

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

**FRANCENYA KELLEY LOPES DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE QUITINASE POR *Paenibacillus illinoisensis*  
IMOBILIZADOS EM MATRIZ DE ALGINATO**

GOIÂNIA-GO

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**  Dissertação       Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

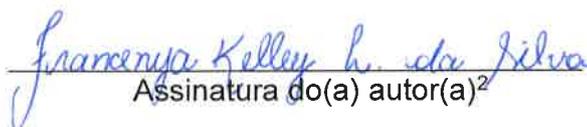
Nome completo do autor: Francenya Kelley Lopes da Silva.

Título do trabalho: PRODUÇÃO DE QUITINASE POR *Paenibacillus illinoisensis* IMOBILIZADOS EM MATRIZ DE ALGINATO.

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 15 / 05 / 18

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

FRANCENYA KELLEY LOPES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE QUITINASE POR *Paenibacillus illinoisensis*  
IMOBILIZADOS EM MATRIZ DE ALGINATO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Nível: Mestrado

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral

GOIÂNIA-GO

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Francenya Kelley Lopes da  
PRODUÇÃO DE QUITINASE POR *Paenibacillus illinoisensis*  
IMOBILIZADOS EM MATRIZ DE ALGINATO [manuscrito] /  
Francenya Kelley Lopes da Silva. - 2018.  
42 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2018.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Quitina. 2. Imobilização celular. 3. Biopolímeros. 4. Gelificação iônica. I. Amaral, André Corrêa, orient. II. Título.

CDU 579



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

1        **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 066**

2        Aos quatro dias do mês de maio do ano de dois mil e dezoito  
3        (04/05/2018), às 09hs00min, no (a) Sala 402 do IPTSP, reuniram-se os  
4        componentes da banca examinadora: **Prof. Dr. André Corrêa Amaral, Profa.**  
5        **Dra. Lilian Carla Carneiro e Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria** para, em  
6        sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à  
7        avaliação da defesa de dissertação intitulada: "**Produção de quitinase por**  
8        ***Paenibacillus illinoisensis* imobilizados em matriz de alginato**", em nível  
9        de mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de  
10        autoria de **Francenya Kelley Lopes da Silva**, discente do Programa de Pós-  
11        Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás.  
12        A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros  
13        da banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em  
14        cerca de trinta minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho.  
15        Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-  
16        se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição,  
17        procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na  
18        Resolução nº 1294/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura  
19        (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e  
20        Biologia Molecular, a dissertação foi aprovada, considerando-se  
21        integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre  
22        em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A  
23        conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da  
24        dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela  
25        banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa.  
26        Cumpridas as formalidades de pauta, às 10 horas e 55 minutos,  
27        encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Clayton L. Borges,



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

28 Coordenador do PGBM do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade  
29 Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada  
30 pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

31

32

33

  
**Prof. Dr. André Corrêa Amaral**  
**Presidente da Banca**  
**UFG/GO**

34

35

36

37

38

39

40

  
**Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro**  
**UFG/GO**

41

42

43

44

45

  
**Profa. Dra. Fabrícia Paula de Faria**  
**UFG/GO**

46

47

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

Aos meus pais, Carlos Aparecido Lopes e Maria do Carmo da Silva Lopes, e à minha irmã, Francielle Karla Lopes da Silva, pelo carinho, apoio e por ser uma família maravilhosa. Sou extremamente grata à Deus, por terem vocês em minha vida.

Ao meu orientador, Dr. André Corrêa Amaral, pela orientação e dedicação. Por ser uma pessoa amiga, extremamente compreensível e disposta a sanar todas as dúvidas no decorrer do trabalho.

A todos os meus parceiros de laboratório que se tornaram amigos para a vida toda, Artur Ribeiro de Sá Alexandre, Ariádine Amorim Casas, Maycon Carvalho Ribeiro, Samuel Rodrigues dos Santos Júnior e Barbara Carolina Silva, por todo apoio tanto nos experimentos quanto nos inúmeros mutirões para preparo de material e lavagem de bacias repletas de placas de Petri. Ou mesmo aquelas pessoas que conhecemos em corredores mas que se tornaram muito especiais, como a Fernanda Garrote. Além dos incontáveis cafezinhos e conversas que faziam os dias mais leves.

A Dr<sup>a</sup> Keili Maria Cardoso de Souza, por toda orientação e disposição para ajudar a resolver os problemas no decorrer dos experimentos.

A Msc Viviane Lopes Rocha Corrêa, por ter me ajudado sempre que precisei.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, LAMAB, pela disponibilidade de ajuda em todos os momentos.

A Dr<sup>a</sup> Walquíria Arruda, por me atender e ajudar a solucionar problemas de preparação de amostras, com toda a simpatia do mundo.

A todos meus amigos que caminharam comigo ao longo do mestrado, principalmente os que sempre me acompanham nos rodízios.

