

BRUNA LEITE SUFIATE

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA
DEXTRANASE DE *Pochonia chlamydosporia* (VC4) E SUA APLICAÇÃO NA
REMOÇÃO DE DEXTRANA DO CALDO DE CANA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S946p
2016

Sufiate, Bruna Leite, 1990-

Produção, purificação e caracterização parcial da dextranase de *Pochonia chlamydosporia* (VC4) e sua aplicação na remoção de dextrana do caldo de cana / Bruna Leite Sufiate. – Viçosa, MG, 2016.

vii, 57f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Humberto de Queiróz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Pochonia chlamydosporia*. 2. Enzimas de fungos.
3. Indução enzimática. 4. Cana-de-açúcar. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica
Aplicada. II. Título.


CDD 22. ed. 579.567

BRUNA LEITE SUFIATE

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA
DEXTRANASE DE *Pochonia chlamydosporia* (VC4) E SUA APLICAÇÃO NA
REMOÇÃO DE DEXTRANA DO CALDO DE CANA**

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

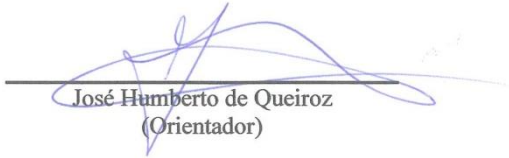
APROVADA: 17 de Fevereiro de 2016.



Filipe Elias de Freitas Soares
(Coorientador)



Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa



José Humberto de Queiroz
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pelo acolhimento e pela possibilidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudo.

Às agências financiadoras FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos meus orientadores, José Humberto de Queiróz e Filipe Elias de Freitas Soares, pela orientação, paciência e oportunidade.

Ao professor Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa, por aceitar o convite para participar da banca.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo e Fermentação, pela agradável convivência. Em especial à Angélica e Samara, pela ajuda fundamental para a conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo Evandro Ferreira Cardoso, pelo companheirismo, compreensão e por toda ajuda.

Aos meus pais Cláudia Beatriz Leite Sufiate e Vanderli Sufiate, e à minha irmã Raphaela Leite Sufiate, por todo apoio.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho e que sempre torceram por mim.

BIOGRAFIA

BRUNA LEITE SUFIATE, filha de Vanderli Sufiate e Cláudia Beatriz Leite Sufiate, nasceu dia 22 de Novembro de 1990, em Vitória, Espírito Santo.

Em Março de 2009, iniciou o curso de Bacharelado de Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, concluindo-o em Fevereiro de 2014.

Em Março de 2014, ingressou no Programa de Mestrado em Bioquímica Aplicada na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, defendendo a dissertação em Fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Dextranases.....	3
2.2. Produção de dextranases.....	4
2.3. Aplicações das dextranases	5
2.3.1. Aplicações clínicas das dextranases e dextranas.....	5
2.3.2. Aplicações das dextranases no tratamento de placa dentária.....	6
2.3.3. Aplicações das dextranases na indústria de açúcar	8
2.4. <i>Pochonia chlamydosporia</i>	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
4. OBJETIVOS	17

CAPÍTULO 1:

Otimização da produção de dextranase de *Pochonia chlamydosporia* (VC4) e sua aplicação na remoção de dextrana em caldo de cana

RESUMO	19
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Cultivo do fungo e obtenção do extrato enzimático	23
2.2. Medida da atividade enzimática	23
2.3. Efeito do tempo de incubação na produção de dextranase	24
2.4. Pré-caracterização enzimática	24
2.4.1. Efeito do pH na atividade enzimática	24
2.4.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática	24
2.4.3. Efeito do tempo de reação na atividade de dextranase.....	24
2.5. Delineamentos Experimentais	25
2.5.1. Plackett-Burman.....	25
2.5.2. Delineamento composto central	27
2.6. Aplicação da dextranase na remoção de dextrana do caldo de cana	28

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. Efeito do tempo de incubação na produção de dextranase.....	29
3.2. Pré-caracterização enzimática	29
3.3. Otimização da produção de dextranase	31
3.4. Aplicação da dextranase na remoção de dextrana do caldo de cana.....	35
4. CONCLUSÃO	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

CAPÍTULO 2:

Purificação parcial e caracterização da dextranase de *Pochonia chlamydosporia*

RESUMO	43
ABSTRACT.....	43
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1. Cultivo do fungo e obtenção do extrato enzimático	46
2.2. Medida da atividade enzimática	46
2.3. Quantificação de proteínas	47
2.4. Purificação parcial	47
2.5. SDS-PAGE	47
2.6. Caracterização enzimática	48
2.6.1. Efeito do pH na atividade enzimática	48
2.6.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática	48
2.6.3. Efeito de íons metálicos na atividade enzimática.....	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1. Purificação parcial da dextranase produzida por <i>Pochonia chlamydosporia</i>	49
3.2. Caracterização enzimática.....	50
3.2.1. Efeito do pH na atividade enzimática	50
3.2.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática	51
3.2.3. Efeito de íons metálicos na atividade enzimática.....	52
4. CONCLUSÃO	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

SUFIATE, Bruna Leite, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2016.

Produção, purificação e caracterização parcial da dextranase de *Pochonia chlamydosporia* (VC4) e sua aplicação na remoção de dextrana do caldo de cana.

Orientador: José Humberto de Queiróz. Coorientador: Filipe Elias de Freitas Soares.

Dextranases (EC 3.2.1) são enzimas que hidrolisam ligações α -(1,6), α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4) em polissacarídeos de dextrana, sendo produzidas por fungos, bactérias e algumas leveduras. São utilizadas na produção de dextrana para aplicações clínicas, na produção de isomaltooligossacarídeos e oligodextranas prebióticos, em produtos de higiene bucal para o tratamento e a prevenção de cáries e para remoção de dextranas na indústria de açúcar. O objetivo deste trabalho foi produzir, purificar e caracterizar parcialmente a dextranase produzida pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) e avaliar sua aplicação na remoção de dextranas em caldo de cana. Os efeitos de diferentes componentes do meio de cultura na produção de dextrana foram analisados através do delineamento de Plackett-Burman e do delineamento composto central. A superfície de resposta foi utilizada para determinar quais os níveis, dentre as variáveis que influenciam a produção de dextranase, proporcionam maior produção desta enzima pelo fungo *P. chlamydosporia*. Avaliou-se, ainda, a aplicação da dextranase na remoção de dextrana do caldo de cana. O extrato bruto foi parcialmente purificado em resina de troca iônica DEAE-Sepharose. A atividade de dextranase foi avaliada em diferentes pHs, temperaturas e na presença de íons metálicos. Apenas dois componentes do meio de cultura, NaNO_3 e pH, demonstraram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de dextranase. Os níveis de NaNO_3 e pH que proporcionaram maior produção desta enzima foram, respectivamente, 5 g/L e 5,5. A dextranase de *P. chlamydosporia* mostrou-se eficaz em remover a dextrana presente no caldo de cana, reduzindo em 75% o teor de dextrana após 12 horas, quando comparado com o controle. O rendimento da purificação foi 128%, o fator de purificação foi 2,58, e a atividade específica de 114,66 U/mg. A temperatura e a faixa de pH que resultaram em maior atividade foram, respectivamente, 50 °C, e 5,0 a 6,0. O íon Cu^{2+} inibiu a atividade da dextranase em 55%, e o íon Mg^{2+} aumentou a atividade em 24%, em relação ao controle.

ABSTRACT

SUFIATE, Bruna Leite, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016.
Production, purification and partial characterization of dextranase from *Pochonia chlamydosporia* (VC4) and its application in the removal of dextran from cane juice. Adviser: José Humberto de Queiróz. Co-adviser: Filippe Elias de Freitas Soares.

Dextranases (EC 3.2.1) are enzymes that hydrolyze α -(1,6), α -(1,2), α -(1,3) and α -(1,4) bonds in dextran polysaccharides, being produced by fungi, bacteria and some yeasts. They are used in dextran production for clinical applications, in the production of isomalto-oligosaccharides and oligodextrans prebiotics, in oral hygiene products for the treatment and prevention of caries and for the dextrans removal in the sugar industry. The purpose of this study was to produce, partially purify and characterize dextranase produced by fungus *Pochonia chlamydosporia* (VC4), and evaluate its activity on dextran removal from sugarcane juice. The effects from different components of the culture medium on dextranase production were analyzed by Plackett-Burman experimental design and central composite design. The response surface was used to determine the levels, among the variables influencing dextranase production, provide greater production of this enzyme by the fungus *P. chlamydosporia*. It was evaluated, also, the dextranase application in removing dextran in sugarcane juice. The crude extract was partially purified on ion exchange resin DEAE-Sepharose. Dextranase activity was assessed at different pHs, temperatures and presence of metal ions. Only two components of the culture medium, pH and NaNO₃, showed a significant effect ($p < 0.05$) on dextranase production. It was determined that the pH and NaNO₃ levels which provided the higher enzyme production were, respectively, 5 g/L and 5.5. The dextranase from *P. chlamydosporia* proved to be effective in removing dextran present in sugarcane juice, reducing the dextran content by 75% after 12 hours, when compared to the control treatment. The purification yield was 128%, the purification factor was 2.58, and the specific activity was 114.66 U/mg. The temperature and pH range which resulted in increased activity were, respectively, 50 °C, and 5.0 to 6.0. The Cu²⁺ ion inhibited dextranase activity by 55%, and the Mg²⁺ ion increased dextranase activity by 24%, when compared to the control.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana de açúcar, no campo, no transporte e na indústria, está sujeita a infecções microbianas que levam a produção de dextrana a partir da sacarose. Segundo Morel du Boil e Wienese (2002), a presença de dextranas no processamento de açúcar resulta, principalmente, do atraso pós-colheita e da falta de higiene nas fábricas.

A dextrana-sacarase, enzima necessária para produção da dextrana, é sintetizada por uma variedade de bactérias pertencentes à família *Lactobacillaceae*, e em particular pelos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (Rodrigues, 2009).

Dextrana é o nome dado a uma grande variedade de polissacarídeos extracelulares compostos quase exclusivamente por unidades de glicose ligadas predominantemente por ligações α -(1,6), mas também contendo ligações glicosídicas α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4) (Morel du Boil e Wienese, 2002).

Dentre os problemas causados pela produção de dextrana na indústria de açúcar podemos citar a redução na concentração de sacarose resultante do seu uso na produção de dextrana, menor recuperação da sacarose como consequência da inibição da cristalização, aumento na viscosidade do caldo de cana e xaropes resultantes da produção de açúcar (Khalikova; Susi; Korpela, 2005). Além disso, a dextrana afeta a qualidade do produto final, o açúcar, uma vez que a expurga dos méis não ocorre de maneira adequada, formando resíduos nos cristais de açúcar (Batista, 2014; Morel du Boil e Wienese, 2002), além da formação de cristais opacos, irregulares, alongados e em tom caramelo (Jiménez, 2009).

Em trabalho conduzido por Jiménez (2009) ficou evidenciado que, dentre os estudos por ele analisados, as perdas geradas pela presença de dextrana correspondem a valores de 0,35 a 8 kg de açúcar por tonelada de cana-de-açúcar moída devido à presença de 1000 ppm de dextrana no caldo, o que demonstra a necessidade real de se remover a dextrana do processamento na produção de açúcar.

Além da perda de sacarose e piora na qualidade do produto final, a presença da dextrana no caldo de cana também resulta em maior desgaste do equipamento e compromete a quantificação do teor de sacarose, base para o pagamento da cana-de-açúcar aos produtores (Singleton *et al.*, 2002).

Os métodos de separação física, tais como ultrafiltração, diálise e osmose reversa são métodos úteis para a remoção do polissacárido em escala reduzida, no

entanto, em escala comercial, seu uso ainda não é economicamente viável (Morel du Boil e Wienese, 2002).

Sendo assim, em sua maioria, os métodos usados para remoção da dextrana presente nas soluções de açúcar utilizam a hidrólise enzimática através do uso de dextranase. Dextranases (EC 3.2.1) são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações α -(1,6) e ramificações formadas por ligações glicosídicas α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4) em polissacarídeos de dextrana. Os principais produtos de sua hidrólise pelas dextranases são: glicose, isomaltose e isomalto-oligossacarídeos (Jaiswal e Kumar, 2011).

A aplicação econômica das dextranases demanda a disponibilidade de uma enzima adequada ao grau de remoção da dextrana, sendo esta dependente do tempo, temperatura e concentração da mesma (Morel du Boil e Wienese, 2002).

A produção de dextranase foi verificada em algumas espécies bacterianas, fungos filamentosos e um pequeno número de leveduras, e sua utilização tem ocorrido em vários países (Bhatia *et al.*, 2010).

Em estudos preliminares, foram testados seis diferentes espécies de fungos nematófagos para a produção de dextranase: *Monacrosporium thaumasium*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Monacrosporium sinense* e *Pochonia chlamydosporia*. Dentre os fungos analisados, o *P. chlamydosporia* apresentou alta atividade de dextranase, sendo selecionado para este estudo.

O *P. chlamydosporia* é um fungo parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematoides, encontrado no solo em várias regiões do mundo, tendo sido isolado diretamente de amostras de solo ou de ovos e cistos de fitonematoides (Lelis, 2014; Podestá *et al.*, 2009).

