

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

# PRODUÇÃO DE QUITINASES POR FERMENTAÇÃO POR *Trichoderma* sp.

Aluna: Ana Paula dos Santos Ribeiro

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Teixeira Franco

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química  
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia  
Química.

CAMPINAS - S.P

DEZEMBRO 2000

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE: Pe ✓  
L.º CHAMADA: TI UNICAMP  
R 354-p  
Ex. 1  
COMBO BC/ 44115  
PROC. 16-392/01  
C  D   
PREC. R\$ 11,00  
DATA 25/04/01  
N.º CPD

CM-00154648-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP


R354p      Ribeiro, Ana Paula dos Santos  
            Produção de quitinases por fermentação por  
*Trichoderma* sp. / Ana Paula dos Santos Ribeiro.--  
Campinas, SP: [s.n.], 2000.

            Orientadora: Telma Teixeira Franco  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

            1. Quitina. 2. Polissacarídeos. 3. Enzimas de  
fungos. 4. *Trichoderma*. I. Franco, Telma Teixeira. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Química. III. Título.

---

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

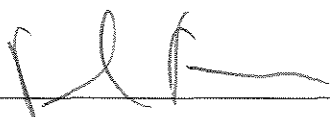


---

Prof.ª. Dr.ª. Telma Teixeira Franco

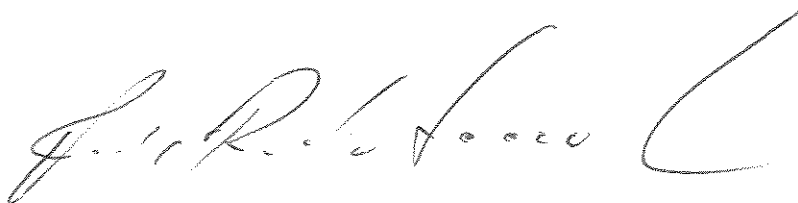
---

Dissertação de Mestrado defendida por **Ana Paula dos Santos Ribeiro** e aprovada em **4 de dezembro de 2000** pela banca examinadora constituída pelos doutores:



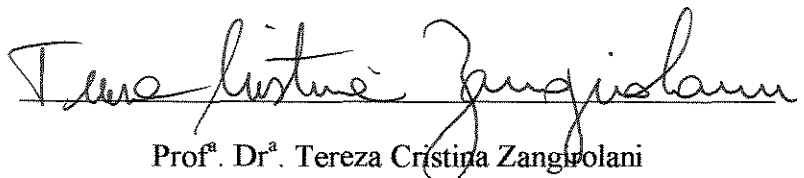
Prof. Dr.ª. Telma Teixeira Franco

(Orientador)



Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

(Titular)



Prof. Dr.ª. Tereza Cristina Zangrolani

(Titular)

---

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese em memória de minha "Vovó Dinda", que me amou como se fosse sua filha, oferecendo-me muito carinho, amor, e incentivo nas horas difíceis.*

*Saudades Vovó!!*

---

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas me ajudaram durante esses anos, espero não esquecer de agradecer ninguém.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me dado muita saúde e força para a realização deste trabalho.

À minha "Vovó Dinda", que não está mais conosco, mas me ajudou muito na época que não tinha bolsa.

Ao Marcos Aurélio, meu noivo, que sempre esteve ao meu lado nas horas alegres, tristes e difíceis.

À minha família (Mamãe, Papai, minhas irmãs, Raquel, Juliana e agora meu lindinho, Pedro Augusto) que sempre me incentivaram a continuar estudando.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Teixeira Franco um agradecimento muito especial, pois demonstrou ser acima de tudo uma pessoa amiga, companheira e muito paciente, principalmente nas horas difíceis e preocupando-se muito com nosso desenvolvimento profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

À minha "nova" família (Matilde, Mauricio, Paulinho e Fábio) que me receberam como uma filha em sua casa.

Ao Valmir, do laboratório de graduação, que sempre estava disposto em me ajudar e colaborar nas horas em que precisei.

Aos meus amigos do LEB, Kathia, Lianne, Everaldo, Érico, Luciana, Sérgio, Estelinha, Zéa, Ricardo, Jonatas, Aline, Cris, Lilian que se tornaram pessoas muito especiais, fazendo com que o nosso ambiente de trabalho fosse muito agradável. Obrigada Pessoal !!!!!

---

Um agradecimento mais do que especial é para minhas companheiras (Fafá, Li, Dani, Cris, Ana, Giovana, Fânia) de longas datas, que participaram em "tempo integral" destes anos de mestrado, noites de estudos e muita conversa. Sentirei saudades !!!

E todos os amigos, em especial a Aninha do Laboratório de Engenharia Ambiental que me ajudou em muitas horas de dificuldade, que tornaram esses anos mais alegres e divertidos (Eliana, Cleide, Rose, Kelly, Jorge, Evelyn) e todos os "vizinhos" de laboratório.

---

## EPÍGRAFE

*O objetivo da ciência é prever, e não, como muitos pensam, compreender.*

*Pierre Du Noury*



---

## SUMÁRIO

<b><u>LISTA DE FIGURAS</u></b> .....	XIII
<b><u>LISTA DE TABELAS</u></b> .....	XV
<b><u>NOMENCLATURA</u></b> .....	XVI
<b><u>RESUMO</u></b> .....	XVII
<b><u>ABSTRACT</u></b> .....	XVIII
<b><u>1 - INTRODUÇÃO</u></b> .....	19
<b><u>2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u></b> .....	21
<b><u>2.1 – POLÍMEROS DE QUITINA E ENZIMAS QUITINOLÍTICAS</u></b> .....	21
<b><u>2.1.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</u></b> .....	21
<b><u>2.1.2 - CARACTERÍSTICA E OBTENÇÃO DE QUITINA</u></b> .....	22
<b><u>2.1.2 - DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA QUITINA POR</u></b> <b><u>MICROORGANISMOS</u></b> .....	23
<b><u>2.2 - AS QUITINASES E SEU PAPEL NA BIOTECNOLOGIA</u></b> .....	25
<b><u>2.2.1 - QUITINASES VEGETAIS</u></b> .....	26
<b><u>2.2.2 - QUITINASES BACTERIANAS</u></b> .....	27
<b><u>2.2.3 - QUITINASES DE INVERTEBRADOS MARINHOS</u></b> .....	27
<b><u>2.2.4 - QUITINASES DE PEIXES</u></b> .....	28
<b><u>2.2.4 - PRODUÇÃO DE QUITOOLIGOSSACARÍDEOS</u></b> .....	28
<b><u>2.2.5 – QUITINA DESACETILADA: QUITOSANA</u></b> .....	29

---

<u>2.3 - CONCEITOS BÁSICOS DA FERMENTAÇÃO</u> .....	30
<u>2.2.2 – COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO</u> .....	32
<u>2.4 - FUNGOS: CARACTERÍSTICAS E ALGUMAS FUNÇÕES</u> .....	34
<u>2.4.1 - CONTROLE BIOLÓGICO</u> .....	35
<u>2.5 – PRODUÇÃO DE QUITINASE POR FERMENTAÇÃO</u> .....	36
<u>2.5.1 – PRODUÇÃO FÚNGICA</u> .....	36
<u>2.5.2 – PRODUÇÃO BACTERIANA</u> .....	38
<u>2.6 – PRODUÇÃO DE QUITINASE POR FERMENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE ( ESTADO SEMI-SÓLIDO)</u> .....	39
<u>2.7 – PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS QUITINOLÍTICAS</u> .....	39
<u>2.7 - OTIMIZAÇÃO POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL</u> .....	41
<b><u>3 - MATERIAL E MÉTODOS</u></b> .....	<b>43</b>
<u>3.1- MICRORGANISMO</u> .....	43
<u>3.1.1- FERMENTAÇÃO</u> .....	44
<u>3.2 - MÉTODOS ANALÍTICOS</u> .....	45
<u>3.2.1 - DETERMINAÇÃO DE ACÚCARES REDUTORES INICIAIS (ARI) - MÉTODO SOMOGY &amp; NELSON</u> .....	45
<u>3.2.1.1- Preparo da Quitina Coloidal</u> .....	46
<u>3.2.1.2 – Preparo da Curva Padrão de N-acetilglicosamina</u> .....	46
<u>3.2.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA – ACÚCARES REDUTORES ENZIMÁTICOS (ARe)</u> .....	47

---

---

3.2.2.1 – Cálculo para Obtenção do Valor da Atividade Quitinolítica.....	47
<b><u>3.2.3 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....</u></b>	<b>47</b>
3.2.3.1 - Preparo do substrato .....	47
3.2.3.2 - Ensaio para determinação da atividade proteolítica .....	48
<b><u>3.2.4 – DETERMINAÇÃO QUITOOLIGOSSACARÍDEOS POR CROMATOGRÁFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....</u></b>	<b>49</b>
3.2.4.1 – Equipamento .....	49
3.2.4.2 - Método da Cromatografia CLAE .....	49
<b><u>4- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</u></b>	<b>51</b>
<b><u>4.1 – PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO: ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, AGITAÇÃO E PH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE QUITINASE.....</u></b>	<b>51</b>
<b><u>4.1.1 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR <i>Trichoderma sp.</i> PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2<sup>3</sup>).....</u></b>	<b>53</b>
1.) <u>CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM GLICOSE 0,1%.....</u>	53
2.) <u>CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM GLICOSE 0,5%.....</u>	55
3.) <u>CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM GLICOSE 0,3%.....</u>	56
<b><u>4.2 – SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO (2<sup>3</sup>): ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, AGITAÇÃO E PH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE QUITINASE.....</u></b>	<b>58</b>

---

<u>4.2.2 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR <i>Trichoderma</i> sp. PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2<sup>o</sup>)</u> .....	58
<u>1.) CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM LACTOSE 0,1%</u> .....	58
<u>2.) CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM LACTOSE 0,5%</u> .....	61
<u>3.) CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM LACTOSE 0,3%</u> .....	62
<u>4.3 – DISCUSSÃO SOBRE O PLANEJAMENTO APLICADO NESTE TRABALHO</u> .....	64
<u>4.3 – PRODUTIVIDADE DA QUITINASE EM RELAÇÃO AOS DADOS DA LITERATURA</u> .....	65
<u>4.3 – PRODUÇÃO DE QUITOOLIGOSSACARÍDEOS PELA QUITINASE DE <i>TRICHODERMA</i> SP. T<sub>6</sub></u> .....	66
<u>5- CONCLUSÕES</u> .....	71
<u>6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</u> .....	73
<u>7- BIBLIOGRAFIA</u> .....	74

---

## LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA 1 – ESTRUTURA POLIMÉRICA DA QUITINA</u> .....	21
<u>FIGURA 2 – ROTAS PARA A DEGRADAÇÃO DA QUITINA NA NATUREZA (SIEFERT <i>ET AL.</i>, 2000)</u> .....	25
<u>FIGURA 3 - ESTEQUIOMETRIA DE CRESCIMENTO, SEGUNDO STANBURY &amp; WHITAKER <i>ET AL.</i> (1984)</u> .....	33
<u>FIGURA 4 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR <i>TRICHODERMA SP. T<sub>6</sub></i> CONTENDO GLICOSE 0,1% (ENSAIOS 1 AO 4). (A) ATIVIDADE QUITINOLÍTICA; (B) pH; (C) ARI; (D) ATIVIDADE PROTEOLÍTICA</u> .....	54
<u>FIGURA 5 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR <i>TRICHODERMA SP. T<sub>6</sub></i> PARA OS ENSAIOS CONTENDO GLICOSE 0,5% (ENSAIO 5 AO 8). (A) ATIVIDADE QUITINOLÍTICA; (B) pH; (C) ARI; (D) ATIVIDADE PROTEOLÍTICA</u> .....	55
<u>FIGURA 6 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR <i>TRICHODERMA SP. T<sub>6</sub></i> PARA OS ENSAIOS CONTENDO GLICOSE 0,3% (ENSAIOS 9 AO 11). (A) ATIVIDADE QUITINOLÍTICA; (B) pH; (C) ARI</u> .....	57
<u>FIGURA 7 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR <i>TRICHODERMA SP. T<sub>6</sub></i> PARA OS ENSAIOS CONTENDO LACTOSE 0,1% (ENSAIO 1 AO 4). (A) ATIVIDADE QUITINOLÍTICA; (B) pH; (C) ARI; (D) ATIVIDADE PROTEOLÍTICA</u> .....	59
<u>FIGURA 8 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR <i>TRICHODERMA SP. T<sub>6</sub></i> PARA OS ENSAIOS CONTENDO LACTOSE 0,5% (ENSAIOS 4 AO 7). (A) ATIVIDADE QUITINOLÍTICA; (B) pH; (C) ARI; (D) ATIVIDADE PROTEOLÍTICA</u> .....	62
<u>FIGURA 9 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR <i>TRICHODERMA SP. T<sub>6</sub></i> PARA OS ENSAIOS CONTENDO LACTOSE 0,3% (ENSAIOS 9 AO 11). (A) ATIVIDADE QUITINOLÍTICA; (B) pH; (C) ARI</u> .....	63

---

<u>FIGURA 10 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE QUITOLIGOSSACARÍDEOS EM COLUNA <math>\mu</math>BONDAPAK-NH<sub>2</sub>, SOLUÇÃO DE ACETONITRILA E ÁGUA (70:30, V/V E 50:50, V/V) A UM FLUXO GRADIENTE LINEAR DE 0,8ML/MIN, DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (210 NM).</u> .....	67
<u>FIGURA 11 - CROMATOGRAMA PADRÃO DE MONO-N-ACETILGLICOSAMINA.</u> ...	68
<u>FIGURA 12 - CROMATOGRAMA PADRÃO DE N,N'-DIACETILQUITOBIOSE.</u> .....	69
<u>FIGURA 13 - CROMATOGRAMA DA HIDRÓLISE DA QUITINA COLOIDAL 1% (TAMPÃO ACETATO 50 MM, PH 5,2) APÓS 8 HORAS COM CALDO DE FERMENTAÇÃO DO <i>TRICHODERMA</i> SP. T<sub>6</sub>.</u> .....	69
<u>FIGURA 14- CINÉTICA DE FORMAÇÃO DO DI-N-ACETILQUITOBIOSE (MG) EM FUNÇÃO DA HIDRÓLISE DE QUITINA COLOIDAL 1% EM TAMPÃO ACETATO 50 MM, PH 5,2 PELO CALDO DE FERMENTAÇÃO DE <i>TRICHODERMA</i> SP. T<sub>6</sub> (PROVENIENTE DO ENSAIO 6 CONTENDO GLICOSE).</u> .....	70

---

## LISTA DE TABELAS

<u>TABELA 1 - APLICAÇÕES DA QUITINA, QUITOSANA E SEUS DERIVADOS.....</u>	30
<u>TABELA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE A FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO E A SUBMERSA.....</u>	32
<u>TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO PARA MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO.....</u>	43
<u>TABELA 4 - COMPOSIÇÃO BÁSICA PARA ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO UTILIZANDO GLICOSE.....</u>	44
<u>TABELA 5 - COMPOSIÇÃO BÁSICA PARA ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO UTILIZANDO LACTOSE.....</u>	45
<u>TABELA 6 - NÍVEIS DE 0,3% DE GLICOSE NÃO EXPLORADO PELO PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....</u>	64
<u>TABELA 7- PRODUÇÃO DE QUITINASE MICROBIANA (DADOS DA LITERATURA).....</u>	66

---

## NOMENCLATURA

<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>ARi</b>	Açúcares Redutores Iniciais
<b>ARe</b>	Açúcares Redutores Enzimáticos
<b>GP</b>	Grau de Polimerização
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



---

## RESUMO

Enzimas quitinolíticas, como as quitinases, presentes nos reinos animal, vegetal e fúngico, constituem um importante grupo de enzimas associadas com o metabolismo e degradação de substratos insolúveis como a quitina.

Neste trabalho foi realizado um estudo para a verificação da influência da fonte de carbono livre (glicose e lactose) e das condições de cultivo (agitação e pH) na produção de quitinase da linhagem de *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub>. As fermentações foram realizadas a 27°C, retirando-se amostras a cada 12 horas ao longo de 72 horas de fermentação para determinação da atividade quitinolítica, proteolítica, açúcares redutores e pH. Foi avaliado o efeito das três variáveis sobre a produção de quitinase por *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub>.

As melhores condições encontradas para o meio contendo glicose, foram agitação de 200 rpm, pH 6,0, 0,3% de glicose atingindo uma média de produção de enzima de 1,92 U/mL.

Para os meios de cultura contendo lactose, a máxima produção de quitinase se deu nos ensaios 5, 6 e 7 (0,5% lactose) com 0,76, 0,75 e 0,85 U/mL, respectivamente.

Foi observada formação de proteases desde o início da fermentação nos ensaios contendo lactose.

A hidrólise enzimática com o caldo bruto do ensaio de máxima produção quitinolítica foi acompanhada por 8 horas produzindo dois oligossacarídeos predominantes, o mono e o di-acetilquitobiose.

---

## ABSTRACT

Chitinolytic enzymes, as chitinases, constitute an important group of enzymes related with metabolism and degradation of insoluble substrate as chitin present in animal, plants and fungi.

In this work studies of carbon source (glucose and lactose) and cultivation conditions (agitation and pH) to produce chitinase by *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> were carried out. The effect of carbon source, agitation and pH upon chitinase production by *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> was investigated. Fermentations were performed at 27°C, and samples were withdrawn every 12 hours during 72 hours of fermentation in order to assay both chitinolytic and proteolytic activity, as well as reducing sugar and pH.

The optimal conditions for chitinase production found in glucose medium were 200 rpm (agitation), 6,0 (pH) and 0,3% (glucose) achieving an average value of 1,92 U/mL.

Liquid culture medium with lactose showed maximum production of chitinase at 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> experiments (0,5% lactose) with 0,76, 0,75 and 0,85 U/mL, respectively.

It was observed that proteases were formed at beginning of fermentation in the experiments using lactose.

Chitin hydrolysis by the raw broth of maximum chitinolytic activity was followed for 8 hours and the two predominant oligosaccharides, were mono and di-acetylchitobiose, respectively.

## 1 - INTRODUÇÃO

A biotecnologia representa um amplo campo de atividades, impulsionado à partir da Segunda Guerra Mundial pela indústria de antibióticos, e compreende aplicações na indústria farmacêutica, química, agroalimentar e ambiental.

Dentre os produtos biotecnológicos destacam-se as enzimas, que são biocatalisadores altamente específicos utilizados em biotransformações de substratos e seus derivados.

Quitinases e quitosanases são enzimas hidrolíticas, os quais atuam na hidrólise da quitina e da quitosana, encontradas em bactérias, fungos e plantas agindo em suas ligações acetoglicosamina ( $\beta$ -(1-4) glicosamina). Em plantas, estas enzimas são consideradas patogênicas, relacionadas ao mecanismo de defesa antagonista de fungos patogênicos.