## RESUMO

**SILVA, F.K.L.** “PRODUÇÃO DE QUITINASE POR *Paenibacillus illinoisensis* IMOBILIZADOS EM MATRIZ DE ALGINATO”. Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

As quitinases são enzimas que atuam no processo de hidrólise da quitina, um polissacarídeo presente nos exoesqueletos de insetos, carapaças de crustáceos, em algas e na parede celular de fungos. Tais enzimas podem ser aplicadas na preparação de quitosana e quitoligômeros para uso farmacêutico, no controle de fungos patogênicos e no tratamento de resíduos quitinosos derivados da pesca. A melhoria na produção de quitinase e de outras enzimas por microrganismos pode ser alcançada pela técnica da imobilização celular, que consiste na fixação ou confinamento de células em um suporte inerte. A imobilização celular confere proteção contra a força de cisalhamento, promove a fácil separação das células utilizadas do meio de cultura, bem como do produto e diminuição do custo de produção, uma vez que, possibilita o reuso do biocatalisador. Dentre os materiais utilizados como suporte em uma imobilização celular, os biopolímeros, tais como o alginato, têm recebido destaque por serem atóxicos, baratos e de grande disponibilidade na natureza. O presente trabalho teve como objetivo a imobilização de *Paenibacillus illinoisensis* em matriz polimérica de alginato para produção de quitinase, avaliando-se as diferenças na produção da enzima entre as células livres e imobilizadas. Para tal, uma solução aniônica de alginato contendo as células foi gotejada em uma solução catiônica de  $\text{CaCl}_2$ , levando a formação instantânea das esferas que apresentaram tamanho médio de 4 mm. A eficiência de imobilização foi de  $99,99\% \pm 0,01$ , sendo utilizados para produção de quitinase. A biomassa foi determinada durante a produção enzimática e os valores máximos foram de  $1,45 \times 10^8$  UFC/ mL em 96 horas para células imobilizadas e  $8,95 \times 10^7$  UFC/ mL em 48 horas para células livres, evidenciando o aumento da quantidade de células imobilizadas em relação as células livres em 62,01 %. A saída de células do suporte de imobilização durante o processo foi avaliada e correspondeu a 6,46 % do total de células ao final da fermentação. A atividade enzimática foi de 0,902 U em 96 horas para as células imobilizadas em comparação com a das células livres de 0,641 U em 48 horas, demonstrando um aumento da atividade em 40,71 %. As células imobilizadas também foram testadas para a reutilização em um sistema de bateladas sequenciais e demonstraram estabilidade para produção por 4 ciclos de 96 horas cada, perdendo 21,04 % da atividade inicial ao final do quarto ciclo. Desse modo, verificou-se que a metodologia de imobilização celular empregada resultou em esferas com capacidade de manutenção da viabilidade celular durante o bioprocessamento, aumento da atividade enzimática, baixa saída de células do suporte e capacidade de reuso, podendo futuramente ser empregada para produção de quitinase para suas diversas aplicações.

**Palavras-chave:** Quitina, imobilização celular, biopolímeros, gelificação iônica.

## ABSTRACT

Chitinases are enzymes that act in the hydrolysis of chitin, a polysaccharide present in insect exoskeletons, crustacean shells, algae and fungal cell walls. Such enzymes can be applied in the preparation of chitosan and chitoligomers for pharmaceutical use, in the control of pathogenic fungi and in the treatment of chitinous residues derived from fishing. Improvement in the production of chitinase and other enzymes by microorganisms can be achieved by the cell immobilization technique, which consists in fixing or confining cells in an inert carrier. The cell immobilization confers protection against the shear force, promotes the easy separation of the cells from the culture medium, as well as the product and decrease of the cost of production, since, it allows the reuse of the biocatalyst. Among the materials used as support in a cellular immobilization, biopolymers, such as alginate, have been highlighted as non-toxic, inexpensive and highly available in nature. The present work aims to immobilize *Paenibacillus illinoisensis* in a polymer matrix of alginate for chitinase production, evaluating the differences in the production of the enzyme between free and immobilized cells. Thus, an anionic alginate solution containing the cells was dripped into a cationic solution of  $\text{CaCl}_2$ , leading to the instant formation of spheres having an average size of 4 mm. The immobilization efficiency was  $99.99\% \pm 0.01$ . The biomass was determined during enzymatic production and the maximum values were  $1.45 \times 10^8$  CFU / mL in 96 hours for immobilized cells and  $8.95 \times 10^7$  CFU / mL in 48 hours for free cells, evidencing an increase of 62.01% in the amount of cells immobilized in comparison to the free cells. The cell leakage from the immobilization support during the process was evaluated and corresponded to 6.46% of the total cells at the end of the fermentation. The enzymatic activity was 0.902 U in 96 hours for the immobilized cells and 0.641 U in 48 hours for the free cells, demonstrating an activity increase of 40.71%. The immobilized cells were also tested for reuse in a sequential batch system and demonstrated stability in the production for 4 cycles of 96 hours each, losing 21.04% of the initial activity at the end of the fourth cycle. The cellular immobilization methodology resulted in spheres with capacity to maintain the cell viability during the bioprocess, increase of the enzymatic activity, low leakage of cells of the support and reuse capacity, being able to be used in the future for the production of chitinase for its various applications.