Embora existam na literatura inúmeros estudos utilizando o fungo *P. chlamydosporia* voltados para a sua atividade ovicida e larvicida, e produção de proteases e quitinases (Araújo *et al.*, 2009, 2008; Braga *et al.*, 2008, 2010, 2011; Frassy *et al.*, 2010; Gouveia *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2015; Tobin *et al.*, 2008), não existem relatos quanto ao seu uso para produção de dextranases.

Portanto, o objetivo deste estudo foi a produção, purificação e caracterização parcial de dextranase a partir do fungo *P. chlamydosporia* e sua aplicação na remoção da dextrana presente no caldo de cana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Dextranases

Dextranases (EC 3.2.1) são enzimas que hidrolisam ligações α -(1,6) em polissacarídeos de dextrana. Muitas dextranas contêm grande número de ligações secundárias, que não são ligações α -(1,6), podendo conter ramificações formadas por ligações glicosídicas α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4). Assim, enzimas que clivam ligações (1,2), (1,3) e (1,4) em polissacarídeos de dextrana também são classificadas como dextranases. Os principais produtos da hidrólise de dextrana pela ação das dextranases são glicose, isomaltose e isomalto-oligossacarídeos. Por isso, as dextranases são comumente chamadas de glucanases (Jaiswal e Kumar, 2011).

Estas enzimas englobam um grande e diverso grupo de enzimas que diferem entre si pelo modo de atuação e produtos gerados na hidrólise da dextrana. Considerando isto, o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, 2015) classifica as dextranases em:

1) Endodextranases (EC 3.2.1.11), que produzem fragmentos de dextrana e oligossacarídeos, através da hidrólise de ligações internas α -(1,6)-D-glicosídicas em pontos aleatórios da cadeia polissacarídica.

2) Glicano-1,6- α -D-glicosidases (EC 3.2.1.70), ou exodextranases formadoras de glicose. São exodextranases que atuam hidrolisando ligações α -(1,6)-D-glicosídicas de extremidades redutoras da dextrana ou de oligossacarídeos, tendo como produto D-glicose.

3) Glicano-1,6- α -D-isomaltosidase (EC 3.2.1.94), ou exodextranases formadoras de isomaltose. Hidrolisam ligações α -(1,6)-D-glicosídicas de extremidades não redutoras da dextrana ou de oligossacarídeos, formando unidades de isomaltose. Para isto, hidrolisam também ligações α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4).

4) Dextrana-1,6- α -D-isomaltosidase (EC 3.2.1.95), ou exodextranases formadoras de isomaltotriose. Removem unidades de isomaltotriose através da hidrólise de ligações α -(1,6)-D-glicosídicas de extremidades não redutoras de dextrana ou isomaltodextrina.

5) Dextranaexo-1,2- α -glicosidase (EC 3.2.1.115) ou exodextranase desramificadora. Esta enzima hidrolisa apenas ligações glicosídicas α -(1,2) das ramificações das dextranas, liberando D-glicose.

O banco de dados Carbohydrate Active Enzymes (CAZy, 2015) classifica as enzimas que degradam, modificam ou criam ligações glicosídicas segundo semelhanças nas sequências de aminoácidos. Segundo este banco de dados, as dextranases pertencem à classe das Glicosil Hidrolases (GH), sendo as endodextranases (EC 3.2.1.11) divididas nas famílias 49 e 66; as glicano-1,6- α -D-glicosidases (EC 3.2.1.70) pertencentes às famílias 13 e 15; as glicano-1,6- α -D-isomaltosidase (EC 3.2.1.94) classificadas como família 27 e as dextrana-1,6- α -D-isomaltosidases classificadas como família 49.

2.2. Produção de dextranases

As dextranases são produzidas por fungos, bactérias e algumas leveduras, e estão presentes nos rins, fígado, intestino delgado e baço dos animais (Sugiura *et al.*, 1973). Os fungos são os principais produtores de endodextranases extracelulares, cuja atividade enzimática é superior à daquelas produzidas por bactérias e leveduras (Khalikova, Susi e Korpela, 2005). Dentre as bactérias produtoras de dextranases, destacam-se as do gênero *Bacillus* (Esawy *et al.*, 2012; Mahmoud *et al.*, 2014; Zohra *et al.*, 2015), *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Thermoanaerobacter* e *Streptococcus* (Khalikova, Susi e Korpela, 2005). Entre as espécies de fungos que produzem dextranase, estão *Paecilomyces lilacinus* (Bhatia *et al.*, 2010, 2015) e espécies pertencentes aos gêneros *Penicillium* (Mahmoud *et al.*, 2014; Shukla, Madhu e Prabhu, 1989; Sugiura *et al.*, 1973), *Chaetomium* (Hattori, Ishibashi e Minato, 1981; Khalikova, Susi e Korpela, 2005; Virgen-Ortíz *et al.*, 2015) e *Aspergillus* (El-Shamy e Atalla, 2014; El-Tanash, El-Baz e Sherief, 2011).

As características das dextranases, tais como produtos de hidrólise, especificidade pelo substrato, massa molecular e efeito de pH, temperatura e efetores químicos, produzidas pelos diferentes microrganismos citados variam muito, mesmo quando comparadas dextranases produzidas por microrganismos pertencentes ao mesmo gênero. Além disso, a composição do meio de cultura, as condições de cultivo e o microrganismo utilizado também afetam a produção de dextranase (Jiménez, 2009).

As fontes de carbono estudadas para a produção de dextranases incluem dextrana, glicose, lactose, dextrina, amido, galactose, maltose, lactose, sacarose, xilana,

xilose, pectina, além de fontes naturais, como melão, farelo de milho e farelo de trigo. No entanto, segundo Abdel-Naby *et al.* (1999) e El-Masry (1991), constatou-se produção significativa de dextranase apenas quando a fonte de carbono utilizada foi dextrana.

Há poucos estudos disponíveis na literatura acerca da otimização da produção de dextranases de fungos. Abdel-Naby *et al.* (1999) obtiveram atividade de dextranase produzida por *Penicillium funiculosum* de 41,8 U/mL ao utilizar meio de cultura contendo dextrana 3,5%, NaNO₃ 1%, extrato de levedura 0,2%, K₂HPO₄ 0,4%, MgSO₄.7H₂O 0,06%, KCl 0,02% e FeSO₄.7H₂O 0,0001%, com pH inicial 8,0 e incubação a 30°C.

El-Masry (1991) avaliou a produção de dextranase por *Fusarium moniliforme* em meio de cultura líquido contendo dextrana 1%, NaNO₃ 0,2%, K₂HPO₄ 0,2%, MgSO₄.7H₂O 0,05%, KCl 0,05%, FeSO₄.7H₂O 0,001%, extrato de levedura 0,2%, com pH inicial 6,0 e incubação a 29°C e rotação de 150 rpm, obtendo atividade de dextranase igual a 66,4 U/mL. Obara-Doi *et al.* (2003) obtiveram maior atividade de dextranase (0,9 U/mL) produzida por *Fusarium* sp. em meio de cultura líquido composto por amilopectina 0,8%, dextrana 1%, extrato de levedura 0,9%, K₂HPO₄ 0,2%, MgSO₄.7H₂O 0,05%, KCl 0,05% e FeSO₄.7H₂O 0,0001%, com pH inicial 6,0 e incubação a 28°C e rotação de 180 rpm.

Além da existência de poucos estudos relacionados ao assunto, aqueles existentes utilizam meios de cultura e microrganismos distintos, resultando em produção de dextranases muito variada, evidenciando a necessidade de maiores estudos e padronização destes na otimização da produção de dextranases.

2.3. Aplicações das dextranases

2.3.1. Aplicações clínicas das dextranases e dextranas

Os estudos iniciais a respeito das dextranases voltaram-se à possibilidade de aplicação na produção comercial de dextrana clínica, uma solução estéril de dextrana de peso molecular específico usada na restauração do volume do sangue de pacientes que sofreram grande perda de sangue. Antes do uso das dextranases para este fim, a dextrana clínica era produzida por meio de hidrólise ácida controlada de dextrana, seguida de fracionamento com solvente orgânico, mas devido a perdas durante o

processo, o rendimento obtido era de apenas 10 a 12%. O método enzimático mostrou-se uma boa alternativa ao método de hidrólise ácida, pois necessita de menos energia, os produtos são mais uniformes e o rendimento é maior, de 25% a 52% (Khalikova, Susi e Korpela, 2005). Segundo estes mesmos autores, dentre as vantagens do uso de dextrana clínica formada a partir da ação das dextranases estão a biocompatibilidade, biodegradabilidade lenta e a viabilidade de incorporação de moléculas em matrizes formadas por dextranas.

Além do uso de dextrana clínica como substituinte sanguíneo, a dextrana tem sido estudada quanto à formação de hidrogéis que atuam como veículos de liberação de fármacos administrados por via oral. Este método é aplicável a fármacos potencialmente perigosos para a mucosa gástrica, ou sensíveis aos fluidos gástricos, e que devem ser liberados no intestino, uma vez que as bactérias presentes neste local produzem enzimas capazes de degradar a dextrana (Pitarresi *et al.*, 2007).

Outra aplicação clínica de dextranases consiste no uso destas para hidrolisar controladamente a dextrana, produzindo isomaltooligossacarídeos e oligodextranas (Mountzouris, Gilmour e Rastall, 2001). Estes oligossacarídeos atuam como prebióticos, pois são resistentes às enzimas digestivas de mamíferos presentes no intestino delgado, mas são rapidamente fermentadas no intestino grosso por bactérias probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, promovendo assim o crescimento e a proliferação de bactérias destes gêneros (Khalikova, Susi e Korpela, 2005).

A dextranase pode também ser utilizada como direcionadora de agentes terapêuticos. Hansen (1998) descreveu o uso da dextranase como direcionadora no tratamento de câncer, através da criação de um anticorpo biespecífico para um antígeno presente na célula alvo e para a dextranase. Este anticorpo é inserido na circulação, ligando-se às células cancerosas, então a dextranase é injetada e, conseqüentemente capturada pelo anticorpo ligado às células cancerosas. O agente terapêutico conjugado com dextrana é então inserido no sangue, sendo o conjugado clivado pela ação da dextranase, liberando o fármaco para atuar nas células cancerosas.

2.3.2. Aplicação de dextranases no tratamento de placa dentária

Em dentes molares, cáries podem se desenvolver em fissuras e sulcos pela ação de bactérias, no entanto as lesões nas superfícies lisas dos demais dentes não podem ser

formadas da mesma maneira. Para que tais lesões de superfície lisa ocorram, é necessário o acúmulo de uma camada de polissacarídeos sobre a superfície dos dentes (Naessens *et al.*, 2005).

A estrutura e composição dessa placa dentária, biofilme bacteriano aderido à superfície dos dentes, é bastante variada, sendo composto por bactérias, substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana (polissacarídeos insolúveis em água) e outras partículas (Khalikova, Susi e Korpela, 2005; Xavier *et al.*, 2005). Aproximadamente 20% do peso seco da placa dentária é constituído por estes polissacarídeos (Marotta *et al.*, 2002).

Tais substâncias são definidas por Wingender *et al.* (1999) como sendo "polímeros orgânicos de origem microbiana que em sistemas de biofilme são frequentemente responsáveis pela ligação de células e outros materiais particulados entre si (coesão) e ao substrato (adesão)" e, quando degradados e removidos, previnem o aparecimento de doenças orais tal como as cáries.

Diversas são as estratégias que podem ser aplicadas no intuito de remover biofilmes indesejados. Estas incluem: (i) a limpeza mecânica, (ii) a utilização de agentes antimicrobianos, (iii) interrompendo o crescimento do biofilme através da remoção de nutrientes essenciais, (iv) inibição da adesão microbiana à superfície e (v) promovendo o descolamento da biomassa (Xavier *et al.*, 2005).

Vale ressaltar que a limpeza mecânica e o uso de agentes antimicrobianos ainda são os métodos mais utilizados, sendo a escovação o principal método na remoção da placa dentária, no entanto inúmeros outros métodos vêm sendo estudados visando uma remoção mais eficiente (Xavier *et al.*, 2005). Desta forma, o uso de substâncias que promovam a remoção direta do biofilme através da destruição da integridade física de sua matriz parece ser uma alternativa promissora (Chen e Stewart, 2000).

Os principais microrganismos presentes nas cáries são as bactérias do gênero *Streptococcus* cujo potencial cariogênico está diretamente relacionado à sua capacidade de produzir polissacarídeos solúveis (dextranas) e insolúveis (mutanas) em água a partir da sacarose (Naessens *et al.*, 2005).

As dextranas são essenciais para a adesão e cariogenicidade da placa em questão. Sendo assim, dextranas desempenham um papel chave no desenvolvimento, proliferação, e integridade estrutural da placa dentária (Marotta *et al.*, 2002).

