UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELLE CRISTINA TANOUE BATISTA

PRODUÇÃO DE DEXTRANASES A PARTIR DE BAGAÇO DE MALTE: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

CURITIBA
2014

MICHELLE CRISTINA TANOUE BATISTA

PRODUÇÃO DE DEXTRANASES A PARTIR DE BAGAÇO DE MALTE: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Engª de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná

Orientadora:
Prof. Dr. Luciana P. S. Vandenberghe e
Coorientadora:
Prof. Dr. Michele Rigon Spier

CURITIBA
2014

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Miriam, pai Maurício, irmãos Ricardo e Maira, família maravilhosa, por sempre apoiarem minhas decisões, por serem meu suporte e minha motivação pra tudo. Amo muito todos vocês.

Ao meu amor, José Anderson, pelo companheirismo e compreensão.

E aos meus amigos especiais que são parte de mim e estão em tudo que eu faço, Robson, Vanessa e Johann. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

À Profª. Luciana por aceitar o desafio de iniciar um novo tema em sua pesquisa. À Profª. Michele, pela coorientação e suporte em etapas importantes deste trabalho. À Profª. Adriane e Prof°. Luciano Huergo pela ajuda em etapas específicas da pesquisa. Ao Prof°. Miguel Noseda pelo pronto atendimento às diversas solicitações indispensáveis para o desenvolvimento do trabalho.

Ao gerente Maurício H. e todos os funcionários da Usina X, na qual foi realizada a aplicação do produto desenvolvido. Foi um grande aprendizado poder trabalhar com vocês, obrigada pelo trabalho competente e por me receberem com tanta atenção. À Angélica Schiavon, amiga eterna, e Fabrício Fregadolli pela grande ajuda.

Aos colegas André Xalalá, Mário, Joana, Suzan, Alejandra, Tânia, Tiemi, Ryu, Ju Oliveira, Rafaela Gonçalves e Valesca. Com vocês esta jornada foi muito mais leve.

Aos queridos Márcio, Dinise e Fernanda pelas horas de bancada, de café, por serem amigos na alegria e na tristeza.

E em especial às minhas valiosas amigas Mitiyo, Mara Eli e Mary Rose. Só por vocês eu continuei até o fim. Agradeço imensamente por tudo que fizeram e ainda fazem. Agora vocês são parte da minha história e da minha família.

À CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Dextranases são enzimas que agem na hidrólise da dextrana. A dextrana é originada pela contaminação bacteriana da cana-de-açúcar, principalmente pelo *Leuconostoc mesenteroides*. Este polissacarídeo causa danos severos ao processo sucroalcooleiro, resultando em açúcar de menor qualidade. Embora estejam disponíveis dextranases comerciais para aplicação não é comum o emprego desta no tratamento do caldo de cana-de-açúcar. Dentre os vários métodos disponíveis, o uso de dextranase é o único capaz de eliminar efetivamente a dextrana. Além da falta de conhecimento sobre os benefícios do uso desta enzima para o processo, o alto preço praticado torna o produto inacessível para a maioria das usinas brasileiras. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo processo para a obtenção de dextranases, empregando resíduos agroindustriais em fermentação em estado sólido (FES). Dentre vários resíduos testados, o bagaço de malte foi o melhor substrato/suporte para a produção de dextranases por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129. Este resíduo é originado após a etapa de filtração do malte na indústria cervejeira e é produzido abundantemente a baixos custos, aproximadamente 15,4 milhões de toneladas ao ano. O bagaço de malte supriu quase todas as necessidades nutricionais do micro-organismo, sendo necessários poucos aditivos sintéticos. Experimentos sequenciais foram utilizados para otimizar a atividade da dextranase. As condições ótimas determinadas foram: sulfato de amônio 0,45 $g.L^{-1}$ dextrana 15 $g.L^{-1}$ com 70% de umidade inicial, pH inicial de 5, utilizando 8 g de bagaço de malte em frascos Erlenmeyer. A atividade de dextranase inicial foi de 62,8 $U.g^{-1}$ e a otimização aumentou em 18% a atividade enzimática, alcançando-se o valor de 75,5 $U.g^{-1}$. A dextranase produzida foi caracterizada e tem pH e temperatura ótimos de 5 e 50°C, respectivamente. A enzima foi separada e concentrada em sistema de ultrafiltração por membranas Pellicon 2 (Millipore). Os estudos de aditivos para conservação da atividade enzimática prolongaram a atividade da enzima em 83% por 120 dias a 37°C com a utilização de ácido cítrico a 0,17% e sorbitol 2,83%. A aplicação da dextranase purificada e concentrada na proporção de 3,5 U por 100 mL de caldo de cana levou à hidrólise de 70% da dextrana contaminante inicial em 10 minutos. Este desempenho foi comparável ao obtido por dextranases comerciais disponíveis. A nova dextranase produzida por FES apresenta potencial de aplicação pela remoção efetiva de dextranas em caldo de cana-de-açúcar, além de empregar um processo limpo com reaproveitamento de resíduos.

Palavras-chave: dextranase, dextrana, fermentação em estado sólido, *Penicillium aculeatum*, indústria sucroalcooleira, bagaço de malte.

ABSTRACT

Dextranases are enzymes that hydrolises dextran. It is synthetized mainly because of bacterial contamination, especially by *Leuconostoc mesenteroides*. This polyssacharide causes several injuries to sugar processing and in spite of commercial dextranases is available; its application is not a commom practice. Lack of knowledge about its application benefits associated with high costs makes this product unreachable for the most of factories. Therefore, the objective of this research was to develop an innovative method for dextranase production employing agroindustrial residues in solid-state fermentation process (SSF). Among Brazilians common wastes tested, brewer's spent grain (BSG) was the best substrate/support for *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 producing dextranase. This waste is generated after mashing and lautering malt grain and widely produced, approximately 15,4 millions of tons each year, Several experiments was carried on in order to improve dextranase activity. Brewer`s spent grain provided almost all nutrients needed for enzyme production. Best conditions determined for maximum dextranase activity in Erlenmeyer were: dextran 15 $g.L^{-1}$ and ammonium sulfate 0.45 $g.L^{-1}$ with 70% initial humidity, pH 5 and using 8 g of brewer's spent grain in Erlenmeyer flasks. Initial dextranase activity was 62.8 $U.g^{-1}$ and optimization increased 18% enzymatic activity, reaching 75.5 $U.g^{-1}$. Dextranase characterization revealed optimum pH and temperature of 5 and 50°C, respectivelly. The enzyme was recovered and concentrated in Pellicon 2 (Millipore) ultrafiltration system. Formulation studies determined that 2.83% of sorbitol and 0.17% of citric acid increased enzyme stability in 83% stored in environmental conditions for 120 days at 37°C. The application of purified dextranase in the concentration of 3.5 U per 100 mL of sugarcane juice led to the degradation of 70% of initial dextran content in 10 minutes. This performance is comparable to available commercial dextranases. The new SSF dextranase has a potential application because of its effective removal of dextrans in contaminated sugar-cane juice, plus, the fermentation is a clean process employing waste.

Keywords: dextranase; dextran; solid state fermentation; *Penicillium aculeatum*; sugar industry; brewer`s spent grain.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I REVISÃO DE LITERATURA

FIG. 1 Galerias abertas pela larva de *Diatraea saccharalis* na cana de açúcar 23
FIG. 2 Estrutura da dextrana..... 23
FIG. 3 Árvore filogenética de parentesco das sequências de dextranases disponíveis em bancos de dados 27
FIG. 4 Esquema geral da obtençao do bagaço de malte..... 37
FIG. 5 Colônias de *Penicillium aculeatum* em placas de ágar..... 39
FIG. 6 Fluxograma das etapas de processamento da cana-de-açúcar até a fábrica de açúcar..... 53
FIG. 7 Sementes e cristais de açúcar..... 55
FIG. 8 Esquema geral da Massa B..... 56
FIG. 9 Esquema geral da Massa A..... 56

CAPÍTULO II PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE DEXTRANASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

FIG. 1 Isolamento e seleção de micro-organismo provenientes de bagaço de cana..... 69
FIG. 2 Fluxograma geral das operações realizadas na seleção de cepas e substratos para a produção de dextranase..... 70
FIG. 3 Obtenção do extrato aquoso a partir de resíduos..... 71
FIG. 4 Produção de dextranases em FSm utilizando diversos extratos aquosos obtidos a partir de resíduos por *P. aculeatum* NRRL 2129..... 80
FIG. 5 Produção de dextranases eem fes em diversos suportes/substratos por *P. aculeatum* NRRL 2129..... 82
FIG. 6 Cinética da produção de dextranases em diferentes substratos..... 83
FIG. 7 Superfície de resposta obtida do planejamento DCCR para estudo influência das variáveis pH e umidade sobre a produção de dextranases por FES..... 89
FIG. 8 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na atividade de dextranase obtida por FES..... 90
FIG. 9 Diagrama de pareto resultante do planejamento Plackett-Burmann..... 92
FIG. 10 Superfície de resposta gerada pela combinação de sulfato de amônio e dextrana na resposta atividade dextranásica..... 95

FIG. 11 Fluxograma de resumo dos experimentos de otimização da solução nutritiva..... 96

CAPÍTULO III CARACTERIZAÇÃO, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASE PRODUZIDA POR FES COM BAGAÇO DE MALTE

FIG. 1 Atividade da dextranase em diferentes pHs..... 108
FIG. 2 Atividade da dextranase de *P. aculeatum* em diferentes temperaturas (T) de incubação..... 109
FIG. 3 Efeito da adição de íons metálicos (1mM) na atividade da dextranase de *P. aculeatum* durante a reação enzimática..... 110
FIG. 4 Efeito da concentração de sólidos solúveis (°Brix) na atividade dextranásica de *P. aculeatum* durante a reação enzimática..... 111
FIG. 5 Efeito da concentração de NaCl na atividade dextranásica de *P. aculeatum* em 48 e 168 h de armazenamento à 4°C..... 112
FIG. 6 Diagrama das operações de ultrafiltração em Pellicon 2 com a representação das taxas de recuperação (%)..... 117
FIG. 7 Gel SDS-PAGE e zimograma obtidos com a submissão de amostras de fermentado..... 120

CAPÍTULO IV FORMULAÇÃO E ESTUDOS DE ESTABILIDADE

FIG. 1 Atividade dextranásica residual durante a incubação do extrato bruto contendo a enzima dextranase produzida por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 em FES em diferentes condições de armazenamento..... 130
FIG. 2 Efeito dos diferentes aditivos na atividade da dextranase..... 133
FIG. 3 Diagrama de Pareto mostrando os efeitos significativos dos aditivos acc e sol na conservação da atividade de dextranase..... 137
FIG. 4 Superfície de resposta obtida a partir do DCCR delineado para o estudo das concentrações finais dos aditivos ACC e SOL na formulação da enzima dextranase 138
FIG. 5 Atividade dextranásica residual comparando amostras formuladas com aditivos e não-formuladas 140

CAPÍTULO V ESTUDOS DE APLICAÇÃO DA ENZIMA DEXTRANASE EM INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

FIG. 1 Médias mensais de dextrana (ppm) e paradas por chuva (h) no eixo principal e recuperação da fábrica de açúcar (%) no eixo secundário..... 153
FIG. 2 Placas trocadoras de calor obstruídas pelo excesso de dextrana 154

FIG. 3 Cristais de açúcar formados na presença de dextrana em níveis normais (< 600 ppm) e níveis altos (>1500 ppm)..... 155
FIG. 4 Respostas da dosagem de dextrana total após adição de dextranas de diferentes pesos moleculares..... 157
FIG. 5 Efeito da concentração de dextranase FES na remoção de dextrana em caldo de cana..... 158
FIG. 6 Efeito do tempo de hidrólise de dextrana do caldo de cana com dextranase produzida 158
FIG. 7 Cinética das enzimas dextranases produzida (FES) e comercial (COM) em diferentes concentrações de dextrana T2000..... 160
FIG. 8 Comparação entre os desempenhos de dextranase produzida por FES e dextranase comercial na hidrólise de dextrana em caldo de cana..... 161
FIG. 9 Recomendação de aplicação da dextranase FES no processo sucroalcooleiro..... 164

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I REVISÃO DE LITERATURA

TAB. 1 Principais características das dextranases isoladas de organismos do gênero *Penicillium* sp ……..... 40

CAPÍTULO II PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE DEXTRANASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

TAB. 1 Níveis das variáveis físico-químicas testadas para a produção de dextranases por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 em FES com bagaço de malte..... 74
TAB. 2 Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para *screening* das variáveis significativas na produção de dextranase por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 em FES..... 75
TAB. 3 Níveis das variáveis estudadas no planejamento DCCR com 3 componentes para a produção de dextranases em FES com bagaço de malte por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129..... 76
TAB. 4 Seleção de linhagens do LPB 1 para a produção de dextranase..... 78
TAB. 5 Resultado da produção de dextranase das cepas padrão NRRL..... 79
TAB.6 Produtividade de dextranases ao longo da cinética de 8 dias com diferentes substratos por *P. aculeatum* NRRL 2129 em FES 84
TAB. 7 Composição físico-química do bagaço de malte..... 86
TAB. 8 Respostas e varíáveis decodificadas do planejamento DCCR 3^3 para avaliação das influências das condições físico-químicas na produção de dextranase por FES..... 87
TAB. 9 Resultados da produção de dextranase por FES no planejamento Plackett-burman para escolha da composição do meio nutritivo..... 92
TAB. 10 Resultados do planejamento DCCR para determinação da concentração ótima dos componentes da solução nutritiva utilizada na produção de dextranase por FES com bagaço de malte..... 94
TAB.11 ANOVA da otimização das concentrações de dextrana, sulfato de amônio e cloreto de potássio para a produção de dextranase..... 94

CAPÍTULO III CARACTERIZAÇÃO, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASE PRODUZIDA POR FES COM BAGAÇO DE MALTE

TAB. 1 Sumário dos resultados da separação do extrato bruto enzimático em sistema de ultrafiltração por unidades de filtro para centrifugação..... 113
TAB. 2 Separaçâo/purificação do extrato enzimático em sistema de membrana do tipo fibra oca Quix Stand..... 115

CAPÍTULO IV FORMULAÇÃO E ESTUDOS DE ESTABILIDADE

TAB. 1 Aditivos empregados na etapa de pré-seleção de componentes para formulação de dextranases produzidas em FES em bagaço de malte por *Penicillium aculeatum*..... 128
TAB. 2 Níveis das variáveis estudadas para a avaliação da interação de aditivos para formulação de dextranase produzida em FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129..... 129
TAB. 3 Variáveis independentes e seus níveis testados na determinacao da concentracao final dos componentes da formulaçâo da enzima dextranase produzida em FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129..... 129
TAB. 4 Atividades residuais de dextranase com a combinação dos diferentes aditivos e seus níveis codificados..... 136

CAPÍTULO V ESTUDOS DE APLICAÇÃO DA ENZIMA DEXTRANASE EM INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

TAB. 1 Parâmetros cinéticos determinados para as dextranases comercial e produzida neste trabalho..... 160
TAB. 2 Plano de ação proposto para eliminar ou diminuir os problemas causados pelo excesso de dextrana..... 166

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

EC - Enzyme Comission

FES – fermentação no estado sólido

FSm – fermentação submersa

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

ICUMSA - International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis

K_m - constante de Michaelis-Mentem

MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

SDS-PAGE – Sodium dodecil sulfate – Poliacrylamide Gel Electrophoresis

TOF/TOF – Time-Of-Flight/ Time-Of-Fligh

U – unidade de atividade enzimática

U g^{-1} – µmol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto em 1 g de matéria seca (atividade enzimática)

U mL^{-1} – µmol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto em 1 mL (atividade enzimática)

U mg^{-1} – µmol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática em 1 minuto por mg de proteína (atividade enzimática específica)

VHP – Very high polarization

$V_{máx}$ – velocidade máxima de reação

Sumário

1 INTRODUÇÃO 16

2 OBJETIVOS 19

2.1 Objetivo Geral 19

2.2 Objetivos específicos 19

CAPÍTULO I REVISÃO DE LITERATURA 20

1 DEXTRANA 21

2 DEXTRANASE 24

2.1 Produção de dextranases 27

2.2 Separação de dextranases produzidas por Fermentaçao Submersa (FSm) 30

3 PROBLEMAS CAUSADOS PELA DEXTRANA NO PROCESSO SUCROALCOOLEIRO 33

4 BAGAÇO DE MALTE 35

5 *Penicillium* sp 37

6. FORMULAÇÃO E ESTUDOS DE ESTABILIDADE 40

6.1 Legislação 40

6.2 Produtos Biológicos e Biotecnológicos 42

6.2.1 Enzimas 43

6.3 Estudos de estabilidade 46

7 FABRICAÇÃO DO AÇÚCAR 49

7.1 Pré-tratamentos do caldo de cana 50

7.2 Fabricação do açúcar 53

CAPÍTULO II PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO 64

1 INTRODUÇÃO 65

2 MATERIAIS E MÉTODOS 66

2.1 Ensaios preliminares 66
2.2. Estudos de produção de dextranases por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 .. 69
2.3 Produção do inóculo em meio extrato de bagaço de malte 71
2.4 Determinação da composição do bagaço de malte 72
2.5 Preparação do extrato enzimático 72
2.6 Determinação da atividade dextranásica 72
2.7 Otimização da produção de dextranase por *P. aculeatum* em FES utilizando bagaço de malte 73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 76
3.1 Estudos preliminares 76
3.2 Produção de dextranases por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 78
3.3 Determinação da composição físico-química do bagaço de malte 84
3.4 Otimização da produção de dextranase por *P. aculeatum* NRRL 2129 em FES utilizando bagaço de malte 86
4 CONCLUSÕES 95

CAPÍTULO III CARACTERIZAÇÃO, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASE PRODUZIDA POR FES COM BAGAÇO DE MALTE 99
1 INTRODUÇÃO 100
2 MATERIAL E MÉTODOS 101
2.1 Micro-organismo 101
2.2 Produção de extrato enzimático de dextranases para caracterização e purificação da enzima 101
2.3 Determinação de proteínas totais 102
2.4 Determinação da atividade de dextranases 102
2.5 Determinação do pH ótimo de ação da enzima dextranase 102
2.6 Determinação da temperatura ótima de ação da enzima dextranase 103
2.7 Estudo da influência de íons metálicos na atividade enzimática de dextranase 103
2.8 Estudo da influência da concentração de sólidos solúveis (°Brix) 103
2.9 Estudo da influência de diferentes concentrações de NaCl 103
2.10 Microfiltração do extrato enzimático 104
2.11 Ultrafiltração do extrato enzimático de dextranases em sistema Amicon 104
2.12 Ultrafiltração do extrato enzimático de dextranases em conjunto Quix Stand 104
2.13 Ultrafiltração do extrato enzimático de dextranases em Pellicon 2 105
2.14 Eletroforese SDS-PAGE 105

2.15 Zimograma 105
2.16 Espectrometria de massa Maldi Tof-Tof 106
2.17 Identificação da Dextranase 106
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 107
3.1 Determinação do pH ótimo da enzima dextranase 107
3.2 Determinação da temperatura ótima da enzima dextranase 108
3.3 Estudo da influência da adição de íons metálicos na atividade enzimática de dextranase 108
3.4 Estudo da influência da concentração de sólidos solúveis (ºBrix) sobre na atividade de dextranases de *P. aculeatum* 109
3.5 4 Estudo da influência da concentração de NaCl na estabilidade da atividade enzimática 110
3.6 Ultrafiltração do extrato enzimático no sistema Amicon®Ultra 112
3.7 Ultrafiltração do extrato enzimático em sistema de filtração tangencial Quix-stand (GE) 113
3.8 Ulrafiltração do extrato enzimático em sistema Pellicon 2 114
3.9 SDS-PAGE e Zimograma 118
4 CONCLUSÕES 120

CAPÍTULO IV FORMULAÇÃO E ESTUDOS DE ESTABILIDADE 123

1 INTRODUÇÃO 124
2 MATERIAL E MÉTODOS 125
2.1 Preparo das amostras de enzima para os testes de estabilidade 125
2.2 Determinação da atividade de dextranase 125
2.3 Estudo da estabilidade do extrato bruto de dextranases 126
2.4 Formulação de extrato enzimático de dextranases 126
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 129
3.1 Estabilidade do extrato bruto de dextranase produzida por FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 129
3.2 Formulação da enzima dextranase produzida em FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 131
3.3 Estudo comparativo do extrato de dextranases com aditivos e sem aditivos 138
4 CONCLUSÕES 141

CAPÍTULO V ESTUDOS DE APLICAÇÃO DA ENZIMA DEXTRANASE EM INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA 144

1 INTRODUÇÃO 145

2 MATERIAL E MÉTODOS 146

2.1 Obtenção do extrato enzimático de dextranase para os estudos de aplicação 146

2.2 Determinação de atividade de dextranase 147

2.3 Determinação da dextrana total 147

2.4 Efeito da massa molecular da dextrana na quantificação pelo método rápido . 147

2.5 Avaliação do potencial de aplicação da dextranase produzida em FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 no processo sucroalcooleiro 147

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 150

3.1 Visão geral dos testes de desempenho da enzima dextranase produzida em usina sucroalcooleira 150

3.2 Quantificação de dextranas de diferentes massas moleculares pelo método rápido 154

3.3 Estudo do efeito da concentração da dextranase produzida sobre a hidrólise de dextrana do caldo de cana 155

3.4 Efeito do tempo no tratamento enzimático de caldo de cana com dextranase produzida 156

3.5 Comparação de desempenho entre dextranase produzida e dextranase comercial 157

3.6 Considerações sobre a aplicação da dextranase produzida por FES no processo sucroalcooleiro 160

3.8 Plano de ação para o combate ao excesso de dextrana 163

4 CONCLUSÕES 165

CONSIDERAÇÕES FINAIS 167

1 INTRODUÇÃO

Dextranases (E.C. 3.2.1) compõem um grupo de enzimas capazes de hidrolisar a dextrana, um polímero de glicose relacionado a problemas na indústria sucroalcooleira. A dextrana é um polissacarídeo associado à deterioração da cana-de-açúcar e é produzido principalmente pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, um contaminante natural da cultura. A quantidade de dextrana gerada está relacionada a fatores tais como higiene, infestação das plantações, tipo de solo, temperatura, umidade e outros (SOLOMON, 2000).

Os problemas no processamento do caldo de cana causados pela dextrana são diversos e se intensificam conforme há aumento da sua concentração. Este polissacarídeo aumenta a viscosidade do caldo e das massas de cana, levando a uma série de transtornos no processamento, como: entupimento das placas trocadoras de calor, problemas na centrifugação das massas de açúcar, problemas na cristalização do açúcar, na clarificação e na evaporação, além da produção de açúcar de baixa qualidade. Embora o processo de produção do açúcar seja o mais afetado, alguns processos fermentativos também podem ser prejudicados pelo excesso de dextrana, tendo efeitos também na produção do etanol. Diferentes propostas têm sido apresentadas para diminuir estes impactos no processo, no entanto, apenas a aplicação da dextranase pode efetivamente remover a dextrana (PURUSHE *et al*., 2012).

As dextranases comerciais disponíveis hoje no Brasil não são empregadas de forma rotineira devido aos altos custos. De forma geral, os danos causados ao processo pela presença de dextranas são subestimados e esta alternativa é vista como inacessível pela maioria das usinas. O setor sucroalcooleiro é uma das atividades econômicas mais importantes no Brasil, além da vasta produção açucareira, as culturas de cana resultam no etanol e na bioenergia. A indústria sucroalcooleira é responsável por 2% do PIB nacional e o açúcar brasileiro representa 50% do total de exportações

mundiais. Na safra 2012/2013 o PIB do setor atingiu U$ 48 bilhões e estima-se que este valor possa chegar a 90 bilhões até 2020 (UNICA, 2013).

A destinação de resíduos orgânicos têm sido de grande interesse nos últimos anos (RAMACHANDRAN *et al*., 2007). Resíduos como farelos, cascas, bagaços, polpas e sementes têm sido empregados com sucesso em alguns bioprocessos, já que estes fornecem boas condições para o crescimento de micro-organismos, suplementando algumas necessidades nutricionais (PANDEY e SOCCOL, 1998; PANDEY, 1994), além de reduzir os custos de produção em larga escala (RAMACHANDRAM *et al*., 2007) e minimizar os efeitos poluidores. Considerando a natureza de resíduos sólidos, a fermentação no estado sólido (FES) é uma alternativa para a sua reutilização no estado bruto ou com pré-tratamentos simples (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Diversos resíduos foram estudados para obtenção de produtos biotecnológicos por FES, como ácidos orgânicos, polissacarídeos, etanol, cogumelos, aminoácidos, entre outros. Alguns resíduos destacam-se, como o bagaço de cana-de-açúcar (PANDEY, 1994); a polpa cítrica (SPIER *et al*., 2008), bagaço de mandioca (PRADO et al, 2005) e o bagaço de malte (ALIYU e BALA, 2011). Na produção de enzimas, diversos trabalhos obtiveram sucesso no reuso de resíduos para FES, como a obtenção de fitases a partir fibra de trigo (SALMON *et al*.,2012) e da polpa cítrica (SPIER *et al*., 2011), obtenção de amilases pelo emprego do bagaço de mandioca (PANDEY *et al*., 2000), mananases a partir de cascas de soja, lacases (DHILLON *et al*., 2012) e alfa-amilases (FRANCIS *et al*., 2002) a partir de bagaço de malte.

O mercado cervejeiro brasileiro é o terceiro maior em consumo no mundo todo, atrás apenas dos EUA e China, atingindo 13 bilhões de litros por ano, segundo a CervBrasil. Além do grande mercado consumidor, o setor produtor de cerveja tem se expandido e, consequentemente, produzindo mais resíduos. Entre os diversos resíduos gerados pelas cervejarias, o que tem maior impacto em produção e volume é o bagaço de malte, atingindo uma produção aproximada de 15,4 milhões de toneladas/ano (FAO, 2013). Em geral, o resíduo é doado ou fornecido a baixos custos (MUSSATO *et al*, 2006). Visto o potencial de ampliação deste setor no Brasil e sua disponibilidade não sazonal, o bagaço de malte apresenta um grande potencial para reutilização e obtenção de produtos de alto valor.

Devido à relevância da agroindústria sucroalcooleira no Brasil e às necessidades de tecnologias para o avanço do setor sucroalcooleiro, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de dextranases por FES, empregando resíduos agroindustriais brasileiros, como o bagaço de malte.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo processo para a produção de dextranases obtidas por FES empregando resíduos agroindustriais brasileiros e sua separação, purificação, formulação e aplicação.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar micro-organismo(s) produtores de dextranases;
- Selecionar resíduo(s) agroindustrial(ais) para ser(em) empregado(s) como suporte(s)/substrato(s) em fermentação em estado sólido para produção de dextranases;
- Otimizar as condições físico-químicas e composição do meio para a produção de dextranases;
- Caracterizar a(s) enzima(s) produzida(s);
- Separar e purificar a(s) dextranase(s) produzidas;
- Estudar formulações de dextranase(s) produzida(s) de modo a se obter um produto enzimático estável;
- Avaliar a estabilidade da(s) dextranase(s) em diferentes condições de armazenamento;
- Avaliar o potencial de aplicação do produto obtido na indústria sucroalcooleira.

CAPÍTULO I
REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros estudos da enzima dextranase datam da década de 50 e envolvem o gênero *Penicillium*. As enzimas foram inicialmente estudadas e isoladas na tentativa de se desenvolver um produto formulado de dextrana de massa molecular definida para a elaboração de um substituto de plasma sanguíneo (KHALIKOVA *et al*., 2003). Ainda sobre o aspecto clínico, alguns estudos foram direcionados para a aplicação odontológica no combate à placa dentária, a qual é constituída por exopolissacarídeos secretados principalmente por *Streptococcus mutans* (DONKERSLOOT e HARR, 1979).

A aplicação de dextranases no processo industrial sucroalcooleira iniciou na Austrália na década de 70. O lançamento do primeiro produto comercial aconteceu na década de 80 pela empresa Sankyo, a qual elaborou uma dextranase oriunda do fungo filamentoso *Chaetomium gracile*, responsável pela maior parte da produção comercial.

A partir da década de 80 os artigos científicos passam a apresentar estudos sobre as dextranases com aplicação no processo sucroalcooleiro. Durante o processamento da cana-de-açúcar a presença da dextrana prejudica a formação dos cristais e dificulta a centrifugação pelo aumento da viscosidade (JIMÉNEZ, 2005).

A maioria das dextranases comerciais provém de empresas internacionais. Os altos custos de importação tornam o produto inacessível para o mercado brasileiro, um dos maiores produtores de açúcar do mundo e o maior exportador mundial, dominando 50% do mercado de exportações (UNICA, 2013).

O desenvolvimento de um novo processo para a produção da enzima com emprego de resíduos ou matéria-prima de baixo custo pode tornar este produto economicamente viável, além de propiciar o reaproveitamento destes resíduos. O resultado esperado com o emprego de dextranases seria auxiliar no controle dos problemas gerados pela presença de dextrana no açúcar, o qual precisa estar classificado dentro de especificações de qualidade a serem

cumpridas pela indústria sucroalcooleira, ou seja, cristais de açúcar formados na ausência de dextrana.

1 DEXTRANA

A dextrana é um polissacarídeo sintetizado pela enzima dextranasacarase (RODRIGUES *et al*., 2005) presente em vários organismos, principalmente em linhagens bacterianas. Os principais gêneros produtores de dextrana são *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, sendo a espécie *Leuconostoc mesenteroides* a mais amplamente estudada. Esta espécie é a principal contaminante dos processos de produção açucareira, tanto na matéria-prima beterraba, de regiões temperadas, quanto na cana-de-açúcar, típica de regiões tropicais (DAY, 1992).

A produção da dextrana ocorre principalmente na colheita e durante o processamento, quando as polpas açucaradas das matérias-primas são expostas à microflora natural da planta, disponibilizando a sacarose à ação da enzima dextranasacarase (SALASSI, 2004).

A principal função biológica deste polímero é a estocagem de reservas para os organismos que possuem também a enzima dextranase. Além disso, a produção do polímero está associada ao processo de ancoragem das bactérias a suportes, como por exemplo, na formação da placa dentária por *Streptococcus mutans* (KHALIKOVA *et al*., 2005). Outra condição que pode aumentar a formação de dextrana é a infestação das culturas por pragas. No Brasil, a larva da mariposa *Diatraea saccharalis* é uma grande responsável por estas perdas e está disseminada por todo território. Estes túneis formados expõem a polpa e a planta fica suscetível ao ataque de fungos, como *Fusarium* sp e *Colletotrichum* sp, causadores da podridão vermelha que acelera o processo de deterioração. A FIGURA 1 exibe os danos causados pela ação de pragas e colonização fúngica.

FIGURA 1 GALERIAS ABERTAS PELA LARVA DE *Diatraea Saccharalis* NA CANA-DE-AÇÚCAR. FONTE: A autora (2014).

As dextranas são constituídas por unidades de D-glicose unidas por ligações α 1-6, em uma estrutura linear, podendo também ter ramificações α 1-2, α 1-3 ou α 1-4, constituindo um polímero de alta massa molecular (BROWN e INKERMAN, 1992). Na FIGURA 2, observa-se dois tipos de ligações possíveis. O tipo de estrutura varia com o organismo e o padrão de ramificação pode afetar a solubilidade, sendo que quanto maior a linearidade da cadeia, maior a solubilidade (DAY, 1992). A massa molecular das dextranas varia de 15 kDa até mais de 2000 kDa (CUDDIHY E DONALD, 1999).

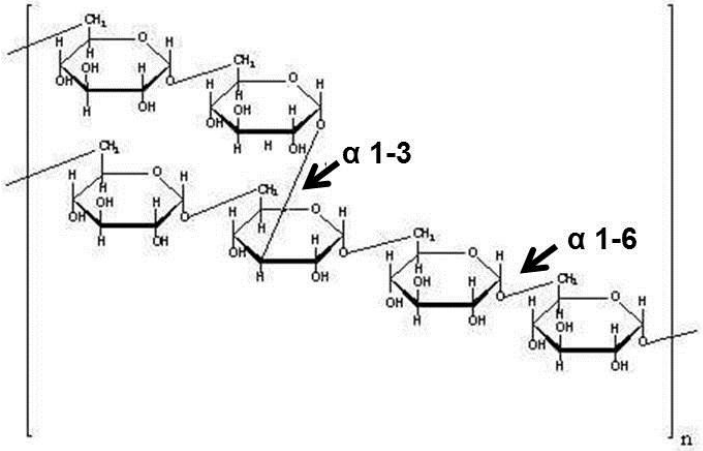

FIGURA 2. ESTRUTURA DA DEXTRANA . ADAPTADO DE EGGLESTONE *et al.*, 2009

A massa molecular das dextranas isoladas de caldos de cana e açúcares é em média 5000 Da (BROWN e INKERMAN, 1992). A presença deste polissacarídeo no processo industrial de produção do açúcar causa o aumento da viscosidade do caldo de cana, prejudicando o padrão de cristalização e provoca alterações na cor final do açúcar, diminuindo o seu valor de mercado. Além dos problemas de processamento, a dextrana presente em caldos, massas e no açúcar final altera a precisão analítica do grau de polarização do açúcar, devido à natureza dextrorotatória da molécula. Sua alta viscosidade torna menos eficiente a clarificação dos caldos para a análise de polarização, produzindo um líquido de alta turbidez que deve ser tratado antes da passagem pelo polarímetro (SINGLETON *et al*., 2002).

Embora indesejada nos processos industriais açucareiros, as dextranas possuem aplicações de importância clínica, principalmente aquelas de baixa massa molecular (25 kDa a 75 kDa), sendo utilizadas no preparo de soluções substitutas de plasma sanguíneo (KIM e DAY, 1994). Os polímeros, entre eles a dextrana, agregam uma série de características favoráveis à liberação controlada de drogas, como a baixa toxicidade e a liberação específica dos princípios ativos quando comparados às formulações convencionais, além de serem facilmente eliminados pelo organismo (SCOMPARIM *et al*., 2001).Uma das derivações deste polímero, a dextrana-sulfato (7300 kDa) é empregada como anticoagulante de baixa toxidade (substituto de heparina), tendo importante papel na interação com glicoproteínas do HIV, dificultando a ligação do vírus às células CD4. Outros derivados são dextrana-Ferro e mercaptodextrana, aplicados em outras formulações clínicas. Ademais, há o envolvimento da dextrana na formulação alimentícia, como espessante; na formulação cosmética e no encapsulamento de drogas de liberação lenta (PATEL *et al*., 2010; MEHVAR, 2000). A dextrana insolúvel (*cross-linked*) é amplamente utilizada em metodologias de separação (KIM e DAY, 1994).

2 DEXTRANASE

As enzimas dextranases (E.C. 3.2.1) pertencem ao grupo das glicosil hidrolases e clivam as ligações α 1-6 da cadeia principal do polissacarídeo dextrana (KHALIKOVA *et al*., 2005). Este grupo de enzimas é bastante diverso no que diz respeito ao modo de ação e ao tipo de produto liberado. As dextranases podem ter origem fúngica ou bacteriana, estando presentes em algumas leveduras. Também são encontradas nos rins, fígado, intestino delgado e baço (SUGIURA, 1973). De acordo com o NCIUB-MB (*Nomenclature Comittee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) os subgrupos desta categoria são:

A - Endodextranase (EC 3.2.1.11), as quais geram fragmentos de dextrana e oligossacarídeos, atuando de forma aleatória nas ligações α1-6 da cadeia principal. São produzidas por fungos e bactérias, sendo que os fungos possuem as melhores atividades enzimáticas. Os fungos reportados na literatura são dos gêneros *Penicillium* (ABDEL-NABY *et al*., 1999), *Chaetomium* e *Aspergillus* (RAOKAH *et al*., 1973), além da espécie *Paecilomyces lillacinus* (LEE e FOX, 1985). Entre as bactérias produtoras desta categoria estão *Arthrobacter*, *Bacteroides*, *Bacillus* (KHALIKOVA *et al.,* 2003), *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* (WALKER *et al*., 1980) e (WYNTER *et al*., 1996).

Destaca-se sobre esta enzima, originaria de fungos, a capacidade de degradar a dextrana *cross-linked* (Sephadex) (SUGIURA *et al*., 1973).

B – Glicano-1,6-α-D-glucosidase (EC 3.2.1.70), uma exodextranase formadora de glicose que atua nas extremidades redutoras da dextrana ou dos oligossacarídeos. Os principais produtores desta classe são principalmente bacterianos, do gênero *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (KHALIKOVA *et al*., 2005).

C – Glicano-1,6-α-isomaltosidase (EC 3.2.1.94), formadora de maltoses livres que clivam as extremidades não redutoras da dextrana, sendo, desta forma, capazes de liberar as ligações α1-2, α1-3, α1-4 das dextranas

ramificadas. Os produtores desta categoria de dextranase são *Arthrobacterium globiformis* T6 e *Actinomadura* sp R10 (KHALIKOVA *et al*., 2005).

D – Dextrana-1,6-α-D-isomaltotriosidase (EC 3.2.1.95), atua na cadeia principal liberando isomaltotriose. Apenas as dextranases das espécies *Brevibacterium fuscum* e *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum* foram identificadas nesta classe (KHALIKOVA *et al*., 2005).

E - Dextranaexo-1,2-α-glucosidase (EC 3.2.1.115), desramificadora. Esta enzima libera D-glicose e atua apenas nas ramificações α1-2 das dextranas. Apenas o gênero *Flavobacterium sp* M-73 se encaixa nesta categoria (KHALIKOVA *et al*., 2005).

Em outro sistema de classificação, CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes*), as enzimas são agrupadas de acordo com a similaridade entre a sequência de aminoácidos, que refletem o parentesco evolucionário entre as enzimas pela característica estrutural proteica e, consequentemente, reflete em diferentes mecanismos de ação. As dextranases são classificadas nas famílias glicosil hidrolases números 13, 15, 27, 49 e 66 (CANTAREL *et al*., 2009).

Em artigo de revisão, autores reuniram 13 sequências protéicas, alinhando-as e analisando a relação de parentesco entre elas. Ficou evidente que esta relação não é muito esclarecedora, portanto, embora as dextranases atuem de forma semelhante, suas estruturas primárias diferem grandemente (KHALIKOVA *et al*., 2005). O alinhamento das sequências está demonstrado na árvore filogenética da FIGURA 3.

A principal aplicação das dextranases é na degradação de dextranas que contaminam a matéria-prima nas usinas sucroalcooleiras. Os polissacarídeos dextrana são produzidos pelos contaminantes naturais da cana-de-açúcar, principalmente o *Leuconostoc mesenteroides* (OLIVEIRA *et al*., 2002). A quantidade do polímero produzida está relacionada às condições climáticas e às condições de colheita, sendo que os países tropicais que utilizam cana-de-açúcar sofrem mais com contaminantes, pela alta temperatura, do que os países temperados, que fabricam açúcar a partir da beterraba (DAY, 1992; SALASSI, 2004). Além disso, o sistema de corte

mecanizado fragmenta o caule em vários pedaços, expondo uma área maior à ação microbiana, podendo aumentar a síntese de dextrana.

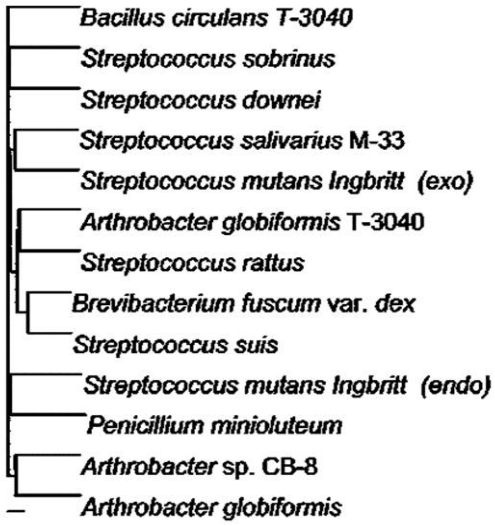

FIGURA 3. ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PARENTESCO DAS SEQUÊNCIAS DE DEXTRANASES DISPONÍVEIS EM BANCOS DE DADOS. FONTE: KHALIKOVA *et al*.,(2005)

Pequenas quantidades da enzima são capazes de clarificar o caldo de cana e reduzir a viscosidade de forma significativa, sendo que, atualmente, a única solução possível para a remoção de dextranas no processo açucareiro é a aplicação dessas enzimas. Outros métodos como filtração a vácuo e osmose reversa já foram propostos na tentativa de remover a dextrana do caldo, no entanto, nenhuma destas alternativas mostrou-se eficaz e economicamente acessível (JIMÉNEZ, 2005). Embora muitos estudos tenham sido realizados para a bioprospecção de novos produtores da enzima, poucos rumaram ao desenvolvimento de um produto de aplicação comercial, pelas características restritas de atuação da enzima, pelos altos custos de purificação ou pela baixa quantidade de dextranase secretada (PURUSHE *et al*., 2012).

Outra questão a ser considerada é que os produtos destinados à aplicação nas usinas têm uma grande diversidade de protocolos, sendo que algumas formulações são mais concentradas, divergindo das recomendações de dosagem (em ppm). Cada enzima tem uma faixa ótima de temperatura e tempo de reação, além de características peculiares para aplicação de cada usina, tais como qualidade da matéria prima, quantidade de caldo, tipo da

planta industrial. Tais características refletem em uma grande variação de fatores para o desenvolvimento de uma metodologia generalista (EGGLESTONE e MONGE, 2005). No entanto, apesar da não uniformidade dos protocolos, a quase totalidade dos produtos disponíveis são provenientes do gênero *Chaetomium* (JIMÉNEZ, 2005).

Outra aplicação promissora da dextranase é na formulação de produtos que combatem a placa dentária, como enxaguantes bucais, cremes dentais e gomas de mascar. A enzima age nos biofilmes formados pelos micro-organismos da flora bucal, principalmente do gênero *Streptococcus*, os quais secretam polissacarídeos de adesão às superfícies lisas do esmalte do dente. Esses exopolissacarídeos são formados principalmente de unidades de glicose ligadas por ligações α1-3, conferindo insolubilidade ao polímero. Estas placas estão associadas à ocorrência de cáries, uma vez que o biofilme forma uma matriz que facilita a colonização por micro-organismos (MAROTTA *et al*., 2002; HAYACIBARA *et al*., 2004).

As dextranases também têm sido aplicadas na formulação de isomaltooligossacarídeos (IMOs), os quais promovem o crescimento do gênero *Bifidobacterium sp* nos intestinos, resultando em um efeito prebiótico. As enzimas foram utilizadas para a quebra da dextrana de forma controlada e específica, resultando nos IMOs de interesse. A dextranase foi utilizada na forma imobilizada (ASLAN e TANRIVESEN, 2007), conjugada com dextranasacarases (ERHARDT e JÖRDENING, 2007) e também foram produzidas com a aplicação de recursos da engenharia genética, inserindo os genes de dextranasacarase e dextranase em um mesmo organismo (KIM *et al*., 2009; RYU *et al*., 2010).

Aplicações clínicas da dextranase estão associadas à quebra da dextrana. Dextranas de alta massa molecular são hidrolisadas e purificadas em uma massa molecular definida, dependendo da aplicação (KIM e DAY, 1994).

2.1 Produção de dextranases

Na literatura publicada, até a data desta revisão, estão apenas relatados meios de cultivo líquidos com componentes sintéticos e em sistema de fermentação submersa para a produção de dextranases. É grande a

variação das características físico-químicas, massa molecular, especificidade e ponto isoelétrico dentre as dextranases, mesmo daquelas provenientes de um mesmo gênero.