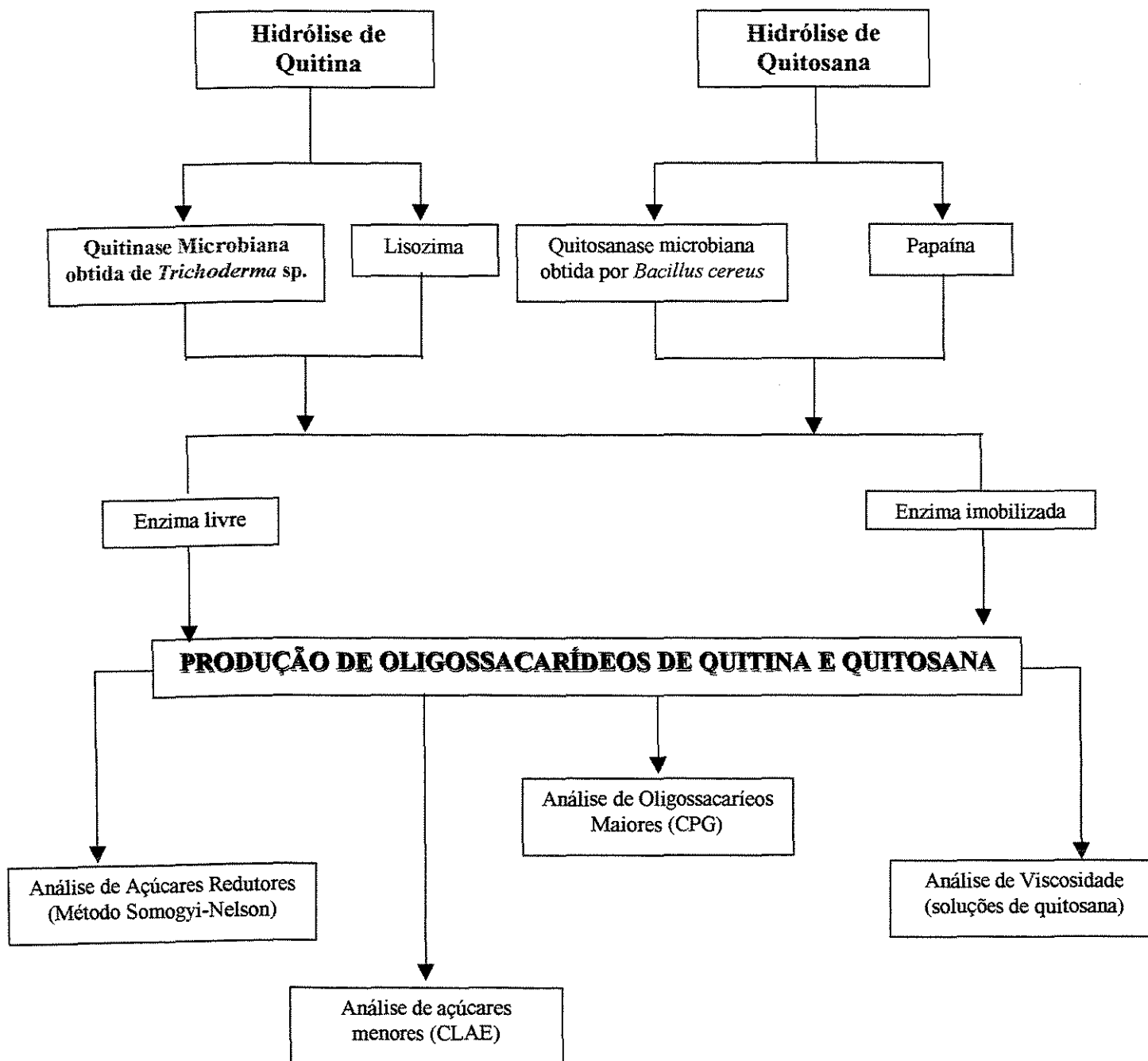
Quitina é uma abundante fonte natural renovável obtida de invertebrados marinhos, insetos, fungos e algas. Cerca de 22 até 33% da parede celular dos fungos pode ser constituído por quitina.

Quase 10% dos desembarques de produtos aquáticos consiste em organismos ricos em materiais quitinosos (10-55% em massa seca) sendo mais de 80.000 toneladas de quitina produzidas por ano à partir de resíduos marinhos (PATIL *et al.*, 2000).

É amplo o uso das enzimas quitinases, que estão envolvidas em mecanismos de defesas de plantas e invertebrados, agindo contra microrganismos patogênicos. A produção enzimática de quitina e quitosana de menores massas molares apresentam um potencial de aplicação na medicina humana. Por exemplo, quitohexose e quitohexose mostraram ter atividade anti-tumoral. Em vista do crescente interesse sobre as enzimas quitinolíticas, muitos microrganismos produtores desta enzima foram isolados a partir de fungos filamentosos e bactérias, sendo a composição do meio de cultura investigado, para melhorar os rendimentos de produção destas enzimas.

Um macroprojeto está sendo desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica com o objetivo de produzir oligossacarídeos e polímeros modificados

derivados da quitina e da quitosana (Figura abaixo). Esta tese de mestrado contempla a utilização do polímero insolúvel acetilado, quitina, precursor da quitosana.



## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – POLÍMEROS DE QUITINA E ENZIMAS QUITINOLÍTICAS

#### 2.1.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A quitina (Figura 1) é amplamente distribuída na natureza em estruturas esqueléticas de crustáceos, insetos, cogumelos comestíveis e parede celular de fungos (LEE *et al.*, 1996). É o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, sendo encontrado somente em menores concentrações que a celulose. Sua importância vem aumentando significativamente por representar fontes de materiais renováveis e devido às propriedades biológicas, médicas e biotecnológicas (PIZA *et al.*, 1999). Particularmente, as quitinases (EC 3.4.1.14) são usadas na agricultura para o controle de microrganismos patogênicos.

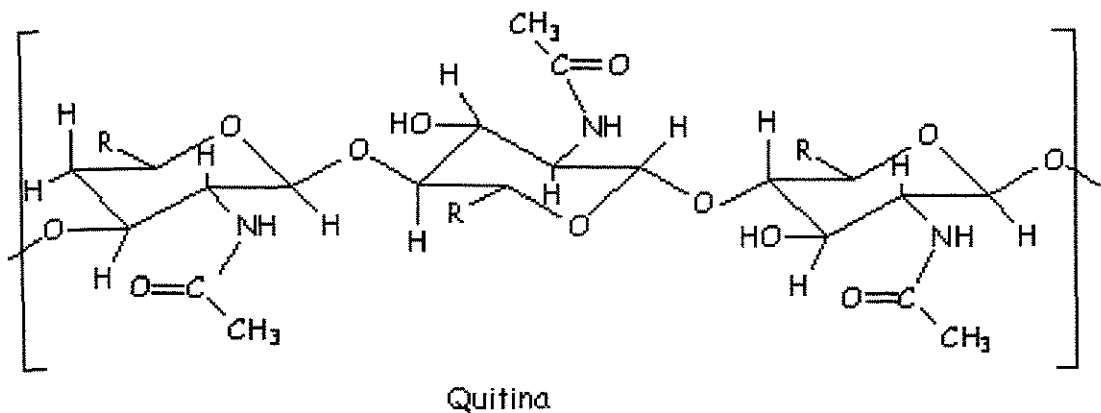


Figura 1 – Estrutura polimérica da quitina

As quitinases e quitooligômeros produzidos pela hidrólise da quitina podem também ser usadas em tratamentos da saúde humana.

O sucesso em empregar quitinases em diferentes aspectos, está ligada à sua obtenção, alta eficiência e custo razoável. Por esta razão, o conhecimento da bioquímica e genes que regulam a síntese e expressão das quitinases, de suas afinidades fitogênicas serão de grande importância para estudos futuros em vários processos (PATIL *et al.*, 2000).

Pesquisadores da Universidade do Ceará estão produzindo a quitosana à partir da quitina por tratamento químico. Inicialmente tentaram aplicar a quitina em processos de tratamento de água, no entanto foi observado um maior potencial para o seu produto desacetilado (quitosana) em processos de recuperação de metais pesados em água. Pesquisas vem sendo desenvolvidas utilizando a quitosana na fabricação de membranas para traumatismos e grandes ferimentos ou em queimaduras como auxiliar na cicatrização. Como vantagem, a membrana de quitosana apresenta uma composição semelhante ao tecido intracelular, é altamente bactericida e pode transportar outras substâncias que ajudam no tratamento, tais como antibióticos ou vitaminas. Foi observado que a cicatrização ocorre em um terço do tempo necessário contra o tratamento convencional. Na quimioterapia a quitosana serve para a formação de “mísseis químicos”, por conter grupos de hidrogênio livres que possuem elevada afinidade pelas células cancerosas, ligando-se diretamente a elas e conduzindo os medicamentos da quimioterapia, reduzindo assim os efeitos colaterais do tratamento convencional. Um produto comercial a base de quitosana foi desenvolvido, o “Fibersan”, que atua na eliminação de gorduras e colesterol do organismo (CRAVEIRO *et al.*, 1999).

### **2.1.2. - CARACTERÍSTICA E OBTENÇÃO DE QUITINA**

Como a celulose, a quitina é um polímero linear com cadeias não ramificadas ligados em  $\beta$ - 1,4 (N-acetil-glicosamina, GlcNAc). Em muitos organismos a quitina é modificada pela ligação com outros polímeros como glucanos, proteínas, etc.

Quitina é um abundante polímero natural renovável, presente em invertebrados marinhos, insetos, fungos e algas. Cerca de 22 até 33% da parede celular dos fungos pode

ser constituído por quitina. Quase 10% dos desembarques de produtos marinhos consiste em organismos ricos em materiais quitinosos (10-55% em massa seca) sendo mais de 80.000 toneladas de quitina produzidas por ano à partir de resíduos marinhos (PATIL *et al.*, 2000).

A quitina obtida de caranguejos e cascas de camarão está associada com as indústrias de alimentos, como as de acondicionamento de camarões limpos para pronto consumo. No entanto, quando falamos em quitina de micelas de fungos, sua obtenção ocorre sob forma de complexos quitosana-glucano associado à processos fermentativos, como por exemplo a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

O processamento das cascas de crustáceos envolve principalmente a remoção de proteínas e dissolução de carbonatos de cálcio, presentes em altas concentrações nas cascas de caranguejos. A quitina é desacetilada em 40% de hidróxido de sódio a 120°C por 1-3 horas. Este tratamento produz 70% de quitosana desacetilada. A completa desacetilação pode ser obtida repetindo esta etapa (MUZZARELLI *et al.*, 1980).

A produção de quitina e quitosana utiliza cascas de caranguejos e camarão descartados pelas indústrias pesqueiras em Oregon, Washington, Virginia, e Japão e por várias frotas pesqueiras na Antártica e América do Sul. Alguns países possuem uma grande fonte de quitina inexplorada, por exemplo, Noruega, México e Chile.

### **2.1.2 - DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA QUITINA POR MICROORGANISMOS**

A degradação microbiana de polissacarídeos requer diversas hidrolases com diferentes especificidades e modos de ação. A maioria abundante de polissacarídeos está presente nas paredes celulares das plantas como carbono e reserva de energia, em paredes celulares de fungos e em exoesqueletos de insetos, aracnídeos e crustáceos.

O interesse em enzimas hidrolíticas para estes polissacarídeos tem aumentado marcadamente por causa do potencial deste substrato para obtenção de produtos

comercializáveis. Isto é observado pelos recentes trabalhos sobre enzimas como amilases, celulasas, hemicelulasas e quitinases (SHAIKH *et al.*, 1993).

A caracterização e purificação da enzima de interesse no sistema a ser trabalhado é importante, pois deve estar isenta de outros componentes com atividades similares. Isto muitas vezes torna-se difícil por causa da presença de diferentes enzimas com as mesmas características hidrolíticas semelhantes.

Naturalmente os substratos que são utilizados para a produção fermentativa dessas enzimas são insolúveis. Os microrganismos que utilizam estes substratos devem usar enzimas extracelulares, livres ou associadas com a superfície da célula, para converter os polissacarídeos em produtos solúveis, os quais são transportados para o interior da célula.

Como a celulose e quitina são homopolímeros lineares de glicose e N-acetilglicosamina, respectivamente, ligados por ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica, um único tipo de reação, hidrólise da ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica, é necessária para converter celulose e quitina a produtos solúveis. No entanto, sua degradação é complexa devido a insolubilidade dos substratos e inacessibilidade da ligação glicosídica, especialmente na região cristalina (WARREN *et al.*, 1996).

Dois diferentes caminhos catabólicos para a degradação da quitina podem existir na natureza. Estes caminhos foram propostos por DAVIS & EVELEIGH em 1984, são mostrados na Figura 2.

A degradação da quitina pelas quitinases, para a obtenção de menores subunidades tais como o monômero N-acetilglicosamina é bem documentada por grande número de publicações. Microrganismos isolados em cultura pura contém variadas enzimas para metabolizar a quitina como única fonte de energia, carbono e nitrogênio. A outra via ou caminho, a chamada "Via Quitosana" tem sido postulada por analogia com a outra via de degradação destes polímeros naturais. A enzima chave desta via é a quitina-desacetilase, a qual converte a quitina em quitosana liberando acetato. Quitina-desacetilases tem sido encontradas em alguns microrganismos, especialmente fungos, que crescem em quitina (GOODAY *et al.*, 1991).



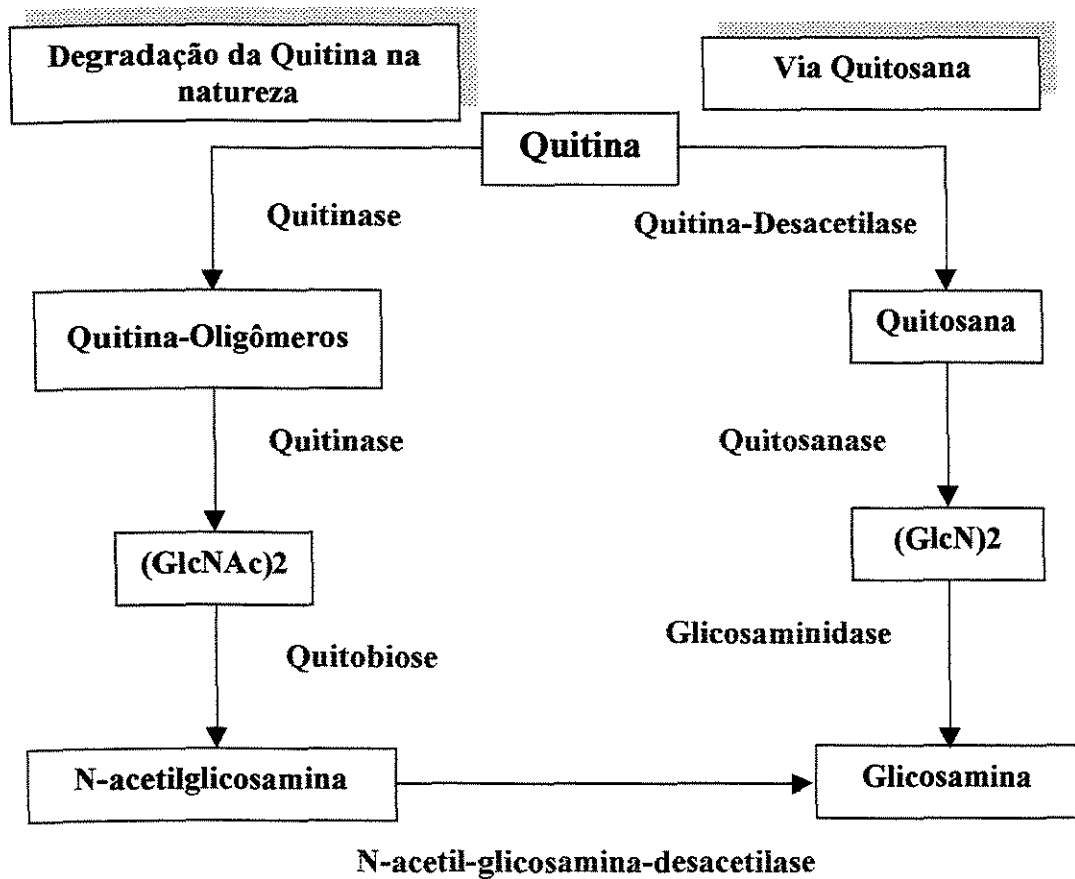


Figura 2 - Rotas para a degradação da quitina na natureza (SIERFERT *et al.*, 2000).

## 2.2 - AS QUITINASES E SEU PAPEL NA BIOTECNOLOGIA

Por definição, as quitinases são enzimas que rompem a ligação entre C<sub>1</sub> e C<sub>4</sub> consecutivos de N-acetilglicosaminas da quitina. Endoquitinases, exoquitinases (EC 3.2.1.14), β-N-acetilglicosaminidases e quitobioses (EC 3.2.1.30) foram caracterizadas. Usualmente as β-N-acetilglicosaminidases são definidas como enzimas que liberam monômeros de N-acetil-glicosamina de quitinas e as exoquitinases como enzimas que liberam quitobiose e endoquitobiose (FLASCH *et al.*, 1992). Diferentes microrganismos produzem uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas as quais exigem diferentes

substratos específicos. As quitinases estão envolvidas principalmente no mecanismo de defesa de plantas e vertebrados. Baculovírus, usados para controle biológico de insetos, também produzem quitinases para estes patogênicos (GOODAY *et al.*, 1995).

### 2.2.1 - QUITINASES VEGETAIS

As quitinases vegetais são as enzimas mais estudadas da família quitinolítica. Infecções por patogênicos, extratos fúngicos e bactericidas, stress físico ou químico e ferimentos, podem influenciar a produção de quitinases vegetais (FLASCH *et al.*, 1992). SCHLUMBAUM (1986) testou o efeito da quitinase em fungos não-patogênicos, mostrando que a quitinase pode inibir o crescimento dos fungos “*in vitro*”.

Em muitas espécies de plantas, a invasão local de patogênicos induz a produção de PR-proteínas como quitinases,  $\beta$ -1,3-glicanases, proteinases, proteinase inibitória, etc (KOMBRINK *et al.*, 1995). Como os fungos e insetos patogênicos possuem quitina, a indução de quitinases em plantas é a principal resposta de defesa. Muitas destas quitinases são induzidas em órgãos de plantas vegetativas pela infecção, embora em algumas plantas, também estão presentes nas sementes. A maioria das quitinases preferencialmente quebra substratos acetilados e a atividade hidrolítica diminui com a diminuição no grau de acetilação. Portanto, o aumento do nível de desacetilação na superfície das hifas dos fungos pode ser útil para resistir às quitinases sendo que a presença da atividade da quitina desacetilase durante a formação da estrutura de infecção sustenta esta hipótese (DEISING *et al.*, 1995).

Várias bactérias de solo também produzem enzimas quitinolíticas. ROBERTS e SELITRENNIKOFF (1988) estudaram plantas e quitinases de bactérias para determinar atividade antifúngica e especificidade da enzima. De acordo com eles, quitinases isoladas de grão de trigo, cevada, e milho funcionaram na inibição de hifas dos fungos testados com endoquitinases. Em contraste, as quitinases de *S. marcescens*, *S. griseus* e *Pseudomonas stutzeri* agem com exo-enzimas e não tinham efeito na extensão das hifas dos fungos testados com *T. reesei* e *Phycomyces blackesleeamus*.

Ainda não é claro, na literatura, se somente os oligossacarídeos e derivados de quitina e quitosana agem como antifúngicos ou se as enzimas quitinolíticas e quitosanolíticas também possuem esta propriedade. O antagonismo de agentes potencialmente úteis em controle biológico de doenças vegetais é pouco compreendido ainda. O antagonismo pode se dar devido a competição, parasitismo ou pela combinação destes dois fatores (LIMA *et al.*, 1996).

### 2.2.2 - QUITINASES BACTERIANAS

As bactérias representam um papel na mineralização da quitina, por exemplo, em algas marinhas e sedimentos, mas nem todas as espécies são capazes de hidrolisar a quitina. CODY (1989) estudou a distribuição da quitinase e quitobiase em linhagens de *Bacillus*. Atividades quitinolíticas foram encontradas em 10 de 29 espécies testadas e atividades quitobiásicas em 15 espécies. Quitinases termoestáveis são produzidas por *Bacillus licheniformis*.

Em bactérias, quitinases são encontradas na forma extracelular. Em *Serratia marcescens* (KOLE *et al.*, 1985-a) cultivada em meio líquido com quitina como fonte de carbono, secretou quitinase no meio.