Desta forma, o fato da dextrana ser um componente da placa bacteriana tem sido uma das principais forças motrizes no estudo das dextranases (Khalikova, Susi e

Korpela, 2005), sendo sua aplicação em diversos produtos comerciais, como pastas de dente, antissépticos bucais e gomas de mascar, visando à prevenção e o tratamento de placas bacterianas, uma realidade (Echeandia *et al.*, 1971; Lukacovic e Majeti, 1994; Shimada, Akiyama e Sudo, 1984; Vidra e Nachtigal, 1976).

2.3.3. Aplicação das dextranases na indústria de açúcar

O crescimento de bactérias do gênero *Leuconostoc* é um dos principais causadores da deterioração pós-colheita da cana-de-açúcar (Jaiswal e Kumar, 2011). Estas bactérias produzem dextrana a partir da sacarose presente na cana-de-açúcar. Dentre os problemas causados pela produção de dextrana na indústria de açúcar estão a perda de sacarose, devido ao uso desta para produzir dextrana, a menor recuperação da sacarose, como consequência da inibição da cristalização, e o aumento da viscosidade dos caldos de cana e xaropes resultantes da produção de açúcar (Khalikova, Susi e Korpela, 2005).

No processamento de açúcar, as centrífugas funcionam em altas rotações, de forma que xaropes de alta viscosidade podem desestabilizar o eixo, prejudicando o equilíbrio, resultando em desgaste do equipamento. Além disso, as telas acopladas às centrífugas têm a função de reter os cristais de açúcar formados, permitindo a passagem dos méis. No entanto quando o xarope apresenta maior viscosidade, a expurga dos méis não ocorre de maneira adequada, formando resíduos nos cristais de açúcar que prejudicam a qualidade do açúcar (Batista, 2014). A presença de altos níveis de dextrana resulta na formação de cristais opacos, irregulares, alongados e em tom caramelo (Jiménez, 2009), características que reduzem o valor comercial do produto.

Outra consequência da presença de dextrana é que esta é três vezes mais dextrogira em comparação à sacarose. O pagamento da cana-de-açúcar aos produtores é feito considerando-se o teor de sacarose em relação ao teor de açúcares totais, e o teor de sacarose é medido através de um equipamento que mede o desvio da luz polarizada, o polarímetro. Como a dextrana é mais dextrogira que a sacarose, a presença de dextrana resulta em quantificação do teor de sacarose acima do valor verdadeiro (Singleton *et al.*, 2002).

Jiménez (2009) descreveu que, dentre os estudos por ele analisados, as perdas geradas por dextrana correspondiam a valores de 0,35 a 8 kg de açúcar por tonelada de cana-de-açúcar moída devido à presença de 1000 ppm de dextrana no caldo,

demonstrando a necessidade de remoção da dextrana do processo de produção de açúcar.

O principal método de remoção de dextrana do caldo de cana é a hidrólise enzimática. As dextranases atuam reduzindo a massa molecular, e conseqüentemente, a viscosidade dos caldos de cana (Khalikova, Susi e Korpela, 2005), tendo seu uso para remover dextrana na indústria de açúcar começado na década de 70, na Austrália (Eggleston e Monge, 2005). Outros métodos foram propostos para remoção de dextrana do caldo de cana, tais como ultrafiltração, osmose reversa e diálise, no entanto estes métodos não se mostraram eficazes e economicamente viáveis para a indústria de açúcar (Jiménez, 2009). O uso do método enzimático de remoção de dextrana do caldo de cana não interfere no processo de produção do açúcar, e além de aumentar o desempenho produtivo, também aumenta a qualidade do açúcar (Jaiswal e Kumar, 2011).

A atividade das dextranases é influenciada pelo pH, temperatura, tempo de reação, concentração de substrato, qualidade da matéria prima, volume de caldo e tipo da planta industrial. Desta forma, cada dextranase tem temperatura, pH e tempo de reação que proporcionam maior atividade, além das características peculiares para aplicação de cada usina. Estas características se traduzem em grande variação de fatores que dificultam o desenvolvimento de uma metodologia generalista para aplicação de dextranases na indústria de açúcar (Batista, 2014). Apesar da discrepância entre os protocolos existentes, a maioria dos produtos disponíveis para aplicação na indústria de açúcar é produzida a partir de fungos do gênero *Chaetomium* (Jiménez, 2009).

2.4. *Pochonia chlamydosporia*

P. chlamydosporia é um fungo, parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematoides, encontrado no solo em várias regiões do mundo, tendo sido isolado diretamente de amostras de solo ou de ovos e cistos de fitonematoides (Lelis, 2014; Podestá *et al.*, 2009). Este fungo foi relatado parasitando ovos do fitonematóide *Heterodera schachtii* pela primeira vez por Willcox & Tribe (1974).

Quando usado como controle biológico de nematoides, este fungo possui a vantagem de se desenvolver na superfície de raízes, colonizar massas de ovos de uma só vez, eliminando grande quantidade ovos. Além disso, a protease produzida por este fungo age também sobre a casca do ovo, aumentando sua permeabilidade e, conseqüentemente, promovendo a passagem de outras substâncias tóxicas produzidas

pelo fungo (Figueiredo, 2014). Outro ponto positivo é o fato de este fungo produzir clamidósporos com paredes espessas, que são estruturas de resistência que aumentam sua sobrevivência e permanência no solo, possibilitando sua sobrevivência em condições adversas (Monteiro, 2013; Podestá, 2015).

A atividade nematófaga de *P. chlamydosporia* baseia-se no desenvolvimento de apressórios, estruturas que permitem aderência à superfície do ovo. A penetração no ovo se dá por força mecânica do apressório e por ação enzimática, resultando em destruição do ovo (Lysek e Sterba, 1991).

Estudos relatam a capacidade de *P. chlamydosporia* destruir ovos de diversos gêneros de helmintos, tanto em condições laboratoriais quanto em condições de campo, tais como *Ascaris suum* (Araújo *et al.*, 2008), *Echinostoma paraensei* (Lelis, 2014), *Meloidogyne javanica* (Podestá, 2015), *Ascaris lumbricoides* (Braga *et al.*, 2007; Lysek e Sterba, 1991), *Globodera pallida* e *Globodera rostochiensis* (Tobin *et al.*, 2008), *Fasciola hepatica* (Braga *et al.*, 2008), *Taenia saginata* (Araújo *et al.*, 2009), *Toxocara canis* (Frassy *et al.*, 2010), *Trichuris vulpis* (Silva *et al.*, 2010).

Estudos recentes relatam que o extrato bruto produzido pelo fungo *P. chlamydosporia* reduz de forma eficaz o número de larvas de nematoides de diversas espécies, bem como a eclosão dos ovos, sendo estas atividades larvicida e/ou ovicida resultantes da atuação de proteases e quitinases presentes no extrato bruto (Braga e Araújo, 2014; Braga *et al.*, 2010, 2011; Gouveia *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2015).

Apesar de haver muitos estudos a respeito do fungo *P. chlamydosporia*, sua atividade ovicida e larvicida, e produção de proteases e quitinases, não há relatos disponíveis na literatura sobre o uso de *P. chlamydosporia* na produção de dextranases.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-NABY, M. A. *et al.* Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. **Process Biochemistry.**, v. 34, n. 4, p. 391–398, 1999.
- ARAÚJO, J. M. *et al.* Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 4, p. 338–41, 2009.
- ARAÚJO, J. V. *et al.* In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. **Parasitology Research**, v. 102, p. 787–790, 2008.
- BATISTA, M. C. T. **Produção de dextranases a partir de bagaço de malte: caracterização e avaliação do potencial de aplicação em indústria sucroalcooleira.** 169f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, 2014.
- BHATIA, S. *et al.* Dextranase production from *Paecilomyces lilacinus* and its application for dextran removal from sugarcane juice. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p. 133–138, 2010.
- BHATIA, S. *et al.* Kinetic and thermodynamic properties of partially purified dextranase from *Paecilomyces lilacinus* and its application in dextran removal from cane juice. **Sugar Tech**, 2015.
- BRAGA, F. R. *et al.* In vitro observation of the action of isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Verticillium chlamydosporium* on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 356–358, 2007.
- BRAGA, F. R. *et al.* In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1559–1564, 2008.
- BRAGA, F. R. *et al.* Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172,

n. 3-4, p. 264–268, 2010.

BRAGA, F. R. *et al.* Ovicidal action of a crude enzymatic extract of fungus *Pochonia chlamydosporia* against *Ancylostoma sp* eggs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 116–118, 2011.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 71–82, 2014.

CAZy – Carbohydrate Active Enzymes, 2015. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>, acessado dia 20/12/2015.

CHEN, X.; STEWART, P. S. Biofilm removal caused by chemical treatments. **Water Research**, v. 34, n. 17, p. 4229–4233, 2000.

ECHEANDIA, J. *et al.* **Anhydrous toothpaste formulation**. US Pat. 3574824, 13 abril 1971, 5p.

EGGLESTON, G.; MONGE, A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1881–1894, 2005.

EL-MASRY, H. G. Optimization of dextranase synthesis by a locally isolated *Fusarium moniliforme* (12). **Zentralblatt für Mikrobiologie: Landwirtschaft, Technologie, Umweltschutz**, v. 146, n. 3, p. 185–192, 1991.

EL-SHAMY, A. R.; ATALLA, S. M. M. Immobilization of dextranase by *Aspergillus penicillioides* NRC 39 and its properties. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 49, p. 3893–3900, 2014.

EL-TANASH, A. B.; EL-BAZ, E.; SHERIEF, A. A. Properties of *Aspergillus subolivaceus* free and immobilized dextranase. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 5, p. 735–742, 2011.

ESAWY, M. A. *et al.* Characterization of extracellular dextranase from a novel halophilic *Bacillus subtilis* NRC-B233b a mutagenic honey isolate under solid state fermentation. **E-journal of Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 1494–1510, 2012.

FIGUEIREDO, L. D. DE. **Atividade de *Pochonia chlamydosporia* sobre nematóides**

do gênero *Meloidogyne* na presença de matéria orgânica. 53f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2014.

FRASSY, L. N. *et al.* Destruction of *Toxocara canis* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 102–104, 2010.

GOUVEIA, A. DE S. *et al.* Enzymatic action of proteases and chitinases of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Diectophyma renale* eggs. **Anais da V Jornada Acadêmica Internacional da Bioquímica**, v. 1, n. 1, p. 88–89, 2015.

HANSEN, H. J. **Method for antibody targeting of therapeutic agents**. US Pat. 5851527, 22 dez 1998, 13p.

HATTORI, A.; ISHIBASHI, K.; MINATO, S. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 2409–2416, 1981.

JAISWAL, P.; KUMAR, S. Impact of media on isolation of dextranase producing fungal strains. **Journal of Scientific Research**, v. 55, p. 71–76, 2011.

JIMÉNEZ, E. R. Dextranase in sugar industry: A review. **Sugar Tech**, v. 11, n. 2, p. 124–134, 2009.

KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: Fundamentals and Applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 306–325, 2005.

LELIS, R. T. **Controle biológico de Echinostoma paraensei pelo fungo nematófago Pochonia chlamydosporia**. 48f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2014.

LUKACOVIC, M. F.; MAJETI, S. **Oral composition**. US Pat. 5320830. 14 jun 1994, 8p.

LYSEK, H.; STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Folia Parasitologica**, v. 38, p. 255–259, 1991.

MAHMOUD, K. F. *et al.* Microbial production and characterization of dextranase.

International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 3, n. 9, p. 1095–1113, 2014.

MAROTTA, M. *et al.* Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 101–108, 2002.

MONTEIRO, T. S. A. **Controle biológico do nematóide das galhas, *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamidosporia* e *Duddingtonia flagrans***. 55f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2013.

MOREL DU BOIL, P. G.; WIENESE, S. Enzymic reduction of dextran in process-laboratory evaluation of dextranases. **Proceedings of South African Sugar Technologist Association**, v. 76, p. 435–443, 2002.

MOUNTZOURIS, K. C.; GILMOUR, S. G.; RASTALL, R. A. Continuous production of oligodextrans via controlled hydrolysis of dextran in an enzyme membrane reactor. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1767–1771, 2001.

NAESSENS, M. *et al.* *Leuconostoc dextranase* and dextran: production, properties and applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 80, n. 8, p. 845–860, 2005.

NC-IUBMB – Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2015. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>, acessado dia 20/12/2015.

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.

PITARRESI, G. *et al.* Photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives: a combination suitable for colon-specific drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 119, p. 328–338, 2007.

PODESTÁ, G. S. *et al.* Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 191–193, 2009.

PODESTÁ, G. S. **Interação entre *Pochonia chlamydosporia* e rizobactérias no controle de *Meloidogyne javanica***. 73f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2015.

RODRIGUES, R. **Dextrana: Produção e aplicação industrial**. 50f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e Bacharelado). Universidade Estadual Paulista, 2009.

SHIMADA, K.; AKIYAMA, K.; SUDO, M. **Oral composition containing dextranase and α -1,3-glucanase and a method for preventing and suppressing oral diseases using the same**. US Pat. 4438093. 20 mar 1984, 9p.

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

SILVA, A. R. *et al.* In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 76–79, 2010.

SINGLETON, V. *et al.* A new polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose. **Journal American Society of Sugarcane Technologists**, v. 22, p. 112–119, 2002.