As fontes de carbono estudadas para a produção da enzima são bastante diversificadas tais como amido, amilopectina (OBARA-DOI *et al*., 2003) frutose, maltose, celulose, glicerol, sorbitol (MADHU e PRABHU, 1984), sacarose (SKULA *et al*., 1989), além de outras fontes que não favoreceram a atividade da enzima. Em um estudo com *Penicillium lilacium* (DAS e DUTTA, 1996), os autores conseguiram aumentar a atividade enzimática utilizando junto com a dextrana o açúcar maltose no meio de cultivo nas concentrações de 0,75% e 0,25%, respectivamente. Estes estudos reforçam a característica indutiva da dextranase com a necessidade de utilização da dextrana no meio de cultivo.

Poucos artigos sobre dextranases tratam da otimização da produção da enzima e poucas possibilidades de fontes de carbono e de nitrogênio foram testadas. Em geral, é utilizada uma mistura complexa de sais para suplementação, embora alguns meios sejam bastante simplificados. Desta forma, muitos artigos apresentam produções de dextranase em baixos níveis, como exemplo, no trabalho com *Fusarium* sp., em meio com 1% de dextrana, mistura de sais, polipeptona 0,3% e extrato de levedura 0,3%, em sistema agitado durante 7 dias alcançaram 35 $U.mL^{-1}$ de produção (SHIMIZU *et al*., 1998).

De acordo com Madhu e Prabhu (1984), em estudo com *P. aculeatum* em FSm com diferentes fontes de nitrogênio, o extrato de levedura propiciou maiores atividades quando comparado às fontes inorgânicas. De forma semelhante, também em estudos com FSm, com *Aspergillus sp* (ABDELWAHED *et al*., 2013) e *Streptomyces sp* (PURUSHE *et al*., 2012) as fontes extrato de levedura e triptofano, respectivamente, foram as melhores para a atividade enzimática de dextranase. Desta forma, é possível presumir que as fontes de nitrogênio preferidas para a produção de dextranase devem incluir fontes orgânicas para maiores atividades enzimáticas.

Os estudos de otimização começaram em 1983 (MADHU e PRABHU, 1984), com o estudo de *Penicillium aculeatum*. A atividade enzimática partiu de 60-70 $U.mL^{-1}$ para 228-230 $U.mL^{-1}$ no meio otimizado de Fukumota: 2%;

$NaNO_3$ 2%; K_2PO_4 0,2%, extrato levedura 0,2% e pH inicial 6,3-6,5, incubado a 30°C por 96 h. Neste estudo, houve a variação na concentração dos sais e dos valores de pH de forma simples, sem a utilização dos planejamentos experimentais empregados mais recentemente.

Em um estudo de 1989, Shukla *et al.* testaram vários meios de cultivo líquidos com três espécies do gênero *Penicillium*: *P. aculeatum*, *P. purpurogenum* e *P. funiculosum*. Os meios testados foram Fukumota, Tshchyia, Kosaric e Stacey modificado. A maior concentração obtida foi com o meio Fukumota, a partir de *P. aculeatum*, chegando à atividade de 58 $U.mL^{-1}$ e atividade específica de 292 $U.mg^{-1}$. O *P. aculeatum* destacou-se por produzir dextranases exclusivamente extracelulares, e a sua estabilidade sob refrigeração é ressaltada pelos autores.

Os delineamentos experimentais e metodologia de superfície de resposta, os quais consideram a interação entre os fatores e produzem resultados estatísticos confiáveis, têm sido vastamente empregados como ferramenta para a otimização de bioprocessos. Estes planejamentos geralmente requerem menor quantidade de ensaios, reduzindo custos e tempo. Empregando esta técnica para avaliação da influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio por *Fusarium* sp, autores (OBARA-DOI *et al*., 2003) alcançaram o máximo de produção de dextranase (0,9 $U.mL^{-1}$) com meio constituído de (m/v): amilopectina 0,8%; dextrana T-2000 1,0% e extrato de levedura 0,9%. Ainda dentro dessa metodologia, outro estudo combinou fatores físico-químicos com variações na composição do meio para o micro-organismo *Streptomyces* sp. A melhor condição alcançada foi cultivo na temperatura de 40°C e a melhor fonte de nitrogênio foi triptofano 0,1 $g.L^{-1}$ (PURUSHE *et al*., 2012) sendo que a máxima produção da enzima não foi relatada. Em pesquisa com *Aspergillus sp* foram considerados fatores como tempo de cultivo, tamanho do inóculo, idade do inóculo, volume do meio e composição do meio para os delineamentos experimentais. As condições ótimas foram dextrana 2,1 $g.L^{-1}$; 52,47 mL de meio e tempo de incubação 80, 48 h, alcançando 438 $U.mL^{-1}$ de dextranases. Também por meio de delineamentos experimentais, neste estudo vários sais foram influentes na atividade da enzima. Os componentes significativos foram K_2HPO_4, $NaNO_3$, NaCl, $MgSO_4.7H_2O$ (ABDELWAHED *et al*., 2013).

2.2 Separação de dextranases produzidas por Fermentaçao Submersa (FSm)

As estratégias de separação e purificação de enzimas variam muito quanto às metodologias e etapas utilizadas. A porcentagem de recuperação depende do sucesso e boa definição dos métodos a serem empregados, os quais devem ser escolhidos de acordo com a enzima produzida.

Primeiramente, deve ocorrer a separação das células, para a qual predomina a centrifugação. Contudo, a filtração também pode ser empregada. O uso do conjunto filtrante Miracloth para retirar o micélio de *P. notatum* (PLESZCZYNSKA *et al*., 1996) e micélio de *Sporothrix schenckii* (ARNOLD *et al*., 1998) foi reportado.

As enzimas intracelulares devem passar por etapas suplementares de rompimento celular. Alguns autores relatam formas diferentes de separação, como a sonicação e uso de prensa (*French Press*) (CHEETAM e RICHARDS, 1972) para a extração da dextranase intracelular.

O trabalho de Arnold *et al*. (1998) recuperou 92% da dextranase produzida pelo fungo *Sporothrix schenckii* com a precipitação por sulfato de amônio (66,2 g em 100 mL) *overnight*. Após a cromatrografia em Biogel e separação em HPLC, a recuperação final da enzima foi de 67%.

Pleszczynska *et al*. (1996) obtiveram alto índice de recuperação de dextranase com a liofilização do extrato bruto, atingindo 90%. Neste trabalho foram identificadas duas dextranases de diferentes massas moleculares que se separaram na etapa de cromatrografia em CM Sepharose, atingindo recuperação final de 48% da dextranase I e 29% da dextranase II. Não realizaram a precipitação com sulfato de amônio.

No trabalho com *Bacillus* sp isolado do solo, os autores Khalikova *et al*. (2003) atingiram o máximo de 78500 $U.g^{-1}$ de atividade dextranásica após precipitação em sulfato de amônio, separação em duas fases com PEG e posteriormente a cromatografia em DEAE-Sepharose.

Dentre os trabalhos que relatam a precipitação tipo *salting out* com sulfato de amônio, as concentrações empregadas mais comuns deste componente são 80% de saturação (PURUSHE *et al*, 2012; DAS e DUTTA, 1996; WYNTER

et al., 1997) e 60% de saturação (RICHARDS e STREAMER, 1972). O sal $(NH_4)_2SO_4$, foi empregado nas seguintes concentrações: 66,2 g/100 mL (ARNOLD *et al*., 1998), 561 g/1000 mL (HOSTER *et al*, 2001); 68 g/100 mL (KHALIKOVA *et al*., 2003) e quantidade não relatada por Sugiura *et al*., (1973). Outros agentes de extração líquido-líquido (duas fases aquosas) foram utilizados, tais como PEG (KHALIKOVA *et al*., 2003), isopropanol (SHIMIZU *et al*., 1998) e etanol (KOENIG e DAY, 1989).

As cromatografias utilizadas foram combinadas em muitos trabalhos, a maioria seguindo etapas sequenciais até a obtenção da enzima purificada. Merece ser destacado o trabalho de Hatada *et al*. (2004), que estudaram a enzima recombinante de *Arthrobacter* sp. expressa em *Bacillus subtilis*. Os autores atingiram a recuperação de 95% da enzima utilizando apenas uma cromatografia de troca aniônica em DEAE-Toyopearl 650M, com coluna de 2,5 cm por 15 cm. Após a eluição com solução NaCl 40 mM, as frações ativas foram unidas e a etapa seguinte foi a concentração em membrana PM-10 (Millipore, corte de 10 kDa). O concentrado enzimático apresentou 43 $U.mg^{-1}$ de atividade específica e a massa molecular da enzima foi estimada em 65,5 kDa.

O QUADRO 1 resume algumas operações de purificação de enzimas dextranases com linhagens não recombinantes e enzimas não imobilizadas.

QUADRO 1. RESUMO DAS METODOLOGIAS DE PURIFICAÇÃO DE DEXTRANASES REPORTADAS NA LITERATURA PRODUZIDAS POR FSm.

Cromatografia (s)	Observações	Ref.
CEM - Bio Gel P 200 91.5 x 3.5 cm	Duas dextranases D1- 49.5% pureza AE 21.7 U/mg D2-38.7% pureza AE 16.9 U/mg	Richards e Streamer, 1972
1 – CEM- Bio Gel P 200 90 x 2.5 cm (P:45%) 2 - Tentativas de purificação em CTI - DEAE e CTI - CM-celulose não deram certo 3 – CEM - Bio-Gel HTP hidroxilapatita coluna 0.8 x 3.0 cm (P:150%)	Identifica duas dextranases mas não determina as massas moleculares	Cheetam e Richards, 1972
1 –CEM - Bio Gel P 60 AE 125 U/mg 2 – CTI - CM Celulose AE 954 U/mg 3 – CTI - DEAE Celulose (P:30%) AE 964 U/mg	Duas dextranases Dextranase I – 1230 U/mg Dextranase II – 1260 U/mg	Sugiura *et al.*, 1973
1 - CTI – Troca Aniônica- DE-32 Celulose 80 x 2.5 cm (PI:17.4%) (PII: 5.8%) 2 - Diálise e reaplicação DE-32 (40 x 1.7) (PI: 16%) (PII: 4.4%)	Cromatografia 1 Dextranase I AE 19.3 Dextranase II AE 16.5 U/mg Cromatografia 2 Dextranase I AE 34.6 Dextranase II AE 18.2 U/mg	Lee e Fox, 1985
1 – CTI - DEAESepharose 1.5 x 35cm (P:96.97%) AE 152.11 U/mg 2 – CTI - CM-Sepharose 1 x 30cm Dextranase I AE 740 U/mg DextranaseII AE 590 U/mg	Fermentado AE 17.86 U/mg Cromatofocalização Dextranase I AE 1720 U/mg – 55.8 KDa Dextranase II AE 2005 U/mg – 50.1 KDa	Pleszczynska *et al*., 1996
CTI - Gel Cálcio fosfato	Filtrado - 288.7 U/mg Gel fosfato calcio 3893 U/mg (P: 13.5%) MM 28 KDa	Das e Dutta, 1996
1 – CTI- DEAE Trisacryl (P: 52.7%) AE 4,1 U/mg 2 - CIH - Phenyl Sepharose (P: 18.5%) AE 12,1 U/mg 3 – CEM- Ultrogel ACA44 (P: 6,9%) 4 - CTI – Troca aniônica Mono Q HR 5/5 AE 10,3 U/mg	Fermentado - 0.27 U/mg	Wynter *et al*., 1997
1 - Troca aniônica DEAE Bio-gel 1,5cm (P:92%) AE 206 U/mg 2 - HPLC (P: 67%) AE 288 U/mg	Fermentado AE 11 U/mg MM 79KDa	Arnold *et al*., 1998
1 -CTI- DEAE-Sepharose 1,0 x 20 cm (P: 19%) AE 78500 U/mg	-	Khalikova *et al*., 2003
1-CTI- DEAE Sepharose 1x20 cm (P:55.5%)	SDS PAGE 8% gel 130 kDa	Purushe *et al*., 2012

P: porcentagem de enzima recuperada em relação ao extrato bruto CEM: Cromatografia de Exclusão Molecular CTI: Cromatografia de Troca Iônica CIH: Cromatografia de Interação Hidrofóbica

3 PROBLEMAS CAUSADOS PELA DEXTRANA NO PROCESSO SUCROALCOOLEIRO

Os problemas causados pela contaminação do caldo de cana por micro-organismos iniciam-se ainda na fase da colheita. A flora natural da cana passa a proliferar com grande velocidade a partir do corte, quando há exposição da sacarose da planta como substrato para estes organismos. O tempo gasto no trajeto da cana à usina e o tempo de retenção dos caldos ao longo do processamento da sacarose utilizada pelos contaminantes constitui uma importante perda nos açúcares totais. Além da perda de matéria-prima, parte desses açúcares é utilizada para a multiplicação dos contaminantes e para o seu metabolismo, do qual podem resultar os polissacarídeos dextranas, além de outros produtos indesejados. Além da dextrana, outros exopolissacarídeos podem ser encontrados entre os contaminantes dos processos de fabricação de açúcar, como a levana, isolada de culturas de beterraba (TALLGREN *et al*., 1999) e a alternana, produzida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1355 (COTÊ, 1992).

O excesso de dextrana causa o aumento da viscosidade dos caldos de cana e xaropes, ocasionando o entupimento de filtros de centrífugas e bombas, diminuindo a troca térmica e dificultando a evaporação (SINGLETON *et al*., 2002). Esses problemas no processamento podem ser observados em valores de dextrana acima de 300 ppm. As centrífugas de açúcar funcionam em altíssima rotação e uma massa de viscosidade elevada pode vir a desestabilizar o eixo e prejudicar o equilíbrio. Acopladas às centrífugas posicionam-se telas de tamanhos definidos, as quais retêm os cristais de açúcar formado, mas permitem a passagem dos méis, ricos em açúcares redutores com coloração caramelo. Com o aumento da viscosidade, os poros da tela não permitem a expurga do mel de forma adequada, deixando um residual no cristal que prejudica a qualidade do produto final.

Outro problema causado pela dextrana é a falsa avaliação na qualidade da cana. Na maioria das usinas, o pagamento da cana aos produtores é realizado baseado no teor de sacarose em relação à quantidade de açúcares totais. Esta relação constitui o valor da pureza da cana. O

equipamento conhecido como polarímetro mede a quantidade de sacarose na amostra pelo desvio da luz polarizada. A dextrana tem característica dextrorotatória, ocasionando uma falsa quantificação nesses valores (SINGLETON *et al*., 2002) e alterando a avaliação final da qualidade da matéria prima. Estima-se que há o desvio em 0,3° para cada 1000 ppm de dextrana em caldo.

O maior dano ocasionado pela dextrana no processo é a produção do açúcar de qualidade inferior. O nível de dextrana no açúcar acarreta em um produto de menor valor de mercado (EGGLESTONE *et al*., 2008). Os cristais formados em presença de altos níveis de dextrana são opacos e irregulares, principalmente pela diminuição da taxa de cristalização (JIMÉNEZ, 2005). Em geral, os cristais alongam-se e a padronização da cristalização é comprometida (EGGLESTONE *et al*., 2012). Também devido à alta viscosidade, a centrifugação não ocorre da maneira correta e a expurga do mel não é adequada. O cristal fica com resíduos de méis em tom caramelo, aumentando a cor ICUMSA (International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis), reduzindo o valor comercial do produto. Esses resíduos de mel também conferem higroscopia ao material (KAUR e KALER, 2008), formando grânulos de açúcar, acarretando a perda de todo o processo de cristalização.

Por fim, os danos causados pela alta concentração de dextrana refletem diretamente nos rendimentos industriais, pois diminuem a recuperação do açúcar. De acordo com Day (1992), estima-se que todo ano perdem-se 1,134 g (0,0025 pounds) por tonelada de cana-de-açúcar processado a cada ppm de dextrana presente no caldo de cana. Em artigo de 1999 os autores (CUDDIHY e DONALD, 1999) afirmam que a perda pela presença de dextrana pode alcançar 1,7 kg de açúcar para cada tonelada de açúcar produzido. Além da baixa recuperação, o valor de mercado alcançado pelo açúcar com altas concentrações de dextrana sofre penalidades comerciais, com um desconto de 0,007% do preço multiplicado pelas toneladas vendidas. Este valor pode aumentar gradualmente quanto maior for a concentração de dextrana, sendo que a cada acréscimo de 160 ppm aplica-se um desconto de 0,002% no preço da tonelada, atingindo 0,013% de desconto em açúcares com mais de 1010 ppm de dextrana.

Em artigo de revisão, o autor enfatiza que, em geral, há perda de 7,4 a 8 kg de açúcar por tonelada de cana processada em consequência da presença de dextrana no caldo (JIMÉNEZ, 2005).

Estes dados disponíveis não evidenciam quais as metodologias empregadas para o cálculo de estimativas de perda ocasionadas pela dextrana. Nota-se que há uma grande variação entre os autores, além da falta de dados mais atualizados sobre o tema.

4 BAGAÇO DE MALTE

De acordo com o SINDICERV (Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja) em levantamento feito pela FGV (Fundação Getúlio Vargas) a indústria cervejeira no Brasil emprega 1,7 milhões de pessoas em atividades diretas e indiretas e é responsável por 1,4% do PIB do Brasil. A região Sul do Brasil destaca-se pela produção de cereais, sendo a cevada um dos mais importantes em termos de quantidade, porém o Brasil ainda figura entre os principais importadores de malte. Atualmente, cerca de 90% da cevada cultivada no Brasil, é usada principalmente para fabricação de cerveja e é da variedade BR- 2. O bagaço de malte é o principal resíduo sólido produzido pela indústria cervejeira. De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2013), a produção mundial anual deste resíduo é de aproximadamente 15,4 milhões de toneladas.

O bagaço de malte varia quanto à sua composição, dependendo da mistura de cereais, do pré-tratamento dos grãos, das condições do processo de malteação, do tipo de malte, das variedades de plantas selecionadas. Em artigo de revisão (ALIYU e BALA, 2011), os autores reportam a composição do bagaço de malte, obtendo resultados bastante diversos, descritos, a seguir, em % base seca: celulose (16,8 a 25,4), hemiceluloses (28,4 a 35), lignina (7 a 27,8), proteínas (2,4 a 24), cinzas (2,3 a 7,9), carboidratos (79,9), fibras (3,3), lipídeos (2,5 a 10,6).

Este resíduo é formado (FIGURA 4) após a germinação do malte e brassagem, na etapa de filtração do mosto, são gerados de 14 a 20 kg a cada 100 litros de cerveja (SANTOS e RIBEIRO, 2005). A destinação do bagaço de malte varia de acordo com a região, pode ser direcionado para diversas aplicações (MUSSATO *et al*., 2006) como: alimentação animal, alimentação humana, produção de energia (carvão vegetal, biogás e combustão direta), incorporação em materiais de construção, produção de papel, adsorventes e pode seguir para outros empregos menos usuais, como a hidrólise para obtenção de xilo-oligossacarídeos, xilitol e meios de cultura rico em pentoses (OLAJIRE, 2012) e emprego em processos biotecnológicos (substrato para o crescimento de fungos e produção de enzimas).

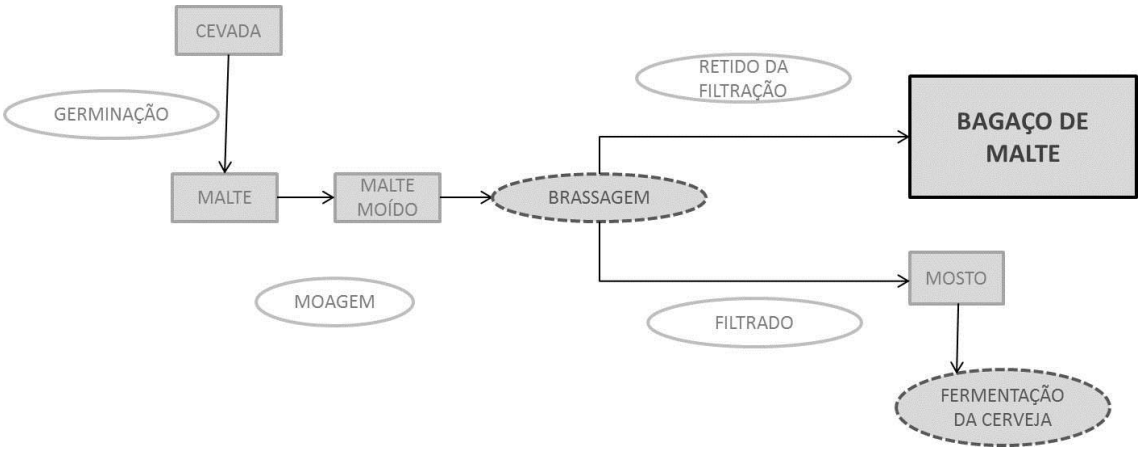

FIGURA 4. ESQUEMA GERAL DA OBTENÇAO DO BAGAÇO DE MALTE. FONTE: A autora (2014).

Pela sua composição rica e grau alimentício, é usualmente direcionado para a alimentação animal. Este destino, porém, exige gastos com distribuição e transporte, além de ser geralmente doado ou vendido a baixo preço, representando um processo custoso para que as empresas destinem corretamente o resíduo. A estocagem do material é inviável devido ao grande volume, além do bagaço de malte exigir a secagem para que seja protegido de ação microbiana. A secagem do material viabiliza o transporte, concentra os nutrientes por unidade de matéria seca, além de aumentar a vida útil do resíduo (BOURSCHEIDT *et al.*, 2010).

O bagaço de malte pode ser aproveitado para a produção de produtos biotecnológicos. Dentre os produtos de interesse destaca-se o etanol. Em trabalho desenvolvido no ano de 2008 (XIROS *et al*., 2008), os autores empregaram o bagaço de malte em associação com palha de trigo como substratos para fermentação em estado sólido inoculando o micro-organismo *Neurospora crassa*. Este fungo tem a capacidade de produzir etanol diretamente a partir das fibras de celulose e hemicelulose, com a formação concomitante de enzimas xilanases e celulases. Em condições otimizadas os pesquisadores obtiveram 74 gramas de etanol por quilo de bagaço de malte seco.

Na produção de enzimas já foi descrita a produção de lacases em bagaço de malte para a degradação de corantes. O micro-organismo utilizado (*Trametes versicolor*) foi inoculado em frascos Erlenmeyer com 80% de umidade. A máxima atividade alcançada foi de 13506,2±138,2 $IU.g^{-1}$ (DHILLON *et al*., 2012). A alfa-amilase também foi descrita como produto de *Aspergillus oryzae* utilizando bagaço de malte como substrato. A máxima produção da enzima foi 6870 $U.g^{-1}$ em 96h de fermentação (FRANCIS *et al*., 2002).

5 *Penicillium* sp

O gênero *Penicillium* constitui um dos mais amplamente estudados e compreende uma enorme diversidade de espécies. A classificação taxonômica atual, segundo Catalogue of Life (2014) é:

Reino: Fungi
Filo: Ascomycota
Classe: Eurotiomycetes
Ordem: Eurotiales
Família: *Trichomaceae*
Gênero: *Penicillium*

Os fungos da divisão Ascomycota caracterizam-se pelas hifas septadas e sua principal característica é o asco, bolsa na qual se encontram os esporos

sexuados com características peculiares a cada espécie. As colônias típicas da espécie *Penicillium aculeatum*, com os conídios e detalhes das estruturas dos esporos estão registrados na FIGURA 5. Também são comumente encontrados conídios e propágulos sexuados (TRABULSI *et al*., 1999).

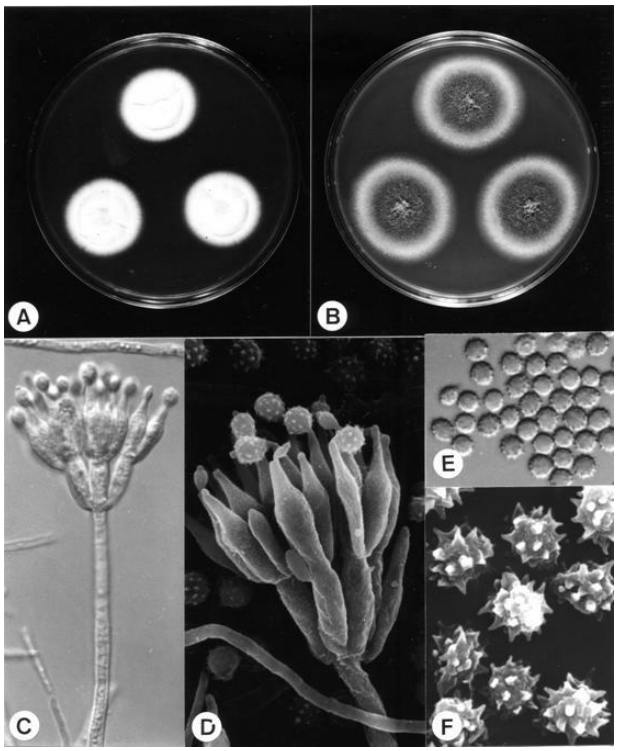

FIGURA 5 COLÔNIAS DE *Penicillium aculeatum* EM PLACAS DE ÁGAR. A E B REPRESENTAM COLÔNIAS EM ÁGAR, C E D APRESENTAM A ESTRUTURA DO CONÍDIO, E E F MOSTRAM DETALHES DOS CONÍDIOS. FONTE: Bioresource Collection and Research Center (2014).

Os fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos pela importância de seus bioprodutos, como antibióticos (penicilinas); fungos aromáticos empregados na fabricação de queijos como *P. roqueforti* para o queijo roquefort, *P. glaucum* para o queijo gorgonzola, *P. candidum* para o queijo brie. Também podem ser patogênicos, como *P. mameffei*, um típico organismo oportunista que ataca pacientes imunodeprimidos. Na agricultura, algumas doenças fitopatológicas são atribuídas ao gênero *Penicillium*. Ao *P. verrucosum* é atribuída a contaminação pela micotoxina ocratoxina A em cereais, a qual causa nefropatia grave.

Os fungos *Penicillium* têm sido estudados para a produção de dextrana e os principais artigos relacionados constam na TABELA 1.

TABELA 1. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS DEXTRANASES ISOLADAS DE ORGANISMOS DO GÊNERO *Penicillium* sp (ADAPTADO DE KHALIKOVA *et al*., 2005).

Micro-organismo	pH ótimo	T°C ótima	Estabilidade	Íons	Referência
Penicillium minioluteum	4.0 - 6.0	50	pH 3.5-7.0 T < 50°C	Estável a Ca^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Sr^{2-}, Cu^{2+}	Fukimoto *et al*., 1971
Penicillium funiculosum	6.0	-	pH 5.0-7.0 T < 40°C	Ativado por Co^{2+}, Mn^{2+} e Cu^{2+}. Estável a Ca^{2+} Fe^{3+}	Sugiura *et al*., 1973
Penicillium funiculosum NRRL 1768	4.5 - 5.5	-	pH 5.0-7.0 a 4 °C por 1 ano	Estável a Hg^{2+}	Chaiet *et al*., 1970
Penicillium lilacinum NRRL 895	5.0 - 5.8	40-45	pH 4.8-9.0	Inibida por Hg^{2+}, Ag^{2+} e $KMnO_4$. Estável a Cu^{2+} $Ba^{2+.}$	Das e Dutta, 1996
Penicillium notatum	4.8	50	-	-	Pleszczynska *et al*., 1996
Penicillium aculeatum	5.0 - 6.0	50 - 60	T 50°C por 60 min pH 4.5-5.6 por 2 meses	Inibido por Hg^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Ag^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}	Madhu e Prabhu, 1984

Em documento de 2006 publicado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a legislação brasileira estabelece um “Regulamento Técnico que Aprova o Uso de Enzimas e Preparações Enzimáticas”, no qual constam os organismos fonte de dextranases *Chaetomium gracile* e *Penicillium lilacinum* como permitidas para o uso em alimentos destinados ao consumo humano. De acordo com o banco de cepas ATCC (American Type Culture Collection), o *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 (correspondente ao ATCC 10409) é grau de biossegurança 1.

6. FORMULAÇÃO E ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Os produtos formulados naturais ou sintéticos podem conter aditivos em sua composição para preservar a atividade dos compostos, na formulação de drogas e medicamentos, cosméticos, alimentos entre outros produtos. A formulação contendo aditivos pretende prolongar a vida útil dos produtos, mantendo as características funcionais, organolépticas, físico-químicas e microbiológicas. Preservar ou prolongar as características peculiares de um produto requer um cuidado na adição de insumos químicos, os quais têm um limite de toxidade, além de exigir um extenso estudo sobre as embalagens e condições de armazenamento para que o produto chegue com características ótimas ao consumidor final.

6.1 Legislação

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão brasileiro responsável pela legislação e fiscalização de medicamentos, cosméticos e alimentos. Para os estudos de estabilidade em cosméticos a ANVISA lançou em 2004 um guia que abrange os produtos cosméticos, de higiene e perfumes, contendo sugestões de metodologias para guiar a formulação desses produtos de forma adequada. Neste guia é citado o IFCC (*International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*), o qual considera o teste de estabilidade sugerido pela diretriz capaz de prever por meio de estudos acelerados a vida útil dos cosméticos.

Para os produtos alimentícios, diversas diretrizes estabelecem padrões e limites para os processos de obtenção, aditivos, embalagem, armazenamento, entre outros. Ao contrário dos produtos cosméticos não há na ANVISA um guia específico para os estudos de estabilidade. A empresa interessada deve procurar a legislação especifica vigente para adequar-se às regulações estabelecidas. No Brasil, é de responsabilidade da empresa detentora avaliar a estabilidade de seu produto antes de colocá-lo à disposição do público. No ato do registro do item, os estudos de estabilidade devem ser

anexados, além de a empresa assumir um termo de responsabilidade, o qual declara que a empresa é possuidora dos estudos de estabilidade e eficácia e segurança de seu produto.

No que se refere aos produtos alimentícios, a legislação brasileira é clara em relação aos aditivos alimentares, quanto aos limites de cada componente, e por meio da Resolução CNS/MS N.º 04, de 24 de novembro de 1988, aprova as tabelas com os insumos e seus limites máximos.

Para o uso de enzimas em alimentos a ANVISA aprovou o documento "Regulamento técnico sobre o uso de enzimas e preparações enzimáticas na produção de alimentos destinados ao consumo humano" (Consulta Pública nº 93, de 21 de dezembro de 2005 - D.O.U de 22/12/2005), o qual traz no Anexo I uma tabela contendo a origem da enzima, no Anexo II aborda a lista de veículos e no Anexo III a lista de aditivos alimentares que podem ser incorporados às fórmulas. No item 4 – Princípios gerais vale destacar:

> 4.1 A empresa deve ter o cadastro e o controle da composição do produto, a faixa de atividade enzimática e o método analítico empregado para o seu controle.
> 4.4 As enzimas de origem microbiana devem ser obtidas por métodos e condições que garantam a fermentação controlada e impeçam a introdução de micro-organismos capazes de originar substâncias tóxicas ou indesejáveis (ANVISA, Regulamento técnico sobre o uso de enzimas e preparações enzimáticas na produção de alimentos destinados ao consumo humano).

No caso específico da enzima dextranase estão listados como micro-organismos fonte desta enzima os micro-organismos *Chaetomium gracile* e *Penicillium lilacinum*, não sendo impossibilitados os registros de outros micro-organismos, nem mesmo os geneticamente modificados, porém, produtos advindos de outros organismos ficam sujeitos a complementar informações no ato do registro. O micro-organismo alvo deste trabalho, *Penicillium aculeatum* é considerado um micro-organismo grau 1 na classificação de riscos de biossegurança (ANEXO 1). Portanto, sua manipulação não requer cuidados adicionais.

Nos EUA o órgão análogo à ANVISA é o FDA (*Food and Drug Administration*). Está disponível para consulta pública no site do *United States Department of Health and Human Service* um guia intitulado "*Guidance for industry: Stability testing of drug substances and products*", de junho de 2013. De forma semelhante à ANVISA, este guia serve como um roteiro para os estudos de estabilidade de novos produtos, não tendo caráter de obrigatoriedade, permitindo que a empresa estabeleça seus próprios métodos de avaliação e acompanhamento de seus produtos. A base deste guia são os artigos da ICH (*International Conference on Harmonisation of* Technical *Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), os quais são separados em guias intitulados:

- Q1A - *Stability Testing of New Drug Substances and Products*;
- Q1B - *Photostability Testing of New Drug Substances and Products*;
- Q1C - *Stability Testing for New Dosage Forms*;
- Q1D - *Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products*;
- Q1E - *Evaluation of Stability Data*

Além desses documentos, a ICH disponibiliza outros roteiros para consulta, sempre focando nos estudos de estabilidade e outros estudos complementares. A ICH é uma comissão formada por autoridades e membros de indústrias farmacêuticas e alimentícias dos Estados Unidos, Europa e Japão que se uniram na tentativa de unificar os padrões, técnicas e requisitos para aprovação de drogas e produtos pra consumo humano. Pela importância técnica deste comitê, esses documentos aprovados e disponibilizados para assegurar a qualidade e segurança dos produtos farmacêuticos também são recomendados para os estudos de estabilidade de alimentos, conforme instruções do FDA (2013).

6.2 Produtos Biológicos e Biotecnológicos

De acordo com a ANVISA, produtos biológicos são: moléculas complexas de alta massa molecular obtidas a partir de fluidos biológicos,

tecidos de origem animal ou procedimentos biotecnológicos por meio de manipulação ou inserção de outro material genético (tecnologia do DNA recombinante) ou alteração dos genes que ocorre devido à irradiação, produtos químicos ou seleção forçada. Uma formulação com compostos desta natureza tem particularidades, pois são constituídos principalmente de proteínas e polipeptídeos, os quais devem manter sua conformação e estrutura para permanecerem ativos. Além disso, estes compostos são extremamente sensíveis às variações do ambiente. Também existe uma maior variação entre os lotes do produto, os quais são mais difíceis de controlar e padronizar do que as drogas de origem sintética (MHRA, 2013). A instabilidade destes produtos pode levar a grandes perdas e geralmente isso acontece durante os processos de recuperação, comumente aqueles de maior custo. Assegurar a estabilidade é o fato de maior importância no sucesso da implantação de um produto de origem biológica (WEIJERS e RIET, 1992).

A ICH lançou um guia direcionado para produtos biológicos e biotecnológicos (Q5C), o qual recomenda cuidados adicionais necessários em um estudo de estabilidade utilizando matérias-primas dessa natureza. Dentre diversas recomendações, uma delas é que se faça um estudo de estabilidade do produto em tempo real e condições naturais de temperatura por pelo menos 6 meses e com 3 lotes do produto. Este estudo longo não dispensa os estudos de estabilidade acelerada, os quais podem avaliar o comportamento do produto frente a condições mais severas de estresse. Outros tópicos abordam sobre a amostragem, metodologias recomendadas para avaliação da molécula ativa, frequência dos testes, embalagem, rotulagem, entre outros.

6.2.1 Enzimas

No caso específico da formulação de enzimas ou preparações enzimáticas é ainda mais importante considerar sua origem biológica. As enzimas são particularmente sensíveis às variações do ambiente, podendo rapidamente perder a sua atividade, muitas vezes de forma irreversível. Além da suscetibilidade natural, processos de purificação, concentração e

sucessivos ensaios podem trazer mudanças estruturais e conformacionais, podendo levar à inativação (HARRIS e ANGAL, 1989).

Isolar uma enzima de seu ambiente natural, *in vivo*, é um procedimento agressivo para a molécula, a qual pode tornar-se instável e rapidamente perder sua atividade. Por essa característica, muitos trabalhos abordam o isolamento de enzimas e produtos de interesse a partir de micro-organismos já adaptados a condições extremas, como altas temperaturas ou grandes variações de temperaturas, pHs extremos, alta pressão osmótica, entre outras condições adversas. Na indústria, de forma geral, essas condições extremas são empregadas e apesar das vantagens da especificidade da ação das enzimas, a falta de resistência frente a estas condições pode ser um limitante para ampliar a aplicação de enzimas em processos industriais (COLACINO e CRICHTON, 1997).

Dentre todas as condições adversas praticadas na indústria, as altas temperaturas são o fator mais limitante de atuação enzimática. Algumas teorias sustentam que a termoestabilidade das enzimas está associada ao fato de que esta interage com outros componentes celulares, como lipídeos e polissacarídeos, formando uma matriz que protege a enzima da desnaturação. Além disso, acredita-se as enzimas de origem termófila possuem características particulares no que se refere à sua estrutura, interação e forma compacta quando comparadas a enzimas de mesma ação, porém de origem mesofílica (MOZHAEV e MARTINEK, 1984). Algumas características genéticas podem estar associadas aos micro-organismos termófilos, as quais resultam em estruturas diferenciadas mais resistentes (VETRIANI *et al*., 1998). No caso específico das dextranases, uma importante nova fonte desta foi isolada a partir de águas geotérmicas na Austrália. Sua principal característica é a resistência da atividade até os 80°C (WYNTER *et al*., 1996). No entanto, estas características de resistência não são conferidas à maioria das outras enzimas, as quais têm origem mesofílica. Desta forma, alguns métodos podem ser empregados na tentativa de preservar a estrutura tridimensional das enzimas ou simular seus ambientes de origem.

Diversas estratégias foram estudadas na tentativa de preservar as enzimas da desnaturação e possibilitar maior tempo de vida útil. Dentre os métodos podem ser citados: a imobilização de enzimas em matrizes sintéticas

ou naturais, modificações químicas das moléculas (COSTA *et al*., 2002; GULLA *et al*., 2004), modificações genéticas e associação com aditivos em uma formulação (FU *et al*., 2010). O uso de aditivos é uma das formas mais acessíveis e pode prevenir a ação de agentes químicos e biológicos, além de aumentarem a resistência das moléculas a altas pressões (ATHÈS *et al*., 1999) e altas temperaturas, o principal fator que afeta a estabilidade enzimática (GULLA *et al*., 2004).

Os aditivos são compostos adicionados ao produto de interesse, como sais, aminoácidos, surfatantes, metil ésteres, compostos metálicos, poli hídricos, polieletrólitos, antibióticos (BOURNEOW *et al*., 2012), polissacarídeos (LI *et al*., 2010), entre outros. Estes agentes têm naturezas químicas diversas e a escolha dos componentes está associada à característica que se deseja atingir. Em artigo técnico, a empresa Pierce Biotechnology (*Pierce Biotechnology Inc*., 2005) descreve o uso de combinações de aditivos com diferentes funções para alcançar estabilidade proteica por tempo prolongado sob refrigeração ou armazenamento a -20°C. Entre os aditivos estão listados um coquetel estabilizante, de fórmula não revelada; um crioprotetor (glicerol ou etileno glicol) para evitar a formação de cristais de gelo; um inibidor de enzimas proteolíticas como benzamidina, leupeptina, aprotinina, entre outros; um antimicrobiano, como azida sódica, para inibir contaminações microbiológicas; um quelante, como EDTA para prevenir oxidações nos grupos -SH das proteínas e um último agente redutor, como mercaptoetanol para manter as proteínas em estado reduzido, prevenindo a oxidação de cisteínas.

A inativação térmica das enzimas está associada à oxidação dos grupos –***tiol*** seguido pela desnaturação e precipitação (GOUDA *et al.*, 2003, GULLA *et al*., 2004). A imobilização da enzima e o uso de sais, polióis e polieletrólitos para manter a força iônica diminuem a desnaturação da enzima por manterem a sua conformação terciária (GULLA *et al*., 2004).

É possível que os agentes estabilizadores prolonguem o tempo de armazenamento da enzima por reprimir o crescimento biológico pelo aumento osmótico, porém, o fato de aumentarem também a sua resistência térmica ocorre por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. A adição de açúcares, aminoácidos e sais podem agir na tensão superficial da proteína, tendo relação com a hidratação da molécula, mantendo algumas interações

iônicas na enzima e prevenindo do ressecamento excessivo (IZUTSU *et al*., 1991). Os aditivos também podem proteger a molécula da deformação, interagindo diretamente com a proteína, uma vez que esses componentes podem “ocupar” espaços das cadeias da estrutura proteica, servindo como uma rede que mantém a estrutura firme e ativa (IZUTSU *et al*., 1991; CIOCI, 1995 ; GULLA *et al*., 2004). Essas hipóteses também são sustentadas para explicar os mecanismos dos crioprotetores agregados às moléculas que passam pelo congelamento. Após a liofilização, o rearranjo proteico pode produzir moléculas amorfas ou cristalinas, e essa reconstituição interfere na atividade enzimática. O uso dos crioprotetores permite a manutenção da conformação da estrutura da enzima, permanecendo também a sua atividade (IZUTSU *et al*., 1991). Os polietilenoglicóis protegem as enzimas da desnaturação provavelmente pela transformação da estrutura proteica em uma conformação inflexível (COSTA *et al*., 2002; LONGO e COMBES, 1999).

Em alguns casos, os estabilizantes nas fórmulas são utilizados para preservar outras moléculas da fórmula, e não o princípio ativo em si. Como exemplo, o ácido cítrico, que protege a estrutura, e consequentemente, a função dos conservantes de alimentos, como o ácido sórbico, que pode ser suscetível à degradação em solução. O ácido sórbico em pó é estável e bastante utilizado como conservante, porém, em solução aquosa pode provocar o escurecimento de alimentos, resultando em um efeito indesejável (CAMPOS e GERSCHENSON, 1996).

6.3 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade visam avaliar o produto formulado quanto à manutenção de suas características durante longo período. De forma geral, recomenda-se que as amostras sejam alojadas em frascos transparentes, com vedação suficiente para evitar a perda de gases e volumes, sem a incorporação de ar ao produto e mantendo um *headspace* de um terço do volume do frasco (ANVISA, 2004).

Os estudos de estabilidade dividem-se em três tipos: os estudos preliminares, a estabilidade acelerada e o teste de prateleira. Os tópicos a seguir foram baseados no documento técnico “Séries temáticas- Guia de

estabilidade de produtos cosméticos", da ANVISA (2004) e documentos da ICH sobre estabilidade de produtos biológicos e biotecnológicos, além dos documentos sobre testes de estabilidade de novas drogas e substâncias (ICH, Q1A).

6.3.1 Estabilidade preliminar

Estes testes são também conhecidos como Teste de Triagem, Estabilidade Acelerada ou de Curto Prazo, têm como objetivo auxiliar e orientar a escolha das formulações. São avaliados diversos parâmetros em condições aceleradas com o objetivo de triar os componentes de uma fórmula, verificar incompatibilidades entre os aditivos e avaliar outras características que possam influenciar na qualidade organoléptica do produto final, importante principalmente para produtos cosméticos e alimentos. Este estudo tem a duração de 15 dias, podendo ser avaliado diariamente ou ao fim do período de incubação. Cada produto deve ser submetido às condições mais adequadas de acordo com a sua aplicação, podendo ser incubados em temperaturas altas (37 a 50°C); temperaturas baixas (-10 a 5°C) ou ciclos de estresse térmico, submetendo a amostra a extremos de temperaturas altas e baixas com incubações de 24 a 48 h em cada temperatura.

6.3.2 Estabilidade em condição acelerada

Também conhecidos como Estabilidade Normal ou Exploratória, tem como objetivo "prever" a vida útil da formulação, empregando condições menos extremas que a primeira e utilizando lotes maiores ou em escala piloto. Esta etapa é uma prévia da fórmula e embalagens definitivas, uma vez que os componentes já foram estabelecidos na etapa anterior. O período de testes recomendado é: 24 h e aos 7°, 15°, 30°, 60° e 90° dia de incubação, podendo variar de acordo com a natureza do produto estudado. Em geral, nesta etapa é realizada uma bateria completa de análises físico-químicas (pH, viscosidade, densidade, etc), organolépticas (cor, odor, sabor, aspecto, etc) e microbiológicas (teste de desafio).