### 2.2.3 - QUITINASES DE INVERTEBRADOS MARINHOS

Quitinases foram caracterizadas em invertebrados, moluscos e crustáceos, como ostras, camarões, lagostas e krills. Em *Euphasia surperba* e *Meganyctiphanes norvegica* (SPINDLER *et al.*, 1988), as enzimas, quitinase e  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase, foram detectadas. Ambas enzimas tem pH ótimo em torno de 5,0 e temperatura ótima entre 40°C e 50°C. Quanto menores são as temperaturas do meio, maiores são as atividades enzimáticas, mostrando uma adaptação funcional para temperaturas baixas nas águas marinhas.

#### 2.2.4 - QUITINASES DE PEIXES

Muitas quitinases de peixes são observadas no trato digestivo daqueles que se alimentam de invertebrados, como os peixes da Antártica que se alimentam de krill.

Foi purificada a quitinase do estômago de um peixe do Mar Vermelho (KONO *et al.*, 1987) onde sua massa molar foi de aproximadamente 46.000, pI 8,3, e seus pontos ótimos de temperatura e pH foram 50°C e 5,5, respectivamente. A atividade foi bastante inibida por  $Hg^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$  e  $Sn^{+2}$ . Os produtos da hidrólise final da quitina foram N-acetilglicosamina e quitobiose. A quitinase foi sintetizada (KONO *et al.*, 1987 - b) durante o período de larva. Em enguias (KONO *et al.*, 1987 - c), a quitinase foi encontrada no estômago. No entanto, o trato digestivo das enguias continha também bactérias degradadoras de quitina.

#### 2.2.4 - PRODUÇÃO DE QUITOOLIGOSSACARÍDEOS

Devido ao potencial biológico dos quitooligossacarídeos, sua produção tem sido investigada. Eles agem na defesa das plantas, envolvendo a formação do nódulo da raiz sendo potencialmente útil também à medicina humana. A quitinase de *Vibrio alginolyticus* foi usado para preparar quitopentose e quitotriose de quitina coloidal (MURAO *et al.*, 1992). KOBAYASHI (1997), entretanto, relatou o uso da quitinase de *Bacillus* para a síntese da quitobiose associando GlcNAc e um derivado de açúcar oxazolina. Este GlcNAc produzido é também uma droga anti-inflamatória.

Pesquisas na preparação de oligômeros de quitina e quitosana bem como em suas propriedades fisiológicas tem sido realizadas devido a versatilidade das aplicações dos mesmos na indústria alimentícia e farmacêutica.

Existem dois métodos hidrolíticos para preparar oligômeros de quitina e da quitosana: hidrólise ácida e enzimática. A hidrólise com ácidos inorgânicos conduz a formação de oligômeros com baixo grau de polimerização (G.P), variando de monômero a trimêro em rendimento quantitativo. O rendimento de oligômeros ativos com G.P relativamente alto, como tetrâmero à heptâmero, é o mais desejável, mas é em geral baixo.

Em contraste com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática da quitina e quitosana por quitinase e por quitosanase permite prontamente a produção de diferentes produtos. Uma descrição detalhada dos métodos de preparação de oligômeros está disponível na literatura já existente (JEON *et al.*, 1998).

Estudos nas propriedades funcionais dos oligômeros de quitina e de quitosana tem revelado sua alta dependência do grau de polimerização. Os oligomêros com maior G.P, de pentâmero para heptâmero tem uma melhor funcionabilidade característica comparando com os oligômeros de baixo grau de G.P (KENDRA *et al.*, 1984; HIRANO *et al.*, 1989).

Conversão de resíduos de processos em produtos e materiais não convencionais foi identificado como um oportuno desafio no desenvolvimento de inúmeras aplicações dos polímeros de quitina. Neste sentido, esses biopolímeros oferecem uma larga faixa de aplicações, como descrito na Tabela 1.

### 2.2.5 –QUITINA DESACETILADA: QUITOSANA

Quitosana e seus derivados tem mostrado efeito inibitório no mecanismo de crescimento de alguns fungos e bactérias, especialmente patogênicas. HIRANO & NAGAO *et al.* (1989) estudaram a relação entre o grau de despolimerização da quitosana e seu efeito inibitório. Eles mostraram que os oligômeros de quitosana e as quitosanas de baixa massa molar são inibidores mais fortes de crescimento de fungos do que as quitosanas com maiores massas molares, agindo como antagonistas de vários fitopatógenos incluindo *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis fukushi*, *Alternaria alternata*, entre outros. KENDRA *et al.* (1989) demonstraram que alguns oligomêros de quitosana com atividade biológica, presentes na interface de ervilha/*Fusarium* aparecem para inibir o crescimento fúngico. UCHIDA *et al.* (1988) encontraram oligômeros com massas molares maiores, os quais foram ligeiramente hidrolisados pela quitosanase, que eram mais ativos em ambas atividades: antifúngicas e antibacterianas, do que a quitosana e os oligômeros com menores massas molares. JEON & KIM *et al.* (1998) relataram que entre as três frações de oligômeros produzidos e separados usando um sistema de reator enzimático de ultrafiltração de membrana, os oligômeros de massas molares entre 5.000-10.000 Da tiveram a maior atividade antagonista à maioria dos patógenos testados.

ROLLER *et al.* (1999) verificaram a propriedade antimicrobiana do glucamato de quitosana (um derivado da quitina) sobre setes linhagens de fungos filamentosos. A quitosana (1 g/l) reduziu a taxa de crescimento do *Mucor racemosus*, entretanto foram requeridas concentrações de 5 g/L para prevenir completamente o crescimento de três linhagens de *Byssochlamys* sp. em placas de ágar incubadas em 25°C por 3 semanas. Foi concluído que maiores estudos deveriam ser realizados para verificar as propriedades conservantes potencialmente úteis em alimentos por ser a quitosana antagonista de fungos esporulados. As propriedades antimicrobianas dos derivados de quitosana foram descritas contra *Staphylococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *Streptococcus* sp, *Klebsiella* sp, *Proteus* sp e *Candida* sp (OLSEN *et al.*, 1988) entre outros.

**Tabela 1** - Aplicações da quitina, quitosana e seus derivados.

ÁREA DE APLICAÇÃO	EXEMPLOS
<b>Agentes Antimicrobianos</b>	1. Bactericida 2. Fungicida
<b>Indústrias de películas</b>	1. Controle de liberação de substâncias antimicrobianas 2. Controle de liberação de antioxidantes 3. Controle de liberação de nutrientes, condimentos e drogas. 4. Controle de taxa de respiração 5. Controle de temperatura
<b>Nutricional</b>	1. Fibra dietética 2. Efeito hipocolesterolêmico 3. Aditivos em alimentos para peixes e animais domésticos 4. Redução de absorção de lipídios 5. Agente antigástrico 6. Ingredientes de alimentos infantis
<b>Purificação da água</b>	1. Remoção de íons metálicos, pesticidas, fenois e PCB's 2. Remoção de corantes
<b>Outras aplicações</b>	1. Imobilização de enzimas 2. Cromatografia 3. Reagentes analíticos

Fonte: SHAHIDI *et al.* (1999)

### 2.3 - CONCEITOS BÁSICOS DA FERMENTAÇÃO

Os bioprocessos tiveram origem no uso de microrganismos para a produção de alimentos como queijos, iogurtes, lingüiças e conservas fermentadas, molho de soja e

outros produtos orientais, cervejas e vinhos. Embora a tradicional forma de bioprocessamento no preparo de alimentos e bebidas ainda represente a maior aplicação comercial, outros bioprodutos derivados de fermentações microbianas são produzidos, dentre eles:

- **Metabólitos Primários:** etanol, ácido acético, ácido láctico, glicerol, butanol, ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e polissacarídeos.

- **Metabólitos Secundários:** penicilina, estreptomicina, cefalosporina, etc.

- **Enzimas:** as extracelulares amilase, pectinase e protease e as intracelulares invertase e asparaginase, etc. (já utilizadas industrialmente).

Os processos fermentativos geralmente são desenvolvidos em três etapas. O primeiro estágio envolve a seleção do microrganismo que é conduzida por procedimentos microbiológicos relativamente simples, usando placas de Petri, erlenmeyers, etc. Esta etapa é seguida por uma investigação em planta piloto para determinar as condições ótimas de operação em um biorreator com volume de 2 a 200 litros. O estágio final é a transferência do estudo para a planta ou produção em escala industrial (STANBURY & WHITAKER, 1984).

Em processos fermentativos, o crescimento do microrganismo no biorreator pode ocorrer de três maneiras, em batelada, batelada alimentada ou em processo contínuo. As reações no biorreator podem ser na presença ou ausência de oxigênio, em culturas estáticas ou agitadas e em meio líquido ou sólido. O microrganismo pode estar livre ou fixo por imobilização ou por aderência natural. A Tabela 2 apresenta uma comparação entre a Fermentação no Estado Sólido e a Fermentação Submersa (ou líquida).

A otimização de uma fermentação envolve um grande número de fatores e o produto formado depende do material onde o microrganismo foi selecionado, do meio de cultivo utilizado e das condições de crescimento. Os microrganismos devem ser cultivados e induzidos a formar o produto desejado em um biorreator contendo a composição do meio de cultivo ótimo para o microrganismo e os parâmetros de crescimento como temperatura e aeração devem ser controlados.

**Tabela 2** - Comparação entre a fermentação no estado sólido e a submersa.

FATOR	FERMENTAÇÃO SUBMERSA	FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO
Substrato	Solúvel (açúcares)	Polímero insolúvel (amido, celulose, pectinas e lignina)
Condições Assépticas	Esterilização com calor e controle asséptico	Tratamento com vapor, condições não estéreis
Água	Elevado volume de água consumido	Consumo de água limitado
Aquecimento Metabólico	Fácil controle de Temperatura	Baixa capacidade de transferência de calor
Aeração (oxigênio)	Limitação de oxigênio solúvel e requerimento de elevadas quantidades de ar	Aeração fácil e grande superfície de contato ar/substrato
Controle do pH	Fácil	Dificultado
Agitação Mecânica	Boa homogeneização	Preferencialmente em condições estáticas
Escalonamento	Equipamentos industriais disponíveis	Necessidade de projetos
Inoculação	Fácil, processo contínuo ou batelada	Inoculação de esporos, batelada
Contaminação	Riscos de contaminação por bactérias	Risco de contaminação pela baixa taxa de cresc. fúngico
Energia	Elevado consumo de energia	Baixo consumo de energia
Volume do Equipamento	Elevado	Pequeno
Efluentes	Grande volume de efluentes	Sem efluentes
Concentração Substrato/Produto	30-80 g/L	100-300 g/L

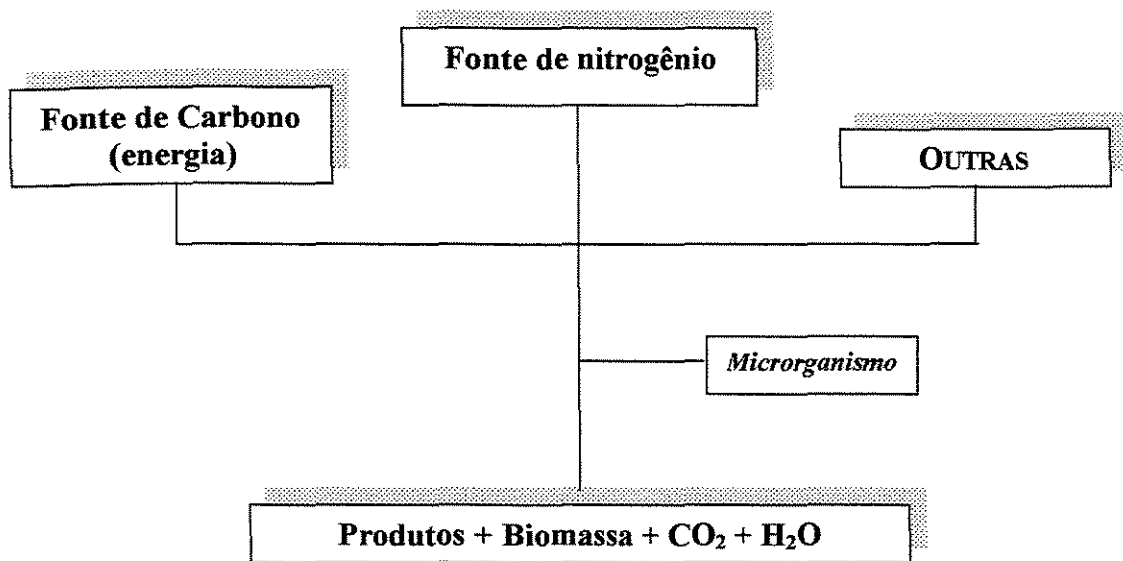
Fonte: RAIMBAULT e SOCCOL (1998) (In: TAGLIARI, 1999).

### 2. 2. 2 – COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO

Uma investigação detalhada é necessária para estabelecer qual a melhor composição do meio de cultivo para um processo de fermentação específico, mas certamente as exigências básicas devem ser encontradas em qualquer meio. Todos os microrganismos requerem água, fontes de energia, carbono e nitrogênio, elementos minerais e possivelmente vitaminas além de oxigênio, se forem aeróbios. Em menor escala é relativamente simples dispor de um meio contendo compostos puros, mas o meio resultante, embora alcançando crescimento satisfatório, pode ser inviável para o uso em processo de escala industrial. Além do meio de cultivo, o crescimento de microrganismos e a formação de produtos podem ser influenciados pela variação de pH, formação de espuma, potencial de oxi-redução e pela morfologia do microrganismo (STANBURY & WHITAKER, 1984).



A formulação de um meio deve satisfazer as necessidades elementares para a produção de biomassa celular e metabólicos e também deve conter suprimento adequado de energia para a biossíntese e manutenção da célula. Através do balanço estequiométrico é possível calcular a quantidade mínima de nutrientes necessária para produzir uma determinada quantidade de biomassa ou produto. Para elaborar a composição do meio de cultivo a Figura 3 representa como a estequiometria de crescimento e formação de produto deve ser considerada :



**Figura 3** - Estequiometria de crescimento, segundo STANBURY & WHITAKER *et al.* (1984).

A água é o fator determinante em todos os processos biotecnológicos e na maioria dos casos é o maior componente dos meios de crescimento e cultivo de microrganismos, portanto, a qualidade da água é altamente relevante.

A energia para o crescimento dos microrganismos vem da oxidação dos componentes do meio ou da luz. É muito comum que os microrganismos utilizem a fonte de carbono (carboidratos, lipídeos e proteínas) como fonte de energia. O principal produto

de um processo fermentativo freqüentemente determinará a escolha da fonte de carbono, particularmente se o produto resulta da transformação da mesma.

A maioria dos microrganismos pode utilizar a fonte de nitrogênio orgânica ou inorgânica. O nitrogênio inorgânico pode ser suprido como gás amônia, nitratos ou sais de amônio, e o nitrogênio orgânico pode ser suprido como aminoácidos, proteínas, uréia ou resíduos da agroindústria. Na maioria dos casos o crescimento será mais rápido com o suprimento de nitrogênio orgânico.

Além do carbono e do nitrogênio, os microrganismos exigem macronutrientes para o seu metabolismo, como fósforo, cálcio, magnésio, potássio e enxofre; além dos microelementos como manganês, zinco, ferro, cobre e cobalto.

As condições em que se processam as fermentações também devem ser monitoradas e controladas. Os fatores mais importantes são a temperatura, o pH, a aeração e a agitação contínua do meio de cultivo (STANBURY & WHITAKER, 1984).

## 2.4 - FUNGOS: CARACTERÍSTICAS E ALGUMAS FUNÇÕES

Os fungos possuem paredes celulares rígidas, sendo a quitina um dos componentes mais comuns nas paredes de certos fungos. Essas paredes são compostas geralmente por 18-90% de polissacarídeos, além de proteínas, lipídios, polifosfatos, e íons orgânicos fortificando a matriz celular. O conhecimento da química da parede celular dos fungos é importante por causa do uso abrangente dos fungos na biotecnologia, pesquisa e indústria (MADIGAN *et al.*, 1996).

*Trichoderma* é um grupo complexo de fungos com importantes aplicações na agricultura e medicina. Esta espécie é caracterizada pelo rápido crescimento de colônias, chegando ao diâmetro entre 2 à 9 cm depois de 4 dias de crescimento à 20°C.

As espécies de *Trichoderma* são distribuídas em 5 seções: *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum*, *Pachybasium* e *Hypocreanum*. Alguns isolados de *Trichoderma* tem um odor aromático peculiar parecendo com côco. Esta seção inclui *T. viride*, *T. koningii*, *T. aureoviride* e *T. atroviride* (EPOSITO *et al.*, 1998).

O gênero *Trichoderma* é amplamente distribuído por todo mundo e ocorre em quase todos os solos e outros habitats naturais, especialmente nos ambientes contendo material orgânico. É também encontrado nas superfícies de raízes de várias plantas, em cascas em decomposição especialmente quando danificada ou contaminada por outros fungos.

Como *Trichoderma* é um fungo cosmopolita, é capaz de crescer em uma faixa ampla de diferentes condições ambientais e substratos. Esta característica confere a este gênero a possibilidade de ser utilizado em muitas situações de interesse biotecnológico (EPOSITO *et al.*, 1998).

Em condições quando o solo permanece seco por longos períodos, as populações de *Trichoderma* diminuem. Algumas linhagens de *T. hamatum* e *T. pseudokoningii* são adaptadas para solos extremamente úmidos e os *T. viride* e *T. polysporum* são restritos para áreas dominantes de temperatura baixa. *T. harzianum* é o mais comum organismo encontrado em regiões de clima temperado, enquanto *T. hamatum* e *T. koningii* são amplamente distribuídos em áreas de condições climáticas diversas.

O ferro que o solo contem pode ser um importante determinante para preferência de local ou distribuição dos *Trichoderma* (PAPARIZAS *et al.*, 1985).

O *Trichoderma* produz grandes quantidades de celulasas e outras enzimas hidrolíticas. *T. reesi* produz múltiplas enzimas celulíticas e enzimas hemicelulíticas, podendo ser aplicado para reciclagem de materiais de resíduos celulíticos e ser úteis também na produção de bioprodutos de interesse comercial.

#### 2.4.1 - CONTROLE BIOLÓGICO

Entre as mais importantes enzimas que o *Trichoderma* produz estão aquelas envolvidas em micoparasitismo, as quais degradam quitina (LORITO *et al.*, 1993). As funções fisiológicas das quitinases dependem do substrato fúngico. Em fungos, as quitinases oferecem um papel fisiológico na divisão celular ou diferenciação, bem como um papel nutricional mencionado para a atividade micoparasita (DE LA CRUZ *et al.*, 1992).

Espécies de *Trichoderma* tem sido usadas em preparações comerciais de produtos para controle biológico de plantas infectadas por fungos reduzindo assim a necessidade de utilização de compostos químicos poluentes. O *Trichoderma harzianum* é o agente ativo no produto comercial de Trichodex, o qual é usado nas raízes da macieira para protegê-la de fungos nocivos, e é combinado com *T. polysporum* no produto Binab-T, qual é usado para controlar rachaduras que causam a decomposição da madeira (RICARD *et al.*, 1981).

O gênero *Trichoderma* apresenta um excelente potencial para aplicação em algumas áreas de interesse ambiental e industrial. Um melhor conhecimento da taxonomia e definição de espécies deve ser importante assim como as características moleculares integradas com informações da morfologia, bioquímica, química, fisiologia e estudos de ciclo de vida.

## 2.5 – PRODUÇÃO DE QUITINASE POR FERMENTAÇÃO

### 2.5.1 – PRODUÇÃO FÚNGICA

Enzimas quitinolíticas produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* K-187 foram estudada por WANG *et al.*, 1997, usando pó de cascas de camarão e caranguejo (PCCC) como fonte de carbono. Observou que o PCCC quimicamente tratado induziu um aumento significativo na produção da enzima, comparado com PCCC sem tratamento. Várias estratégias de processamento foram examinadas e comparadas em termos de produção quitinolíticas. Um aumento de 3,5 vezes na produção da enzima (0,68 U/mL para 2,4 U/mL) foi observado quando utilizado o tratamento com NaOH/HCl em PCCC.

