



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

NATHÁLIA KELLY DE ARAÚJO

Produção de enzimas quitosanólíticas utilizando *Paenibacillus ehimensis*
e *Paenibacillus chitinolyticus* para obtenção de quitooligossacarídeos

NATAL
2011

Produção de enzimas quitosanolíticas utilizando
Paenibacillus ehimensis e *Paenibacillus*
chitinolyticus para obtenção de
quitoligossacarídeos

Dissertação de mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal do
Rio Grande do Norte – UFRN, como
requisito parcial à obtenção do título de
mestre em bioquímica.

Orientador:

Prof^o Dr. Matheus de Freitas Fernandes
Pedrosa

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a Maria Giovana Binder
Pagnoncelli

Natal

2011

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Araújo, Nathália Kelly de.

Produção de enzimas quitosanólíticas utilizando *Paenibacillus ehimensis* e *Paenibacillus chitinolyticus* para obtenção de quitooligossacarídeos / Nathália Kelly de Araújo. – Natal, RN, 2011.

79 f. : Il.

Orientador: Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa.

Co-Orientadora: Prof^a Dra Giovana Binder Pagnoncelli.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

1. Polissacarídeos – Dissertação 2. Quitosanases – Dissertação. 3. Quitooligossacarídeos – Dissertação. I. Pedrosa, Matheus de Freitas Fernandes. II. Pagnoncelli, Giovana Binder. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 577.124.5

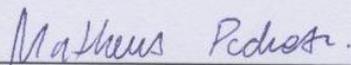
NATHÁLIA KELLY DE ARAÚJO

PRODUÇÃO DE ENZIMAS QUITOSANOLÍTICAS UTILIZANDO OS *Paenibacillus ehimensis* E *Paenibacillus chitinolyticus* PARA OBTENÇÃO DE QUITOOLIGOSSACARÍDEOS

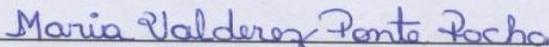
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 21/03/2011

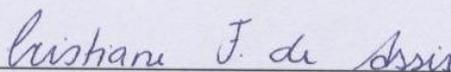
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Matheus de Freitas Fernandes Pedrosa
Departamento de Farmácia - UFRN
Orientador



Prof^a. Dr^a. Maria Valderoz Ponte Rocha
Departamento de Agrotecnologia e Ciências Sociais- UFRSA
1º Examinador



Prof^a. Dr^a. Cristiane Fernandes de Assis
Departamento de Farmácia – UFRN
2º Examinador

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Otávio de Barros Neto** e **Maria Áurea de Araújo** (in memoriam), por tudo que me ensinaram no nosso curto tempo de convívio. Apesar de ter sido breve os nossos dias juntos, o que aprendi se refletirá por toda a minha vida.*

Agradecimentos

Aos meus pais por terem me mostrado que a educação é a única herança verdadeira;

Aos meus irmãos, em especial Sandra, pelos incentivos, orientações e risadas;

A Tiago pela paciência, amor, afeto e companheirismo;

A meus sobrinhos, em especial André, por me encantar com a beleza da infância;

A Professora Dr^a Giovana, por ter me mostrado os primeiros passos da vida de pesquisadora. Você (ou a senhora?) é uma verdadeira professora, obrigada por ter me mostrado o caminho das pedras durante a iniciação científica e por te me auxiliado tanto durante todo o mestrado;

Ao Professor Dr. Matheus pelas orientações e por ter acreditado no meu trabalho;

Professora Dr^a Gorete e Dr. Everaldo pela amizade, conselhos e por terem me aceitado e apoiado no mundo da Engenharia Bioquímica;

A Professora Dr^a Cristiane pelo imenso carinho e conselhos durante a execução deste trabalho. Fofitita, te adoro!

Ao professor Dr. Mauricio (in memoriam) pela confiança e orientações que ficarão para sempre guardadas no meu coração;

A professora Dr^a Valderez Rocha por ter aceitado a proposta de contribuir com este trabalho;

Tia Zélia e Edgar pelo afeto e apoio que senti todas as vezes que estive ao lado dos dois;

A Rubia, a minha priminha do coração, Chilena que eu amo demais!

A Dayse Santos por estar sempre por perto ajudando a corrigir o meu jeito Natalício de ser;

A Larissa Lira por toda a psicologia empregada na tentativa de me fazer uma pessoa de juízo;

Dayse Caroline por me entender tão bem, dois peixinhos se conhecem bem;

Aos demais colegas de sala do mestrado pela ajuda durante os tão difíceis dias de seminários e artigos;

Aos meus alunos de iniciação científica: Louise, Humberto, Luã e Paulo. Sem vocês esse trabalho não teria chegado ao fim;

Aos companheiros de laboratório, em especial Francisco, Michelly, Rodrigo e Alexandre. Eu sei que eu peço demais e às vezes sou um pouco chata, obrigada por termos uma convivência tão boa;

A professora Dra. Luciana da Matta, pela atenção, esforço e ajuda indispensáveis para o aperfeiçoamento desta dissertação;

Ao PPG do departamento de Bioquímica pela oportunidade de concluir minha pós-graduação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo financeiro durante meu mestrado.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já têm a forma do nosso corpo e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."

Fernando Pessoa

RESUMO

A obtenção de oligossacarídeos a partir da quitosana tem sido alvo de diversas pesquisas na área farmacêutica, bioquímica, alimentar e médica, devido às propriedades funcionais destes compostos. Este trabalho teve o objetivo de potencializar a produção de quitooligossacarídeos (QOS), através da otimização da produção e caracterização de enzimas quitosanólíticas secretadas pelos microrganismos *Paenibacillus chitinolyticus* e *Paenibacillus ehimensis*, e avaliação do potencial antioxidante dos produtos obtidos. No processo de otimização da produção de quitosanases foram empregadas as estratégias de Planejamento Experimental Fatorial Fracionado e Delineamento Central Composto Rotacional. Os resultados encontrados identificaram a quitosana, a peptona e o extrato de levedura como os componentes que mais influenciaram na produção de quitosanases por estes microrganismos. Com a otimização dos meios de cultivo foi possível obter um aumento de aproximadamente 8,1 vezes (de $0,043\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ para $0,35\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e de 7,6 vezes (de $0,08\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ para $0,61\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) na atividade enzimática de quitosanases produzidas pelos *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis*, respectivamente. Os complexos enzimáticos mostraram alta estabilidade nas faixas de temperatura entre 30°C e 55°C , e de pH entre 5,0 e 9,0. Foi vista a ação de solventes orgânicos, íons bivalentes e outros agentes químicos sobre a atividade destas enzimas, demonstrando alta estabilidade destes complexos brutos e dependência de Mn^{2+} . Os QOS gerados mostraram habilidade de seqüestro do radical DPPH, atingindo uma taxa máxima de seqüestro de 61% e 39% quando estes foram produzidos com enzimas do *P. ehimensis* e *P. chitinolyticus*, respectivamente. A utilização dessas enzimas na forma bruta poderá facilitar seu uso para aplicações industriais.

Palavras-chave: Quitosanases. Quitooligossacarídeos. Antioxidantes.

ABSTRACT

The acquisition of oligosaccharides from chitosan has been the subject of several studies in the pharmaceutical, biochemical, food and medical due to functional properties of these compounds. This study aimed to boost its production of chitooligosaccharides (COS) through the optimization of production and characterization of chitosanolytic enzymes secreted by microorganisms *Paenibacillus chitinolyticus* and *Paenibacillus ehimensis*, and evaluating the antioxidant potential of the products obtained. In the process of optimizing the production of chitosanase were employed strategies Fractional Factorial Experimental Design and Central Composite Rotatable Design. The results identified the chitosan, peptone and yeast extract as the components that influenced the production of chitosanase by these microorganisms. With the optimization of the culture media was possible to obtain an increase of approximately 8.1 times (from 0.043 to 0.35 U.mL U.mL⁻¹) and 7.6 times (from 0.08 U.mL⁻¹ to 0.61 U.mL⁻¹) in the enzymatic activity of chitosanase produced by *P. chitinolyticus* and *P. ehimensis* respectively. Enzyme complexes showed high stability in temperature ranges between 30° and 55° C and pH between 5.0 and 9.0. Has seen the share of organic solvents, divalent ions and other chemical agents on the activity of these enzymes, demonstrating high stability of these crude complexes and dependence of Mn²⁺. The COS generated showed the ability of DPPH radical scavenging activity, reaching a maximum rate of scavenging of 61% and 39% when they were produced with enzymes of *P. ehimensis* and *P. chitinolyticus* respectively. The use of these enzymes in raw form might facilitate its use for industrial applications.

Keywords: Chitosanases. Chitooligosaccharides. Antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da quitina e quitosana.....	2
Figura 2 - Comparação entre a estrutura tridimensional de duas quitosanas.....	4
Figura 3 - Comparação entre a configuração espacial de duas quitosanas visualizadas em dois ângulos com rotação de 90°, em amarelo o sítio catalítico..	5
Figura 4 - Mecanismo de hidrólise de uma molécula de quitosana 80% desacetilada, sob ação das enzimas da subclasse I, II e III.	5
Figura 5 - Gráfico de pareto do Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2^{5-1}) para o cultivo do <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	25
Figura 6 - Gráfico de pareto do Delineamento Composto Central Rotacional para o cultivo do <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	27
Figura 7 - Diferença entre atividade enzimática de dois meios de cultivo para o <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	28
Figura 8 - Gráfico de pareto do Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2^{5-1}) para o cultivo do <i>Paenibacillus ehimensis</i>	30
Figura 9 - Gráfico de pareto do Delineamento Composto Central Rotacional para o cultivo do <i>Paenibacillus ehimensis</i>	31
Figura 10 - Diferença entre atividade enzimática de dois meios de cultivo para o <i>Paenibacillus ehimensis</i>	32
Figura 11 - Efeito da temperatura na estabilidade do extrato enzimático produzido por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	34
Figura 12 - Efeito da temperatura na estabilidade do extrato enzimático produzido por bactéria <i>Paenibacillus ehimensis</i>	35
Figura 13 - Efeito do pH na estabilidade do extrato enzimático produzido por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	37
Figura 14 - Efeito do pH na estabilidade do extrato enzimático produzido por <i>Paenibacillus ehimensis</i>	38
Figura 15 - Efeito de solventes orgânicos (25% v/v) na estabilidade de quitosanas produzidas por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> . O extrato enzimático foi incubado, a temperatura ambiente, na presença de: metanol (A), etanol (B), acetona (C), butanol (D), tolueno (E), acetato de etila (F) e acetonitrila (G).....	39

Figura 16 - Efeito de solventes orgânicos (25% v/v) na estabilidade de quitosanases produzidas por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> . O extrato enzimático foi incubado, a 4°C, na presença de: metanol (A), etanol (B), acetona (C), butanol (D), tolueno (E), acetato de etila (F) e acetonitrila (G).	40
Figura 17 - Efeito de solventes orgânicos (25% v/v) na estabilidade de quitosanases produzidas por <i>Paenibacillus ehimensis</i> . O extrato enzimático foi incubado, a temperatura ambiente, na presença de: metanol (A), etanol (B), acetona (C), butanol (D), tolueno (E), acetato de etila (F) e acetonitrila (G).....	41
Figura 18 - Efeito de solventes orgânicos (25% v/v) na estabilidade de quitosanases produzidas por <i>Paenibacillus ehimensis</i> . O extrato enzimático foi incubado, a 4°C, na presença de: metanol (A), etanol (B), acetona (C), butanol (D), tolueno (E), acetato de etila (F) e acetonitrila (G).....	42
Figura 19 - Efeito de vários agentes químicos (5mM) sobre a atividade enzimática do complexo de quitosanases produzidas por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	44
Figura 20 - Efeito de vários agentes químicos (5mM) sobre a atividade enzimática do complexo de quitosanases produzidas por <i>Paenibacillus ehimensis</i>	44
Figura 21 - Cromatograma dos padrões de quitooligossacarídeos (GlcN) _{n=2-6}	45
Figura 22 - Perfil de QOS produzidos após 1 (a), 3 (b), 6 (c), 9 (d) e 12 horas (e) de hidrólise utilizando o complexo enzimático produzido por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	46
Figura 23 - Perfil de QOS produzidos após 1 (a), 3 (b), 6 (c), 9 (d) e 12 horas (e) de hidrólise utilizando o complexo enzimático produzido por <i>Paenibacillus ehimensis</i> ..	48
Figura 24 - Efeito seqüestrador dos QOS, produzidos a partir da hidrólise da quitosana utilizando o complexo enzimático sintetizado por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> , sob o radical DPPH.....	52
Figura 25 - Efeito seqüestrador dos QOS, produzidos a partir da hidrólise da quitosana utilizando o complexo enzimático sintetizado por <i>Paenibacillus ehimensis</i> , sob o radical DPPH.	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Exemplos de quitosanases produzidas por microrganismos e classificação.....	6
Quadro 2- Possíveis oligômeros obtidos após a ação das subclasses de quitosanases.....	6

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Meio de cultivo “A” utilizado para ativação das cepas.	16
Tabela 2- Meio de cultivo “B” utilizado para produção de quitosanases.	16
Tabela 3- Valores utilizados no planejamento Fatorial Fracionado.....	18
Tabela 4- Valores utilizados no DCCR para o <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	19
Tabela 5- Valores utilizados no DCCR para o <i>Paenibacillus ehimensis</i>	19
Tabela 6- Matriz de planejamento para 5 variáveis independentes (fatores).....	24
Tabela 7- DCCR para o estudo da produção de quitosanase por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	26
Tabela 8- Matriz de planejamento para 5 variáveis independentes (fatores).....	29
Tabela 09- DCCR para o estudo da produção de quitosanase por <i>Paenibacillus ehimensis</i>	31
Tabela 10- Produção de oligômeros (GlcN) ₂₋₆ em diferentes tempos de hidrólise da quitosana utilizando o complexo enzimático produzido por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	47
Tabela 11- Produção de dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmeros, em diferentes tempos de hidrólise da quitosana, utilizando o complexo enzimático produzido por <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	47
Tabela 12- Produção de oligômeros (GlcN) ₂₋₆ em diferentes tempos de hidrólise da quitosana utilizando o complexo enzimático produzido por <i>Paenibacillus ehimensis</i>	49
Tabela 13- Produção de dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmeros, em diferentes tempos de hidrólise da quitosana, utilizando o complexo enzimático produzido por <i>Paenibacillus ehimensis</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

AE	Atividade enzimática
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra- acético
GH	Glicosil Hidrolases
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GP	Grau de polimerização
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
QOS	Quitooligossacarídeos
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 POLISSACARÍDEOS	1
1.2 QUITINA E QUITOSANA	1
1.3 QUITOSANASES	3
1.4 CONVERSÃO DA QUITOSANA EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS (QOS)	7
1.4.1 Produção de QOS por métodos químicos	7
1.4.2 Produção de QOS por método enzimático	8
1.5 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DOS QOS	9
1.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 MATERIAIS	14
3.1.1 Material Biológico	14
3.1.2 Reagentes	14
3.1.3 Equipamentos	14
3.2 MÉTODOS	15
3.2.1 Cultivo dos Microrganismos	15
3.2.2 Análise da atividade enzimática	17
3.2.3 Otimização da produção de quitosanases	17
3.2.4 Caracterização Físico-Química do Extrato Bruto	19
3.2.5 Produção de QOS	21
3.2.6 Análises do perfil dos QOS produzidos	21
3.2.7 Avaliação de atividade antioxidante	21
3.2.8 Análise estatística	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	23
4.1.1 Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2^{5-1}) - <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	23

4.1.2 Delineamento Composto Central Rotacional - <i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	25
4.1.3 Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2^{5-1}) - <i>Paenibacillus ehimensis</i>	28
4.1.4 Delineamento Composto Central Rotacional - <i>Paenibacillus ehimensis</i>	30
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO	34
4.2.1 Efeito térmico na estabilidade enzimática	34
4.2.2 Efeito do pH na estabilidade enzimática	36
4.2.3 Efeito de solventes orgânicos na estabilidade enzimática	38
4.2.4 Efeito de diferentes íons e agentes químicos sobre a atividade enzimática	43
4.4 PERFIL DOS QUITOOLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS	45
4.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA	51
4.5.1 Sequestro do radical livre DPPH	51
5 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo estão apresentados tópicos sobre, polissacarídeos, quitina e quitosana, quitosanas, conversão da quitosana em quitooligossacarídeos (QOS), aplicações biológicas destes, e planejamento experimental. Os itens aqui contemplados estão relacionados ao tema desta dissertação e servirão de base para explicar os fenômenos observados durante a produção de QOS a partir das enzimas produzidas.

1.1 POLISSACARÍDEOS

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de média até alta massa molecular. A cada, ano a fotossíntese converte mais de 100 bilhões de toneladas de CO₂ e H₂O em celulose e outros produtos vegetais. Certos carboidratos são a base da dieta na maior parte do mundo e a oxidação dos carboidratos é a principal via metabólica fornecedora de energia na maioria das células não-fotossintéticas (NELSON; COX, 2006).

Os carboidratos possuem duas funções principais: armazenamento de energia e, componente estrutural de paredes celulares e exoesqueleto de animais. O amido e o glicogênio são homopolissacarídeos estocados como combustíveis nas células dos vegetais, animais e bactérias. Eles consistem de moléculas D-glucose unidas por ligações α (1 \rightarrow 4) e todos contêm ramificações. A celulose, a quitina e a dextrana exercem função estrutural. A celulose, composta por moléculas de D-glucose unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) confere força e rigidez às paredes de células vegetais. A quitina, um polímero de moléculas de *N*-acetil-D-glucosamina unidas por ligações β (1 \rightarrow 4), fortalece o exoesqueleto dos artrópodes. A dextrana forma uma capa adesiva ao redor de algumas bactérias (NELSON; COX, 2006).

1.2 QUITINA E QUITOSANA

Caracterizada como um homopolímero linear, a quitina é composta por unidades de *N*-acetil-D-glucosamina unidas por ligações β (1 \rightarrow 4). Sua única diferença química com a celulose, carboidrato mais abundante na natureza, é a substituição de um grupo hidroxila em C-2 por um grupo amino acetilado. A quitina forma fibras estendidas similares àquelas da celulose e, como a celulose, não é digerível por animais vertebrados. Depois da celulose, é o polissacarídeo mais abundante na natureza (NELSON; COX, 2006).

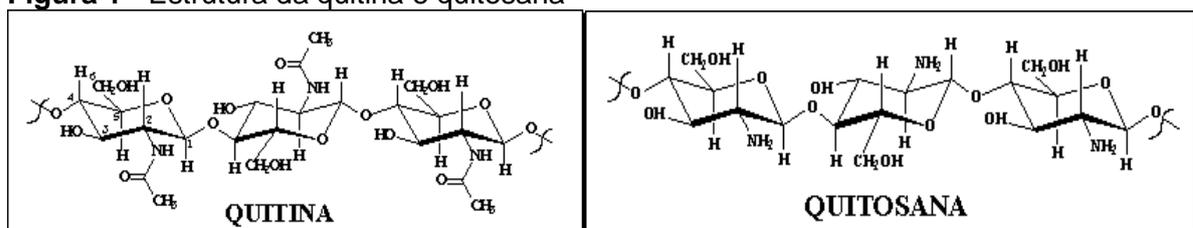
Outras características da quitina são a sua insolubilidade em água e a existência de duas formas cristalinas polimórficas, α e β . A α -quitina consiste de folhas fortemente empacotadas alternando entre cadeias paralelas e antiparalelas. Esta forma da quitina é encontrada no exoesqueleto de artrópodes, insetos e na parede celular de fungos e leveduras. A β -quitina ocorre com menos frequência na natureza do que a α -quitina, mas pode ser extraída de gladius de lula (AAM et al., 2010).