SOARES, F. E. DE F. *et al.* Action of proteases of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs of collared peccary (*Pecari tajacu*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 31, p. 1883–1886, 2015.

SUGIURA, M. *et al.* Studies on dextranase: Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 309, p. 357–362, 1973.

TOBIN, J. D. *et al.* Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. **Biological Control**, v. 46, p. 194–201, 2008.

VIDRA, J. D.; NACHTIGAL, H. **Oral compositions containing dextranase**. US Pat. 3991177. 9 nov 1976, 5p.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. *et al.* Kinetics and thermodynamic of the purified dextranase from *Chaetomium erraticum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 80–86, 2015.

WILLCOX, J.; TRIBE, H. T. Fungal parasitism in cysts of Heterodera. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 62, n. 3, p. 585–594, 1974.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. **Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function**. 1^a ed. Berlin: Springer, 1999. 265 p.

XAVIER, J. B. *et al.* Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix - a modelling study. **Microbiology**, v. 151, n. 12, p. 3817–3832, 2005.

ZOHRA, R. R. *et al.* Purification, characterization and end product analysis of dextran degrading endodextranase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB25. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 243–248, 2015.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a produção de dextranase pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* e sua aplicação na remoção de dextrana do caldo de cana

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os fatores que influenciam a produção de dextranase do fungo *Pochonia chlamydosporia*
- Determinar os níveis destes fatores que proporcionam maior produção de dextranase
- Avaliar o efeito da dextranase na remoção de dextrana do caldo de cana
- Purificar parcialmente e caracterizar a dextranase produzida pelo fungo *Pochonia chlamydosporia*

CAPÍTULO 1

Otimização da produção de dextranase de *Pochonia chlamydosporia* (VC4) e sua aplicação na remoção de dextrana em caldo de cana

Otimização da produção de dextranase de *Pochonia chlamydosporia* (VC4) e sua aplicação na remoção de dextrana em caldo de cana

Resumo

Dextranases (EC 3.2.1) são enzimas que hidrolisam ligações α -(1,6), α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4) em polissacarídeos de dextrana, sendo produzidas por fungos, bactérias e algumas leveduras. O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de dextranase do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4), e avaliar sua atividade na redução de dextrana em caldo de cana. Os efeitos, sobre a produção de dextranase de *P. chlamydosporia*, de diferentes componentes do meio de cultura foram analisados através do delineamento de Plackett-Burman e do delineamento composto central. A superfície de resposta foi utilizada para determinar quais os níveis, dentre as variáveis que influenciam a produção de dextranase, proporcionam maior produção destas enzimas pelo fungo *P. chlamydosporia*. Avaliou-se, ainda, o efeito da dextranase na remoção de dextrana presente no caldo de cana. Observou-se que apenas dois componentes do meio de cultura, NaNO_3 e pH, demonstraram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a produção de dextranase, e determinou-se que os níveis de NaNO_3 e pH que proporcionaram maior produção desta enzima foram, respectivamente, 5 g/L e 5,5. A dextranase de *P. chlamydosporia* mostrou-se eficaz em remover a dextrana presente no caldo de cana, reduzindo em 75% o teor de dextrana após 12 horas, quando comparado com o controle.

Palavras-chave: qualidade de açúcar, dextranase, otimização, *Pochonia chlamydosporia*

Abstract

Dextranases (EC 3.2.1) are enzymes that hydrolyze α -(1,6), α -(1,2), α -(1,3) and α -(1,4) bonds in dextran polysaccharides, being produced by fungi, bacteria and some yeasts. The purpose of this study was to optimize dextranase production from fungus *Pochonia chlamydosporia* (VC4), and evaluate its activity on the dextran reduction of sugarcane juice. The effects over the *P. chlamydosporia* dextranase production from different components of the culture medium were analyzed by Plackett-Burman experimental design and central composite design. The response surface was used to determine the

levels, among the variables influencing dextranase production, provide greater production of these enzymes by the *P. chlamydosporia* fungus. It was evaluated, also, the dextranase effect in removing dextran present in sugar cane juice. It was noted that only two components of the culture medium, pH and NaNO₃, showed a significant effect ($p < 0.05$) on dextranase production, and it was determined that the pH and NaNO₃ levels which provided the higher enzyme production were, respectively, 5 g/L and 5.5. The dextranase from *P. chlamydosporia* proved to be effective in removing dextran present in sugar cane juice, reducing the dextran content by 75% after 12 hours, when compared to the control treatment.

Keywords: sugar quality, dextranase, optimization, *Pochonia chlamydosporia*

1. INTRODUÇÃO

Dextrana é o nome dado a uma grande variedade de polissacáridos extracelulares composto exclusivamente por unidades de glicose ligadas predominantemente por ligações α -(1,6), mas também contendo ligações glicosídicas α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4) (Morel du Boil e Wienese, 2002).

Sua produção é uma propriedade comum aos microrganismos em ambientes naturais e sua ocorrência tem sido demonstrada tanto em microrganismos procariotos como em eucariotos (Wingender, Neu e Flemming, 1999).

Tal substância é responsável por inúmeros problemas na indústria açucareira. Dentre eles destacam-se a redução na concentração e menor taxa de recuperação da sacarose, aumento na viscosidade do caldo de cana e xaropes (Khalikova; Susi; Korpela, 2005), e piora na qualidade do produto final, o açúcar (Batista, 2014; Morel du Boil e Wienese, 2002), além da formação de cristais opacos, irregulares, alongados e em tom caramelo (Jiménez, 2009).

Além da perda de sacarose e piora na qualidade do produto final, a sua presença no caldo de cana também resulta em maior desgaste do equipamento e compromete a quantificação do teor de sacarose, base para o pagamento da cana-de-açúcar aos produtores (Singleton *et al.*, 2002).

Dextranase é uma enzima que degrada especificamente moléculas de dextrana de alto peso molecular em dextranas menores, reduzindo assim a viscosidade do caldo, massa cozida e melaço. Com o uso da dextranase, o alongamento dos grãos cessa, os tempos de ebulição são encurtados, e o produto flui mais suavemente devido à diminuição da viscosidade (Cuddihy *et al.*, 2000).

A produção de dextranase foi verificada em algumas espécies de bactérias, fungos filamentosos e um pequeno número de leveduras e sua utilização tem ocorrido em vários países (Bhatia *et al.*, 2010).

O fungo *P. chlamydosporia*, utilizado no presente estudo, é um fungo parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematoides, encontrado no solo em várias regiões do mundo, tendo sido isolado diretamente de amostras de solo ou de ovos e cistos de fitonematoides (Lelis, 2014; Podestá, 2015).

Embora existam na literatura inúmeros estudos utilizando o fungo *P. chlamydosporia* voltados para a sua atividade ovicida e nematicida, e produção de proteases e quitinases (Araújo *et al.*, 2009, 2008; Braga *et al.*, 2008, 2010, 2011; Frassy

et al., 2010; Gouveia *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2015; Tobin *et al.*, 2008), não existem relatos quanto ao seu uso para produção de dextranases.

Portanto, o objetivo deste estudo foi otimizar a produção de dextranase a partir de fonte fúngica, *P. chlamydosporia* e sua aplicação na remoção da dextrana presente no caldo de cana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo do fungo e obtenção do extrato enzimático

O fungo *P. chlamydosporia* isolado VC4, originado de solo brasileiro, cedido pelo Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, foi mantido em meio sólido de ágar batata dextrose (BDA), sob refrigeração, a 4°C. O fungo foi ativado antes da inoculação no meio de cultura líquido, sendo repicado para uma nova placa de Petri em meio de BDA. As colônias foram transferidas na forma de discos e, então, foram incubadas por 10 dias a 28°C.

Para a inoculação em meio de cultura líquido, foram retirados das bordas das placas de Petri quatro discos de igual tamanho. Estes discos foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido, previamente autoclavados a 121 °C durante 15 minutos. O meio líquido continha dextrana 10 g/L, NaNO₃ 10 g/L, KH₂PO₄ 4 g/L, MgSO₄.H₂O 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, ZnSO₄.7H₂O 0,178 g/L e FeSO₄.7H₂O 0,18 g/L. Após a inoculação, os frascos foram mantidos a 28 °C e 180 rpm por 7 dias. Após este período, o conteúdo dos erlenmeyers foi filtrado em filtro de nylon e centrifugado a 10000 g por 20 minutos, obtendo-se o extrato bruto.

2.2. Medida da atividade enzimática

A atividade da dextranase foi medida avaliando-se a quantidade de açúcares redutores produzidos a partir da hidrólise da dextrana pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). O ensaio enzimático foi realizado em tubos de ensaio, utilizando-se 750 µL de solução tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,2, 200 µL de solução de dextrana 1% e 50 µL de amostra enzimática. Os reagentes foram incubados a 50 °C durante 15 minutos. Após este tempo, a reação foi interrompida adicionando-se 1 mL do reagente de DNS. As amostras foram aquecidas por 5 minutos em banho-maria. Após o banho fervente, foram adicionados 2 mL de água a cada tubo de ensaio. As leituras de absorbância foram realizadas a 540 nm. Para se obter a quantidade de açúcar redutor a partir dos valores de absorbância, foi construída uma curva padrão com glicose, cuja concentração variou de 0,22 a 2,44 µmol/mL. Uma unidade (U) de dextranase foi definida como a quantidade da enzima que catalisa a

liberação de 1 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio. Todas as medidas de atividade enzimática foram realizadas em triplicata.

2.3. Efeito do tempo de incubação na produção de dextranase

Durante 11 dias, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada uma das três repetições, que foi transferida pra um microtubo tipo eppendorf e centrifugada a 10000 g por 20 minutos. Estas amostras foram submetidas à medida da atividade de dextranase. O meio de cultura líquido foi preparado como descrito no item 2.1. Os dados obtidos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey, com significância de 5%, utilizando-se o software Bioestat 5.0.

2.4. Pré-caracterização enzimática

2.4.1. Efeito do pH na atividade enzimática

A atividade da dextranase foi mensurada no extrato bruto utilizando-se tampão citrato-fosfato 100 mM com diferentes valores de pH: 2,2; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0. Os ensaios foram realizados nas condições descritas no item 2.2, utilizando-se a solução tampão nos referidos valores de pH.

2.4.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática

A atividade da dextranase foi determinada no extrato bruto utilizando-se diferentes temperaturas de incubação da reação: 30, 40, 50 e 60 °C, mantendo-se as demais condições descritas no item 2.2, com exceção da solução tampão, sendo utilizada a solução tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,0.

2.4.3. Efeito do tempo de reação na atividade de dextranase

A atividade da dextranase foi medida no extrato bruto utilizando-se diferentes tempos de incubação da reação: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Neste ensaio, e em todos

os outros seguintes, foram usados a temperatura e o pH que resultaram em maior atividade enzimática, ou seja, 50 °C, e tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,0.

2.5. Delineamentos Experimentais

2.5.1. Plackett-Burman

Com o objetivo de determinar quais componentes do meio de cultura influenciam significativamente a produção de dextranase pelo fungo *P. chlamydosporia* (VC4), avaliou-se as seguintes variáveis através do delineamento de Plackett-Burman (Plackett e Burman, 1946): dextrana (g/L), NaNO₃ (g/L), KH₂PO₄ (g/L), sais (MgSO₄.H₂O, KCl, ZnSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O) (g/L), pH e tempo de incubação (dias). Para esta análise, foi utilizado o software Minitab 16. Cada fator foi analisado em dois níveis: -1 para o nível inferior e +1 para o nível superior. As variáveis e seus níveis analisados estão demonstrados na Tabela 1. A matriz do delineamento experimental está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 1. Nível inferior (-1) e superior (+1) das seis variáveis analisadas pelo delineamento Plackett-Burman

Variável	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)
Dextrana (g/L)	2	20
NaNO ₃ (g/L)	0	10
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0	4
Sais (g/L)	MgSO ₄	0,5
	KCl	0,5
	ZnSO ₄	0,178
	FeSO ₄	0,180
pH	4,5	7,5
Tempo (dias)	7	11

Tabela 2. Matriz do design experimental de Plackett-Burman para os seis fatores estudados.

Ensaio	Dextrana (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Sais Minerais				pH	Tempo de Incubação (dias)
				MgSO ₄ (g/L)	KCl (g/L)	ZnSO ₄ (g/L)	FeSO ₄ (g/L)		
1	20	0	4	0	0	0	0	4,5	7
2	20	10	0	0,5	0,5	0,178	0,180	4,5	7
3	2	10	4	0	0	0	0	7,5	7
4	20	0	4	0,5	0,5	0,178	0,180	4,5	11
5	20	10	0	0,5	0,5	0,178	0,180	7,5	7
6	20	10	4	0	0	0	0	7,5	11
7	2	10	4	0,5	0,5	0,178	0,180	4,5	11
8	2	0	4	0,5	0,5	0,178	0,180	7,5	7
9	2	0	0	0,5	0,5	0,178	0,180	7,5	11
10	20	0	0	0	0	0	0	7,5	11
11	2	10	0	0	0	0	0	4,5	11
12	2	0	0	0	0	0	0	4,5	7

2.5.2. Delineamento composto central

Este delineamento foi utilizado para aplicar a metodologia de superfície de resposta, e assim determinar o nível ideal das variáveis selecionadas a partir do delineamento Plackett-Burman (pH e NaNO₃), bem como suas possíveis interações. Cada variável teve seu efeito avaliado em cinco níveis experimentais: $-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$, onde $\alpha=2^{n/4}$, sendo n o número de variáveis e 0 correspondente ao ponto central. Foram feitos 13 experimentos, sendo 5 replicatas do ponto central. Os dados foram analisados utilizando-se o software Design Expert 7.0. As variáveis e seus níveis analisados são mostrados na Tabela 3. A matriz do delineamento experimental é mostrada na Tabela 4. As outras variáveis não selecionadas no delineamento Plackett-Burman foram mantidas como descrito no item 2.1.