Em um trabalho anterior, WANG *et al.* (1995), identificou que esta mesma linhagem parecia ser uma linhagem produtora de quitinase em grande potencial. Este microrganismo foi identificado como o *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade máxima foi obtida quando a linhagem cresceu aerobicamente em meio contendo 3 % de pó de casca de camarão e lagosta, 0,1 % de CMC (carboxilmetil celulose), 0,1 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 % de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,1 % de  $\text{ZnSO}_4$  (pH 9,0), à 45°C depois de 3 dias. O

pH ótimo e a temperatura da reação da enzima foram 7 e 40°C, respectivamente. A quitinase foi estável a pH de 5 à 10 e foi estável também sob uma temperatura de 60°C.

O estudo da atividade quitinolítica de *S. liquefaciens*, foi realizado para estudar a produção de quitinase e quitobiose. Para isso foi utilizado um mutante Chi<sup>+++</sup> (SJ101) obtido de mutagêneses Tn5 de *S. liquefaciens* e usado para otimizar as condições de fermentação para a produção dessas enzimas (JOSHI *et al.*, 1989). A melhor condição para a produção quitinolítica foi à presença de 1 % de cana tratada e 0,75 % de quitina a pH 7,5 a 30°C. Sob estas condições, 15,1 U/mL de quitinase foram produzidas depois de 45 horas de fermentação.

A produção “in vitro” de quitinases e  $\beta$ -1,3-glicanases por *Starchybotrys elegans*, um micoparasita de *Rhizoctonia solani*, foi examinado sob várias condições de cultivo, com fonte de carbono e nitrogênio, pH e período de incubação. A produção de ambas as enzimas foi influenciada pela fonte de carbono incorporado sob o meio e foi estimulado pela acidez do pH e NaNO<sub>3</sub>. A atividade de ambas as enzimas foram muito menores em culturas de células desenvolvidas em glicose e sacarose comparado com os detectados em quitina (para quitinases) e fragmentos de parede celular (para  $\beta$ -1,3-glicanases) (TWEDDELL *et al.*, 1994).

Quitinase de *S. virificans* é uma enzima induzida e os níveis máximos são atingidos pela adição de 1,5 % de quitina coloidal, à 30°C com uma agitação de 200 rpm depois de 6 dias de incubação. Uma diminuição na produção da enzima foi observada com um aumento da concentração de açúcares redutores na cultura filtrada (GUPTA *et al.*, 1995)

MC CORMACK (1991) trabalhou com uma cepa de *Talaromyces emersonii*, o qual cresceu em meio contendo quitina. O rendimento da atividade das enzimas quitinase, quitobiase foi de 0,45  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$  e 1,4  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectivamente, depois de 2 à 4 dias de crescimento sob condições de pH controlado. A atividade enzimática foi ótima a pH entre 5,0-5,5 à 65°C.

LIMA *et al.* (1996) produziram quitinase por 6 diferentes cepas de *Trichoderma* sp. A produção máxima obtida de quitinase foi de 514 U/mL para um dos isolados, em

meio contendo 0,1% de peptona, 0,1% de uréia e 0,5% de quitina em pH 5,5. A quitina purificada e bruta destruíram a parede celular de *Sclerotium rolfsii*, entretanto somente o caldo bruto de fermentação destruiu as paredes de *Rhizoctonia solani*.

A produção de quitinase por *Serratia marcescens* 990E foi máxima para a concentração de oxigênio em uma faixa de 20 a 50% de saturação. A adição de quitina (6 g/L) no fim da fermentação reativou o crescimento mas não influenciou em mais acumulação de quitinase (KHOURY *et al.*, 1997).

O processo de fermentação da quitinase por *Trichoderma harzianum* utilizando a quitina como fonte de carbono foi estudado em bioreator de tanque agitado. A agitação de 224 rpm foi observada como sendo a melhor tanto para o crescimento celular e produção da quitinase. O rendimento da quitinase diminuiu rapidamente a uma maior agitação, enquanto que o rendimento celular a uma maior agitação foi baixo. Provavelmente, a limitação de transferência de massa foi predominante no processo fermentativo a uma baixa agitação. Altas agitações representam uma redução na produção de quitinase (PANDA *et al.*, 2000).

### 2.5.2 – PRODUÇÃO BACTERIANA

A linhagem bacteriana, designada de WY22, produtora de quitinase extracelular foi isolada do solo enriquecido com meio contendo 1% (m/v) de quitina coloidal úmida como fonte de carbono. O isolado foi identificado como *Bacillus* sp, baseado nas características fisiológicas e morfológicas do microrganismo. As condições ótimas com *Bacillus* sp. WY22, foram examinados em meio de quitina. As concentrações ótimas foram: concentração de quitina coloidal (3,0%); concentração de extrato de levedura (0,5%), pH inicial (7,0); temperatura (30°C) (WOO *et al.*, 1996).

Foi investigado os efeitos de várias fontes de carbono na produção de quitinase por *Bacillus* sp. WY22. Observou-se altos níveis de quitinase produzidos no meio contendo 1% de quitina coloidal, N-glucosamina ou lactose como fonte de carbono. Em meios contendo 1% de glicose-amido, em substituição à quitina coloidal, foi observado que a bactéria produziu entre 68 à 78% de quitinase, comparado com o meio de quitina simples. Baixos níveis de atividade quitinolítica foram detectados em meio contendo outros

carboidratos como frutose, sacarose, ribose e pectina. Frutose e rafinose foram relatados bons indutores na produção de quitinase em *Acinetobacter* sp. (SHIN *et al.*, 1995) enquanto que para *Streptomyces lividans* (ROBBIN *et al.*, 1992) a melhor fonte de carbono foi a lactose.

A adição de 0,5% de extrato de levedura ao meio de cultura contendo quitina duplicou a produção da enzima em relação ao de meio controle (meio de quitina sem 0,5% de extrato de levedura). Algumas fontes de nitrogênio inorgânico como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mostraram ser necessários na produção de quitinase (WOO *et al.*, 1996).

## 2.6 – PRODUÇÃO DE QUITINASE POR FERMENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE ( ESTADO SEMI-SÓLIDO)

Um fungo quitinolítico, *Beauveria bassiana* foi isolado de um sedimento marinho e alguns parâmetros do processo influenciaram a produção de quitinase na fermentação em estado semi-sólido usando farelo de trigo como uma das fontes de carbono. Estes parâmetros foram otimizados por SURESH (1999). O organismo foi fortemente alcalofílico e a máxima produção de quitinase se deu a pH 9,20. O inóculo vegetativo (micelos) se adaptou melhor que o inóculo conidial para a obtenção do rendimento máximo da enzima. A adição de fosfato e de extrato de levedura resultou em um alto rendimento quitinolítico. Depois da otimização, o rendimento máximo foi de  $246,6 \text{ unidades} \cdot (\text{g substrato seco inicial})^{-1} (\text{UgIDS}^{-1})$ .

## 2.7 – PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS QUITINOLÍTICAS

O extrato bruto de enzima de cinco *Actinomyces* selecionados do solo do cerrado apresentou boa atividade endoquitinolítica quando comparado a quitinase comercial (GOMES *et al.*, 2000). Atividades exoquitinolíticas e quitobiose foram detectadas também. Eles foram identificados como *Streptomyces*. O extrato bruto, obtido do crescimento do micelo fúngico mais quitina de três das linhagens, tem mostrado uma notável atividade antagonística ao fungo fitopatogênico. Em testes usando crescimento celular, todas as cinco

linhagens foram ativas. Estes dados sugerem que estas linhagens possuem grande potencial para aplicação no biocontrole de insetos.

As propriedades quitinolíticas do *Bacillus pabuli* K1 isolado de um grão mofado foram estudados por FRÄNDBERG (1994). Atividades quitinolíticas foram medidas como a liberação de p-nitrofenol de p-nitrofenoil-N-N'-diacetilquitobiose. Influência da concentração de substratos e de diferentes variáveis ambientais no crescimento e atividade quitinolíticas foram determinadas. As ótimas condições de cultivo para a produção de quitinase foram: 30°C, pH inicial de 8,0, oxigênio inicial 10% e  $a_a > 0,99$ . A produção de quitinase foi induzida quando *B. pabuli* K1 cresceu em quitina coloidal. Os menores quitooligossacarídeos capazes de induzir a produção quitinolítica foram N-N'-diacetilquitobiose, (GlcNAc)<sub>2</sub>. A produção também foi induzida por (GlcNAc)<sub>3</sub> e (GlcNAc)<sub>4</sub>. Quando a bactéria cresceu em glicose ou N-acetilglicosamina, não houve formação de quitinases. As maiores produções quitinolíticas foram observadas com quitina coloidal como substrato. A produção de quitinases por *B. pabuli* K1 crescendo em quitina foi reprimida por níveis maiores (0,6 %) de glicose bem como por 0,6 % de amido, por laminarina e por  $\beta$ -glucano de cevada e por glicerol. A adição de pectina e carboximetil celulose aumentou a produção de quitinase (FRÄNDBERG et al., 1994).

Quitinase (EC 3.2.1.14) da cultura de *Trichoderma harzianum* foi purificada por precipitação com sulfato de amônio seguido por cromatografia de troca iônica em Q-sepharose, filtração em gel em sephadex G-100 e interação hidrofóbica em Fenil-sepharose CL-4B. Este procedimento típico promoveu purificação de 76 vezes e 10 % de rendimento. O massa molar da quitinase purificada foi de 40.000 Da para o SDS-PAGE e 36.000 Da para filtração em gel, o pH ótimo de 4,0-4,5 e a atividade máxima obtida foi conseguida à 40°C (ULHOA et al., 1992).

MATHIAVANAM (1998) isolou uma quitinase de *Fusarium chlamydosporum* e a purificou por cromatografia de troca iônica e filtração em gel. A massa molar da quitinase pura foi 40 kDa como foi estimada pela eletroforese em gel. A quitinase foi otimamente ativa a pH 5,0 e estável na faixa de 4,0-6,0 e a temperaturas superiores a 40°C. Entre os metais e inibidores testados, o cloreto de mercúrio inibiu completamente a atividade enzimática. A atividade da quitinase foi alta em quitina coloidal e pura.



LIMA *et al.* (1997) estudaram a capacidade de seis isolados de *Trichoderma* sp., não identificados para produzir enzimas quitinolíticas e  $\beta$ -glicanases em comparação ao *T. harzianum* 39,1. Todos os isolados demonstraram atividade enzimática. Entretanto, enquanto os isolados aqui chamados T2, T3, T5 e T7 produziram menores quantidades de enzima, a atividade dos isolados T4 e T6 foram 2-3 vezes maiores do que a produzida por *T. harzianum* 39,1. A quitinase produzida pelo isolado T6 foi purificada por uma etapa de cromatografia de troca iônica e tem um a massa molar de 46 kDa.

Um alcalofílico, *Bacillus* sp. BG11 produtor de quitinase foi isolado e uma quitinase extracelular foi purificada 16,5 vezes usando processos convencionais de purificação. A quitinase foi estável entre pH 6,0-9,0 e temperatura de 50°C por 2 horas. A meia vida da enzima à 60°C, 70°C e 80°C foi de 90 min., 30 min. e 20 min. respectivamente (BHUSHAN *et al.*, 1998).

Uma enzima quitinolítica foi purificada da cultura *T. harzianum* (T198) pela precipitação com sulfato de amônio seguido pela ligação de afinidade da quitina e eluição com 10% (v/v) de ácido acético. A massa molar da enzima foi determinada por cromatografia de filtração em gel e SDS-PAGE, respectivamente. O ponto isoelétrico da enzima foi de 7,4, o pH ótimo para atividade foi de 3,5 com atividade máxima à 50°C. Análises de CLAE dos produtos da hidrólise demonstraram que a enzima era uma exoquitinase liberando somente N-acetilglicosamina.

## 2.7 - OTIMIZAÇÃO POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os planejamentos experimentais foram iniciados por G.E.P.BOX (1978) na década de 1950. Sua aplicação vem crescendo exponencialmente com os avanços da informática e a facilidade do uso de softwares para análises estatísticas (BARROS *et al.*, 1995)

Atualmente, a necessidade de minimizar custos vem incentivando engenheiros de processos a analisar previamente as implantações de sistemas, como objetivo de determinar faixas de operação que continuem garantindo um bom rendimento sem prejuízos na produtividade, situação esta imprescindível para a viabilidade de um processo. Em processos biotecnológicos geralmente é observada a influência de muitas variáveis, onde a

importância de cada uma deve ser determinada. Portanto, a otimização baseada no planejamento experimental é ferramenta de trabalho útil para melhor compreensão do sistema.

Este método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada, executando-se experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa é usual um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para  $n$  variáveis envolvidas no estudo o número de experimentos que devem se realizados para investigar todas as possíveis combinações é igual a  $2^n$  (BOX et al., 1978).

Esta metodologia é útil para uma redução no número de experimentos práticos a serem realizados, minimizando tempo e custos operacionais, além de se obter uma análise mais racional dos resultados baseados nas probabilidades estatísticas.

Outros métodos de planejamento experimental como o de “self-directing optimization” ou “rotating simplex” de otimização foi empregado por PANDA *et al.* (1999) para determinar a melhor combinação de certos parâmetros como, controle de pH, taxa de aeração e taxa de agitação para a máxima produção de quitinase por *Trichoderma harzianum* em batelada. Atividade extracelular enzimática aumentou de um valor inicial de 0,109 U sob condições não otimizadas para um valor final de 0,384 U depois da otimização. Um pH de 4,9 (controlado), uma vazão de ar de 1,5 L por minuto e uma velocidade de agitação de 224 rpm foram encontrados serem a melhor combinação.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão discutidos os procedimentos experimentais utilizados para o estudo da otimização do meio de cultura para produção de quitinase por *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub>.

#### 3.1- MICRORGANISMO

Utilizou-se uma linhagem de fungo filamentosso *Trichoderma* sp. (T<sub>6</sub>) cedida pelo Prof. Dr. Carlos R. Felix do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB). Esta linhagem foi escolhida por ter sido considerada a melhor produtora de quitinase, entre as setes espécies estudadas por LIMA *et al.* (1997).

A linhagem da cultura foi mantida em tubos de ensaio inclinados contendo a composição descrita na Tabela 3 e estocada em geladeira à 4°C, sendo feita uma nova repicagem mensalmente.

#### INÓCULO

O preparo do inóculo foi padronizado através da transferência asséptica da cultura em meio, descrito na Tabela 3, para 10 mL de água destilada para contagem de esporos em Câmara de Neubauer.

Os esporos foram padronizados em  $3 \cdot 10^6$  esporos por mL (concentração total final) de água destilada e estéril para os diferentes meios.

**Tabela 3** - Composição do meio para manutenção do microrganismo.

Componentes	g.L <sup>-1</sup>
Extrato de malte	5
Extrato de levedura	2,5
Glicose	20
Agar	15

### 3.1.1- FERMENTAÇÃO

Foram utilizados a glicose e lactose e a quitina como fontes de carbono, os dois primeiros como fonte livre de açúcar e o terceiro, como fonte polimérica. A uréia foi usada como fonte de nitrogênio orgânico e o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio inorgânico.

As composições dos meios de cultura (Tabelas 4 e 5) para a produção de quitinase foram estabelecidas através de planejamento experimental descrito (itens 4.1 e 4.2). Todos os meios de cultura foram previamente esterilizados à  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

Aos meios de cultura foi adicionada a suspensão de esporos para atingir concentração total final no meio de cultivo de  $3 \cdot 10^6$  esporos. $\text{mL}^{-1}$  e as fermentações foram acompanhadas durante 72 horas à  $28^\circ\text{C}$ . Os ensaios foram conduzidos em frascos agitados de 250 mL com um volume de trabalho de 25 mL.

As amostras foram coletadas a cada 12 horas para acompanhamento do pH, a determinação da atividade quitinolítica e proteolítica, a determinação de açúcares redutores inicial (ARi) e determinação de quitoologossacarídeos por CLAE.

**Tabela 4** - Composição básica para estudo do meio de cultivo utilizando glicose.

Componentes	$\text{g.L}^{-1}$
Glicose	3
Bactopeptona	10
Úréia	3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	14
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3
Quitina (Sigma)	5
Traço de elementos ( $\text{Fe}^{+2}$ , $\text{Mn}^{+2}$ , $\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Co}^{+2}$ )	0,1

Fonte : ULHOA et al., 1997.

**Tabela 5** - Composição básica para estudo do meio de cultivo utilizando lactose.

Componentes	g.L <sup>-1</sup>
Lactose	3
Bactopeptona	10
Úreia	3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3
Quitina (Sigma)	5
Traço de elementos (Fe <sup>+2</sup> , Mn <sup>+2</sup> , Zn <sup>+2</sup> , Co <sup>+2</sup> )	0,1

### 3.2 - MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.2.1 - DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES INICIAIS (ARI) - MÉTODO SOMOGY & NELSON

Na determinação de açúcares redutores iniciais foi adotado o método Somogyi & Nelson (NELSON *et al.*, 1945). O método se fundamenta na reação de oxi-redução em que os íons cúpricos (Cu<sup>+2</sup>) reagem com açúcares redutores em meio alcalino e resultam em íons cuprosos (Cu<sup>+1</sup>), que em meio alcalino reagem com arsenomolibdato formando um complexo azul, cuja intensidade é proporcional do Cu<sub>2</sub>O formado, que por sua vez é diretamente proporcional à quantidade de açúcares redutores presentes. As amostras, coletadas a cada 12 horas durante o período de fermentação, foram filtradas em papel de filtro (Whatman n°1). Em tubos Ependorffs de 2 mL foram adicionados 0,8 mL de tampão acetato 50 mM com pH 5,2, 0,2 mL do caldo bruto de fermentação e 1 mL de quitina coloidal 0,5% (suspensa em tampão acetato pH 5,2). O preparo da quitina coloidal é descrito no item 3.2.1.1. Todas as análises foram feitas com repetição de cada cinco vezes para ponto. Então o sistema foi centrifugado (JOAN MR 1812) à 6.000 g (10.000 rpm) por 10 minutos. Retirou-se 1 mL do sistema centrifugado para análises dos açúcares redutores solúveis. E então adicionada 1 mL de reativo Somogyi e colocado em aquecimento à 100°C

por 10 minutos. Após resfriamento em banho de gelo (reação colorimétrica interrompida) 1 mL de reativo Nelson foi adicionado. Após agitação, foi lida a absorbância à 540 nm em espectrofotômetro (GBC. UV/VIS 911A). Uma unidade de ARi é definida como a quantidade de açúcar redutor liberado no meio líquido em 1µmol de N-acetilglicosamina por mL, nas condições descritas. O cálculo do ARi foi feito utilizando uma curva padrão descrita no item 3.2.1.2.

### **3.2.1.1- Preparo da Quitina Coloidal**

A quitina (Sigma), previamente passada (2 g) por uma peneira de abertura  $d=0,35$  mm, foi pesada e progressivamente adicionada de 50 mL de ácido clorídrico (grau analítico) concentrado com agitação à 4°C por 1 hora. Após este período, a mistura resultante foi aquecida à 37°C até que o sistema se tornou mais escuro e pouco viscoso, e filtrada em lã de vidro. O material filtrado foi diluído em água destilada gelada suficiente para a concentração final de 1 M. A quitina foi coletada por decantação e centrifugação à 6000 g por 10 minutos e lavada com tampão acetato de sódio até que o pH final alcançasse 5,2.

A suspensão resultante foi estocada a 4°C e a concentração de quitina foi determinada gravimetricamente de acordo com CHEN (1994).