Estima-se que a bioprodução de quitina atinja 10^{10} a 10^{11} toneladas por ano. Por ser a biodegradação da quitina um processo muito lento, o acúmulo dos produtos de descarte do processamento de crustáceos tornou-se um problema para as indústrias que processam produtos marinhos. Para a maioria dos países produtores o principal desafio é encontrar uma forma de descartar esse resíduo sem danos ao meio ambiente (KUMAR; THARANATHAN, 2004; KURITA, 2001; WANG et al., 2008).

A partir da desacetilação da quitina obtêm-se a quitosana. A quitosana é um amino polissacarídeo composto principalmente de unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glucose, também conhecido por glucosamina (GlcN), ligadas linearmente por ligações glicosídicas β -1,4 com grau de acetilação variado. Geralmente, acima de 80% das unidades de glucosamina encontram-se desacetiladas (KURITA, 2001). A Figura 1 apresenta as estruturas da quitina e da quitosana.

É possível isolar quitosana diretamente da parede celular de certos fungos, mas quitosanas comercialmente disponíveis são usualmente preparadas de quitina em um processo heterogêneo de desacetilação (AAM et al., 2010).

Figura 1 - Estrutura da quitina e quitosana



(Fonte: Polymar Co.)

A quitosana é insolúvel em água, mas dissolve-se em soluções aquosas de ácidos orgânicos como ácido acético, fórmico e cítrico, além de ácidos inorgânicos como, ácido clorídrico diluído. A sua solubilidade está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica. Quanto maior a

quantidade desses grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água. Portanto, o grau de acetilação da quitosana tem efeito marcante na sua solubilidade (JANEGITZ et al., 2007; SANTOS et al., 2003).

Há uma ampla variedade de propriedades físico-químicas e biológicas descritas para a quitosana. Isto, em combinação com a não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, fazem da quitosana suscetível para uso em inúmeras aplicações na agricultura, cosméticos, tratamento de água e medicina (BHATNAGAR; SILLANPÄÄ, 2009; KIM; RAJAPAKSE, 2005; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

1.3 QUITOSANASES

A despolimerização enzimática da quitosana envolve principalmente as quitosanases. Estas enzimas promovem a hidrólise de ligações glicosídicas entre açúcares e assim são chamadas de glicosil hidrolases (GH). Segundo Aam et al. (2010) enzimas com atividade quitosanólíticas têm sido descritas nas famílias GH 5, 7, 8, 46, 75 e 80, sendo encontrada em uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, e uma pequena quantidade em plantas (CHEN; XIA; YU, 2005).

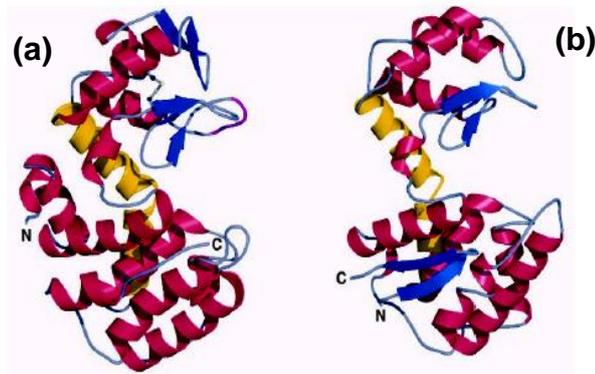
As GH da família 5 contêm uma ampla variedade de atividades enzimáticas, incluindo quitosanases, celulasas, liqueninases, manases e xilases. A atividade quitosanase tem sido detectada em somente poucos casos, sendo que esta atividade parece estar ligada ao sitio ativo das celulasas. A GH 7 é uma família de celulasas e, novamente, poucos casos de atividade quitosanase tem sido detectada nestas enzimas. Em GH 8, enzimas ditas como quitosanases ocorrem com mais frequência, porém esta família possui poucas quitosanases verdadeiras. As outras três famílias, GH 46, GH 75 e GH 80 possuem exclusivamente quitosanases. As famílias GH 75 e GH 80 são formadas por poucos membros, não há informações estruturais e poucas informações funcionais disponíveis sobre essas enzimas. As quitosanases melhor estudadas são aquelas pertencentes a família 46 (AAM et al., 2010).

Os mecanismos de hidrólise da quitosana podem variar de acordo com o tipo de quitosanase obtida, pois diferentes microrganismos produzem enzimas com determinadas diferenças na conformação da molécula. As quitosanases podem ser divididas em duas categorias quanto ao seu mecanismo de ação, endoquitosanases

e exoquitosanases. As endoquitosanases catalisam a hidrólise de maneira aleatória no interior da molécula de quitosana, gerando oligossacarídeos de diversos tamanhos, enquanto as exoquitosanases hidrolisam a partir das terminações não redutoras, resultando em produtos finais com unidades redutoras (PETER, 2005).

É importante entender que o reconhecimento específico do substrato e os mecanismos catalíticos das quitosanases são devido à estrutura tridimensional das enzimas. A Figura 2 representa a estrutura de duas quitosanases obtidas a partir de diferentes microrganismos, apenas algumas partes apresentam similaridade (SAITO et al., 1999).

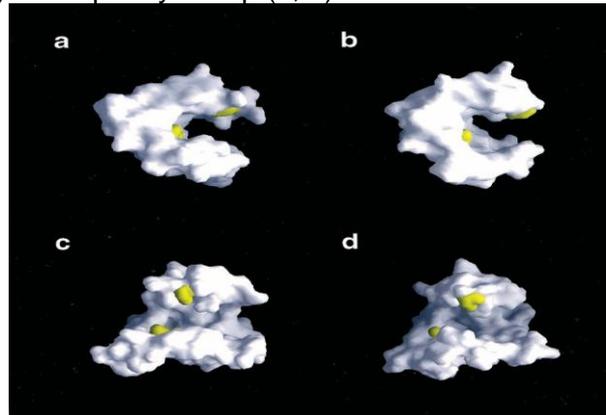
Figura 2 - Comparação entre a estrutura tridimensional de duas quitosanases. (a) Molécula de quitosanase extraída do cultivo de *Bacillus circulans* e (b) molécula de quitosanase extraída do cultivo do *Streptomyces sp.*



(Fonte: Saito et al., 1999)

A diferença na especificidade é explicada pelos diferentes arranjos espaciais na ligação com o substrato, pois moléculas com diferenças na conformação podem apresentar sítios catalíticos em locais diferentes. Na Figura 3 a parte em amarelo representa o sítio catalítico das quitosanases do *Bacillus circulans* (a, c) e *Streptomyces sp* (b, d) (SAITO et al., 1999).

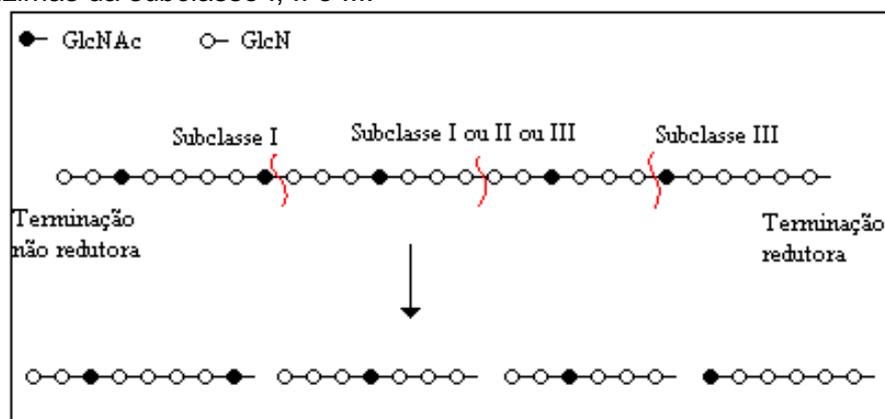
Figura 3 - Comparação entre a configuração espacial de duas quitosanases visualizadas em dois ângulos com rotação de 90°, em amarelo o sítio catalítico. Quitosanases produzidas por *Bacillus circulans* (a, c) e *Streptomyces* sp (b, d).



(Fonte: Saito et al., 1999)

O reconhecimento do substrato pelas quitosanases permite a quebra em determinadas posições. De acordo com essa especificidade, as quitosanases são classificadas em três subclasses. Na subclasse I as enzimas quebram as ligações GlcN-GlcN ou GlcNAc-GlcN, as quitosanases na subclasse II quebram somente as ligações GlcN-GlcN, reconhecendo especificamente a seqüência $-(\text{GlcN})_3$. E as enzimas da subclasse III quebram as ligações das unidades GlcN-GlcN ou GlcN-GlcNAc (PETER, 2005; SAITO et al., 1999). Na Figura 4 é possível visualizar como acontece a hidrólise de uma molécula de quitosana.

Figura 4 - Mecanismo de hidrólise de uma molécula de quitosana 80% desacetilada, sob ação das enzimas da subclasse I, II e III.



(Fonte: Pagnoncelli, 2008)

O Quadro 1 mostra alguns exemplos de quitosanases produzidas por diferentes microrganismos e os produtos gerados, de acordo com o local de hidrólise.

Quadro 1 - Exemplos de quitosanases produzidas por microrganismos e classificação.

Microrganismo	GP	Terminação não redutora	Terminação redutora	Subclasse
<i>Penicillium islandicum</i>	2-3	GlcN	GlcN/GlcNAc	-
<i>Bacillus pumilus</i> BN-262	2-4	GlcN	GlcN/GlcNAc	I
<i>Streptomyces</i> N174	2-4	GlcN	GlcN/GlcNAc	I
<i>Bacillus</i> sp. 7-M	2-6	GlcN	GlcN	II
<i>S. griseus</i> HUT 6037	2-6	GlcN/ GlcNAc	GlcN	III
<i>B. circulans</i> MH-K1	2-5	GlcN/ GlcNAc	GlcN	III
<i>B. circulans</i> WL-12	2-5	GlcN/ GlcNAc	GlcN	III

Grau de Polimerização (GP). (Fonte: Peter, 2005)

Após conhecer os mecanismos de hidrólise da quitosana por essas quitosanases, é possível estabelecer os possíveis produtos obtidos após o processo de hidrólise. Levando em consideração a classe da enzima utilizada e a distribuição das unidades de GlcNAc na quitosana, o Quadro 2 apresenta os prováveis oligômeros obtidos da hidrólise.

Quadro 2 - Possíveis oligômeros obtidos após a ação das subclasses de quitosanases.

	Subclasse I (<i>Streptomyces</i> sp. N ^o 174)	Subclasse II (<i>Bacillus</i> sp. N ^o 7-M)	Subclasse II (<i>B. circulans</i> MH-K1)
Produtos da degradação	●●-	●●-	●●-
	●●●-	●●●-	●●●-
	●○-	●●●●-	●○●●-
	●●○-	●○●●●-	●●○●●-
	●○○-	●●○●●-	○●●●-
	●●○○-	●○●●●●-	
	●○○○-	●●○●●●-	
	●○○○○-		
Pontos de quebra	GlcN-GlcN	GlcN-GlcN	GlcN-GlcN
	GlcNAc-GlcN		GlcN-GlcNAc

GlcN (●), GlcNAc (○), unidades redutoras (○- e ●-). (Fonte: Saito et al., 1999)

A presença de grupos de acetil na molécula de quitosana é importante para aumentar o grau de hidrólise da molécula e permitir a formação dos quitoooligossacarídeos com grau de polimerização (GP) acima de três, os quais apresentam maior atividade biológica. A caracterização das quitosanases extraídas de diversos microrganismos, assim como os produtos obtidos após a hidrólise da quitosana, são critérios utilizados para avaliar o potencial dessas enzimas (SAITO et al., 1999).

1.4 CONVERSÃO DA QUITOSANA EM QUITOOLIGOSSACARÍDEOS (QOS)

A hidrólise da quitosana é um processo similar ao que ocorre com outros polissacarídeos, na qual a presença de determinados agentes rompe as ligações glicosídicas. Essa degradação das ligações glicosídicas pode ser obtida utilizando diferentes metodologias, nas quais os produtos gerados (quitoooligossacarídeos) variam o GP, como também a seqüência das unidades de GlcN e N-acetilglucosamina (GlcNAc) no oligômero gerado. Entre os métodos já descritos encontra-se hidrólise ácida utilizando ácidos concentrados, hidrólise enzimática, degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio, degradação ultra-sônica, químico-enzimático (KIM; RAJAPAKSE, 2005) e radiação (HAI et al., 2003), sendo as hidrólise ácida e a enzimática as mais utilizadas.

1.4.1 Produção de QOS por métodos químicos

Entre os métodos químicos para hidrólise da quitosana, a hidrólise ácida é provavelmente o mais conhecido (AAM et al., 2010). Para a produção em grande escala de QOS, este tipo de hidrólise pode ser utilizada para romper as ligações glicosídicas da quitosana, podendo ser realizada através do uso de ácido clorídrico (HCl) (DOMARD; CARTIER, 1989) ou Ácido Nitroso (HNO_2) (TØMMERAAS et al., 2001). Esse método é de fácil execução, porém esse mecanismo resulta em um baixo rendimento de oligômeros e grande quantidade de monômeros, além de não poderem ser utilizados como material bioativo devido à possível presença de contaminação por compostos químicos tóxicos como, por exemplo o uso de HNO_2 pode ocasionar modificações estruturais no produto final (CABRERA; CUTSEM, 2005). Outro inconveniente desse método é a necessidade de utilizar altas temperaturas e grandes concentrações de reagentes, o que pode causar problemas ambientais (RONCAL et al., 2007). Por estes motivos, alto risco associado à

poluição ambiental, baixas taxas de produção e uso de alguns componentes tóxicos, os QOS provenientes de hidrólise química apresentam desvantagens para serem comercializados (KIM; RAJAPAKSE, 2005).

Outro método conhecido para a produção de QOS é a sua síntese química. Este método requer múltiplos passos de proteção e desproteção, e não é um procedimento de rotina atualmente. A síntese química dos QOS fornece componentes puros, porém a maioria dos métodos existentes hoje requer tempo e o uso extensivo de solventes orgânicos, além disso, não são capazes de produzir outras moléculas, além de homo-oligômeros (AAM et al., 2010).

1.4.2 Produção de QOS por método enzimático

Ao invés do agressivo método de hidrólise ácida, a quitosana pode ser hidrolisada em condições brandas utilizando enzimas para produzir QOS. As enzimas catalisam a hidrólise de forma mais específica e permitem um controle no decorrer do processo e, conseqüentemente, controle do GP dos oligômeros gerados (KIM; RAJAPAKSE, 2005; KUO; CHEN; CHIANG, 2004; MING et al., 2006; RONCAL et al., 2007). A quitosanase, por apresentar maior especificidade, é a principal enzima utilizada para a hidrólise da quitosana.

A especificidade das enzimas que hidrolisam quitosana tem sido tradicionalmente estudada pela extensiva hidrólise enzimática do polímero e subsequente isolamento e caracterização dos oligômeros resultantes. Recentemente, estudos com quitosanases têm demonstrado que o perfil do produto muda consideravelmente durante as reações de hidrólise. Devido às enzimas terem diferentes afinidades de ligação por diversas seqüências no substrato, reações demonstram múltiplas cinéticas, e a mistura de produtos obtidos no fim de cada fase difere consideravelmente (AAM et al., 2010).

Vários autores têm empregado enzimas inespecíficas, tais como, papaína e celulase para degradar quitosana (TERBOJEVICH; COSANI; MUZZARELLI, 1996; XIE; WEI; HU, 2010). Uma vez que estas preparações enzimáticas tendem a ser grosseiras e derivadas de diferentes fontes (por exemplo, fungos, bactérias e plantas) que são conhecidas produtoras de enzimas quitosanolíticas, permanece a dúvida sobre quais enzimas catalisam as reações de hidrólise da quitosana neste caso. Além disso, quitinases podem agir em quitosanas parcialmente *N*-acetiladas pelo reconhecimento de resíduos GlcNAc na seqüência de açúcares da molécula de

quitosana (KIM; RAJAPAKSE, 2005). Entretanto, para a finalidade prática de produção de QOS, o uso de enzimas inespecíficas pode ser bastante útil (AAM et al., 2010).

Segundo Pagnoncelli (2008), as bactérias da espécie *Paenibacillus chitinolyticus* NRRL B-23119 e *Paenibacillus ehimensis* NRRL B-23118, previamente isoladas de amostras de solo coletado no Japão (KUROSHIMA et al., 1996), são produtoras de enzimas quitosanólíticas e apresentam potencial para a produção de QOS. Os complexos enzimáticos produzidos por esses microrganismos apresentaram a capacidade de hidrolisar a quitosana e gerar oligossacarídeos com o GP desejado (tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros, os quais apresentam maior atividade biológica), além de apresentarem uma alta estabilidade quando expostos em condições ótimas de atividade em relação a outras quitosanases purificadas e já relatadas na literatura (PAGNONCELLI, 2008; PAGNONCELLI et al., 2010). A estabilidade observada por esses dois complexos enzimáticos torna essas enzimas adequadas para serem utilizadas em processos industriais, porém a utilização dos complexos não permitiu que fosse alcançado o máximo rendimento em termos de produção e atividade enzimática já que não foram utilizados meios de fermentação otimizados.

1.5 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DOS QOS

Os oligossacarídeos provenientes da hidrólise da quitosana, derivados de glucosamina, têm despertado muito interesse na área farmacêutica, química, alimentar e médica, devido às suas propriedades biológicas. Diversas pesquisas relacionadas com a avaliação dessas atividades e formas de obtenção desses oligômeros vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos (ASSIS et al., 2010; KIM; RAJAPAKSE, 2005; LIANG et al., 2010; SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999; SHEN et al., 2009; XU et al., 2010;).

Dentre essas propriedades, destacam-se a atividade antitumoral (MAEDA; KIMURA, 2004; PRASHANTH; THARANATHAN, 2005; SHEN et al., 2009; SUZUKI et al., 1986; XU et al., 2008), antibacteriana (JEON; PARK; KIM, 2001; ZHENG; ZHU, 2003), prebiótica, antidiabética, imunoestimulante, aceleração da absorção de cálcio, antimutagênica, estimula a recuperação de tecidos e a ativação da resistência de plantas contra insetos e ataques de patógenos (RONCAL et al., 2007), antifúngica (LEE et al., 2006; XIA et al., 2011), antiinflamatória, antiviral,

antioxidante (XIA et al., 2011; XU et al., 2010), atuação na diminuição da absorção gorduras (XIA; LEE, 2008), aumento do crescimento ósseo (RATANAVARAPORN et al., 2009), prevenção da adesão bacteriana em células humanas (RHOADES et al., 2006) e uso como vetor para entrega de genes (KÖPING-HÖGGARD et al., 2003; KÖPING-HÖGGARD et al., 2004).

Na avaliação da atividade dos QOS em células tumorais foi observada atividade antitumoral, particularmente, no hexâmero e no heptâmero (PRASHANTH; THARANATHAN, 2005). Em outro estudo foi observado que QOS com massa molecular entre 21 e 46 kDa apresentaram atividade antitumoral; quando comparada à quitosana solúvel, com massa molecular de 130 kDa, esta não apresentou efeito no desenvolvimento de tumor em experimentos realizados com sarcoma de 180 em ratos (MAEDA; KIMURA, 2004).

Wang et al. (2009) verificaram que QOS produzidos por hidrólise enzimática, com GP entre 5-4 demonstraram maior poder antioxidante do que aqueles com GP entre 3-1. Em estudos com células humanas de carcinoma hepatocelular, Shen et al. (2009) observaram que QOS de massa molecular 3,99 kDa foram capazes de inibir significativamente o crescimento destas células e, nesse mesmo, estudo foi verificado que estes oligossacarídeos também possuem poder inibitório para metástase.

Xu et al. (2010) avaliaram o efeito antioxidante dos QOS em hepatócitos humanos submetidos a estresse oxidativo. Os resultados encontrados mostram que estes oligossacarídeos, com GP entre 2 e 8, são capazes de seqüestrar os radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e atenuar o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Quitosana e QOS são conhecidos por aumentar a diferenciação de linhagens de células mesenquimais para osteoblastos e conseqüentemente, facilitar a formação do tecido ósseo (AAM et al., 2010).