**Keywords:** Chitin, cell immobilization, biopolymers, ionic gelation.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	Quitina .....	1
1.2	Quitinases.....	3
1.2.1	Bactérias produtoras de quitinase .....	5
1.2.2	Aplicações das quitinases .....	6
1.3	Imobilização celular.....	7
1.3.1	Técnicas de Imobilização Celular.....	9
1.4	Imobilização celular por aprisionamento.....	12
1.5	Suportes de Imobilização .....	13
1.5.1	Alginato .....	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo geral .....	17
2.2	Objetivos específicos .....	17
3	METODOLOGIA .....	18
3.1	Microrganismo.....	18
3.2	Meios de cultura.....	18
3.2.1	<i>Meio de cultura para crescimento bacteriano e produção de quitinase .....</i>	<i>18</i>
3.2.2	<i>Meio de cultura para contagem de microrganismos em placas.....</i>	<i>18</i>
3.2.3	<i>Esterilização dos meios de cultura .....</i>	<i>18</i>
3.3	Quitina coloidal.....	19
3.4	Análise qualitativa da produção de quitinase.....	19
3.5	Imobilização em matriz de alginato.....	19
3.6	Eficiência da imobilização em matriz de alginato .....	20
3.7	Produção de quitinase por células livres e imobilizadas.....	21
3.8	Atividade enzimática da quitinase .....	21
3.9	Determinação de biomassa e saída de células do suporte durante a produção .....	23

3.10	Reuso das células imobilizadas em bateladas sequenciais.....	24
3.11	Preparação das amostras para visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	24
3.12	Análises estatísticas.....	25
4	RESULTADOS .....	26
4.1	Imobilização em matriz de alginato .....	26
4.2	Eficiência de imobilização em matriz de alginato .....	27
4.3	Atividade enzimática da quitinase .....	27
4.4	Determinação da biomassa e saída de células do suporte de imobilização durante a produção .....	28
4.5	Reuso das células imobilizadas em bateladas sequenciais .....	30
4.6	Visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura.....	31
5	DISCUSSÃO.....	33
6	CONCLUSÃO .....	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01. Estrutura química da quitina.....	2
FIGURA 02. Aloformas da quitina .....	2
FIGURA 03. Quitinases e mecanismo de ação .....	4
FIGURA 04. Principais técnicas de imobilização de células .....	10
FIGURA 05. Formas de matriz de suporte.....	12
FIGURA 06. Imobilização celular por aprisionamento.....	13
FIGURA 07. Estrutura do alginato.....	15
FIGURA 08. Formação do gel de alginato.....	16
FIGURA 09. Formação das esferas de alginato com células .....	20
FIGURA 10. Atividade enzimática da quitinase .....	22
FIGURA 11. Determinação da biomassa das células livres e imobilizadas .....	23
FIGURA 12. Confirmação da produção de quitinase pelo isolado <i>Paenibacillus illinoisensis</i>	26
FIGURA 13. Imobilização em matriz de alginato.....	27
FIGURA 14. Comparação entre a atividade enzimática de células imobilizadas e livres .....	28
FIGURA 15. Biomassa imobilizada e livre.....	29
FIGURA 16. Reuso de células imobilizadas para produção de quitinase.....	31
FIGURA 17. Micrografia de amostras de bactéria e esferas de alginato .....	32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01. Características ideais de um material de suporte .....	14
TABELA 02. Unidade Formadora de Colônias (UFC) das células imobilizadas e na solução de $\text{CaCl}_2$ .....	27
TABELA 03. Saída de células do suporte de imobilização .....	30

## LISTA DE SIGLAS

ADNS .....	Ácido Dinitrosalicílico
BHI .....	Brain Heart Infusion
C.I.....	Células Imobilizadas
CGTase .....	Ciclodextrina Glicosiltransferase
EDTA .....	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
GlcNAc .....	N-acetil-D-glicosamina
MEV .....	Microscopia Eletrônica de Varredura
PBS .....	Tampão Fosfato Salino
PCA .....	Plate Count Agar
S.P.....	Saída de Células do Suporte
UFC .....	Unidades Formadoras de Colônias