6.3.4 Teste de prateleira ou *Shelf-Life*

Podem também serem denominados Testes de Estabilidade de Longa Duração ou *Shelf Life*. Este é o teste final, que pretende comprovar, em condições reais, o tempo de duração previsto pelos estudos anteriores. A duração é longa, podendo durar anos, de acordo com o prazo de validade previsto e os lotes devem simular uma condição real e são submetidos às condições normais de armazenamento (condições não controladas sujeitas às variações ambientais). Também neste estudo serão avaliadas as possíveis interações e condições das embalagens.

6.3.5 Informações Complementares

Alguns estudos adicionais podem agregar mais informações sobre novos produtos, podendo, inclusive serem exigidos no ato do registro. São eles:

- **Estudo de estabilidade ao transporte**, no qual os ensaios podem ser reais ou simulados, cumprindo as etapas logísticas da saída do produto da fábrica até a chegada ao seu local final para aplicação ou consumo. Durante o transporte pode ocorrer a influência de fatores adversos, interferindo na estabilidade da formulação ou na interação do produto com a embalagem.

- **Estudo de genotoxicidade**, pode ser realizado *in vivo* ou *in vitro*, com o objetivo de avaliar possíveis efeitos nocivos à saúde (mutagênicos e teratogênicos) que podem estar relacionados com a incidência de câncer, problemas reprodutivos, entre outros. A avaliação dos efeitos é feita por metodologias diversas para verificar a interferência de um agente (produto) na sequência do DNA.

- **Estudos de eficácia**, principalmente para medicamentos e produtos cosméticos, os quais pretendem avaliar o cumprimento dos benefícios indicados no rótulo.

- **Estudos de segurança para os trabalhadores**, no qual serão avaliados os riscos ocupacionais relacionados ao produto e toda a sua linha de produção.

- **Estudos de segurança para as espécies alvo**, principalmente para produtos desenvolvidos para animais, como alimentos e vacinas, os quais devem ser acompanhados por veterinários e profissionais autorizados a fim de assegurar que não existam efeitos tóxicos e/ou adversos na aplicação ou consumo do produto.

- **Estudos de segurança ambiental**, avaliando os efeitos do descarte e tratamento dos resíduos e subprodutos da área industrial. Deve conter plano de contenção em caso de acidente, vazamento, derramamento, bem como um plano emergencial para tratamento de áreas afetadas por produtos. (Séries temáticas- Guia de estabilidade de produtos cosméticos, ANVISA (2004); Q1A – Stability testing of new drugs substances and products, ICH, 2003).

7 FABRICAÇÃO DO AÇÚCAR

O processamento da cana-de-açúcar é uma sequência de etapas que visam a clarificação e tratamento do caldo para obtenção de uma matéria prima de qualidade para a fabricação de açúcar. A composição do caldo de cana-de-açúcar é formada basicamente de carboidratos, porém pode conter algumas proteínas e gorduras. É importante ressaltar que a denominação de “açúcar” tratada neste documento refere-se ao produto açúcar, constituído apenas de sacarose. Além da eliminação de componentes indesejáveis, o tratamento do caldo de cana é um processo que visa diminuir a carga microbiana. A seguir, as etapas desse processo serão explicadas em síntese.

7.1 Pré-tratamentos do caldo de cana

Estas etapas foram descritas baseadas em informações da AGEITEC (Agência Embrapa de Iinformação Tecnológica); MARAFANTE, 1993; Manual Dedini – Sistema de cozimento de duas massas para a Usina X, 2000, além de considerar detalhes específicos da linha de produção da Usina X, onde foi desenvolvida a etapa de aplicação (CAPÍTULO V deste trabalho).

RECEPÇÃO - A cana é recebida na indústria e todas as cargas são pesadas. Algumas cargas são amostradas no laboratório de matéria prima para avaliação de alguns parâmetros. Esta etapa é importante para a quantificação e qualificação da matéria prima bruta e os dados coletados servirão para posteriores cálculos de rendimentos. Os caminhões seguem para o descarregamento diretamente na mesa de lavagem. Algumas cargas podem ser armazenadas em barracão, porém, esta prática não é recomendada por aumentar a carga microbiana e a inversão do açúcar, além da formação de dextrana. Na mesa de lavagem, a cana é lavada com água caleada, pH 9-11. Este processo tem objetivo de retirar parte da terra e resíduos, além de carregar um pouco da carga microbiana.

MOAGEM - Após a lavagem, a cana segue para os picadores e moagem. Dependendo da usina podem existir de 4 a 6 ternos de moenda. À medida que a cana avança pelos ternos, o bagaço permanece nas esteiras enquanto o caldo é coletado por uma canaleta. No primeiro terno é retirado o caldo de alta pureza, caldo primário, o qual pode ser separado dos demais para destinações posteriores. Nos demais ternos de moenda pode ser usada a água de embebição, que auxilia na extração de mais açúcar da fibra de cana. A temperatura praticada e os volumes utilizados são particulares de cada usina. Os caldos dos diversos ternos são misturados em um tanque de caldo misto e seguem para os posteriores tratamentos.

SULFITAÇÃO - Este processo é comum principalmente na produção de açúcar cristal e refinado, mas pode ser utilizado para açúcar tipo VHP (Very High Polarization) em alguns casos. O enxofre em escamas é sublimado (250 °C) e libera SO_2, o qual é incorporado ao caldo, que atinge valores de pH entre 4,2 e 4,5. Este procedimento tem a finalidade de diminuir a cor do açúcar a há uma relativa melhora na qualidade do caldo. Este processo deve ser bem regulado, pois o residual de enxofre no açúcar tem parâmetros máximos determinados para venda. Além disso, em usinas que possuem também destilaria os excessos de enxofre podem prejudicar o desempenho das leveduras na fermentação, portanto, esse procedimento deve ser usado com cuidado.

CALEAGEM ou CALEAÇÃO - A cal hidratada e maturada por 24 a 48 h é misturada ao caldo até que seja atingido pH 7,0 a 7,5. Esta etapa tem por finalidade provocar a floculação do caldo, além de proteger os equipamentos e tubulações da corrosão. O pH natural do caldo de cana deve ser de 4,5 a 5,0. Além da retirada dessas impurezas, nesta etapa favorece a redução dos contaminantes microbiológicos.

AQUECIMENTO – O caldo é submetido a temperaturas de 90 a 105°C. A função principal desta etapa é a redução microbiana. Juntamente com a adição de cal, esta conjugação de processos forma colóides, aglomerados de sais, proteínas, gorduras, os quais podem agregar cor ao açúcar e/ou dificultar a cristalização.

DECANTAÇÃO – Processo com tempo de retenção alto que separa as impurezas por gravidade.

FILTRAÇÃO – O lodo coletado no decantador é submetido à filtração para retirada do caldo. O produto sólido retirado denomina-se torta e retorna para o campo, trazendo vários benefícios ao solo pela reposição de alguns nutrientes e pela alta carga orgânica.

EVAPORAÇÃO – o caldo já clarificado, livre de impurezas sofre um processo sequencial de concentração para retirada de água. O caldo de cana tem

entrada contendo 15-20 °Brix e ao fim da evaporação deve ter entre 55-63° Brix. A partir desta etapa, o líquido concentrado é chamado de xarope, o qual segue para as etapas seguintes de cristalização para obtenção do açúcar.

A FIGURA 6, ilustra as etapas sequenciais da entrada da cana-de-açúcar até a obtenção do xarope para a fábrica de açúcar.

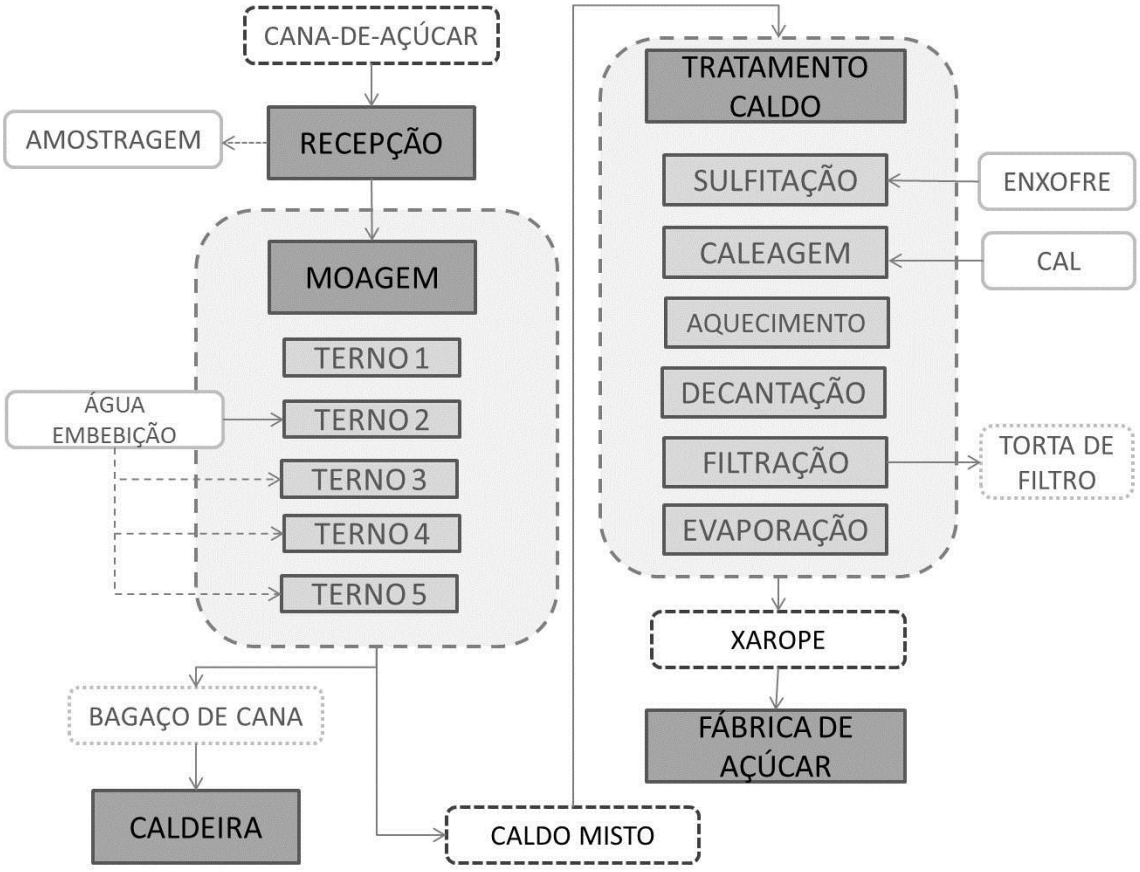

FIGURA 6. FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE PROCESSAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR ATÉ A FÁBRICA DE AÇÚCAR. FONTE: A autora (2014).

A aplicação de dextranases não segue um padrão definido, cada empresa faz uma recomendação de dosagem e de ponto de aplicação. Além dessas variações, devem ser consideradas as características peculiares de cada dextranase para a obtenção de melhor rendimento. Estas variações já foram discutidas e estudadas por Egglestone e Monge (2005). No artigo, os autores recomendam que a aplicação de dextranases seja feita principalmente no caldo de cana e devem ser evitadas as etapas de altas concentrações de sólidos solúveis (°Brix). A dextranase alvo deste trabalho, produzida por *P. aculeatum* por fermentação no estado sólido com bagaço de malte foi avaliada

quanto ao seu potencial de aplicação e as discussões referentes a esta etapa estão no CAPÍTULO V.

A fábrica de açúcar é responsável pela recuperação da sacarose da cana-de-açúcar, portanto, trata-se de um processo de purificação. O princípio do funcionamento está na diferença dos tipos de açúcares presentes no caldo de cana, os quais têm diferenças na cristalização. Os açúcares redutores tem maior dificuldade na cristalização, por apresentar formas isoméricas diferentes.

Desta forma, existe a necessidade de incentivar a formação dos cristais de sacarose, além de garantir que estes cristais, sólidos, se separem o máximo possível dos açúcares redutores, líquidos.

A cristalização neste caso ocorre por supersaturação, em alta concentração de sacarose, as outras moléculas da mesma natureza passam a se organizar em forma de cristais. Altas temperaturas (65-71°C) e pressões são praticadas nesta etapa, a fim de facilitar a cristalização. A etapa seguinte é a purga do mel (açúcares redutores) por centrifugação, na qual uma força centrífuga é aplicada e os cristais ficam retidos na malha interna da centrífuga, enquanto o mel atravessa estes poros.

7.2 Fabricação do açúcar

7.2.1 Sementes

O processo de produção do açúcar inicia-se com a “semente”. Por um período de 10 a 48 h o açúcar cristal é agitado dentro de um moinho de bolas na proporção de 1 parte para 2 de etanol. Ao fim do período, será formada uma pasta, a qual é retirada do moinho e armazenada por um período mínimo de repouso de 4 dias. Desta forma, o cristal quebra-se em várias partículas de menor tamanho, as quais servirão de ponto de partida para o crescimento do cristal de açúcar. O produto desta quebra no moinho de esferas pode ser observado na FIGURA 7.

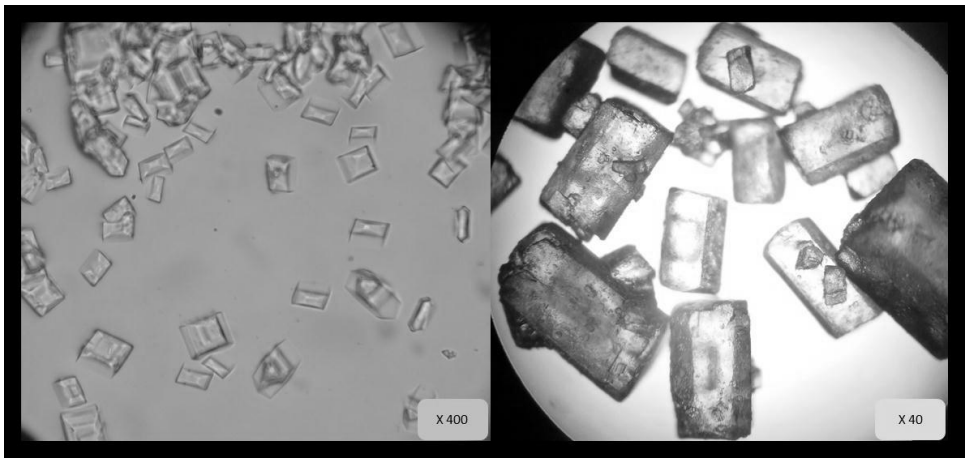

FIGURA 7. SEMENTES E CRISTAIS DE AÇÚCAR. À ESQUERDA, SEMENTES DE AÇÚCAR EM AUMENTO DE 400 VEZES. À DIREITA, CRISTAIS DE AÇÚCAR EM AUMENTO DE 40 VEZES. FONTE: A autora (2014).

Com estas sementes iniciais um cozedor de açúcar é alimentado com mel pobre, de forma gradual, até que encha por completo. Neste momento, os cristais já começam a aparecer a olho nu, porém, ainda têm tamanho pequeno. O volume ou conteúdo do cozedor é separado em 3 partes, e cada parte enche um novo cozedor, o qual é alimentado com mel pobre, até que os cristais aumentem até um tamanho satisfatório (diferentes tamanhos para cada tipo de açúcar). Estas massas são chamadas de massa B.

7.2.2 Massa B

A massa B é iniciada com parte das sementes preparadas na etapa anterior e alimentada com mel pobre. A massa é cozida até a formação dos cristais de tamanho satisfatório. A massa é então liberada e centrifugada. O mel retirado desta etapa é chamado mel final e é destinado à destilaria para formar o mosto. O mel final ainda tem 50% de pureza e pode ser esgotado até 37% num sistema de três massas, porém, na maioria das usinas, o sistema adotado é de 2 massas. O retido na tela da centrífuga denomina-se magma e é o início da formação da massa A. O fluxograma geral desta etapa está demonstrada na FIGURA 8.

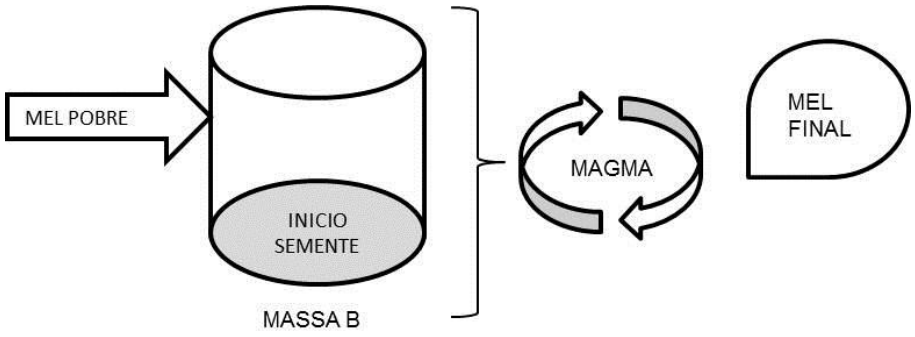

FIGURA 8. ESQUEMA GERAL DA MASSA B. FONTE: A autora (2014).

7.2.3 Massa A

A massa A é iniciada com magma e alimentada com xarope e mel rico (FIGURA 9). Os cristais produzidos por estes cozedores são o produto final. A massa é liberada em um recipiente de agitação contínua, chamado cristalizador, onde os cristais aumentam de tamanho. Após o tempo mínimo, esta massa do cristalizador é centrifugada. Os cristais ficam retidos em uma malha padronizada e o mel purgado nesta etapa é o mel pobre. Para que o mel residual seja retirado dos cristais é feita uma lavagem com água, a qual arrasta sacarose dos cristais já formados, portanto, este mel da lavagem é conhecido como mel rico, com maior pureza que o mel pobre.

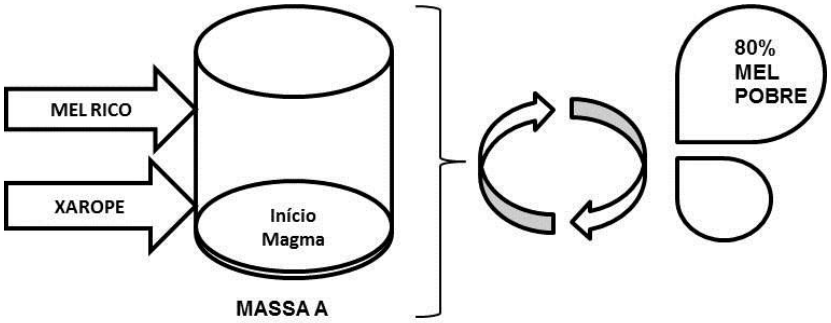

FIGURA 9. ESQUEMA GERAL DA MASSA A. FONTE: A autora (2014).

Ao fim deste processo, o açúcar retido na centrífuga passa por um secador e é resfriado, podendo ser armazenado em *big bags* ou carregado em caminhões. No caso do açúcar cristal, uma planta anexa realiza o ensaque e o

processo tem várias modificações técnicas e operacionais. (AGEITEC- Agência Embrapa de Iinformação Tecnológica, EMBRAPA, 2014); MARAFANTE, 1993; Manual Dedini – Sistema de cozimento de duas massas para a Usina X, 2000).

REFERÊNCIAS

ABDEL-NABY, M A; ISMAIL, A M S; ABDEL-FATTAH, A M. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. **Process Biochemistry,** n. 34, p. 391–398, 1999.

ABDELWAHED, N A M; AHMED E F; EL-GAMMAL E W; HAWAS U W. Application of statistical design for the optimization of dextranase production by a novel fungus isolated from Red Sea sponge. 3 **Biotech**, dez. 2013.

ALIYU, S; BALA M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology,** n. 10, p. 324-331, 2011.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries temáticas – Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 2004. Disponível em: www.portal.anvisa.gov. Acesso em: 20 jan.2013.

ARNOLD, W. N.; NGUYEN, R. B. P; MANN, L. C. Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix schenkii*. **Arch Microbiol,** n.170, p. 91-98, 1998.

ASLAN, Y; TANRIVESEN, A. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharides from dextran. **Biochemical Engineering Journal**, n. 34, p. 8–12, 2007.

ATHÈS, V; GUERRA, P; COMBES, D. Effect of soluble additives on enzyme thermo- andror baro-deactivation**. Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatics**, (7):1-9, 1999.

BIORESOURCE COLLECTION AND RESEARCH. Disponível em: {http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802260005}. Acesso em 14/03/2014.

BOURNEOW, C; BENJAKUL, S.; H-KITTIKUN, A. Impact of some additives on the stability of microbial transglutaminase from *Providencia* sp. C1112. **As. J. Food Ag-Ind.** n.5, v.03, p. 226-233, 2012.

BOURSCHEIDT, C. T.; OLIVEIRA, B. H.; SILVA, G. M. C. Avaliação do resíduo do bagaço de malte na alimentação animal. **Anais do II ENDICT** – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica, 2010.

BRENDA Enzyme Database. Institut fur Biochemie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig, Langer Kamp 19B 38106 Braunschweig, Germany, 2014.

BROWN, C.F.; INKERMAN, P.A. Specific method for quantitative measurement of the total dextran content of raw sugar. **J. Agric. Food Chem.** n. 40, p. 227-233, 1992.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N. Effect of certain additives on sorbate stability. **Food Research International**, n.29, p.147-154, 1996.

CANTAREL, B. L; COUTINHO, P. M; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, D. HERNRISSAT, B. The carbohydrate active enzymes – CAZy: an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Res**.; 2009; 37:D233-238. Disponível em: {http://www.cazy.org/}. Acesso em 03/02/2014.

CATALOGUE OF LIFE. Disponível em: www.catalogueoflife.org. Acesso em 28/06/2014.

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 Microbiology,** p.421-426, 1970.

CHEETAM, N W H; RICHARDS, G. N. Studies on dextranases. **Carbohydrate Research**, p.333-339, 1972.

CIOCI, F. Thermostabilization of erythrocyte carbonic anhydrase by polyhydric additives. **Enzyme and Microbial Technology.** n.17, p.592-600, 1995.

COLACINO, F.; CRICHTON, R. R. Enzyme thermostabilization: the State of Art. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, n.14, p.211-277, 1997.

COSTA, S. A.; TZANOV, T.; CARNEIRO, A. F.; PAAR, A.; GÜBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Studies of stabilization of native catalase using additives. **Enzyme and Microbial Technology**, 30:387–391, 2002.

COTÊ, G. L. Low-viscosity α-D-glucan fractions derived from sucrose which are resistant to enzymatic digestion. **Carbohydrate Polymer.** n. 19, p.249-252, 1992.

CUDDIHY, J. A, DONALD, F. D. The process and financial impact of dextran on a sugar factory.**Sugar Journal**. n. 3, p.27–30, 1999.

DAS, D. K.; DUTA, S. K. Purification, biochemical characterisation and mode of action of an extracellular endodextranase from the culture filtrate of *Penicillium lilacinum*. Int. **J. Biochem. Cell Biol.** n. 28, p.107-113, 1996.

DAY, D.F. **Spoilage in the sugar industry.** The lactic acid bacteria. B. J. B. Wood. London and New York: Elsevier Applied Science, 1992. p. 343-361.

DHILON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K. In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. **International Biodeterioration & Biodegradation**. n. 72, p. 67-75.

DONKERSLOOT, J. A. ; HARR, R. J. More sensitive test agar for detection of dextranase - producing oral *Streptococci* and identification of two glucan synthesis-defective dextranase mutants of *Streptococcus mutans* 6715. **Journal of Clinical Microbiology**. n. 10, p. 919-922, 1979.

EGGLESTONE, G.; MONGE, A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. **Process Biochemistry.** n. 40, p. 1881–1894, 2005.

EGGLESTONE, G.; MOREL DU BOIL, P.G.; WALFORD, S.N. A review of sugar cane deterioration in the United States and South Africa. **Proc S Afr Sug Tecnhol. Ass**. n. 81, p. 72-85, 2008.

EGGLESTONE, G.; MONGE, A.; MONTES B., STEWART, D. Application of dextranases in sugarcane factory : Overcoming practical problems. **Sugar Tech** 11(2) : 135-141, 2009.

EGGLESTONE, G.; YEN, J.W.T.; ALEXANDER, C.; GGOBER, J. Measurement and analysis of the mannitol partition coefficient in sucrose crystallization under simulated industrial conditions. **Carbohydrate Research.** n. 355, p. 69–78, 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. AGIETEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Árvore do conhecimento, cana-de-açúcar, fabricação do açúcar. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de acucar/arvore/CONT000fkcg3t9y02wyiv80sq98yq8ekb08p.html**.** Acesso em 23/04/2014.

ERHARDT, F. A.; JÖRDENING, H. J. Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*. **Journal of Biotechnology.** n. 131, p. 440–447, 2007.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura.

FDA. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for Industry ANDAs: Stability Testing of Drug Substances and Products. 2013.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. ; SZAKACS, G. ; PANDEY, A. Synthesis of α-amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Journal of Basic Microbiology.** n. 42, p. 320–326, 2002.

FU, D.; LI, C.; LU, J.; RAHMAN, A.; TAN, T. Relationship between thermal inactivation and conformational change of *Yarrowia lipolytica* lipase and the effect of additives on enzyme stability. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 66:136–141, 2010.

FUKIMOTO, J.; H. TSUJI; D. I. TSURU. *Penicillium luteum* dextranase: its production and some enzymatic properties. J. Biochem. 69:1113–1121, 1971.

GOUDA, M. D.; SINGH, S. A.; APPU RAO, A. G; THAKUR, M. S.; KARANTH, N. G. Thermal inactivation of glucose oxidase: mechanism and stabilization using additives. **J. Biol. Chem.** 26:24324-24333, 2003.

GULLA, K C; GOUDA, M D, THAKUR, M S, KARANTH, N G. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. **Biosensors and Bioelectronics**. 19: 621–625, 2004.

HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. **Protein purification methods**: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1989.

HATADA, Y.; HIDAKA, Y.; NOGI, Y.; UCHIMURA, K.; KATAYAMA, K.; LI, Z.; AKITA, M.; OHTA, Y.; GODA, S.; ITO, H.; MATSUI, H.; ITO, S.; HORIKOSHI, K. Hyper-production of isomato-dextranase of an *Arthrobacter* sp by a protease deficient *Bacillus subtilis*: sequencing, properties and crystallization of the recombinant enzyme. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology,** 65:583-592, 2004.

HAYACIBARA, M. F.; KOO, H.; SMITH, A. M. V.; KOPEC, L. K.; SCOTT-ANNE, K.; CURYA, J. A.; BOWENB, W. H. The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by streptococcal glucosyltransferases. **Carbohydrate Research.** n. 339, p. 2127–2137, 2004.

HOSTER, F., DANIEL, R. GOTTSCHALK, G. Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase. **J. Gen. Appl. Microbiol**., 47, 187–192, 2001.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Available in: www.ich.org. Acesso em 14/03/2014.

IZUTSU, K.; YOSHIOKA, S.; TAKEDA, Y. The effects of additives on the stability of freeze-dried p-galactosidase stored at elevated temperature. **International Journal of Pharmaceutics**, 71:137-146, 1991.

JIMÉNEZ, E.F. La dextranasa a lo largo de la industria azucarera. **Biotecnología Aplicada.** n. 22, p. 1-19, 2005.

KAUR, S; KALER, R S S. Dextran and its effect on the flow behaviour of molasses and crystallization rate. **Journal of Food Engineering.** n. 86, p.55–60, 2008.

KHALIKOVA E, SUSI P, USANOV N, KORPELA T. Purification and properties of extracellular dextranase from a *Bacillus* sp. **Journal of Chromatography B.** n.796,p.315–326, 2003.

KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** p.306-325, 2005.

KIM, D.; DAY, D.F. A new process for the production of clinical dextran by mixed-culture fermentation of *Lipomyces starkeyi* and *Leuconostoc mesenteroides*. **Enzyme Microb. Technol.** n.16, p.844-848, 1994.

KIM, Y. M. ; SEOC, M. Y.; KANGA, H. K.; ATSUOD, K.; KIMA, D. Construction of a fusion enzyme of dextransucrase and dextranase: Application for one-step synthesis of isomalto-oligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 44, p. 159–164, 2009.

KOENIG D; DAY, D. The purification and characterization of a dextranase from *Lypomyces starkeyi*. **European Journal of Biochemistrry,** 183:161-167, 1989.

LEE, J. M.; FOX, P.F. Purification and characterization of *Paecilomyces lilacinum* dextranase. **Enzyme Microb. Technol.** n.7, p. 573-577, 1985.

LI, S.; SCHÖNEICH, C.; BORCHARDT, R. T. Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. **Biotechnology and Bioengeneering**, 48, 490-500, 2004.

LONGO, M. A.; COMBES, D.Thermostability of modified enzymes: a detailed study. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 74: 25–32, 1999.

MADHU G.L.S..; PRABHU, K. A. Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*. **Enzyme Microb. Technol**. n. 6, p. 217-220,1984.

MARAFANTE, M. J. **Tecnologia da fabricação do álcool e do açúcar**. São Paulo: Ícone, 1993.

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**. n. 38, p. 101-108, 2002.

MEHVAR, R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. **Journal of Controlled Release**. n. 69, p. 1–25, 2000.

MHRA - Regulation Medicines and Medical Devices. Disponível em: www.mhra.com.uk. Acesso em 14/03/2014.

MOZHAEV, V. V.; MARTINEK, K. Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. **Enzyme Microb. Technol.** 6:50-59, 1984.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Review: Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications.**Journal of Cereal Science**. n. 43, p.1–14, 2006.

OBARA-DOI, S. M.; DEKKER, R. F.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Otimização da produção de dextranase de *Fusarium sp* utilizando metodologia de superfície de resposta. XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis, 2003.

OLAJIRE, A. A. The brewing industry and environmental challenges. **Journal of Cleaner Production.** p. 1-21, 2012.

ÖLÇER, Z; TANRIVESEN, A. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in alginate. **Process Biochemistry.** n. 45, p. 1645–1651, 2010.

OLIVEIRA, A. S.; RINALDI, D. A.; TAMANINI, C.; VOLL, C. E.; HAULY, M. C. O. Factors that Interfere in Dextran Production By Sugarcane Contaminating Microorganisms. **Semina**: Ciências Exatas e Tecnológica. n. 23, p. 99-104, 2002.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Bioconversion of biomass: A case study of ligno-cellulosics bioconversions in solid state fermentation. **Brazilian Archives Biology Technology,** n.41, v.4, p.379-390, 1998.

PANDEY A. **Solid state fermentation- an overview.** In- Solid State Fermentation, A. Pandey (ed.), Wiley Eastern Publishers, New Delhi, 3-10, 1994.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V. T. Biopotential of immobilized amylases. **Indian J. Microbiol**. v.40, p.1-14, 2000.

PATEL, S.; KASOJU, N.; BORA, U.; GOYAL, A. Structural analysis and biomedical applications of dextran produced by a new isolate *Pediococcus pentosaceus* screened from biodiversity hot spot Assam. **Bioresource Technology.** p. 6852–6855, 2010.

PIERCE BIOTECHNOLOGY INC., Rockfold, IL, USA. Technical Resource. Protein stability and storage. 2005.

PLESZCZYNSKA, M.; ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Purification and some properties of an extracellular dextranase from *Penicillium notatum*. **Mycol. Res.** n.100. v.6, p. 681-686, 1996.

PRADO, F.C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R. Relation between citric acid production by solid state fermentation from cassava bagasse and respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in semi-pilot scale. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, 48: 29-36, 2005.

PURUSHE, S. ; PRAKASH, D. ; NAWANI, N. N.; DHAKEPHALKAR, P.; KAPADNIS, B. Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial measure for dextran removal during sugar manufacture. **Bioresource Technology**, n. 115, p. 2-7, 2012.

RAMACHANDRAN,S.; SINGH, S.K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications. A review **Bioresource Technology**. n.98, p.2000–2009, 2007.

RAOKAH, N.; SUJIJ, K.; FUKUMOTO, U.; YAMAMOTO, T.; TSURU, D. Some Physicochemical Properties and Substrate Specificity of Dextranases Obtained from *Aspergillus carneus* and *Penicillium luteum*. **Int. J. Peptide Protein Res.** n. 5, p. 161-169, 1973.

RICHARDS, G. N.; STREAMER, M. Studies on dextranases. Part 1. Isolation of extracellular, bacterial. **Carbohydrate research,** n.25, p.323-332, 1972.

RODRIGUES, S.; LONA, L.M.F. ; FRANCO, T.T. The effect of maltose on dextran yield and molecular weight distribution. **Bioprocess Biosyst Eng**. n. 28, p. 9–14, 2005.

RYU, H. J; JIN, X.; LEEC, J. H.; WOO, H. J.; KIM, Y. M.; KIM, G. J.; SEO, E. S.; KANG, H. K.; KIM, J.; CHOG, D. L; KIMURA, A.; KIM, D. Optimal expression and characterization of a fusion enzyme having dextransucrase and dextranase activities. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 47, p. 212–215, 2010.

SALASSI, M.E.; GARCIA, M.; BREAUX, J.B.; NO, S.C. Agricultural Economics Association of Georgia Impact of Sugarcane Delivery Schedule on Product Value at Raw Sugar Factories. **Journal of Agribusiness**. n. 22, p.61-75, 2004.

SALMON, D.N.X., PIVA, L.C., BINATI, R.L., RODRIGUES, C. VANDENBERGHE, L.P.S., SOCCOL. C.R., SPIER, M.R. A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 35, p.1067–1079, 2012.

SANTOS, M.S.; RIBEIRO, F.M. **Cervejas e Refrigerantes.** São Paulo: CETESB, 2005. 58 p.

SCOMPARIN, A.; SALMOSOA, S.; BERSANIA, S.; SATCHI-FAINAROB, R.; CALICETI, P. Novel folated and non-folated pullulan bioconjugates for anticancer drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. n. 41, p. 547–558, 2001.

SHIMIZU, E.; UNNO, T.; OHBA, M.; OKADA, G. Purification and characterization of an isomaltotriose-producing endodextranase from *Fusarium* sp. **Bioscience, Biotecnhology and Biochemistry.** n. 62, p.117-122, 1998.

SHUKLA, G. L. ; MADHU ; PRABHU, K. A. Study of some parameters for the production of dextranase by *Penicillium aculeatum*. **Enzyme Microb. Technol.** n.11, p. 533-536, 1989.

SINDICERV. Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Disponível em: www.sindicerv.com.br. Acesso em:03/02/2014.

SINGLETON, V.; HORN, J.; BUCKE, C.; ADLARD, M. A. New polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose. **Journal American Society of Sugarcane Technologists.** n. 22, p.112-119, 2002.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, P. S. 2003. Overview of solid-state fermentation. **Biochemical Eng. Journal**, 13: 205-18, 2003.

SOLOMON, S. Post-Harvest cane deterioration and its milling consequences. **Sugar Tech**. n.2, p.1-18, 2000.

SPIER, M.R.; GREINER, R.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; WOICIECHOWSKI, A.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. Phytase production using citric pulp and other residues of the agro-industry in SSF by fungal isolates. **Food Technology Biotechnology,** n.46, p.178-182, 2008.

SPIER, M.R.; SCHEIDT, G.N; PORTELLA, A.C; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; WOICIEHOWSKI, A.L.; GREINER, R.; SOCCOL, C.R. Increase in Phytase Synthesis During Citric Pulp Fermentation. **Chemical Engineering Communications,** v. 198, p. 286 – 297, 2011.

SUGIURA M. Studies on dextranase – Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.357-362, 1973.

TALLGREN, A. H.; AIRAKSINEN, U.; VON WEISSENBERG, R.; OJAMO, H.; KUUSISTO, J.; LEISOLA, M. Exopolysaccharide-Producing Bacteria from Sugar Beets. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 862–864, 1999.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J A N. **Microbiologia**. Rio de Janeiro. Atheneu, 1999.

ÚNICA. Cenários e desafios para a expansão do setor sucroenergético. 2012-2013. Disponível em: www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=21033654. Acesso em abril 2014.

USDA. United States Department of Agriculture. **Sugar:** World Markets and Trade. nov. 2013.

VETRIANI, C; MAEDER, P L; TOLLIDAY, N; YIP, K S; STILLMAN, H H; ROBB, F T. Protein thermostability above 100°C: A key role for ionic interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA, n.95,p.12300-12305, 1998.

WALKER, G J; MURRAY, V L; MORAY-JONES, J. G. Regulation of dextranase synthesis by *Streptococcus mutans*. **Febs Letters**. n. 115, p. 206-208, 1980.

WEIJERS, S R; RIET, K V. Enzyme stability in downstream processing. Part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization. **Biotech. Adv**., n.10, p237-249, 1992.

WYNTER, C.; PATEL, B. K. C.; BAIN, P.; JERSEY, J.; HAMILTON, S. A novel thermostable dextranase from a *Thermoanaerobacter* species cultured from the geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. **FEMS Microbiology Letters**. n. 140, p. 271-276, 1996.

XIROS, C; TOPAKAS, E; KATAPODIS, P; CHRISTAKOPOULOS, P. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. **Bioresource Technology.** n. 99, p. 5427–5435, 2008.

CAPÍTULO II
PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

RESUMO

Diversos micro-organismos foram testados quanto à produção de dextranases, entre eles, 59 micro-organismos isolados do bagaço de cana, 5 cepas padrão NRRL e 28 cepas da coleção de culturas do Laboratório de Bioprocessos I. Dentre as cepas testadas, *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 alcançou uma das maiores produções de dextranases em meio sintético. A cepa foi então empregada em fermentação no estado sólido, nas etapas posteriores. Alguns resíduos agroindustriais foram testados para a produção da enzima e o bagaço de malte foi o melhor substrato/suporte propiciando a produção de 64,39 $U.g^{-1}$ de dextranases no quarto dia de fermentação. A melhor fonte de nitrogênio selecionada foi o sulfato de amônio. Delineamentos experimentais foram aplicados com o objetivo de determinar os componentes no meio nutritivo para a produção de dextranases. A seleção de componentes a serem adicionados à solução nutritiva iniciou com sete componentes. Dois componentes foram significativos: sulfato de amônio e dextrana. A melhor condição para a produção de dextranases por FES em frascos Erlenmeyer de 250 mL foi: dextrana 15 $g.L^{-1}$, sulfato de amônio 0,45 $g.L^{-1}$ com umidade inicial de 70%, pH inicial 5 e utilizando 8 g de bagaço de malte a 30°C. A atividade inicial aumentou em 18%, alcançando ao fim dos experimentos de otimização 75,5 $U.g^{-1}$ de dextranases.

Palavras-chave: dextranase; fermentação no estado sólido; otimização; delineamento experimental.

1 INTRODUÇÃO

O processo sucroalcooleiro não é asséptico, o que demanda uma série de cuidados para o controle de contaminações microbiológicas. Algumas linhagens são capazes de produzir exopolissacarídeos (EPS) e o mais amplamente estudado contaminante deste processo é o *Leuconostoc mesenteroides*, o principal produtor de dextrana.

A dextrana afeta todo o processo dentro da indústria principalmente porque aumenta a viscosidade do caldo de cana e das massas. O açúcar formado na presença de dextrana tem qualidade inferior, com cristais alongados (JIMÉNEZ, 2005) e cor ICUMSA fora do padrão. O único método disponível capaz de eliminar a dextrana formada é a aplicação de dextranases. Infelizmente, apesar de estar disponível no Brasil, seu alto custo não permite o emprego em larga escala nas usinas. O custo desta enzima gira em torno de 100 U$ o litro, em uma cotação realizada em 2012 (Usina X).

As dextranases são pesquisadas há muitas décadas, e uma diversidade de micro-organismos entre fungos, bactérias e leveduras foram identificadas como produtores da enzima. De forma geral, os fungos alcançam as maiores produções enzimáticas e destacam-se os fungos do gênero *Chaetomium* sp como os principais produtores das enzimas dextranases comerciais (JIMÉNEZ, 2005). Até o momento, nenhum trabalho emprega o uso de resíduos para a produção de dextranases e os artigos empregam meios de cultivo complexos e sintéticos.

Diversos resíduos têm sido empregados para a produção de enzimas por processos biotecnológicos, na tentativa de reutilização dos mesmos. Um dos principais bioprocessos é a fermentação em estado sólido (FES). Esta técnica já foi empregada com sucesso para a produção de enzimas, apresentando algumas vantagens em comparação ao método de fermentação submersa, como: necessidade de pouca energia, custos reduzidos com água, alta produtividade, reuso de resíduos e pouco volume de resíduos líquidos gerados (PANDEY, 2003), entre outros. Em países como o Brasil, com vasta biomassa vegetal e muitos resíduos agroindustriais disponíveis, a FES mostra-se promissora na obtenção de vários produtos (SOCCOL e VANDENBERGHE,

2003). Alguns processos bem sucedidos para produção de enzimas foram relatados empregando-se resíduos, tais como a produção de fitases a partir fibra de trigo (SALMON *et al*., 2012) e polpa cítrica (SPIER *et al*., 2011), obtenção de amilases pelo emprego do bagaço de mandioca (PANDEY *et al*., 2000), mananases a partir de cascas de soja, lacases (DHILLON *et al*., 2012) e alfa-amilases (FRANCIS *et al*., 2002) a partir de bagaço de malte. O bagaço de malte é um resíduo gerado em abundância, aproximadamente 15,4 milhões de toneladas anuais (FAO, 2013). Além da grande disponibilidade, este resíduo é produzido a baixos custos e possui riqueza de (% em base seca): proteínas (2,4 a 24), carboidratos (79,9), fibras (3,3) e lipídeos (2,5 a 10,6) (ALIYU e BALA, 2011). Estas características conferem ao resíduo uma potencialidade para o emprego como suporte em FES.

O uso de planejamentos experimentais para otimização de bioprocessos tem sido cada vez mais empregado, diminuindo o tempo e custos dos experimentos. Além da resposta rápida e viabilidade econômica, os planejamentos avaliam ao mesmo tempo a interferência e interação de vários fatores e em várias respostas. Desta forma, a análise estatística resultante permite a avaliação das respostas de forma confiável e criteriosa (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

O objetivo desta etapa foi selecionar micro-organismos produtores de dextranases, além de determinar o bioprocesso mais adequado e o substrato/suporte empregado. Na segunda etapa, o objetivo foi otimizar a produção de dextranases a partir do resíduo e micro-organismo selecionados em FES, utilizando planejamentos experimentais e análises estatísticas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Ensaios preliminares

2.1.1 Micro-organismos testados na produção de dextranases

As cepas *Penicillium aculeatum* NRRL 2129, *P. pinophilum* NRRL 3503, *P. funiculosum* NRRL 3647, *Microbacterium dextranolyticum* B-23242 e

Artrobacter globiformis B-4425, conhecidos produtores de dextranases, foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service Culture Collection*).

As cepas do gênero *Giberella* sp (2AB, G42, 1AB, 1AC, 1CB, 1FA, 1FB, 1FBP, 1516, 2284, 3CB, 3CP, 3DC, 3C2, 4EB, BCA, F, G22, H11, H12, H12 Vills, H21, H31) , *Rhizopus* sp (25975, 5905) e *Aspergillus* sp (1278 e Cuba) empregadas neste estudo são provenientes da Coleção de Culturas do Laboratório de Processos Biotecnológicos I (LPB I) da Universidade Federal do Paraná. Estas cepas estão classificadas dentro dos respectivos gêneros e suas espécies não foram identificadas.