A partir de hidrólise enzimática e separação através de exclusão molecular, foi possível obter QOS com GP entre 2 e 8 unidades de glucosamina. Essa mistura de oligossacarídeos não inibiu o crescimento de bifidobactérias e bactérias ácido lácticas e sim, as estimulou, podendo ser potencialmente utilizados como prebiótico em alimentos nutracêuticos (LEE et al., 2002). O prebiótico favorece o desenvolvimento das bactérias probióticas, inibindo dessa forma as bactérias patogênicas (CHUNG; DAY, 2002).

Devido a esse potencial, a conversão da quitosana em oligossacarídeos tem sido alvo de diversos estudos, sendo o principal desafio nesse processo a conversão da quitosana em oligossacarídeos com GP em torno de quatro a oito unidades de monossacarídeos, os quais apresentam melhores características funcionais (NAKAKUKI, 2002).

1.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental é uma ferramenta útil para se chegar às condições otimizadas de um processo e para se avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas. Com esta ferramenta é possível reduzir o número de experiências ou repetições e melhorar a qualidade da informação obtida através dos resultados. Isto significa uma sensível diminuição de trabalho e, conseqüentemente, do tempo final e custo (RODRIGUES; IEMMA, 2005). A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que o pesquisador procura (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

A primeira coisa a se fazer no planejamento de um experimento é determinar quais são os fatores (variáveis controladas pelo experimentador) e as respostas de interesse para o sistema que se quer estudar. Tendo selecionado as variáveis importantes, depois se avalia quantitativamente sua influência sob a variável resposta (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

Planejamentos fatoriais são extremamente econômicos e permitem o estudo de muitos fatores experimentais ao mesmo tempo. Para executar um planejamento fatorial precisa-se em primeiro lugar especificar os níveis em que cada fator será estudado, isto é, os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos. Um planejamento fatorial requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

O planejamento fatorial fracionado é uma opção muito interessante, pois permite avaliar os efeitos das variáveis principais com a mesma segurança em relação a planejamento completo. Este tipo de planejamento fornece informações quanto à importância dos efeitos sobre a(s) resposta(s) e se a faixa escolhida de

estudo é a mais adequada, e ainda, em que direção deve-se seguir no próximo planejamento.

Após a realização de um delineamento fracionado para análise de todas as variáveis envolvidas em um processo, uma estratégia a seguida pode ser um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para as variáveis que apresentaram maior significância estatística no primeiro planejamento.

O DCCR é um delineamento simétrico e de segunda ordem, constituído de duas partes: o fatorial 2^k , com um ou mais pontos centrais, e a parte axial. No caso de duas ou três variáveis independentes ou fatores, não há escolhas, não deve-se realizar um fatorial fracionado. Mas para cinco fatores, como nos experimentos realizados neste trabalho, um DCCR necessita de no mínimo 45 ensaios ($2^5 + 10$ pontos axiais + 3 repetições do ponto central). É um número grande de ensaios para primeira avaliação das variáveis. Como na maioria das vezes o processo ainda está longe das condições otimizadas não compensa investir diretamente num completo. Um caminho interessante é explorar as variáveis num planejamento 2^{5-1} com 3 ou mais repetições no ponto central, analisando seus efeitos sobre as respostas e prosseguir com outro(s) planejamento(s) com um número reduzido de fatores, já que na maioria das vezes é possível fixar uma ou mais variáveis após a análise estatística dos efeitos (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Assim, seguindo estas recomendações, neste trabalho foi adotada a estratégia seqüencial de planejamento com a realização de um Fatorial fracionado para cinco variáveis seguido de DCCR para as três variáveis de maior significância estatística.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi a otimização da produção de enzimas quitosanólíticas para obtenção de quitooligossacarídeos bioativos e a caracterização destas enzimas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção de quitosanases
- Caracterizar os complexos enzimáticos produzidos pelos *Paenibacillus ehimensis* e *Paenibacillus chitinolyticus* quanto à:
 - Estabilidade térmica;
 - Estabilidade em pH;
 - Influência de Solventes Orgânicos na atividade enzimática;
 - Influências de íons bivalentes e outros agentes químicos na atividade enzimática;
- Determinar as condições ótimas de atividade dos complexos enzimáticos para a hidrólise da quitosana;
- Identificar e quantificar os quitooligossacarídeos produzidos;
- Avaliar o potencial antioxidante dos quitooligossacarídeos obtidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo são apresentadas as metodologias utilizadas para a realização dos ensaios que geraram os resultados apresentados nesta dissertação. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Material Biológico

As bactérias *Paenibacillus ehimensis* NRRL B-23118 e *Paenibacillus chitinolyticus* NRRL B-23119, previamente isoladas de amostras de solo coletadas no Japão (KUROSHIMA, et al 1996) e obtidas do banco de microrganismos “Agricultural Research Service culture Collection” (Peoria, Illinois – USA), foram utilizadas nesse trabalho. Segundo Pagnoncelli (2008) e Pagnoncelli et al. (2010) estas bactérias são produtoras de quitosanases estáveis, por esta razão foram selecionadas para a execução deste trabalho.

3.1.2 Reagentes

- Quitosana (85% desacetilada, peso molecular: 90-190 KDa) adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo.)
- Padrões de QOS (dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmero) adquiridos da Seikagaku Co. (Japão)
- Componentes de meio de cultivo: peptona, extrato de levedura, glicose, sulfato de magnésio heptahidratado e fosfato dibásico de potássio adquiridos comercialmente.

3.1.3 Equipamentos

- Espectrofotômetro Thermo Spectronic
- Agitador magnético TECNAL TE-081
- Banho-Maria (Tecnal - TE 056)
- Banho-Maria (Tecnal - TE 184)
- Balança analítica eletrônica – Explorer Ohaus
- Micro centrífuga Eppendorf 5415D

- Centrífuga Eppendorf 5804 R
- pHmetro Digimed DM-21
- Purificador de água Milli-Q® Water System da Millipore Corp. (Bedford, USA)
- Incubadora Refrigerada com Agitação (Tecnal TE-42)
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu Co. (Japão)
- Coluna cromatográfica Shim-Pack CLC-NH₂ (Shimadzu Co., Japão)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultivo dos Microrganismos

3.2.1.1 Manutenção das Cepas

Conforme descrito por Pagnoncelli (2008), para o procedimento de conservação das células bacterianas, estas foram cultivadas em caldo nutriente por 24 horas. O cultivo foi conduzido em incubador rotativo com agitação de 120 rpm, a 32°C para o *P. chitinolyticus* e 36°C para o *P. ehimensis*. Após o cultivo, o sobrenadante foi removido através de centrifugação a 2500 x g durante 15 minutos a 20°C e ao precipitado (células) adicionado 1,5 mL de uma solução de glicerol a 10% (v/v). A seguir, estas foram estocadas em *freezer* a -20°C e em nitrogênio líquido a -196°C.

Para as cepas armazenadas em nitrogênio líquido não houve necessidade de repique periódico, enquanto que aquelas armazenadas em *freezer* o estoque foi renovado a cada seis meses.

3.2.1.2 Ativação das cepas

Todos os procedimentos de cultivo de microrganismos utilizados neste trabalho foram realizados em incubador rotativo com agitação de 120 rpm e temperatura fixada em 32°C para o *P. chitinolyticus* e 36°C para o *P. ehimensis* seguindo as recomendações de Pagnoncelli (2008). Inicialmente o concentrado celular, armazenado em glicerol 10% (v/v), foi inoculado em 50 mL de meio de cultivo denominado de “A” (Tabela 1), pH 7,0, e cultivado por 24 horas para ativação das cepas.

Tabela 1 - Meio de cultivo "A" utilizado para ativação das cepas.

Composição	Concentração (g/L)
Peptona	1,0
Extrato de levedura	1,0
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,5
Fosfato dibásico de potássio	1,0
Glicose	2,0

(Fonte: Araújo, 2011)

Esse primeiro cultivo foi chamado de pré-inóculo. Em uma etapa seguinte, 45 mL de meio de cultivo A (Tabela 1), foram inoculados com 5 mL de pré-inóculo e cultivado por mais 4 horas (PAGNONCELLI, 2008). Essa suspensão constituiu o inóculo. Alíquotas de inóculo foram utilizadas para fermentação em meio contendo quitosana conforme descrito abaixo.

3.2.1.3 Produção de quitosanases

Para que ocorra a produção de quitosanases pelos microrganismos se faz necessário a presença de quitosana no meio de cultivo. Após a etapa de ativação das cepas, estas foram inicialmente cultivadas em meio, denominado de "B", contendo quitosana conforme estabelecido por Pagnoncelli (2008) cuja composição está descrita na Tabela 2. Assim, 5 mL da suspensão de inóculo foram inoculados em 45 mL deste meio e cultivadas por 48 horas.

Tabela 2 - Meio de cultivo "B" utilizado para produção de quitosanases.

Composição	Concentração (g/L)
Peptona	6,0
Extrato de levedura	6,0
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,5
Fosfato dibásico de potássio	1,0
Glicose	1,0
Quitosana	2,0

(Fonte: Araújo, 2011)

Após o tempo de cultivo, amostras dessas culturas foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para ensaios de atividade

enzimática e produção de QOS. A produção de enzima foi analisada através da quantificação dos açúcares redutores gerados numa reação enzima/substrato conforme descrita no item 3.2.2.

3.2.2 Análise da atividade enzimática

A avaliação da atividade enzimática, em todos os experimentos abaixo relatado, foi conduzida da seguinte forma: 250 µL de extrato enzimático (caldo fermentado) foram incubados com 250 µL de solução de quitosana 1% (solubilizada em HCl, pH 6,0), a mistura foi aquecida em banho-maria por 30 minutos, com temperatura ajustada para 55°C (modificado de PAGNONCELLI, 2008). A reação foi interrompida por fervura durante 10 minutos. A formação de açúcares redutores foi analisada pelo método do ácido dinitro salicílico, usando D-glucosamina como padrão (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de quitosanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de gerar 1 µmol de D-glucosamina por minuto nas condições descritas acima.

3.2.3 Otimização da produção de quitosanases

O meio de cultivo “B” usado para produção de quitosanases pelos *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis* não havia passado por um processo de otimização, de forma que as melhores condições para produção de enzima não estavam estabelecidas. Com o objetivo de maximizar a produção da enzima foi realizado uma série de experimentos com variações das concentrações dos componentes do meio “B”, inicialmente estabelecido por Pagnoncelli (2008), utilizando a metodologia de planejamento experimental.

A estratégia sequencial de planejamento foi escolhida nesta etapa do trabalho. Foram estudadas as seguintes variáveis: concentração de peptona, extrato de levedura, quitosana, sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4). Para tanto, foi realizado primeiramente um planejamento Fatorial Fracionado (2^{5-1}) para determinar os efeitos destas cinco variáveis sobre a atividade enzimática. Nesta etapa inicial foram realizados um total de 19 ensaios, incluindo 03 repetições do ponto central. Após a análise dos efeitos destas cinco variáveis, foram selecionadas as três variáveis mais significantes para um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

A avaliação da atividade enzimática, variável resposta, foi utilizada para identificação do melhor meio para produção de quitosanases. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 3.2.2 deste capítulo.

3.2.3.1 Fatorial Fracionado 2⁵⁻¹

De acordo com Rodrigues; lemma (2005), a escolha da estratégia do planejamento Fatorial Fracionado reduz o número de ensaios e permite avaliar os efeitos das variáveis com a mesma segurança em relação a um planejamento completo. Esta primeira etapa fornece informações quanto à importância dos efeitos sobre a variável resposta, se a faixa escolhida de estudo é a mais adequada, e ainda, em que direção se deve tomar nas próximas etapas do planejamento. A Tabela 3 apresenta as variáveis estudadas e os níveis com os correspondentes valores originais utilizados no planejamento 2⁵⁻¹.

Tabela 3 - Valores utilizados no planejamento Fatorial Fracionado.

Variáveis	Nível		
	-1	0	+1
Peptona (g/L)	3,0	6,0	9,0
Extrato de levedura	3,0	6,0	9,0
Sulfato de magnésio heptahidratado (g/L)	0,25	0,5	0,75
Fosfato dibásico de potássio (g/L)	0,5	1,0	1,5
Quitosana (g/L)	1,0	2,0	3,0

(Fonte: Araújo, 2011)

3.2.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Nessa etapa do planejamento, foi realizado um ensaio do tipo 2³, com 02 repetições do ponto central e a inclusão de 2 níveis axiais (- α e + α), totalizando assim 16 ensaios.

Após as análises do planejamento Fatorial Fracionado, as três variáveis selecionadas para o DCCR realizado com a bactéria *P. chitinolyticus* foram a concentração de: Peptona, Quitosana e Fosfato dibásico de potássio, cujos valores e níveis encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR para o *Paenibacillus chitinolyticus*.

Variáveis	Nível				
	- α	-1	0	+1	+ α
Peptona (g/L)	0,96	3,0	6,0	9,0	11,04
Quitosana (g/L)	0,32	1,0	2,0	3,0	3,68
Fosfato dibásico de potássio (g/L)	0,16	0,5	1,0	1,5	1,84

(Fonte: Araújo, 2011)

No entanto, para o cultivo do *P. ehimensis* as variáveis que apresentaram maior influência foram: peptona, extrato de levedura e quitosana, cujo os níveis e valores encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores utilizados no DCCR para o *Paenibacillus ehimensis*.

Variáveis	Nível				
	- α	-1	0	+1	+ α
Peptona	0,96g/L	3,0g/L	6,0g/L	9,0g/L	11,04g/L
Extrato de Levedura	0,96g/L	3,0g/L	6,0g/L	9,0g/L	11,04g/L
Quitosana	0,32g/L	1,0g/L	2,0g/L	3,0g/L	3,68g/L

(Fonte: Araújo, 2011)

Os outros componentes do meio de cultivo que não apresentaram grande influência sob a atividade enzimática foram mantidos na condição central (0) do Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} .

3.2.4 Caracterização Físico-Química do Extrato Bruto

Nesta etapa do trabalho, todas as amostras de extrato bruto foram obtidas pela fermentação das bactérias no meio de cultivo "B".

3.2.4.1 Efeito térmico na estabilidade enzimática

Para avaliação isolada do efeito da temperatura na estabilidade das quitosanases, o extrato bruto tanto do *P. ehimensis* como do *P. chitinolyticus* foram incubados, isoladamente, na faixa de temperatura de 30°C até 55°C. Os tempos de incubação foram: 0 (controle), 2, 3, 6, 12, 24, 32 e 48 horas, decorrido estes tempos uma alíquota de enzima foi recolhida para realização da atividade enzimática

conforme descrito no item 3.2.2 deste capítulo. Segundo Pagnoncelli (2008) a temperatura ótima de atividade para os dois complexos enzimáticos brutos em questão é 55°C, por esse motivo a máxima temperatura utilizada para esse estudo foi 55°C. A atividade quitosanolítica da amostra no tempo zero (controle positivo) foi considerada como 100% ativa.

3.2.4.2 Efeito do pH na estabilidade enzimática

O perfil de estabilidade em pH do extrato enzimático, produzido pelos *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis* com atividade quitosanolítica, foi determinado pela quantificação da atividade enzimática residual em pH 6,0 depois da incubação do caldo fermentado, a temperatura aproximadamente de 28°C, em vários valores de pH (4-10) por 3, 6, 12 e 24 horas. O pH utilizado para avaliação da atividade residual (pH 6,0) é o pH ótimo para atividade desta enzimas já determinado por Pagnoncelli (2008).

3.2.4.3 Efeito de solventes orgânicos na estabilidade enzimática

Neste estudo, o efeito de diferentes solventes orgânicos (metanol, etanol, acetona, butanol, tolueno, acetato de etila e acetonitrila 25%, v/v) na estabilidade de enzimas brutas, produzidas por *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis*, foi avaliado. O extrato enzimático bruto foi pré-incubado com solventes orgânicos pelos períodos de 02 horas e 10 dias (tempos definidos como máximo e mínimo), a 4°C e a temperatura de aproximadamente 28°C. A atividade enzimática foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959), conforme descrito no item 3.2.2. A atividade quitosanolítica da amostra sem solvente orgânico, pré-incubada com tampão fosfato 50 mM (controle), foi considerada como 100% ativa.

3.2.4.4 Efeito de diferentes íons e agentes químicos sobre a atividade enzimática

A ação de vários agentes químicos sobre a atividade quitosanolítica das enzimas produzidas pelas bactérias *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis*, foi investigado pela pré-incubação do extrato bruto, a temperatura de cerca de 28°C, com diferentes agentes químicos na concentração de 5 mM (EDTA, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺ e SDS) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), por 2 horas seguido de mensuração da atividade quitosanolítica residual conforme descrito no item 3.2.2. O

extrato enzimático bruto incubado apenas com tampão fosfato foi usado como controle.

3.2.5 Produção de QOS

A produção dos QOS foi realizada pela hidrólise enzimática da quitosana utilizando o extrato enzimático bruto (caldo fermentado), individualmente, do *P. ehimensis* e *P. chitinolyticus*. A reação foi desenvolvida pela mistura, na proporção volumétrica de 1:1, do extrato enzimático com uma solução de quitosana 1% (dissolvida em HCl, pH 6,0) em diferentes tempos de hidrólise (1, 3, 6, 9 e 12 horas). A temperatura escolhida para incubação da mistura foi baseada no teste de estabilidade em diferentes temperaturas, sendo realizada na temperatura de 45°C. Para interromper a reação, após o tempo de hidrólise, o tubo contendo a mistura enzima/substrato foi mergulhado em água fervente por 10 minutos.

Para análise do perfil de QOS produzidos utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Antes da realização deste teste, as amostras foram centrifugadas (12000g por 15 minutos) e filtradas em membrana de 0,22µm.

3.2.6 Análises do perfil dos QOS produzidos

A detecção dos QOS foi conduzida usando CLAE, com coluna Shim-Pack CLC-NH₂ (Shimadzu Co., Japão). A corrida cromatográfica foi realizada usando Acetonitrila (60%) como fase móvel em um fluxo de 0,8 mL/minuto e detectado por índice de refração. Os picos de QOS (GlcN)_{n=2-6} foram quantificados usando uma curva padrão (1-10 mg) de acordo com Liang et al (2007).

3.2.7 Avaliação de atividade antioxidante

Atividade antioxidante é uma das propriedades biológicas dos oligossacarídeos de quitosana (NGO; KIM; KIM, 2008; XIA et al., 2011; XU et al., 2010). Por ser uma propriedade de fácil avaliação, esta foi investigada neste trabalho.

Para analisar a atividade antioxidante dos QOS obtidos através de hidrólise enzimática, utilizando complexos enzimáticos brutos produzidos por *P. ehimensis* e *P. chitinolyticus*, foi realizado um teste para verificar a capacidade seqüestradora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) pelos QOS produzidos.

3.2.7.1 Sequestro do radical livre DPPH

O método do DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) é baseado na captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515nm. Para tanto, foi avaliada a capacidade dos QOS produzidos em seqüestrar o radical livre DPPH.

Amostras de 100µL de diferentes tempos de hidrólise (1, 3, 6, 9 e 12 horas; conforme descrito no item 3.9) foram incubadas com 3,9 mL de DPPH por 15 minutos em ambiente escuro. Após agitação intensa, a absorvância foi mensurada a 515 nm contra um branco (metanol 50%). A capacidade de sequestro do radical foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\text{Capacidade seqüestradora (\%)} = [(\Delta A_{515} \text{ do controle} - \Delta A_{515} \text{ amostra}) / \Delta A_{515} \text{ do controle}] \times 100 \text{ (WANG; CHANG; LIANG, 2010)} \quad (1)$$

Para o grupo controle, foi utilizado 100 µl de uma solução de composta por álcool metílico (50% v/v), acetona (70% v/v) e água (RUFINO et al., 2009).

3.2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± DP. Diferenças estatísticas entre as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey-Kramer. O valor de $p < 0,001$, sendo considerado extremamente significativo.