### **3.2.1.2 – Preparo da Curva Padrão de N-acetilglicosamina**

Para determinação da curva padrão de N-acetilglicosamina foram utilizados volumes de amostras contendo concentrações de 10 à 100 µg de N-acetilglicosamina (Sigma). Este volume foi completado até 1 mL com solução tampão acetato 50 mM pH 5,2; 1mL do reativo de Somogyi foi adicionado e aquecido à 100°C por 10 minutos. A reação foi interrompida com banho de gelo e em seguida adicionada 1 mL do reativo de Nelson. A mistura foi homogeneizada e sua absorbância lida à 540 nm.

Para cada lote de reativos preparado foi construído uma curva padrão. Todas as curvas padrões apresentaram um coeficiente de correlação maior que 0,992.

### **3.2.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA – AÇÚCARES REDUTORES ENZIMÁTICOS (ARe)**

Na determinação da atividade quitinolítica foi adotado o mesmo método utilizado no item 3.2.1 com acréscimo de algumas etapas. Após a retirada das amostras e preparo dos sistemas (Ependorffs), estes foram incubados por 12 horas à 37°C com agitação recíproca. Após este tempo de incubação para a ativação enzimática da quitinase, seguiu o mesmo procedimento descrito no item 3.2.1.

#### **3.2.2.1 – Cálculo para Obtenção do Valor da Atividade Quitinolítica**

O cálculo da atividade quitinolítica foi feito pela diferença entre os valores da determinação dos açúcares redutores inicial (ARi) e os açúcares redutores enzimáticos (ARe). Esta diferença foi dividida pelo tempo de incubação de 12 horas.

Uma unidade de quitinase equivale à  $1\mu\text{mol de N-acetilglicosamina.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , nas condições do ensaio.

### **3.2.3 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA**

A quantificação da presença de proteases nas amostras de caldo de fermentação de *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> foi realizada segundo a metodologia modificada de PONEZI (1997) e de SARATH *et al.* (1996).

#### **3.2.3.1 - Preparo do substrato**

Os substratos foram preparados, pesando-se 1 g de caseína láctea (Merse) e acrescentando-se 50 mL de água destilada e 2,5 mL de NaOH 1 M para solubilização da caseína. O pH ficou em torno de 12. Adicionou-se fosfato de sódio monobásico 1M até que a solução chegasse ao pH desejado (em torno de 6, 7, 8 e 9). Completou-se o volume para 100 mL com tampão tris-fosfato 0,3 M com o mesmo valor do pH final desejado e água

numa proporção tal que a solução final tivesse molaridade 0,1625 M. Para os demais ensaios foram utilizados um dos dois tipos de substratos abaixo.

### **I - Preparação do substrato para atividade proteolítica a pH acima de 6**

O substrato foi preparado pesando-se 1 g de caseína láctea e acrescentando-se 25 mL NaOH 0,1 M. Essa solução foi agitada até a caseína ser solubilizada. Adicionou-se então a forma ácida do tampão ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M) até atingir o pH desejado. Completou-se o volume para 100 mL com tampão NaOH/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M de mesmo valor de pH da solução obtida anteriormente.

### **II - Preparação de substrato para atividade proteolítica a pH abaixo de 6**

O substrato de hemoglobina foi preparado dissolvendo-a, com suave agitação em uma solução de 32 g de uréia em 32 mL de água destilada. Após incubar esta solução a 37°C por 1 hora, adicionou-se 20 mL de tampão citrato-fosfato 0,25 M e diminuiu-se o pH para o valor desejado através da adição de HCl 1 M. Finalmente, o volume foi completado para 100 mL com água destilada

#### **3.2.3.2 - Ensaio para determinação da atividade proteolítica**

Equilibrou-se primeiramente todas as soluções a 25°C. Para começar o ensaio, 1 mL de substrato foi colocado em um tubo de ensaio contendo o caldo bruto de *Trichoderma* sp.T<sub>6</sub>. Agitou-se essa solução suavemente para prevenir espuma. A mistura foi incubada na temperatura desejada (28°C para caldo de fermentação de *Trichoderma* sp.T<sub>6</sub>) durante 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 15% para os ensaios. O branco do ensaio foi preparado combinando o ácido tricloroacético com a solução a ser testada e então adicionado o substrato. Todos os ensaios ficaram em repouso por 30 minutos e foram filtrados em papel Whatman n°3. O filtrado foi lido com relação ao branco em cubeta de quartzo com caminho óptico de 4 mm a 280 nm, diluindo-se os



filtrados (inclusive o branco) quando necessário. A maior absorvância do filtrado em relação ao branco é devido à presença de aminoácidos naquela solução. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para causar um aumento de 0,1 unidade na absorvância a 280 nm sob as condições do ensaio.

### **3.2.4 – DETERMINAÇÃO QUITOOLIGOSSACARÍDEOS POR CROMATOGRÁFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

#### **3.2.4.1 – Equipamento**

**Cromatógrafo** da Waters composto por duas bombas série 515, um injetor automático modelo 717 acoplados a dois detectores, um de RI (Waters<sup>TM</sup> 410) e outro de UV(Waters<sup>TM</sup> 486). O equipamento estava acoplado a um micro Pentium 166 MHz com software Millenium.

**Coluna:**  $\mu$ Bondapak-NH<sub>2</sub> de sílica com grupo NH<sub>2</sub> acoplado e respectiva pré-coluna em temperatura ambiente (25°C).

**Fase móvel:** solução de acetonitrila e água (70:30, v/v e 50:50, v/v) a um fluxo gradiente de 0,8 ml/min.

**Detector:** UV à 210 nm

#### **3.2.4.2 - Método da Cromatografia CLAE**

A quantificação do N-acetilglicosamina, N,N'-diacetilquitobiose e N,N',N''-triacetilquitobiose foi feita pelo método LC de calibração linear com apenas uma quantidade de massa de padrão injetada, porém com aferição da resposta do padrão injetada pelo menos duas vezes. O tipo de resposta utilizado na calibração foi a área sob o pico de cada padrão e a correlação dos picos da amostra aos dos padrões foi efetuada de acordo com o tempo de retenção.

## I - Hidrólise da Quitina

Em um reator de 40 mL encamisado mantido a 37°C, adicionou-se em volume, 1% do caldo bruto da fermentação do *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub>, 50% de quitina coloidal 1% (suspenso em tampão acetato pH 5,2) e 49% de tampão acetato pH 5,2. Depois de homogeneizar, transferiu-se para um reator à banho de 37°C. Deixou-se sob agitação e retirou-se amostras de 5 mL (retirou o tempo zero e depois amostras a cada 30 minutos). As amostras foram congeladas e depois liofilizadas. As amostras desidratadas foram a seguir solubilizadas na solução da fase móvel e filtradas em Millex (0,22 µm) antes de serem injetadas.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 – PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO: ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, AGITAÇÃO E pH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE QUITINASE.

O planejamento experimental foi utilizado com o intuito de verificar as melhores condições para a produção da enzima quitinase. De acordo com ULHOA *et al.* (1992) e LIMA *et al.* (1997), o *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> é capaz de produzir de elevadas concentrações de quitinase em meio contendo: 0,3% glicose, 150 rpm de agitação e pH 5,5. Estes verificaram que as melhores condições para a produção da mesma foram após 72 horas de fermentação e para a produção das enzimas quitobiase e  $\beta$ -1,3-glicanase foram após 60 horas de fermentação.

Como os fungos são organismos altamente aeróbicos e, em geral acidófilos, as variáveis, agitação, pH, bem como a concentração de açúcar livre, foram escolhidas para o acompanhamento cinético de produção da quitinase.

Foram escolhidas a glicose e lactose como fontes livres de açúcar. A glicose foi o componente utilizado por LIMA *et al.* (1997) para estimular o crescimento do *Trichoderma* em uma etapa inicial fermentativa. A lactose foi escolhida para evitar a possível inibição pela glicose, através de produção mais lenta de galactose e glicose (crescimento diáuxico).

Os valores (codificados) utilizados nos ensaios do primeiro planejamento experimental estão apresentados na Tabela 6 com os respectivos níveis codificados, e os resultados obtidos neste planejamento estão apresentado na Tabela 7.

TABELA 6 – Tabela de níveis para as variáveis do primeiro planejamento experimental.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Glicose (%)	0,1	0,3	0,5
Agitação (RPM)	150	200	250
PH	5,5	6,0	6,5

TABELA 7 – Produção de quitinase e acompanhamento do pH para fermentações contendo glicose.

Ensaio	Agitação	pH	Glicose	Ativ.	Ativ.	Ativ.	Ativ.	Ativ.	Ativ.	pH	pH	pH	pH	pH	pH
				(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)						
				12h	24h	36h	48h	60h	72h						
1	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,84	5,51	5,94	6,01	6,15	6,14
2	+	-	-	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	5,83	5,72	5,97	5,89	6,03	6,22
3	-	+	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,44	6,28	6,52	6,51	6,67	6,66
4	+	+	-	0,02	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	6,43	6,42	6,36	6,26	6,23	6,25
5	-	-	+	0,03	1,16	0,00	0,00	0,00	0,00	5,62	5,43	4,74	4,54	4,25	4,56
6	+	-	+	0,00	1,59	0,00	0,00	0,00	0,00	5,86	5,65	4,47	4,03	4,63	4,88
7	-	+	+	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,35	6,00	5,25	5,46	6,01	6,01
8	+	+	+	0,17	1,60	0,06	0,27	0,00	0,00	6,45	6,43	6,42	6,36	6,26	6,26
9	0	0	0	0,33	2,08	0,01	0,00	0,00	0,00	6,00	5,97	5,96	5,96	5,99	5,96
10	0	0	0	0,30	1,53	0,04	0,00	0,00	0,00	6,00	5,98	5,97	5,95	5,96	5,97
11	0	0	0	0,31	2,16	0,03	0,00	0,00	0,00	6,00	5,98	5,97	5,96	5,96	5,98

1. Média dos ensaios do ponto central (9, 10 e 11) = **1,92 U/mL** (24 horas)

2. Desvio Padrão : **0,34 U/mL** (para os ensaios 9, 10 e 11)

#### 4.1.1 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR *Trichoderma* sp. PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2<sup>3</sup>).

##### 1.) CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM GLICOSE 0,1%.

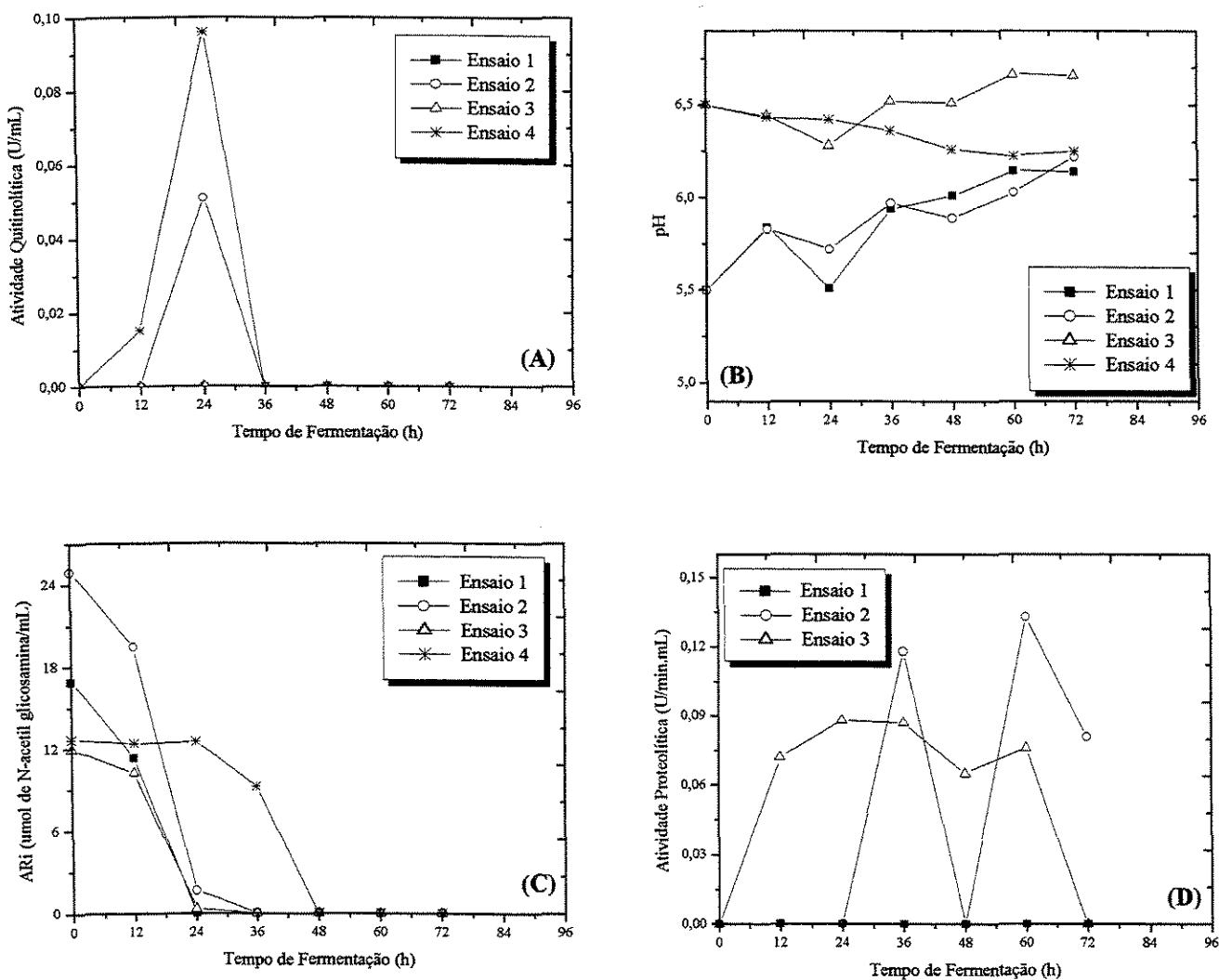
Apesar do *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> produzir três diferentes enzimas relacionadas à transformação da quitina (LIMA *et al.*, 1997) este presente trabalho se concentrou na quitinase, por ser a mais preponderante. As Figuras 4-A a 4-D representam a cinética desta produção por até 72 horas. Foi observado que a máxima produção de quitinase ocorreu em 24 horas de fermentação (Figura 4-A)

Como podemos observar na figura 4-A apenas os ensaios 2 e 4, ambos com máxima agitação de 250 rpm, pH 5,5 e 6,5 respectivamente obtiveram alguma atividade quitinolítica em 24 horas de fermentação (0,05 U/mL e 0,1 U/mL respectivamente). Os ensaios 1 e 3 (Agitação: 150 rpm) não obtiveram nenhuma atividade quitinolítica durante as 72 horas de fermentação.

Os açúcares redutores iniciais livres foram consumidos totalmente durante as 48 horas de fermentação, indicando que havia escassez de energia livre para o ensaio 2 já em 24 horas, e para o ensaio 4 em 48 horas, sugerindo que a relação entre a concentração de 0,1% de glicose no meio de cultura para  $3 \cdot 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> era baixa, insuficiente para crescimento inicial significativo da biomassa. Foi observado que os ensaios 1 e 2 iniciados em pH 5,5 tiveram seu pH aumentado até acima de pH 6,0, em 60 horas de fermentação. O pH para os ensaios 3 e 4, iniciados em 6,5, permaneceu mais estável ao longo da fermentação. Entretanto, foi observado que o ensaio 3, contendo proteases desde as 12 horas de fermentação, aumentou o pH ligeiramente na segunda metade da fermentação (proteólise).

A atividade quitinolítica nula para os ensaios 1 e 3, que possuem em comum uma baixa agitação (150 rpm) indica provavelmente que nestas condições de deficiência de oxigênio, o pH não influenciou a produção de quitinase.

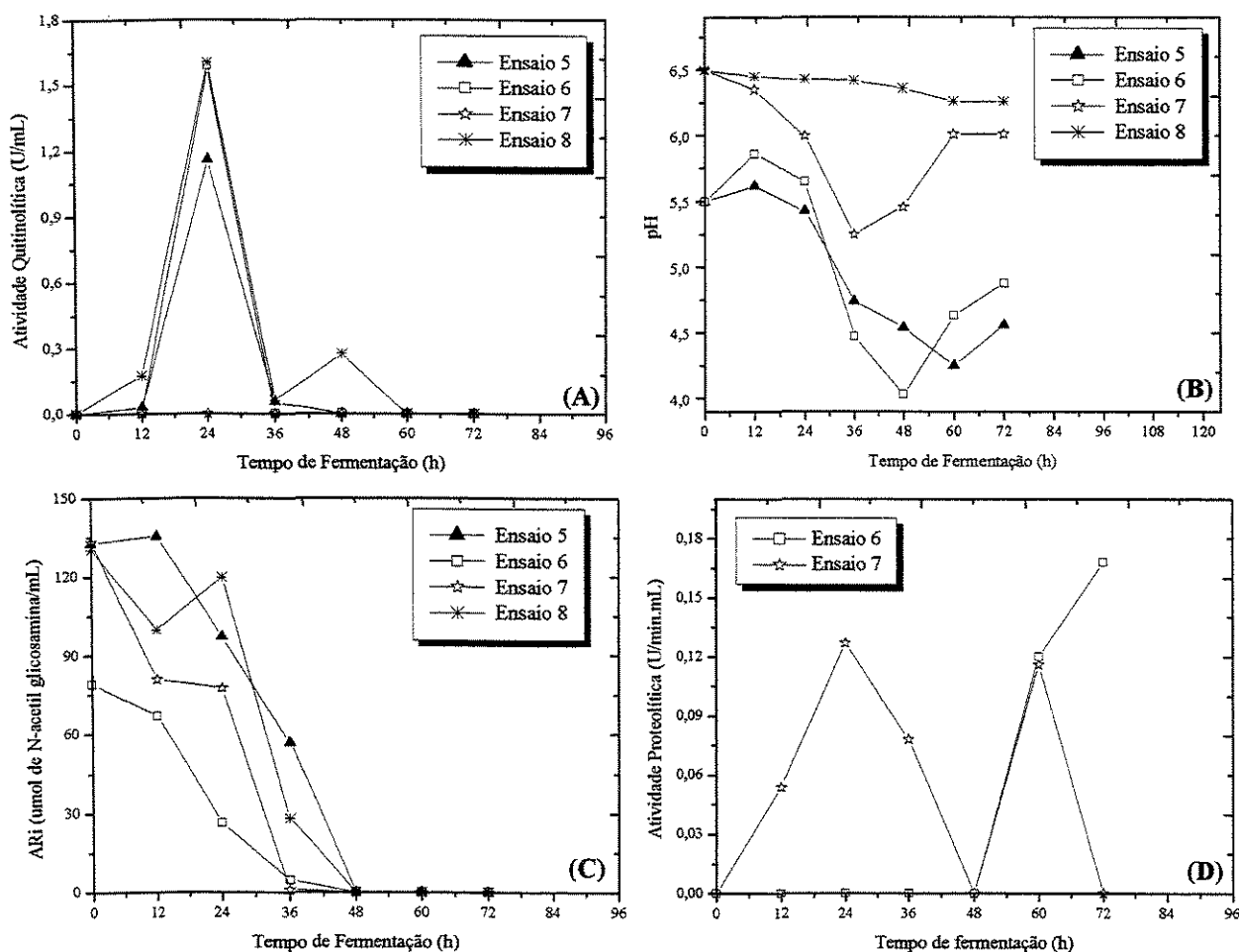
Estes resultados sugerem que o *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> não foi capaz de hidrolisar a quitina insolúvel e convertê-la em fonte disponível neste ensaio.



**Figura 4** – Cinética da produção de quitinase por *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> contendo glicose 0,1% (Ensaio 1 ao 4). (A) Atividade Quitinolítica; (B) pH; (C) ARI; (D) Atividade Proteolítica.

## 2.) CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM GLICOSE 0,5%.

A produção de enzimas quitinolíticas por *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> no meio de cultura contendo glicose no nível máximo (0,5%) do planejamento, apresentou atividades máximas quitinolíticas em 24 horas de fermentação para os ensaio 5, 6 e 8 (Figura 5-A).