Além das cepas provenientes dos bancos, um isolamento de cepas foi realizado, incubando-se o bagaço de cana (proveniente de amostras de bagaço de cana-de-açúcar com altas concentrações de dextrana registrada em boletins industriais) em água peptonada 0,1% (m/v) e dextrana 1% (m/v). Desta forma, a utilização desta condição visou a indução do crescimento de micro-organismos capazes de crescer em meio contendo apenas dextrana, ou seja, que sintetizam dextranases. O material permaneceu sob agitação a 120 rpm por 24 h a 32°C neste meio. O meio de cultivo fermentado foi diluído por diluição seriada e inoculado em placas contendo PCA (Plate Count Agar) para bactérias e PDA (Potato Dextrose Agar) para fungos, as quais foram incubadas a 35°C por 48 h e à 28°C por 48 h para a seleção de bactérias e fungos, respectivamente. O esquema geral da pré-seleção pode ser observado na FIGURA 1.

As colônias isoladas nas placas foram transferidas para tubos contendo meio de cultivo idêntico ao de seleção, identificadas e armazenadas a 4°C.

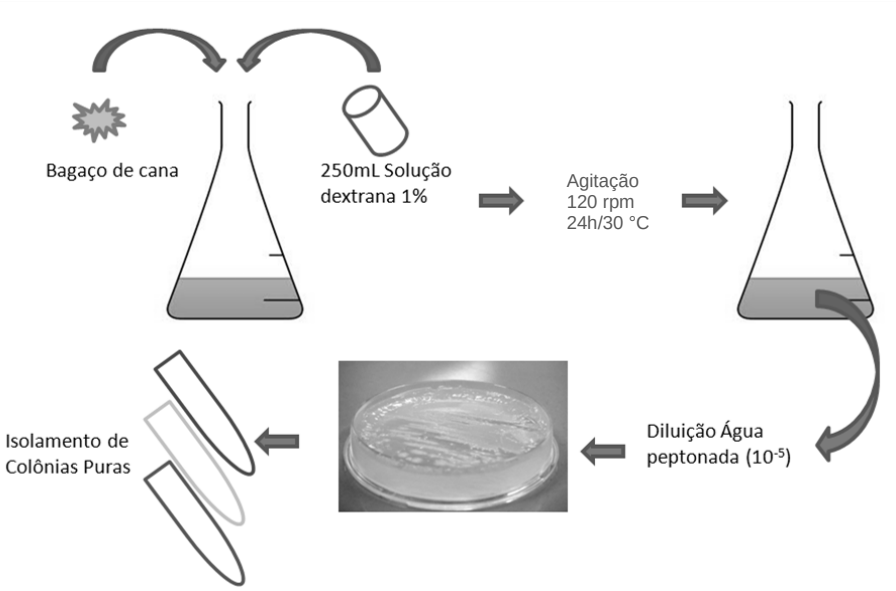

FIGURA 1. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PROVENIENTES DE BAGAÇO DE CANA. FONTE: A autora (2014).

2.1.2 Preparo do inóculo para a produção de dextranases

As cepas fúngicas esporuladas foram incubadas durante 7 dias em meio de cultura PDA (Potato Agar Dextrose) a 28°C. O inóculo foi preparado por meio da suspensão dos esporos cultivados em solução Tween 80 0,1%, agitados com barra magnética. Para as linhagens do gênero *Giberella* sp, após o crescimento em PDA foram recortados discos de diâmetro definido (1,5 mm) e 3 discos foram inoculados em cada Erlenmeyer.

As cepas bacterianas foram incubadas por 48 h a 30°C em meio BHI (Brain and Heart Infusion). A inoculação foi feita pela transferência de 10% do volume do meio de cultivo para o meio de fermentação. Os meios de inóculo e de fermentação para cepas bacterianas foram os mesmos.

2.1.3 Seleção de cepa produtora de dextranase

As linhagens foram testadas em provas fermentativas quanto à sua capacidade de produzir dextranases.

Para as linhagens fúngicas foi empregado o meio de composição ($g.L^{-1}$) dextrana 2,0; $NaNO_3$ 10; K_2HPO_4 4,0; extrato de levedura 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2; KCl 0,2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 (ABDEL-NABY *et al*., 1998 - modificado). Os

frascos foram incubados a 28°C, em shaker sob agitação de 120 rpm durante 7 dias. O fermentado foi filtrado em papel Whatman n°1 e a atividade dextranásica foi determinada.

As diferentes colônias bacterianas isoladas do bagaço de cana foram transferidas para meios de cultivo BHI (Brain and Heart Infusion) enriquecidos com dextrana 2 $g.L^{-1}$. Os frascos foram incubados em condições estáticas por 48 h. O fermentado foi centrifugado e o sobrenadante testado para atividade dextranásica. A FIGURA 2 resume as etapas de seleção realizadas.

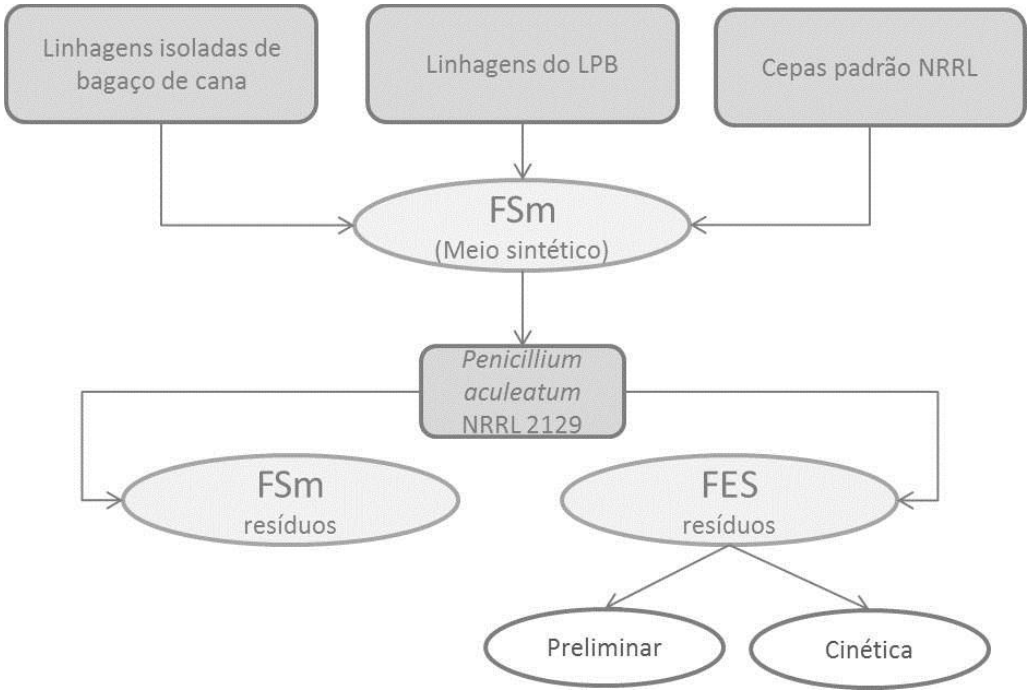

FIGURA 2. FLUXOGRAMA GERAL DAS OPERAÇÕES REALIZADAS NA SELEÇÃO DE CEPAS E SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE DEXTRANASE.

2.2. Estudos de produção de dextranases por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129

2.2.1 Seleção do tipo de fermentação

2.2.1.1 Fermentação submersa (FSm) com reaproveitamento de resíduos

O extrato aquoso dos resíduos cascas de café, cascas de soja, bagaço de mandioca, bagaço de malte, polpa cítrica e farelo de trigo foram obtidos após o aquecimento sob ebulição dos resíduos secos em 10 volumes de água deionizada (1:10 m/v) por 30 minutos (FIGURA 3) O extrato foi resfriado, filtrado e diluído 1:2 com agua deionizada. Os meios de cultura com mel de soja e mel de cana foram diluídos 1:20. A estes meios foram acrescidos (g/L): dextrana (70 kDa) 10 g; $NaNO_3$ 10 g; K_2HPO_4 4 g; extrato de levedura 2 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2 g; KCl 0,2; $FeSO_4.7H_2O$ 0,001 (ABDEL-NABY et al, 1998). Os frascos Erlenmeyers foram inoculados e incubados por 7 dias a 28°C sob agitação (120 rpm). Os fermentados foram filtrados em papel Whatman n°1 e a atividade dextranásica foi determinada conforme descrita no item 2.6.

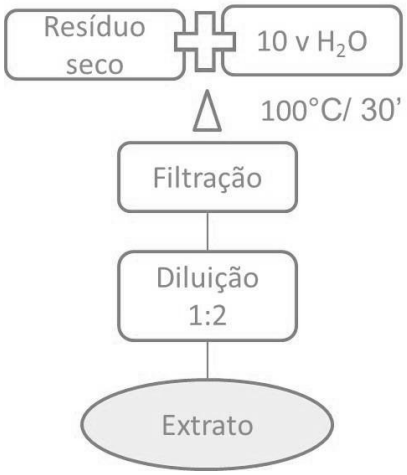

FIGURA 3. OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO A PARTIR DE RESÍDUOS

2.2.1.2 Fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais

Diferentes substratos/suporte foram testados em fermentação no estado sólido (FES). Os substratos testados foram: bagaço de cana, cascas de café, bagaço de mandioca, farelo de trigo, bagaço de malte e polpa cítrica.

O bagaço de cana foi fornecido por uma indústria localizada no Paraná. Cascas de café (cedidas pela Café Damasco®) foram pré-tratadas com KOH 0,25% para remoção dos compostos fenólicos. As cascas de soja foram fornecidas por Imcopa®. Polpa cítrica, bagaço de mandioca, farelo de trigo já estavam disponíveis no laboratório e não necessitaram de pré-tratamentos. O

bagaço de malte foi fornecido por uma cervejaria artesanal da região metropolitana de Curitiba e necessitou de secagem em estufa de circulação a 50 °C. A estes suportes foi acrescida a solução nutritiva composta por: dextrana (70 KDa) 10 g; $NaNO_3$ 10 g; K_2HPO_4 4 g; extrato de levedura 2 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2 g; KCl 0,2; $FeSO_4.7H_2O$ 0,001 g por litro (ABDEL-NABY *et al*., 1998). A mistura foi homogeneizada com bastão de vidro, os frascos Erlenmeyer fechados com tampão de algodão e incubados em estufa a 30° C por 7 dias.

2.2.2 Estudos cinéticos de FES com os melhores substratos/suportes

O bagaço de cana-de-açúcar, polpa cítrica e bagaço de malte foram testados por 8 dias para avaliação da cinética de produção de dextranase. O procedimento de fermentação foi o mesmo descrito em 2.2.1.2. As umidades iniciais foram de 70%. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicatas.

2.3 Produção do inóculo em meio extrato de bagaço de malte

Numa tentativa de adaptar a cepa selecionada do fungo *Penicillium aculeatum* NRRL 2129, procurou-se preparar o inóculo em extrato aquoso do bagaço de malte. Com isso, esperava-se aumentar a produtividade do processo de produção de dextranases em FES.

O bagaço de malte foi seco a 50°C em estufa de circulação de ar. O extrato do bagaço de malte foi obtido após o aquecimento sob ebulição do bagaço seco em 10 volumes de água deionizada (1:10 m/v) por 30 minutos. O extrato foi resfriado, filtrado e diluído 1:2 com água deionizada. O meio de inóculo foi composto por este extrato acrescido de ágar e dextrose, ambos na concentração de 20 $g.L^{-1}$. Os frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo os meios foram inoculados com esporos de *P. aculeatum* e incubados por 7 dias a 28°C. Após o crescimento e esporulação, os esporos foram suspensos e inoculados a 10^7 esporos por grama de substrato.

2.4 Determinação da composição do bagaço de malte

A caracterização físico-química do substrato selecionado, bagaço de malte, foi determinada. O bagaço foi seco e uma amostra homogênea e representativa foi enviada ao Laboratório de Nutrição Animal da UFPR para determinação da umidade, resíduo mineral, proteína, fibra total, extrato etéreo, pH e íons cálcio, fósforo, sódio, potássio e magnésio. Todos os métodos analíticos seguiram o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2009.

2.5 Preparação do extrato enzimático

Uma amostra de 5 g do fermentado sólido foram homogeneizados em agitador magnético por 10 minutos com 50 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5. A suspensão foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1. O filtrado foi analisado quanto à atividade enzimática.

2.6 Determinação da atividade dextranásica

A atividade da dextranase foi determinada pela incubação de 0,5 mL de dextrana T2000 (Sigma) 2%(m/v), substrato padrão, em tampão acetato de sódio pH 5 com 0,5 mL do extrato enzimático diluído. Após 20 minutos de incubação a 50°C foi adicionado 1 mL de DNS e o conteúdo resfriado. Após resfriamento, foram acrescidos 3,5 mL de água destilada e o conteúdo homogeneizado. Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária de enzima que hidrolisa dextrana equivalente a 1 µmol de maltose por minuto nas condições mencionadas.

2.7 Otimização da produção de dextranase por *P. aculeatum* em FES utilizando bagaço de malte

Após estudos de seleção de cepa e substrato, a otimização da produção de dextranases foi realizada com *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 utilizando bagaço de malte como substrato/suporte em frascos Erlenmeyer de 250 mL.

2.7.1 Otimização das condições físico-químicas

O primeiro delineamento experimental empregado foi do tipo DCCR (Delineamento Central Composto Rotacional) tipo 3^3 para avaliar as variáveis independentes (TABELA 1) físico-químicas pH (4,32, 5, 6, 7,68), umidade (53,2, 60, 70, 80 e 86,8%) e quantidade de substrato (1,28, 4, 8, 12, 14,72 g) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, utilizando o meio nutritivo já descrito no item 2.2.1.1. As faixas estudadas de umidade e quantidade de substrato foram baseadas na capacidade de absorção do bagaço de malte.

A metodologia de superfície de resposta foi aplicada para avaliar a influência dessas variáveis na produção de dextranase (variável resposta). Os resultados das atividades dextranásicas foram analisados por meio do software Statistica 5.1 (StatSoft Inc., USA).

TABELA 1. NÍVEIS DAS VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS TESTADAS PARA A PRODUÇÃO DE DEXTRANASES POR *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 EM FES COM BAGAÇO DE MALTE

		Níveis				
Variáveis independentes	**Símbolo**	**-1,68**	**-1**	**0**	**+1**	**+1,68**
pH	pH	4,32	5	6	7	7,68
Umidade	U %	53,2	60	70	80	86,8
Bagaço de malte	g	1,28	4	8	12	14,72

2.7.2 Determinação da influência da fonte de nitrogênio na produção de dextranases

O segundo grupo de experimentos teve como objetivo a escolha da melhor fonte de nitrogênio para a produção de dextranases por FES com bagaço de malte. Os experimentos seguiram em triplicada da seguinte maneira: o meio original (com extrato de levedura), utilizado como controle, meio com $NaNO_3$ e extrato de levedura; meio com $NaNO_3$; meio com extrato de levedura; $(NH_4)_2SO_4$ e ureia $(NH_2)_2CO$. A quantidade de nitrogênio foi calculada de maneira a se ter quantidade equivalente de nitrogênio em todos os ensaios. Os frascos foram inoculados conforme item 2.3 e os frascos incubados a 28°C por 5 dias.

Os resultados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism® 3.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

2.7.3 Determinação da composição da solução nutritiva

2.6.3.1 Seleção dos componentes da solução nutritiva – Planejamento do tipo Plackett-Burman

Para avaliar a significância dos componentes da solução nutritiva a ser adicionado ao bagaço de malte para a produção de dextranase por FES foi estabelecido um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman.

A concentração de dextrana foi fixada em 10 $g.L^{-1}$. Os sais de sulfato de amônio, fosfato de sódio dibásico, sulfato de magnésio, cloreto de sódio e sulfato de ferro foram variados nos níveis apresentados na TABELA 2 . Foram realizados 3 ensaios no ponto central. O nível (-1) foi definido como concentração zero de cada componente estudado e o nível (+1) foi definido como a concentração já utilizada do componente, de modo a se testar a influência da presença e ausência de cada um sobre a atividade de dextranase.

TABELA 2. NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA *SCREENING* DAS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS NA PRODUÇÃO DE DEXTRANASE POR *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 EM FES

		Níveis		
Variáveis independentes (g/L)	**Símbolo**	**-1**	**0**	**1**
Sulfato de amônio	$(NH_4)_2SO_4$	0	0,115	0,23
Fosfato de sódio dibásico	K_2HPO_4	0	2	4
Sulfato de magnésio	$MgSO_4$	0	0,1	0,2
Cloreto de sódio	KCl	0	0,1	0,2
Sulfato de ferro	$FeSO_4$	0	0,0005	0,001

2.7.3.2 Determinação das condições ótimas para a composição da solução nutritiva – Planejamento do tipo DCCR

De acordo com a etapa anterior, apenas o sulfato de amônio é significativo ($p<0,05$) na produção de dextranases em FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 com bagaço de malte como substrato/suporte a 95% de significância. Considerando que o cloreto de potássio foi significativo a 90% de significância, este sal também foi incluído nesta segunda etapa, com o objetivo de estudar o impacto de sua concentração. Nesta etapa também a dextrana, o indutor, foi estudada em diferentes concentrações.

Para a definição das concentrações dos componentes do meio nutritivo foi realizado um planejamento do tipo DCCR (3^3) com cinco repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos (TABELA 3). O software Statistica 5.1 (StatSoft Inc., USA) foi utilizado nesta etapa.

TABELA 3. NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PLANEJAMENTO DCCR COM 3 COMPONENTES PARA A PRODUÇÃO DE DEXTRANASES EM FES COM BAGAÇO DE MALTE POR *Penicillium aculeatum* NRRL 2129

		Níveis				
Variáveis independentes (g/L)	**Símbolo**	**-1,68**	**-1**	**0**	**+1**	**+1,68**
Sulfato de Amônio	$(NH_4)_2SO_4$	0,048	0,15	0,3	0,45	0,552
Cloreto de Potássio	KCl	0,03	0,1	0,2	0,3	0,37
Dextrana	Dex	1,6	5	10	15	18,4

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudos preliminares

3.1.1 Seleção das cepas produtoras de dextranases

A seleção de cepas foi feita inicialmente pela fermentação submersa inicialmente. Das 59 cepas resultantes da pré-seleção descrita em 2.1.1, nenhuma das isoladas pelo método descrito apresentou resultado positivo para a produção de dextranase. Provavelmente, os micro-organismos do bagaço de cana já estavam adaptados a uma condição de abundância de açúcares da cana-de-açúcar, bastante disponíveis, e não foram capazes de sobreviver por um tempo maior utilizando a dextrana como única fonte de carbono.

Outros autores realizaram um screening de sucesso (KHALIKOVA *et al*. 2003), no qual a amostra de solo da Rússia foi incubada na presença de dextrana e Sephadex G75 enriquecidos com fosfato de potássio. Posteriormente, as colônias isoladas foram incubadas em meio sólido com blue dextrana e a formação de halos permitiu o isolamento de *Paenobacillus illinoisenses*. Em um novo screening, o mesmo grupo de pesquisa empregou a mesma técnica de isolamento, porém as amostras foram colmos de cana deteriorados, méis e solo. Nesta seleção foi isolada a bactéria *Bacillus licheniformis*, a qual foi investigada em experimentos seguintes (ZOHRA *et al*., 2013). Também com sucesso foi isolada uma nova cepa a partir de amostras de esponja do mar vermelho, no Egito. A partir de um meio contendo blue dextrana a cepa relacionada ao gênero *Aspergillus* sp, mas não conclusivamente identificada (ABDELWAHED *et al*., 2013).

Partindo para uma segunda estratégia, uma pré-seleção na Coleção de Culturas do LPB I (27 cepas) foi realizada e apenas algumas cepas do gênero *Giberella* apresentaram atividade de dextranases: 2AB; G42, 3C2; F; H21 e H31. A pesquisa de produtores de dextranase foi intensificada no gênero *Giberella* sp por apresentar os primeiros resultados positivos para atividade

dextranásica. Na literatura, até a finalização deste trabalho, o gênero *Giberella* sp não foi relatado como produtor de dextranases.

Os resultados de atividades dextranásicas das cepas do LPB estão demonstrados na TABELA 4.

TABELA 4. SELEÇÃO DE LINHAGENS DO LPB I PARA A PRODUÇÃO DE DEXTRANASE

CEPAS LPB	**Atividade dextranásica ($U.mL^{-1}$)**
A 1278	-
*A*Cuba	-
G 2AB	0,072
G G42	0,166
G 1 AB	-
G 1 AC	-
G 1 CB	-
G 1 FA	-
*G*1 FB	-
*G*1 FBP	-
G 1516	-
G 2284	-
G 3CB	-
G 3 CP	-
G 3 DC	-
G 3C2	0,123
G 4 EB	-
G BCA	-
G F	0,088
G G 22	-
G H 11	-
G H 12	-
G H 12 Vills	-
G H21	0,135
G H31	1,025
R 25975	-
R 5905	-

Para fins comparativos, cepas conhecidamente produtoras de dextranases foram requeridas e fornecidas pelo USDA. As cepas padrão NRRL testadas foram *Penicillium aculeatum*; *P. funiculosum*, *P. pinophilum*; *Microbacterium dextranolyticum* e *Arthrobacter globiformis*. Apenas *Penicillium*

pinophilum não produziu dextranases nas condições testadas. A TABELA 5 lista as cepas testadas e suas atividades em $U.mL^{-1}$.

TABELA 5. RESULTADO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANASE DAS CEPAS PADRÃO NRRL

CEPAS PADRÃO NRRL	Atividade dextranásica ($U.mL^{-1}$)
Penicillium aculeatum 2129	1,947
Penicillium funiculosum 3647	0,166
Penicillium pinophilum 3503	0,000
Microbacterium dextranolyticum B-23242	0,003
Artrobacter globiformis B-4425	0,006

Os resultados também evidenciam produção superior das linhagens fúngicas em relação às linhagens bacterianas. A linhagem de *Arthrobacter globiformis*, por exemplo, apresenta atividade muito discreta quando comparado as dados da literatura, de linhagens igualmente não modificada geneticamente com 39,5 $U.mg^{-1}$ de proteína. Da mesma forma, a melhor produtora *P. aculeatum*, a qual é relatada na literatura, produziu de 60 a 70 $U.mL^{-1}$.

De acordo com os dados mostrados na TABELA 5, é evidente que a produção do fungo *P. aculeatum* é bastante superior aos demais nas condições testadas. Embora a cepa H31, possivelmente pertencente ao gênero *Giberella*, tenha apresentado bom desempenho e seja um novo organismo produtor, as atividades atingidas por *P. aculeatum* foram quase 100% maiores. Desta forma, *P. aculeatum* NRRL 2129 foi mantido para os experimentos posteriores. O gênero *Penicillium* foi amplamente estudado para a produção de dextranases e são bastante representativos na literatura (KHALIKOVA *et al*., 2005). O gênero *Giberella* sp ainda não foi relatado na literatura e poderia apresentar uma inovação como nova cepa produtora.

3.2 Produção de dextranases por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129

3.2.1 Seleção do tipo de técnica de fermentação para a produção de dextranases

A cepa *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 foi selecionada nas etapas anteriores como melhor produtora da enzima dextranase. Contudo, é necessário escolher a melhor técnica de fermentação a ser empregada com o uso de resíduos como substrato. Duas técnicas de fermentação foram testadas conforme está descrito a seguir.

3.2.1.1 Produção de dextranases por fermentação submersa (FSm) com reaproveitamento de resíduos

Os resíduos cascas de café, cascas de soja, bagaço de mandioca, bagaço de malte, polpa cítrica e farelo de trigo foram base para a obtenção de um extrato, usado como meio de cultivo em FSm para produção de dextranases. Além destes, o mel de soja e mel de cana também foram diluídos e testados. O controle foi preparado com o meio completo conforme descrito no item 2.2.1.1.

Os resultados das produções de dextranases por FSm com os extratos obtidos constam na FIGURA 4.

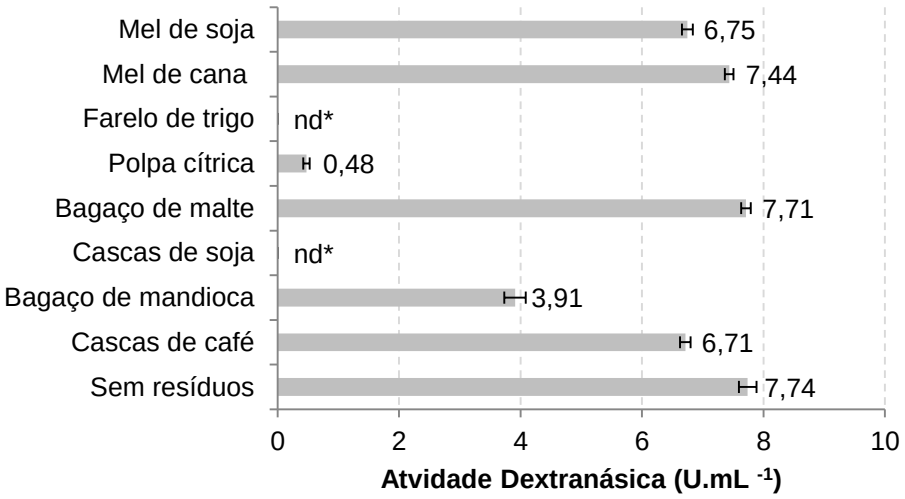

FIGURA 4. PRODUÇÃO DE DEXTRANASES EM FSm UTILIZANDO DIVERSOS EXTRATOS AQUOSOS OBTIDOS A PARTIR DE RESÍDUOS POR *P. aculeatum* NRRL 2129.
*nd – não detectado

Os extratos que apresentaram o melhor desempenho em produção de dextranases foram o mel de cana (7,44 $U.mL^{-1}$), bagaço de malte (7,71 $U.mL^{-1}$) e o meio sem resíduos (7,74 $U.mL^{-1}$) sem os extratos adicionados. Pode-se

concluir, a partir destes resultados, que o bagaço de malte e mel de cana não afetaram a produção de dextranases em FSm. Os demais resíduos, porém, apresentaram desempenhos piores do que o meio sem resíduos.

A extração aquosa de resíduos pode ter contribuído não somente à extração de nutrientes, mas também de outros compostos inibidores da produção de dextranases. Outra possibilidade seria a presença em excesso de alguns compostos do extrato aquoso somados aos componentes do meio completo.

O extrato aquoso de cascas de soja não favoreceu o desenvolvimento do micro-organismo. De forma semelhante, os resultados com extrato de resíduos de soja apresentaram atividades enzimáticas não detectáveis. Isto pode estar relacionado aos altos índices de cobre (14,29 $mg.kg^{-1}$), zinco (61,07 $mg.kg^{-1}$), manganês (40,29 $mg.kg^{-1}$) e ferro (16,41 $mg.kg^{-1}$) (PERIPOLLI et al., 2012), os quais podem ter efeitos negativos no desenvolvimento do micro-organismo.

De forma geral, pelo fato do meio controle propiciar o melhor resultado, o uso de extratos de resíduos não parece apresentar muitas vantagens para a produção de dextranases por *P. aculeatum* NRRL 2129 em FSm.

3.2.1.2 Produção de dextranases por fermentação no estado sólido (FES) com resíduos agroindustriais

Os resíduos farelos de soja, farelo de trigo, polpa cítrica, bagaço de malte, bagaço de mandioca, bagaço de cana, cascas de café e cascas de soja foram escolhidos de acordo com sua disponibilidade e relatos prévios em literatura para FES. Os meios foram enriquecidos com a solução nutritiva completa já descrita em 2.2.1.1 para ajuste da umidade e fornecimento de nutrientes. Os resultados obtidos estão em gramas base seca ($U.g^{-1}$).

Os dados obtidos (FIGURA 5) mostram maiores produções de dextranase com o emprego de polpa cítrica e bagaço de malte, respectivamente 44,18 e 56,8 $U.g^{-1}$ Os subprodutos de soja apresentaram atividade enzimática não detectável, sendo extremamente desvantajosos. Farelo de trigo (23,28 $U.g^{-1}$), bagaço de mandioca (25,86 $U.g^{-1}$) e cascas de café (19,31 $U.g^{-1}$) propiciaram desempenhos comparáveis entre si.

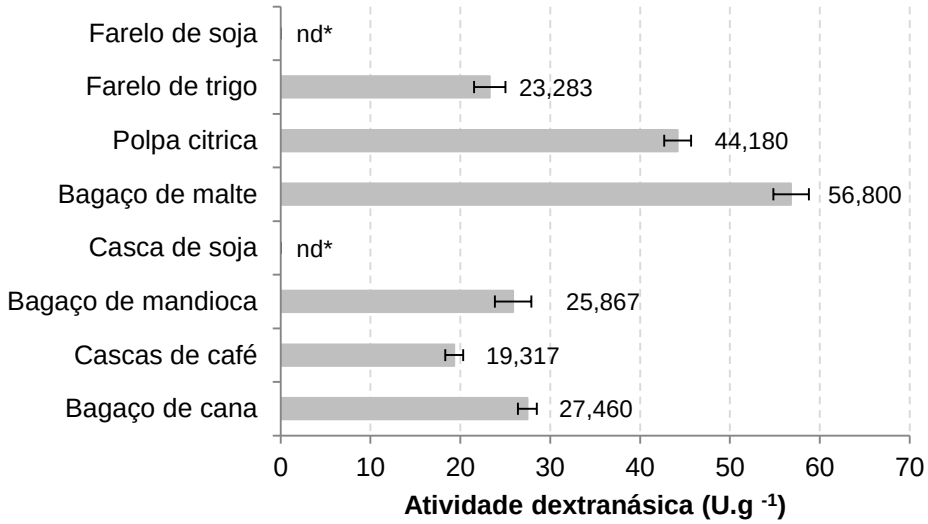

FIGURA 5. PRODUÇÃO DE DEXTRANASES EEM FES EM DIVERSOS SUPORTES/SUBSTRATOS POR *P. aculeatum* NRRL 2129.
*nd – não detectada

Na aplicação do bagaço de cana como suporte para *P. aculeatum* NRRL 2129, apesar de ser um resíduo bastante pobre em nutrientes, a matriz formada foi vantajosa para o desenvolvimento do micro-organismo e a produção de dextranase foi considerável (27,46 $U.g^{-1}$). No processamento da cana-de-açúcar, a cana é moída, esmagada e "lavada" com água de embebição sucessivas vezes para extrair o máximo de açúcares. Ao fim da moagem, o bagaço tem 50% de umidade e até 4% de açúcares totais. A cana-de-açúcar, conhecidamente pobre em proteínas, é praticamente constituída de açúcares e minerais. Após a moagem e extração do caldo, resulta um bagaço praticamente constituído de fibra, pobre em nutrientes.

Uma vez que este estudo tem como objetivo a aplicação da enzima em indústria sucroalcooleira, o bagaço de cana, resíduo gerado em grande quantidade neste segmento, foi mantido para um estudo mais aprofundado na etapa seguinte.

Os resíduos bagaço de malte e polpa cítrica alcançaram os melhores desempenhos pela riqueza de nutrientes disponíveis combinados com o formato e arranjo proporcionados pelas suas fibras. O conteúdo proteico do bagaço de malte (posteriormente caracterizado) foi de 18% e a polpa cítrica tem valores entre 5,5 e 6,2. A quantidade de fibra bruta no bagaço de malte foi

de 17% e a polpa cítrica 14% (SPIER *et al*, 2008). As semelhanças dos resíduos quanto a estes conteúdos provavelmente foram as características favoráveis ao desenvolvimento do micro-organismo. Os derivados de soja são igualmente nutritivos, com abundância de açúcares e proteínas, no entanto, por fatores não elucidados, não forneceram condições favoráveis à síntese de dextranases por *P. aculeatum* NRRL 2129.

De acordo com Peripolli *et al* (2012) os derivados de soja podem conter altas concentrações de zinco, manganês, ferro e cobre. Em análise posterior, o extrato enzimático não sofreu inibição por estes cátions, porém a presença destes no meio de cultivo pode ter sido um fator importante no crescimento e metabolismo do fungo.

3.2.2 Estudos cinéticos da produção de dextranases em FES com os melhores substratos/suportes

Bagaço de malte (BM), polpa cítrica (PC) e bagaço de cana (BC) foram selecionados para esta etapa de experimentos, em estudo cinético de 8 dias. Os resultados da cinética de produção de dextranases estão apresentados na FIGURA 6.

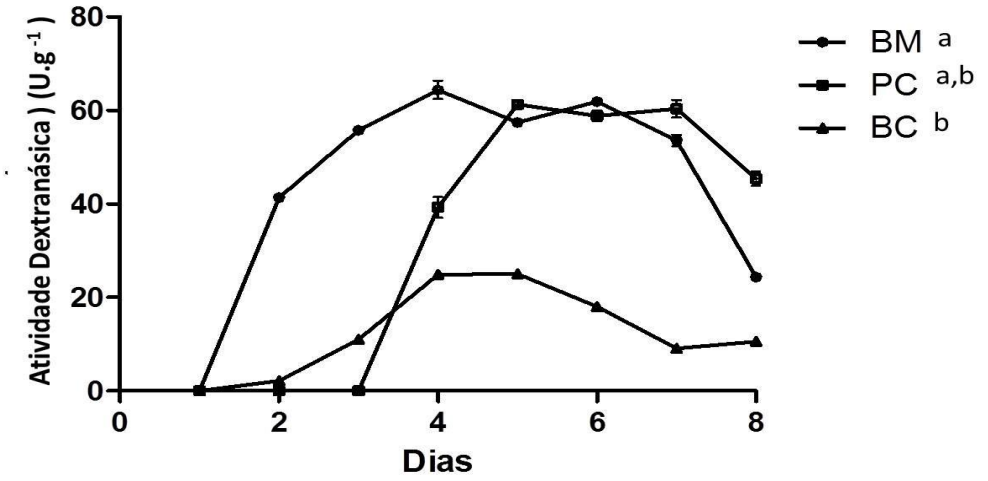

FIGURA 6. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE DEXTRANASES EM DIFERENTES SUBSTRATOS (BM- BAGAÇO DE MALTE; PC-POLPA CÍTRICA E BC – BAGAÇO DE CANA) POR *P. aculeatum* NRRL 2129 EM FES. * Letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes.

Os picos de produção (em base seca) foram de 64,39 $U.g^{-1}$ no 4°dia com BM como substrato/suporte; 61,32 $U.g^{-1}$ no 5°dia com PC e apenas 25,04 $U.g^{-1}$ no 5°dia com BC.

Ao fim dos experimentos, as atividades residuais de dextranase diminuíram consideravelmente em BM, atingindo apenas 24,36 $U.g^{-1}$ no 8° dia, apenas 37% da atividade inicialmente obtida (4º dia). Até o 6° dia, no entanto, 96% da atividade foi mantida. Esta característica pode apresentar uma vantagem, pois a fermentação pode ser interrompida entre o 4° e 6° dia sem que existam grandes perdas da atividade enzimática.

Nos ensaios com PC também houve permanência de 98% da atividade máxima ao 7° dia, caindo também drasticamente ao 8°dia. Os dois resíduos parecem favorecer a estabilidade da enzima após a síntese por 2 dias, sendo que o BM tem a vantagem de alcançar o seu pico de produção 24 horas antes que a PC, ou seja, com uma maior produtividade. O uso do BC como substrato/suporte levou a piores produções ao fim do 8° dia, que reteve apenas 40% (10,59 $U.g^{-1}$) de sua atividade enzimática. .

Os resultados foram analisados estatisticamente. Letras iguais não diferem estatisticamente, letras diferentes são estatisticamente diferentes. O pós-teste Tukey ao nível de 95% de significância aponta que não há diferenças significativas entre o BM (a) e PC (a,b). PC também foi estatisticamente semelhante ao BC (b), porém BC e BM apresentaram diferenças significativas. BM apresenta vantagem em termos de produtividade, uma vez que seu pico de produção aparece no 4° dia de fermentação e permanece estável até o 7° dia.

A PC apresentou seu pico de produção um pouco mais tardiamente, ao 5° dia. As produtividades apresentadas na TABELA 6 evidenciam a síntese precoce de dextranase em BM comparadas às produtividades em BC e PC. A produção de dextranase em BM já é observada no segundo dia, em altas quantidades. Neste resíduo, é interessante observar a manutenção da atividade enzimática nos dias subsequentes. O BC, além de apresentar produtividade extremamente baixa, quando comparado aos outros resíduos, tem grande parte da enzima inativada com a evolução do tempo.

TABELA 6. PRODUTIVIDADE DE DEXTRANASES AO LONGO DA CINÉTICA DE 8 DIAS COM DIFERENTES SUBSTRATOS POR *P. aculeatum* NRRL 2129 EM FES.

	Produtividade de dextranases ($U.g^{-1}.dia^{-1}$)		
Dias	**BM**	**PC**	**BC**
1	0,00	0,00	0,00
2	20,70	0,00	1,09
3	18,59	0,00	3,68
4	16,10	9,82	6,23
5	11,49	12,26	5,01
6	10,32	9,81	3,00
7	7,65	8,62	1,30
8	3,04	5,68	1,32

O resíduo BM é geralmente doado e os custos seriam mínimos, apenas com a logística de transporte para um local produtor. Já a PC é restrita a certas regiões, além de ser resíduo de uma cultura sazonal, o que poderia ser um limitante para a implantação industrial. Além disso, a estabilidade prolongada na atividade enzimática é uma vantagem e, provavelmente, está associada às características intrínsecas deste resíduo. Somando-se a estas vantagens técnicas, o BM é um resíduo abundante, de composição rica em nutrientes e produzido a baixos ou nenhum custo (MUSSATO *et al*., 2006). No Brasil, a cevada é produzida principalmente nos três estados da região Sul, nos meses de maio a agosto. A cevada é germinada em maltarias e o grão maltado pode ser armazenado por períodos prolongados, atendendo às necessidades de cevada cervejeira no país (SPIER, 2010). Além de todas estas vantagens, o departamento já dispunha de um projeto de pesquisa aprovado em 2011 com recursos do CNPQ para a produção de enzimas a partir de BM. O BM foi, portanto, escolhido como melhor substrato/suporte para *P. aculeatum* NRRL 2129.

3.3 Determinação da composição físico-química do bagaço de malte

Na TABELA 7 observam-se os resultados obtidos a partir da análise de uma amostra composta homogênea do lote de BM usado neste trabalho. As diferentes amostras enviadas à caracterização foram obtidas de diferentes secagens, mesmo que o BM fosse proveniente de um único lote. A umidade de

9,45% reflete que foi atingido parâmetro desejado na secagem do material. Com esta baixa umidade, o tempo de vida útil do bagaço foi prolongado e de acordo com Bourscheidt *et al.*, (2010), a secagem a 50°C não prejudica os conteúdos nutricionais do BM.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE

Parâmetro	**%**
Umidade (105 °C)	9,45
Proteína total	18,64
Carboidratos	65,2
Extrato etéreo	5,94
Resíduo mineral	9,45
Fibra	17,66
pH	5,5
Cálcio	0,27
Fósforo	0,47
Sódio	0,01
Potássio	0,08
Magnésio	0,22

O pH é levemente ácido e favorece a produção da enzima dextranase por estar próximo ao pH ótimo. O conteúdo proteico de 18,6% está dentro da faixa reportada na literatura, já que o artigo de revisão comparando várias análises da composição de BM (ALIYU e BALA, 2011) descreve que as proteínas podem variar entre 2,4 e 24%. Igualmente os lipídios totais determinados nesta amostra 5,9% estão na faixa descrita na revisão (2,5 a 10,6%).

No caso das fibras, esta análise apontou 17,7 %, enquanto os valores de literatura relatam a média de 3,3%. Este valor pode refletir uma vantagem, no que se refere ao caráter inerte ou pouco fermentescível do material que servirá como suporte para o crescimento do micro-organismo. Esta variação na quantidade de fibras pode ser um fator determinante para uso como suporte para FES, uma vez que a organização do arranjo da matriz afeta a aeração e difusão de gases para o micélio.

Os demais sais analisados apontam valores baixos de concentração. Num estudo posterior (CAPÍTULO 3), a concentração de $Ca^{2+,}$ Mg^{2+} e K^{+} não afetou a atividade da dextranase de forma significativa.

3.4 Otimização da produção de dextranase por *P. aculeatum* NRRL 2129 em FES utilizando bagaço de malte

3.4.1. Otimização das condições físico-químicas

As influências e interações entre as condições físico-químicas pH, umidade inicial (%) e quantidade do substrato (g) BM foram avaliadas por um delineamento estatístico e os resultados plotados na TABELA 8.

TABELA 8 – RESPOSTAS E VARÍÁVEIS DECODIFICADAS DO PLANEJAMENTO DCCR 3^3 PARA AVALIAÇÃO DAS INFLUÊNCIAS DAS CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NA PRODUÇÃO DE DEXTRANASE POR FES

Ensaio	Níveis			Atividade dextranásica ($U.g^{-1}$)
	pH	Umidade (%)	Substrato (g)	
1	5	60	4	39,84
2	5	60	12	46,33
3	5	80	4	18,33
4	5	80	12	19,3
5	7	60	4	38,71
6	7	60	12	22,7
7	7	80	4	18
8	7	80	12	16,56
9	4,32	70	8	13,66
10	7,68	70	8	24,52
11	6	53,2	8	2,6
12	6	86,8	8	15,59
13	6	70	1,28	15,99
14	6	70	14,72	5,19
15 (C)	6	70	8	61,61
16 (C)	6	70	8	63,04
17 (C)	6	70	8	64,04

As respostas em atividade enzimática variaram drasticamente, de 2,6 até 64,04 $U.g^{-1}$ e atingiu a média de 62,8 $U.g^{-1}$ no ponto central. O ponto central, pH 6, umidade 70% e 8 g de bagaço de malte foi a melhor combinação de fatores para a atividade de dextranase. Por outro lado, o ensaio 11, com

apenas 53% de umidade levou a uma menor produção da enzima, alcançando apenas 2,6 $U.g^{-1}$.

A umidade certamente é um fator de grande importância e impacto no metabolismo microbiano, o valor de 53% certamente impôs uma condição que impediu o desenvolvimento pleno do micélio do fungo, prejudicando consequentemente, a produção enzimática. Um valor muito pequeno de atividade de dextranase também foi atingido no ensaio 14, o qual teve marcadamente maior quantidade de substrato no Erlenmeyer combinado com um valor de pH 6 e umidade 70%. Estudos posteriores apontaram que os pHs mais ácidos favorecem a enzima dextranase. A umidade na FES é bastante explorada e varia bastante de acordo com o micro-organismo. O estudo da quantidade de substrato por frasco é importante porque a relação desta massa com o volume do frasco influencia na difusão de ar dentro deste microambiente, alterando a disponibilidade de oxigênio e o crescimento de biomassa, consequentemente, a produção enzimática.

A análise de variância (ANOVA) apresentou R^2 igual a 0,698 da atividade de dextranase apontou que todas as variáveis testadas foram significativas ao nível de 95%. O valor de R^2 não é ideal, porém está próximo ao valor aceitável para bioprocessos. Em estado bruto, os dados analisados alcançaram R^2 0,71, porém o valor foi diminuído devido à exclusão das interações entre os fatores, as quais não foram significativas. A melhor condição para a produção de dextranase em FES com BM por *P. aculeatum* NRRL 2129 foi de 62,8 $U.g^{-1}$ atingida com valores próximos ao ponto central: pH 5, umidade inicial 70% e 8 g de bagaço de malte. Estas foram as condições utilizadas para os experimentos seguintes. Na FIGURA 7, a superfície de resposta com a quantidade de bagaço de malte fixada em 8 g.