Nos ensaios para otimização da produção de quitosanases, os resultados foram analisados utilizando software *Statistica 7.0*. Quando os valores apresentaram $p < 0,05$ as análises foram consideradas estatisticamente significante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2^{5-1}) - *Paenibacillus chitinolyticus*

O cultivo do *P. chitinolyticus* foi conduzido em incubador rotativo por 48 horas com temperatura, agitação e pH inicial fixados em 32°C, 120 rpm, e 7,0, respectivamente. O Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2^{5-1}), com 16 ensaios e 03 repetições do ponto central, foi empregado para avaliar a influência dos componentes do meio de cultivo (peptona, extrato de levedura, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ e quitosana) na produção de quitosanases. Os 19 meios de cultivo foram preparados e cultivados, de maneira aleatória, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Matriz de planejamento para 5 variáveis independentes (fatores). A, Peptona (g.L^{-1}); B, Extrato de levedura (g.L^{-1}); C, K_2HPO_4 (g.L^{-1}); D, MgSO_4 (g.L^{-1}); E, Quitosana (g.L^{-1}). Na última coluna tem-se a atividade enzimática (AE) (U.mL^{-1}), para cada um dos dezenove meios estudados, resultante de hidrólise da quitosana utilizando complexo enzimático bruto do *Paenibacillus chitinolyticus* após 48 horas de cultivo.

Ensaio	A	B	C	D	E	AE (U.mL^{-1})	DP
1	3,0	3,0	0,5	0,25	3,0	0,202	± 0.002
2	9,0	3,0	0,5	0,25	1,0	0,048	± 0.001
3	3,0	9,0	0,5	0,25	1,0	0,107	± 0.003
4	9,0	9,0	0,5	0,25	3,0	0,086	± 0.002
5	3,0	3,0	1,5	0,25	1,0	0,079	± 0.001
6	9,0	3,0	1,5	0,25	3,0	0,100	± 0.001
7	3,0	9,0	1,5	0,25	3,0	0,051	± 0.003
8	9,0	9,0	1,5	0,25	1,0	0,028	± 0.002
9	3,0	3,0	0,5	0,75	1,0	0,064	± 0.002
10	9,0	3,0	0,5	0,75	3,0	0,057	± 0.002
11	3,0	9,0	0,5	0,75	3,0	0,120	± 0.004
12	9,0	9,0	0,5	0,75	1,0	0,053	± 0.002
13	3,0	3,0	1,5	0,75	3,0	0,107	± 0.003
14	9,0	3,0	1,5	0,75	1,0	0,040	± 0.001
15	3,0	9,0	1,5	0,75	1,0	0,043	± 0.001
16	9,0	9,0	1,5	0,75	3,0	0,050	± 0.005
17	6,0	6,0	1,0	0,5	2,0	0,043	± 0.001
18	6,0	6,0	1,0	0,5	2,0	0,038	± 0.001
19	6,0	6,0	1,0	0,5	2,0	0,052	± 0.003

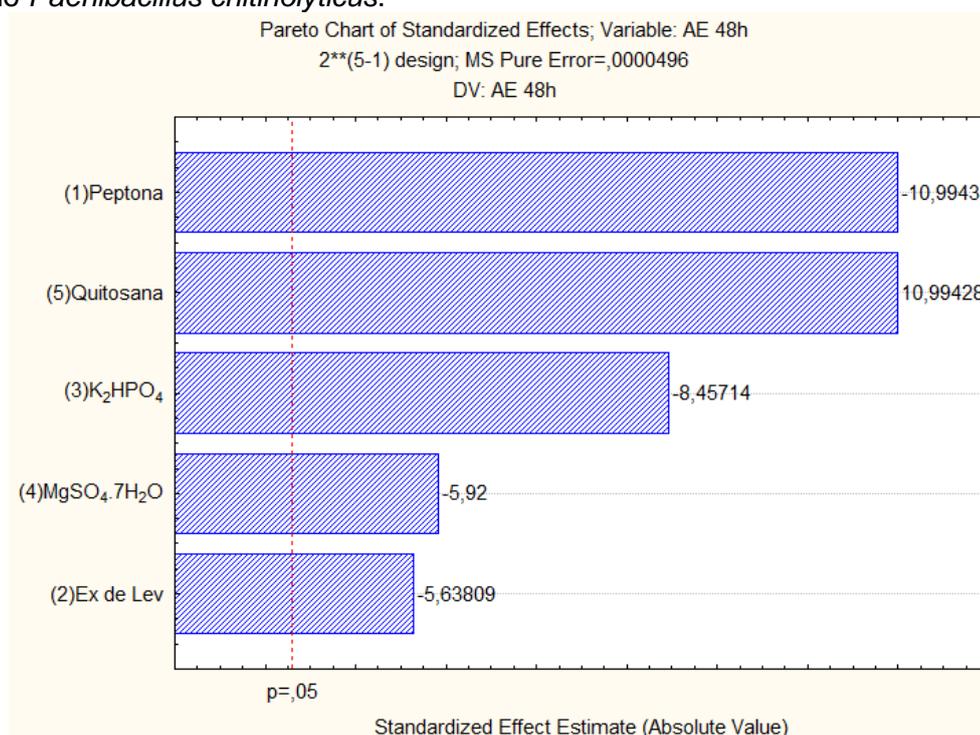
(Fonte: Araújo, 2011)

A variável dependente (ou variável resposta) analisada nos 19 ensaios foi a atividade enzimática (AE). Após 48 horas de cultivo, uma alíquota de cada um dos dezenove meios foi retirada e utilizada para avaliação da atividade enzimática conforme descrito no item 3.1. As atividades encontradas para cada meio também estão dispostas na Tabela 6. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Statistica 7.0. Quando os valores apresentaram $p < 0,05$ as análises foram consideradas estatisticamente significativas.

O gráfico de pareto (Figura 5) apresenta o efeito das cinco variáveis sobre a atividade enzimática, e observa-se que todas as variáveis apresentaram significância estatística, sendo que peptona, quitosana e K_2HPO_4 foram as três variáveis que apresentaram maior influência sobre atividade enzimática.

Um incremento na concentração de quitosana conduziu a acréscimo da atividade enzimática (efeito de +10,99428). Já um incremento nas concentrações de peptona, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e extrato de levedura promovem um decréscimo da atividade, efeitos, respectivamente, de -10,9943, -8,45714, -5,92 e -5,63809.

Figura 5 - Gráfico de pareto do Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2^{5-1}) para o cultivo do *Paenibacillus chitinolyticus*.



(Fonte: Araújo, 2011)

A partir da análise desse resultado, as variáveis concentração de peptona, quitosana e K_2HPO_4 , por apresentarem maior significância estatística, foram escolhidas para comporem o DCCR.

4.1.2 Delineamento Composto Central Rotacional - *Paenibacillus chitinolyticus*

As concentrações de peptona, quitosana e K_2HPO_4 foram então selecionadas e estudadas através de um DCCR para avaliar a influência na atividade enzimática. As concentrações das outras 2 variáveis ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e extrato de levedura) foram fixadas na condição 0 (ponto central). Os 16 ensaios e a variável resposta (atividade

enzimática) encontram-se na Tabela 7. Todos os meios foram preparados e cultivados de forma aleatória.

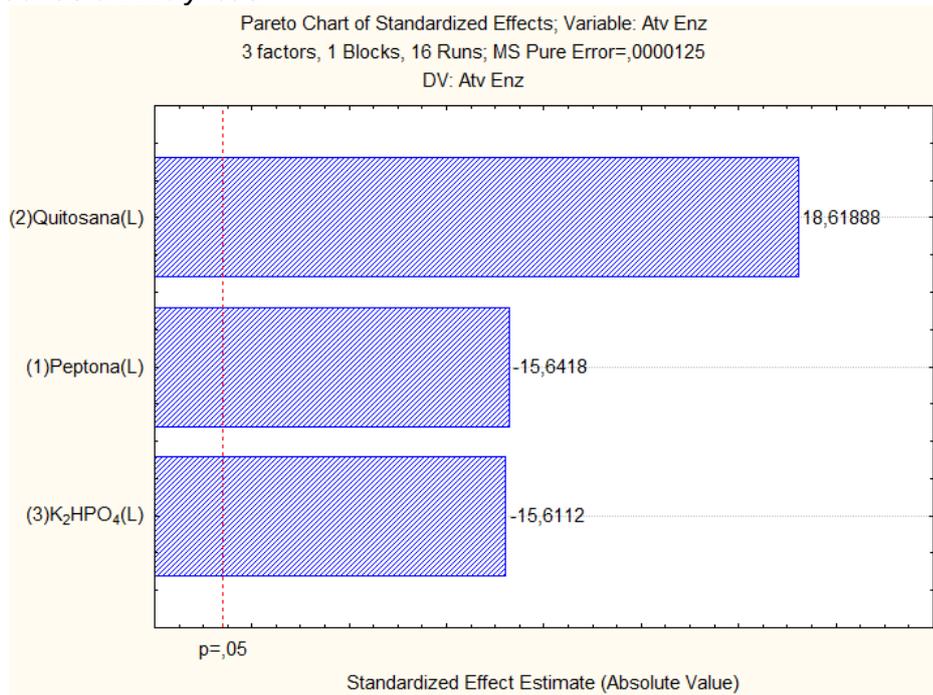
Tabela 7 - DCCR para o estudo da produção de quitosanase por *Paenibacillus chitinolyticus*.

Ensaio	Peptona	Quitosana	K ₂ HPO ₄	AE (U.mL ⁻¹)	DP
1	-1	-1	-1	0,100	± 0.001
2	-1	-1	1	0,078	± 0.011
3	-1	1	-1	0,200	± 0.005
4	-1	1	1	0,051	± 0.001
5	1	-1	-1	0,048	± 0.201
6	1	-1	1	0,028	± 0.004
7	1	1	-1	0,085	± 0.006
8	1	1	1	0,099	± 0.004
9	0	0	0	0,043	± 0.003
10	-1,68	0	0	0,052	± 0.004
11	1,68	0	0	0,031	± 0.004
12	0	-1,68	0	0,021	± 0.002
13	0	1,68	0	0,058	± 0.001
14	0	0	-1,68	0,069	± 0.003
15	0	0	1,68	0,053	± 0.001
16	0	0	0	0,038	± 0.003

(Fonte: Araújo, 2011)

A maior atividade enzimática ocorreu foi obtida no ensaio 3, no qual as concentrações de peptona e K₂HPO₄ encontravam-se no nível -1, enquanto que a quitosana estava no nível +1. Com a análise do gráfico de pareto (Figura 6), é possível observar que as três variáveis foram estatisticamente significativas para a atividade enzimática, sendo que um acréscimo nas concentrações de peptona (efeito de -15,6418) e K₂HPO₄ (efeito de -15,6112) levaram a uma diminuição da atividade enzimática, enquanto que um acréscimo na concentração de quitosana (efeito de +18,61888) promoveu um aumento da atividade.

Figura 6 - Gráfico de pareto do Delineamento Composto Central Rotacional para o cultivo do *Paenibacillus chitinolyticus*.

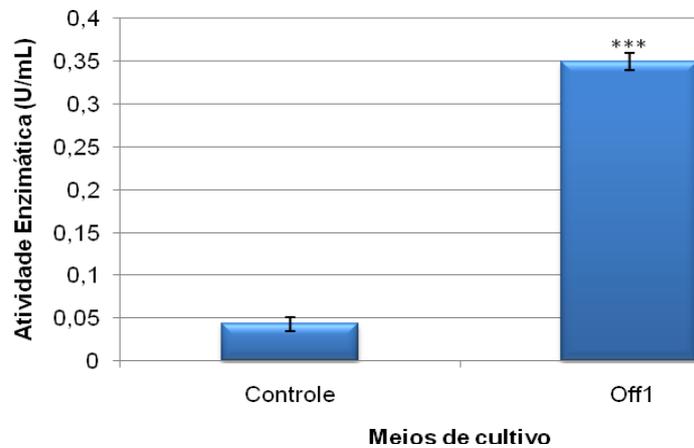


(Fonte: Araújo, 2011)

Na tentativa de obter um extrato enzimático com uma atividade ainda melhor, a peptona, componente com maior influência negativa, foi retirada do meio de cultivo. Esse novo meio, na ausência de peptona, teve as variáveis extrato de levedura, K₂HPO₄ e MgSO₄.7H₂O fixadas na concentração central (ponto zero) e quitosana na condição +1, sendo denominado de meio Off1.

As enzimas produzidas pelo *P. chitinolyticus* no meio Off1 (atividade enzimática de 0,35 U.mL⁻¹) (Figura 7) apresentaram atividade enzimática superior ao melhor meio do DCCR (0,20 U.mL⁻¹). Se comparado aos valores de atividade encontrados no meio B (correspondente ao ponto central do planejamento) estabelecido por Pagnoncelli (2008), foi obtido um aumento de aproximadamente 8,1 vezes na atividade enzimática (de 0,043U.mL⁻¹ para 0,35U.mL⁻¹).

Figura 7 - Diferença entre atividade enzimática de dois meios de cultivo para o *Paenibacillus chitinolyticus*. Meio controle é o meio equivalente ao ponto central do planejamento experimental (Extrato de Levedura 6,0 g.L⁻¹, Peptona 6,0 g.L⁻¹, Sulfato de magnésio heptahidratado 0,5 g.L⁻¹, Fosfato dibásico de potássio 1,0 g.L⁻¹ e Quitosana 2,0 g.L⁻¹), o meio Off1 é meio controle sem peptona e com quitosana na condição +1. ***p<0,001 indica uma aumento significativo entre a atividade enzimática do controle e a atividade enzimática do meio Off1.



(Fonte: Araújo, 2011)

A peptona é utilizada como fonte de nitrogênio, porém o extrato de levedura apresenta a mesma função. A alta concentração de nitrogênio no meio poderia estar agindo como repressora da síntese ou da atividade de quitosanases produzidas por este microrganismo.

Portanto, o meio Off1 (extrato de levedura 6,0 g.L⁻¹; sulfato de magnésio heptahidratado 0,5 g.L⁻¹; fosfato dibásico de potássio 1,0 g.L⁻¹; quitosana 3,0 g.L⁻¹) foi considerado o ideal para ser utilizado para síntese de quitosanases pelo *Paenibacillus chitinolyticus*.

4.1.3 Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2⁵⁻¹) – *Paenibacillus ehimensis*

O cultivo da bactéria *P. ehimensis* NRRL B-23118 foi conduzido em incubador rotativo com temperatura, agitação e pH inicial fixados em 36°C, 120 rpm e 7,0, respectivamente. O Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2⁵⁻¹), com 16 ensaios e 03 repetições do ponto central, foi empregado para avaliar a influência dos componentes do meio de cultivo (peptona, extrato de levedura, K₂HPO₄, MgSO₄ e quitosana) na produção de quitosanases. Os 19 meios de cultivo foram preparados e cultivados, de maneira aleatória, conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Matriz de planejamento para 5 variáveis independentes (fatores). A, Peptona (g.L^{-1}); B, Extrato de levedura (g.L^{-1}); C, K_2HPO_4 (g.L^{-1}); D, MgSO_4 (g.L^{-1}); E, Quitosana (g.L^{-1}). Na ultima coluna tem-se a atividade enzimática (U.mL^{-1}), para cada um dos dezenove meios estudados, resultante de hidrólise da quitosana utilizando complexo enzimático bruto do *Paenibacillus ehimensis* após 48 horas de cultivo.

Ensaio	A	B	C	D	E	AE (U.mL^{-1})	DP
1	3,0	3,0	0,5	0,25	3,0	0,456	± 0.001
2	9,0	3,0	0,5	0,25	1,0	0,051	± 0.002
3	3,0	9,0	0,5	0,25	1,0	0,033	± 0.001
4	9,0	9,0	0,5	0,25	3,0	0,186	± 0.014
5	3,0	3,0	1,5	0,25	1,0	0,223	± 0.002
6	9,0	3,0	1,5	0,25	3,0	0,082	± 0.001
7	3,0	9,0	1,5	0,25	3,0	0,092	± 0.004
8	9,0	9,0	1,5	0,25	1,0	0,101	± 0.001
9	3,0	3,0	0,5	0,75	1,0	0,314	± 0.018
10	9,0	3,0	0,5	0,75	3,0	0,091	± 0.004
11	3,0	9,0	0,5	0,75	3,0	0,171	± 0.004
12	9,0	9,0	0,5	0,75	1,0	0,128	± 0.008
13	3,0	3,0	1,5	0,75	3,0	0,515	± 0.005
14	9,0	3,0	1,5	0,75	1,0	0,040	± 0.001
15	3,0	9,0	1,5	0,75	1,0	0,064	± 0.004
16	9,0	9,0	1,5	0,75	3,0	0,180	± 0.001
17	6,0	6,0	1,0	0,5	2,0	0,070	± 0.003
18	6,0	6,0	1,0	0,5	2,0	0,071	± 0.008
19	6,0	6,0	1,0	0,5	2,0	0,080	± 0.002

(Fonte: Araújo, 2011)

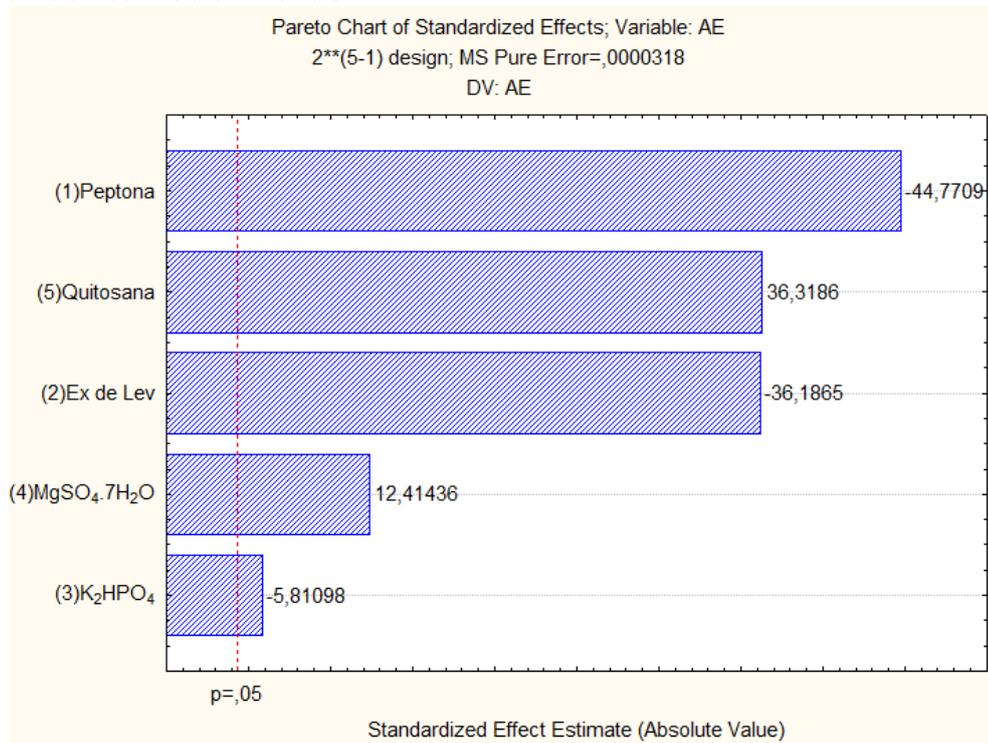
A variável dependente (resposta) analisada nos 19 ensaios foi a atividade enzimática. Após 48 horas de cultivo, uma aliquota de cada um dos dezenove meios foi retirada e utilizada para avaliação da atividade enzimática conforme descrito no item 3.1. As atividades encontradas para cada meio também estão dispostas na Tabela 8. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Statística 7.0. Quando os valores apresentaram $p < 0,05$ as análises foram consideradas estatisticamente significativas.