Tabela 3. Níveis das duas variáveis analisadas pelo delineamento composto central (DCC) na produção de dextranase pelo fungo *Pochonia chlamydosporia*

Variável	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
NaNO ₃ (g/L)	1,89	5	12,5	20	23,11
pH	4,88	5,5	7	8,5	9,12

Tabela 4. Matriz do delineamento composto central para os dois fatores analisados na produção de dextranase pelo fungo *Pochonia chlamydosporia*

Ensaio	NaNO ₃ (g/L)	pH
1	5	5,5
2	20	5,5
3	5	8,5
4	20	8,5
5	1,89	7
6	23,11	7
7	12,5	4,88
8	12,5	9,12
9	12,5	7
10	12,5	7
11	12,5	7
12	12,5	7
13	12,5	7

2.6. Aplicação da dextranase na remoção de dextrana do caldo de cana

Para a extração do caldo de cana, foi utilizado o cultivar RB867515 de cana de açúcar obtido no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Após a colheita, a cana foi armazenada a temperatura ambiente por 7 dias. O caldo foi extraído de 5 canas utilizando-se moedor de cana, e logo em seguida, foi filtrado em filtro de nylon para remover sujidades.

Procedeu-se a quantificação de dextrana no caldo de cana imediatamente após sua extração. Diferentes quantidades (0, 5, 10 e 15 U) de dextranase, a partir do extrato bruto, foram adicionadas a 100 mL de caldo de cana, e a dextrana residual foi quantificada após 12 h. A quantificação de dextrana foi feita segundo o método de Roberts (Roberts, Clarke e Godshall, 1983). Neste método, todos os polissacarídeos são separados do açúcar usando ácido tricloroacético e álcool. A dextrana é precipitada seletivamente com sulfato de cobre alcalino, e quantificada colorimetricamente por meio de sua reação com fenol e ácido sulfúrico. Os dados obtidos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey, com significância de 5%, utilizando-se o software Bioestat 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do tempo de incubação na produção de dextranase

A produção de dextranase foi acompanhada durante 11 dias (Figura 1). A maior produção de dextranase em valores absolutos ocorreu no oitavo dia de incubação, no entanto, as atividades de dextranase nos dias 6, 7, 8 e 9 não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Deste modo, para os demais ensaios de produção de dextranase, foram utilizados 7 dias de incubação.

Bhatia *et al.* (2010) determinaram que *Paecilomyces lilacinus* alcançou produção máxima de dextranase com 5 dias de incubação. Ao estudar a dextranase produzida por *Fusarium moniliforme*, El-Masry (1991) observou que a maior produção ocorreu com 8 dias de incubação, e Abdel-Naby *et al.* (1999) relataram que *Penicillium funiculosum* teve maior produção de dextranase com 7 dias de incubação, fato similar ao observado no presente estudo.

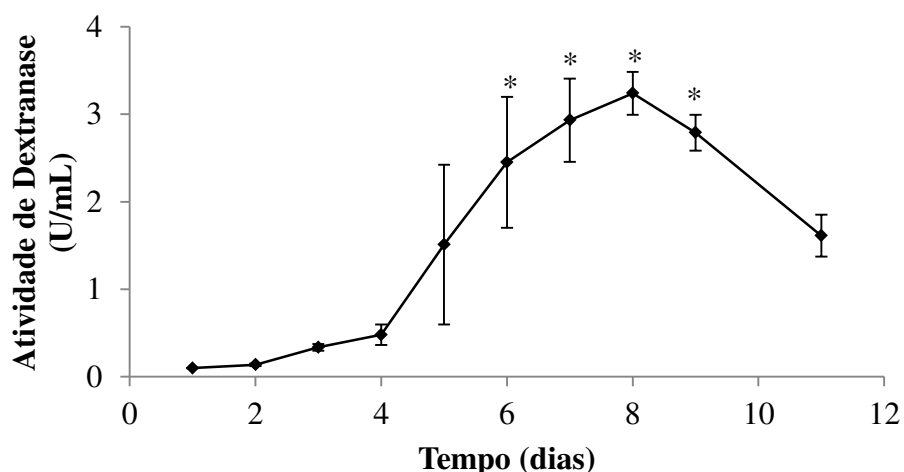


Figura 1. Atividade de dextranase produzida pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* em função do tempo de incubação em fermentação submersa a 28 °C e 180 rpm. * indica que não houve diferença significativa na atividade de dextranase ($p > 0,05$) entre os dias marcados, pelo teste de Tukey.

3.2. Pré-caracterização enzimática

O tempo de reação, pH e temperatura de uma reação enzimática devem ser avaliados para se determinar quais as melhores condições para a ocorrência da reação. Ao analisar a produção de açúcares redutores/mL em função do tempo de reação

(Figura 2), observou-se que 10 minutos de reação é suficiente para a reação ocorrer. É importante que o tempo de reação seja pequeno, pois assim garante-se que a cinética da reação enzimática esteja muito próxima ao estado estacionário, e desta forma pode-se considerar a velocidade inicial como zero. Assim, para os demais ensaios de atividade, o tempo de reação utilizado foi 10 minutos.

Depois de definido o tempo de reação, avaliou-se o efeito da temperatura (Figura 3) e do pH (Figura 4) na atividade de dextranase. A temperatura de 50 °C e o pH 6,0 apresentaram maior atividade de dextranase, no entanto a enzima apresentou alta atividade na faixa de pH 4,0 a 7,0. Diante destes resultados, os ensaios posteriores de atividade de dextranase foram feitos a 50 °C, pH 6,0 e com 10 minutos de reação.

Estes resultados corroboram os resultados encontrados por Bhatia *et al.* (2015), que determinaram que a dextranase produzida por *P. lilacinus* apresentou maior atividade em pH 5,0 e temperatura de 50 °C. Por outro lado, a dextranase produzida por *Aspergillus subolivaceus* demonstrou maior atividade em pH 5,5 e temperatura de 60 °C (El-Tanash, El-Baz e Sherief, 2011), e a dextranase produzida por *Penicillium lilacinum* exibiu atividade máxima na faixa de pH de 4,5 a 5,5 e na faixa de temperatura de 30 a 35 °C (Aslan e Tanriseven, 2007).

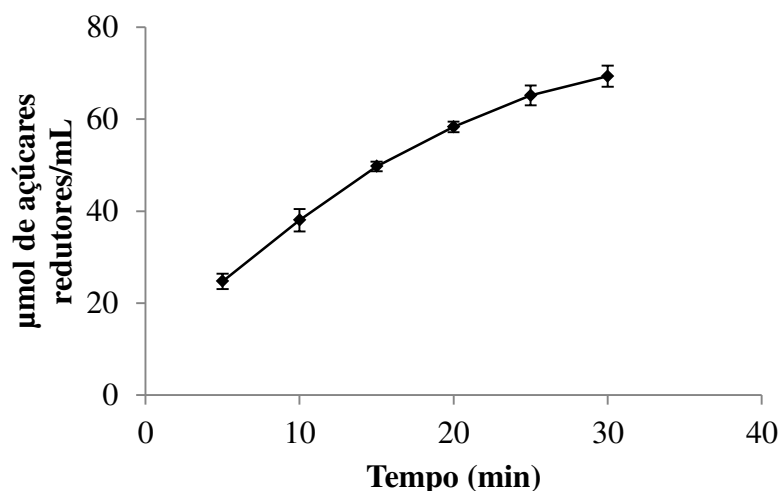


Figura 2. Produção de açúcares redutores/mL em função do tempo de reação da dextranase produzida pelo fungo *Pochonia chlamydosporia*.

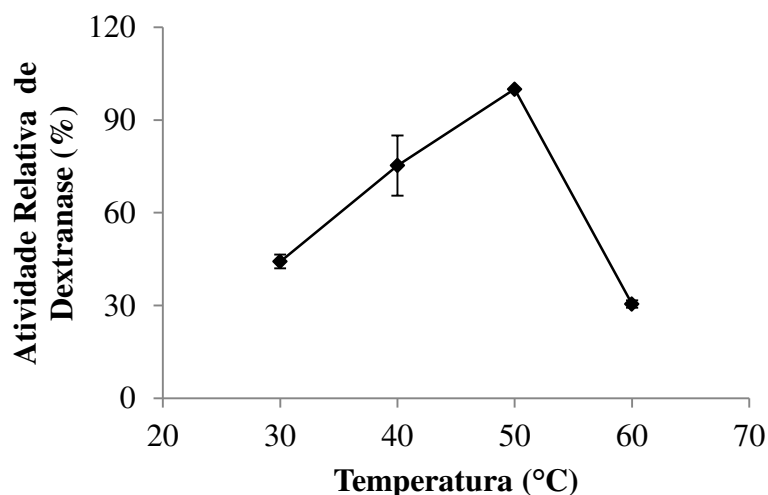


Figura 3. Efeito da temperatura de incubação da reação de atividade enzimática de dextranase presente no extrato bruto produzido por *Pochonia chlamydosporia*.

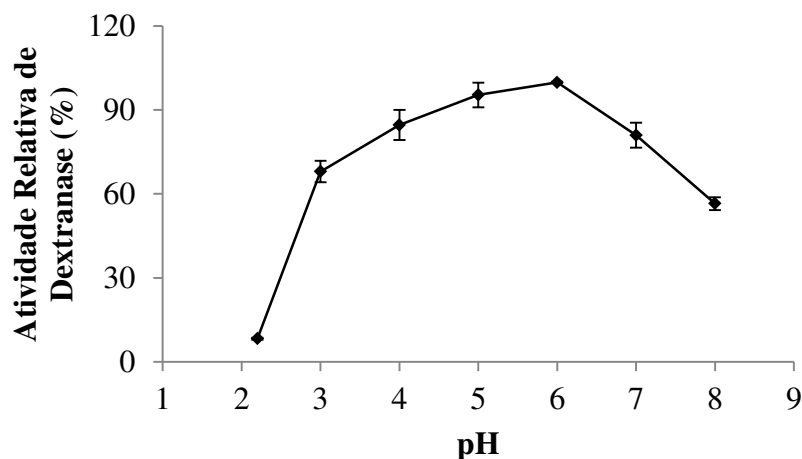


Figura 4. Efeito do pH na reação de atividade enzimática de dextranase presente no extrato bruto produzido por *Pochonia chlamydosporia*.

3.3. Otimização da produção de dextranase

O delineamento Plackett-Burman permitiu determinar quais, dos fatores estudados, influenciam significativamente a produção de dextranase de *P. chlamydosporia*. As seguintes variáveis analisadas não apresentaram efeito significativo ($p > 0,05$): Dextrana ($p = 0,780$), KH_2PO_4 ($p = 0,988$), sais ($p = 0,938$) e tempo de incubação ($p = 0,363$). Nas condições do experimento, foi constatado que a fonte de nitrogênio (NaNO_3) apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) e que a variável pH apresentou tendência a efeito significativo ($p = 0,054$) (Tabela 5). A matriz do delineamento

experimental com os valores de atividade de dextranase obtidos para cada corrida é mostrada na Tabela 6.

Tabela 5. Efeitos estimados das variáveis estudadas no delineamento de Plackett-Burman na produção de dextranase de *Pochonia chlamydosporia*

	Efeito	Coef	SE Coef	Teste-t	p-valor
Intercepto	----	0,5700	0,0337	16,88	0,000
Dextrana	0,0199	0,0099	0,0337	0,30	0,780
NaNO ₃	0,2129	0,1064	0,0337	3,15	0,025
KH ₂ PO ₄	-0,0011	-0,0005	0,0337	-0,02	0,988
Sais	-0,0055	-0,0027	0,0337	-0,08	0,938
pH	0,1698	0,0849	0,0337	2,51	0,054
Tempo	0,0676	0,0338	0,0337	1,00	0,363

Coef: coeficiente; SE: desvio padrão; Teste-t: valor das variáveis determinado pelo teste t-student em nível de 5% de probabilidade; p-valor.

Tabela 6. Matriz do delineamento Plackett-Burman e os resultados de atividade de dextranase.