# 1 INTRODUÇÃO

A produção de enzimas é um ramo da economia que movimenta valores em números expressivos. A estimativa é que até 2020 o mercado de enzimas tenha um faturamento de US\$ 5,4 bilhões de dólares (ALLIED MARKET RESEARCH, 2016). Embora seja uma área lucrativa, problemas são observados na produção de enzimas, principalmente quando os catalisadores (células) são utilizados de forma livre. Destacam-se baixa estabilidade, menor produtividade, inativação de biocatalisadores caros e dificuldades de purificação do produto final. Diante disto, é gerado um gasto econômico mais elevado, tornando o processo, de um modo geral, mais dispendioso (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

Uma das alternativas para atenuar tais dificuldades é pela imobilização das células para otimizar a performance operacional de bioprocessos industriais (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). O processo de imobilização vem sendo empregado há bastante tempo, visto que muitas são as vantagens apresentadas, como: proteção celular, aumento da concentração de células, fácil separação do produto do meio de cultura, diminuição do custo de produção pelo fato de poder reutilizar tanto as células como a matriz e melhoria da estabilidade celular contra variações drásticas de temperatura e pH.

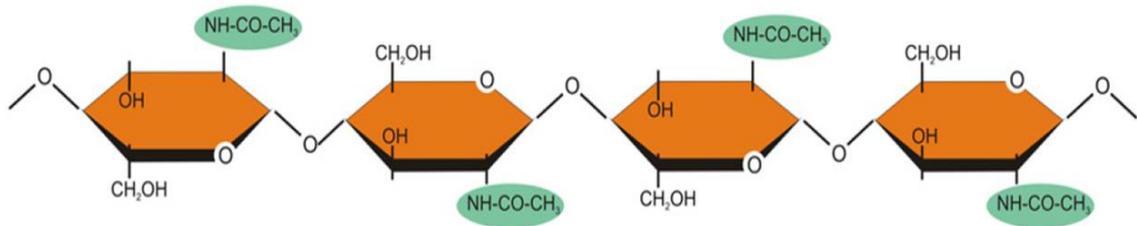
Tanto células animais, vegetais e microrganismos podem ser imobilizados por diferentes técnicas e materiais de suporte (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). Dentre os diversos materiais, destaca-se o biopolímero alginato (PILKINGTON et al., 1998; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006) que pode ser aplicado para imobilização de microrganismos para a produção de enzimas, à exemplo das bactérias produtoras de quitinase, que se utilizam da quitina, um substrato de extrema abundância na natureza (VASSILEV et al., 2008).

## 1.1 Quitina

A quitina é um biopolímero de alta disponibilidade e é depois da celulose o segundo mais abundante na natureza. Está presente como microfibrilas cristalinas que formam componentes estruturais nos exoesqueletos de insetos, carapaças de crustáceos, em algas e na parede celular de fungos (VELÁSQUEZ, 2006; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

Em relação à estrutura química, a quitina é um polissacarídeo de cadeia linear, formado por monômeros de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) unidos por ligação do tipo glicosídica  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), possuindo assim uma extremidade redutora com OH livre do carbono 1 e uma

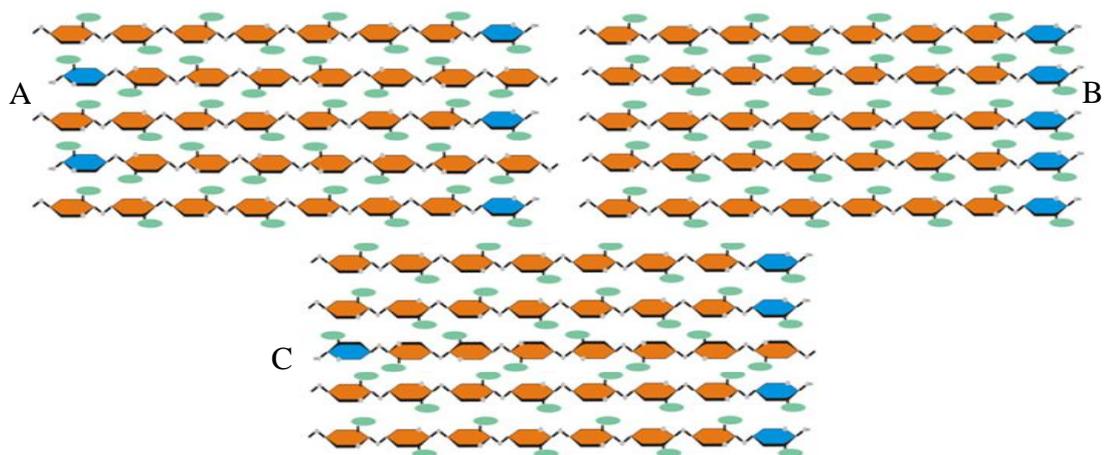
extremidade não redutora correspondente ao carbono 4 (VELÁSQUEZ, 2006; CAMPANA-FILHO et al., 2007), como mostra a Figura 01.