O gráfico de pareto (Figura 8), que apresenta o efeito das cinco variáveis sobre a atividade enzimática, indica que todas as variáveis apresentaram

significância estatística, sendo que a peptona, a quitosana e o extrato de levedura foram as três variáveis que apresentaram maior influência sobre atividade enzimática.

Um incremento na concentração de quitosana (efeito de +36,3186) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (+12,41436) conduziu a um acréscimo da atividade enzimática. Já um incremento nas concentrações de peptona (efeito de -44,7709), extrato de levedura (efeito de -36,1865) e K_2HPO_4 (efeito de -5,81098), promovem um decréscimo da atividade.

Figura 8 - Gráfico de pareto do Planejamento Experimental Fatorial Fracionado (2^{5-1}) para o cultivo do *Paenibacillus ehimensis*.



(Fonte: Araújo, 2011)

A partir da análise desse resultado, as variáveis concentração de peptona, quitosana e extrato de levedura, por apresentarem maior significância estatística, foram escolhidas para comporem o DCCR.

4.1.4 Delineamento Composto Central Rotacional - *Paenibacillus ehimensis*

As concentrações de peptona, quitosana e extrato de levedura foram então selecionadas e estudadas através de um DCCR para avaliar a sua influência na atividade enzimática. As concentrações das outras duas variáveis ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e K_2HPO_4) foram fixadas na condição 0 (ponto central). Os valores das variáveis

estudadas para os 16 ensaios e a variável resposta (atividade enzimática) encontram-se na Tabela 09. Todos os meios foram preparados e cultivados de forma aleatória.

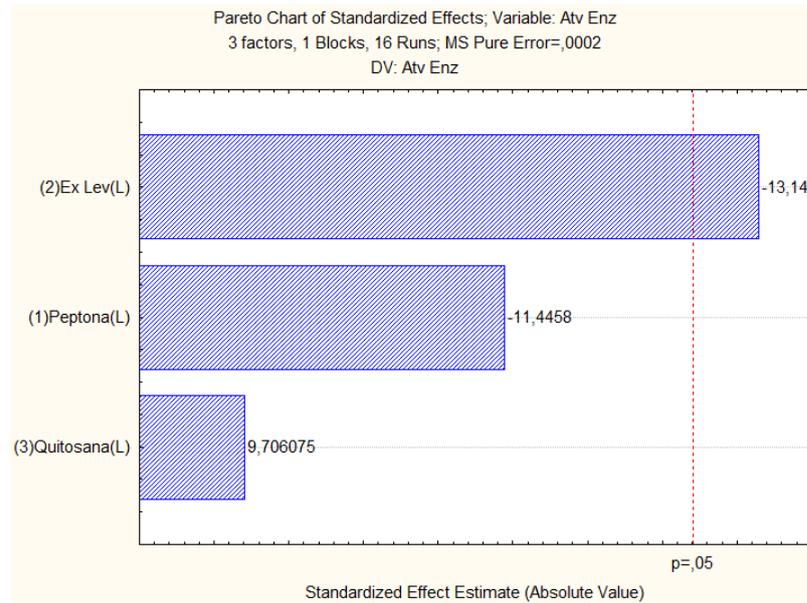
Tabela 09 - DCCR para o estudo da produção de quitosanase por *Paenibacillus ehimensis*.

Ensaio	Peptona	Extrato de Levedura	Quitosana	AE (U.mL ⁻¹)	DP
1	-1	-1	-1	0,22	± 0.004
2	-1	-1	1	0,51	± 0.007
3	-1	1	-1	0,03	± 0.001
4	-1	1	1	0,09	± 0.002
5	1	-1	-1	0,05	± 0.001
6	1	-1	1	0,08	± 0.001
7	1	1	-1	0,10	± 0.002
8	1	1	1	0,18	± 0.007
9	0	0	0	0,07	± 0.004
10	-1,68	0	0	0,14	± 0.004
11	1,68	0	0	0,046	± 0.002
12	0	-1,68	0	0,16	± 0.002
13	0	1,68	0	0,025	± 0.000
14	0	0	-1,68	0,04	± 0.001
15	0	0	1,68	0,068	± 0.001
16	0	0	0	0,08	± 0.001

(Fonte: Araújo, 2011)

O melhor valor para atividade enzimática ocorreu para o ensaio 2, no qual as concentrações de peptona e extrato de levedura encontravam-se no nível -1, enquanto que a quitosana estava no nível +1. Com a análise da Figura 9 (gráfico de pareto), é possível observar que apenas a concentração de extrato de levedura (efeito de -13,14) foi significante para a atividade enzimática, sendo que um acréscimo nas concentrações de extrato de levedura e peptona levou a uma diminuição da atividade enzimática, enquanto que um acréscimo na concentração de quitosana promoveu um aumento da atividade.

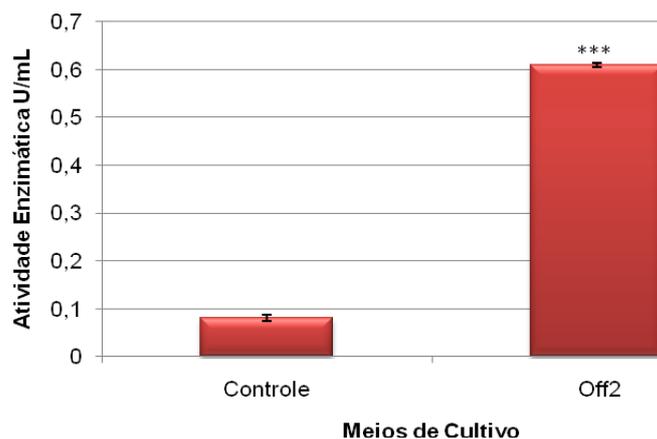
Figura 9 - Gráfico de pareto do Delineamento Composto Central Rotacional para o cultivo do *Paenibacillus ehimensis*



(Fonte: Araújo, 2011)

Como o que ocorreu na otimização da produção de quitosanases pela bactéria *Paenibacillus chitinolyticus*, na tentativa de se obter um meio de cultivo que se possibilite uma maior atividade enzimática, o extrato de levedura foi retirado do meio de cultivo. Esse novo meio, na ausência de extrato de levedura, teve as variáveis peptona, K_2HPO_4 e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ fixadas na concentração central (ponto zero) e quitosana na condição +1, sendo denominado de meio Off2.

Figura 10 - Diferença entre atividade enzimática de dois meio de cultivo para o *Paenibacillus ehimensis*. Meio controle é o meio equivalente ao ponto central do planejamento experimental (Extrato de Levedura $6,0 \text{ g.L}^{-1}$, Peptona $6,0 \text{ g.L}^{-1}$, Sulfato de magnésio heptahidratado $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, Fosfato dibásico de potássio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e Quitosana $2,0 \text{ g.L}^{-1}$), o meio Off2 é meio controle sem extrato de levedura e com quitosana na condição +1. *** $p < 0,001$ indica uma aumento significativo entre a atividade enzimática do controle e a atividade enzimática do meio Off2.



(Fonte: Araújo, 2011)

As enzimas produzidas por *Paenibacillus ehimensis* no meio Off2 (atividade enzimática de $0,61 \text{ U.mL}^{-1}$) (Figura 10) apresentaram atividade enzimática superior ao melhor meio do DCCR ($0,51 \text{ U.mL}^{-1}$). Se comparado aos valores de atividade encontrados no meio B (correspondente ao ponto central do planejamento) estabelecido por Pagnoncelli (2008), foi obtido um aumento de aproximadamente 7,6 vezes na atividade enzimática (de $0,08 \text{ U.mL}^{-1}$ para $0,61 \text{ U.mL}^{-1}$).

Conforme também observado na otimização da produção de quitosanases por *P. chitinolyticus*, a alta concentração de nitrogênio no meio, proveniente do extrato de levedura e peptona, estaria agindo como repressora da síntese ou da atividade de quitosanases. No caso do cultivo do *P. ehimensis*, a ausência do extrato de levedura favoreceu a atividade enzimática então, não só a alta concentração de nitrogênio estaria agindo como repressora da síntese de quitosanases, assim como, algum produto ou molécula provenientes do metabolismo da levedura que se encontra presente no extrato de levedura. Baseado nos resultados obtidos, o meio Off2 foi considerado o ideal para ser utilizado para síntese de quitosanases pelo *P. ehimensis*.

Sun et al. (2007) e Chen; Fang; Xia (2008) em estudos de planejamento experimental encontraram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fonte de nitrogênio como também uma das variáveis mais influentes na produção de quitosanases por *Microbacterium* sp.OU01 e *Aspergillus* sp. CJ 22-326, respectivamente. Wee et al. (2009) detectaram o extrato de carne (fonte de nitrogênio) como uma das variáveis que mais influenciou a produção de quitosanases pelo *Bacillus* sp.RKY3.

A alta concentração de nitrogênio nos meios de cultivo tanto para o *P. chitinolyticus* como para *P. ehimensis* estaria deslocando o metabolismo bacteriano para a produção de outras enzimas tais como celulases, proteases e amilases ao invés de quitosanases.

Para os dois microrganismos estudados neste trabalho, foi observado que a quitosana exerce um efeito positivo na produção de quitosanases. Isto deve estar associado ao fato de que a quitosana age como indutora na síntese destas enzimas. O mesmo foi observado durante a otimização da produção de quitosanases por *Aspergillus* sp. CJ 22-326 e pelo *Trichoderma koningii* sp por Chen; Fang; Xia (2008) e Silva et al. (2010), respectivamente.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO

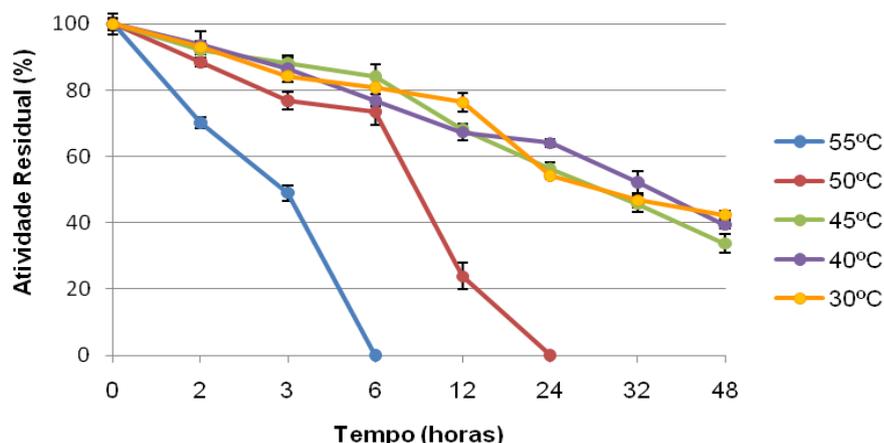
4.2.1 Efeito térmico na estabilidade enzimática

A estabilidade térmica das quitosanases produzidas por *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis* foram estudadas pela incubação do extrato bruto (caldo fermentado) em várias faixas de temperaturas (30°C – 55°C) por até 48 horas.

O complexo enzimático bruto obtido do cultivo do *P. chitinolyticus* manteve sua atividade superior a 50% por cerca de 24 horas para as temperaturas entre 30°C e 45°C (Figura 11). Após 3 horas de exposição a 55°C (temperatura ótima de atividade) o complexo de quitosanases ainda exibiu 50% da sua atividade inicial. Para duas quitosanases purificadas por Wang; Yeh (2008) e Goa et al. (2008), após apenas 60 minutos de exposição à temperatura ótima das enzimas em questão, esta conservavam cerca de 60% da sua atividade original.

Liang et al. (2010) realizaram estudos de estabilidade semelhante, os quais observaram que nos 30 primeiros minutos de exposição a temperaturas inferiores a 60°C, cerca de 80% da atividade enzimática foi conservada. Para o complexo enzimático do *P. chitinolyticus* essa atividade foi mantida por até 2 horas para a faixa de temperatura entre 30°C e 50°C. Tal resultado pode ser comparado ao encontrado por Sun; Zhang; Wang (2009) para uma quitosanase purificada, na qual para um mesmo período de exposição (2 horas), na faixa de temperatura de 20°C a 40°C, cerca de 90% da atividade enzimática foi mantida.

Figura 11 - Efeito da temperatura na estabilidade do extrato enzimático produzido por *Paenibacillus chitinolyticus*. A atividade residual foi expressa como uma porcentagem da mais alta atividade (tempo 0), a qual foi considerada 100%.

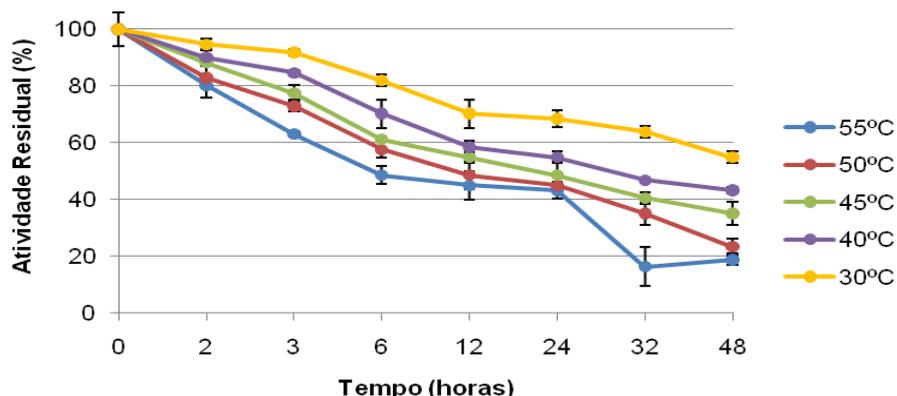


(Fonte: Araújo, 2011)

O complexo enzimático bruto do *P. ehimensis* manteve cerca de 55% da sua atividade original após 48 horas de exposição a temperatura de 30°C (Figura 12). Para esta mesma temperatura e tempo de exposição, o complexo enzimático bruto do *P. chitinolyticus* reteve apenas 40% da sua atividade inicial (Figura 11). Para temperatura ótima de hidrólise (55°C), após 6 horas de incubação, o complexo enzimático do *P. chitinolyticus* não possuiu nenhuma atividade quitosanólítica enquanto que o complexo enzimático obtido pelo *P. ehimensis* exibiu cerca de 40% da sua atividade original (Figura 12). Tais resultados demonstram uma superior estabilidade térmica das enzimas produzidas por *P. ehimensis* quando comparada com as produzidas por *P. chitinolyticus*.

A estabilidade térmica (cerca de 80% de atividade relativa) apresentada pelo complexo enzimático do *P. ehimensis* após 2 horas de incubação, na faixa de temperatura de 30°C a 55°C, pode ser comparada com a estabilidade de uma quitosanase purificada por Wang et al. (2008), onde foi encontrado que durante 1 hora de incubação na faixa de temperatura de 30°C a 60°C, a atividade relativa é mantida em cerca de 80%. Wang; Chang; Liang (2010) e Johnsen; Hansen; Stougaard (2010) encontraram resultados semelhantes, para as faixas de temperatura de 20°C a 60°C e 40°C a 50°C, respectivamente, porém para um período de incubação de apenas 30 minutos, onde a atividade quitosanólítica foi mantida em 100%. Enquanto que a quitosanase purificada por El-Sherbiny (2011), manteve 100% de sua atividade inicial por até 90 minutos de incubação na faixa de temperatura de 40°C a 50°C.

Figura 12 - Efeito da temperatura na estabilidade do extrato enzimático produzido por bactéria *Paenibacillus ehimensis*. A atividade relativa foi expressa como uma porcentagem da mais alta atividade (tempo 0), a qual foi considerada 100%.



(Fonte: Araújo, 2011)

A alta estabilidade térmica apresentada por este complexo enzimático bruto garante uma boa atividade enzimática sem as etapas dispendiosas de purificação e pode ser utilizada na produção contínua de QOS, sendo importante para as aplicações industriais do ponto de redução dos custos. Para a produção de oligossacarídeos é de grande importância o uso de enzimas estáveis e que gere oligossacarídeos biologicamente funcionais.

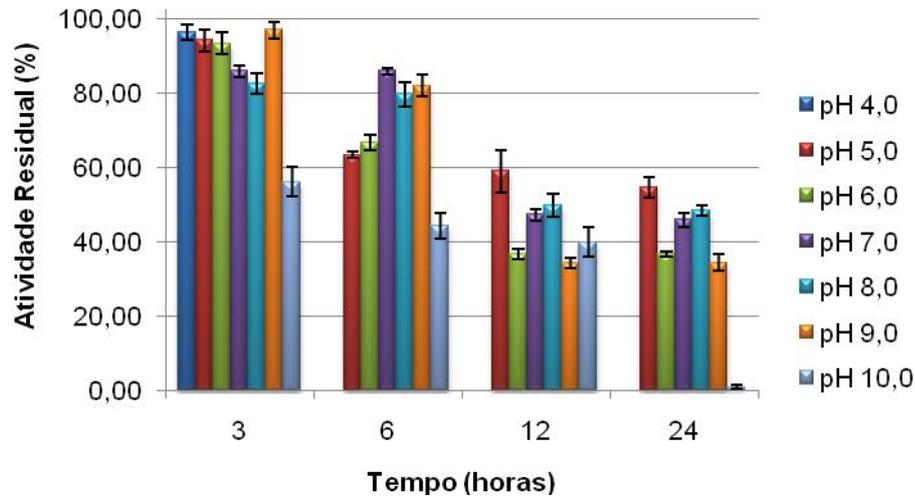
Com a análise geral destes resultados, a temperatura dita como ideal para produção de oligossacarídeos por estes complexos enzimáticos foi de 45°C, já que os dois complexos enzimáticos conseguem manter 50% da sua atividade nesta temperatura por até 24 horas.

4.2.2 Efeito do pH na estabilidade enzimática

O perfil de estabilidade em pH do extrato enzimático, produzido por *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis* com atividade quitosanólítica, foi determinado pela medida da atividade residual em pH 6,0 depois da incubação do caldo fermentado, a temperatura ambiente, em vários valores de pH (4-10) por 3, 6, 12 e 24 horas. A avaliação da atividade enzimática foi realizada através da determinação dos açúcares redutores gerados no meio de reação a partir da hidrólise da quitosana conforme descrito no item 3.2.2.

A atividade quitosanólítica, para o complexo enzimático do *P. chitinolyticus*, foi estável entre a faixa de pH de 4-9 nas 3 primeiras horas de experimento. Após esse período as maiores atividades encontradas foram entre a faixa de pH 5 a 9, porém, nessa faixa, o pH não influenciou significativamente a estabilidade dessas enzimas. Os extremos de pH (4 e 10), promoveram um rápido declínio da estabilidade enzimática ao longo do tempo (Figura 13). Resultado semelhante foi encontrado por Wang et al. (2008) onde a atividade de quitosanase purificada mostrou-se estável da faixa de pH entre 4-8 e por Wang; Yeh (2008) entre os valores de pH de 4-9.

Figura 13 - Efeito do pH na estabilidade do extrato enzimático produzido por *Paenibacillus chitinolyticus*. A atividade relativa foi expressa como uma porcentagem da mais alta atividade (tempo 0), a qual foi considerada 100%.