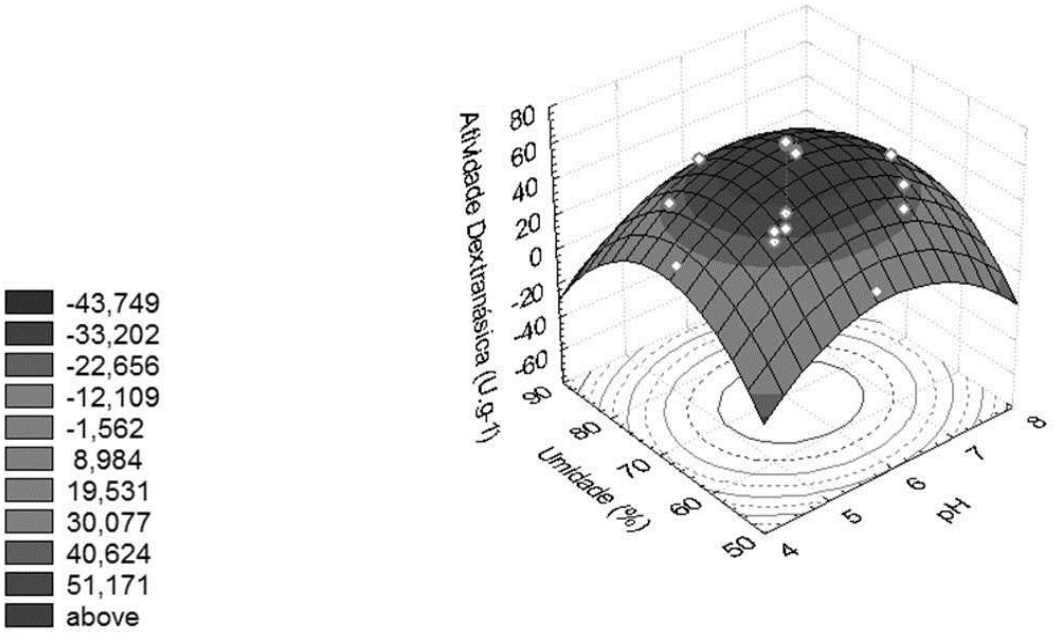

FIGURA 7. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA DO PLANEJAMENTO DCCR PARA ESTUDO INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS pH E UMIDADE SOBRE A PRODUÇÃO DE DEXTRANASES POR FES

Valores de pH mais ácidos são conhecidos por favorecer o crescimento fúngico, além disto, valores levemente ácidos são comumente encontrados como valores ótimos de atividade dextranásica em linhagens de fungos (KHALIKOVA *et al*., 2005).

Em relação aos experimentos preliminares, a atividade enzimática teve aumento discreto, pois as condições de cultivo prévias já estavam sendo trabalhadas próximas aos valores ótimos (62,8 $U.g^{-1}$).

3.4.2 Determinação da influência da fonte de nitrogênio na produção de dextranases por FES

A segunda etapa de otimização foi a suplementação do meio nutritivo, adicionado ao BM, com diferentes fontes de nitrogênio. Apenas a fonte de nitrogênio foi variada e os demais nutrientes que compõem a solução nutritiva (item 2.2.1.2) foram iguais para todos os experimentos. A FIGURA 8 apresenta os valores encontrados de produção de dextranases para as diferentes fontes testadas, bem como os resultados do pós-teste Tukey.

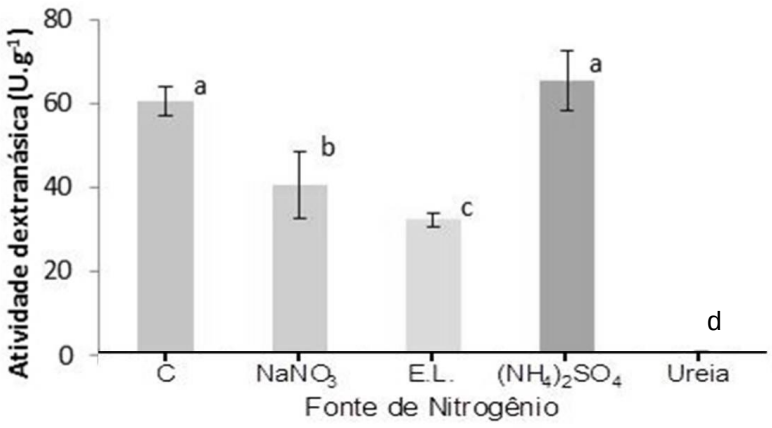

FIGURA 8. EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA ATIVIDADE DE DEXTRANASE OBTIDA POR FES.
*C- Controle. Composto por 10g/L de $NaNO_3$ e 2 g/L de extrato de levedura.

As fontes extrato de levedura e ureia não favoreceram as atividades enzimáticas. Os demais experimentos atingiram os valores comparáveis, sendo os valores de atividade dextranásica de 60,51±3,55 $U.g^{-1}$ para o controle, com nitrato de sódio (10 $g.L^{-1}$) e extrato de levedura (2 $g.L^{-1}$) ; 40.60±8.09 $U.g^{-1}$ para o nitrato de sódio e 65.39±7.27 $U.g^{-1}$ para o sulfato de amônio. Os resultados do teste de Tukey mostram que o controle e sulfato de amônio propiciaram produções da enzima estatisticamente iguais, sendo estas superiores às obtidas com nitrato de sódio.

Os resultados deste experimento sugerem que as fontes de nitrogênio inorgânicas são preferidas às fontes orgânicas pelo fungo *P. aculeatum* NRRL 2129 já que extrato de levedura teve desempenho muito menor e a ureia levou a valores de atividade enzimática mínimos. De acordo com Madhu e Prabhu, (1984) em estudo com *P. aculeatum* em FSm, o extrato de levedura favoreceu a produção de maiores atividades quando comparado à fontes inorgânicas. De forma semelhante, também em estudos com FSm, com *Aspergillus* sp. (ABDELWAHED *et al*., 2013) e *Streptomyces* sp. (PURUSHE *et al*., 2012) as fontes extrato de levedura e triptofano, respectivamente, foram melhores para a atividade enzimática. Em artigo de revisão, autores relatam que a quantidade de proteína total presente em BM pode variar de 2,4 a 24% em base seca (ALIYU e BALA, 2011) e os valores obtidos na caracterização do bagaço de malte, 18%, encontram-se dentro desta faixa já relatada. Estas evidências levam a concluir que proteínas presentes no BM devem suprir as necessidades

de fonte de nitrogênio orgânica, a qual é mais biodisponível. As adições de fontes orgânicas de nitrogênio por meio da solução nutritiva podem ter desbalanceado a relação carbono-nitrogênio do meio de cultivo, provavelmente disponibilizando um excesso deste último.

Para os estudos seguintes, o sulfato de amônio foi utilizado em substituição à combinação de nitrato de sódio e extrato de levedura. Esta substituição apresenta certamente uma vantagem, pois substitui a necessidade de dois componentes por apenas um. Além disso, o uso de fontes de nitrogênio inorgânicas é economicamente mais acessível. Outro fator de grande importância são as etapas posteriores de purificação e recuperação. A adição de fontes orgânicas dificulta a separação da enzima das demais proteínas produzidas pelo metabolismo do micro-organismo. Desta forma, algumas etapas na separação da dextranase de outros metabólitos proteicos podem ser evitadas ou simplificadas apenas com esta substituição.

3.4.3 Determinação da composição da solução nutritiva para a produção de dextranases

Para a determinação dos componentes do meio de cultivo e suas concentrações ótimas foram necessárias duas etapas. Na primeira, realizou-se um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, com 5 variáveis, 8 ensaios, 3 pontos centrais e avaliação de uma resposta, a atividade enzimática. Nesta etapa foram selecionados os componentes da solução nutritiva que tinham um efeito significativo sobre a atividade de dextranase.

O R^2 0,73 mostra um bom resultado do modelo obtido e as respostas das atividades enzimáticas estão apresentadas na TABELA 9. O sulfato de amônio foi a única variável significativa ao nível de 95% de confiança.

Neste planejamento a dextrana não foi incluída como variável, pela natureza indutora da enzima. A dextrana foi fixada em 10 $g.L^{-1}$ para todos os ensaios. As variações na resposta foram pequenas, de 53,32 até 73,65. O pior resultado obtido foi a combinação de fatores no ensaio 7, o qual não possui cloreto de potássio e sulfato de amônio, exatamente as variáveis significativas de acordo com o Diagrama de Pareto (FIGURA 9) em nível de 90% de significância.

TABELA 9. RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE DEXTRANASE POR FES NO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA ESCOLHA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO NUTRITIVO.

Ensaio	Variáveis independentes ($g.L^{-1}$)					Atividade de Dextranase $U.g^{-1}$
	$(NH_4)_2SO_4$	K_2HPO_4	$MgSO_4$	KCl	$FeSO_4$	
1	0	0	0	0,20	0,001	66,30
2	0,23	0	0	0	0	60,61
3	0	4,0	0	0	0,001	54,98
4	0,23	4,0	0	0,20	0	73,65
5	0	0	0,20	0,20	0	62,57
6	0,23	0	0,20	0	0,001	70,73
7	0	4,0	0,20	0	0	53,32
8	0,23	4,0	0,20	0,20	0,001	64,93
9 (C)	0,115	2,0	0,10	0,10	0,0005	63,77
10 (C)	0,115	2,0	0,10	0,10	0,0005	63,09
11 (C)	0,115	2,0	0,10	0,10	0,0005	65,83

De forma oposta, os ensaios 4 e 6, os quais atingiram, respectivamente, 73,65 e 70,73 $U.g^{-1}$ têm em comum a presença do sulfato de amônio na maior concentração.

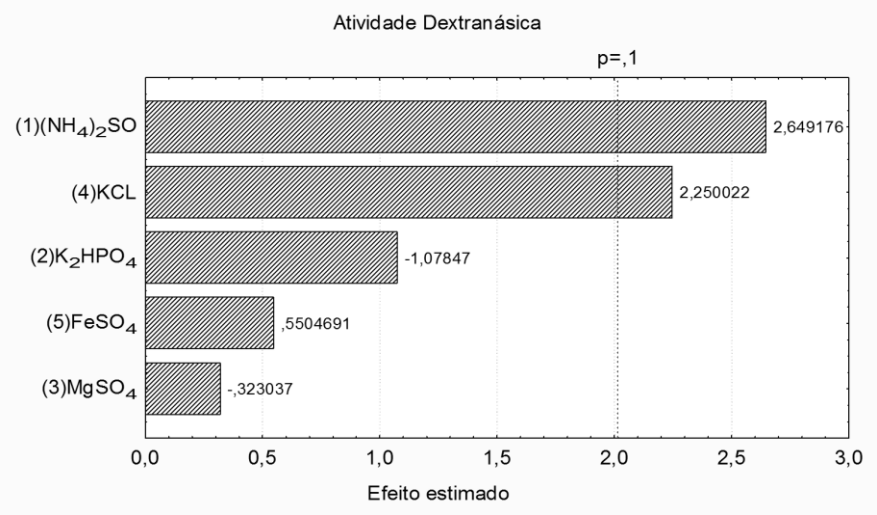

FIGURA 9. DIAGRAMA DE PARETO RESULTANTE DO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMANN EMPREGADO PARA SELEÇÃO DE COMPONENTES DA SOLUÇÃO NUTRITIVA QUE FAVORECEM ATIVIDADE DEXTRANÁSICA DE *P. aculeatum* EM FES COM BAGAÇO DE MALTE

A alteração do valor do intervalo de confiança para 90% ($p<0,1$) resultou em mais uma variável significativa, o cloreto de potássio. Desta forma, para os experimentos seguintes, este sal foi mantido para avaliação de sua influência em uma faixa mais ampla de variação. Os resultados obtidos são discrepantes quando comparados com o efeito de diversos componentes na atividade de *Aspergillus sp* por FSm (ABDELWAHED *et al*., 2013), no qual vários sais (K_2HPO_4, $NaNO_3$, NaCl, $MgSO_4.7H_2O$) foram significativos na atividade da enzima. Isto pode ser resultado das diferentes dinâmicas dos micro-organismos empregados. Além disso, neste artigo o meio de cultivo é exclusivamente sintético, o qual necessita de maior suplementação do que com o uso de um resíduo rico em termos de nutrientes como o BM.

3.4.4 Determinação das condições ótimas para a composição da solução nutritiva para a produção de dextranases – Planejamento do tipo DCCR

A etapa final de otimização por FES da composição da solução nutritiva teve como objetivo determinar as concentrações dos componentes, determinados na etapa anterior como significativos, sulfato de amônio e cloreto de potássio; além de considerar a dextrana em um planejamento do tipo do DCCR.

Os resultados do DCCR do tipo 3^3 estão apresentados na TABELA 10. As respostas das atividades enzimáticas variaram bastante, de 9,64 a 74,58 $U.g^{-1}$. Esta foi a maior faixa de variação observada na otimização da solução nutritiva por considerar a dextrana como variável independente, reforçando a natureza indutiva da dextranase. A menor atividade foi obtida no ensaio 13, com apenas 1,6 $g.L^{-1}$ de dextrana e o maior resultado foi obtido no ensaio 8, com 15 $g.L^{-1}$ de dextrana. É interessante observar que a dextrana é um fator altamente significaivo (valor *p* 0,0000001). As interações da dextrana com os outros componentes, sulfato de amônio e cloreto de potássio, também interferem na atividade enzimática, o que é evidente na análise dos dados mostrados na tabela de análise de variância (ANOVA) da TABELA 11.

TABELA 10. RESULTADOS DO PLANEJAMENTO DCCR PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DOS COMPONENTES DA SOLUÇÀO NUTRITIVA UTILIZADA NA PRODUÇÂO DE DEXTRANASE POR FES COM BAGAÇO DE MALTE.

Ensaio	Variáveis independentes ($g.L^{1}$)			Atividade de Dextranase
	$(NH_4)_2SO_4$	KCl	Dex	($U.g^{-1}$)
1	0,15	0,1	5	26,114
2	0,15	0,1	15	32,378
3	0,15	0,3	5	19,562
4	0,15	0,3	15	49,676
5	0,45	0,1	5	24,005
6	0,45	0,1	15	66,8
7	0,45	0,3	5	21,793
8	0,45	0,3	15	74,585
9	0,048	0,2	10	22,089
10	0,552	0,2	10	59,493
11	0,3	0,03	10	35,84
12	0,3	0,37	10	40,584
13	0,3	0,2	1,6	9,641
14	0,3	0,2	18,4	55,07
15 (C)	0,3	0,2	10	44,768
16 (C)	0,3	0,2	10	43,33
17 (C)	0,3	0,2	10	39,058

O cloreto de potássio não apresentou efeito significativo (p>0,05) nem mesmo em uma avaliação maior de sua concentração. Os termos lineares das variáveis dextrana e sulfato de amônio e as interações entre dextrana e sulfato de amônio em seus termos lineares foram significativos ao nível de 95%.

TABELA 11. ANOVA (R^2 0,942) DA OTIMIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE DEXTRANA, SULFATO DE AMÔNIO E CLORETO DE POTÁSSIO PARA A PRODUÇÃO DE DEXTRANASE

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias Quadradas	Razão f	Razão p
$(NH_4)_2SO_4$(L)	1096,041	1	1096,041	44,533	0,0000228
Dex (L)	3179,449	1	3179,449	129,185	0,0000001
$(NH_4)_2SO_4$(L) e Dex (L)	438,213	1	438,213	17,805	0,0011897
KCl (L) e Dex (L)	143,202	1	143,202	5,818	0,0327838

O modelo obtido teve excelente ajuste (R^2 0,942) mesmo com a exclusão dos efeitos do cloreto de potássio. Portanto, a equação gerada

(FIGURA 10) pode explicar 94% dos dados experimentais. Os eixos mostram as quantidades de dextrana e sulfato de amônio em $g.L^{-1}$.

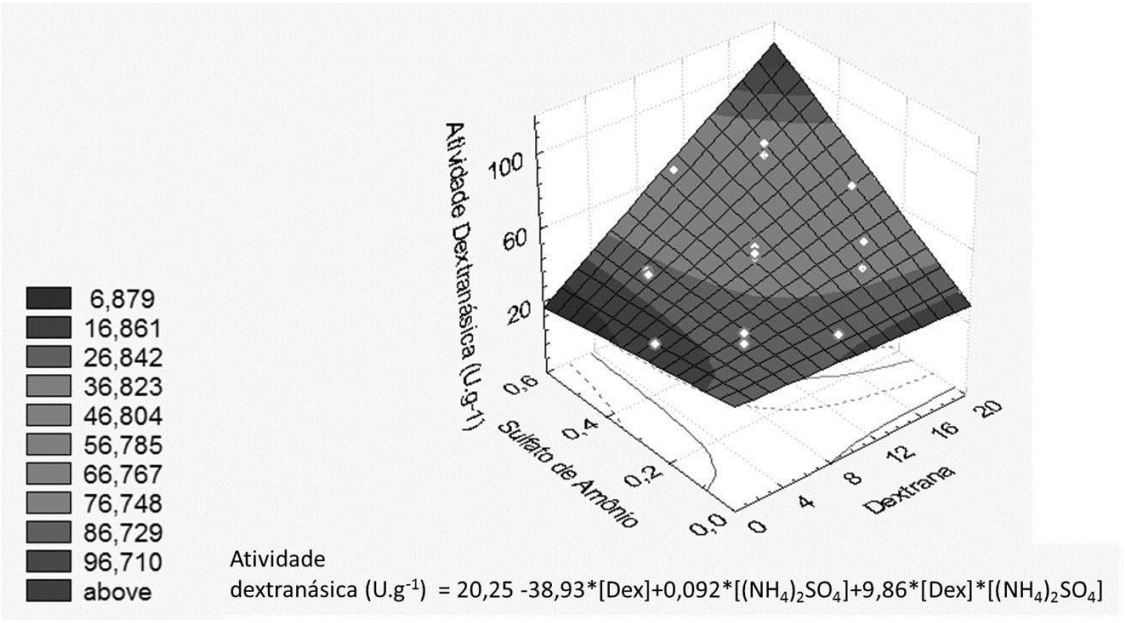

FIGURA 10. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA GERADA PELA COMBINAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO E DEXTRANA NA RESPOSTA ATIVIDADE DEXTRANÁSICA.

As respostas de atividades dextranásicas obtidas nos experimentos variaram de 9,64 $U.g^{-1}$ no ponto de mínima concentração de dextrana até 74,58 $U.g^{-1}$, no ponto de maior concentração do polissacarídeo. De forma geral, quanto maior a concentração de dextrana, maior será a atividade enzimática, conforme já havia sido previsto. Com o aumento da dextrana aumenta-se proporcionalmente a viscosidade da solução nutritiva e, consequentemente, seus custos. Desta forma, o meio final otimizado para a produção de dextranase contêm dextrana em uma concentração 15 $g.L^{-1}$ e sulfato de amônio a 0,45 $g.L^{-1}$.

Os experimentos de otimização em sua totalidade propiciaram um aumento de 18% na atividade inicial da dextranase pela combinação dos estudos físico-químicos e de composição do meio de cultivo (FIGURA 11). Além deste aumento, os estudos comprovam que o resíduo escolhido supre várias necessidades nutricionais que os meios sintéticos apresentam e que são favoráveis à produção de dextranase por *P. aculeatum* NRRL 2129. Dos iniciais sete componentes apenas dois componentes, sulfato de amônio e dextrana,

foram imprescindíveis na produção desta enzima por FES em BM, o que pode significar uma redução de custos relativos ao meio de produção.

O processo desenvolvido traz uma interessante inovação com vantagem econômica quando comparada aos meios sintéticos tradicionais.

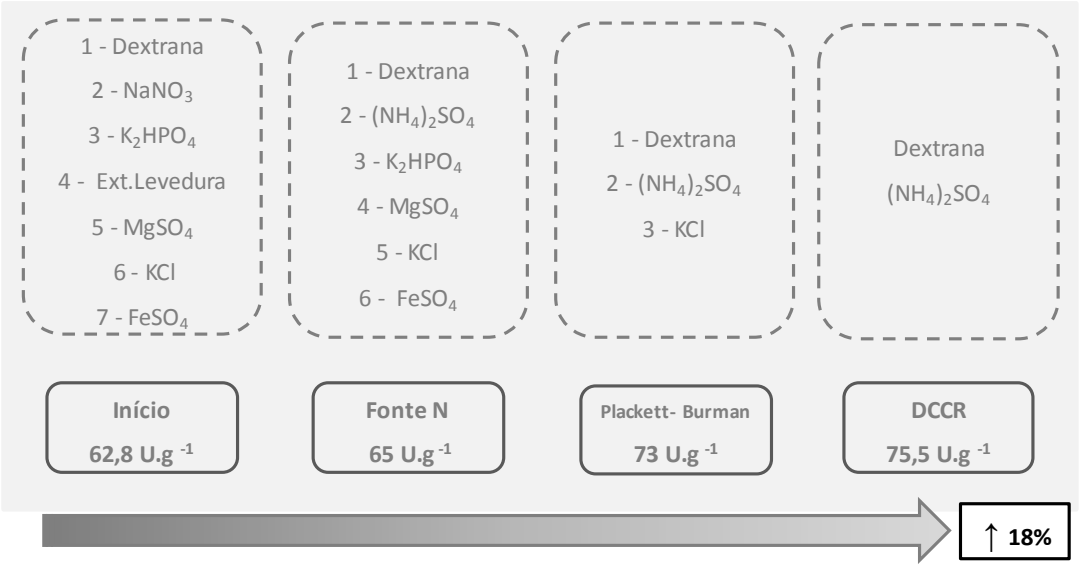

FIGURA 11. FLUXOGRAMA DE RESUMO DOS EXPERIMENTOS DE OTIMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRITIVA.

4 CONCLUSÕES

Dentre todas as cepas testadas para a produção de dextranases, entre linhagens reportadas na literatura e linhagens isoladas, *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 alcançou maiores produções de dextranases e foi escolhido para os estudos de otimização. Foram testados diferentes subprodutos e resíduos agroindustriais brasileiros para este processo, contudo o BM reuniu as melhores características pela sua composição, disponibilidade, custo e por propiciar uma produção de dextranase superior aos outros resíduos testados.

Os estudos de otimização para produção de dextranase por FES foram bem sucedidos por reduzirem o número de componentes em relação aos meios sintéticos, além de estabelecer condições de cultivo favoráveis ao melhor desempenho do micro-organismo. As melhores condições foram umidade

inicial 70%, pH 5 e 8 g de BM em frascos Erlenmeyer de 250 mL. A melhor fonte de nitrogênio foi definida como o sulfato de amônio. A composição final do meio nutritivo alcançou seus níveis ótimos combinando dextrana 15 $g.L^{-1}$ e sulfato de amônio 0,45 $g.L^{-1}$.

Desde a etapa de seleção até o fim da otimização, a atividade inicial de dextranase passou de 62,8 $U.g^{-1}$ para 75,5 $U.g^{-1}$, representando um aumento global de 18% na atividade dextranásica.

As vantagens econômicas pelo emprego de resíduos de composição rica aumentam a possibilidade de ampliação da aplicação da enzima dextranase nas indústrias sucroalcooleiras.

REFERÊNCIAS

ABDEL-NABY, M A; ISMAIL, A M S; ABDEL-FATTAH, A M. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. **Process Biochemistry,** n. 34, p. 391–398, 1999.

ABDELWAHED, N.A.M., AHMED, E.F., EL-GAMMAL, E.W.; HAWAS, U.W. Application of statistical design for the optimization of dextranase production by a novel fungus isolated from Red Sea sponge. **3 Biotech**., 2013.

ALIYU, S., BALA, M., 2011. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology.** n.10, p. 324-331,2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Associação Brasileira da Indústria de Alimentação Animal. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. Métodos analíticos. In: **Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal**. São Paulo: SINDIRAÇÕES, 2009.

BOURSCHEIDT, C. T.; OLIVEIRA, B. H.; SILVA, G. M. C. Avaliação do resíduo do bagaço de malte na alimentação animal. **Anais do II ENDICT** – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica, 2010.

DHILON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K. In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 72:67-75, 2012.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Synthesis of a-amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**. n.42, p.320–326, 2002.

JIMENEZ, E.R. La dextranasa a lo largo de la industria azucarera. **Biotecnologia Aplicada**. n. 22, p.11-19, 2005.

KHALIKOVA, E., SUSI, P., KORPELA, T. Microbial Dextran-hydrolizing enzymes: Fundamentals and Applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. n. 69, p. 305-325, 2005.

MADHU, P.K.A.; PRABHU, K.A. Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*. **Enzyme Microb. Technol.** n. 6, p. 217-220, 1984.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**. n. 31, p. 426-428, 1959.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Review: Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications.**Journal of Cereal Science**. n. 43, p.1–14, 2006.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81–84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V. T. Biopotential of immobilized amylases. **Indian J. Microbiol**. v.40, p.1-14, 2000.

PERIPOLLI, V.; BARCELLOS, J. O. J.; PRATES, E. R.; WILBERT, C. A.; LOPES, R. B. Composição mineral da casca proteinada de soja para alimentação de ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.40, v.1, p. 1020, 2012.

PURUSHE, S.; PRAKASH, D.; NAWANI, N.N.; DHAKEPHALKAR, P.; KAPADNIS, B. Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial measure for dextran removal during sugar manufacture. **Bioresource Technology**. n. 115, p. 2-7, 2012.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos** – uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1. ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

SALMON, D.N.X., PIVA, L.C., BINATI, R.L., RODRIGUES, C. VANDENBERGHE, L.P.S., SOCCOL. C.R., SPIER, M.R. A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. **Bioprocess Biosyst Eng.** v. 35, p.1067–1079, 2012.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, P. S. Overview of solid-state fermentation. **Biochemical Eng. Journal**, v. 13, p. 205-18, 2003.

SPIER M.R., GREINER R., RODRI´GUEZ-LEO´N J.A., WOICIECHOWSKI A.L., PANDEY A., SOCCOL V.T., SOCCOL C.R. Phytase production using citric pulp and other residues of the agro-industry in SSF by fungal isolates. **Food Technol Biotechnol** 46:176–180, 2008.

SPIER, M.R. Material didático da disciplina de Biotecnologia Aplicada à Indústria de Alimentos e Bebidas. Departamento de Engª de Bioprocessos e Biotecnologia. Setor de Tecnologia. UFPR - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2010.

SPIER, M.R.; SCHEIDT, G.N; PORTELLA, A.C; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; WOICIEHOWSKI, A.L.; GREINER, R.; SOCCOL, C.R. Increase in Phytase Synthesis During Citric Pulp Fermentation. **Chemical Engineering Communications,** v. 198, p. 286 – 297, 2011.

ZOHRA, R. R.; AMAN, A.; ZOHRA, R. R.; ANSARI, A.; GHANI, M.; QADER, S. A. U. Dextranase: Hyper production of dextran degrading enzyme from newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*. **Carbohydrate Polymers.** n. 92, p.2149– 2153, 2013.

CAPÍTULO III
CARACTERIZAÇÃO, SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASE PRODUZIDA POR FES COM BAGAÇO DE MALTE

RESUMO

A dextranase produzida por fermentação no estado sólido por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 foi caracterizada, purificada e concentrada. O extrato bruto teve pH e temperatura ótimos de 5 e 50°C, respectivamente. A atividade da enzima foi testada na presença de íons e Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} e Fe^{2+}, estes não afetaram a atividade da dextranase. A presença de Mn^{2+} e Co^{2+} levou a um aumento da atividade da enzima em 31% e 18%, respectivamente, podendo ser considerados como ativadores desta enzima. A atividade enzimática do extrato bruto foi determinada na presença de diferentes concentrações de sólidos solúveis. Concentrações de açúcares acima de 25 °Brix foram prejudiciais para a atividade dextranásica. O sal NaCl presente em concentrações acima de 2% levou à diminuição da atividade enzimática. A melhor condição de armazenamento da enzima na presença de NaCl foi de 2% durante 48 h sob refrigeração. Os sistemas de separação por membranas de ultrafiltração *Quix Stand* (GE) e *Amicon* (Millipore) não foram eficientes na separação da enzima. Já o sistema de ultrafiltração Pellicon 2 foi empregado com sucesso e concentrou em 20% a enzima, alcançando 97,7% de recuperação em cassettes de 10 kDa. As técnicas SDS-PAGE e zimograma combinadas sugerem a presença de duas dextranases, uma na faixa de 225 kDa a 150 kDa e a segunda próxima a 50 kDa.

Palavras-chave: dextranase; bagaço de malte; purificação; zimograma; dextrana.

1 INTRODUÇÃO

Após um processo fermentativo, uma grande quantidade de biomoléculas é produzida juntamente com o composto de interesse. Na FES, em especial, que emprega resíduos como substrato/suporte, as etapas de separação e purificação de bioprodutos assim obtidos devem garantir a pureza do produto, bem como sua segurança, resultando em uma produção final livre de contaminantes (KOSSEVA, 2013).

Produtos biotecnológicos são usualmente mais sensíveis às variações do ambiente quando comparados a produtos químicos, merecendo maior atenção nas etapas de recuperação. Nos processos de purificação de proteínas é importante que sua estrutura não seja danificada para assegurar a estabilidade. No caso específico das enzimas, é imprescindível o acompanhamento constante de sua atividade durante todas as etapas de separação, estocagem e conservação durante as etapas sucessivas de recuperação.

O grau de pureza do produto final depende da aplicação para a qual se destina. Cada processo exige uma concentração diferente do produto. Também deve ser levado em consideração se o produto biotecnológico será destinado para aplicação durante um processamento ou se o alvo é uma aplicação ou incorporação final, como em um alimento ou medicamento. Em pesquisas acadêmicas, as etapas de purificação de uma proteína são de grande importância para sua caracterização. Pequenas quantidades produzidas são suficientes para avaliação em diferentes etapas de purificação em escala laboratorial. Tais experimentos são necessários para o bom conhecimento da biomolécula em questão e os custos, neste caso, não são considerados. De forma antagônica, a produção industrial necessita de grandes volumes de produto e, neste caso, os custos de separação são extremamente relevantes. Um método simples de separação, com menos operações pode levar à significativa redução dos custos, aumentando a viabilidade e concretização de um processo industrial (ROY e GUPTA, 2001).

A caracterização enzimática para aplicação em processos industriais deve reunir informações sobre suas peculiaridades, resultando em fatos

técnicos que vão influenciar no modo de aplicação desta enzima, já que a indústria sucroalcooleira processa sua matéria prima em uma série de operações não estéreis, nas quais o caldo de cana é submetido a variações consideráveis de pH, temperatura e adição de insumos químicos.

Considerando que o bioprocesso desenvolvido no capítulo anterior é inovador e o emprego de FES e reuso de resíduos nunca foram anteriormente relatados, este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar a dextranase produzida por FES com *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 com bagaço de malte como substrato/suporte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Penicillium aculeatum NRRL 2129 foi gentilmente cedido pelo *Agricultural Research Service* (USDA). A linhagem liofilizada foi reativada em PDA e a cepa mantida sob refrigeração em tubos contendo meio sólido inclinados.

2.2 Produção de extrato enzimático de dextranases para caracterização e purificação da enzima

Depois de realizada a otimização das condições físicas e químicas de cultivo (CAPÍTULO II), a enzima foi produzida em maior escala para as etapas de purificação e caracterização.

O bagaço de malte foi adicionado de solução de dextrana 15 $g.L^{-1}$ e sulfato de amônio 0,45 $g.L^{-1}$ e inoculado com suspensão de esporos de *Penicillium aculeatum* NRRL 2129, de modo a ter 70% de umidade inicial. O substrato homogeneizado foi distribuído em biorreatores tipo bandejas perfuradas com leito de 5 cm no máximo. O material foi incubado a 28°C por 5 dias em ambiente de umidade saturada. Após este período, o fermentado foi

homogeneizado com tampão acetato de sódio pH 5 para extração da enzima e, posteriormente, filtrado.

Após a fermentação, 5 g do fermentado foram homogeneizados com agitador magnético por 10 minutos com 50 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5. A mistura foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1. O filtrado, denominado extrato bruto foi utilizado para a caracterização.

2.3 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.4 Determinação da atividade de dextranases

A atividade da dextranase foi medida pela incubação de 0,5 mL de dextrana T2000 (Sigma) 2% em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 incubados juntamente com 0,5 mL da enzima diluída. Após 20 minutos de incubação a 50°C foi adicionado o DNS e o conteúdo fervido por 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 3,5 mL de água e o conteúdo homogeneizado. Os açúcares redutores liberados pela reação enzimática foram determinados pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para hidrolisar dextrana equivalente a 1 µmol de maltose por minuto dentro das condições mencionadas.

2.5 Determinação do pH ótimo de ação da enzima dextranase

O pH ótimo da reação enzimática foi determinado usando diferentes soluções tampão: pH 1,0-2,0 (tampão HCl-KCl), pH 3,0-5,0 (tampão citrato-fosfato), pH 6,0-8,0 (tampão fosfato), 9,0-10,0 (tampão glicina-NaOH). A atividade enzimática foi determinada em diferentes pHs a 50°C.

2.6 Determinação da temperatura ótima de ação da enzima dextranase

O extrato bruto enzimático foi submetido a diferentes temperaturas durante a reação enzimática: 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C. O extrato bruto foi incubado na presença de dextrana 2% (m/v) em pH 5 por 20 minutos nas diferentes temperaturas.

2.7 Estudo da influência de íons metálicos na atividade enzimática de dextranase

A inibição ou ativação da atividade da dextranase por diferentes íons metálicos foi avaliada em soluções de extrato bruto enzimático contendo a concentração final de 1 mM dos seguintes íons na forma dos sais sulfatos e cloretos: Ca^{2+} , K^{+}, Na^{+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+} diluídos em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5. Os resultados foram expressos em atividade relativa de dextranase em relação ao extrato bruto sem a adição de íons metálicos.

2.8 Estudo da influência da concentração de sólidos solúveis (°Brix)

O extrato bruto enzimático foi submetido a diferentes concentrações crescentes de açúcar (ºBrix) durante a reação enzimática. As soluções de 5 a 60°Brix foram preparadas com sacarose P.A. e acrescidas de dextrana T2000 2% para avaliação da atividade enzimática. Os resultados foram comparados ao extrato bruto sem adição de sacarose.

2.9 Estudo da influência de diferentes concentrações de NaCl

Foi adicionado ao extrato bruto o sal cloreto de sódio em diferentes concentrações 1-10% para avaliar a estabilidade da enzima. Este sal foi testado para avaliar o seu uso como potencial conservante na atividade da enzima. Nestas condições, o extrato bruto foi conservado sob refrigeração

(4°C) de 48 a 168 h (7 dias). Os resultados foram comparados ao extrato bruto sem adição de NaCl.

2.10 Microfiltração do extrato enzimático

Para as etapas de purificação, o extrato bruto obtido foi centrifugado e microfiltrado em conjunto Sartorius em membrana de 0,45 µm. Este processo resultou no extrato microfiltrado. Este procedimento garante a retirada de células microbianas e partículas que poderiam se acumular e prejudicar o desempenho das membranas de ultrafiltração. Também foram microfiltrados a água de lavagem, tampões e soluções de limpeza empregadas nos processos de ultrafiltração.

2.11 Ultrafiltração do extrato enzimático de dextranases em sistema Amicon

Após a extração enzimática e microfiltração foram tomados 15 mL do extrato bruto enzimático para centrifugação em membranas de ultrafiltração de 30, 50 e 100 kDa (Amicon Ultra/Milipore). As membranas Amicon são planas e constituídas de ultracel (celulose regenerada). Os tubos de centrífuga com membranas foram equilibrados e o conjunto submetido à centrifugação a 20000g por 20 minutos a 4°C . As amostras foram separadas e denominadas de F (filtrado ou permeado) e R (retido) para determinação da atividade enzimática, de forma que os permeados de uma etapa fossem as frações iniciais da próxima etapa, seguindo da maior porosidade para a menor.

2.12 Ultrafiltração do extrato enzimático de dextranases em conjunto Quix Stand

O extrato bruto microfiltrado foi submetido à ultrafiltração em sistema fechado QuixStand (GE Benchtop System). As membranas utilizadas são de fira oca e constituídas de polietersulfona. Os tamanhos de corte de massa molecular utilizados foram (300, 100 e 30 kDa), sendo que a sequência de

filtração foi realizada da membrana de poros maiores para a menor, havendo um período de espera da amostra de 12 horas a 4°C até a próxima separação. As frações obtidas foram discriminadas entre Retido (R) ou Permeado (P).

2.13 Ultrafiltração do extrato enzimático de dextranases em Pellicon 2

Volume de 5 litros do extrato bruto microfiltrado foi submetido à separação no conjunto Pellicon 2 (Millipore). Foram testadas membranas do tipo cassetes de fluxo tangencial de diferentes cortes de massa molecular (10, 30, and 100 kDa). Todo o processo foi conduzido a 4°C para melhor conservação das propriedades da enzima. As separações iniciaram-se em membrana de 10 kDa. O retido desta foi aplicado em membrana de 100 kDa. Em um experimento independente foi aplicada amostra em membrana de 30 kDa.

2.14 Eletroforese SDS-PAGE

A técnica de separação em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) foi conduzida em gel de 0,1 mm de espessura na concentração de 8% (LAEMMLI, 1970). Os padrões de massa molecular utilizados foram da marca Fermentas (ThermoScientific) na faixa de 10-200 kDa.

2.15 Zimograma

O zimograma foi realizado baseado em Barret e Curtis (1986) com modificações para reduzir o tempo de revelação das bandas. O gel de separação foi usado na concentração 8% (m/v). As trocas de tampões foram sucessivas e o gel foi incubado a 50°C a cada troca, seguindo a sequência: duas trocas de tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 0,5% Triton X-100 por 15 min cada; duas trocas de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, 0,05% Triton X-100 por 30 minutos cada. O segundo tampão foi trocado e incubado sucessivamente até a revelação das bandas. Os géis foram imediatamente

registrados devido a descoloração do fundo azul quando em longos períodos no líquido.

2.16 Espectrometria de massa Maldi Tof-Tof

Uma banda protéica obtida do SDS-PAGE em posição análoga à banda descorada no zimograma foi submetida à digestão com tripsina (Promega, USA) foi processada pelo método adaptado de Shevchenko *et al*. (1996). Após incubação a 37 °C / 20 horas, alíquotas da amostra hidrolizada foram misturadas numa solução matriz HCCA “α-cyano-4-hydroxycinnamic acid’, e pipetadas nas placas de MALDI onde permaneceram até completa secagem em temperatura ambiente. O espectro de massa (MS) foi adquirido utilizando o espectrofotômetro MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Alemanha) operando em modo refletivo e detecção de íons positivos com voltagem de aceleração de 20 kV. Alguns sinais presentes no espectro de massa MS foram submetidos à fragmentação em modo MS/MS LIFT refletivo positivo, a fragmentação foi induzida pela energia do laser LID “laser induced dissociation”. Os picos foram convertidos em listas de massas monoisotópicas com auxílio do programa computacional FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics).

2.17 Identificação da Dextranase

A identificação de proteínas foi realizada utilizando comparação com o banco de sequências público “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBInr) e o programa Mascot. A massa dos íons parentais tolerada foi de 100 ppm, com os critérios de pesquisa definidos em: erro parental (100 ppm), digestão com tripsina, 1 sítio de clivagem perdido, oxidação de metionina selecionada como variável de modificação, e erros de fragmentação de 0,5 Da.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do pH ótimo da enzima dextranase

Os resultados obtidos da atividade de dextranase sob diferentes valores de pH estão plotados na FIGURA 1. O pH ótimo da enzima obtida foi 5. Contudo observa-se que a atividade relativa diminui em até 20% se o pH estiver na faixa de 3 a 4 ou em 30% se o pH aumentar para 6.

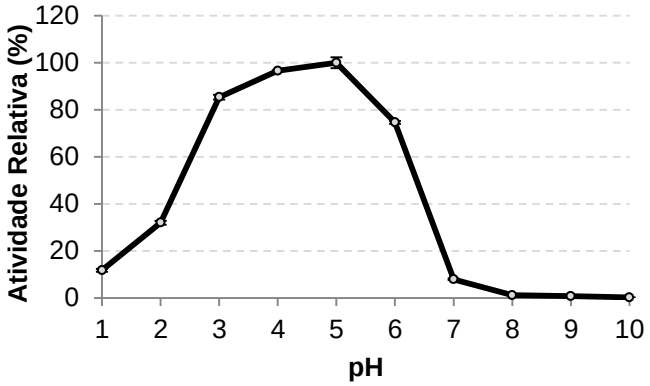

FIGURA 1. ATIVIDADE DA DEXTRANASE EM DIFERENTES pHS.

A enzima estudada tem natureza ácida, sendo relativamente estável entre os pHs 3,0 e 5,0. O incremento do pH acima de 7,0 prejudica drasticamente a atividade dextranásica, tendendo a zero a partir do pH 8,0.

De forma geral, as dextranases fúngicas apresentam natureza mais acidófila quando comparadas às dextranases provenientes de bactérias e leveduras, as quais atuam melhor em pHs ótimos no intervalo de 5,5 a 7,0 (JIMÉNEZ, 2005). Estes resultados estão em concordância com os dados apresentados pela literatura (FUKIMOTO *et al*., 1971; SUGIURA *et al*., 1973; CHAIET *et al*., 1970; DAS e DUTTA, 1996; PLESZCZYNSKA *et al*., 1997; MADHU e PRABHU, 1984) para o gênero *Penicillium*, que apresentam pHs ótimos na faixa de 4,0 a 6,0.

Para fins de aplicação, o resultado obtido mostra-se promissor no uso de dextranase em usina sucroalcooleira, pois o pH médio do caldo de cana é 5.

3.2 Determinação da temperatura ótima da enzima dextranase

Este estudo evidencia a temperatura ótima da dextranase de *Penicillium aculeatum* como 50°C (FIGURA 2). Os dados obtidos estão de acordo com a literatura. Há uma considerável atividade residual de 55% em 60°C.

Os fungos, de forma geral, apresentam temperaturas ótimas entre 50°C a 60°C, superiores às enzimas de origem bacteriana, as quais possuem este valor próximo a 40°C (JIMÉNEZ, 2005).

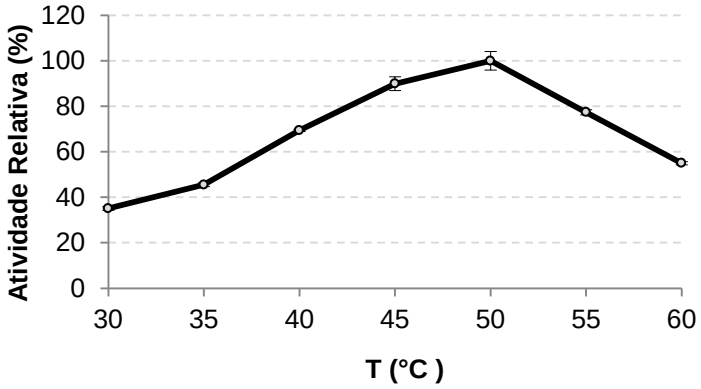

FIGURA 2. ATIVIDADE DA DEXTRANASE DE *P. aculeatum* EM DIFERENTES TEMPERATURAS (T) DE INCUBAÇÃO

3.3 Estudo da influência da adição de íons metálicos na atividade enzimática de dextranase

As atividades da enzima dextranase foram avaliadas quanto à adição de íons metálicos e suas atividades comparadas ao experimento controle, sem adição destes. A atividade dextranásica aumentou em 31% com a adição de Mn^{2+} e 18% com Co^{2+}.