**Figura 5** – Cinética da produção de quitinase por *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> para os ensaios contendo glicose 0,5% (Ensaio 5 ao 8). (A) Atividade Quitinolítica; (B) pH; (C) ARi; (D) Atividade Proteolítica.

Os ensaios 6 e 8 obtiveram a mesma atividade máxima quitinolítica (1,6 U/mL) com uma agitação máxima de 250 rpm, indicando que nestas condições a maior aeração do

meio favoreceu a produção de quitinase em 24 horas, não importando o pH inicial. Entretanto a Figura 5-B indica que o ensaio 6, o pH iniciado em 5,5, é reduzido drasticamente até 4,0 em 48 horas de fermentação, embora o pH relativo à atividade máxima quitinolítica foi igual a 5,5. Já o pH do ensaio 8 não foi alterado significativamente e o teor de açúcar livre disponível para o microrganismo permaneceu mais elevado (120  $\mu\text{mol}$  de N-acetilglicosamina/mL) até 24 horas de fermentação.

Podemos considerar que a atividade quitinolítica nula do ensaio 7 (Agitação: 150 rpm, pH 6,5) ocorreu devido a ação de proteases presentes desde o início da fermentação (Figura 5-D), as quais provavelmente destruíram a quitinase. Portanto, neste ensaio, o único açúcar consumido foi a glicose, seguido de uma redução de pH até 5,3 (36 horas de fermentação) e a seguir a reversão do pH pela proteólise.

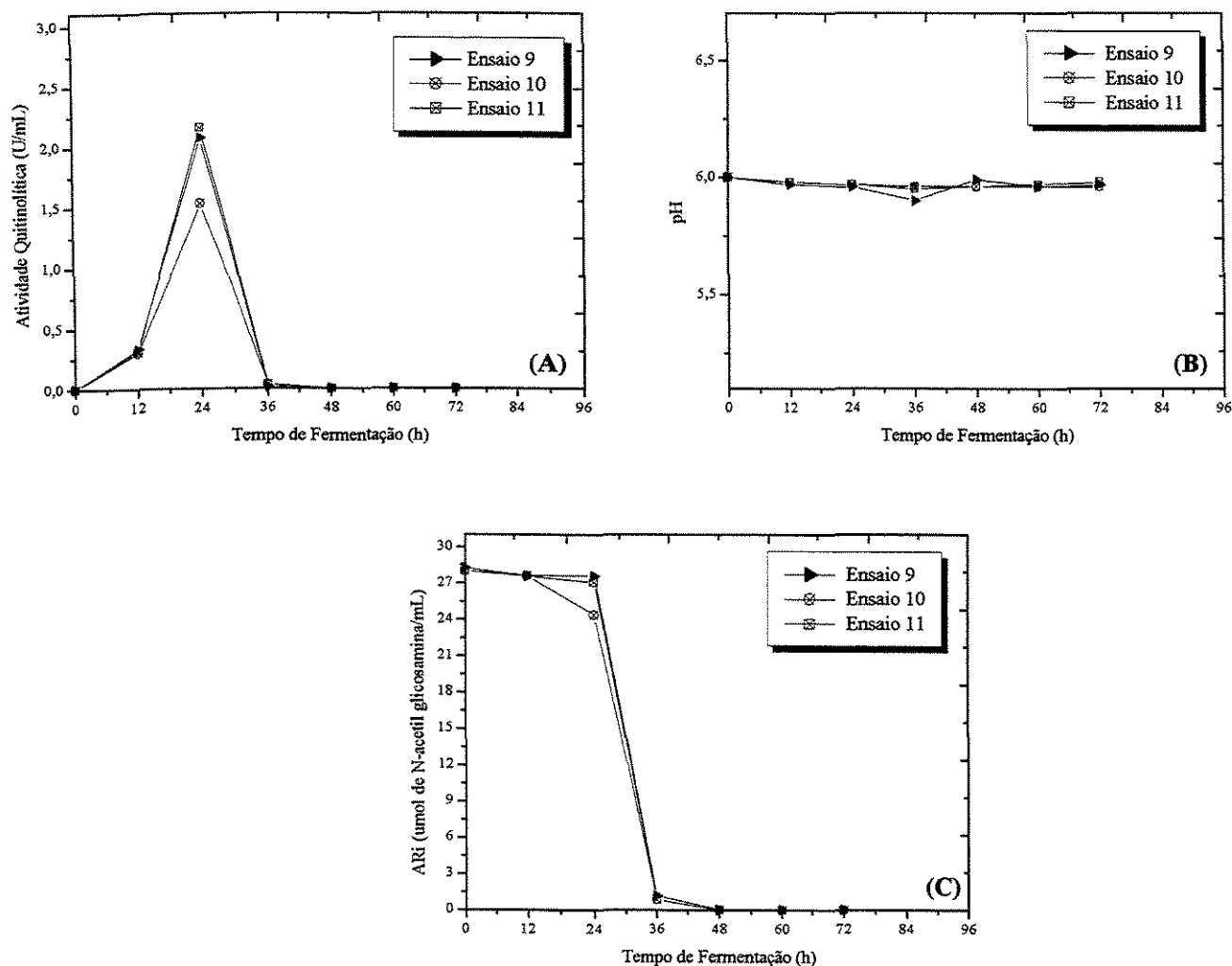
O ensaio 8 foi o único que permitiu o aparecimento de um segundo pico de atividade quitinolítica (0,3 U/mL), provavelmente devido a manutenção do pH a 6,5. Os valores de pH durante as 36 horas de fermentação diminuíram para todos os outros ensaios, indicando a rota catabólica da glicose e conseqüente produção de ácido nesta via, mesmo nos meios tamponados à pH 6,5. Na fase final da fermentação, o pH tendeu a aumentar, para os ensaios 5, 6 e 7, provavelmente devido a proteólise e degradação celular.

### 3.) CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM GLICOSE 0,3%.

O isolado *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> produziu teor máximo de quitinase nas 24 horas iniciais de fermentação no meio de cultura contendo quitina e 0,3% glicose, com mesma composição de açúcares utilizados por ULHOA *et al.* (1992) conforme as Figuras 6-A.

Estes ensaios, considerados pontos centrais do planejamento experimental completo (2<sup>3</sup>), foram realizados nas seguintes condições: agitação de 200 rpm, pH 6,0 e 0,3% de glicose, portanto podemos considerar que os três ensaios foram triplicatas do mesmo ponto. A atividade máxima encontrada nesses ensaios foi de 2,20 U/mL, mas a média dos três ensaios foi de 1,92 U/mL, no pH 6,0 praticamente estável durante as 72 horas de fermentação (Figura 6-B).





**Figura 6** – Cinética da produção de quitinase por *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> para os ensaios contendo glicose 0,3% (Ensaio 9 ao 11). (A) Atividade Quitinolítica; (B) pH; (C) ARI.

Praticamente todos os açúcares redutores foram consumidos durante as 36 horas de fermentação, mantendo-se constante (27 μmol de N-acetilglicosamina por mL) durante o

período das 24 horas de máxima produção quitinolítica, sendo reduzido drasticamente após 36 horas (Figura 6-C).

A somatória da concentração de AR, 27  $\mu\text{mol}$  de N-acetilglicosamina por mL, foi mantida constante por 24 horas provavelmente devido à acetilglicosamina e à diacetilglicosamina liberados pela hidrólise enzimática. A partir de 36 horas, todos os açúcares se esgotaram no meio de cultura devido a manutenção do microrganismo.

Foi observado que a média de atividade de quitinase dos três ensaios foi de 1,92 U/mL, com desvio padrão 0,34 U/mL para o tempo de 24 horas de fermentação.

#### **4.2 – SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPLETO ( $2^3$ ): ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE, AGITAÇÃO E PH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE QUITINASE.**

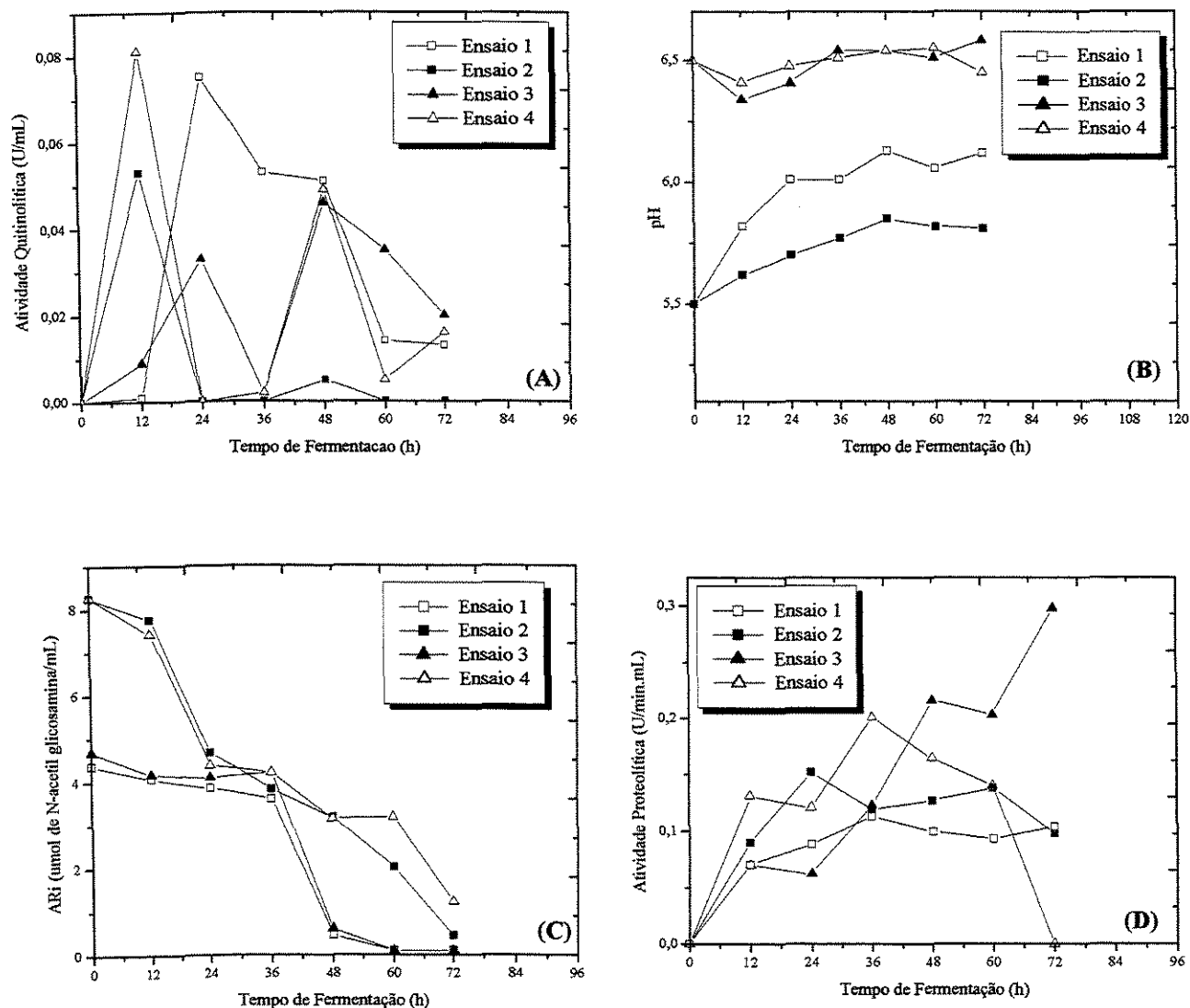
##### **4.2.2 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE QUITINASE POR *Trichoderma* sp. PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ( $2^3$ ).**

Os valores (codificados) utilizados nos ensaios do primeiro planejamento experimental estão apresentados na Tabela 8 com os respectivos níveis codificados e os resultados obtidos neste planejamentos estão apresentados na Tabela 9.

##### **1.) CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM LACTOSE 0,1%.**

Neste segundo planejamento experimental, a lactose foi analisada com o objetivo de evitar a possível inibição pela glicose da produção da quitinase. A lactose, através de hidrólise, poderia fornecer mais lentamente os monossacarídeos glicose e galactose, evitando picos de glicose e seus efeitos.

Foi observado para os quatro ensaios que a atividade quitinolítica apresentou dois picos de atividade enzimática durante as 72 horas de fermentação. As máximas atividades quitinolíticas foram encontradas nos ensaios 1 e 4 com aproximadamente 0,1 U/mL distanciados por 12 horas.



**Figura 7** - Cinética da produção de quitinase por *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> para os ensaios contendo lactose 0,1% (Ensaio 1 ao 4). (A) Atividade Quitinolítica; (B) pH; (C) ARi; (D) Atividade Proteolítica.

TABELA 8 – Tabela de níveis para as variáveis do primeiro planejamento experimental.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Lactose (%)	0,1	0,3	0,5
Agitação (RPM)	150	200	250
pH	5,5	6,0	6,5

TABELA 9 – Produção de quitinase e acompanhamento do pH para fermentações contendo lactose.

Ensaio	Agitação	pH	Lactose	Ativ.	Ativ.	Ativ.	Ativ.	Ativ.	Ativ.	pH	pH	pH	pH	pH	pH
				(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)						
				12h	24h	36h	48h	60h	72h	12h	24h	36h	48h	60h	72h
1	-	-	-	0,00	0,08	0,05	0,05	0,01	0,01	5,82	6,01	6,01	6,13	6,06	6,12
2	+	-	-	0,05	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	5,62	5,70	5,77	5,85	5,82	5,81
3	-	+	-	0,01	0,03	0,00	0,05	0,04	0,02	6,34	6,41	6,54	6,54	6,51	6,58
4	+	+	-	0,08	0,00	0,00	0,01	0,05	0,02	6,41	6,48	6,51	6,54	6,55	6,45
5	-	-	+	0,00	0,42	0,00	0,76	0,61	0,07	5,60	5,84	5,93	5,93	5,64	5,24
6	+	-	+	0,47	0,57	0,75	0,00	0,05	0,02	5,60	5,61	5,78	5,66	5,58	5,24
7	-	+	+	0,00	0,14	0,00	0,53	0,85	0,37	6,43	6,48	6,48	6,45	6,45	6,45
8	+	+	+	0,05	0,27	0,20	0,04	0,11	0,03	5,82	6,01	6,13	6,06	6,03	6,12
9	0	0	0	0,04	0,14	0,18	0,04	0,09	0,07	6,03	6,15	6,28	6,32	6,15	6,45
10	0	0	0	0,14	0,15	0,14	0,15	0,03	0,07	6,03	6,11	6,24	6,31	6,08	6,04
11	0	0	0	0,09	0,17	0,19	0,15	0,15	0,10	5,99	6,15	6,81	6,33	6,11	6,07

1. Média dos ensaios 9, 10 e 11 para os tempos 12, 24, 36 e 48 horas = 0,09, 0,15, 0,17, 0,11 U/mL (respectivamente)
2. Desvio padrão para os ensaios 9, 10 e 11 para os tempos de 12, 24, 36, 48 horas = 0,05, 0,02, 0,03, 0,06 U/mL (respectivamente)

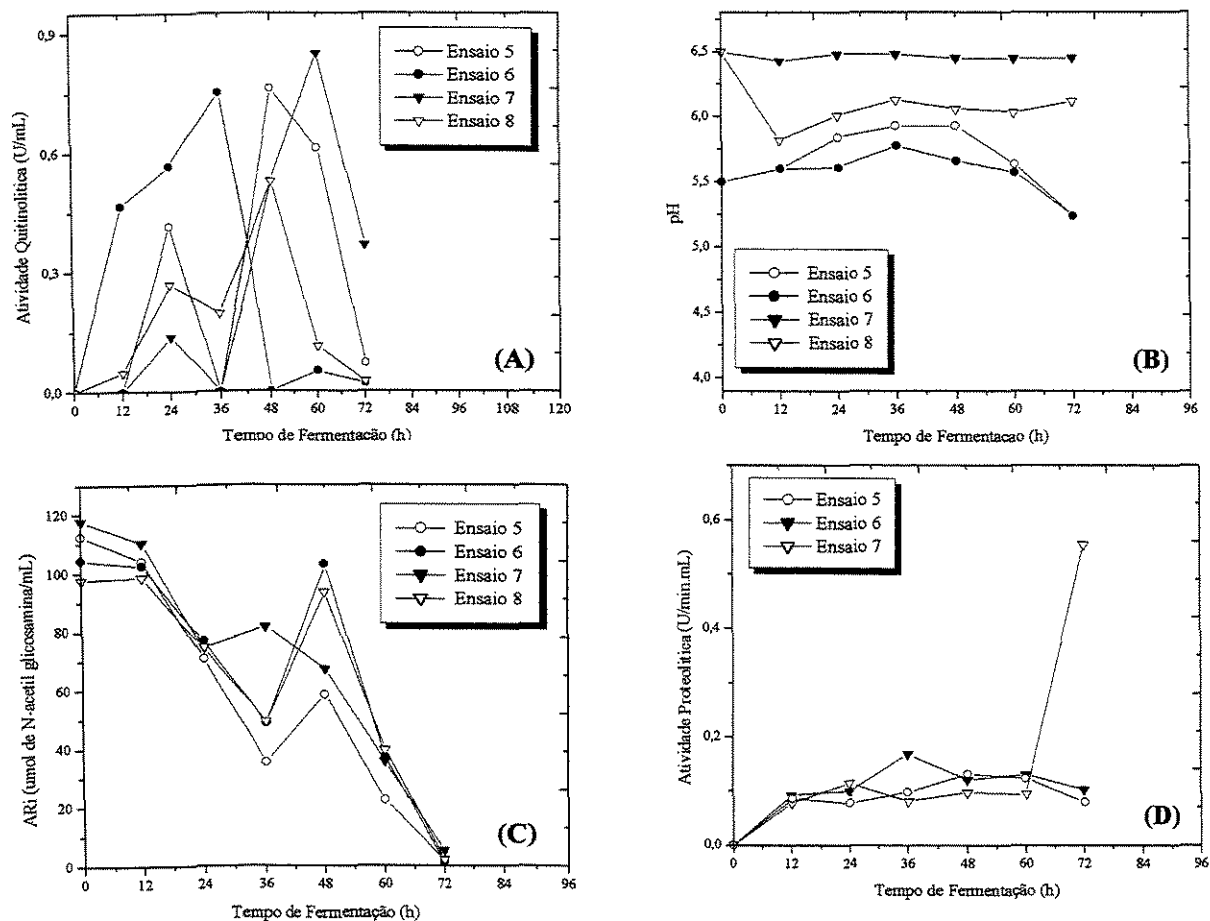
Podemos sugerir que o primeiro pico estava relacionado com o crescimento inicial do microrganismo e consumo da glicose e o outro com o consumo da galactose, N-acetilglicosamina e diacetilglicosamina. Observamos melhor este efeito pela mudança da inclinação do consumo dos açúcares à partir de 24 horas de fermentação (Figura 7-C). A atividade proteolítica foi detectada para os quatros ensaios desde as 12 horas de fermentação sendo máxima para os ensaios 3 e 4 (pH 6,5) como representado na Figura 7-D.

## **2.) CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM LACTOSE 0,5%.**

A Figura 8-A representa os resultados das atividades quitinolíticas para os ensaios com lactose no nível superior (0,5%) do planejamento experimental completo 2<sup>3</sup>.

Os ensaio 5 e 6 obtiveram a mesma atividade quitinolítica (0,8 U/mL) com um pH inicial de 5,5, indicando que nestas condições, o menor pH do meio de cultura favoreceu maiores produções de quitinase (Figura 8-B). Foi observado que a maior agitação antecipou o máximo da produção enzimática em 12 horas (ensaio 6: máximo em 36 horas e ensaio 5: máximo em 48 horas).