(Fonte: Araújo, 2011)

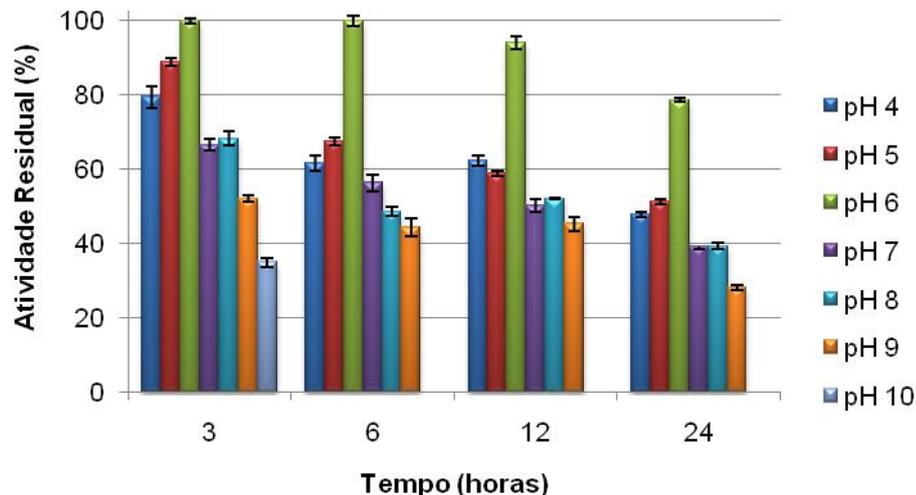
Os resultados encontrados neste experimento podem ser considerados superiores, por apresentarem uma maior faixa de variação de pH, aos encontrados por Goa et al. (2008), no qual se tem uma faixa de estabilidade em pH de 6-10 para uma quitosanase purificada a partir de caldo fermentado de *Bacillus cereus* D-11 e aos encontrados por Liang et al. (2010) onde a estabilidade de uma enzima purificada encontra-se na faixa de pH entre 4-7.

Para o complexo enzimático do *P. ehimensis*, nas três primeiras horas de incubação, a faixa de pH mais estável foi de 4,0 - 6,0 (Figura 14). Wang et al. (2009), em um experimento similar utilizando quitosanase purificada a partir de caldo fermentado de *Serratia sp.*, mostrou estabilidade para a faixa de pH 4,0 - 7,0 após 30 minutos de incubação. Para este mesmo período de incubação, Wang; Chang; Liang (2010) encontraram estabilidade na faixa de pH entre 6,0 - 7,0 para quitosanase purificada a partir de caldo fermentado de *Serratia sp.* TKU016; enquanto que Johnsen; Hansen; Stougaard (2010) relata estabilidade para quitosanase de *Janthinobacterium* na faixa de pH entre 5,0 - 7,0 .

Quitosanases produzidas por *P. ehimensis* quando comparadas as produzidas por *P. chitinolyticus*, mostraram grande estabilidade durante a exposição a faixas de pH ácido, mantendo cerca de 50% da sua atividade residual após 24 horas de incubação a pH 4,0. Porém, mostrou-se mais sensível a extremos de pH

básicos, apresentando atividade quitosanólítica (cerca de 30% de atividade residual) após incubação a pH 10 apenas nas três primeiras horas de experimento (Figura 14).

Figura 14 - Efeito do pH na estabilidade do extrato enzimático produzido por *Paenibacillus ehimensis*. A atividade relativa foi expressa como uma porcentagem da mais alta atividade (tempo 0), a qual foi considerada 100%.



(Fonte: Araújo, 2011)

Também é possível observar que este complexo enzimático apresenta grande estabilidade para o pH 6,0, nota-se que após 24 horas de incubação a atividade relativa é mantida em 80%. Sendo assim, este pH é o ideal para a estocagem desse material biológico.

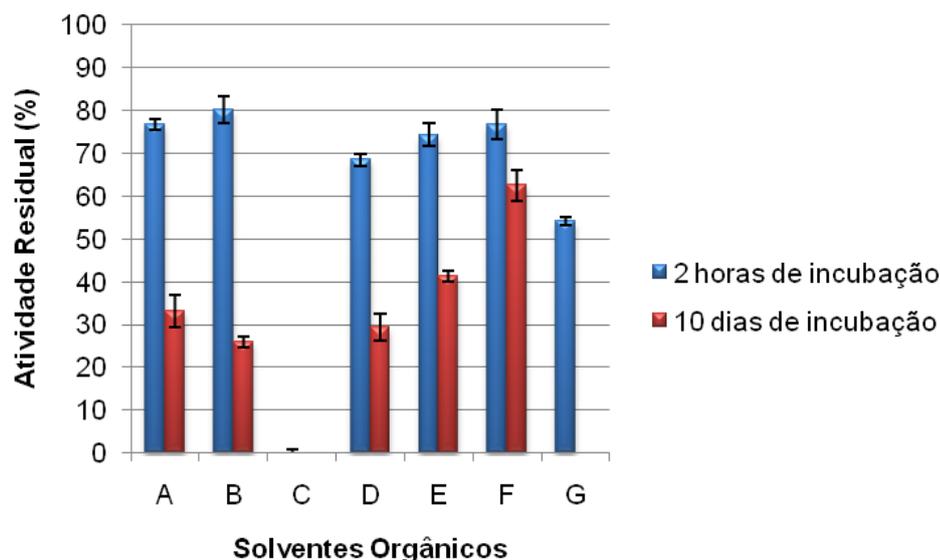
4.2.3 Efeito de solventes orgânicos na estabilidade enzimática

Enzimas são usualmente inativadas ou desnaturadas na presença de solventes orgânicos (Wang et al., 2008). Neste estudo foi avaliado o efeito de diferentes solventes orgânicos (25%, v/v) na estabilidade de enzimas brutas, produzidas pelas bactérias *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis*. O extrato bruto enzimático foi pré-incubado com solventes orgânicos pelos períodos 2 horas e 10 dias, a 4°C e a temperatura de cerca de 28°C. A atividade enzimática residual foi determinada conforme descrito no item 3.2.2. A atividade quitosanólítica da amostra sem solvente orgânico (controle) foi considerada como 100% ativa.

Para o complexo enzimático produzido por *Paenibacillus chitinolyticus*, conforme demonstrado na Figura 15, a atividade quitosanólítica permaneceu superior a 50% da atividade original nas primeiras 2 horas de incubação à

temperatura ambiente em todos os solventes, exceto quando avaliou-se a acetona. Cerca de 80% da atividade original foi mantida quando incubada com etanol e acetato de etila. Com 10 dias de incubação a atividade residual superior a 50% só foi encontrada para a incubação com acetato de etila, porém todos os demais solventes, exceto a acetona e acetonitrila, não foram capazes de promover uma inativação enzimática total.

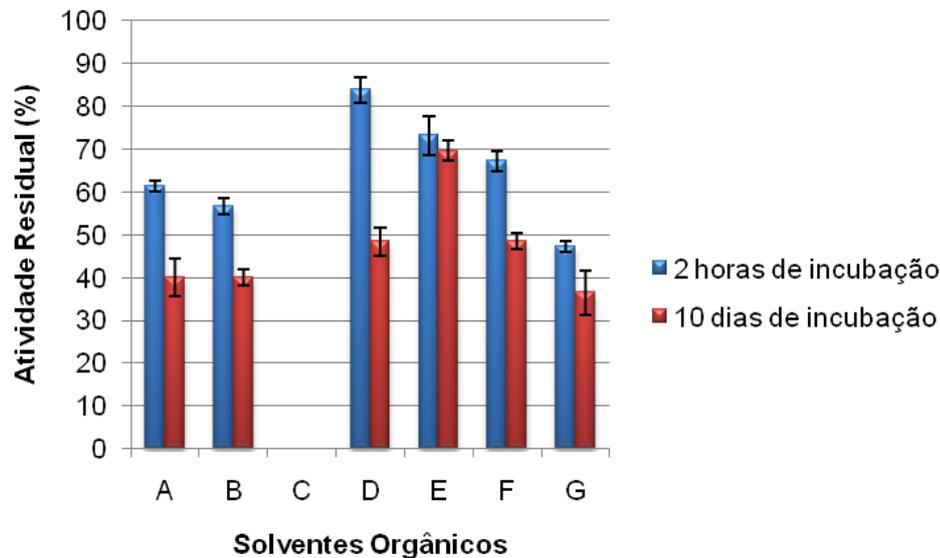
Figura 15 - Efeito de solventes orgânicos (25% v/v) na estabilidade de quitosanasas produzidas por *Paenibacillus chitinolyticus*. O extrato enzimático foi incubado, a temperatura ambiente, na presença de: metanol (A), etanol (B), acetona (C), butanol (D), tolueno (E), acetato de etila (F) e acetonitrila (G).



(Fonte: Araújo, 2011)

Ainda sobre as enzimas produzidas por *Paenibacillus chitinolyticus*, para incubação a temperatura de 4°C (Figura 16), nas 2 primeiras horas de experimento, a atividade residual também se manteve acima de 50% para a incubação com todos os solventes, exceto acetona e acetonitrila. Após 10 dias de incubação, nenhum solvente, exceto a acetona, foi capaz de reduzir mais do que 65% da atividade quitosanólítica original do extrato enzimático. Vale ressaltar que, para esta temperatura (4°C), a incubação com acetonitrila não provocou a inativação enzimática como ocorreu quando o experimento foi realizado a temperatura ambiente. A diminuição da temperatura auxilia na conservação da atividade enzimática.

Figura 16 - Efeito de solventes orgânicos (25% v/v) na estabilidade de quitosanases produzidas por *Paenibacillus chitinolyticus*. O extrato enzimático foi incubado, a 4°C, na presença de: metanol (A), etanol (B), acetona (C), butanol (D), tolueno (E), acetato de etila (F) e acetonitrila (G).



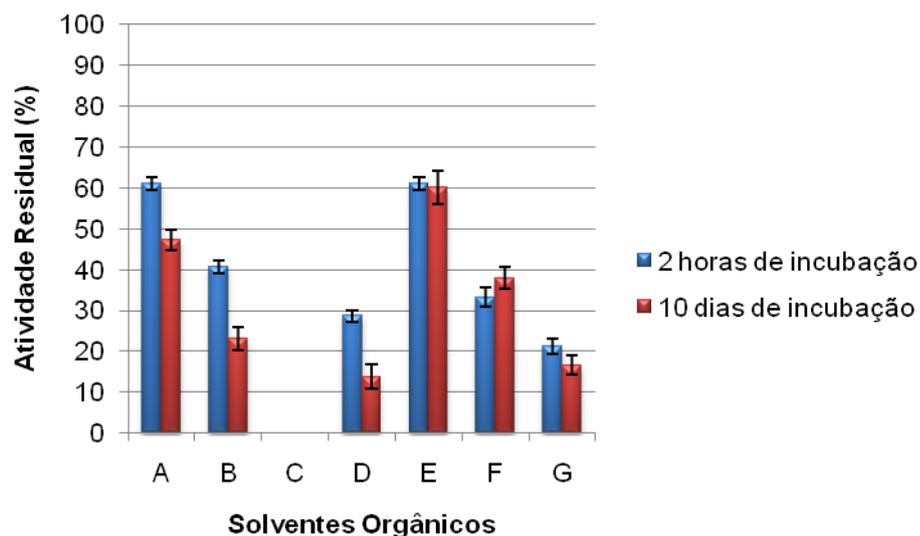
(Fonte: Araújo, 2011)

Quando incubadas a temperatura ambiente com os diferentes solventes orgânicos por um período de 2 horas, as enzimas, com ação quitosanólíticas, produzidas pelo *P. ehimensis* (Figura 17), se mostraram menos estáveis que as enzimas produzidas pelo *P. chitinolyticus* (Figura 15). A incubação com metanol, etanol, butanol, acetato de etila e acetonitrila reduziu, respectivamente, 40%, 60%, 70%, 68% e cerca 80% da atividade inicial das enzimas produzidas pelo *P. ehimensis* nas 02 primeiras horas de incubação. Nas mesmas condições, as enzimas produzidas pelo *P. chitinolyticus* tiveram na condição menos favorável (incubação com acetonitrila) apenas cerca de 50% da sua atividade comprometida; vale ressaltar que para a incubação com etanol, houve somente a perda de 20% da sua atividade inicial (80% de atividade residual).

Porém, para 10 dias de incubação, a temperatura ambiente, o efeito do tolueno na atividade residual do complexo enzimático produzido pelo *P. ehimensis* manteve o mesmo valor (60%) que foi obtido nas 02 primeiras horas de experimento (Figura 17). O mesmo não pode ser observado para as enzimas produzidas pelo *P. chitinolyticus*, na qual a atividade residual caiu de cerca de 70% (2 horas de incubação) para 40% (10 dias de incubação) quando incubada com esse solvente (Figura 15). Também vale ressaltar que a incubação com acetonitrila não provocou

total inativação da atividade enzimática como tinha ocorrido para as enzimas produzidas por *P. chitinolyticus*. Além disso, nas enzimas produzidas pelo *P. ehimensis*, a perda de atividade enzimática pela incubação com acetato de etila e acetonitrila não demonstrou diferença significativa entre os tempos de 2 horas e 10 dias.

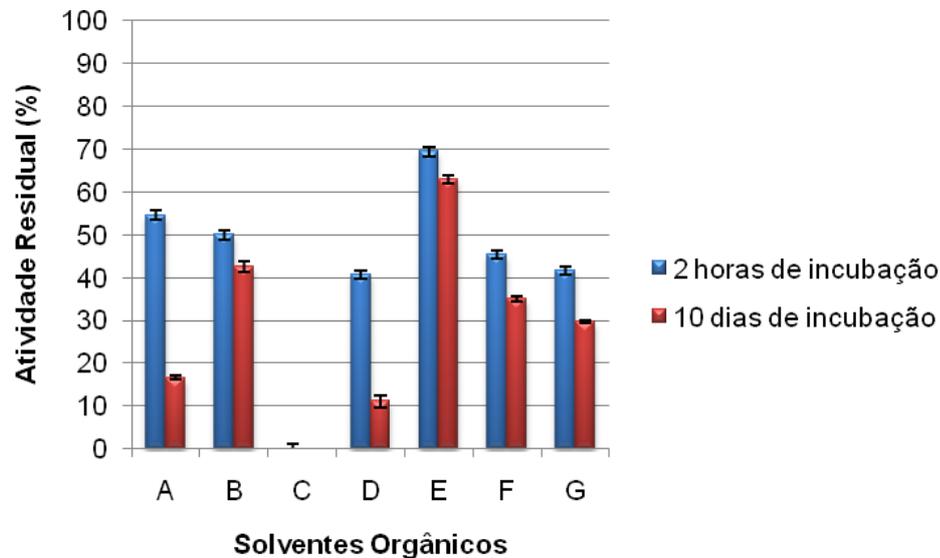
Figura 17 - Efeito de solventes orgânicos (25% v/v) na estabilidade de quitosanases produzidas por *Paenibacillus ehimensis*. O extrato enzimático foi incubado, a temperatura ambiente, na presença de: metanol (A), etanol (B), acetona (C), butanol (D), tolueno (E), acetato de etila (F) e acetonitrila (G).



(Fonte: Araújo, 2011)

A incubação a 4°C do complexo enzimático do *P. ehimensis* com os diversos solventes (Figura 18) revelou resultados semelhantes a sua incubação a temperatura ambiente. Neste caso, a temperatura não tem grande influência sobre a estabilidade e sim, a própria interação enzima/solvente. Esse fato pode ser comprovado pelo experimento de estabilidade térmica no qual as enzimas deste microrganismo mostraram considerável estabilidade.

Figura 18 - Efeito de solventes orgânicos (25% v/v) na estabilidade de quitosanases produzidas por *Paenibacillus ehimensis*. O extrato enzimático foi incubado, a 4°C, na presença de: metanol (A), etanol (B), acetona (C), butanol (D), tolueno (E), acetato de etila (F) e acetonitrila (G).



(Fonte: Araújo, 2011)

Quando comparadas as enzimas do *P. chitinolyticus* incubadas a 4°C (Figura 16), o complexo enzimático do *P. ehimensis* mostrou estabilidade semelhante nas duas primeiras horas de experimento. Porém, após 10 dias a sua estabilidade se mostrou inferior a do *P. chitinolyticus*. A incubação com butanol, por exemplo, reduziu cerca de 90% da atividade do complexo enzimático do *P. ehimensis* enquanto que para as enzimas do *P. chitinolyticus* essa redução foi de aproximadamente 50%.

Os resultados encontrados nestes experimentos corroboram com o relatado por Wang et al. (2008), no qual é observado a presença de atividade quitosanolítica residual após a incubação por 10 dias com diversos solventes, entre estes butanol, tolueno e acetonitrila.

Além disso, para os dois tempos e para as duas temperaturas de incubação utilizadas, a acetona promoveu total perda da atividade quitosanolítica. Esse efeito também foi observado por Wang; Yeh (2008) em uma quitosanase produzida por *Bacillus subtilis* TKU007.

De acordo com Wang et al. (2008), a estabilidade enzimática em solventes orgânicos depende da natureza do solvente orgânico e, a substituição de algumas

moléculas de água que circulam a enzima por moléculas de solvente pode estabilizar a estrutura da enzima.

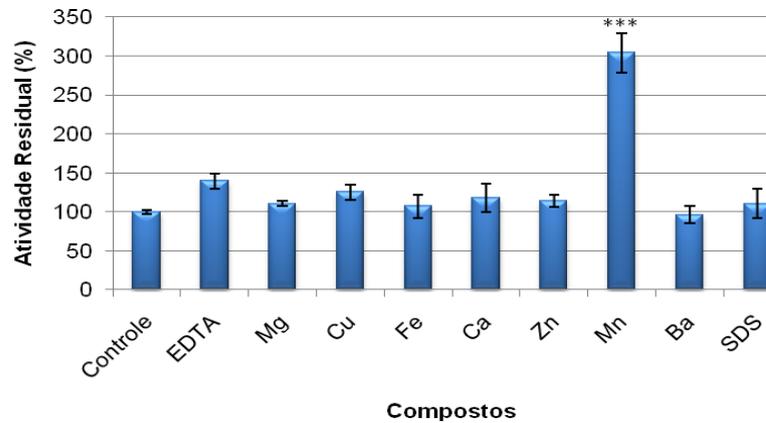
Enzimas que possuam esse tipo de estabilidade podem permitir o uso de solventes orgânicos para deslocar o equilíbrio de reações reversas entre hidrólise e síntese de QOS e assim, se ter um controle do processo (WANG; YEH, 2008).

4.2.4 Efeito de diferentes íons e agentes químicos sobre a atividade enzimática

Para uma adicional caracterização dos complexos enzimáticos bruto dos *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis*, foram examinados os efeitos de alguns conhecidos inibidores enzimáticos e metais divalentes na sua atividade. O efeito dos vários íons e agentes químicos na atividade das enzimas foi investigado pela pré-incubação dos complexos enzimáticos com os compostos químicos em tampão fosfato 50mM (pH 7,0) por duas horas a temperatura de cerca de 28°C.

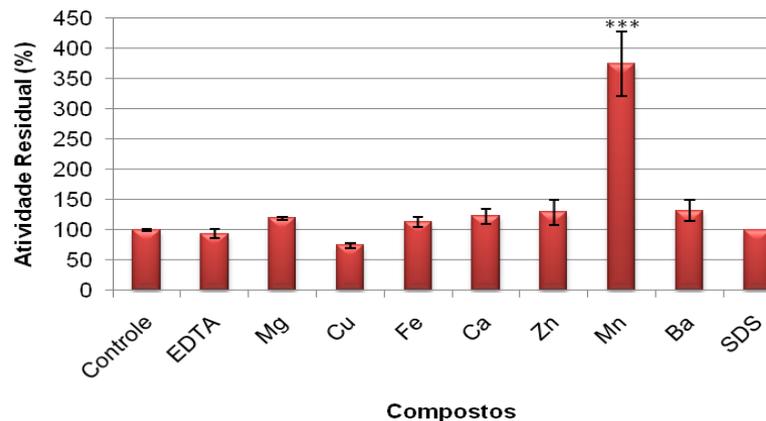
Os resultados demonstram que as enzimas brutas produzidas tanto por *P. chitinolyticus* (Figura 19) como as produzidas por *P. ehimensis* (Figura 20), foram fortemente ativadas pelo Mn^{2+} . O mesmo foi observado nos estudos de Sun et al. (2006) em duas quitosanases produzidas pela *Microbacterium* sp., por Zhu; Zhou; Feng (2007) em quitosanase purificada a partir de caldo fermentado de *Gongronella* sp. e por El-Sherbiny (2011) para quitosanase purificada a partir do fermentado de *Streptomyces cyaneogriseus*. Em contraste, o íon Mn^{2+} teve efeito totalmente inibitório para quitosanases purificadas produzidas por *Serratia marcescens* TKU011 (WANG et al. 2008), por *Bacillus subtilis* TKU007 (WANG; YEH, 2008), *Serratia* sp. TKU020 (WANG; PENG; LIANG, 2009) e *Serratia* sp. TKU016 (WANG; CHANG; LIANG, 2010).