**FIGURA 01. Estrutura química da quitina.** Estrutura química da quitina formada por monômeros de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) em cadeia linear. Fonte: Adaptado de (SEIDL, 2008).

As cadeias poliméricas da quitina são organizadas em folhas ou lamelas e podem se agrupar de forma paralela e/ ou antiparalela em relação umas às outras. Devido a variação do arranjo adquirido e também da finalidade da quitina no organismo, há diferentes estruturas polimórficas que são conhecidas como  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -quitina (WAN; TAI, 2013; KAYA et al., 2017).

A  $\alpha$ - quitina (Figura 02 A) é a conformação mais abundante, sendo encontrada em estruturas rígidas, como exoesqueleto de crustáceos, estando associada a proteínas (BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008; KUMIRSKA et al., 2010). Suas cadeias poliméricas estão dispostas de forma antiparalela, resultando em uma estrutura densa, por meio de numerosas ligações de hidrogênio intra e intermolecular na mesma lamela ou com lamelas adjacentes (CAMPANA-FILHO et al., 2007).



**FIGURA 02. Aloformas da quitina.** A:  $\alpha$ -quitina, composta por cadeias poliméricas de N-acetilglicosamina dispostas de forma antiparalela. B:  $\beta$ -quitina, composta por cadeias poliméricas de N-acetilglicosamina dispostas paralelamente. C:  $\gamma$ -quitina, composta por cadeias poliméricas de N-acetilglicosamina paralelas, intercaladas por uma cadeia antiparalela. Fonte: Adaptado de (SEIDL, 2008).

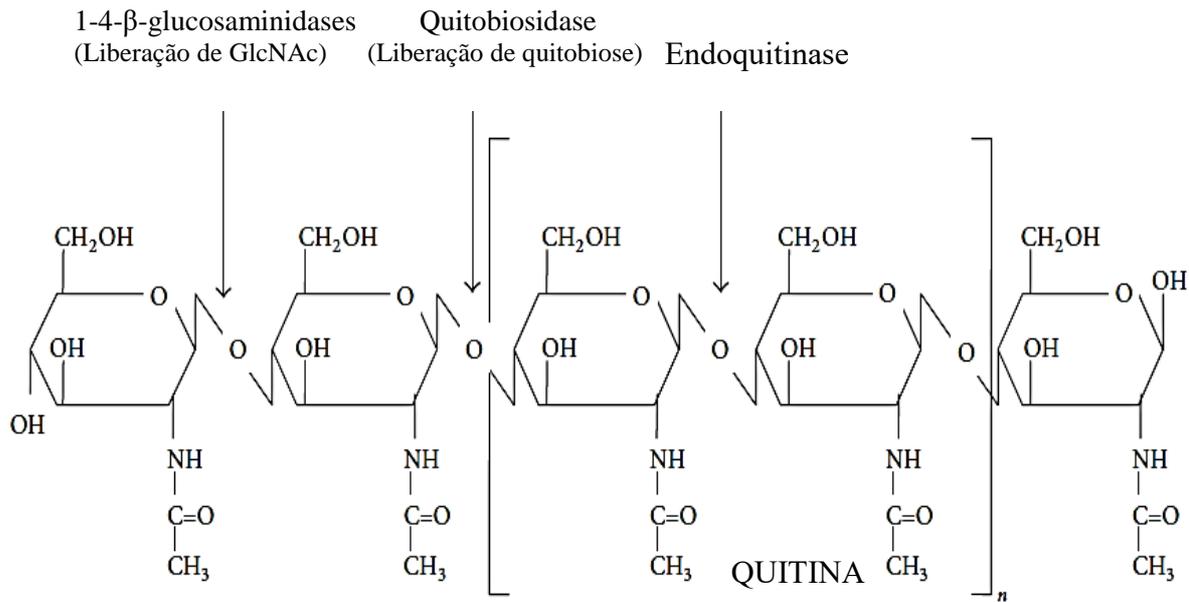
A  $\beta$ -quitina (Figura 02 B) é encontrada em estruturas flexíveis e se apresenta de forma menos densa devido as suas cadeias poliméricas estarem organizadas de forma paralela, dificultando ligações de hidrogênio de modo intermolecular assim como entre as lamelas (CAMPANA-FILHO et al., 2007; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008), tornando-se, portanto, uma estrutura mais favorável à ação enzimática e reações químicas (FAN; SAITO; ISOGAI, 2008). Esta estrutura também possui a capacidade de incorporar pequenas moléculas, dentre elas a molécula de água, tornando-se uma estrutura mais solúvel (WAN; TAI, 2013).

Por sua vez, a  $\gamma$ -quitina apresenta uma combinação dos arranjos da  $\alpha$  e  $\beta$ -quitina, sendo que as cadeias de duas lamelas paralelas estão separadas por uma lamela com sentido antiparalelo, como pode ser observado na Figura 02 C (CAMPANA-FILHO et al., 2007). Esta conformação é a que ocorre em cogumelos (ELIEH-ALI-KOMI; HAMBLIN, 2017).