Foi observado que as quantidades de enzimas produzidas nestes três ensaios 5, 6 e 7 (volume de meio de cultura X atividade quitinolítica por mL) foram aproximadamente iguais (46 U) indicando, que para o meio contendo lactose, a agitação elevada associada a baixo pH (ensaio 6) antecipa a produção de enzima, provavelmente por favorecer a transferência de massa e hidrólise da lactose. Já a associação de alta agitação com pH maior (ensaio 8), retardou o aparecimento do segundo pico de atividade quitinolítica para 48 horas. Para a associação de menor agitação e pH elevado (ensaio 7) retardou ainda mais o aparecimento da quitinase (60 horas). Entretanto a associação de pH maior com agitação máxima, produziu aproximadamente 36% de enzima em relação aos três ensaios.



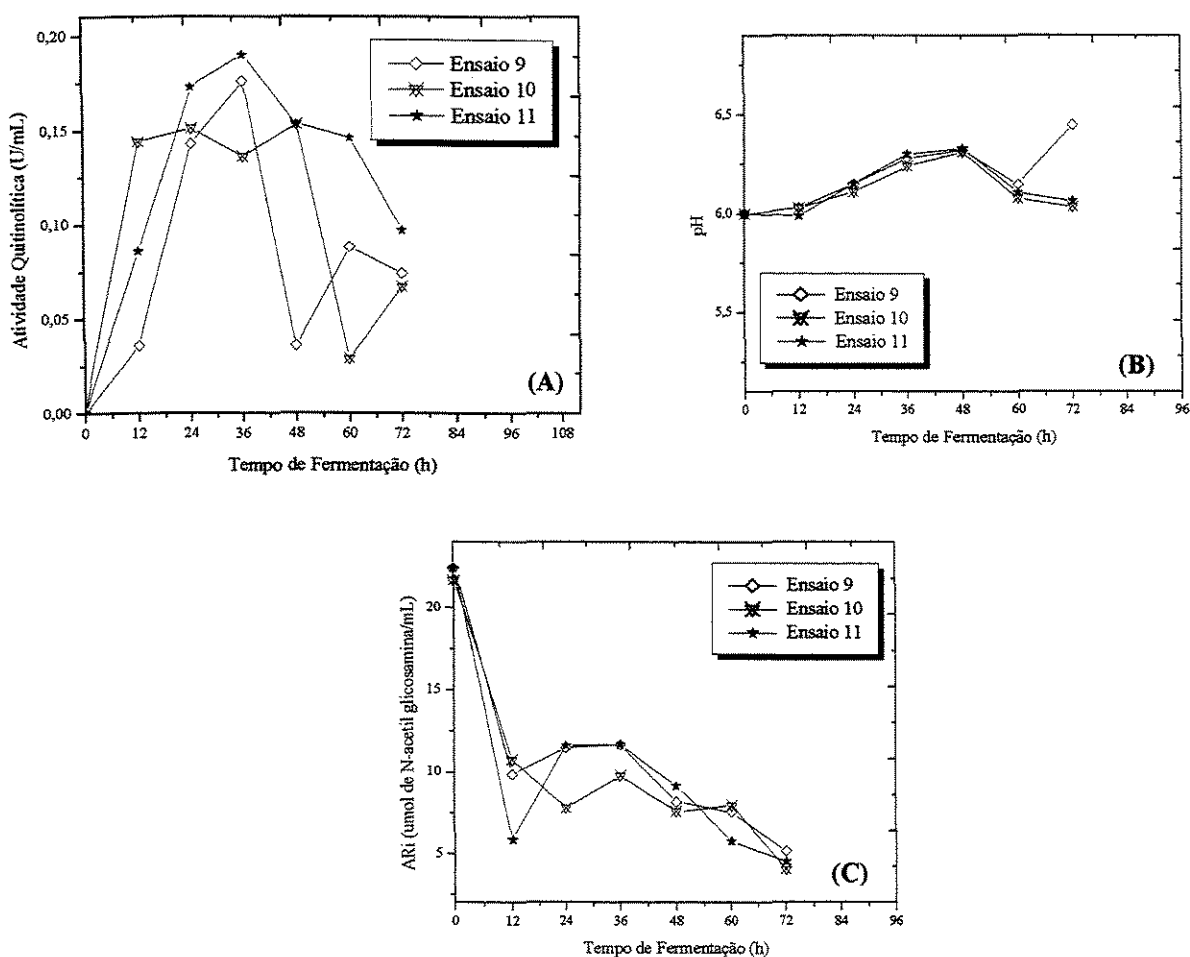
**Figura 8** - Cinética da produção de quitinase por *Trichoderma sp. T6* para os ensaios contendo lactose 0,5% (Ensaio 4 ao 7). (A) Atividade Quitinolítica; (B) pH; (C) ARi; (D) Atividade Proteolítica.

### 3.) CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE QUITINASE PARA OS ENSAIOS COM LACTOSE 0,3%.

A produção de quitinase por *Trichoderma sp. T6* nos ensaios do ponto central do planejamento experimental (Agitação: 200 rpm, pH 6,0) foi máxima em 24 e 36 horas de fermentação, como representado na Figura 9-A, quando as concentrações de AR voltaram a aumentar.

Comparando os resultados dos ensaios anteriores, podemos dizer que a concentração de lactose no meio de cultura influenciou muito a produção de quitinase no meio, pois os ensaios contendo lactose a 0,1% não produziram respostas significativas de atividade quitinolítica comparativamente aos ensaios contendo lactose 0,5%.

Foi observado que as médias de atividade de quitinase destes três ensaios foram de 0,09 U/mL, 0,15 U/mL, 0,17 U/mL, com desvio padrão de 0,05, 0,02, 0,03 U/mL para os tempos de 12, 24, 36 horas de fermentação respectivamente.



**Figura 9** - Cinética da produção de quitinase por *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> para os ensaios contendo lactose 0,3% (Ensaio 9 ao 11). (A) Atividade Quitinolítica; (B) pH; (C) ARI.

### 4.3 – DISCUSSÃO SOBRE O PLANEJAMENTO APLICADO NESTE TRABALHO

Foi observado que para o meio de cultura contendo nível mínimo de glicose (0,1%), não houve respostas significativas de atividade quitinolítica. Provavelmente, esta concentração de açúcar livre era insuficiente para manutenção e crescimento dos esporos contidos no frasco ( $3 \cdot 10^6$  esporos por mL). Assim, todos os resultados dos ensaios contendo 0,1% de glicose que tiveram respostas de atividade quitinolítica muito baixa, não puderam ser avaliados pelo programa estatístico, pois o desvio padrão era superior às respostas avaliadas. Já os ensaios contendo 0,5% de glicose, obtiveram respostas satisfatórias para ser utilizado em programa estatístico.

Os ensaios do ponto central foram utilizados para verificar a média e desvio padrão do processo fermentativo e portanto não podem ser transformados no ponto mínimo de glicose (-), por não possibilitarem a exploração das outras interações do processo como:

**Tabela 6** – Níveis de 0,3% de glicose não explorado pelo primeiro planejamento experimental.

NÍVEIS		
Glicose	Agitação	pH
0,3	-	-
0,3	+	-
0,3	-	+
0,3	+	+

Onde: Agitação (-): 150 rpm e (+) de 250 rpm; pH (-): 5,5 e (+) de 6,5



O segundo planejamento experimental para meio contendo lactose, os resultados de atividade quitinolítica do nível mínimo de lactose (0,1%) não tiveram significância para o programa estatístico porque alguns ensaios ficaram com respostas inferiores ao desvio padrão.

#### 4.3 – PRODUTIVIDADE DA QUITINASE EM RELAÇÃO AOS DADOS DA LITERATURA

A produção de quitinase por diferentes microrganismos vem sendo investigada por diferentes autores nos últimos 30 anos, devido ao seu potencial como bioinseticida e como biocatalisador na produção de polissacarídeos de interesse industrial, conforme descrito anteriormente. A Tabela 11 apresenta um resumo dos principais resultados da produção de quitinase descritos na literatura.

A diferença entre os valores de atividade quitinolítica descritos pela literatura pode estar ligada aos diferentes substratos utilizados na determinação enzimática bem como as formas diferentes de cálculos. Como por exemplo, este presente projeto utilizou como substrato para a determinação da atividade quitinolítica, a quitina coloidal (obtida conforme item 3.2.1.1) e tempo de incubação de 12 horas. De outra forma, LIMA *et al.*, 1997, utilizando o substrato de quitina regenerada (quitosana acetilada) e tempo de incubação do caldo mais substrato de 6 horas, obtiveram níveis de produtividade muito maiores comparado com o presente trabalho, utilizando o mesmo *Trichoderma sp. T<sub>6</sub>*.

PANDA *et al.* (1999) estudaram as melhores condições de pH, aeração e agitação para aumentar a atividade quitinolítica de *Trichoderma harzanium*. A atividade enzimática aumentou 3,5 vezes mais, de 0,11 para 0,38 U/mL depois da otimização. Como podemos observar, a atividade quitinolítica obtida por eles foi inferior cinco vezes comparado com este presente trabalho. Um novo trabalho de PANDA *et al.*, 2000 para produção de quitinase em cultura submersa, também estudando a agitação no meio de cultura em bioreatores, observou a máxima atividade quitinolítica de 0,389 U/mL.

**Tabela 7-** Produção de quitinase microbiana (dados da literatura).

Microrganismo	Atividade Quitinolítica (U/mL)	Glicose (%)	Tempo de Cultivo (h)	Produtividade (U/mL.h)	Referência
<i>Trichoderma</i> sp. T <sub>6</sub>	524	0,5	72	7,280	LIMA <i>et al.</i> , 1997
<i>Trichoderma harzianum</i> 39,1	171	0,5	72	2,380	LIMA <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus</i> sp. BG-11	76,0	0,5	72	1,060	BHUSHAN <i>et al.</i> , 1998
<i>Serratia liquefaciens</i>	15,1	*ofc	45	0,340	JOSHI <i>et al.</i> , 1989
<b><i>Trichoderma</i> sp. T<sub>6</sub></b>	<b>1,92</b>	<b>0,3</b>	<b>24</b>	<b>0,080</b>	<b>Este trabalho</b>
<i>Talaromyces Emersonii</i>	2,30	*nd	48	0,050	MCCORMACK <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	2,40	ofc	72	0,030	CHAN <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	0,60	ofc	72	0,010	CHAN <i>et al.</i> , 1995
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,39	0,5	112	0,004	PANDA <i>et al.</i> , 2000
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,38	0,5	*nd	*nd	PANDA <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptomyces viridificans</i>	0,20	ofc	144	0,002	GUPTA <i>et al.</i> , 1995
<i>Serratia marcescen</i>	0,39	0,5	168	*nd	MONREAL <i>et al.</i> , 1968
<i>Trichoderma harzianum</i> 39,1	*nd	0,3	48	*nd	ULHOA <i>et al.</i> , 1992

Obs: \* não determinado, ofc = outra fonte de carbono

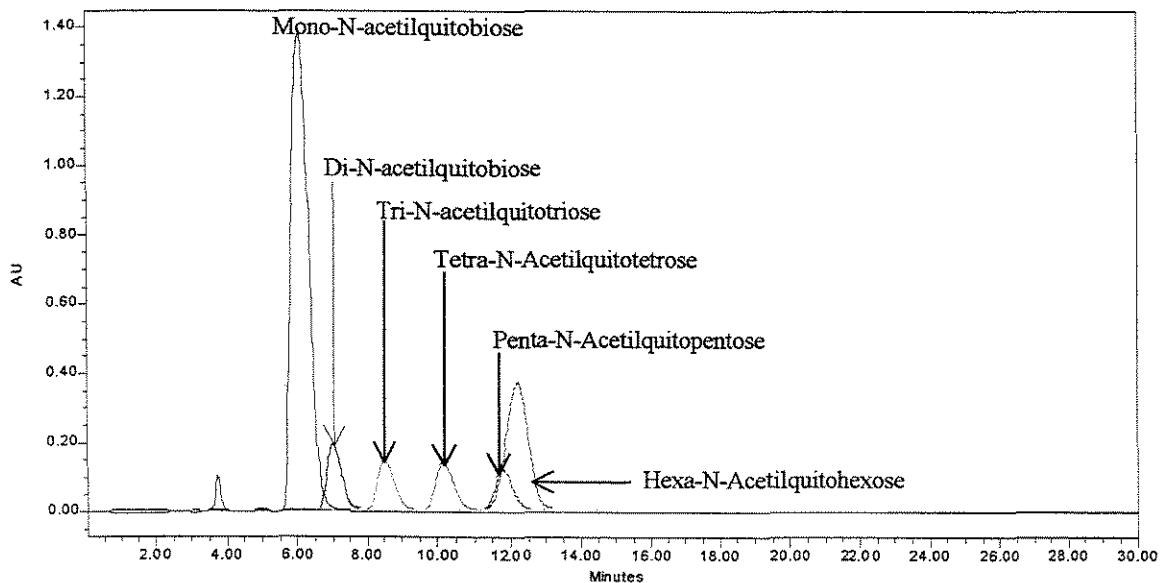
#### 4.3 – PRODUÇÃO DE QUITOOLIGOSSACARÍDEOS PELA QUITINASE DE *TRICHODERMA* SP. T<sub>6</sub>

Foi desenvolvido um método CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) para quantificação dos oligossacarídeos derivados da hidrólise enzimática da quitina coloidal. Como alguns deles são poucos solúveis na fase móvel composta por 70% de acetonitrila e 30% de água, foi necessária modificação do método analítico da literatura (SCHANZENBACH *et al.*, 1994), com utilização de um gradiente de solventes, de menor a maior polaridade, para possibilitar a eluição dos padrões de oligômeros formados por 2 a 6 unidades de acetilglicosamina.

O caldo de fermentação utilizado para a produção de oligossacarídeos foi o ensaio do ponto central do planejamento experimental (ensaio 10 com 2,16 U/mL de atividade quitinolítica) nas seguintes condições: 200 rpm de agitação, pH 6,0, 0,3% de glicose.

O método cromatográfico desenvolvido promoveu a partição das substâncias no interior da coluna, devido a diferentes interações de polaridade com as fases móvel e estacionária. A eluição dos padrões de N-acetilglicosamina ocorreu em ordem crescente do grau de polimerização.

A Figura 10 representa o cromatograma dos seis padrões de oligossacarídeos de quitina, desde o monômero N-acetilglicosamina até o hexâmero, obtidas nas condições descritas na metodologia (item 3.2.4.2 -I).



**Figura 10** - Cromatograma dos padrões de quitoligossacarídeos em coluna  $\mu$ Bondapak-NH<sub>2</sub>, solução de acetonitrila e água (70:30, v/v e 50:50, v/v) a um fluxo gradiente linear de 0,8mL/min, detector de índice de refração (210 nm).

O aumento no caráter polar de acordo com o aumento de grupos N-acetilglicosaminas nas moléculas pode ser observado pelo aumento do tempo de retenção na coluna dos açúcares maiores. Os tempos de retenção dos padrões injetados foram 5,94

minutos para o Mono-N-Acetilquitobiose, 7,05 minutos para o Di-N-Acetilquitobiose, 8,48 minutos para Tri-N-Acetilquitotriose, 10,22 minutos para o Tetra-N-Acetilquitotetrose, 11,89 minutos para o Penta-N-Acetilquitopentose e 12,22 minutos para o Hexa-N-Acetilquitohexose.

Para a calibração do Mono e DiacetilQuitobiose, as massas padrões injetadas foram relacionadas às áreas sob o pico formado (Figura 12). De acordo com OHTAKARA *et al.* (1997) existe uma relação linear entre a área do pico e a massa de amostra injetada. Para a construção das curvas de calibração foram utilizadas soluções do padrão em três concentrações diferentes, injetando-se três vezes cada concentração utilizada.

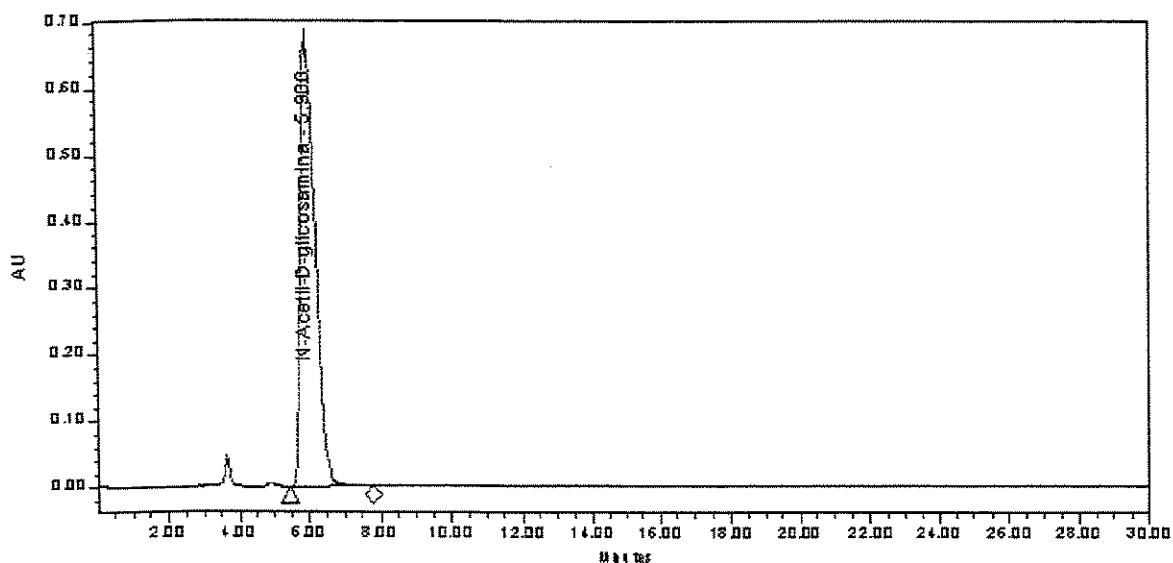


Figura 11 - Cromatograma padrão de Mono-N-acetilglicosamina.

Para a quantificação das amostras hidrolizadas, a área integrada sob o pico foi relacionada à massa deste oligossacarídeo presente na quantidade de amostra injetada, utilizando-se a curva de calibração previamente construída. A amostra de hidrólise enzimática apresentou dois produtos predominantes Mono-N-acetilglicosamina o Di-N-Acetilquitobiose (Figura 12).

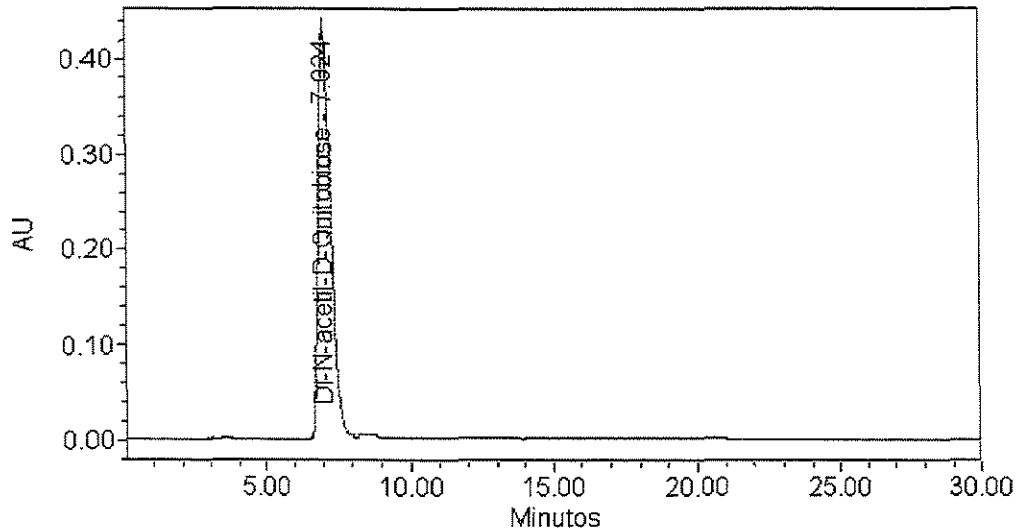


Figura 12 – Cromatograma padrão de N,N'-DiacetilQuitobiose.