Ensaio	Dextrana (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Sais Minerais				pH	Tempo de Incubação (dias)	Atividade de Dextranase (U/mL)
				MgSO ₄ (g/L)	KCl (g/L)	ZnSO ₄ (g/L)	FeSO ₄ (g/L)			
1	20	0	4	0	0	0	0	4,5	7	0,308
2	20	10	0	0,5	0,5	0,178	0,180	4,5	7	0,553
3	2	10	4	0	0	0	0	7,5	7	0,875
4	20	0	4	0,5	0,5	0,178	0,180	4,5	11	0,557
5	20	10	0	0,5	0,5	0,178	0,180	7,5	7	0,748
6	20	10	4	0	0	0	0	7,5	11	0,732
7	2	10	4	0,5	0,5	0,178	0,180	4,5	11	0,553
8	2	0	4	0,5	0,5	0,178	0,180	7,5	7	0,393
9	2	0	0	0,5	0,5	0,178	0,180	7,5	11	0,600
10	20	0	0	0	0	0	0	7,5	11	0,582
11	2	10	0	0	0	0	0	4,5	11	0,599
12	2	0	0	0	0	0	0	4,5	7	0,341

A partir dos resultados do delineamento experimental Plackett-Burman, o delineamento composto central foi utilizado para determinar os níveis ótimos das duas variáveis selecionadas (NaNO₃ e pH). Foram feitos 13 ensaios com diferentes combinações das duas variáveis. O ponto central foi repetido cinco vezes, para estimar o erro. A matriz do delineamento experimental com os valores de atividade de dextranase observados é mostrada na Tabela 7.

O modelo de regressão foi testado estatisticamente pelo teste F, e a análise de variância (ANOVA) foi usada para o modelo quadrático da superfície de resposta (Tabela 8). O modelo quadrático foi significativo com p-valor 0,0003. Além disso, a falta de ajuste ao modelo não foi significativa, com p-valor 0,1036. O R² do modelo foi 0,94, indicando a confiabilidade deste modelo. A maior atividade de dextranase observada foi 4,388 (U/mL) nas condições de pH 4,88 e NaNO₃ 12,5 (g/L).

Os resultados demonstram que o termo linear do pH, o termo quadrático do pH e o termo referente à interação entre pH e NaNO₃ tem efeito significativo (p<0,05) na produção de dextranase por *P. chlamydosporia*.

A equação abaixo representa a atividade de dextranase, após a remoção dos termos relacionados às variáveis não-significativas (p>0,05):

$$Y = 31,65860 - 6,92677X_1 + 0,047721X_1X_2 + 0,38916X_1^2$$

Onde Y é a atividade de dextranase e X₁ e X₂ correspondem ao pH e NaNO₃, respectivamente.

Na Figura 5, é exibida a superfície de resposta tridimensional gerada segundo o modelo final de produção de dextranase pelo fungo *P. chlamydosporia*. Pela Figura 5, pode-se observar que a diminuição do pH e do NaNO₃ resulta em maior produção de dextranase.

Tabela 7. Matriz experimental do delineamento composto central, usando duas variáveis e seus respectivos valores de atividade de dextranase de *Pochonia chlamydosporia*.

Ensaio	NaNO ₃ (g/L)	pH	Atividade de Dextranase (U/mL)
1	5	5,5	4,354
2	20	5,5	3,534
3	5	8,5	0,724
4	20	8,5	1,872
5	1,89	7	1,842
6	23,11	7	1,143
7	12,5	4,88	4,388
8	12,5	9,12	0,773
9	12,5	7	1,366
10	12,5	7	0,788
11	12,5	7	1,403
12	12,5	7	1,262
13	12,5	7	0,900

Tabela 8. Análise da variância para a equação resposta obtida na produção de dextranase pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* em fermentação submersa.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p-valor
NaNO ₃	0,088	1	0,088	0,48	0,5113
pH	14,00	1	14,00	76,21	<0,0001
NaNO ₃ *pH	1,15	1	1,15	6,27	0,0407
NaNO ₃ ²	0,77	1	0,77	4,16	0,0807
pH ²	5,33	1	5,33	29,02	0,0010
Modelo	20,91	5	4,18	22,76	0,0003
Falta de Ajuste	0,97	3	0,32	4,09	0,1036
Erro	0,32	4	0,079		
Total	22,20	12			

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados.

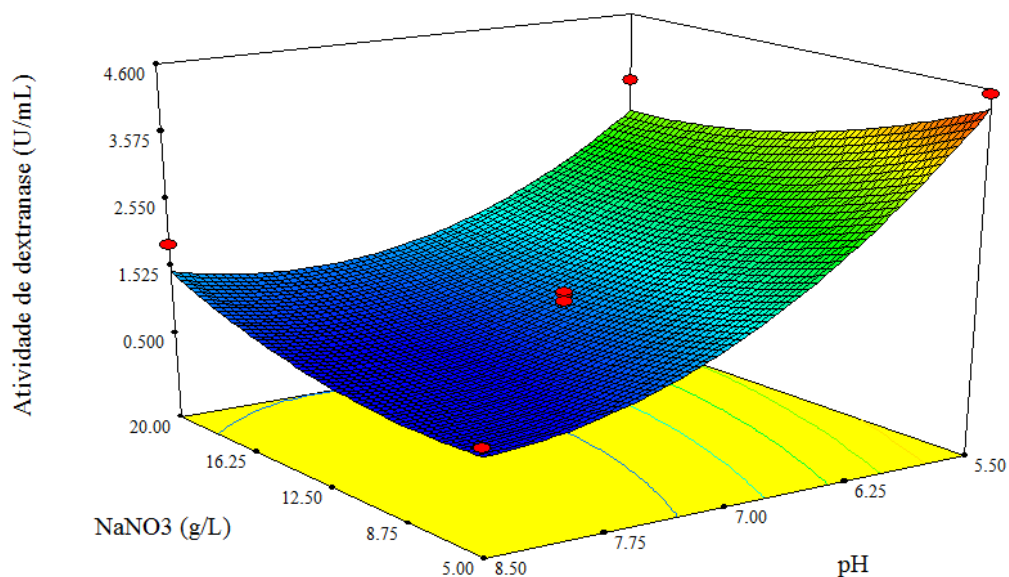


Figura 5. Superfície de resposta da produção de dextranase pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* em fermentação submersa.

3.4. Aplicação da dextranase na remoção de dextrana do caldo de cana

O armazenamento do caldo de cana durante 12 horas resultou em aumento no teor de dextrana de 3,62 para 28,84 mg/100 mL. Com a adição de dextranase ao caldo de cana, foi observado menor aumento do teor de dextrana, quando comparado ao controle, o que demonstra a remoção de dextrana pela atuação da dextranase (Tabela 9). Ao adicionar dextranase na concentração de 15 U/100 mL de caldo de cana, o teor de dextrana medido após 12 horas foi 7,158 mg/100 mL de caldo de cana, o que significa uma redução de 75% do teor de dextrana, quando comparado ao caldo de cana não tratado (28,84 mg de dextrana/100 mL de caldo de cana) (Tabela 9). Pelo teste de Tukey, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o caldo de cana tratado com 10 e com 15 U/100 mL de caldo de cana. A remoção de dextrana do caldo de cana utilizando-se dextranase produzida por fungo foi descrita por Bhatia *et al.* (2015) que, ao adicionar 5, 10 e 15 U de dextranase parcialmente purificada de *P. lilacinus* a 100 mL de caldo de cana, observaram, após 12 horas, redução do teor de dextrana de 38,89%, 52,74% e 61,11%, respectivamente.

Tabela 9. Remoção da dextrana em caldo de cana pela aplicação de dextranase de *Pochonia chlamydosporia*, em diferentes concentrações com 12 h de tratamento.

Dextranase (unidades/100 ml de caldo de cana)	Dextrana (mg/100 mL de caldo de cana) após o tempo (h)	
	0	12
0	3,62 ± 0,10	28,84 ± 5,58 ^a
5	3,62 ± 0,10	16,10 ± 0,69 (44%) ^b
10	3,62 ± 0,10	10,06 ± 1,27 (65%) ^{bc}
15	3,62 ± 0,10	7,158 ± 3,76 (75%) ^c

Os valores mostrados são as médias ± desvio padrão. Os valores em parênteses representam a % de remoção do conteúdo de dextrana em comparação ao controle (sem dextranase). Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

4. CONCLUSÃO

Dentre os fatores analisados, pH e NaNO₃ influenciaram a produção de dextranase pelo fungo *Pochonia chlamydosporia*. Pela análise da superfície de resposta, os níveis de pH e NaNO₃ que resultaram em maior produção de dextranase foram, respectivamente, 5,5 e 5g/L.

A dextranase de *P. chlamydosporia* mostrou-se eficaz em remover a dextrana presente no caldo de cana. Após 12 horas, comparando-se o caldo de cana não tratado e o caldo de cana tratado com 15 U, observou-se uma redução de 75% do teor de dextrana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-NABY, M. A. *et al.* Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. **Process Biochemistry.**, v. 34, n. 4, p. 391–398, 1999.
- ARAÚJO, J. M. *et al.* Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 4, p. 338–41, 2009.
- ARAÚJO, J. V. *et al.* In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. **Parasitol Research**, v. 102, p. 787–790, 2008.
- ASLAN, Y.; TANRISEVEN, A. Immobilization of *Penicilium lilacinum* dextranase to produce isomlatooligosaccharides from dextran. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 8-12, 2007.
- BATISTA, M. C. T. **Produção de dextranases a partir de bagaço de malte: caracterização e avaliação do potencial de aplicação em indústria sucroalcooleira.** 169f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, 2014.
- BHATIA, S. *et al.* Dextranase production from *Paecilomyces lilacinus* and its application for dextran removal from sugarcane juice. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p. 133–138, 2010.
- BHATIA, S. *et al.* Kinetic and thermodynamic properties of partially purified dextranase from *Paecilomyces lilacinus* and its application in dextran removal from cane juice. **Sugar Tech**, 2015.
- BRAGA, F. R. *et al.* In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1559–1564, 2008.
- BRAGA, F. R. *et al.* Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3-4, p. 264–268, 2010.

CUDDIHY, J. A. *et al.* Dextranase in sugar production: factory experience. **Journal American Society of Sugar Cane Technologists**, v. 20, p. 95 – 102, 2000.

BRAGA, F. R. *et al.* Ovicidal action of a crude enzymatic extract of fungus *Pochonia chlamydosporia* against *Ancylostoma sp* eggs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 116–118, 2011.

EL-MASRY, H. G. Optimization of dextranase synthesis by a locally isolated *Fusarium moniliforme* (12). **Zentralblatt fur Mikrobiologie: Landwirtschaft, Technologie, Umweltschutz**, v. 146, n. 3, p. 185–192, 1991.

EL-TANASH, A. B.; EL-BAZ, E.; SHERIEF, A. A. Properties of *Aspergillus subolivaceus* free and immobilized dextranase. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 5, p. 735–742, 2011.

FRASSY, L. N. *et al.* Destruction of *Toxocara canis* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 102–104, 2010.

GOUVEIA, A. DE S. *et al.* Enzymatic action of proteases and chitinases of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Diectophyma renale* eggs. **Anais da V Jornada Acadêmica Internacional da Bioquímica**, v. 1, n. 1, p. 88–89, 2015.

JIMÉNEZ, E. R. Dextranase in sugar industry: A review. **Sugar Tech**, v. 11, n. 2, p. 124–134, 2009.

KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: Fundamentals and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 306–325, 2005.

LELIS, R. T. **Controle biológico de Echinostoma paraensei pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia***. 48f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOREL DU BOIL, P. G.; WIENESE, S. Enzymic reduction of dextran in process-laboratory evaluation of dextranases. **Proceedings of South African Sugar**

Technologist Association, v. 76, p. 435–443, 2002.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

PODESTÁ, G. S. **Interação entre *Pochonia chlamydosporia* e rizobactérias no controle de *Meloidogyne javanica***. 73f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2015.

ROBERTS, E. J.; CLARKE, M. A.; GODSHALL, M. A. The analysis of dextran in sugar production. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technol 18th Congress**, v. 3, p. 1374-1383, 1983

SILVA, A. R. *et al.* In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 76–79, 2010.

SINGLETON, V. *et al.* A new polarimetric method for the analysis of dextran and sucrose. **Journal American Society of Sugarcane Technologists**, v. 22, p. 112–119, 2002.

SOARES, F. E. DE F. *et al.* Action of proteases of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs of collared peccary (*Pecari tajacu*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 31, p. 1883–1886, 2015.

TOBIN, J. D. *et al.* Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. **Biological Control**, v. 46, p. 194–201, 2008.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. **Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function**. 1^a ed. Berlin: Springer, 1999. 265 p.

CAPÍTULO 2

Purificação parcial e caracterização da dextranase de *Pochonia chlamydosporia*

Purificação parcial e caracterização da dextranase de *Pochonia chlamydosporia*

Resumo

Uma dextranase do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) foi parcialmente purificada e caracterizada. O fungo foi cultivado em meio de cultura líquido, e o extrato bruto foi obtido após filtração e centrifugação do meio de cultura, sendo posteriormente purificado em resina de troca iônica DEAE-Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences®). A eluição foi acompanhada pela medida de atividade enzimática e de proteína. As frações que apresentaram alta atividade de dextranase foram reunidas, formando um pool. As etapas da purificação foram acompanhadas por eletroforese (SDS-PAGE). A atividade de dextranase foi avaliada em diferentes pHs, temperaturas e na presença de íons metálicos. O rendimento da purificação foi 128% o fator de purificação foi 2,58, e a atividade específica de 114,66 U/mg. Através do SDS-PAGE, observou-se que a enzima foi purificada apenas parcialmente, devido ao aparecimento de várias bandas. A temperatura e faixa de pH que resultaram em maior atividade foram, respectivamente, 50 °C, e 5,0 a 6,0. O íon Cu^{2+} inibiu a atividade da dextranase em 55%, e o íon Mg^{2+} aumentou a atividade em 24%, em relação ao controle.