A análise estatística dos resultados pelo teste Tukey indica que não são significativas as diferenças entre os demais cátions adicionados e o ensaio controle. Portanto, esta enzima caracteriza-se por ser estável a Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} e Fe^{2+} na concentração 1 mM. Os íons cobalto e manganês já haviam sido relatados por Sugiura *et al*. (1973) como ativadores da dextranase

de *P. funiculosum*, atingindo 140% e 139% de atividade relativa, respectivamente.

Estes resultados evidenciam a diversidade das enzimas provenientes do gênero *Penicillium*.

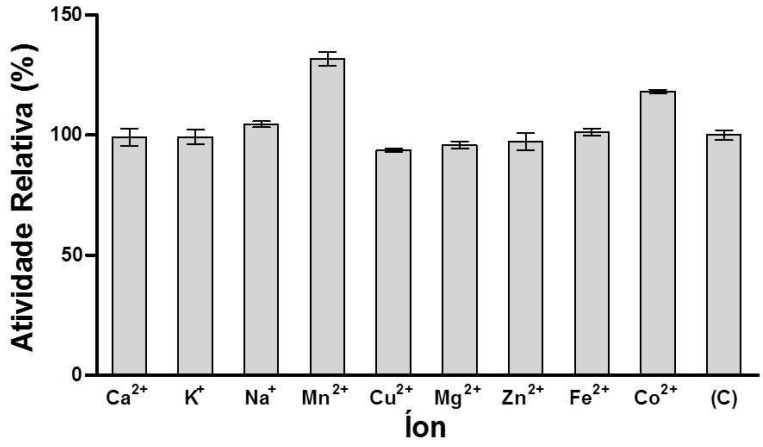

FIGURA 3. EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS METÁLICOS (1 mM) NA ATIVIDADE DA DEXTRANASE DE *P. aculeatum* DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA

A dextranase de *P. lilacinum* foi estudada por Das e Dutta (1996) e mostrou-se inativada na presença de íons zinco e ferro. O mesmo ocorre com a dextranase de *P.aculeatum* na presença de cobre, ferro, zinco e manganês. (MADHU e PRABHU, 1984). Pelas análises não conclusivas quanto ao estabelecimento de relações evolucionárias entre as dextranases (KHALIKOVA *et al*., 2005), estas diferenças nos resultados levam à conclusão de que mesmo pertencendo ao mesmo gênero, as dextranases de *Penicillium* sp podem diferir em sua estrutura, conformação e afinidade. Portanto, suas atividades de dextranase podem variar em diferentes composições de meio de cultivo e condições do ambiente.

3.4 Estudo da influência da concentração de sólidos solúveis (ºBrix) sobre na atividade de dextranases de *P. aculeatum*

O resultado desse estudo está demonstrado na FIGURA 4. Em condições controladas de temperatura e pH demonstra que há grande influência da adição de sacarose à reação enzimática.

O desvio-padrão máximo foi de 3,8%. As atividades enzimáticas permaneceram acima de 90% de atividade relativa se comprada à do extrato bruto sem adição de açúcar na faixa de até 15°Brix. A concentração de açúcar acima de 40°Brix afeta drasticamente a atividade da enzima, que passa a atingir menos de 50% da atividade acima de 45°Brix.

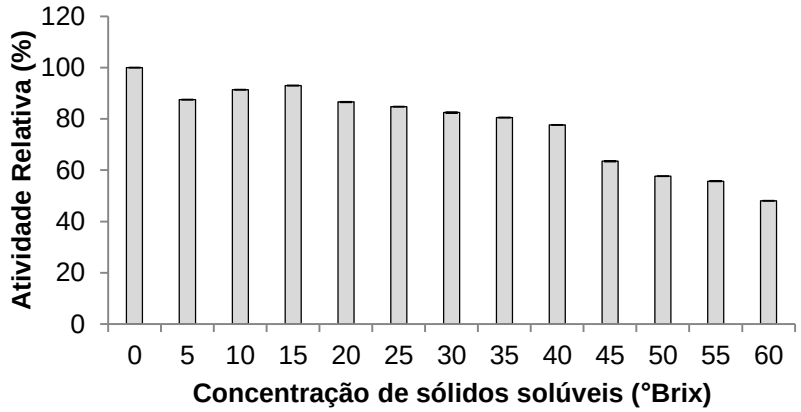

FIGURA 4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS (°BRIX) NA ATIVIDADE DEXTRANÁSICA DE *P. aculeatum* DURANTE A REAÇÃO ENZIMÁTICA

Altas pressões osmóticas causadas pela adição de sacarose parecem prejudicar a proteína. Estes resultados são importantes para avaliar o potencial real de aplicação industrial da enzima, uma vez que na indústria sucroalcooleira trabalha-se com altíssimas concentrações de açúcares, de 15 a 60°Brix, podendo ser ainda superior na fábrica de açúcar. Em estudos com dextranases comerciais oriundas de *Chaetomium erraticum* e *C. gracile*, o efeito da concentração de sacarose (°Brix) foi um dos mais influentes parâmetros que afetaram o desempenho das enzimas. Estes resultados reforçam que a aplicação adequada da dextranase é em caldos de cana e os xaropes e massas devem ser evitados (EGGLESTONE e MONGE, 2005).

3.5 4 Estudo da influência da concentração de NaCl na estabilidade da atividade enzimática

No intervalo de concentração de 1 a 7% de NaCl, em 48 h de armazenamento a 4°C, a enzima manteve relativa estabilidade, chegando a 11,5% de perda de atividade (FIGURA 5). Após 7 dias de armazenamento, a

atividade residual foi menor nas concentrações de 2-4%, mantendo 15% de perdas, aproximadamente. O aumento da concentração de NaCl e do tempo de armazenamento contribui para a perda da atividade. Observa-se que a condição mais favorável foi a de concentração de NaCl 2%, a qual manteve 93% da atividade inicial em 48 h de armazenamento. Provavelmente por razões semelhantes ao efeito da concentração de sólidos solúveis (°Brix), a adição de cloreto de sódio pode diminuir demasiadamente a hidratação, podendo afetar a conformação da enzima e sua atividade. A perda de atividade em 168 h aumentou em concentrações de NaCl acima de 4%, alcançando 23% de perda com 8% de concentração.

Esta avaliação é um experimento simples que permite antecipar o comportamento da enzima quanto à resistência às variações da concentração salina. Em alguns sistemas de extração e em algumas resinas de troca iônica o tampão pode ter concentrações salinas diferentes ao longo da separação. Pelo fato da dextranase apresentar sensibilidade à adição de sal, outras estratégias de purificação disponíveis no laboratório foram aplicadas, prezando pela preservação da atividade dextranásica.

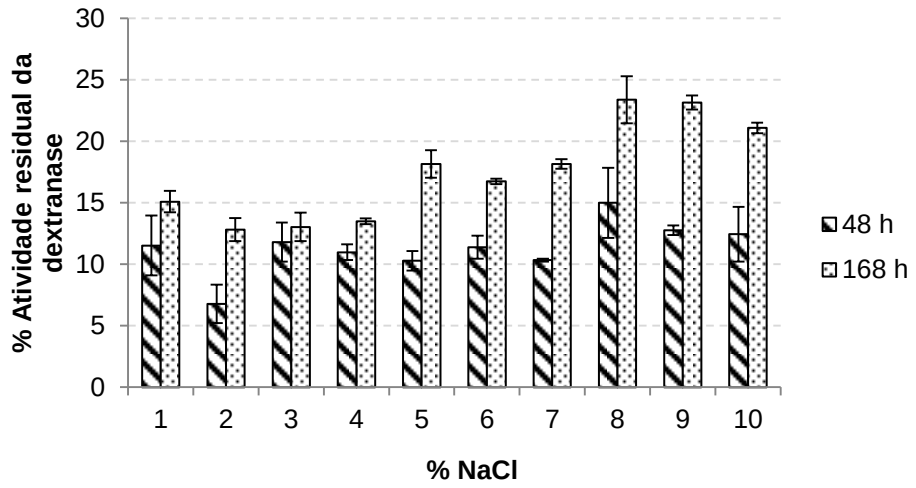

FIGURA 5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl NA ATIVIDADE DEXTRANÁSICA DE *P. aculeatum* EM 48 E 168 h DE ARMAZENAMENTO A 4°C

3.6 Ultrafiltração do extrato enzimático no sistema Amicon®Ultra

A técnica de ultrafiltração é usada geralmente para separação e/ou concentração de biomoléculas. Neste caso ela foi empregada para um estudo prévio para determinação da provável massa molecular da enzima produzida.

Os resultados obtidos (TABELA 1) mostram que houve separação de frações, sendo que a maior quantidade de proteínas totais está no extrato bruto. A maior atividade enzimática total e maior atividade específica de dextranase encontra-se na fração permeada da membrana de 100 kDa, com 61 $U.mg^{-1}$, concentrando a enzima em 19% em relação ao extrato bruto (50,9 $U.mg^{-1}$). Em unidades totais, a fração P100 ficou com 80% de todas as unidades de entrada nos sistemas, o que representa uma separação significativa.

TABELA 1. SUMÁRIO DOS RESULTADOS DA SEPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO EM SISTEMA DE ULTRAFILTRAÇÃO POR UNIDADES DE FILTRO PARA CENTRIFUGAÇÃO

Etapa	Volume mL	Proteína total mg	Atividade específica $U.mg^{-1}$	Rendimento	Taxa de Purificação
EB	28,50	1,70	50,94	1,15	1,00
R100	1,30	0,20	9,16	0,21	0,18
P100	27,20	1,13	61,11	1,38	1,20
R50	1,50	0,09	14,23	0,32	0,28
P50	13,50	0,54	25,03	0,57	0,49
R30	5,20	0,21	2,57	0,06	0,05
P30	6,30	0,21	0,93	0,02	0,02

Ainda houve presença de dextranase nas demais frações, porém em concentrações menos expressivas. Nota-se que pouca enzima foi recuperada após a passagem na membrana de 50 kDa, com baixíssima taxa de purificação e rendimento no permeado (0,02) e retido (0,05) de 30, mesmo que as quantidades de proteína totais somadas das duas frações sejam compatíveis. Ou seja, embora não tenha havido perda de proteínas (volume), houve perda de atividade. Isto pode ser atribuído à retirada de elementos importantes que poderiam auxiliar na estabilização enzimática. Também deve ser destacado que houve a concentração de uma quantidade importante de proteínas no

permeado de 50, com uma atividade de 25 $U.mg^{-1}$. Esta fração pode revelar uma potencial isoenzima em menor quantidade.

Esses resultados sugerem que 80% da enzima dextranase produzida por *P. aculeatum* em FES deve ter massa molecular entre 80 e 100 kDa, porém, não se pode afirmar com exatidão pelo fato de que a membrana não faz uma seleção exata por faixa molecular.

3.7 Ultrafiltração do extrato enzimático em sistema de filtração tangencial Quix-stand (GE)

Este equipamento de bancada é um sistema fechado que permite o processamento de amostras de até 1000 mL. A amostra é recirculada diversas vezes sob pressão em um sistema fechado, através de membranas do tipo fibras ocas, com vazão controlada por uma bomba peristáltica. Os experimentos foram conduzidos dentro da pressão recomendada pelo fabricante.

A amostra foi submetida às membranas de cortes de massa molecular maiores para os menores e o permeado de uma membrana foi a entrada da próxima etapa. O processo iniciou-se com o extrato bruto sendo submetido à membrana de 300 kDa. A fração permeada desta etapa ficou em repouso por 12 h e foi aplicada à membrana de 100 kDa. Após o repouso de 12 horas o permeado de 100 kDa foi aplicado contra o cartucho de 30 kDa. Os resultados das análises e rendimentos estão demonstrados na TABELA 2. A cada troca de cartuchos é necessária a limpeza do sistema e a amostra repousa por 12 h sob refrigeração. As amostras foram analisadas antes e depois do repouso e as perdas neste período foram significativas.

Neste sistema a fração mais importante está novamente no permeado de 300 kDa (P300). Em termos de unidades globais, nesta fração permaneceram 84% das unidades totais de entrada. Trabalhos anteriores com *Penicillium sp*. (KHALIKOVA *et al*., 2005) relatam dextranases de 25 a 50 kDa. Na segunda etapa, com membrana de corte de 100 kDa, não houve separação efetiva, as atividades específicas do retido e permeado apresentam resultados muito semelhantes. Isso sugere que a massa molecular da dextranase deve estar em torno de 100 kDa.

TABELA 2. SEPARAÇÂO/PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO EM SISTEMA DE MEMBRANA DO TIPO FIBRA OCA - QUIX STAND.

Etapa	Fração	Atividade Específica ($U.mg^{-1}$)	%	Balanço
	Entrada	136	100	
Membrana 300 kDa	Retido	193	10,3	Recuperação:95,46 %
	Permeado	495	85,16	Perdas: 4,51 %
	Perdas		4,51	
Repouso	Perdas		-8	
	Entrada	539	100	
Membrana 100 kDa	Retido	510	7,93	Recuperação: 99,88 %
	Permeado	597	91,95	Perdas: 0,12%
	Perdas		0,12	
Repouso	Perdas		29,3	
	Entrada	427	100	
Membrana 30 kDa	Retido	265	21,4	Recuperação: 74,3 %
	Permeado	524	53,2	Perdas: 25,4 %
	Perdas		25,4	
TOTAL				PERDAS : 44,99%
				RECUPERAÇÃO : 65,01%

Na etapa seguinte, a separação pela membrana de 30 kDa apresentou problemas significativos de estabilidade; aproximadamente 25% das unidades totais foram perdidas. A atividade específica caiu drasticamente, 53% da enzima inicial permeou a membrana, o que sugere que a enzima é menor que 30 kDa.

O processo de separação global não foi bom para a manutenção das atividades enzimáticas, pois 45% de toda a enzima de entrada foram perdidas durante as ultrafiltrações. De forma geral, os resultados sugerem que existem duas dextranases de diferentes tamanhos presentes na amostra inicial, uma próxima a 100 kDa e uma segunda com massa molecular perto de 30 kDa.

3.8 Ulrafiltração do extrato enzimático em sistema Pellicon 2

Este equipamento permite a separação de grandes volumes de amostra em relação a outros equipamentos de bancada, simulando um procedimento

mais próximo à realidade industrial. Neste sistema a filtração é tangencial e a amostra flui impulsionada por uma bomba peristáltica através de membranas planas organizadas em cassetes de 0,5 m² de área total. A amostra é ultrafiltrada pelas membranas e o retido recircula por diversas vezes, sendo recolhidas em uma saída as moléculas menores que o tamanho de corte da membrana, até a obtenção do volume desejado.

O extrato bruto foi submetido primeiramente à membrana de 10 kDa e houve concentração da amostra com baixas perdas. A fração retida (R) desta etapa foi submetida a uma nova operação de ultrafiltração em membrana de 100 kDa. A sequência de operações e taxas de recuperação estão demonstradas FIGURA 6. Os resultados em % referem-se à atividade enzimática.

Também foi testada a membrana de 30 kDa em um processo independente, porém, 25,4% de toda a enzima submetida ao processo foi perdida. Estas perdas não são perdas de volumes, e sim perdas de atividade enzimática. Não há como determinar o motivo de uma membrana ser superior à outra em conservação da atividade da enzima, porém, a separação de acordo com o corte pode retirar elementos essenciais à estabilidade da molécula, ou a passagem através da membrana pode causar deformações e perdas de atividade.

No caso da membrana de 100 kDa houve distribuição de 52,60% da atividade enzimática no retido e 35,61% no permeado. Os dados mostram que a separação não foi efetiva, uma vez que o resultado esperado era reter a maioria da atividade em uma fração ou outra. Na passagem pela membrana de 30 kDa, 68% da atividade foi retida, porém a perda de 25,4 % do total da atividade da dextranase não viabiliza esta alternativa. Considerando que o cassete de 10 kDa reteve 97% do total de atividade de entrada, com perdas de 2,13%, este processo foi o mais efetivo, e escolhido para as próximas etapas como método de concentração da atividade enzimática. Outras repetições com esta membrana foram realizadas, resultados semelhantes foram obtidos e a enzima foi concentrada em 20%.

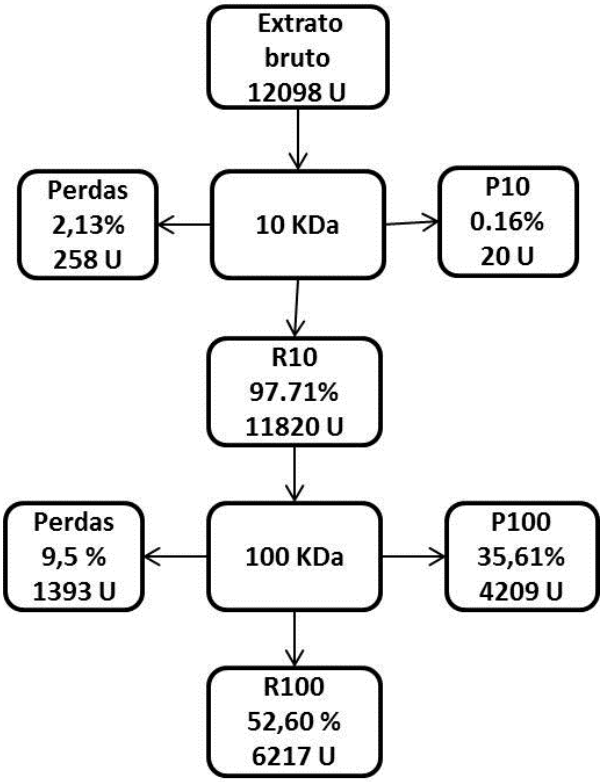

FIGURA 6. DIAGRAMA DAS OPERAÇÕES DE ULTRAFILTRAÇÃO EM PELLICON 2 COM A REPRESENTAÇÃO DAS TAXAS DE RECUPERAÇÃO (%). P REPRESENTA A FRAÇÃO PERMEADA E R A FRAÇAO RETIDA.

A extração da enzima em tampão adequado após o fim da fermentação certamente teve um efeito positivo na conservação da atividade. Além disso, pode-se considerar que algumas características do resíduo utilizado podem ter componentes que ajudem na estabilização da enzima. Esta hipótese pode ser sustentada pelas etapas de seleção (CAPÍTULO II), nas quais se observou a manutenção da atividade enzimática em bagaço de malte durante 4 dias de forma praticamente inalterada.

A estratégia de definir o conjunto Pellicon 2 com operação em membrana de 10 kDa foi escolhida para a produção da enzima para as etapas de purificação e formulação, já que as perdas foram mínimas e esta metodologia permite o trabalho com grandes volumes de enzima em pouco tempo. Esta ferramenta escolhida obviamente irá concentrar não só a dextranase, como também outras proteínas presentes na amostra. Neste caso, isto não apresenta uma desvantagem, já que pouca proteína residual é encontrada no fim da fermentação, fato evidenciado pelas outras técnicas de purificação e análise. Também o fato deste organismo não precisar de fontes

de proteína orgânica em seu meio de cultivo facilita a obtenção de um extrato fermentado mais puro, como fica evidente pela análise de SDS-PAGE (item 3.9).

O processo açucareiro, por sua vez, não requer altíssimos níveis de pureza porque após a aplicação da enzima no processo, as etapas seguintes utilizam altíssimas temperaturas (>100°C), garantindo a inativação da maioria dos compostos bioativos.

Os diferentes métodos de ultrafiltração empregados resultaram em recuperações diversas. Os permeados de 100 kDa obtiveram recuperações de 80%; 91,95% e 35,61% para os conjuntos de ultrafiltração Amicon, Pellicon e QuixStand, respectivamente. Cada sistema difere quanto à composição e à forma de operação, sendo, portanto, difícil compará-los. As membranas Amicon são constituídas de celulose regenerada (ultracel) e a separação ocorre pela força centrifugacional; os cartuchos para Quixstand são constituídos de polisulfona e a separação ocorre tangencialmente e os cartuchos Biomax do Pellicon 2 são feitos de polietersulfona modificada e a separação é tangencial. As configurações de Amicon e Pellicon são planas, enquanto o Quixstand utiliza membranas de fibra oca. Essas diferenças podem ter sido o fator decisivo na diferença entre os resultados.

No caso do sistema Quixstand, o período de repouso entre as ultrafiltrações em diferentes membranas de corte foram desvantajosos na manutenção da atividade residual dextranásica. Além disto, este sistema pode apresentar turbulência durante as ultrafiltrações, o que pode contribuir em grande parte na desnaturação protéica. Em consequência desta turbulência, e pode haver o aumento da oxidação da enzima, o que pode afetar alguns tipos de aminoácidos, levando a alterações funcionais e estruturais, podendo causar inativação da enzima. Os aminoácidos mais suscetíveis à oxidação são metionina, cisteína, histidina, triptofano e tirosina (LI *et al*., 2004). Embora a composição da dextranase produzida por FES não tenha sido elucidada, esta é uma hipótese para explicar a perda de atividade durante a ultrafiltração. O sistema de centrifugação do Amicon não causa turbulência na amostra e a configuração do Pellicon 2 também pode ser operado sem que ocorra tanta oxigenação, o que pode explicar os níveis de recuperação superiores.

Dentre todos os métodos testados, o melhor resultado foi alcançado com a utilização da membrana de corte de 10 kDa em sistema de ultrafiltração Pellicon 2, o qual reteve 97,71% de atividade da amostra de entrada, índice excelente para ampliação da escala de produção.

3.9 SDS-PAGE e Zimograma

A técnica de zimograma para enzimas hidrolíticas é baseada na degradação do substrato. Desta forma, a região de hidrólise do substrato pode ser visualizada e a enzima localizada por seu tamanho molecular. A visualização é baseada na agregação de elementos corantes no substrato ou no produto (VANDOOREN *et al*., 2013). No caso específico da dextranase, o método desenvolvido por Barret e Curtis (1986) emprega a blue dextrana como substrato incorporado ao tradicional SDS-PAGE. A ação enzimática libera o corante e a posição da enzima é revelada pelas bandas brancas, descoradas em contraste ao fundo azul do gel de corrida.

Os resultados das técnicas SDS-PAGE e Zimograma foram combinados na FIGURA 8.

No gel de SDS-PAGE as amostras são usualmente levadas à ebulição, antes da aplicação no gel, porém, para um alinhamento exato com o zimograma este procedimento não foi executado. No zimograma, durante a corrida com o substrato, a proteína (enzima) deve manter sua forma ativa e, certamente, o aquecimento desnaturaria a enzima dextranase.

O zimograma permite a clara visualização de duas bandas distintas, independente da amostra. O alinhamento com o gel corado demonstra que uma das proteínas enzimas tem massa molecular acima de 200 kDa e a segunda está próxima a 50 kDa.

Dentre as diversas espécies produtoras de dextranases, os relatos em literatura apontam massas moleculares variando de 23 a 140 kDa. Dextranases do gênero *Penicillium sp*, apresentam massas moleculares entre 25 e 50 kDa (KHALIKOVA *et al*.,2005)

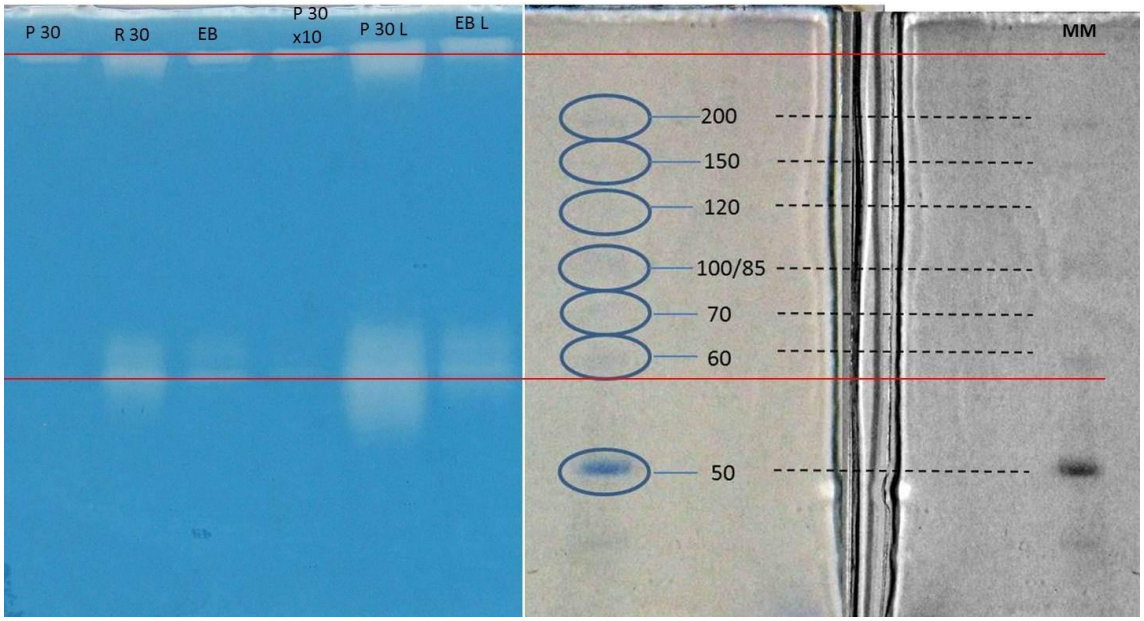

FIGURA 8. GEL SDS-PAGE GEL E ZIMOGRAMA OBTIDOS COM A APLICAÇÃO DE AMOSTRAS DE FERMENTADO. Amostras da esquerda para direita: P30 – amostra permeada do Amicon 30 kDa; R30 – amostra retida em Amicon 30 kDa; EB- extrato bruto concentrado em Amicon 10 kDa; P30x10 – amostra permeada em Amicon 30 kDa e concentrada em membrana Amicon 10kDa; P30L – amostra permeada em Amicon 30 kDa, liofilizada; EBL – extrato bruto liofilizado

O relato de duas dextranases já foi discutido em trabalhos prévios. Richards e Streamer (1972) também encontraram duas dextranases no fermentado de uma bactéria não identificada. As massas moleculares não puderam ser identificadas e a separação das enzimas foi em coluna BioGel P200. Sugiura *et al.* (1973) demonstraram que o fermentado de *P. funiculosum* também possui dextranases distintas, as quais foram separadas por uma série de cromatografias e as massas moleculares das enzimas não foram relatadas. Lee e Fox (1985) em trabalhos com *Paecilomyces lilacinus* apontaram a presença de isoenzimas dextranases pelo método de zimograma, e também não determinaram as massas moleculares. Pleszczynska *et al*. (1996) identificaram duas dextranases de massas moleculares 55,8 e 50,1 kDa nos fermentados de *P. notatum*. As separações das enzimas foram sequências de várias cromatografias, porém no zimograma apenas houve a revelação de uma banda, pela proximidade dos seus tamanhos moleculares. A presença de isoenzimas não parece estar associada a um grupo específico, foi encontrado tanto em linhagens bacterianas quanto fúngicas.

As bandas reveladas nos géis foram recortadas e submetidas ao sequenciamento. Embora os espectros de massa obtidos tenham alcançado sinal satisfatório, os dados lançados no banco NCBi não geraram similaridade com sequencias já disponíveis. Conforme ressaltado por Khalikova *et al*. (2005), as sequencias de dextranases disponíveis alinhadas não geram informações suficientes de parentesco e relação entre os micro-organismos produtores. Desta forma, o genoma de *P. aculeatum* NRRL 2129 deve ser elucidado primeiramente para que os dados obtidos no espectro possam ser comparados. Até o momento, um projeto conduzido pela Novozymes para sequenciamento de genomas de várias espécies do gênero *Penicillium* sp já tem parte concluída (*Joint Genome Institute - Fungal Genomics Program*), no entanto os dados ainda não foram publicados nem lançados em bancos de acesso público. Portanto, a identificação das dextranases produzidas por FES ainda não foi concluída por falta de informação do genoma de *P. aculeatum.*

4 CONCLUSÕES

A dextranase produzida por FES apresentou pH ótimo e temperatura ótima compatíveis com os valores de literatura, sendo, respectivamente, 5 e 50°C. O efeito da concentração de sólidos solúveis (°Brix) teve efeito similar aos relatados pela literatura com outras enzimas comerciais. Os efeitos inibitórios foram severos a partir de 45 °Brix, a atividade residual foi de 50%.

As etapas de purificação evidenciaram a presença de duas dextranases de diferentes massas moleculares, fato este confirmado pela presença de duas bandas diferentes agindo sob o substrato dextrana.

A separação e concentração, em sistema de ultrafiltração Pellicon 2 foi o método mais eficiente de tratamento do extrato bruto, recuperando mais de 90% da enzima de entrada em um produto 20% mais concentrado.

REFERÊNCIAS

BARRET, J. F., R. CURTISS. Renaturation of dextranase activity from culture supernatant fluids of *Streptococcus sobrinus* after sodium dodecylsulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 158:365–370.

BRADFORD, M. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-258, 197, 1986.

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 Microbiology,** p.421-426, 1970.

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*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 28, p. 107-113, 1996.

EGGLESTON, G.; MONGE, A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. **Process Biochemistry.** v. 40, p.1881-1894, 2005.

FUKIMOTO, J.; H. TSUJI; D. I. TSURU. *Penicillium luteum* dextranase: its production and some enzymatic properties. J. Biochem. 69:1113–1121, 1971.

JIMENEZ, E. R. 2005. La dextranasa a lo largo de la industria azucarera. **Biotecnologia Aplicada.** v. 22, p. 11-19, 2005.

KHALIKOVA, E. ; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial Dextran-hydrolizing enzymes: Fundamentals and Applications**. Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 69, p. 305-325, 2005.

KOSSEVA, M. R. Assessment and Recuperation Commodities. **Food Industry Waste. Academic Press.** p. 77-102, 2013.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680–685, 1970.

LEE, J. M.; FOX, P. F. Purification and characterization of *Paecilomyces lilacinus* dextranase. **Enzyme Microb. Technology,** 7:573-577, 1985.

LI, S.; SCHÖNEICH, C.; BORCHARDT, R. T. Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. **Biotechnology and Bioengeneering,** 48, 490-500, 2004.

MADHU, G.L.S.; PRABHU, K.A. Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*. **Enzyme Microb. Technol**. v. 6, p. 217-220, 1984.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry.** v. 31, p. 426-428, 1959.

PLESZCZYNSKA, M.; ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Purification and some properties of an extracellular dextranase from *Penicillium notatum*. **Mycol. Res.** n.100. v.6, p. 681-686, 1996.

RICHARDS, G N; STREAMER, M. Studies on dextranases. Part 1. Isolation of extracellular, bacterial. **Carbohydrate Research**, 25:323-332, 1972.

ROY, I., GUPTA, M. N. Downstream Processing of Enzymes/Proteins. Proc. **Indian Sci Acad.** (Pinsa). B68-2, p. 175-204, 2002.

SUGIURA, M.; ITO, A.; OGISO, T.; KATO, K.; ASANO, H. Studies on dextranase. Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. Biochimica et Biophysica Acta, 309:357-362, 1973.

USDA. Foreign Agricultural Service. **Sugar:** World Market and Trade. nov. 2013.

VANDOOREN J; GEURTS N; MARTENS E; VAN DEN STEEN P E; OPDENAKKER G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. **Nature Methods**, n.10, v.3, 2013.

CAPÍTULO IV
FORMULAÇÃO E ESTUDOS DE ESTABILIDADE

RESUMO

As biomoléculas prospectadas e estudadas para aplicação em larga escala devem alcançar, além dos desempenhos satisfatórios em escala laboratorial, capacidade de manutenção de suas atividades biológicas após a recuperação. A estabilidade da dextranase produzida por FES em bagaço de malte foi estudada e testada com a presença de aditivos para prolongar a atividade enzimática. Dentre os diversos aditivos testados, glicerol, sorbitol, ácido cítrico e ácido sórbico foram os melhores na preservação da atividade dextranásica a 37 °C por 15 dias. A partir de delineamentos experimentais, ácido cítrico a 0,17% (m/v) e sorbitol a 2,83% (m/v) foram determinados como melhor combinação de aditivos. No estudo de longo prazo, com avaliação durante 120 dias, esta formulação prolongou a atividade da enzima em 83% comparadas ao ensaio controle sem aditivos em temperatura ambiente e aumentaram em 9,43% a atividade da enzima comparada ao ensaio controle sob refrigeração. Desta forma, a adição desses dois componentes prolongou efetivamente a vida útil da enzima, principalmente em condição de armazenamento em temperatura ambiente.

Palavas-chave: formulação; aditivos; estabilidade; armazenamento, dextranase.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas e demais produtos de origem biológica requerem cuidados específicos para a manutenção de suas características. Os processos de recuperação e separação dessas biomoléculas podem afetar a estabilidade dos compostos, por causa dos processos seriados (HARRIS e ANGAL, 1989), uso de produtos químicos, estresses mecânicos (centrifugação, agitação), estresse térmico, entre outros. Além disso, quando isolada, a molécula deixa de interagir com diversas estruturas e componentes celulares que podem estar associados à manutenção de suas atividades biológicas (COLACINO e CRICHTON, 1997). Assegurar a estabilidade é o fato de maior importância no sucesso da implantação de um produto de origem biológica (WEIJERS e RIET, 1992).

As estratégias para estabilização de enzimas têm sido temas de diversos trabalhos. Dentre os métodos podem ser citados: a imobilização de enzimas em matrizes sintéticas ou naturais, modificações químicas das moléculas (GULLA *et al*., 2004), modificações genéticas e associação com aditivos em uma formulação (FU *et al*., 2010). No caso das enzimas dextranases, a imobilização em diferentes matrizes com o objetivo de avaliar as estabilidades já foram investigadas com sucesso em alguns trabalhos. (ROGALSKI *et al*., 2007; ASLAN e TANRISEVEN, 2007; ÖLÇER e TANRISEVEN, 2010).

O uso de aditivos é uma das formas mais acessíveis e pode prevenir a ação de agentes químicos e biológicos, além de aumentar a resistência das moléculas a altas temperaturas, o principal fator que afeta a estabilidade enzimática (GULLA *et al*., 2004). Os aditivos são compostos adicionados ao produto de interesse, como sais, aminoácidos, surfatantes, metil ésteres, compostos metálicos, poli hídricos, polieletrólitos, antibióticos, entre outros. Estes agentes têm naturezas químicas diversas e a escolha dos componentes está associado à característica que se deseja atingir. Um trabalho avaliando o efeito de aditivos na estabilidade de dextranase obtida de *Arthrobacter oxydans* (WANG *et al*.,2014) foi realizado, avaliando principalmente a ação de polióis.

O objetivo deste trabalho foi estudar a nova enzima, produzida em FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 com emprego de bagaço de malte como

suporte/substrato, quanto à sua estabilidade e o efeito de aditivos no extrato enzimático concentrado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das amostras de enzima para os testes de estabilidade

Após a fermentação no estado sólido em condições otimizadas, o fermentado foi extraído com 10 volumes de tampão acetato de sódio a 50 mM, pH 5 e o conteúdo foi homogeneizado em agitador mecânico de hélice por 10 minutos. A mistura foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1. O extrato bruto obtido foi centrifugado e em cartucho de microfiltração (Sartorius) com porosidade de 0,45 µm, posteriormente submetido, à ultrafiltração em membrana do tipo *cassette* de 10 kDa do sistema de ultrafiltração Pellicon 2 (Millipore).

Este processo resultou no concentrado enzimático de dextranases, o qual foi utilizado para os estudos de estabilidade.

2.2 Determinação da atividade de dextranase

A atividade da dextranase foi determinada pela incubação de 0,5 mL de dextrana T2000 (Sigma) 2% (m/v) em tampão acetato de sódio pH 5 incubados juntamente com 0,5 mL da enzima diluída. Após 20 minutos de incubação a 50°C foi adicionado DNS e a mistura levada à ebulição por 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 3,5 mL de água e o conteúdo homogeneizado. Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para hidrolisar dextrana equivalente 1 µmol de maltose por minuto dentro das condições mencionadas.

2.3 Estudo da estabilidade do extrato bruto de dextranases

Alíquotas do extrato bruto de dextranases produzidas foram acondicionadas em diferentes métodos de armazenamento: temperatura ambiente (A), refrigeração (R), freezer (F) (-10°C) e ultrafreezer (UF) (-80°C).

As amostras foram analisadas quanto à atividade enzimática semanalmente, totalizando 120 dias ao fim do experimento.

2.4 Formulação de extrato enzimático de dextranases

2.4.1 Seleção de componentes para formulação de extrato de dextranases

Este estudo foi uma pré-seleção (*screening*) de aditivos que favorecem a permanência da atividade de dextranase. Os aditivos selecionados para o teste foram escolhidos com base na RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988 da ANVISA, de acordo com a sua disponibilidade no laboratório. Foram excluídos aqueles em que havia alguma restrição de aplicação em alimentos segundo a ANVISA.

Os aditivos foram testados em duas diferentes concentrações (%), a máxima permitida [2C] pela legislação brasileira e a metade desta quantidade [C] e os aditivos escolhidos e suas concentrações estudas constam na TABELA 1.

A atividade inicial refere-se à atividade do extrato concentrado inicial, antes da incubação e sem aditivos. Um experimento controle, sem a presença de aditivos foi incubado nas mesmas condições.

O extrato enzimático de dextranase, preparado conforme item 2.1 concentrado foi incubado juntamente ao aditivo em frascos transparentes, mantendo 1/3 de *headspace*. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e incubados em estufa a 37±2°C durante 15 dias. Ao fim dos 15 dias, as atividades foram determinadas e comparadas à atividade inicial no tempo zero sem aditivos.

TABELA 1. ADITIVOS EMPREGADOS NA ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO DE COMPONENTES PARA FORMULAÇÃO DE DEXTRANASES PRODUZIDAS EM FES EM BAGAÇO DE MALTE POR *Penicillium aculeatum*

ADITIVO	[2C] %	[C] %
Ác. Cítrico (ACC)	0,3	0,15
Sorbato K (SORK)	0,5	0,25
Ác. Benzoico (ACB)	0,05	0,025
Benzoato Na (BZNA)	0,1	0,5
Metabissulfito Na (METNA)	0,002	0,001
Ác. Sórbico (ACS)	0,05	0,025
Glicerol (GOL)	5	2,5
Sorbitol (SOL)	5	2,5
Manitol (MOL)	5	2,5
Carboximetilcelulose (CMC)	5	2,5
Citrato sódio (CAN)	0,1	0,5
Polietilenoglicol 400 (PEG)	1	0,5
Controle	-	-

Os dados foram analisados pelo software de estatística GraphPad Prism® 3.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

2.4.2 Avaliação da interação de componentes da fórmula de enzima dextranases

Os melhores aditivos selecionados da etapa anterior (ácido cítrico, ácido benzoico, glicerol e sorbitol) foram combinados em um delineamento fatorial incompleto de dois níveis tipo 2^4, totalizando 11 ensaios e 3 pontos centrais. O software Statistica 5.1 (StatSoft Inc., USA) foi utilizado para analisar os dados experimentais. Os frascos foram incubados a 37±2°C por 15 dias.

Os níveis e as variáveis testadas nesta avaliação estão demonstrados na TABELA 2.

TABELA 2. NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA A AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE ADITIVOS PARA FORMULAÇÃO DE DEXTRANASE PRODUZIDA EM FES POR *Penicillium aculeatum* NRRL 2129

Variáveis independentes (%)	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
Ácido cítrico	ACC	0	0,15	0,3
Ácido benzóico	ACB	0	0,025	0,05
Glicerol	GOL	0	2,5	5
Sorbitol	SOL	0	2,5	5

2.4.3 Teste final da formulação da enzima dextranase

O objetivo deste experimento foi definir a concentração final dos aditivos significativos na estabilidade da dextranase produzida em FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129.

O software Statistica 5.1 (StatSoft Inc., USA) foi empregado para delinear e analisar o experimento por meio de um planejamento do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) do tipo 3^2 com 3 repetições no ponto central. Os frascos foram incubados a 37±2°C por 15 dias. As variáveis testadas e seus níveis constam na TABELA 3.

TABELA 3. VARIÁVEIS INDEPENDENTES E SEUS NÍVEIS TESTADOS NA DETERMINACAO DA CONCENTRACAO FINAL DOS COMPONENTES DA FORMULAÇÂO DA ENZIMA DEXTRANASE PRODUZIDA EM FES POR *Penicillium aculeatum* NRRL 2129.

Variáveis independentes (%)	Símbolo	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Ácido cítrico	ACC	0,04	0,08	0,15	0,23	0,26
Sorbitol	SOL	0,74	1,25	2,50	3,75	4,26

2.4.4 Estudo da estabilidade comparativo do extrato parcialmente purificado com aditivos e sem aditivos

O extrato bruto concentrado (controle) sem aditivos e a fórmula final com aditivos em suas concentrações ideais foram testados quanto à atividade enzimática a cada 15 dias, totalizando 120 dias de acompanhamento. As

condições de armazenamento foram sob refrigeração (4°C) e à temperatura ambiente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabilidade do extrato bruto de dextranase produzida por FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129

O extrato bruto de dextranase produzida por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 em FES foi analisado quanto à sua estabilidade em diferentes condições de armazenamento: ambiente (A), freezer (F), refrigerada (R) e ultrafreezer (UF).

A atividade residual do extrato enzimático de dextranase consta no gráfico da FIGURA 1.

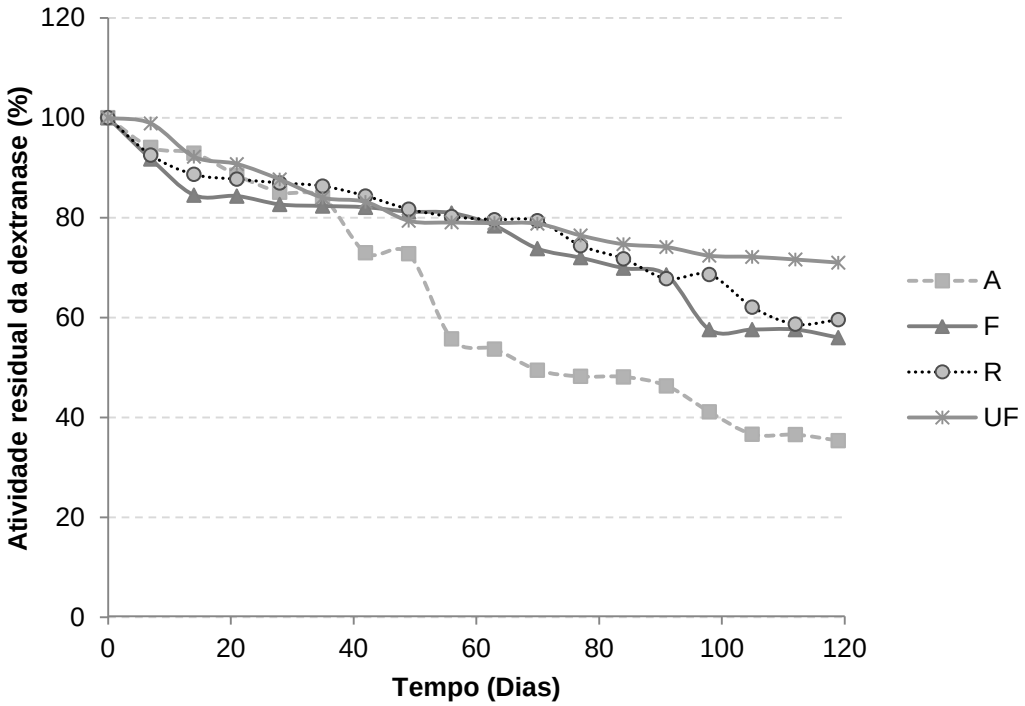

FIGURA 1. ATIVIDADE DEXTRANÁSICA RESIDUAL DURANTE A INCUBAÇÃO DO EXTRATO BRUTO CONTENDO A ENZIMA DEXTRANASE PRODUZIDA POR *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 EM FES EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO: AMBIENTE (A), REFRIGERAÇÃO (R), FREEZER (F) (-10°C) E ULTRAFREEZER (UF) (-80°C).