Figura 19 - Efeito de vários agentes químicos (5mM) sobre a atividade enzimática do complexo de quitosanases produzidas por *Paenibacillus chitinolyticus*. O extrato enzimático foi incubado, a temperatura ambiente, por 2 horas, na presença de: EDTA, Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). *** $p < 0,001$ indica uma aumento significativo entre a atividade enzimática do controle e a incubação do complexo enzimático com manganês.



(Fonte: Araújo, 2011)

Figura 20 - Efeito de vários agentes químicos (5mM) sobre a atividade enzimática do complexo de quitosanases produzidas por *Paenibacillus ehimensis*. O extrato enzimático foi incubado, a temperatura ambiente, por 2 horas, na presença de: EDTA, Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). *** $p < 0,001$ indica uma aumento significativo entre a atividade enzimática do controle e a incubação do complexo enzimático com manganês.



(Fonte: Araújo, 2011)

Os outros agentes químicos não demonstraram efeitos estatisticamente significativos sobre a ação dos dois complexos enzimáticos. Porém, é bem conhecido o efeito inibitório de EDTA (WANG et al., 2008; WANG; YEH, 2008; WANG et al., 2009; WANG; CHANG; LIANG, 2010; ZHU; ZHOU; FENG, 2007;), Cu^{2+} (WANG et al., 2008), Fe^{2+} (WANG et al., 2008; ZHU; ZHOU; FENG, 2007), Ca^{2+} (WANG; YEH, 2008; ZHU; ZHOU; FENG, 2007), Zn^{2+} (WANG et al., 2008; ZHU; ZHOU; FENG, 2007) e SDS (WANG; YEH, 2008; WANG et al., 2009) sobre

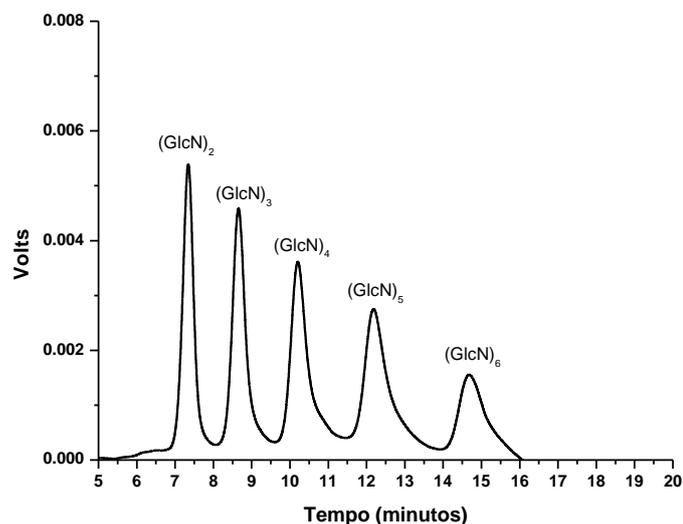
quitosanases purificadas de fermentação microbiana. Uma maior resistência a inibição desde dois complexos enzimáticos pode ser vantajosa quando seu uso se faz necessário em meio contendo estes componentes químicos.

4.4 PERFIL DOS QUITOOLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS

Os complexos enzimáticos bruto, livre de células, obtidos do cultivo das bactérias *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis* foram utilizados para produção dos QOS conforme descrito no item 3.2.5. Após a hidrólise da quitosana e filtragem das amostras em membrana de 0,22 μm , o perfil de QOS produzidos foi analisado através de CLAE.

Na Figura 21 tem-se o cromatograma de uma mistura de padrões de QOS com grau de polimerização entre 2 a 6 unidades de glucosamina (Seikagaku Co., Tokyo, Japan).

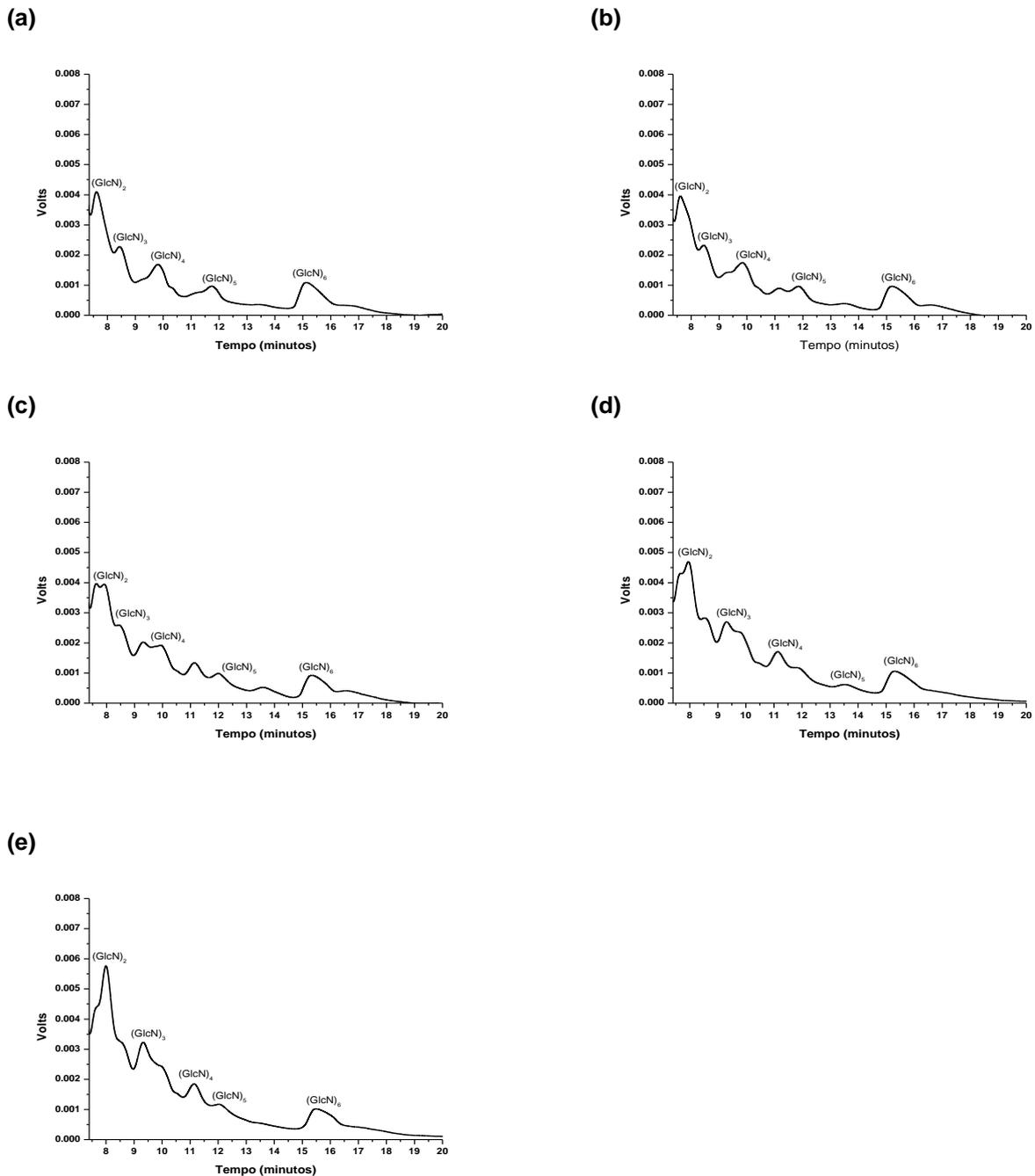
Figura 21 - Cromatograma dos padrões de quitooligossacarídeos $(\text{GlcN})_{n=2-6}$.



(Fonte: Araújo, 2011)

Os cromatogramas obtidos para diferentes tempos de hidrólise (1, 3, 6, 9 e 12 horas) utilizando complexo enzimático produzido pelo *P. chitinolyticus* encontram-se demonstrados na Figura 22.

Figura 22 - Perfil de QOS produzidos após 1 (a), 3 (b), 6 (c), 9 (d) e 12 horas (e) de hidrólise utilizando o complexo enzimático produzido por *Paenibacillus chitinolyticus*. Cromatografia realizada em CLAE com coluna Shim-Pack CLC-NH₂. As análises dos oligômeros foram feitas utilizando acetonitrila (60%) como fase móvel em um fluxo de 0,8mL/minuto e utilizado o índice do detector refrativo.



(Fonte: Araújo, 2011)

Utilizando o complexo enzimático produzido pelo *P. chitinolyticus* foi possível a obtenção de QOS compatíveis com os padrões de dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmero de glucosamina. As melhores taxas de produção de

oligômeros foram encontradas para o tempo de hidrólise de 9 e 12 horas (Tabela 10).

Tabela 10 - Produção de oligômeros (GlcN)₂₋₆ em diferentes tempos de hidrólise da quitosana utilizando o complexo enzimático produzido por *Paenibacillus chitinolyticus*.

Tempo de Hidrólise	Produção total de (GlcN) ₂₋₆ (mg/mL)	*Produção relativa % para 10 mg/mL de quitosana
1 hora	4,42	44,2
3 horas	4,67	46,7
6 horas	3,89	38,9
9 horas	5,96	59,6
12 horas	5,77	57,7

* A produção relativa foi mensurada pela produção total de (GlcN)₂₋₆ / concentração de quitosana x 100. (Fonte: Araújo, 2011)

Há um aumento seguido de diminuição na taxa de produção de oligômeros (GlcN)₂₋₆ com o passar do tempo (Tabela 10). De acordo com Assis et al. (2010) essa diminuição na concentração total de QOS pode sugerir que há um aumento na produção de monômeros (GlcN) promovido pela ação combinada de quitosanases com mecanismo de ação do tipo endo e exo-enzimas. O GP dos QOS determina suas propriedades biológicas. As melhores características biológicas são obtidas em QOS com grau de polimerização entre cinco e sete (SHAHIDI, 1999). A máxima concentração de pentâmeros (0,29 mg/mL) e hexâmeros (0,62 mg/mL) foram alcançadas no tempo de 9 horas (Tabela 11).

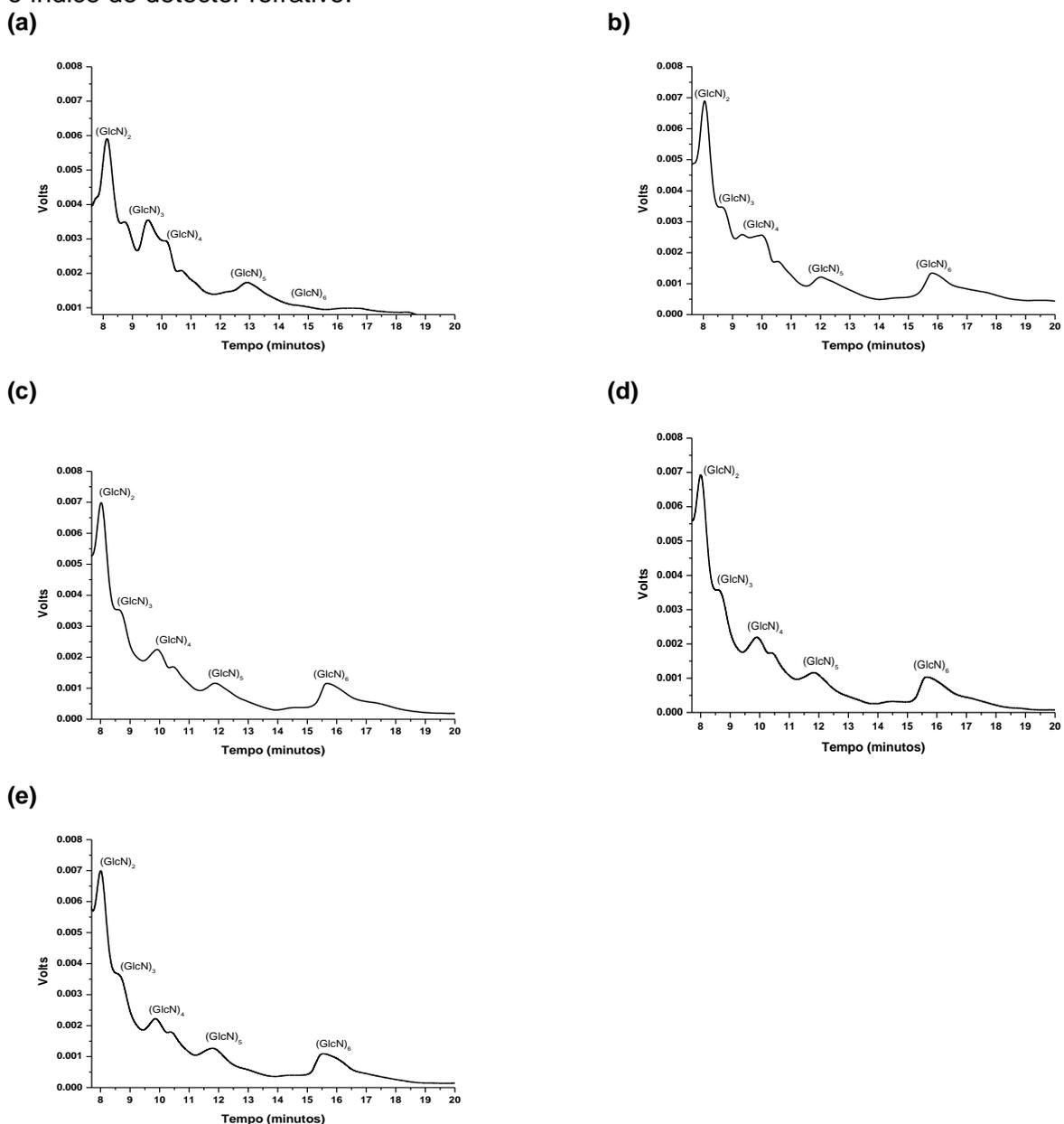
Tabela 11 - Produção de dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmeros, em diferentes tempos de hidrólise da quitosana, utilizando o complexo enzimático produzido por *Paenibacillus chitinolyticus*.

Tempo de hidrólise	Dímero (mg/L)	Trímero (mg/L)	Tetrâmero (mg/L)	Pentâmero (mg/L)	Hexâmeros (mg/L)
1 hora	1,91	1,07	0,93	0,20	0,31
3 horas	2,04	1,12	1,12	0,13	0,26
6 horas	1,18	1,27	0,97	0,23	0,24
9 horas	2,95	1,30	0,80	0,29	0,62
12 horas	2,81	1,40	1,27	0,12	0,17

(Fonte: Araújo, 2011)

Na Figura 23 encontram-se os cromatogramas obtidos nos mesmos tempos de hidrólise (1, 3, 6, 9 e 12 horas), porém, utilizando complexo enzimático produzido pelo *Paenibacillus ehimensis*. Neste caso também foi possível a obtenção de QOS compatíveis com os padrões de dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmero de glucosamina.

Figura 23 - Perfil de QOS produzidos após 1 (a), 3 (b), 6 (c), 9 (d) e 12 horas (e) de hidrólise utilizando o complexo enzimático produzido por *Paenibacillus ehimensis*. Cromatografia realizada em CLAE com coluna Shim-Pack CLC-NH₂. As análises dos oligômeros foram feitas utilizando acetonitrila (60%) como fase móvel em um fluxo de 0,8mL/minuto e utilizado o índice do detector refrativo.



(Fonte: Araújo, 2011)

Com análise das taxas de produção de oligômeros utilizando enzimas produzidas pelo *Paenibacillus ehimensis* (Tabela 12), percebe-se que este complexo enzimático é superior na produção de oligômeros quando comparado ao complexo enzimático produzido pelo *Paenibacillus chitinolyticus*. No tempo de hidrólise de 12 horas foi possível obter uma produção relativa de 99,1%. Para este mesmo tempo, as enzimas do complexo enzimático produzido pelo *Paenibacillus chitinolyticus* forneceram uma produção de 57,7%. Porém, para a análise do primeiro tempo de hidrólise (1 hora), as enzimas produzidas pelo *Paenibacillus ehimensis* são mais eficientes na produção de oligômeros (44,2% de produção relativa) do que as produzidas pelo *Paenibacillus chitinolyticus* (40,7% de produção relativa).

Tabela 12 - Produção de oligômeros (GlcN)₂₋₆ em diferentes tempos de hidrólise da quitosana utilizando o complexo enzimático produzido por *Paenibacillus ehimensis*.

Tempo de Hidrólise	Produção total de (GlcN) ₂₋₆ (mg/mL)	*Produção relativa % para 10 mg/mL de quitosana
1 hora	4,07	40,7
3 horas	9,73	97,3
6 horas	9,80	98,0
9 horas	9,86	98,6
12 horas	9,91	99,1

* A produção relativa foi mensurada pela produção total de (GlcN)₂₋₆ / concentração de quitosana x 100. (Fonte: Araújo, 2011)

Entre os hidrolisados obtidos com a incubação com enzimas produzidas pelo *P. ehimensis*, aquele obtido com 12 horas de hidrólise apresentou maior concentração pentâmeros (1,16 mg/mL) e hexâmeros (0,63 mg/mL) (tabela 13).

Tabela 13 - Produção de dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmeros, em diferentes tempos de hidrólise da quitosana, utilizando o complexo enzimático produzido por *Paenibacillus ehimensis*.

Tempo de hidrólise	Dímero (mg/L)	Trímero (mg/L)	Tetramero (mg/L)	Pentâmero (mg/L)	Hexâmeros (mg/L)
1 hora	2,71	0,79	0,20	0,15	0,22
3 horas	5,47	1,52	1,01	1,18	0,55
6 horas	5,48	1,54	1,02	1,19	0,57
9 horas	5,51	1,59	0,99	1,15	0,62
12 horas	5,52	1,60	1,01	1,16	0,63

(Fonte: Araújo, 2011)

Diferente do que ocorreu durante hidrólise utilizando o complexo enzimático *P. chitinolyticus*, há um aumento gradativo na taxa de produção de oligômeros (GlcN)₂₋₆ com o passar do tempo, não promovendo a total conversão de quitosana a monômeros (Tabela 12). Sendo assim, provavelmente, o complexo enzimático produzido por o *P. ehimensis* é formado prioritariamente por enzimas com mecanismo de hidrólise do tipo endo-enzimas. Enzimas com este tipo de mecanismo catalisam a hidrólise de maneira aleatória no interior da molécula, gerando oligossacarídeos de diversos tamanhos.

Assis et al. (2010), utilizando extrato enzimático bruto produzido pelo *Metarhizium anisopliae*, atingiu uma taxa máxima de produção relativa de 54,3% em 10 minutos de hidrólise. Resultados semelhantes foram alcançados pelo complexo enzimático bruto do *P. chitinolyticus*, porém com tempo de hidrólise maior. Choi et al. (2004), utilizando quitosanase purificada a partir de caldo fermentado de *Bacillus* sp. KCTC 0377BP, obtiveram uma taxa de produção máxima de oligômeros de 65,1% porém em um tempo de hidrólise de 60 horas. Neste presente estudo, num tempo de hidrólise cinco vezes menor, as enzimas do complexo enzimático bruto do *P. ehimensis* alcançaram uma taxa de hidrólise de 99,1%. Roncal et al. (2007) utilizando quitosanase adquirida comercialmente, obtiveram uma produção de oligômeros de 46,3% após 20 horas de hidrólise.

Levando em consideração o tempo e a produtividade de oligômeros utilizando complexo enzimático bruto, tanto o *P. chitinolyticus* como *P. ehimensis* mostraram-se eficientes para a produção em larga escala de QOS. O fato das enzimas não exigirem processos de purificação para apresentarem a atividade biológica plena,

pode beneficiar a aplicação na indústria, pela diminuição de tempo e de recursos financeiros.