A obtenção da quitina no âmbito industrial pode ser realizada por meio da extração química a partir da elevada quantidade de resíduos oriundos da produção de alimentos marinhos, como carapaça de crustáceos, camarões e caranguejos (FARAG et al., 2014). Essas carapaças contém por volta de 15-20 % de quitina, 25-40 % de proteínas e 40-55 % de carbonato de cálcio, além de lipídeos e pigmentos (MATHUR; NARANG, 1990). A extração de forma geral, envolve três etapas: desmineralização, desproteínação e despigmentação (BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008). Já a obtenção dos derivados à partir da quitina, como a quitosana, que é de grande interesse econômico pode ser realizada por enzimas denominadas quitinases.

## 1.2 Quitinases

As quitinases são glicosil hidrolases de massa molecular na faixa de 20-90 kDa e atuam no processo de hidrólise da quitina (HAMID et al., 2013). Baseado no modo de ação, podem ser classificadas em dois grupos: endoquitinases e exoquitinases (Figura 03). As endoquitinases atuam na quebra interna de forma aleatória da quitina e leva a formação de multímeros solúveis de baixa massa molecular de GlcNAc tais como a quitotriose, quitotetraose e o dímero diacetilquitobiose. As exoquitinases são classificadas em duas subcategorias: quitobiosidases, que atuam na clivagem da quitina em sua extremidade não redutora e gera a liberação de diacetilquitobiose e a 1-4- $\beta$ -glucosaminidases que clivam os produtos gerados pela ação das endoquitinases e quitobiosidases, levando a formação de monômeros de GlcNAc (HAMID et al., 2013; RATHORE; GUPTA, 2015).



**FIGURA 03. Quitinases e mecanismo de ação.** 1-4- $\beta$ -glucosaminidases cliva unidade monomérica de GlcNAc a partir de o terminal não redutor. Quitobiosidase cliva unidade dimérica de GlcNAc a partir de terminais não redutores. Endoquitinase cliva aleatoriamente a quitina em locais internos formando quitotriose, quitotetraose e o dímero diacetilquitobiose. Fonte Adaptado de: (RATHORE; GUPTA, 2015).

A hidrólise completa da quitina é realizada por um sistema quitinolítico que age de forma sinérgica e consecutiva (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). O processo tem início com a secreção de endoquitinases denominadas por quitina depolimerases, que agem no polímero levando a liberação de GlcNAc, quitobiose e quitoligossacarídeos. Em seguida, há a entrada desses compostos no periplasma celular e sofrem degradação a GlcNAc por parte de quitodextrinases e N-acetil-glucosaminidases. Os produtos gerados pela degradação da quitina, GlcNAc e quitobiose, podem ser utilizados pela célula para a biogênese da parede celular, após modificações ou metabolização (HOWARD et al., 2003).

Baseado na similaridade de sequências, as glicosil hidrolases são classificadas em 130 famílias (ITOH et al., 2013). As quitinases foram agrupadas nas famílias 18, 19 e 20, pelo trabalho realizado por Henrissat no ano de 1991, por meio da análise de homologia entre os aminoácidos presentes em suas sequências. Nas famílias 18 e 19, encontram-se as endoquitinases de plantas, fungos, insetos, bactérias e vírus. Embora, a família 19 possua quitinases de diferentes organismos, nesta há o predomínio de quitinases de plantas. Já na família 20, encontram-se as N-acetil-glucosaminidases de *Vibrio harveyi* e N-acetil-hexosaminidases de humanos e de *Dictyostelium discoideum* (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000).

Em fungos, as quitinases agem na manutenção estrutural para o remodelamento da parede celular desempenhado pelo balanço entre a lise e síntese de quitina, germinação e diferenciação de esporos, na autólise das hifas, em funções nutricionais para degradação de quitina exógena, no ataque a outros fungos (micoparasitismo) e insetos (fungos entomopatogênicos) e na divisão celular em leveduras (BHATTACHARYA; NAGPURE; GUPTA, 2007).

Em muitos insetos e crustáceos, as quitinases possuem ação na morfogênese, hidrolisando a quitina da cutícula durante a ecdise ou troca do exoesqueleto (STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015). Nesses organismos a expressão dos genes de quitinases deve ser rigorosamente controlada, uma vez que, havendo exposição prematura poderia ocasionar inibição do crescimento ou mesmo a morte (ADRANGI; FARAMARZI, 2013).

Em plantas, as quitinases exercem papel na defesa contra patógenos que possuem quitina em sua estrutura (BHATTACHARYA; NAGPURE; GUPTA, 2007). Em um processo de infecção, as quitinases são liberadas e bloqueiam o crescimento de hifas que invadem e alteram a integridade celular, também podem agir no crescimento e desenvolvimento da planta. As quitinases atuam ainda na degradação de quitoligossacarídeos da parede celular da semente durante a germinação e desta forma permite o crescimento radicular, além de também garantir a proteção dos tecidos da semente contra patógenos. Os genes de quitinase também são expressos em condições de estresse para a planta, como frio e seca (GROVER, 2012).