Observa-se que o decréscimo na atividade do extrato enzimático de detxranase foi semelhante para os quatro tratamentos nos primeiros 35 dias, atingindo de 82 a 84% de atividade residual em quaisquer condições. Após este período, as amostras armazenadas em temperatura ambiente sofreram decréscimo acelerado da atividade, atingindo ao fim de 120 dias apenas 35% de atividade residual. Este resultado era esperado porque nesta condição, a amostra fica mais suscetível às variações do ambiente, além de ser vulnerável a contaminações microbiológicas e outros tipos de ataque.

Em até 70 dias, as condições de armazenamento sob refrigeração, congelamento e ultrafreezer são comparáveis e semelhantes na conservação da atividade, alcançando ao fim destes dias uma atividade residual de 78,4% para as amostras congeladas, 79,6% para as amostras refrigeradas e 78,9% para aquelas armazenadas no ultrafreezer. Após este período, o ultrafreezer foi a melhor forma de estocagem, conservando 71% da atividade enzimática ao fim de 120 dias. As amostras congeladas mantiveram 56% e as refrigeradas 59% da atividade inicial.

Embora o armazenamento da solução enzimática em ultrafreezer tenha apresentado um desempenho superior às demais formas de conservação, este método é inviável em termos industriais. Desta forma, a partir dos experimentos conduzidos, sem adição de conservantes ou estabilizantes, ressalta-se que a enzima é estável por 35 dias sob refrigeração, conservando 81% da atividade inicial. É importante ressaltar que a solução de extração da enzima foi tampão acetato de sódio a 50 mM, pH 5 e o armazenamento nesta condição pode ter sido um fator de grande importância nestes resultados, por estar perto do pH ótimo da enzima e por manter a força iônica do meio, preservando a estrutura enzimática.

Outros estudos avaliaram o tempo de armazenamento de dextranase, porém com objetivo de imobilização (ROGALSKI *et al*., 2007; ASLAN e TANRISEVEN, 2007; ÖLÇER e TANRISEVEN, 2010). No estudo do extrato bruto contendo duas isoenzimas dextranases, Rogalski *et al* (2007) concluem que as enzimas de *P. notatum* imobilizadas e incubadas a 28 °C retiveram 68% da atividade inicial após 14 dias com o uso de cobertura de APTES em pérolas de vidro. Desta forma, as isoenzimas dextranases de *P. aculeatum* produzidas por FES foram mais resistentes, pois sem necessidade de imobilização nem

tratamentos adicionais, retiveram 81% da atividade inicial sob refrigeração. Empregando dextranase de *P. lilacinum*, os pesquisadores Aslan e Tanriseven (2007) imobilizaram a enzima em Eupergit C, obtendo maior resistência da enzima a variações de pH e temperatura. Após 20 dias de armazenamento, 90% de atividade foi mantida sob refrigeração. As enzimas imobilizadas tem sido amplamente estudadas, podendo aumentar a resistência da enzima à variações mais severas do ambiente, além de poderem ser reutilizadas. No entanto, este procedimento de imobilização exige estudo extenso a altos custos.

Em estudos de conservação com outras enzimas, as fitases de macromicetos alcançaram os melhores resultados no armazenamento sob congelamento, no entanto, grandes diferenças foram encontradas nas atividades remanescentes dependendo da origem biológica da enzima. *Ganoderma stipitatum* DRL-70 reteve 95% da atividade inicial em 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente (SPIER *et al*., 2012).

3.2 Formulação da enzima dextranase produzida em FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129

3.2.1 Seleção de componentes para formulação de dextranases

Os aditivos alvos deste estudo foram escolhidos de acordo com a sua disponibilidade no laboratório e citação no “Regulamento técnico que aprova o uso de enzimas e preparações enzimáticas”, Anexo III, o qual traz a lista de aditivos e Resolução CN/MS n.4 de 24 de novembro de 1988, a qual estabelece os limites máximos. Os aditivos que não continham limite de adição foram testados na concentração de 5%. A temperatura de incubação foi de 37 ±2°C. Nos estudos de estabilidade acelerada (ou teste de triagem), o objetivo é estudar a influência de compostos em condições estressantes. A duração do estudo é geralmente 15 dias e há diversas faixas de temperaturas sugeridas pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004). A escolha da temperatura de 37°C deve-se ao fato desta enzima ser termossensível. Além disso, a maioria das formulações de dextranase disponíveis tem indicação de armazenamento em geladeira, a 4°C. Não existe uma exigência

quanto à periodicidade deste estudo. Após a incubação, os ensaios foram analisados ao fim dos 15 dias. Os resultados a seguir se referem à atividade residual em relação à atividade inicial, no tempo zero, sem aditivos.

Os efeitos dos aditivos testados na atividade de dextranase constam na FIGURA 2.

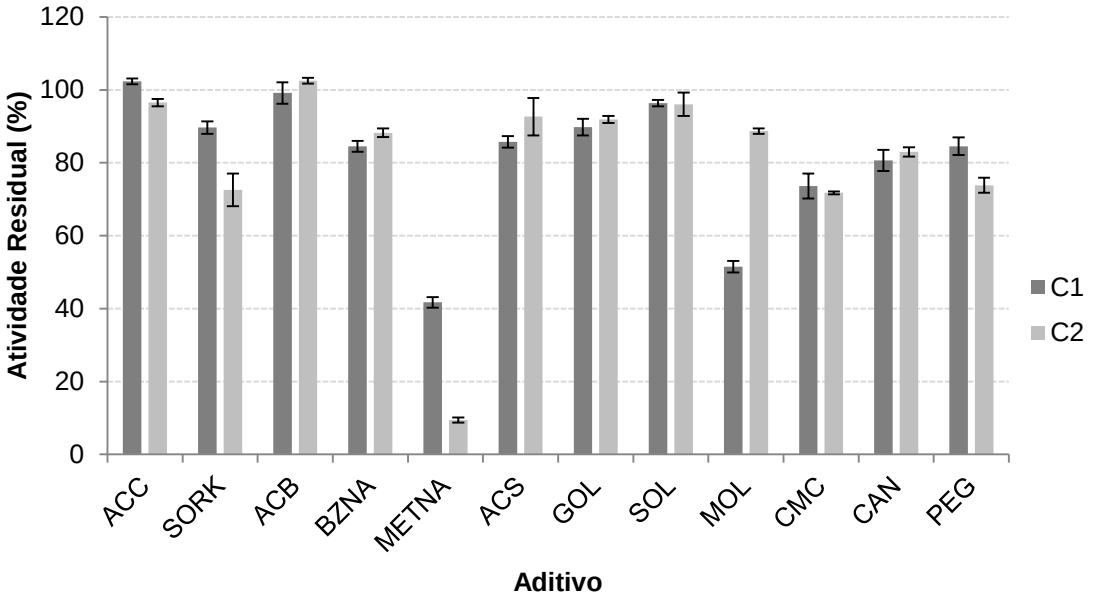

FIGURA 2. EFEITO DOS DIFERENTES ADITIVOS NA ATIVIDADE DA DEXTRANASE. A PRIMEIRA COLUNA REPRESENTA O EFEITO DA MEIA CONCENTRAÇÃO [C1] E A SEGUNDA REPRESENTA A MÁXIMA CONCENTRAÇÃO PERMITIDA [C2].
ACC – ácido cítrico, SORK – sorbato de potássio, ACB – ácido benzoico, BZNA – benzoato de sódio, METNA – metabissulfito de sódio, ACS – ácido sórbico, GOL – glicerol, SOL – sorbitol, MOL – manitol, CMC – carboximetilcelulose, CAN – citrato de sódio, PEG – polietilenoglicol 400.

A ANOVA gerada aponta que o efeito da concentração não é significativo (p=0,4117). Por este motivo, para estudos posteriores, a concentração [C], a qual corresponde à metade da concentração máxima da legislação brasileira, foi escolhida. O efeito entre os diferentes aditivos, porém foi significativo e o pós-teste Tukey foi aplicado. O pior aditivo empregado foi METNA (metabissulfito de sódio). Embora seja o aditivo de menor concentração, seus efeitos foram bastante prejudiciais à estabilidade da dextranase, alcançando no fim do experimento de 41,72±1,45 na concentração [C] e 9,46±0,2 na concentração [2C]. Os melhores aditivos na conservação da atividade da dextranase, com a concentração [C] foram ACC (ácido cítrico) com 102,32%±0,79, ACB (ácido benzoico) com 99,14%±2,97, SOL (sorbitol) com

96,35%±0,89 de manutenção da atividade após incubação. GOL (glicerol) conservou 89,79%±2,30 da atividade inicial. ACC, ACB e SOL não apresentaram diferenças significativas entre si no pós-teste Tukey. Para estudos posteriores foram escolhidos os aditivos ACC, ACB, GOL e SOL por apresentarem os melhores efeitos protetores da atividade da dextranase.

O glicerol já foi relatado como excelente aditivo na conservação de enzimas, como catalase, com efeito termoprotetor (COSTA et al., 2002); transglutaminase (BOURNEOW *et al*, 2012) a 20% (m/v), porém, este estudos foram conduzidos por períodos curtos (até 24 h) e em concentrações muito altas do aditivo.

Os aditivos ácido cítrico e ácido benzoico tinham sido inicialmente selecionados para este estudo para atuar como conservantes na formulação. No entanto, seus efeitos na atividade da enzima foram melhores do que muitos aditivos considerados estabilizantes. A ANVISA classifica os aditivos alimentares em grupos de funções especificas, porém, muitas vezes um componente pode abranger mais de uma função dentro da classificação. O ácido cítrico é um acidulante, comumente empregado na indústria alimentícia como agente anti-escurecimento e acidulante. Em uma patente de 2011, os autores descrevem diversos processos assegurando a extensão da vida útil de enzimas para formulação de detergentes, produtos de higiene, entre outras aplicações, pelo uso conjugado de três componentes: (a) um ácido hidroxi-poli-carboxílico com dois ou três grupos carboxilas, (b) um componente contendo boro e (c) um sal de cálcio. O autor reforça que o ácido preferido (a) é o ácido cítrico. Estes componentes devem ser usados em formulações líquidas contendo enzimas de 0,001 a 25%. Proteases, lipases e outras enzimas presentes nessas formulações variam muito quanto à estabilidade final. Os testes de estabilidade avaliam a resistência das formulações quanto aos ciclos de lavagem (LENOIR, 2011).

Considerando as propriedades antioxidantes do ácido cítrico, provavelmente a sua ação está associada à proteção estrutural de alguns elementos da proteína. Iyer e Ananthanarayam (2008) discutem diversos fatores associados à perda de atividade em enzimas e destacam que a oxidação age diretamente em grupos funcionais como cisteína, metionina e triptofano. O resultado da oxidação desses grupos pode levar à inativação pelo

desarranjo da estrutura. Embora não elucidada a presença destes grupos na dextranase produzida pela FES por *P. aculeatum*, o ácido cítrico pode combater o efeito oxidante, preservando por um tempo mais longo a estabilidade estrutural da dextranase produzida.

O experimento controle, sem aditivos, apresentou 69,96% de atividade após o fim deste experimento. Por este fato, metabissulfito e manitol apresentaram desempenhos que prejudicaram a enzima ao longo do teste. Em um estudo do efeito protetor de PEG, quando covalentemente ligado à dextranase, este aditivo teve excelente efeito estabilizante na ação de dextranases em ambientes intracelulares quando comparado à enzima livre. No entanto, este estudo teve a finalidade de aplicação clínica e a dextranase foi modificada pelo PEG (MUMTAZ e BACHAWAT, 1994).

O pH final de todos os experimentos variou de 5,03 a 5,29, com exceção do ACC. Como a extração enzimática foi feita em tampão, estas pequenas variações de pH causadas pelos aditivos não pareceram ter efeitos significativos ao longo do experimento. O pH final dos experimentos com ACC teve grande efeito de variação de pH, e a média final foi de 4,54. Visto que este aditivo foi um dos melhores na preservação da atividade enzimática, esta leve acidificação teve um efeito entre benéfico e nulo ao longo do tempo.

3.2.2 Estudo de interação dos componentes da formulação da enzima dextranase

Os melhores aditivos testados na etapa de seleção (ácido cítrico, ácido benzoico, sorbitol e glicerol) foram combinados neste segundo experimento para avaliar as respostas de suas combinações.

Os resultados da ANOVA (R^2 0,814) mostram grande variação nas respostas obtidas (TABELA 4). O experimento controle equivale ao ensaio 8, no qual não há aditivos, o qual alcançou ao fim do experimento 67,9 % da atividade inicial, bastante semelhante ao experimento controle anterior. Algumas combinações entre os aditivos pré-selecionados não foram vantajosas se for considerar os seus usos em separado. A pior combinação testada foi de ACB e GOL (ensaio 5), alcançando apenas 82,5%. Em relação ao controle estes efeitos foram obviamente protetores, porém, utilizados de forma

conjugada alcançaram respostas piores que os índices de preservação obtidos quando usados separadamente. O uso de todos os aditivos combinados (ensaio 1) preservaram 93,5% da atividade inicial nas concentrações máximas e 85,7 a 87,1 quando adicionados na metade desta concentração (controles). Estas respostas mostram um padrão complexo de interação entre os diferentes aditivos, assim como os efeitos da concentração.

TABELA 4. ATIVIDADES RESIDUAIS DE DEXTRANASE COM A COMBINAÇÃO DOS DIFERENTES ADITIVOS E SEUS NÍVEIS CODIFICADOS

	Aditivos				Atividade Residual
Ensaio	ACC	ACB	GOL	SOL	(%)
1	1	1	1	1	93,521
2	1	1	-1	-1	90,338
3	1	-1	1	-1	89,350
4	1	-1	-1	1	99,540
5	-1	1	1	-1	82,515
6	-1	1	-1	1	83,282
7	-1	-1	1	1	84,251
8	-1	-1	-1	-1	67,916
9 (C)	0	0	0	0	86,979
10 (C)	0	0	0	0	87,110
11 (C)	0	0	0	0	85,746

O ensaio 4, combinando ácido cítrico e sorbitol reteve 99,54% da atividade inicial após 15 dias de incubação. A análise de Pareto (FIGURA 3) resultante resume os resultados dos experimentos e evidencia efeito significativo de ACC e SOL na proteção da atividade enzimática, nas concentrações estudadas (0,04 a 0,26% para ACC e 0,74 a 4,26 para SOL).

As respostas obtidas mostram que as diferentes combinações levam a respostas variáveis ao longo do tempo, as quais são extremamente sensíveis a pequenas variações de concentração. Também pode ser considerado que a ação conjunta desses aditivos modifica a concentração osmótica do meio em diferentes níveis. Em artigos que discutem as possíveis formas de ação dos aditivos, a força iônica e atividade de água estão fortemente relacionadas como as mais importantes na conservação estrutural da enzima. Os aditivos também podem proteger a molécula da deformação, interagindo diretamente com a

proteína, uma vez que esses componentes podem “ocupar” espaços das cadeias da estrutura proteica, servindo como uma rede que mantém a estrutura firme e ativa (IZUTSU *et al*., 1991; CIOCI, 1995 ; GULLA *et al*., 2004).

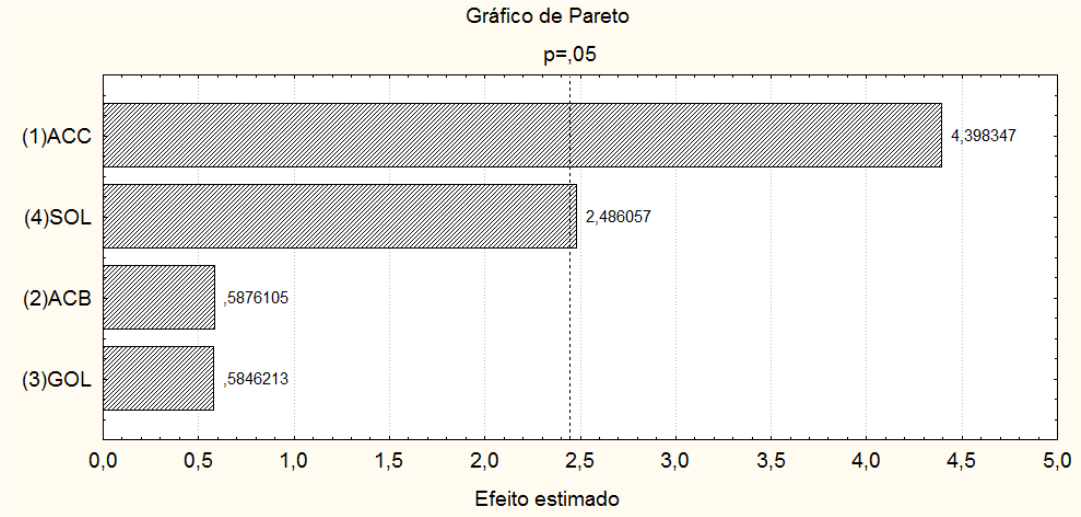

FIGURA 3. GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS SIGNIFICATIVOS DOS ADITIVOS ACC E SOL NA CONSERVAÇÃO DA ATIVIDADE DE DEXTRANASE.

Na patente de Vidra e Nachtigal (1979), uma composição oral de pasta de dente contendo dextranase contém sorbitol na formulação na proporção de 74,24% (m/v), no entanto, os efeitos estabilizantes da fórmula são atribuídos à presença de sais de cálcio e magnésio e o sorbitol é adicionado como adoçante. Os íons cálcio e magnésio possuem ação estabilizante e aumentam a atividade da enzima. São empregados na fórmula (m/v): carbonato de cálcio 5%, fosfato de cálcio bi hidratado 46,75%; cloreto de magnésio tetrahidratado 0,20%. Em ensaio controle estas adições aumentam de 5 a 14 vezes a atividade da enzima e a estabilidade em 9 semanas foi de 86% da atividade inicial da enzima é retida.

Em estudo sobre a adição de diferentes produtos (WANG *et al*.,2014) à dextranase de *Arthrobacter oxydans*, vários açúcares foram testados, entre eles glicose, sacarose, maltose, lactose,dextrina, gelatina e sorbitol. O último propiciou um melhor desempenho e foi adicionado em altas concentrações (10-19%) num segundo experimento. A concentração de 13% foi a melhor condição, alcançando atividade residual de 58% a 55°C por 30 minutos, 8% a mais que o controle, sem aditivos. No mesmo estudo, foram testados polióis

(glicerol, etanediol e PEG), apresentando efeitos positivos com aumento de até 40% na proteção da enzima com etanediol 10%. No entanto, este aditivo foi desconsiderado por seu caráter tóxico e para outros experimentos foi utilizada a glicerina. Em experimento final com os melhores resultados, as concentrações finais da fórmula foram: glicerol 16%; acetato de sódio 18% e citrato de sódio 16%. Também foram acrescentados os antissépticos ácido p-hidroxi benzóico 0,05%; isoascorbato de sódio 0,03%; e sorbato de potássio 0,05%. Após 13 semanas, incubando-se a fórmula a 25 e 37 °C, as atividades residuais finais foram 70,8 e 28,96%, respectivamente.

3.2.3 Teste final da formulação da enzima dextranase

Os melhores aditivos de efeito significativo na preservação da atividade dextranásica, ácido cítrico e sorbitol, foram combinados em um experimento para avaliar os efeitos de suas concentrações. Os resultados obtidos originaram a superfície de resposta mostrada na FIGURA 4.

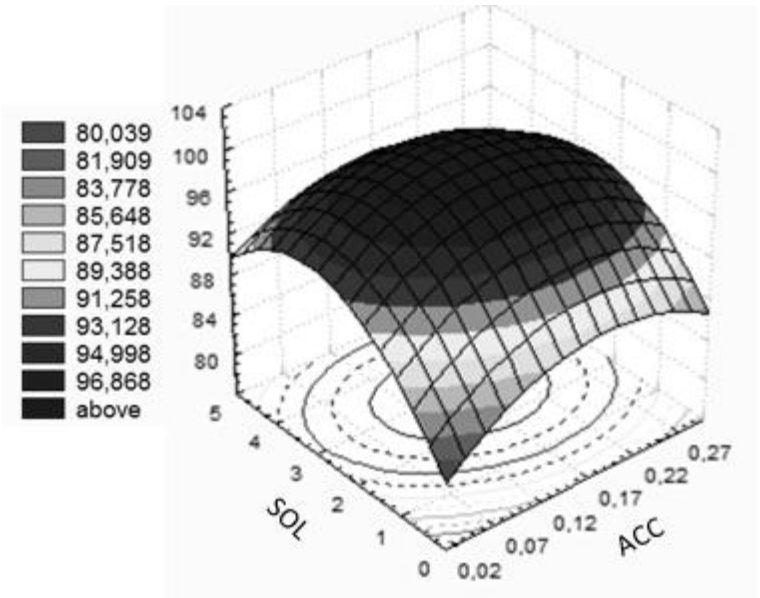

FIGURA 4 . SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA A PARTIR DO DCCR DELINEADO PARA O ESTUDO DAS CONCENTRAÇÕES FINAIS DOS ADITIVOS ACC E SOL NA FORMULAÇÃO DA ENZIMA DEXTRANASE

Neste experimento final, as concentrações de ACC e SOL foram ampliadas para faixas mais abrangentes, dentro dos valores máximos

permitidos. As faixas estudadas foram 0,04 a 0,26% para o ácido cítrico e 0,74 a 4,26 para sorbitol. Os resultados mostram uma boa adequação do modelo (R^2 0,801) de equação:

$$z= 76,01 + 113,67\ x - 299,52\ x^2 + 9,32\ y - 1,50\ y^2 - 4,76\ x\ y$$

onde x representa a concentração de ácido cítrico, y corresponde à quantidade de sorbitol e z é a % de atividade enzimática residual.

Todos os termos, lineares, quadráticos e de interação foram considerados. O ponto de máxima atividade residual é combinação da concentração 2,83% para sorbitol (y) e 0,17% para ácido cítrico (x). Desta forma, o modelo prevê que nas condições ótimas as atividades de dextranase devem permanecer acima de 96% durante os primeiros 15 dias de incubação a 37°C. Esta condição reflete uma realidade estressante para a enzima. Em geral, as enzimas de formulação líquida são conservadas a 4°C. Este prazo, portanto, deve ser estendido para melhor avaliação do efeito protetor destes aditivos na conservação da atividade dextranásica.

Os efeitos avaliados nestes estudos são específicos para a enzima e condições testadas. A falta de padronização dos estudos de estabilidade em estudos científicos dificulta a comparação real dos efeitos, visto que os protocolos variam quanto às temperaturas praticadas, tempo de avaliação, concentrações dos aditivos e a própria natureza da enzima. Embora exista essa diversidade de informações não uniformes, é interessante notar que os polióis são, de forma geral, aqueles que apresentaram os melhores desempenhos na conservação das enzimas submetidas ao estresse. Segundo Gulla *et al*. (2004), a diminuição na desnaturação da enzima pelos polióis está relacionada à manutenção da força iônica da enzima, mantendo a estrutura terciária e consequentemente preservando o seu sítio catalítico.

3.3 Estudo comparativo do extrato de dextranases com aditivos e sem aditivos

A formulação final das enzimas dextranases com os aditivos selecionados em suas concentrações ótimas foram avaliados em duas formas

de armazenamento, em temperatura ambiente (A), sujeito a variações, e sob refrigeração (R) por 120 dias. Cada forma de armazenagem teve um grupo controle, denominados CA o controle sem aditivos incubados em temperatura ambiente e CR o controle sem aditivos incubados sob refrigeração.

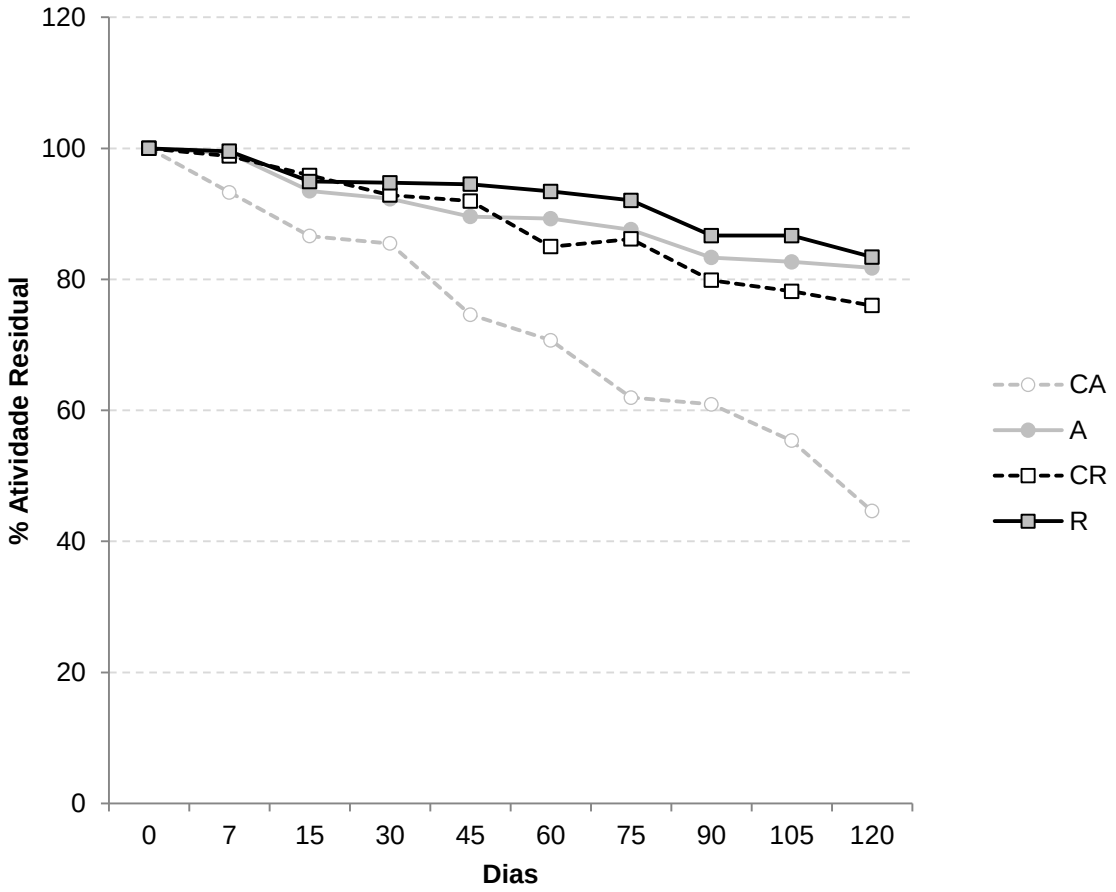

FIGURA 5. ATIVIDADE DEXTRANÁSICA RESIDUAL COMPARANDO AMOSTRAS FORMULADAS COM ADITIVOS (A) E (R) E NÃO-FORMULADAS (CA) E (CR)

Ao fim do experimento, as atividades remanescentes finais foram CA 44,61%, A 81,73%, CR 76,01%, R 83,39%. É clara a proteção da enzima conferida pelo uso dos aditivos. Na comparação do resultado final, o grupo formulado (a) propiciou 83,21% a mais de atividade enzimática que o controle CA. O grupo formulado refrigerado obteve 9,72% a mais de atividade residual que o grupo controle. Até 30 dias de avaliação, R, CR e A foram comparáveis quanto às atividades residuais, de 92,30 a 94,73%. Após este período, o CR, o qual não possuía aditivos acentuou a queda de atividade quando comparado às amostras formuladas. De forma geral, o estudo da dextanase FES mostrou grande diferença na proteção da atividade da enzima com e sem aditivos na

condição ambiente, enquanto na condição refrigerada o aditivo não teve grande diferença, pois o armazenamento sob refrigeração já é um fator de grande contribuição na conservação da enzima.

Na comparação do estudo que determinou as concentrações da fórmula, ao fim de 15 dias em condições aceleradas, os componentes da fórmula levaram à uma estabilização da enzima em 99,5%. Este resultado não foi alcançado nem em incubação ambiente e nem sob refrigeração.

Em experimento anterior, com extrato bruto, ao fim de 120 dias, o valor de atividade residual foi de apenas 35,39%. Estas amostras são suscetíveis às variações do ambiente, os lotes de produção são diferentes, e a amostra incubada com a formulação foi concentrada e ultrafiltrada, o que pode fundamentar as diferenças entre os resultados. De forma geral, após processos de purificação, as enzimas ficam mais suscetíveis que em sua forma natural, porém, neste estudo, as etapas empregadas afetaram a estabilidade enzimática de forma positiva. Na comparação entre as amostras refrigeradas, as atividades residuais foram de 59,53% no estudo de estabilidade do extrato bruto e o controle refrigerado sem formulação atingiu 76,01%. Novamente, a purificação e concentração favoreceram a estabilidade da dextranase.

Em um estudo de viabilidade de aplicação de dextranases comerciais em fábrica de açúcar (EGGLESTONE e MONGE, 2005), fórmulas concentradas e não-concentradas foram armazenadas por 90 dias em temperatura ambiente, sujeito a variações de temperatura, condição julgada mais provável em uma situação industrial real. Ao fim do experimento, as fórmulas concentradas (Brix 41,96-45,13°) perderam apenas 9% da atividade inicial, enquanto as não-concentradas (Brix 26,57-37,45°) perderam 46%. Em paralelo também foram guardadas amostras das duas fórmulas sob refrigeração (4°C) e as fórmulas concentradas quase não perderam atividade após 150 dias de armazenamento, enquanto as não-concentradas continuaram a ter perdas significativas (resultados não mostrados). Considerando estas características, a enzima concentrada seria mais vantajosa economicamente por ter um tempo de prateleira mais longo, enquanto a não concentrada exigiria um acompanhamento rotineiro da manutenção desta atividade antes da aplicação. No entanto, não há conhecimento dos componentes das fórmulas. O °Brix considerado também pode tanto estar associado à presença de mais

dextranase na fórmula, como maior concentração de aditivos. Outros autores também reforçam que as fórmulas concentradas preservam por um tempo mais prolongado as atividades enzimáticas, pois as fórmulas aquosas são mais suscetíveis à ações desnaturantes (IYER e ANANTHANARAYAN, 2008; *Pierce Biotechnology Inc*., 2005).

A relação entre os dois estudos ressalta a importância dos aditivos na conservação da atividade de dextranase armazenadas em condição ambiente. Os dois estudos também concluem que as formas de enzimas concentradas possuem maior estabilidade que as enzimas de menor concentração.

4 CONCLUSÕES

Os delineamentos fatoriais foram uma ferramenta excelente nos estudos de formulação da nova enzima dextranase produzida por FES, pois diferentemente da maioria dos estudos, avaliou as interações entre os componentes da fórmula. Dentre vários aditivos testados, ácido cítrico e sorbitol foram os que alcançaram os melhores desempenhos. As concentrações finais desses aditivos foram 0,17 e 2,83%, respectivamente, acrescentados ao extrato enzimático concentrado. Com esta condição, a conservação da enzima ao fim do experimento de estabilidade acelarada foi de 99,54% após 15 dias. Na comparação entre a dextranase produzida por FES com e sem aditivos, as amostras incubadas em temperatura ambiente conservaram 83,21% a mais a atividade da enzima do que o controle sem aditivos.

REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.portal.anvisa.gov. Acesso em 31/03/2014.

ANVISA. Séries Temáticas. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 2004

ASLAN, Y.; TANRISEVEN, A. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharides from dextran. Biochemical Engineering Journal 34: 8–12, 2007.

BOURNEOW, C.; BENJAKUL, S.; H-KITTIKUN, A. Impact of some additives on the stability of microbial transglutaminase from Providencia sp. C1112. As. **J. Food Ag-Ind.** n.5, v.03, p. 226-233, 2012.

CIOCI, F. Thermostabilization of erythrocyte carbonic anhydrase by polyhydric additives. **Enzyme and microbial technology.** v. 17, p. 592-600, 1995.

COLACINO, F.; CRICHTON, R. R. Enzyme thermostabilization: the State of Art. Biotechnology and Genetic. **Engineering Reviews.** v. 14, p. 211-277, 1997.

COSTA, S. A.; TZANOV, T.; CARNEIRO, A. F.; PAAR, A.; GÜBITZ, G. M., CAVACO-PAULO, A. Studies of stabilization of native catalase using additives. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 30, p. 387–391, 2002.

EGGLESTONE, G.; MONGE, A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. **Process Biochemistry**, n.40, p.1881–1894, 2005.

FU, D.; LI, C.; LU, J. ; RAHMAN, A. ; TAN, T. Relationship between thermal inactivation and conformational change of *Yarrowia lipolytica* lipase and the effect of additives on enzyme stability. **Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic**. v. 66, p. 136–141, 2010.

GULLA, K. C.; GOUDA, M. D.; THAKUR, M. S.; KARANTH, N G. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, p. 621–625, 2004.

HARRIS, E. L. V. ; ANGAL, S. **Protein purification methods:** a practical approach. Oxford: IRL Press, 1989.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAM, L. Enzyme stability and stabilization. Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, 43:1019-1032, 2008.

IZUTSU, K.; YOSHIOKA, S.; TAKEDA, Y. The effects of additives on the stability of freeze-dried P-galactosidase stored at elevated temperature. **International Journal of Pharmaceutics.** v.71, p. 137-146, 1991.

LENOIR, Pierre. Enzyme stabilization. US n. 7928052 B2. 19 abr 2011. Disponível em: http://www.google.com/patents/US7928052. Acesso em: 02/04/2014.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**. 31:426-428, 1959.

MUMTAZ, S.; BACHHAWAT, B. K. Enhanced intracellular stability and efficacy of PEG modified dextranase in the treatment of a model storage disorder.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1199, p. 175–182,1994.

ÖLÇER, Z.; TANRIVESEN, A. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in alginate. **Process Biochemistry,** 45:1645–1651, 2010.

PIERCE BIOTECHNOLOGY Inc., Rockfold, IL, USA. Technical Resource. Protein stability and storage. 2005.

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; PLESZCZYHKA, M.; FIEDUREK, J. Immobilisation and kinetics of *Penicillium notatum* dextranase on controlled porous glass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 3:271-283, 1997.

SPIER, M. R.; SALMON, D. N. X.; BINATI, L. C. P.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C R. Stability of New Macromycetes Phytases under Room, Cooling and Freezing Temperatures of Storage. World Academy of Science. **Engineering and Technology**. v. 67, p. 427-431, 2012.

VIDRA, J. D.; NACHTIGAL, J. H. Oral composition containing dextranase. US n. 4140758. 1979.

WANG, D.; LUB, M.; WANG, X.; JIAO, Y.; FANG, Y.; LIU, Z.; WANG, S. Improving stability of a novel dextran-degrading enzyme from marine *Arthrobacter oxydans*. **Carbohydrate Polymers.** 103: 294– 299, 2014.

WEIJERS, S. R.; RIET, K. V. Enzyme stability in downstream processing. Part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization. **Biotech. Adv**. 10:237-249, 1992.

CAPÍTULO V
ESTUDOS DE APLICAÇÃO DA ENZIMA DEXTRANASE EM INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

RESUMO

A dextranase de *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 produzida por FES com bagaço de malte foi produzida em condições otimizadas, parcialmente purificada, concentrada e aplicada em caldo de cana para a sua avaliação na remoção de dextrana no caldo. A aplicação da enzima na concentração de 3,5 U em 100 mL de caldo degradou 70% da dextrana inicial presente em apenas 10 minutos. A comparação entre a dextranase produzida por FES e a dextranase comercial alcançaram desempenhos comparáveis quando testadas nas mesmas condições. A aplicação de apenas 5 U de dextranase FES hidrolisou 44% mais dextrana que a enzima comercial testada nas mesmas condições. Os parâmetros cinéticos determinados para a dextranase FES foram V_{max} 11,89±0,47 e K_m 4,2±0,27. A dextranase obtida pelo novo bioprocesso obteve sucesso na hidrólise de dextrana em caldo de cana e é uma alternativa com potencial de aplicação na indústria sucroalcooleira por alcançar desempenho comparável à dextranase comercial. As características da enzima permitem a sua aplicação no processo de forma efetiva e satisfatória.

Palavras-chave: *Penicillium aculeatum*, dextranase, dextrana, indústria sucroalcooleira, açúcar

1 INTRODUÇÃO

A importância econômica da indústria açucareira no Brasil iniciou-se com a exploração europeia das Américas. O açúcar era na Europa anterior a 1500 um artigo raro, de uso exclusivo das elites, considerado exótico e trazido através de longas viagens desafiadoras ao oriente. No século 16, Portugal e Espanha iniciaram o plantio da cana-de-açúcar e as atividades industriais em suas colônias na América do Sul e Central. A expansão da produção para larga escala tornou esta iguaria acessível às massas (*Fairtrade Foundation*). Desde esta época, o cenário econômico e social modificou-se grandemente, e esta atividade, herdada da exploração, hoje é um setor rentável e em avanço (UNICA, 2013).

O principal centro da produção de cana no Brasil atualmente é o estado de São Paulo. O grande parque tecnológico na região de Sertãozinho gera milhões em produtos, equipamentos, suporte técnico e serviços exclusivos para o setor. O açúcar agora divide atenção com o setor energético, devido à importância alcançada pelo etanol e a cogeração de energia das usinas. As indústrias sucroalcooleiras hoje são biorrefinarias, as quais produzem uma diversidade de produtos, subprodutos e energia em apenas uma planta industrial.

Embora no Brasil o processamento da cana-de-açúcar divida atenção com o etanol e bioenergia, o açúcar mantém o Brasil como o maior exportador mundial há anos. De acordo com USDA, a produção brasileira para a safra de 2013/14 está estimada em 38,8 milhões de toneladas com mix de 47%. O ano de 2013 foi especialmente difícil para o mercado brasileiro, devido a um incêndio no mês de outubro no Porto de Santos, o qual destruiu o açúcar pronto para o carregamento. Os prejuízos também afetam a logística e alguns reparos ainda estão em andamento. Também em 2013 uma temporada chuvosa afetou plantações e muitos produtores não atingiram as suas metas de moagem de cana (UNICA, 2013).

A tecnologia envolvida neste setor alcançou altíssimos níveis de rendimentos e lucros nos últimos anos, mas existem ainda muitos desafios na expansão deste negócio. Muitos produtos e soluções têm sido desenvolvidos

para atender as demandas do setor e, certamente, existem vários campos a serem conquistados por inovações.

As enzimas dextranases têm como principal aplicação o controle da contaminação por dextrana no processo sucroalcooleiro. Na maioria das usinas, esta enzima não é aplicada, devido aos altos custos, falta de conhecimento dos benefícios ao processo, além da falta de padronização dos protocolos de aplicação (EGGLESTONE e MONGE, 2005). De forma geral, as enzimas comerciais estão disponíveis em fórmulas bastante concentradas e os custos de aplicação podem ser acessíveis se houver uma dosagem adequada do produto. O uso de dextranases propõe não apenas o alcance de um produto de qualidade, mas também solucionar parte dos problemas industriais causados pelo excesso de dextrana.

O objetivo deste trabalho foi aplicar o extrato enzimático de dextranases em um processo sucroalcooleiro para superar problemas e transtornos causados pela dextrana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato enzimático de dextranase para os estudos de aplicação

O extrato contendo a enzima foi obtido por FES em condições otimizadas descritas anteriormente. Após a fermentação, 5 g do fermentado foram homogeneizados com agitador magnético por 10 minutos com 50 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5. A mistura foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1, centrifugado e ultrafiltrado em conjunto Pellicon 2 (Millipore) em cartuchos do tipo cassette de 10 kDa. Este extrato de enzima concentrado foi utilizado nos estudos de aplicação.

2.2 Determinação de atividade de dextranase

A atividade da dextranase foi medida pela incubação de 0,5 mL de dextrana T2000 (Sigma) 2% (m/v) em tampão acetato de sódio pH 5 incubados juntamente com 0,5 mL da enzima diluída. Após 20 minutos de incubação a 50°C foi adicionado DNS e a mistura levada à ebulição por 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 3,5 mL de água e o conteúdo homogeneizado. Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para hidrolisar dextrana equivalente 1 µmol de maltose por minuto nas condições mencionadas.

2.3 Determinação da dextrana total

A quantidade de dextrana em caldo de cana foi medida pelo método rápido (CLARKE *et al*., 1987). Esta técnica é uma adaptação dos autores para o método original de Roberts (ROBERTS, 1981).

2.4 Efeito da massa molecular da dextrana na quantificação pelo método rápido

Diferentes dextranas (Sigma MW 10, 17, 150, 500, 2000, 5000 KDa) foram adicionadas ao caldo de cana, homogeneizadas e analisadas pelo método rápido (descrito no subitem 2.3) para observar o comportamento da resposta analítica. A quantidade de dextrana inicial foi descontada.

2.5 Avaliação do potencial de aplicação da dextranase produzida em FES por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 no processo sucroalcooleiro

Os experimentos foram conduzidos em laboratório industrial de uma usina sucroalcooleira do Estado do Paraná.

Todos os estudos foram realizados em caldo de cana com dextrana 100% natural e os conteúdos iniciais e residuais de dextrana medidos pelo método rápido. O caldo de cana para análise foi coletado em condições específicas: após longo período de chuva, na saída da moenda e com dextrana natural. O caldo de cana foi filtrado antes das análises para eliminar contaminantes sólidos.

2.5.1 Estudo do efeito da concentração da dextranase de FES no tratamento enzimático do caldo da cana

Às amostras de caldo de cana com dextrana foram adicionadas diferentes quantidades da enzima dextranase FES (0,35 a 14 U) produzida por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 diluídas em tampão acetato de sódio 50 mM a pH 5, e incubados a 50°C. As amostras foram retiradas do banho aos 20 minutos e levadas à ebulição por 3 minutos para inativar a enzima.

A enzima diluída (1 mL) foi adicionada ao caldo (100 mL) em copos de Becker cobertos com folha de alumínio. Para o controle foi utilizada água deionizada ao invés da enzima. A quantidade total (U) foi determinada de acordo com o descrito em 2.2

2.5.2 Estudo da influência do tempo no tratamento enzimático de caldo de cana com dextranase produzida por FES

Às amostras de caldo de cana (100 mL) com dextrana foi adicionada a enzima dextranase (1 mL) concentrada e a mistura foi incubada a 50°C em banho-maria. Para o controle (tempo 0) foi adicionada água deionizada ao invés da enzima.

Após incubação, as amostras foram retiradas do banho aleatoriamente, em triplicata, em diferentes tempos (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos) e levadas à ebulição por 3 minutos para inativar a enzima.

2.5.3 Comparação da dextranase produzida neste trabalho com dextranase comercial no tratamento enzimático do caldo de cana

2.5.3.1 Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas a serem testadas

Antes do teste comparativo da ação das duas enzimas sobre a dextrana presente no caldo de cana, uma produzida neste trabalho e enzima dextranase comercial, foi preciso avaliar os parâmetros cinéticos de ambas. Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram obtidos após ensaio enzimático em diferentes concentrações de substrato dextrana T2000 (Sigma), variando de 1,5 a 5% (m/v).

A enzima comercial utilizada é produzida por *Chaetomium erraticum* (Sigma – proveniente de Novozymes Corp.) e foi diluída para conter uma quantidade de U equivalente à da enzima FES.