4.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

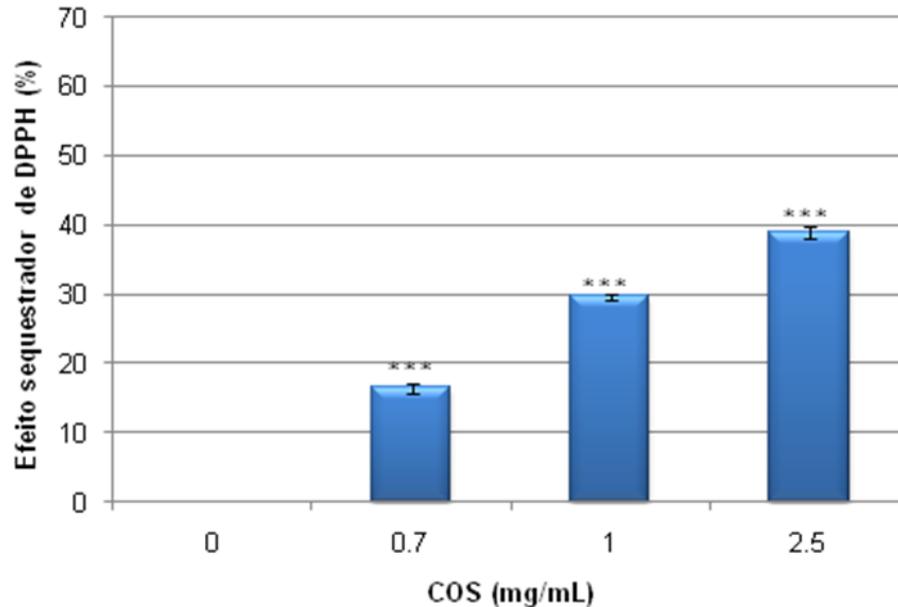
Para o teste de atividade antioxidante, foi realizada a hidrólise enzimática da quitosana conforme descrito no item 3.9. Os hidrolisados gerados foram quantificados quanto a sua concentração de açúcares redutores pelo método de DNS (MILLER, 1959). As concentrações de açúcar foram ajustadas, com água destilada, para 0,7 mg/mL (QOS obtidos com 6 horas de hidrólise), 1 mg/mL (QOS obtidos com 9 horas de hidrólise) e 2,5 mg/mL (QOS obtidos com 12 horas de hidrólise).

4.5.1 Sequestro do radical livre DPPH

O DPPH é um radical livre estável e recebe elétrons ou radicais hidrogênio para se tornar uma molécula diamagnética (SOARES et al. 1997). A solução de DPPH possui cor roxa, com absorvância máxima próximo a 515nm. Na presença de um antioxidante, a coloração da solução muda de roxo para amarelada ou torna-se clara.

Com a hidrólise da quitosana sendo realizada pelo complexo enzimático produzido pelo *Paenibacillus chitinolyticus*, foi obtida uma taxa máxima de seqüestro de 39%. Essa taxa foi alcançada pelos QOS produzidos no tempo de hidrólise de 12 horas, concentração de 2,5 mg/mL. Para os QOS produzidos nos tempos de hidrólise de 9 horas (concentração de QOS de 1mg/mL) e 6 horas de hidrólise (concentração de QOS de 0,7mg/mL), foi possível obter uma taxa de seqüestro de 29% e 16%, respectivamente (Figura 24).

Figura 24 - Efeito seqüestrador dos QOS, produzidos a partir da hidrólise da quitosana utilizando o complexo enzimático sintetizado por *Paenibacillus chitinolyticus*, sob o radical DPPH. No grupo controle a incubação ocorreu na ausência de QOS. *** $p < 0,001$ indica um aumento significativo entre a taxa de seqüestro do radical DPPH do grupo controle e as amostras incubadas com QOS nas concentrações de 0,7 mg/mL, 1 mg/mL e 2,5 mg/mL.

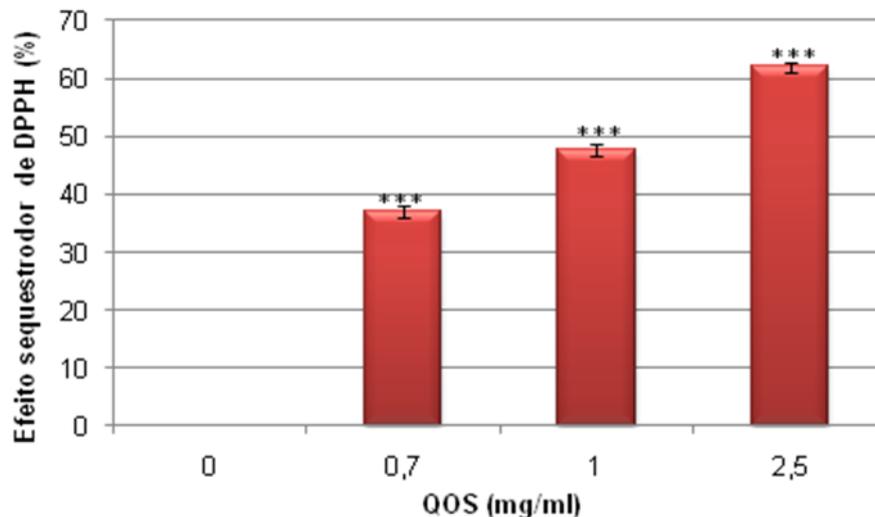


(Fonte: Araújo, 2011)

Quando os QOS foram gerados pelo complexo enzimático do *Paenibacillus ehimensis*, as taxas de seqüestro foram bem maiores que os gerados pelo complexo enzimático do *Paenibacillus chitinolyticus*. No caso do QOS gerados pelo complexo enzimático do *Paenibacillus ehimensis* na concentração de 2,5 mg/mL, foi possível a obtenção de uma taxa máxima de seqüestro de 61%. Para as concentrações de QOS de 1 mg/mL e 0,7 mg/mL foi possível obter QOS uma taxa de seqüestro de 47% e 37%, respectivamente (Figura 25).

É possível observar que os QOS obtidos no maior tempo de hidrólise (12 horas) alcançaram maior taxa de seqüestro do radical DPPH. Para esse tempo de hidrólise se tem uma maior concentração de pentâmeros e hexâmeros, resultando assim numa maior atividade biológica.

Figura 25 - Efeito seqüestrador dos QOS, produzidos a partir da hidrólise da quitosana utilizando o complexo enzimático sintetizado por *Paenibacillus ehimensis*, sob o radical DPPH. No grupo controle a incubação ocorreu na ausência de QOS. *** $p < 0,001$ indica um aumento significativo entre a taxa de seqüestro do radical DPPH do grupo controle e as amostras incubadas COS nas concentrações de 0,7 mg/mL, 1 mg/mL e 2,5 mg/mL.



(Fonte: Araújo, 2011)

Xu et al. (2010) realizaram teste semelhante com o radical DPPH o qual encontraram uma taxa de seqüestro de cerca de 50% pela incubação com QOS na concentração de 1 mg/mL, e de 80% para uma concentração de 2 mg/mL. Esses resultados podem ser considerados superiores aos encontrados aqui, já que a maior taxa de sequestro (61%) foi alcançada pela incubação com QOS na concentração de 2,5 mg/mL. O mesmo foi observado por Wang et al. (2009) e Wang et al. (2010) no qual encontraram taxas máximas de sequestro de 75 e 82%, respectivamente.

Para os experimentos realizados por Wang; Chang; Liang (2010) com pó de gladius de lula, e por Wang et al. (2008) com sobrenadante de fermentação de *S. marcescens* TKU011, os quais alcançaram uma taxa máxima de sequestro de 50% e 22% respectivamente, os resultados aqui apresentados podem ser considerados superiores.

Os diferentes resultados na produtividade de moléculas antioxidantes, utilizando a hidrólise enzimática da quitina ou quitosana, pode ser resultante da especificidade de substrato das diferentes enzimas utilizadas para produção de tais moléculas.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados aqui encontrados para experimentos realizados com o *P. chitinolyticus* foi estabelecido que o meio Off1 composto por extrato de levedura ($6,0 \text{ g.L}^{-1}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), fosfato dibásico de potássio ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) e quitosana ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$) é o ideal para o cultivo deste microrganismo. As análises do perfil de QOS gerados quando se utilizou o complexo enzimático produzido por este microrganismo mostrou que essas enzimas são capazes de gerar oligômeros de interesse comercial com comprovada atividade biológica (taxa máxima de seqüestro do radical livre DPPH de 39%).

Através da otimização da produção de quitosanases pela bactéria *P. ehimensis* foi estabelecido que o meio denominado Off2, composto por peptona ($6,0 \text{ g.L}^{-1}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), fosfato dibásico de potássio ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) e quitosana ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$), é o ideal para o cultivo deste microrganismo. Com a hidrólise da quitosana sendo realizada pelo complexo enzimático produzido por este microrganismo também foi possível obter oligômeros de interesse comercial, porém, com uma taxa de produção de oligômeros superior daquela alcançada com uso de enzimas produzidas pelo *P. chitinolyticus*. Além disso, os QOS gerados por enzimas produzidas pelo *P. ehimensis* apresentaram maior taxa de seqüestro do radical DPPH (61%).

A otimização da produção de quitosanases pelos *P. chitinolyticus* e *P. ehimensis* permitiu um aumento significativo na atividade enzimática com consequente melhora no rendimento da produção de QOS. Além disso, este estudo possibilitou conhecimentos para que se possa reduzir e melhorar o uso de componentes do meio de cultivo, contribuindo para uma economia no processo de produção em larga escala de QOS.

Esta é a primeira vez na literatura que é descrito a caracterização do complexo enzimático bruto dos *Paenibacillus chitinolyticus* e *ehimensis*. Suas características bioquímicas, como alta termoestabilidade, ampla faixa de estabilidade em pH, estabilidade em solventes orgânicos, ativação por Mn^{2+} , resistência a inibição por íons bivalente, EDTA e SDS, somada a capacidade desses complexos produzirem QOS biologicamente ativos, torna estes complexos enzimáticos promissores para aplicação industrial na produção de QOS.

Os dados obtidos nas etapas de caracterização dos complexos enzimáticos irão contribuir, tanto quanto os resultados dos planejamentos experimentais, para a produção de oligômeros de quitosana com maior rapidez, eficiência e redução de custos.

REFERÊNCIAS

AAM, B. B. et al. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**, [S.l.], v. 8, p. 1482-1517, 2010.

ARAÚJO, N.K. **Produção de enzimas quitosanolíticas utilizando *Paenibacillus ehimensis* e *Paenibacillus chitinolyticus* para obtenção de quitooligossacarídeos**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Natal, RN, 2011.

ASSIS, C. F. et al. Chitooligosaccharides enzymatic production by *Metarhizium anisopliae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S.l.], v. 33, p. 893-899, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2 ed. Campinas: Ed. Unicamp, 1995. 299 p.

BHATNAGAR, A.; SILLANPÄÄ, M. Applications of chitin - and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater – A short review. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S.l.], v. 152, p. 26-38, 2009.

BRAND-WILLIAMS W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, [S.l.], v. 28, p. 25-30, 1995.

CABRERA, J. C.; CUTSEM, P. V. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. **Biochemical Engineering Journal**, [S.l.], v. 25, p. 165–172, 2005.

CHEN, X.; XIA, W.; YU, X. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp. CJ22-326. **Food Research International**, [S.l.], v. 38, p. 315-322, 2005.

CHEN, X. E; FANG, X. B.; XIA, W. S. Strain improvement and optimization of the media composition of chitosanase-producing fungus *Aspergillus* sp. CJ 22-326. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 7, p. 2501-2508, 2008.

CHOI, Y.J . et al. Purification and Characterization of Chitosanase from Bacillus sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 70, p. 4522-4531, 2004.

CHUNG, C. H.; DAY, D. F. Glucosaminoglycans from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): a potential prebiotic. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [S.l.], v. 29, p. 196-199, 2002.

DOMARD, A.; N. CARTIER. Glucosamine oligomers: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 11, p. 297–302, 1989.

EL-SHERBINY, E. S. A. Purification and Characterization of Chitosanase Enzyme from *Streptomyces cyaneogriseus*. **Asian Journal of Biological Sciences**, [S.l.], v. 4, p. 15-24, 2011.

GOA, X. A. et al. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 72, p. 513-520, 2008.

HAI, L. et al. Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, [S.l.], v. 208, p. 466-470, 2003.

JANEGITZ, B. C. et al. Development of a method employing chitosan to remove metallic ions from wastewater. **Química Nova**, [S.l.], v. 30, p. 879-884, 2007.

JEON, Y. J.; PARK. P. J.; KIM, S. K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 44, p. 71-76, 2001.

JOHNSEN, M. G.; HANSEN, O. C.; STOUGAARD, P. Isolation, characterization and heterologous expression of a novel chitosanase from *Janthinobacterium* sp. Strain 4239. **Microbial Cell Factories**, [S.l.], v. 9, p. 1-9, 2010.

KIM, S. K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 62, p. 357-368, 2005.

KÖPING-HÖGGARD, M. et al. Relationship between the physical shape and efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. **The Journal of Gene Medicine**, [S.l.], v. 5, p. 130-141, 2003.

KÖPING-HÖGGARD, M. et al. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. **Gene Therapy**, [S.l.], v. 11, p. 1441-1452, 2004.

KUMAR, A. B. V.; THARANATHAN, R. N. A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes. **Carbohydrate Polymers**. [S.l.], v. 58, p. 275-283, 2004.

KUO, C. H.; CHEN, C. C.; CHIANG B. H. Properties Process Characteristics of Hydrolysis of Chitosan in a Continuous Ezymatic Membrane Reactor. **JFS E. Food Engineering and Physical**, [S.l.], v. 69, p. 332- 337, 2004.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, [S.l.] v. 26, p. 1921-1971, 2001.

KUROSHIMA, K. I. et al. *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., new chitinolytic members of the genus *Bacillus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S.l.], v. 46, p. 76-80, 1996.

LEE, H. W. et al. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidium* and *Lactobacillus* sp. **Anaerobe**, [S.l.], v. 8, p. 319-324, 2002.

LEE, Y. S. et al. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 73, p. 113-121, 2006.

LIANG, T. W. et al. The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 42, p. 527-534, 2007.

LIANG, T. W. et al. Purification and characterization of a chitosanase and a protease by conversion of shrimp shell wastes fermented by *Serratia Marcescens* Subsp. *Sakuensis* TKU019. **Journal of The Chinese Chemical Society**, [S.l.], v. 57, p. 1-7, 2010.

MAEDA, Y.; KIMURA, Y. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice. **Nutrition and Cancer**, [S.l.], v. 134, p. 945-950, 2004.

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

MING, M. et al. Production of chitosan oligosaccharides by chitosanase directly immobilized on an agar-coated multidisk impeller. **Biochemical Engineering Journal**, [S.l.], v. 28, p. 289-294, 2006.

NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure and Applied Chemistry**, [S.l.], v. 74, p. 1245-1251, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006, 1202 p.

NGO, D. N.; KIM, M. M.; KIM, S. K. Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 74, p. 228-234, 2008.

PAGNONCELLI, M. G. B. **Estudo do mecanismo de produção de oligossacarídeos com atividades nutracêuticas a partir da quitosana por hidrólise enzimática com processo fermentativo simultâneo**. 2008. 118 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal, RN, 2008.

PAGNONCELLI, M. G. B. et al. Chitosanase Production by *Paenibacillus ehimensis* and its Application for Chitosan Hydrolysis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S.l.], v. 53, p. 1461-1468, 2010.

PETER, M. G. Chitin and chitosan from animal sources. In: STEINBÜCHEL, A.; RHEE, S. K. **Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry**. Weinheim: Wiley-vch, 2005, p.115-208.

PRASHANTH, H. K. V.; THARANATHAN, R. N. Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.], v. 1722, p. 22-29, 2005.

PRASHANTH, H. K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential –an overview. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 18, p. 117-131, 2007.

RATANAVARAPORN, J. et al. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells na chitosan and chitooligosaccharide films. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 78, p. 873-878, 2009.

RHOADES, J. et al. Inhibition of the adhesion of enteropathogenic Escherichia coli strains to HT-29 cells in culture by chito-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 64, p. 57-59, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005, 325 p.

RONCAL, T. et al. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v. 342, p. 2750–2756, 2007.

RUFINO, M. S. M. et al. Free radical-scavenging behavior of some North-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 114, p. 693-695, 2009.

SAITO, J et al. Cristal structure of chitosanase from Bacillus circulans MH-K1 at 1.6-Å resolution and its substrate recognition mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 274, p. 30818-30825, 1999.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens: polímeros. **Ciência e Tecnologia**, [S.l.], v.13, p. 242-249, 2003.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 10, p. 37-51, 1999.

SHEN, K. T. et al. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor and metastasis. **Food and Chemical Toxicology**, [S.l.], v. 47, p. 1864-1871, 2009.

SILVA, L. C. A. et al. Optimization of Chitosanase Production by Trichoderma koningii sp. Under Solid-State Fermentation. **Food Bioprocess Technology**, [S.l.], 2010, DOI: 10.1007/s11947-010-0479-1.

SOARES, J. R. et al. Antioxidant activities of some extracts of Thymus zygis. **Free Radical Research**, [S.l.], v. 26, p. 469-478, 1997.

SUN, Y. et al. Purification and characterization of two types of chitosanase from a Microbacterium sp. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 28, p. 1393-1399, 2006.

SUN, Y. et al. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 98, p. 1548-1553, 2007.

SUN, Y.; ZHANG, J.; WANG, S. Purification and characterization of the chitosanase from *Aeromonas* sp. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 8, p. 2830-2834, 2009.

SUZUKI, K. et al. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v.151, p. 403-408, 1986.

TERBOJEVICH, M.; COSANI, A.; MUZZARELLI, R. A. A. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 29, p. 63-68, 1996.

TØMMERAAS, K. et al. Preparation and characterization of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v. 333, p.137-144, 2001.

WANG, S. L. et al. Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v.343, p.1316–1323, 2008.

WANG, S. L; YEH, P. Y. Purification and characterization of a chitosanase from a nattokinase producing strain *Bacillus subtilis* TKU007. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 43, p. 132-138, 2008.

WANG, S. L. et al. Conversion of squid pen by using *Serratia* sp. TKU020 fermentation for the production of enzymes, antioxidants, and N-acetyl chitooligosaccharides. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 44, 854-861, 2009.

WANG, S. L. et al. In vitro antioxidant activity of liquor and semi-purified fractions from fermented squid pen biowaste by *Serratia ureilytica* TKU013. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 119, p. 1380-1385, 2010.

WANG, S. L.; CHANG, T. J; LIANG, T. W. Conversion and degradation of shellfish wastes by *Serratia* sp. TKU016 fermentation for the production of enzymes and bioactive materials. **Biodegradation**, [S.l.], v. 21, p. 321-333, 2010.

WEE, Y. J. et al. Optimization of chitosanase production from *Bacillus* sp. RKY3 using statistical experimental designs. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S.l.], v. 8, p.1356-1363, 2009.

XIA, W.S.; LEE, D.X. Purification and characterization of exo-b-D-glucosaminidase from commercial lipase. *Carbohydrate Polymers*, 74, 544-551, 2008.

XIA, W. et al. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. **Food Hydrocolloids**, [S.l.], v. 25, p. 170-179, 2011.

XIE, Y.; WEI, Y.; HU, J. G. Depolymerization of Chitosan with a Crude Cellulase Preparation from *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S.l.], v. 160, p. 1074-1083, 2010.

XU, O. et al. Chitooligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of Bax. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 71, p. 509-514, 2008.

XU, Q. et al. Chitooligosaccharides protect human embryonic hepatocytes against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. **Marine Biotechnology**, [S.l.], v. 12, p. 292-298, 2010.

ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**. [S.l.], v. 54, p. 527-430, 2003.

ZHU, X. F.; ZHOU, Y.; FENG, J. L. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-05. **Journal of Zhejiang University**, [S.l.], v. 11, p. 831-838, 2007.