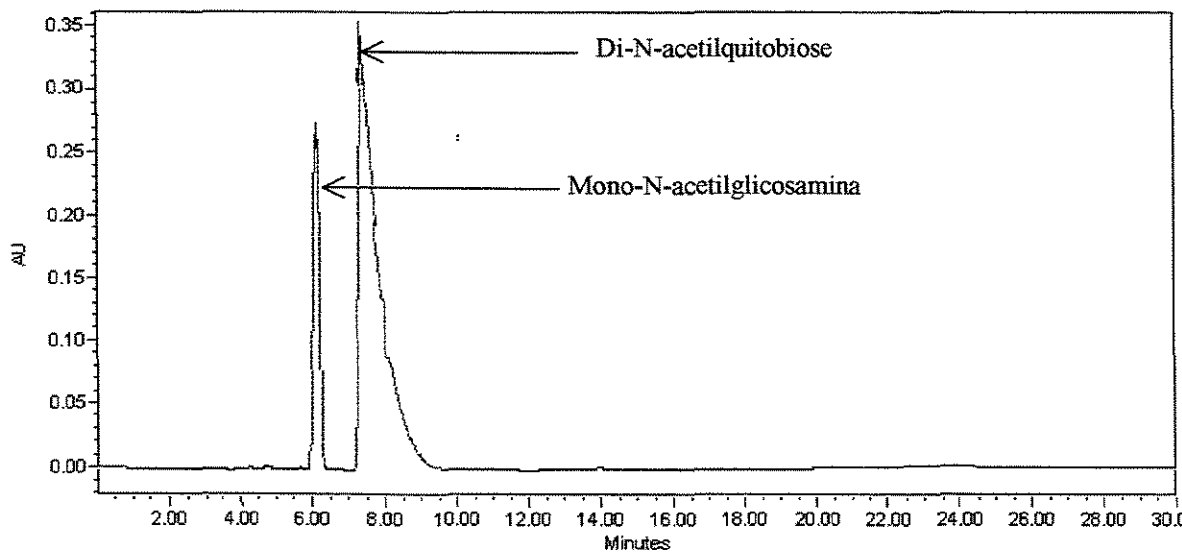
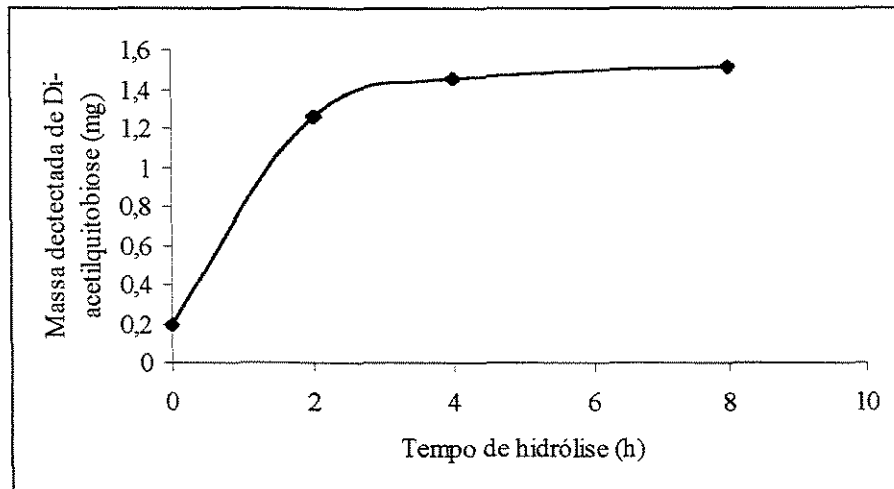


Figura 13 – Cromatograma da Hidrólise da quitina coloidal 1% (tampão acetato 50 mM, pH 5,2) após 8 horas com caldo de fermentação do *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub>.

A cinética da hidrólise da quitina coloidal 1% em tampão acetato de sódio (50 mM) do *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> foi acompanhada por 8 horas. Foi observado que níveis de oligossacarídeos obtidos pela hidrólise enzimática tendem a se estabilizar após 4 horas de

incubação, pois a variação de massa detectada em 8 horas de hidrólise em relação à 4 horas, foi apenas de 15% (Figura 14).



**Figura 14-** Cinética de formação do Di-N-acetilquitobiose (mg) em função da hidrólise de quitina coloidal 1% em tampão acetato 50 mM, pH 5,2 pelo caldo de fermentação de *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> (proveniente do ensaio 6 contendo glicose).

## 5- CONCLUSÕES

Este presente trabalho foi realizado com a finalidade de verificar a influência da glicose e lactose na composição do meio de cultura da agitação e pH para a produção de quitinase por *Trichoderma* sp. T<sub>6</sub> e levaram às seguintes conclusões:

- Para ensaios contendo glicose, a produção máxima se deu em 24 horas de fermentação. A produção máxima quitinolítica (1,92U/mL) foi obtida nas seguintes condições: agitação de 200 rpm, pH 6,0 e 0,3% de glicose em 24 horas de fermentação. Os açúcares redutores foram totalmente consumidos nas primeiras 48 horas de fermentação. Foi observado atividade quitinolítica nula para os ensaios 1, 2, 3 e 4 quando a atividade proteolítica foi encontrada (exceto para o ensaio 1).

- Foi observado que a concentração de glicose influenciou a produção de quitinase, não sendo possível obtenção de respostas significativas de produção desta enzima com 0,1% de glicose. A produção máxima de quitinase se deu em meio contendo 0,3% de glicose.

- Os ensaios 6 e 7 dos experimentos contendo glicose obtiveram a máxima produção quitinolítica (1,60 U/mL) em 24 horas de fermentação com uma agitação máxima de 250 rpm, indicando que nestas condições a maior aeração do meio favoreceu a produção da enzima.

- Para os ensaios contendo lactose a produção máxima quitinolítica se deu nos ensaios 5, 6 e 7 com 0,76, 0,75 e 0,85 U/mL respectivamente. A atividade proteolítica foi detectada desde o início da fermentação para os ensaios contendo 0,1% e 0,5% de lactose.

- A concentração de lactose influenciou a produção de quitinase, não sendo possível portanto, respostas significativas para esta enzima em meios contendo 0,1% de lactose. A máxima produção de quitinase se deu em meios contendo 0,5 % de lactose.

- A hidrólise enzimática da quitina coloidal (1%) com caldo bruto do ensaio de máxima produção quitinolítica foi acompanhada por 8 horas, produzindo dois oligossacarídeos predominantes o mono-N-acetilglicosamina e o di-N-acetilquitobiose.



## 6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados e conclusões obtidos neste trabalho sugere-se como trabalhos futuros:

- Realizar um estudo da hidrólise química completa da quitina para possibilitar avaliar seu consumo durante a fermentação.
- Pesquisar outras fontes brutas de quitina alternativas comercialmente viáveis que possibilitem um bom desempenho do processo quanto à atividade quitinolítica.
- Estudar a concentração ótima de inóculo, visando diminuir a fase lag e conseqüentemente, aumentar a produtividade.
- Realizar um planejamento experimental completo, incluindo a configuração estrela (pontos axiais) , para obter as superfícies de resposta para o meio de cultivo otimizado e gerar um modelo que possa ser utilizado para fins preditivos.
- Otimizar as condições de operação da produção de quitinase em bioreator, incluindo a aeração e agitação e parâmetros cinéticos não estudados com este microrganismo.
- Investigar fermentações por batelada alimentada com sacarose, glicose e lactose.

---

**7- BIBLIOGRAFIA**

1. BARROS, B.N., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Ed. UNICAMP – Campinas, São Paulo, 1995.
2. BEYOND, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes - A Practical Approach**. Reading: Gairtam Sarath, Rebecca S. de La Motte and Fred W. Wagner, 1997. Cap.3 - Protease assay methods, p. 27.
3. BERNASCONI, P.; JOLLÉS, P. AND PILET, P.E. Purification of large amounts of lysozyme with chitinase activity from *Rubus Hispidus* cultured in vitro, in: **Chitin in Nature and Technology**, pg. 234-236. Plenum Press, New York, 1986.
4. BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. Statistics for Experiments. An: **Introduction to design, data analysis and model building**. New York, Wiley, 1978.
5. BHUSH, B.; HOONDAL, G.S. Isolation, purification and properties of thermostable chitinase from alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11. **Biotechnology Letters**, v.20(2), pg.157-159, 1998.
6. CHEN, J-P; CHANG, K-C. Immobilization of chitinase on a Reversibly Soluble-Insoluble for chitin hydrolysis. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.60, pg. 133-140, 1994.
7. CODY, R. M. Distribution of chitinase and chitobiose in *Bacillus*. **Curr. Microbiol.**, v.19, pg.201-205, 1989.
8. CRAVEIRO, A. A., CRAVEIRO, A. C., QUEIROZ, D. C. **Quitosana: A fibra do futuro**. Editora do Parque de Desenvolvimento Tecnológico, Fortaleza, Ceará, 1999.

9. DAVIS, B.; EVELEIGH, D.E. Chitosanases: production and immobilization, in: **Chitin, Chitosan and Related Enzymes**, J. P. Zikakis (ed.). Academic Press, Orlando, pg. 161-179, 1984.
10. DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENÍTEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A. AND LLOBELL, A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **Euro. J. Biochem.**, v.206, pg.859, 1992.
11. DEANE, E.E.; WHIPPS, J.M.; LYNCH, J. M.; PERBERDY, J.F. The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase. **Biochimica et Biophysica Acta 1383**, pg. 101-110, 1998.
12. DEISING, H.; SIEGRIST, J. Chitin desacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* is controlled by fungal morphogenesis. **FEMS Microbiol. Lett.**,v.127, pg. 207-212, 1995.
13. EPOSITO, E.; SILVA, M. Systematic and Environmental Application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v.24 (2), pg. 89-98, 1998.
14. FLASCH, J.; PILLET, P. E.; JOLLÉS, P. What's new in chitinase research. **Experimentia**, v.48, pg. 701-715, 1992.
15. FRÄNNDBERG, E.; SCHNÜRER, J. Chitinolytic properties of *Bacillus pabulis* K1. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, pg 361-367, 1994.
16. GOMES, R. C.; SÊMEDO, L. T. A. S.; SOARES, R. M. A.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F. AND COELHO, R. R. R. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potencial in biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, pg.146-150, 2000.
17. GOODAY, G. W.; PROSSER, J. I.; HILLMAN, K.; CROSS, M. G. Mineralization of chitin in an Estuarine sediment: The Importance of Chitosan Pathway, **Biochem. Syst. Ecol.**, v.19, pg. 395-400, 1991.

18. GUPTA, R.; SAXENA, R. K.; CHATURVEDI, P.; VIRDI, J. S. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potencial in fungal cell lysis. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, pg 378-383, 1995.
19. HIRANO, S. NAGAO, N. Effects of chitin, pectic acid, and chitinase on the growth of several phytopathogens. **Agric. Biol. Chem.**, v.53(11), p. 3065-3066, 1989.
20. JEON, Y.J., PARK P.J., BYUN, H.G., SONG, B.K., KIM, S.K. Bioativities of chitosan oligassacarides and their derivatives. In: **Abstracts of 3<sup>rd</sup> Asia Pacific chitin and chitosan symposium**, Kilung, Taiwain, p.64, 1998.
21. JOSHI, S.; KOZLOWSHI, M.; RICHENS, S.; COMBERBACH, D. M. Chitinase and chitobiose production during fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens*. **Enzyme Microb. Technol.**, v.11, pg. 289-296, 1989.
22. KENDRA, D.F., HARWIGER, L.A. Characterization of the smallest the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. **Exp. Mycol.**, v.8, p. 276-281, 1984.
23. KOBAYASHI, S.; KIYOSADA, .; SHODA, S. A novel method for synthesis of chitobiose via enzymatic glycosylation using a sugar oxazoline as glycosyl donor. **Tetrahedron. Lett.**,v.38, pg. 2111-2112, 1997.
24. KOLE, M. M.; AND ALTOSAAR, I. Increased chitinase production by non-pigmented mutant of *Serratia marcescens*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.26, pg 265-269, 1985.
25. KONO, M.; MATSUI, T. AND SHIMIZU, C. Purification and some properties of chitinase from the stonach of red sea bream *Pagrus major*. **Nippon Susan Gakk**, v.53, pg. 131-136, 1987 (a).

26. KONO, M.; FURUKAWA, K.; SATOH, H.; MATSUI, T. AND SHIMIZU, C. Changes in the chitinase activity at different stages of red sea bream *Pragus major* egg, larva, and juvenile. **Nippon Suisan Gakk.** v.53, pg. 1289-1293 (b).
27. KONO, M.; MATSUI, T.; SHIMIZU, C. AND KOGA, D. Purification and some properties of chitinases from stomach of Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Agric. Biol. Chem.**, v.54, pg. 973-987 (c).
28. KROMBRINK, E.; SOMSSICH, I.E. Defense responses of pathogens. **Adv. Bot. Res.**, v.21, pg. 2-34, 1995.
29. LEE, D., NOH, H.J., LEE, K.M. Purification and characterization of a chitinase from *Cytophaga* sp. HJ isolated from sea sand. **Journal of microbiology and Biotechnology**, 1999.
30. LEE, K.P., KIM, C.N., YU, J.H., OH, D.H. The production and purification of chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA-625. **Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.**, v.18, p. 599-606, 1990.
31. LIM, H.S., KIM, S.D. The production and enzymatic properties of extracellular chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YP-1, as a biological agent. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.4, p. 134-140, 1994.
32. LIMA, L. H. C., ULHOA, C. J., FERNANDES, A.P., FELIX, C.R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v.43, p. 31-37, 1997.
33. LORITO, M.; HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; BRODWAY, R. M.; TRONSMO, A.; WOO, S. L. AND PIETRO, A. D. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiose. **Phytopathology**, v.83, pg. 302, 1993.
34. MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. Brock biology of microorganisms. Prentice-Hall, INC, p. 245, 1996.

35. MATHIVANAM, N.; KABILAN, V.; MURUGESAN, K. Purification, characterization and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, amycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. **Can. J. Microbiol.**, v.44, pg. 646-651, 1998.
36. MCCORMARCK, J., HACKETT, T.J., TUOHY, M.G., COUGHLAN, M.P. Chitinase production by *Talaromyces emersonii*. **Biotechnology Letters**, v.13(9), p. 677-682, 1991.
37. MONREAL, J., REESE, E.T. The chitinase of *Serratia marsescens*. **Can. J. Microbiol.**, v.15, p.689-696, 1989.
38. MURAO, S.; KAWADA, T.; ITOH, H.; OYAMA, H.; SHIN, T. Purification and characterization of a novel type of chitinase from *Vibrio alginolyticus*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.56, pg. 368-369, 1992.
39. MUZZARELLI, R. A. A. Chitin Enzymology. **Euro .Chitin. Soc. Italy**, 1993.
40. MUZZARELLI, R. A. A.; TANFANI, F. AND SCARPINI, G. **Biotechnol. Bioengen.**, v.22, pg 885, 1980.
41. MUZZARELLI, R. A. A. Chitin. Pergamon Press, New York, 1977.
42. NELSON, W. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v.153, pg. 375-380, 1940.
43. OHTAKARA, A., MITSUTOMI, M. Analysis of chitooligosacharides and reduced chitooligosacharides by high-performace liquid chromatography. **Methods in Enzymology**, p.453, 1997.
44. PAPARIZAS, G.C. *Trichoderma* and *gliocladium*: Biology, ecology, and potencial for biocontrol. **An. Ver. Phytopathol.**, v.23, pg. 23, 1985.
45. PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Techoonology**, v.26, pg. 473-483, 2000.

46. PEDRAZA-REYES, M. AND TOPEZ-ROMERO, E. Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*. **J. Gen. Microbiol.**, v.135, pg. 211-218, 1989.
47. PIZA, F.A.T., SILOTO, A.P., CARVALHO, C.V., FRANCO, T.T. Production, characterization and purification of chitosanase from *Bacillus cereus*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.16(2), p. 185-192, June 1999.
48. PONEZI, A. N. Proteases de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*): obtenção caracterização e aplicação em panificação. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, 1997. Pag 3-6. (Tese de mestrado).
49. RAIMBAULT, M., SOCCOL, C.R., CHUZEL, G. International training course on solid state fermentation. **Sarl la Goutte D'Encre Editora**, França, p. 204, 1998.
50. REHBEIN, H.; DANULAT, E. AND LAINEMAN, M. Activities of chitinase and protease and concentration of fluoride in the digestive tract of antarctic fishes feeding on krill (*Euphasia superba* Dana). **Comp. Biochem. Physiol. Pt. A.**, v.85, pg. 545-551, 1986.
51. ROBBIN, P.W., OVERBYE, ALBRIGHT, C., BENFIELD, B., PERO, J. Cloning and high-level expression of chitinase-encoded gene *Streptomyces plicatus*. **Gene**, v.111, p.69-76, 1992.
52. ROLLER, S., COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Microbiology**, v.47, p. 67-77, 1999.
53. RICARD, J.L. Commercialization of a *Trichoderma* - based mycofungicide – some problems and solutions. **Biocontrol News and Information**, v.2, pg. 95, 1981.

54. SCHLUMBAUM, A. ; MAUCH, F.; VÖUGELI, V. AND BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v.324, pg. 365-367, 1986.
55. SHAHIDI, F., ARACHCHI, J.K.V., JEON, YOU-JIN. Food applications chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p. 37-51, 1999.
56. SHAIKH, S. A.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.9, pg. 468-475, 1993.
57. SHIN, W.C., LEE, D.S., KIM, T.H., WOO, J.M., LEE, J.M., KIM, J.G., HONG, S.D. Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. WC-17 producing chitinase. **J. Microbiol Biotechnol.**, v.5, p. 35-45, 1996.
58. SHULER, M. L., KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. Prentice-Hall, Inc, 1992.
59. SIEFERT, E.; BÜNGER, U.; DINTER, S. Enzymatic degradation chitin by microorganisms. **Advan. Chitin Sci.**, v.4. M. G. Peter, A. Domard and R. A. A. Muzzarelli, eds.
60. SILVEIRA, F. Q. F.; MELO, I. S.; FERREIRA, E. X. F. Carbohydrate hydrolyzing enzyme activity production by solid-state cultures of *Trichoderma harzianum* strains. **Rev. Microbiol.**, v.28, pg 152, 1997.
61. SPINDLER, K. D. AND BUCHHOLZ, F. Partial characterization of chitin degrading enzymes from two euphsii, *Euphasia superba* and *Meganyctiphanes norvegica*. **Polar Biol.**, v.9, pg. 115-122, 1988.
62. SURESH, P. V.; CHANDRASEKARAN, M. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.34, pg. 257-267, 1999.



- 
63. TWEDDELL, R. J.; JABAJI-HARE, S. H.; CHAREST, P. M. Production of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases by *Stachybotrys elegans*, a Mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60 (2), pg. 489-495, 1994.
  64. WANG, SAN-LANG; CHIOU, SAL-HUA AND CHANG WEN-TSU. Production of chitinase from shellfish waste by *Pseudomonas aeruginosa* K-187. **Proceedings of the National Science Council, ROC. Parte B: Life Sciences**, v.21 (2), pg. 71-78, 1997.
  65. WANG, SAN-LANG, CHANG, WIN-TSU, LU, MING-CHOU. Production of chitinase by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shimp and crab shell powder as a carbon source. **Proceedings of the National Science Council, ROC. Parte B: Life Sciences**, v.19(2), pg. 105-112, 1995.
  66. WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annu. Ver. Microbiol.**, v.50, pg. 183-212, 1996.
  67. WOO, CHEOL-JOO., YUN, UN-JUNG., PARK, HEUI-DONG. Isolation of chitin utilizing bacterium and production of its extracelullar chitinase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.6(6), p. 439-444, 1996.