Palavras-chave: dextranase, *Pochonia chlamydosporia*, purificação

Abstract

A *Pochonia chlamydosporia* (VC4) fungus dextranase was partially purified and characterized. The fungus was grown in liquid culture medium, and the crude extract was obtained after filtration and centrifugation from the culture medium. Subsequently, it was purified on ion exchange resin DEAE-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences®). Elution was monitored by measuring enzyme and protein activity. Fractions that showed high dextranase activity were combined, forming a pool. The purification steps were monitored by electrophoresis (SDS-PAGE). Dextranase activity was assessed at different pHs, temperatures and in the presence of metal ions. The purification yield was 128%, the purification factor was 2.58, and the specific activity was 114.66 U/mg. Through SDS-PAGE, was observed that the enzyme was only partially purified, due to the appearance of several bands. The temperature and pH range

which resulted in increased activity were, respectively, 50 °C, and 5.0 to 6.0. The Cu²⁺ ion inhibited dextranase activity by 55%, and the Mg²⁺ ion increased dextranase activity by 24%, in relation to control.

Keywords: dextranase, *Pochonia chlamydosporia*, purification

1. INTRODUÇÃO

A deterioração da cana de açúcar no campo, no armazenamento, ou durante o processamento é um ponto de grande preocupação para a indústria de açúcar. Segundo Morel du Boil e Wienese (2002), a presença de dextranas no processamento de açúcar resulta, principalmente, do atraso pós-colheita e da falta de higiene nas fábricas.

Polissacarídeos de dextrana são sintetizados por uma variedade de bactérias pertencentes à família *Lactobacillaceae*, e em particular pelos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (Rodrigues, 2009). São responsáveis por muitos dos inúmeros impactos negativos que a deterioração da cana tem sobre o processamento de fábrica, geralmente associados com o aumento da viscosidade deste polissacarídeo (Eggleston, 2002).

Nesse sentido, com o objetivo de reduzir os problemas gerados pela dextrana na indústria açucareira, faz-se uso de hidrólise enzimática através do uso da enzima dextranase. Dextranases (EC 3.2.1) são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações α -(1,6) e suas ramificações formadas por ligações glicosídicas α -(1,2), α -(1,3) e α -(1,4) em polissacarídeos de dextrana. Os principais produtos de sua hidrólise pelas dextranases são: glicose, isomaltose e isomalto-oligossacarídeos (Jaiswal e Kumar, 2011).

A produção de dextranase foi verificada em algumas espécies de bactérias, fungos filamentosos e um pequeno número de leveduras, e sua utilização tem ocorrido na Austrália e em vários outros países (Bhatia *et al.*, 2010).

O fungo *P. chlamydosporia*, utilizado no presente estudo, é um fungo parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematoides, encontrado no solo em várias regiões do mundo, tendo sido isolado diretamente de amostras de solo ou de ovos e cistos de fitonematoídes (Lelis, 2014; Podestá *et al.*, 2009).

Embora existam na literatura inúmeros estudos utilizando o fungo *P. chlamydosporia* voltados para a sua atividade ovicida e larvicida, e produção de proteases e quitinases (Araújo *et al.*, 2009, 2008; Braga *et al.*, 2008, 2010, 2011; Frassy *et al.*, 2010; Gouveia *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2015; Tobin *et al.*, 2008), não existem relatos quanto ao seu uso para produção de dextranases.

Portanto, o objetivo deste estudo foi purificar e caracterizar parcialmente a dextranase proveniente do fungo *P. chlamydosporia*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo do fungo e obtenção do extrato enzimático

O fungo *P. chlamydosporia* isolado VC4, originado de solo brasileiro, cedido pelo Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, foi mantido em meio sólido de ágar batata dextrose (BDA), sob refrigeração, a 4°C. O fungo foi ativado antes da inoculação no meio de cultura líquido, sendo repicado para uma nova placa de Petri em meio de BDA. As colônias foram transferidas na forma de discos e, então, foram incubadas por 10 dias a 28°C.

Para a inoculação em meio de cultura líquido, foram retirados das bordas das placas de Petri quatro discos de igual tamanho. Estes discos foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido, previamente autoclavados a 121 °C durante 15 minutos. O meio líquido continha dextrana 10 g/L, NaNO₃ 5 g/L, KH₂PO₄ 4 g/L, MgSO₄.H₂O 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, ZnSO₄.7H₂O 0,178 g/L, FeSO₄.7H₂O 0,18 g/L e o pH foi ajustado para 5,5. Após a inoculação, os frascos foram mantidos a 28 °C e 180 rpm por 7 dias. Após este período, o conteúdo dos erlenmeyers foi filtrado em filtro de nylon e centrifugado a 10000 g por 20 minutos, obtendo-se o extrato bruto.

2.2. Medida da atividade enzimática

A atividade da dextranase foi medida avaliando-se a quantidade de açúcares redutores produzidos a partir da hidrólise da dextrana pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). O ensaio enzimático foi realizado em tubos de ensaio, utilizando-se 750 µL de solução tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,0, 200 µL de solução de dextrana 1% e 50 µL de amostra enzimática. Os reagentes foram incubados a 50 °C durante 10 minutos. Após este tempo, a reação foi interrompida adicionando-se 1 mL do reagente de DNS. As amostras foram aquecidas por 5 minutos em banho-maria. Após o banho fervente, foram adicionados 2 mL de água a cada tubo de ensaio. As leituras de absorbância foram realizadas a 540 nm. Para se obter a quantidade de açúcar redutor a partir dos valores de absorbância, foi construída uma curva padrão com glicose, cuja concentração variou de 0,22 a 2,44 µmol/mL. Uma unidade (U) de dextranase foi definida como a quantidade da enzima que catalisa a

liberação de 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio. Todas as medidas de atividade enzimática foram realizadas em triplicata.

2.3. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi estimada em cada fração proveniente da coluna cromatográfica pela absorbância medida em comprimento de onda de 280 nm. Para determinar a concentração de proteínas no extrato bruto e no pool obtido da coluna cromatográfica, foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976), com modificações. Os ensaios foram realizados utilizando-se 100 a 250 μL de amostra, 550 a 700 μL de água destilada e 200 μL do reagente de Bradford 5X. A leitura foi realizada após 15 minutos de reação à temperatura ambiente em comprimento de onda de 595 nm. Para se obter a quantidade de proteína a partir dos valores de absorbância, foi construída uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA), cuja concentração variou de 2 a 24 $\mu\text{g/mL}$.

2.4. Purificação parcial

Um volume de 6 mL de extrato bruto foi submetido a uma coluna de troca iônica DEAE-SepharoseTM Fast Flow (Amershan Biosciences[®]) previamente equilibrada em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,0, conectada a um coletor automático e uma bomba peristáltica. O fluxo foi mantido constante em 0,5 mL/min. Após a aplicação da amostra, aplicou-se 25 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,0. As proteínas ligadas à resina foram eluídas com 25 mL da mesma solução tampão com concentração crescente linear de NaCl até 1 M. As frações coletadas continham 3 mL cada uma e aquelas que continham alta atividade de dextranase foram selecionadas e reunidas, formando um pool que constituiu a enzima parcialmente purificada.

2.5. SDS-PAGE

Amostras do extrato bruto e da purificação parcial foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). As amostras foram preparadas misturando-se tampão de amostra 3X e amostra na razão 1:3 (v/v),

sendo submetidas a banho-maria fervente por 10 minutos. A eletroforese foi realizada a 80 V, e o gel foi corado com nitrato de prata para permitir a visualização das proteínas.

2.6. Caracterização enzimática

2.6.1. Efeito do pH na atividade enzimática

A atividade da dextranase foi mensurada utilizando-se tampão citrato-fosfato 100 mM com diferentes valores de pH: 2,2; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0. Os ensaios foram realizados nas condições descritas no item 2.2, utilizando-se a solução tampão nos referidos valores de pH.

2.6.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática

A atividade da dextranase foi determinada utilizando-se diferentes temperaturas de incubação da reação: 30, 40, 50 e 60 °C, mantendo-se as demais condições descritas no item 2.2.

2.6.3. Efeito de íons metálicos na atividade enzimática

Foi avaliado o efeito da presença dos seguintes íons metálicos na atividade enzimática da dextranase: ZnCl₂, CaCl₂, MgSO₄, MnSO₄, KCl, CuSO₄, FeSO₄. Os sais foram preparados na concentração de 10 mM em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 5,0. A atividade enzimática na ausência de qualquer íon foi considerada como 100%. As demais condições de reação seguiram o que foi descrito no item 2.2. Os dados resultantes desta análise foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Dunnett, com 5% de significância, utilizando-se o software Bioestat 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação parcial da dextranase produzida por *Pochonia chlamydosporia*

A purificação parcial do extrato bruto foi feita em apenas uma etapa, através de cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sepharose, cuja eluição foi feita com tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,0 e concentração crescente linear de NaCl até 1 M. (Figura 1).

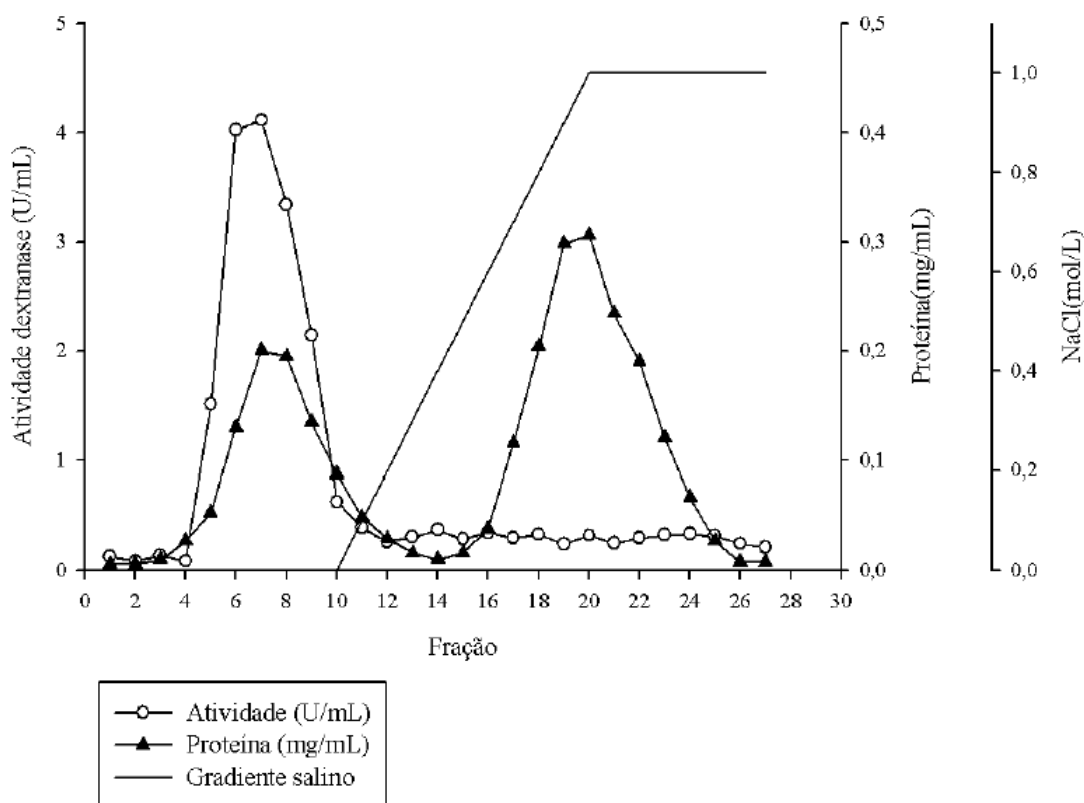


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato bruto de *Pochonia chlamydosporia* em resina DEAE-Sepharose.

As frações que apresentaram alta atividade de dextranase foram reunidas, formando um pool, constituindo a enzima purificada. Os resultados de atividade específica, fator de purificação e rendimento da purificação são mostrados na Tabela 1.

Para acompanhar o processo de purificação, foi feito um SDS-PAGE (Figura 2). Na fração correspondente à cromatografia de troca iônica é possível perceber que houve redução na quantidade de proteínas quando comparada à fração correspondente ao extrato bruto. Isto indica que houve purificação parcial da dextranase, não sendo possível, no entanto, afirmar seu peso molecular.

Tabela 1. Etapas da purificação da dextranase de *Pochonia chlamydosporia*.