Ambas as enzimas foram incubadas e determinadas sob as mesmas condições. A linearização pelo método de Lineweaver-Burk foi realizada pelo GraphPad Prism® 3.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

2.5.3.2 Tratamento enzimático do caldo de cana com o uso de enzima comercial e de enzima produzida

As duas soluções de enzimas foram analisadas quanto à atividade dextranásica conforme descrito no item 2.2 deste trabalho. A enzima produzida por FES com bagaço de malte por *Penicillium aculeatum* foi processada conforme descrito no item 2.1. A enzima comercial utilizada foi a Dextranase Sigma produzida por *Chaetomium erraticum*.

Após a determinação da atividade enzimática, ambas as soluções foram diluídas em tampão acetato de sódio pH 5 (50 mM) de forma a se obter uma solução de dextranases com a mesma quantidade de unidades totais (U).

As amostras de caldo de cana com a mesma concentração de dextrana foram incubadas a 50°C na presença das duas enzimas para avaliação da reação enzimática promovida e comparação de suas performances. As reações enzimáticas foram interrompidas levando-se as amostras à ebulição. Foram avaliados diferentes tempos de incubação: 5, 10, 20 e 30 minutos.

Após o tratamento enzimático, a concentração de dextrana residual presente nas amostras de caldo foi analisada pelo método descrito no item 2.3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Visão geral dos testes de desempenho da enzima dextranase produzida em usina sucroalcooleira

Os experimentos foram realizados em uma usina sucroalcooeira no estado do Paraná, denominada Usina X, durante os meses de setembro e outubro de 2013. Assim como a maioria das usinas, esta também não utiliza dextranases no tratamento enzimático do caldo da cana, embora frequentemente seja detectada a presença dextrana.

Especialmente em meses chuvosos, é esperado um aumento da concentração de dextrana. Os transtornos causados pela dextrana no processo já foram discutidos (CAPÍTULO I) e estão relacionados a diversos fatores de gestão, clima, qualidade da cana, higiene, entre outros. De acordo com a UNICA, nos primeiros dias de outubro de 2013 houve queda de 17,95% na moagem em relação ao mesmo período do ano anterior.

Visando o estudo da aplicação da enzima dextrana produzida neste trabalho e a dextranase comercial, foram escolhidos meses chuvosos e de alta pluviometria, condição favorável à alta presença de dextrana no caldo. Os níveis de dextrana foram monitorados constantemente até que fosse atingido um valor considerado alto.

As amostras foram coletadas diretamente dos tanques de mistura após a moagem e os experimentos foram realizados no laboratório industrial. Alguns dados industriais dos boletins de gerenciamento foram fornecidos pela empresa para auxiliar nas avaliações. Os dados a seguir se referem à média de parâmetros industriais de 12 usinas paranaenses diferentes (FIGURA 1).

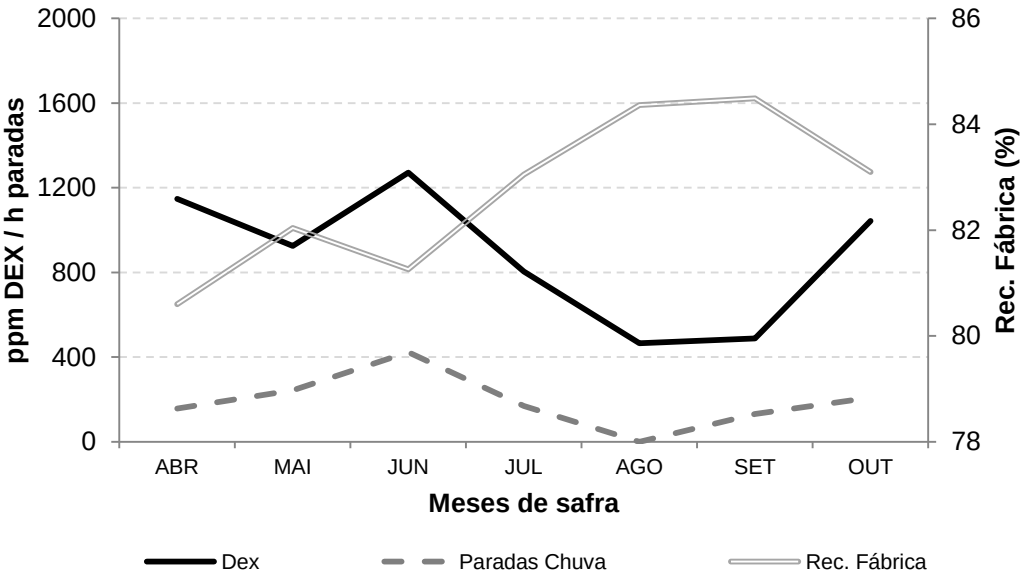

FIGURA 1. MÉDIAS MENSAIS DE DEXTRANA (PPM) E PARADAS POR CHUVA (H) NO EIXO PRINCIPAL E RECUPERAÇÃO DA FÁBRICA DE AÇÚCAR (%) NO EIXO SECUNDÁRIO.

As paradas por chuva mostradas na FIGURA 1 são a soma das horas em que a usina não trabalha devido à chuva. Este parâmetro é importante no gerenciamento, pois é um fator sobre o qual não há controle, diferentemente das paradas por problemas industriais. Fica claro neste gráfico a relação proporcional entre as paradas por chuva e o aumento da presença de dextrana.

Nota-se que a recuperação de fábrica é inversamente proporcional à quantidade de dextrana. A recuperação de açúcar é uma relação de comparação entre as purezas das massas que entram na fábrica (xarope) e a quantidade de resíduo gerado (mel final). (Ver o processo de produção de açúcar – item 7, CAPÍTULO I). Em algumas usinas o caldo de cana é dividido entre a produção de etanol e fábrica de açúcar. Na Usina X, todo o volume de caldo é destinado para a produção de açúcar e apenas o resíduo da fábrica, o mel final, é destinado para a fermentação e produção de etanol. Em situações, quando grandes quantidades de dextrana são detectadas, o processo de cristalização do açúcar fica comprometido e maiores volumes de mel final são gerados e estocados nos tanques de matéria-prima para fermentação. A presença de dextrana está geralmente associada a baixos valores de pureza

do caldo de cana. Tal fato leva ao aumento do tempo de processamento, menos massa (xarope) é convertida em cristal de açúcar e mais mel final é gerado. Há, portanto, uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de dextrana e os rendimentos da fabricação de açúcar.

Como mencionado anteriormente, o período chuvoso foi escolhido para os experimentos. A chuva em excesso afeta as plantações de cana pela formação de lama, que podem causar maior contaminação por micro-organismos do solo (SOLOMON, 2000). O principal micro-organismo contaminante e responsável pela síntese de dextrana é o *Leuconostoc mesenteroides*. (SOLOMON, 2000; EGGLESTONE, 2012). Se a cana é cortada, porém não é colhida e permanece no campo em condições de chuva, a deterioração é acelerada. No período da realização dos experimentos, houve excesso na quantidade de cana cortada, o que levou ao acúmulo de matéria prima no campo exatamente em um período muito chuvoso. A baixa qualidade desta cana resultou em um xarope muito pobre. A taxa de conversão em açúcar foi baixa e os tanques de estoque de mel final ficaram sobrecarregados.

FIGURA 2. PLACAS TROCADORAS DE CALOR OBSTRUÍDAS PELO EXCESSO DE DEXTRANA. FONTE: A autora (2014).

Na reconstituição do mel final em mosto para a fermentação, este mel é resfriado em placas trocadoras de calor, pois sai da fábrica com aproximadamente 70°C e deve chegar para a fermentação a uma temperatura de 30°C. Neste processo de resfriamento, a solubilidade da dextrana é

reduzida. O excesso de dextrana naquele período resultou no acúmulo do polissacarídeo juntamente com outras sujidades, bloqueando as placas do trocador, como registrado na FIGURA 2. A limpeza CIP (*clean in place*) normalmente empregada não é suficiente para remover as obstruções e as placas devem ser abertas para uma higiene adequada. Este procedimento demanda mão de obra e tempo, aumentando os custos desta operação.

Outra condição observada no período da pesquisa de campo foi a queda na qualidade do açúcar produzido. Já é conhecida a alteração no formato dos cristais de açúcar durante o processamento na presença de dextrana, os quais ficam alongados (JIMÉNEZ, 2005). A comparação entre os cristais normais e os cristais formados na presença de altas concentrações de dextrana está mostrada na FIGURA 3.

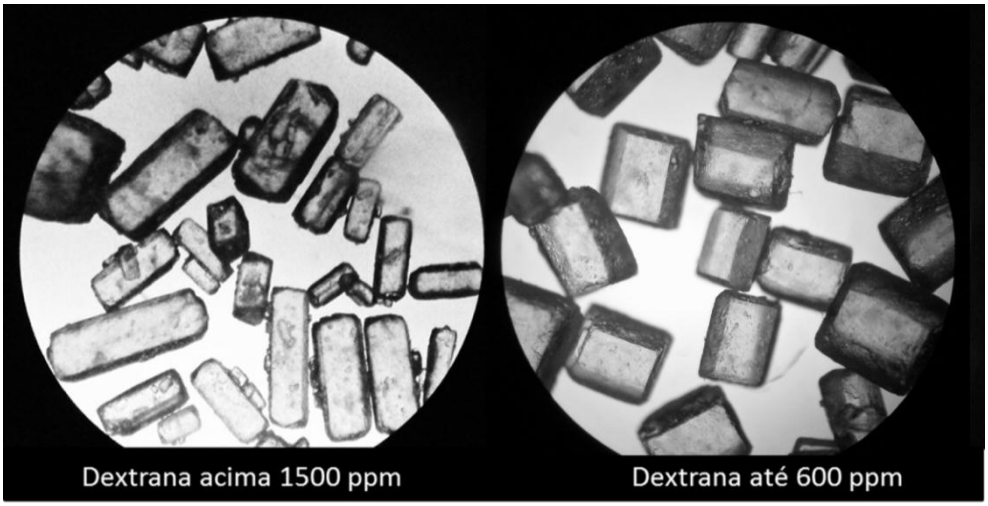

FIGURA 3. CRISTAIS DE AÇÚCAR FORMADOS NA PRESENÇA DE DEXTRANA EM NÍVEIS NORMAIS (< 600 PPM) E NÍVEIS ALTOS (>1500 PPM). AUMENTO 40X. FONTE: A autora (2014).

O açúcar produzido na presença de dextrana é alongado e quebradiço, com aspecto opaco. Na FIGURA 3, à esquerda, os cristais formados na presença de alta concentração de dextrana resultam em cor ICUMSA 1238. À direita, cristais regulares tem cor ICUMSA 937. Observa-se que além da heterogeneidade dos grãos (esquerda.) também existem vários pontos menores aderidos aos cristais grandes, os quais dificultam a purga do mel e

aumentam a cor. A especificação para açúcar VHP determina que a cor ICUMSA seja inferior a 1200 e para açúcar cristal inferior a 300.

Na cristalização em presença de dextrana a lavagem dos cristais para retirada do mel é dificultada, devido à alta viscosidade, deixando residuais de mel nos cristais e aumentando a cor. O residual de mel também aumenta a umidade final, fator que está diretamente relacionada à durabilidade do produto.

No caso do açúcar VHP, o qual é carregado a granel, o açúcar com valor de cor muito alto sofre o BLEND com um açúcar de cor baixa, até que resulte em uma cor média dentro dos parâmetros. Esta operação gera custos e tempo, sendo ideal que não seja necessária esta mistura.

Outros parâmetros como cinzas, umidade e granulometria também são influenciados pela presença da dextrana (e o caldo deteriorado). De forma geral, o açúcar VHP tem faixas de exigência mais largas, sendo tecnicamente mais fácil de atingir os parâmetros estabelecidos que o açúcar cristal branco. Para o açúcar cristal branco, a qualidade da matéria prima entregue é indispensável para obtenção de um produto de qualidade, além de exigir modificações e adequações técnicas.

3.2 Quantificação de dextranas de diferentes massas moleculares pelo método rápido

Dextranas comerciais de massas moleculares conhecidas foram adicionadas ao caldo de cana analisadas pelo método rápido. Existem outros métodos mais específicos para a dosagem de dextrana em caldo, no entanto, este é o método mais empregado nas usinas devido à sua rapidez. Além desta vantagem, outros métodos empregam reagentes de alto custo, como amilases.

Embora as quantidades de dextrana adicionadas fossem as mesmas, a análise pelo método apresentou diferentes respostas (FIGURA 4), na faixa de 1887 a 2072 ppm.

De forma geral, valores maiores foram obtidos com adição de dextranas de maior massa molecular. Quanto maior a massa molecular da dextrana, maior é a viscosidade do caldo e os danos causados ao processo. A sensibilidade do método em atribuir maiores valores às maiores massas

molecular reflete a intensidade dos transtornos potenciais ao processamento e, portanto, proporciona uma estimativa real necessária na tomada de decisões práticas. O parâmetro máximo aceitável de dextrana em caldo é 500 ppm. Acima deste valor, algumas estratégias podem ser colocadas em prática para diminuir o impacto no processo.

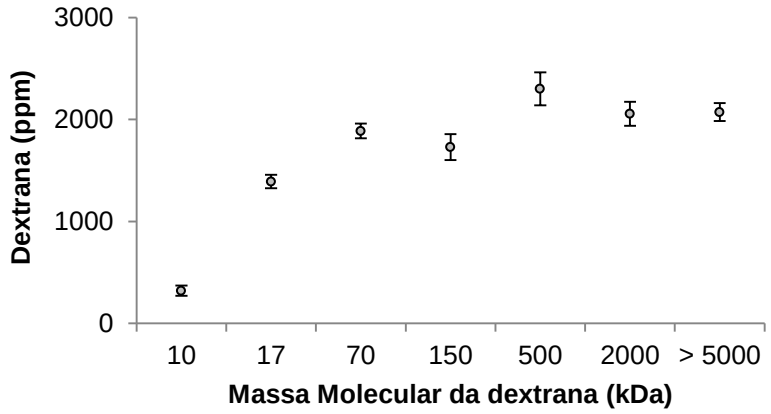

FIGURA 4. RESPOSTAS DA DOSAGEM DE DEXTRANA TOTAL APÓS ADIÇÃO DE DEXTRANAS DE DIFERENTES MASSAS MOLECULARES.

3.3 Estudo do efeito da concentração da dextranase produzida sobre a hidrólise de dextrana do caldo de cana

A aplicação da dextranase produzida neste trabalho, em diferentes concentrações ($U.mL^{-1}$) foi avaliada na remoção de dextrana caldo de cana (FIGURA 5). As diferentes concentrações de dextranase, devidamente diluídas em tampão foram aplicadas no caldo contaminado com dextrana por 20 minutos.

Um excesso de enzima é observado em valores acima de 0,07 $U.mL^{-1}$ mL de caldo. Este resultado pode ser devido à presença de outros polissacarídeos precipitados pelo etanol absoluto no método rápido que não sofrem ação de dextranases. De acordo com os resultados, a aplicação de 0,07 $U.mL^{-1}$ de dextranase no caldo de cana reduziram a quantidade de dextrana inicial em 72%. Com a aplicação de valores maiores, haverá um desperdício de dextranase, uma vez que o residual a partir desta concentração é constante.

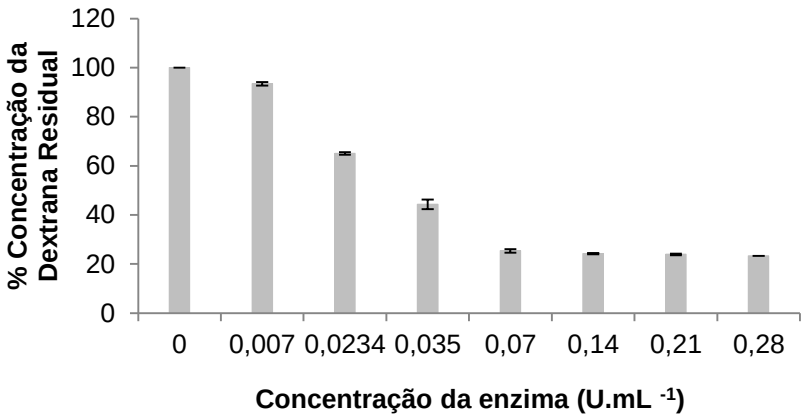

FIGURA 5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE DEXTRANASE FES NA REMOÇÃO DE DEXTRANA EM CALDO DE CANA

3.4 Efeito do tempo no tratamento enzimático de caldo de cana com dextranase produzida

Neste experimento foi avaliado o efeito do tempo na hidrólise de dextrana de caldo de cana de maneira a se determinar qual o tempo necessário para o processo.

A dextranase produzida neste trabalho foi capaz de remover 72% de toda a dextrana presente em apenas 10 minutos. Observa-se na FIGURA 6 que quanto maior o tempo de incubação, maior é a taxa de remoção da dextrana e apenas 10% da dextrana inicial permanece após 60 minutos de incubação.

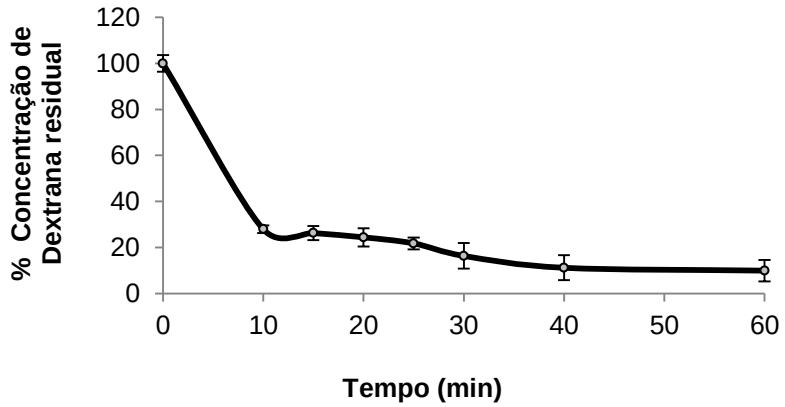

FIGURA 6. EFEITO DO TEMPO DE HIDRÓLISE DE DEXTRANA DO CALDO DE CANA COM DEXTRANASE PRODUZIDA

O resultado final pode ser devido à interferências pela presença de outros polissacarídeos precipitados pelo etanol absoluto no método rápido que não sofrem ação de dextranases. Alguns artigos discutem os métodos disponíveis para análise de dextrana e o método rápido é o mais comumente aplicado, por questões de rapidez e custo. De acordo com Cuddihy e Donald (1999), este método rápido proposto por Clarke *et al*., (1987) não é seletivo para dextrana.

As condições ótimas de aplicação da dextranase produzida foram a concentração de enzima de, 0,07 $U.mL^{-1}$ de caldo de cana durante 10 minutos a 50°C.

Na indústria sucroalcooleira, o tempo de residência e as temperaturas praticadas variam bastante, assim como a concentração de açúcares (°Brix). Na extração do caldo por moenda, 50°C é geralmente a temperatura utilizada na água de embebição. Esta água quente é adicionada aos ternos de moenda para auxiliar na remoção de açúcares das células da cana. O tempo de residência pode variar entre 10 a 20 minutos entre o inicio da extração até o tanque de caldo misto, o que seria suficiente para a ação enzimática, além de praticar os valores ótimos de temperatura da enzima. Portanto, para a aplicação da dextranase não será necessário prever um tanque específico para a hidrólise da dextrana.

Egglestone e Monge (2005) concluíram em seus estudos que a aplicação de dextranases comerciais em caldos é mais efetiva que a aplicação em xaropes e massas. Fato que está de acordo com os resultados prévios de avaliação da dextranase produzida neste trabalho, a qual mostra perda da eficiência enzimática acima de 30°Brix.

3.5 Comparação de desempenho entre dextranase produzida e dextranase comercial

As duas enzimas dextranásicas foram incubadas em caldo de cana com a mesma concentração de dextrana inicial. As enzimas foram analisadas quanto ao seu potencial hidrolítico.

3.5.1 Estudo dos parâmetros das dextranases produzida e comercial

As dextranases produzidas e comercial foram estudadas quanto ao seu comportamento cinético em condições padrão para dextranases. O método de linearização de Lineweaver-Burk foi aplicado para a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$.

TABELA 1. PARÂMETROS CINÉTICOS DETERMINADOS PARA AS DEXTRANASES COMERCIAL E PRODUZIDA NESTE TRABALHO

	Comercial	**Produzida**
V_{max}	10,22±0,41	11,89±0,47
K_m	4,45±0,28	4,20±0,27
R^2	0,9961	0,9958

Os valores de K_m foram 4,45 e 4,20 µmol.mL^{-1} enquanto as velocidades máximas V_{max} foram 10,22 e 11,89 µmol.mL^{-1}.min^{-1}, respectivamente, para a comercial e a produzida. Os dados experimentais (TABELA 1) mostram desempenhos bastante similares, porém, a dextranase produzida por FES demonstra afinidade levemente maior pela dextrana (FIGURA 7), fato este demonstrado pelo valor ligeiramente abaixo do determinado para a dextranase comercial.

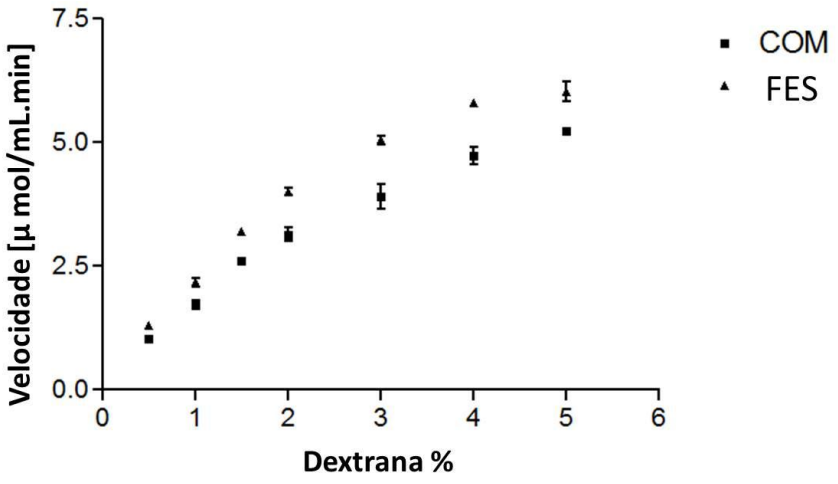

FIGURA 7. CINÉTICA DAS ENZIMAS DEXTRANASES PRODUZIDA (FES) E COMERCIAL (COM) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DEXTRANA T2000

Este experimento foi uma forma de comparação das duas enzimas em condições controladas, com o substrato sintético de alta pureza. Desta forma, outros interferentes que possam afetar os parâmetros de análise foram excluídos. Isso pode ocorrer em caldo de cana, pois alguns microelementos, principalmente íons metálicos, podem alterar significativamente os resultados de hidrólise.

Os resultados mostram que ambas as enzimas, nas concentrações testadas (5 U e 10 U por 100 mL de caldo) agem de forma similar nos diferentes tempos de incubação (FIGURA 8).

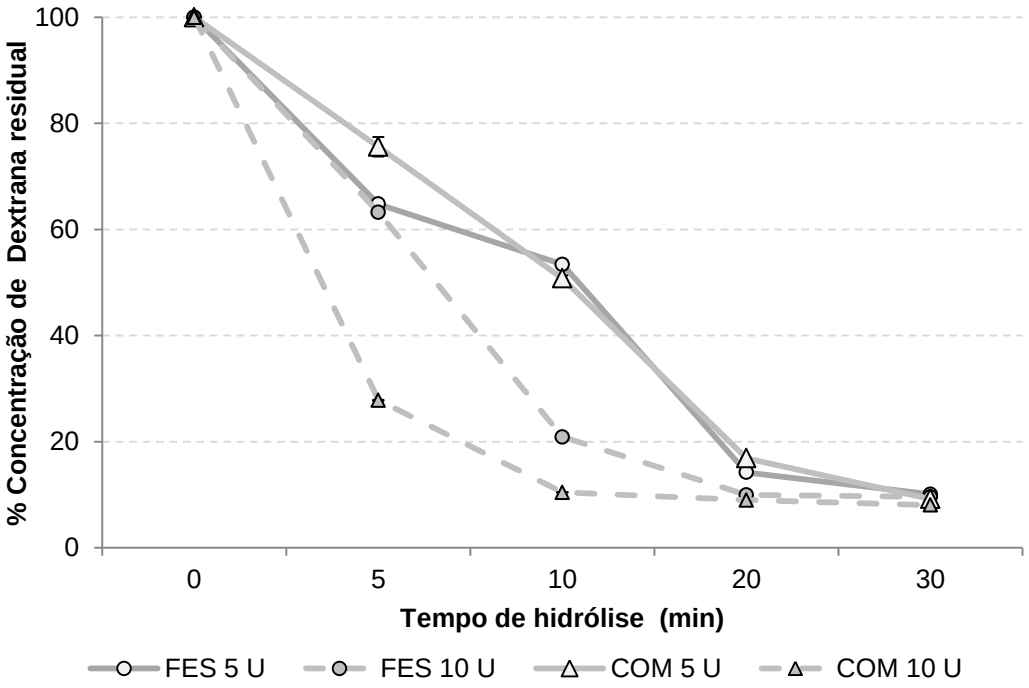

FIGURA 8. COMPARAÇÃO ENTRE OS DESEMPENHOS DE DEXTRANASE PRODUZIDA POR FES E DEXTRANASE COMERCIAL NA HIDRÓLISE DE DEXTRANA EM CALDO DE CANA.

A diferença entre as duas enzimas está principalmente nos primeiros minutos. Em 5 minutos, com apenas 5 U (0,1 $U.mL^{-1}$) a dextranase produzida por FES reduziu o inicial de dextrana para 64% (m/v). Resultado semelhante foi obtido com 10 U (0,2 $U.mL^{-1}$). A dextranase comercial apresentou melhores resultados quando empregados 10 U (0,2 $U.mL^{-1}$), reduzindo a dextrana a 27%.

Entretanto, utilizando apenas 5 U (0,1 U.mL^{-1}), ainda restou 75% da dextrana. Portanto, empregando-se apenas 5 U (0,1 U.mL^{-1}) em 5 minutos, a dextranase FES hidrolisou 44% mais dextrana que a correspondente comercial. Em tempos mais longos de incubação, acima de 20 minutos, os desempenhos das duas enzimas foram muito semelhantes, com resultados entre 8,99 e 16,86% de residual, respectivamente, e rumaram para um residual final praticamente constante ao fim de 30 minutos, de 8,03 a 10,07%.

Embora existam pequenas diferenças nos parâmetros cinéticos das enzimas, os dados coletados nos diversos experimentos permitem concluir que a dextranase produzida por FES alcança desempenho compatível com a dextranase comercial escolhida.

Todos os experimentos discutidos reforçam a viabilidade da aplicação desta enzima no processo sucroalcooleiro. No momento do desenvolvimento do trabalho em que se constatou que a enzima sofria grande queda na atividade pelas altas concentrações de açúcares (°Brix), por essa razão, foi levantado um questionamento sobre a viabilidade de sua aplicação numa condição real. Além desta questão, outros componentes presentes no caldo, como os minerais, poderiam afetar o desempenho enzimático, uma vez que as enzimas podem sofrer inibição, muitas vezes severas, pela presença de alguns minerais em baixas concentrações. Dentro do contexto acadêmico, as enzimas são sempre avaliadas na presença de substrato puro diluído em tampão, em condições restritas e controladas, na qual há pouca influência de outros fatores, a análise é exclusivamente enzima-substrato. Os estudos em campo mostram que a enzima é capaz de atuar na real condição em que deve ser aplicada. Também neste estudo na usina houve a oportunidade de testar a ação da enzima dentro das metodologias aprovadas e comumente aplicadas no contexto industrial. Desta forma, esta etapa final foi de grande importância para valorizar todos os resultados obtidos durante a etapa de desenvolvimento.

3.6 Considerações sobre a aplicação da dextranase produzida por FES no processo sucroalcooleiro

Considerando as características peculiares da dextranase produzida por FES e o funcionamento de um processo operacional padrão de usina, foi criado um guia para aplicação desta enzima. Algumas considerações devem ser ressaltadas:

- A variação da concentração da sacarose causou um efeito já discutido no CAPÍTULO 3. O aumento da concentração de sólidos solúveis (°Brix) acima de 30 inibe fortemente a capacidade de hidrólise da enzima. Portanto, a aplicação para obtenção de resultados efetivos deve ser em caldo de cana e as etapas de evaporação e pós-evaporação devem ser evitadas. Este atributo não é apenas pertinente à dextranase produzida neste trabalho, mas para outras enzimas dextranases, tais como as estudadas por Egglestone e Monge (2005).
- Nas etapas de clarificação, a cal hidratada (fosfato de cálcio) é adicionada ao caldo até que seja alcançado o pH entre 6,7 e 7,3. Esta adição juntamente com o uso de polímeros auxilia na remoção de impurezas do caldo. Conforme já discutido anteriormente, o pH acima de 6 claramente prejudica a atividade catalítica da enzima, portanto, a aplicação da enzima nesta etapa está descartada.
- Após a clarificação, o caldo de cana é aquecido a 103-105°C. Esta prática é comum para o controle microbiológico, com o objetivo de preservar o açúcar contido em caldo do ataque de micro-organismos oportunistas. Considerando estas altas temperaturas praticadas, uma vez que a dextranase de FES é inativada acima de 70°C, as etapas de produção após a clarificação devem ser evitadas.
- A temperatura ótima de atuação da enzima é de 50°C. Esta temperatura é praticada na moenda, local onde é adicionada a água de embebição para a extração de açúcares remanescentes nas células da cana.
-O pH ótimo da enzima é 5. O pH normal do caldo de cana varia de 4,5 a 5,5. Este pH natural é praticado antes da adição de insumos químicos, na moenda.
- O tanque de caldo misto é um tanque de mistura dos caldos extraídos nos diferentes ternos de moenda. A temperatura pode variar, mas não ultrapassa 50°C.

- Na continuidade do processo, o caldo de cana troca calor com o regenerador. O condensado (vapor condensado) do regenerador troca calor com o caldo misto, para que sua temperatura se eleve e menos energia seja gasta na etapa de aquecimento. O condensado, por outro lado, resfria e retorna para a caldeira. Não há um exato controle de temperatura nesta etapa, pois este não é um fator crítico. No entanto, na Usina X, a temperatura de aproximadamente 65°C é a mais comumente praticada.
- O tempo de retenção (Tr) é o tempo em que o caldo permanece em determinada etapa. É um importante parâmetro de gerenciamento, que leva em consideração os volumes de caldo e as vazões nos equipamentos. A velocidade de rotação dos ternos da moenda pode ser ajustada, afetando todos estes fatores, os quais estão interligados.

De acordo com as considerações citadas, é recomendada a aplicação da dextranase FES na moenda, após o segundo terno. Desta forma, a enzima terá tempo de atuar por 10 minutos juntando os períodos de moagem e de retenção no tanque de caldo misto. Após esta etapa, ainda pode-se esperar um efeito de catálise residual durante a regeneração. Os resumos destas recomendações estão representados na FIGURA 9. Os efeitos da sulfitação sobre a atividade enzimática não foram avaliados. Seguindo o curso normal do processo, a enzima perderá atividade durante a adição da cal hidratada e será definitivamente desnaturada na etapa de aquecimento.

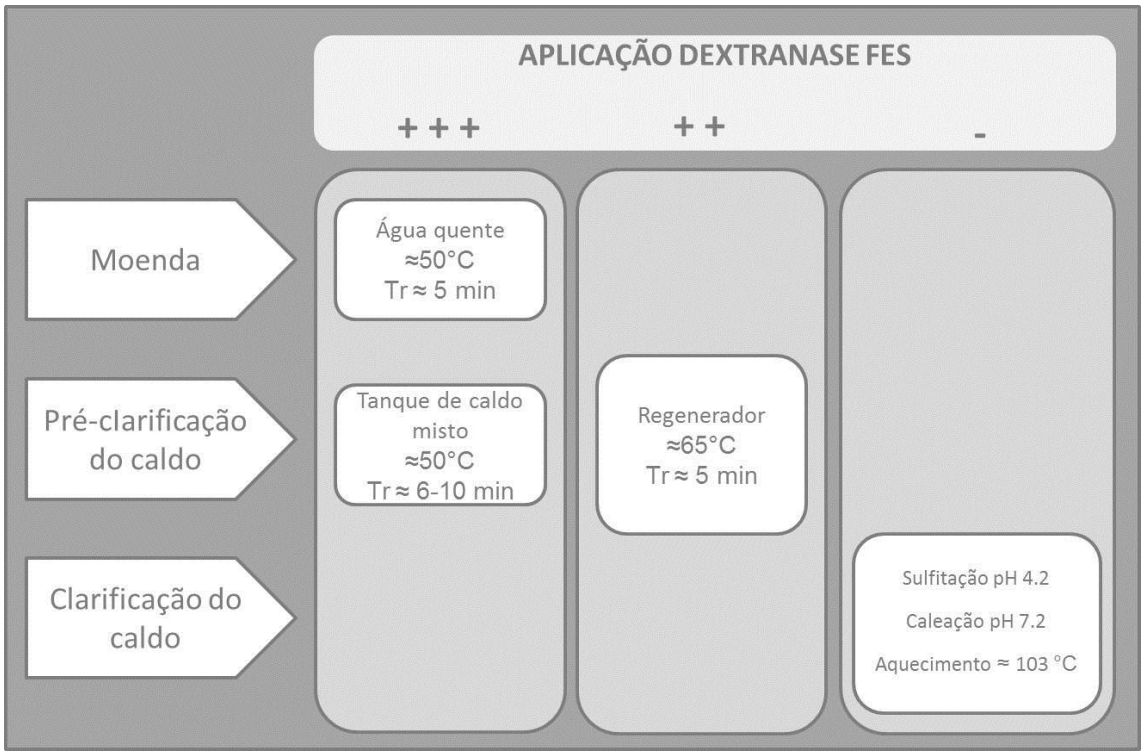

FIGURA 9. RECOMENDAÇÃO DE APLICAÇÃO DA DEXTRANASE FES NO PROCESSO SUCROALCOOLEIRO

3.7 Plano de ação para o combate ao excesso de dextrana

O objetivo deste estudo de campo não foi apenas testar o desempenho da dextranase em caldo, mas também propor uma solução para os problemas causados pela dextrana, entre elas, a aplicação de enzimas dextranases. A dextrana é um problema recorrente e quase inevitável nas condições de operações da maioria das usinas. Mesmo quando existe um bom planejamento de gestão (corte, colheita, transporte e entrega) sempre há a possibilidade de excessos nas quantidades de cana disponível, a qual pode permanecer em campo e ficar suscetível à deterioração, especialmente em condições chuvosas. O parâmetro máximo de dextrana em caldo para um processamento normal é de 500 ppm (em caldo). Quando valores maiores são atingidos, algumas decisões podem amenizar os danos ao processo.

1) Mistura de matérias primas – A cana deteriorada é misturada à cana de boa qualidade, na tentativa de “diluir” o valor total da dextrana e aumentar a pureza do caldo.

2) Sulfitação – Enxofre em escamas é sublimado em fornos e adicionado ao caldo. O uso de enxofre no caldo é uma prática comum para o clareamento/branqueamento e obtenção de açúcar de menor cor. A quantidade máxima permitida pela ANVISA é de 0,02 g de sulfitos por 100 g de açúcar ou 20 ppm. No Codex Alimentarius, o valor máximo para açúcar é de apenas 15 ppm por 100 g (15 mg/kg), valor exigido pelo mercado internacional. Ultimamente, órgãos regulamentadores vêm sofrendo pressões para diminuição desses valores, visto que muitos estudos tem comprovado efeitos prejudiciais à saúde pelo excesso de enxofre. Em substituição a este método tem sido estudado o emprego do ozônio para a mesma finalidade, porém os custos são altos e seus efeitos em produtos alimentícios ainda não foram bem elucidados.

3) Lubrificantes de massa – produtos químicos surfactantes com propriedade de reduzir a viscosidade das massas durante o cozimento.

4) Dextranase - A enzima dextranase está disponível no mercado em diversas formulações e proveniente de vários fornecedores. Seu uso, porém, não é comumente adotado pelo alto valor. É importante ressaltar que o uso destas enzimas é esporádico e a quantidade aplicada varia de acordo com o nível de polissacarídeo presente. O produto Dextramax L da empresa Prozyn indica que o consumo de dextranase de 4 ppm, durante 10 dias por mês representaria um gasto de R$ 1,4 milhões em média por safra em uma usina com moagem de 3 milhões de toneladas (RAVAGNANI, 2010).

Dentre todas as soluções possíveis para o problema, o uso de dextranases é o único que efetivamente elimina o polissacarídeo do processo.

Na TABELA 2, apresent-se uma sugestão de propostas de viabilidade econômica e prática. O tanque acessório é uma sugestão para prolongar a incubação do caldo com a enzima, e seus custos de instalação, volumes e demais peculiaridades devem ser analisados para cada usina.

TABELA 2. PLANO DE AÇÃO PROPOSTO PARA ELIMINAR OU DIMINUIR OS PROBLEMAS CAUSADOS PELO EXCESSO DE DEXTRANA

Dextrana (ppm)	Descrição	Ação	Resultado esperado
até 500	Normalidade	-	-
500 a 2000	Prejuízos brandos ao processo	Uso de lubrificantes de massa, sulfitação	Atingir índices de normalidade de processo
2000 a 4000	Prejuízos grandes ao processo	Uso de dextranase na dosagem de 5 U/100 mL de caldo no primeiro terno (embebição)	Atingir índices de aceitáveis de dextrana (600 a 1200)
4000 a 8000	Prejuízos severos, excesso de mel para destilaria, açúcar de baixa qualidade	Uso de dextranase na dosagem de 10 U/100 mL caldo e incubação em tanque acessório* (tempo de retenção 30 minutos)	Atingir índices de dextrana reduzida (600 a 1200)
8000 a 12000	prejuízos severos, excesso de mel para destilaria, açúcar de baixa qualidade (cristais heterogêneos, escuros e alta umidade)	Uso de dextranase na dosagem de 10 U/100 mL caldo e incubação em tanque acessório (tempo de retenção 60 minutos)	Atingir índices de dextrana com menor impacto (800 a 1200)*

* Tanque acessório desenhado especialmente para incubação por tempo prolongado do caldo com a enzima a 50°C.

4 CONCLUSÕES

A dextranase produzida por FES com *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 a partir de bagaço de malte obteve um desempenho satisfatório para aplicação em caldo de cana para o controle da dextranase em indústria sucroalcooleira. Em apenas 10 minutos de retenção foi possível degradar 70% da dextrana presente em caldo empregando-se a quantidade de 0,07 U/mL.

O estudo da aplicação da enzima produzida por FES em uma planta industrial permitiu afirmar que o desempenho catalítico e a obediência aos requisitos de aplicação particulares da nova enzima fossem moldados ao processo geral de extração do caldo de cana, nas etapas iniciais no setor da moenda. A criação de um plano de trabalho, estabelecendo os intervalos de

concentração de dextrana em caldo apresenta uma nova solução para as usinas superarem os transtornos causados pelo polissacarídeo como mais uma alternativa, junto às estratégias já aplicadas.

REFERÊNCIAS

CLARKE, M. A.; BERGERON, J.; COLE, F. A rapid dextran screening test. **Sugar Azucar.** n. 82, v. 3, p. 23-24, 1987.

EGGLESTON, G.; MONGE, A. 2005. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. **Process Biochemistry**. v. 40, p.1881-1894, 2005.

EGGLESTONE, G.; YEN, J.W.T.; ALEXANDER, C.; GGOBER, J. Measurement and analysis of the mannitol partition coefficient in sucrose crystallization under simulated industrial conditions. **Carbohydrate Research.** n. 355, p. 69–78, 2012.

FAIRTRADE FOUNDATION. Commodity Briefing. Fairtrade Sugar, 2013.

JIMENEZ, E.R. La dextranasa a lo largo de la industria azucarera. **Biotecnologia Aplicada,** v. 22, p.11-19, 2005.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1957.

RAVAGNANI, E M. Dextranase: Custo x Benefícios. **STAB**, v.28; p48; 2010.

ROBERTS, E. J. **Dextran analysis:** Methods and Problems. Proceedings of the 1908 Technical Session on Sugar Cane Refining Research. LA USA: Science and Education Administration, 1981.

SOLOMON, S. Post-Harvest Cane Deterioration and its Milling Consequences. **Sugar Tech**. v. 2, p.1-18, 2000.

UNICA. 2013. **Chuva prejudica a moagem** e qualidade da cana na primeira quinzena de outubro Disponível em: http://www.unica.com.br/noticia/40728229920365001 64/chuva-prejudica-a-moagem-e-qualidade-da-cana-na-primeira-quinzena-de-outubro/. Acesso em: 31/03/2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dextranase produzida por FES com *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 a partir de bagaço de malte obteve um desempenho satisfatório para aplicação em caldo de cana para o controle da dextranase em indústria sucroalcooleira. Com o avanço dos estudos de escalonamento deste processo, em breve poderão ser discutidos dados econômicos comparando a aplicação da nova enzima com produtos já consolidados no mercado.

O desempenho alcançado foi comparável ao de enzimas comerciais já disponíveis no mercado, com a vantagem de ser produzida por um processo ecologicamente correto em que há emprego de resíduos e pouca suplementação por nutrientes sintéticos. Os resultados alcançados reforçam a viabilidade do reuso de resíduos agroindustriais para a obtenção de produtos de alto valor agregado.

Este resultado promove a possibilidade de avanços tecnológicos para a melhoria do segmento sucroalcooleiro. O setor continua em expansão e é cada vez mais necessário o estudo de novas tecnologias para a obtenção de produtos de alta qualidade e processos de alto rendimento para um desempenho competitivo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho iniciou-se com amplos objetivos e as etapas mais tardias do trabalho foram definidas com base nos melhores resultados alcançados. As etapas preliminares, portanto, abrem possibilidades para a exploração de novos temas relacionadas ao estudo de dextranases:

- Estudo das cepas do LPB I positivas para a enzima, possivelmente do gênero *Giberella* sp, nunca relatadas na literatura;
- Estudo de técnicas de FSm com extrato de resíduos;
- Estudos de ampliação de escala da FES já otimizada neste trabalho;
- Estudo de pré-tratamento do bagaço de cana antes do emprego em FES;
- Mutação e expressão do gene da dextranase de P. aculeatum NRRL 2129 em células mais adaptadas à FSm;
- Estudos de estabilidade da dextranase produzida neste trabalho em diferentes embalagens;
- Estudos de formulações de associação da dextranase produzida com amilases e outras enzimas interessantes ao processo sucroalcooleiro.

ANEXO 1

ATCC

Product Sheet

Penicillium aculeatum (ATCC® 10409™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

Biosafety Level
1

Intended Use

Strain Designation: NRRL 2129 [CBS 289.48, E-239, IMI 40588, NRRL A-1474, QM 3074]
Deposited Name: *Penicillium aculeatum* Raper et Fennell, anamorph
Product Description: An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 200: YM agar or YM broth
ATCC® Medium 325: Malt extract agar (Blakeslee's formula)
ATCC® Medium 336: Potato dextrose agar (PDA)

Growth Conditions
Temperature: 24°C to 26°C
Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure
For **freeze-dry (lyophilized)** ampoules:

1. Open an ampoule according to enclosed instructions.
2. From a single test tube of **sterile distilled water** (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a sterile pipette and apply directly to the pellet. Stir to form a suspension.
3. Aseptically transfer the suspension back into the test tube of sterile distilled water.
4. Let the test tube sit at room temperature (25°C) undisturbed for at least 2 hours; longer (e.g., overnight) rehydration might increase viability of some fungi.