Em mamíferos, apesar de não haver a produção de quitina, há genes que codificam para quitinases que podem degradar o polissacarídeo, seja ele advindo da ingestão ou inalação, tais como conídios de fungos. Desta maneira, podem atuar em defesa com o sistema imune ou mesmo digerindo organismos que contem quitina, principalmente em mamíferos que ingerem insetos ou fungos como parte de sua dieta (DI ROSA et al., 2015).

Em bactérias as quitinases podem agir para diferentes finalidades, dentre elas a nutrição, para processamento e digestão de substratos que possuem GlcNAc. Também são produzidas como parte de um sistema alelopático, cuja finalidade é a inibição do crescimento de organismos competidores tais como fungos (ADRANGI; FARAMARZI, 2013).

### **1.2.1 Bactérias produtoras de quitinase**

As quitinases podem ser produzidas por diferentes espécies de bactérias, estas que são encontradas principalmente por técnicas de bioprospecção. Já foi relatada a produção por *Stenotrophomonas sp.* (CFR221 M), *Vibrio sp.* (CFR173 M), *Phyllobacteriaceae sp.* (CFR16 M), e *Bacillus sp.* (CFR188 M) em estudo realizado por Suresh, (2012). Também em

*Paenibacillus pasadenensis* CS0611 (GUO et al., 2017) e *Paenicibacillus barengoltzii* (FU et al., 2016), em *Aeromonas hydrophila* HS4 e *Aeromonas punctata* HS6 (SAIMA et al., 2013) e ainda em *Streptomyces sp* (SOWMYA et al., 2012) e *Serratia marcescens* JPP1 (WANG; YAN; CAO, 2014). Também são encontrados estudos em relação a expressão heteróloga de genes de quitinases bacterianas, como o de Yang et al., (2016) em que expressaram o gene (PbChi70) de uma quitinase de *Paenibacillus barengoltzii* e Danişmazoğlu et al., (2015) para expressão dos genes de quitinases (chiA, chiB, chiC) de *Serratia marcescens*, ambos em *Escherichia coli*, visando o aumento da produção enzimática.

### 1.2.2 Aplicações das quitinases

As quitinases possuem uma vasta gama de aplicações biotecnológicas, variando desde tratamentos de resíduos quitinosos, aplicações médicas para a obtenção de quitoligossacarídeos, para a produção de protoplastos para fins de estudos e até mesmo para o biocontrole de pragas na agricultura (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000; RATHORE; GUPTA, 2015; STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015). Estas aplicações serão detalhadas a seguir.

A aplicação das quitinases para o tratamento de resíduos quitinosos derivados da pesca, foi demonstrada por Kumar et al., (2018), em que observaram a completa degradação de resíduos de camarão por quitinases de *Paenibacillus sp.* e a geração de oligossacarídeos de quitina, um produto de alto valor agregado para a indústria farmacêutica. O mesmo foi observado por Suresh (2012), que mostrou a capacidade de bactérias marinhas em adsorver resíduos de camarão e degradar microfibras de quitina, evidenciando assim o potencial das quitinases na biorremediação.

Em relação ao uso para produção de quitooligossacarídeos para uso farmacêutico, Woo e Park (2003) reportaram a utilização de quitinase purificada de *Bacillus sp.*, cepa WY22, já descrita em trabalhos anteriores, para a produção de quitotriose à partir de quitina coloidal e sugerem que essa enzima possui elevado potencial para a produção específica desse quitooligossacarídeo, o qual possui atividade antioxidante.

A preparação de protoplastos para utilização em transformação genética já foi demonstrada por Halder et al., (2014), em que utilizou-se de quitinase de *Aeromonas hydrophila* SBK1 para hidrólise da parede celular do fungo *Aspergillus niger* e também por Fleuri e Kawaguti (2009) em que uma quitinase de *Cellulosimicrobium cellulans* apresentou potencial para aplicação de formação de protoplasto principalmente em *Penicillium sp.* e *Rhizopus oligosporus*.

Para controle de fungos patogênicos, Senol et al., (2014), mostraram que as quitinases purificadas da bactéria *Bacillus subtilis* apresentaram atividade antifúngica eficaz contra o fungo fitopatogênico *Fusarium culmorum*. Okay, Özdal e Kurbanoglu (2013) também evidenciaram a atividade antifúngica contra *Alternaria citri*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryza* a partir da produção de quitinase por meio da técnica de imobilização celular com *Serratia marcescens* MO-1 em alginato de cálcio.