Etapa	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato Bruto	1453,07	32,70	44,44	100	1
DEAE-Sepharose	1863,59	16,25	114,66	128	2,58

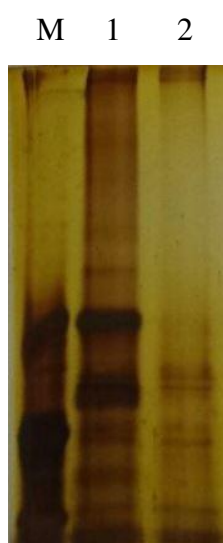


Figura 2. Análise da purificação da dextranase de *Pochonia chlamydosporia* em gel SDS-PAGE 10%. M: Marcador de peso molecular (kDa); 1: Extrato bruto; 2: Dextranase parcialmente purificada.

3.2. Caracterização enzimática

3.2.1. Efeito do pH na atividade enzimática

A dextranase parcialmente purificada de *P. chlamydosporia* apresentou maior atividade na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 (Figura 3). Além disso, observou-se que a dextranase possui alta capacidade de hidrólise também a pH 4,0, com atividade relativa superior a 80%. De maneira semelhante, Machado (2009) determinou que o pH 6,0 proporciona maior atividade da dextranase produzida por *Paecilomyces marquandii*, e que em pH 4,0, apresenta atividade relativa de 90%. Virgen-Ortíz *et al.* (2015)

relataram que o pH 5,2 resulta em maior atividade da dextranase produzida por *Chatomium erraticum*, e observaram atividade relativa superior a 85% na faixa de pH de 4,0 a 6,0. No entanto, ao estudar a dextranase de *Penicillium aculeatum*, Mahmoud *et al.* (2014) observaram que o pH de maior atividade foi 4,5, e que a partir deste valor de pH, a atividade de dextranase caiu abruptamente. Estes resultados demonstram que a dextranase produzida pelo fungo *P. chlamydosporia* apresenta propriedades semelhantes às aquelas já descritas na literatura.

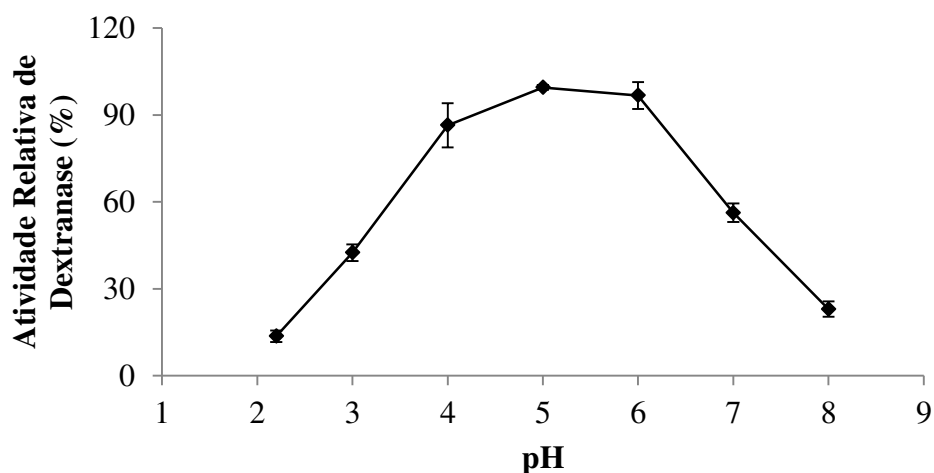


Figura 3. Efeito do pH na atividade enzimática da dextranase parcialmente purificada de *Pochonia chlamydosporia*.

3.2.2. Efeito da temperatura na atividade enzimática

A temperatura de maior atividade da dextranase parcialmente purificada de *P. chlamydosporia* foi 50 °C (Figura 4). A 60 °C a enzima demonstrou apenas 44% de atividade, indicando que a esta temperatura pode ocorrer desnaturação protéica.

Estes resultados corroboram os resultados encontrados por Mahmoud *et al.* (2014), que determinaram que a dextranase produzida por *P. aculeatum* exibiu maior atividade a 45 °C, com atividade relativa de aproximadamente 75% a 40 e a 50 °C. Por outro lado, Virgen-Ortíz *et al.* (2015) e Machado (2009), observaram que a dextranase de *C. erraticum* exibiu atividade máxima a 60 °C e mais de 85% de sua atividade máxima na faixa de temperatura de 55 a 65 °C e que a dextranase de *P. marquandii* apresentou temperatura de maior atividade em 55 °C, e a 60 °C reteve 80% de sua atividade.

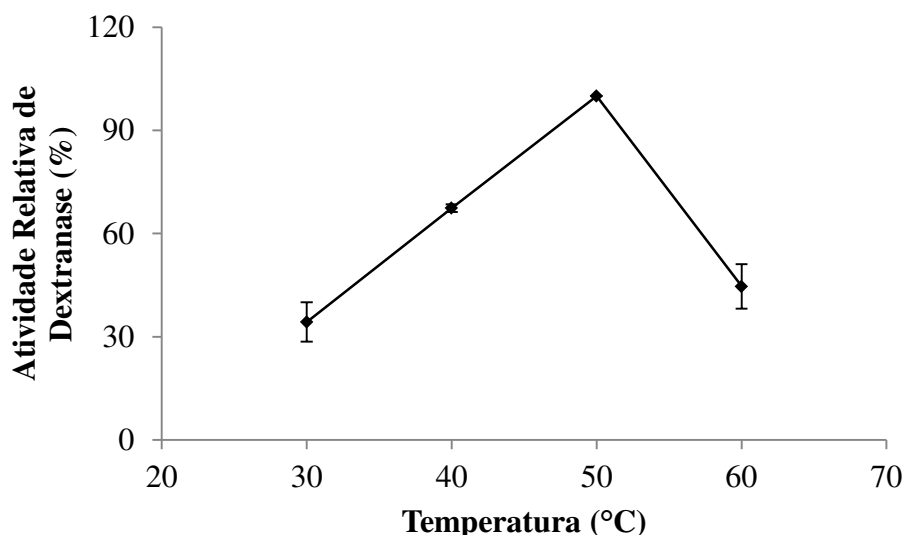


Figura 4. Efeito da temperatura na atividade enzimática da dextranase parcialmente purificada de *Pochonia chlamydosporia*.

3.2.3. Efeito da presença de íons na atividade enzimática

O íon Cu^{2+} atuou como inibidor da atividade da dextranase parcialmente purificada, reduzindo-a significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Dunett em 55%. A presença do íon Mn^{2+} aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade de dextranase em 24% pelo teste de Dunett. Além disso, nota-se que o íon Mg^{2+} aumentou a atividade enzimática em 20%, porém este efeito não foi significativo ($p > 0,05$) pelo teste de Dunett. Os demais íons analisados também não apresentaram efeito significativo ($p > 0,05$) na atividade de dextranase pelo teste de Dunett (Figura 5).

A dextranase de *P. marquandii* teve sua atividade aumentada em 20% e 15% na presença dos íons Fe^{2+} e Mn^{2+} na concentração de 10 mM e perdeu aproximadamente 50% de sua atividade na presença de Cu^{2+} e Pb^{2+} e 40% na presença de Ag^+ , também a 10 mM (Machado, 2009). A dextranase de *C. erraticum* sofreu inibição total em presença de Ag^+ 1 mM, e inibição de 77% em presença de Cu^{2+} 1 mM, e teve sua atividade aumentada em 18% e 25% quando incubada com Ca^{2+} e Co^{2+} 1 mM (Virgen-Ortíz *et al.*, 2015). Cu^{2+} e Hg^{2+} inibiram completamente a dextranase de *C. gracile*, e Fe^{3+} inibiu em 40% na concentração de 1 mM (Hattori, Ishibashi e Minato, 1981). A dextranase de *P. funiculosum* foi totalmente inibida por Hg^{2+} , teve sua atividade reduzida em aproximadamente 70% quando incubada com Ag^+ , e foi ativada por Co^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} 2 mM em 42%, 39% e 21%, respectivamente (Sugiura *et al.*, 1973).

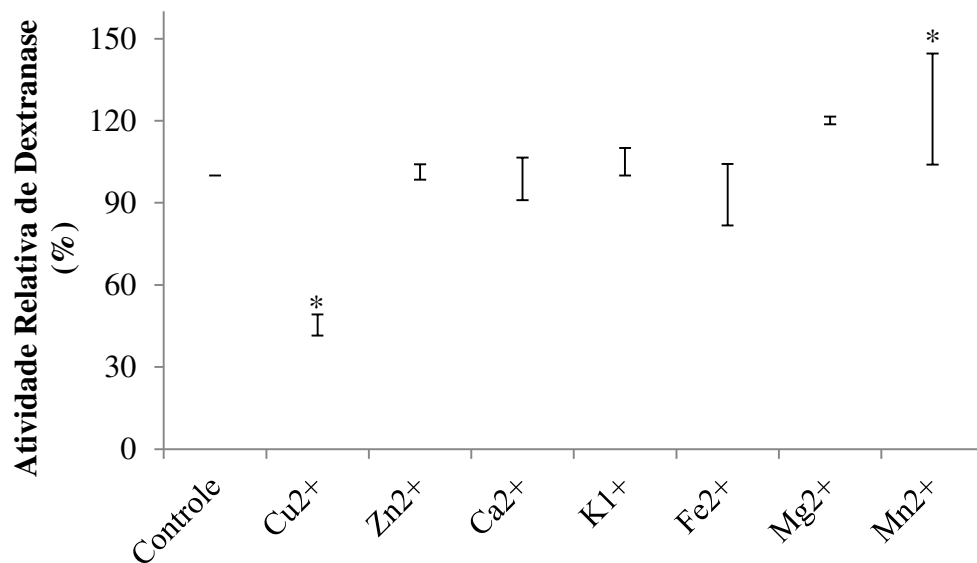


Figura 5. Efeito da presença de íons sobre a atividade enzimática da dextranase parcialmente purificada de *Pochonia chlamydosporia*. * indica quais íons apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) na atividade da dextranase, pelo teste de Dunett, em relação ao controle.

4. CONCLUSÃO

A dextranase produzida por *Pochonia chlamydosporia* foi purificada apenas parcialmente em uma única etapa, com fator de purificação de 2,58, tendo sua atividade específica aumentada de 44,44 U/mg para 114,66 U/mg.

A temperatura e pH de maior atividade da enzima parcialmente purificada foram, respectivamente, 50 °C e a faixa de pH 4,0 a 6,0.

Com relação às mudanças na atividade de dextranase ocasionadas pela presença de íons, verificou-se que Cu^{2+} inibiu a atividade de dextranase em 55% e Mn^{2+} aumentou a atividade da enzima em 24%.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. M. *et al.* Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental parasitology**, v. 121, n. 4, p. 338–41, 2009.

ARAÚJO, J. V. *et al.* In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. **Parasitology Research**, v. 102, p. 787–790, 2008.

BHATIA, S. *et al.* Dextranase production from *Paecilomyces lilacinus* and its application for dextran removal from sugarcane juice. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p. 133–138, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAGA, F. R. *et al.* In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1559–1564, 2008.

BRAGA, F. R. *et al.* Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 3-4, p. 264–268, 2010.

BRAGA, F. R. *et al.* Ovicidal action of a crude enzymatic extract of fungus *Pochonia chlamydosporia* against *Ancylostoma sp* eggs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 116–118, 2011.

EGGLESTON, G. Deterioration of cane juice—sources and indicators. **Food Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 95–103, 2002.

FRASSY, L. N. *et al.* Destruction of *Toxocara canis* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 102–104, 2010.

GOUVEIA, A. DE S. *et al.* Enzymatic action of proteases and chitinases of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Diectophyma renale* eggs. **Anais da V Jornada Acadêmica Internacional da Bioquímica**, v. 1, n. 1, p. 88–89, 2015.

HATTORI, A.; ISHIBASHI, K.; MINATO, S. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 2409–2416, 1981.

JAISWAL, P.; KUMAR, S. Impact of media on isolation of dextranase producing fungal strains. **Journal of Scientific Research**, v. 55, p. 71–76, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LELIS, R. T. **Controle biológico de *Echinostoma paraensei* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia***. 48f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2014.

MACHADO, F. P. P. **Produção, purificação e caracterização bioquímica da dextranase de *Paecilomyces marquandii***. 91f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2009.

MAHMOUD, K. F. *et al.* Microbial production and characterization of dextranase. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 9, p. 1095–1113, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOREL DU BOIL, P. G.; WIENESE, S. Enzymic reduction of dextran in process-laboratory evaluation of dextranases. **Proceedings of South African Sugar Technologist Association**, v. 76, p. 435–443, 2002.

PODESTÁ, G. S. *et al.* Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 191–193, 2009.

RODRIGUES, R. **Dextrana: Produção e aplicação industrial**. 50f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e Bacharelado). Universidade Estadual Paulista, 2009.

SILVA, A. R. *et al.* In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 76–79, 2010.

SOARES, F. E. DE F. *et al.* Action of proteases of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs of collared peccary (*Pecari tajacu*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 31, p. 1883–1886, 2015.

SUGIURA, M. *et al.* Studies on dextranase: Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 309, p. 357–362, 1973.

TOBIN, J. D. *et al.* Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. **Biological Control**, v. 46, p. 194–201, 2008.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. *et al.* Kinetics and thermodynamic of the purified dextranase from *Chaetomium erraticum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 80–86, 2015.