### 1.3 Imobilização celular

A imobilização celular é designada pela fixação ou confinamento de células viáveis em um suporte inerte constituído de materiais sintéticos ou naturais (ZUR; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016). A finalidade da imobilização é limitar a migração das células para o ambiente circundante e ao mesmo tempo, reproduzir as condições em que os microrganismos já crescem na natureza, aderidos ou mesmo dentro de um suporte, uma vez que, muitos possuem a habilidade de formar comunidades microbianas aderidas a superfícies, os chamados biofilmes (KOURKOUTAS et al., 2004; ABDELMAJEED; HJELIL; DANIAL, 2012).

O campo da imobilização de células vem sendo estudado desde os anos de 1970 e surgiu como uma técnica alternativa à imobilização de enzimas, uma vez que, as células utilizadas não precisam passar pelos mesmos processos dispendiosos como a maioria das enzimas antes de serem imobilizadas, tais como extração e purificação (MARTINS et al., 2013). Vale ressaltar ainda, a possibilidade de utilização da própria maquinaria celular para catálise de reações dependentes de diversas enzimas e a capacidade de regeneração de co-fatores e de sua biossíntese contínua dentro da célula, o que contribuem para prolongar a atividade enzimática durante o bioprocessamento (CANILHA; CARVALHO, 2006).

Dentre as inúmeras vantagens da imobilização celular destacam-se: a proteção das células pela matriz de suporte contra a força de cisalhamento, substratos inibitórios ou tóxicos, variações de temperatura, pH e concentração de nutrientes. Desta forma, é assegurado que tenha uma elevada quantidade de células viáveis no suporte e assim promova o aumento na produção do metabólito de interesse (WANG et al., 2005; CANILHA; CARVALHO, 2006; COVIZZI et al., 2007; EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

A imobilização celular garantiu proteção às células como mostra o estudo realizado por Man e Quyen (2016), em que imobilizaram *Kluyveromyces marxianus* em bainha de folha de nipa, uma palmeira típica asiática, e testaram a tolerância das leveduras à altas concentrações

de ácido acético durante a produção de etanol. Foi constatado que o sistema imobilizado apresentou maior densidade celular total por volume de meio e também resistência às mudanças ambientais devido à proteção gerada pelo suporte. Já o aumento na produção do metabólito de interesse foi comprovado por Maity et al., (2011), em que imobilizaram *Bacillus thuringiensis*, em alginato de cálcio e conseguiram o aumento de aproximadamente três vezes na produção de  $\alpha$ -amilase em relação à produção com as mesmas células livres.

Outra vantagem que pode ser citada é: a fácil separação das células do meio de cultura, possibilitando tanto o seu reuso como o da matriz em outro ciclo de produção, em regime de bateladas repetidas (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). O reuso das células imobilizadas foi testado por Duarte et al., (2013), em que imobilizaram *Saccharomyces cerevisiae* em esferas de alginato de cálcio recobertas ou não com quitosana e conseguiram reutilizar as mesmas esferas por oito ciclos sequenciais de produção, de 10 horas cada, com concentrações estáveis de etanol. Uma outra importante vantagem observada, foi não ter sido necessário o uso de antibióticos e desta forma os autores sugerem que a imobilização pode ter evitado a contaminação.

No entanto, a imobilização pode apresentar por outro lado, algumas desvantagens, tais como: limitações quanto a transferência de oxigênio e massa entre o meio de cultura e as células, o que pode acarretar em alterações tanto na cinética quanto na fisiologia celular, destruição do material utilizado como suporte devido ao crescimento celular e uso indicado somente para células em que o produto de interesse deve ser extracelular. Todavia, mesmo com tais desvantagens ainda é considerada como tendo potencial para utilização na indústria. Entretanto, estudos adicionais que visam a resolução destes problemas devem ser realizados para garantir a eficácia desta ferramenta em suas diversas aplicações (WANG et al., 2005).

Inúmeras pesquisas tem se beneficiado das vantagens da imobilização celular, onde diferentes tipos de suportes e de microrganismos têm sido empregados para a aplicação nos bioprocessos. Como exemplo, se tem a produção de ácidos orgânicos divulgado em estudo realizado por Iqbal e Saeed (2005), em que utilizaram pela primeira vez a fibra de mamão como matriz de aprisionamento do fungo *Aspergillus terreus* resultando em um aumento de 23,5% em relação às células livres para a produção de ácido itacônico.

A imobilização também é bastante utilizada em estudos para produção de vinhos. Kourkoutas et al., (2003), utilizaram leveduras *Kluyveromyces marxianus* IMB3 imobilizadas em suporte de celulose, maçã e marmelo e demonstraram que o biocatalisador pode ser estocado e reativado por um período de no mínimo 30 dias sem afetar de forma negativa a atividade na fermentação e produção de compostos voláteis. Já Genisheva et al., (2012), imobilizaram *S.*

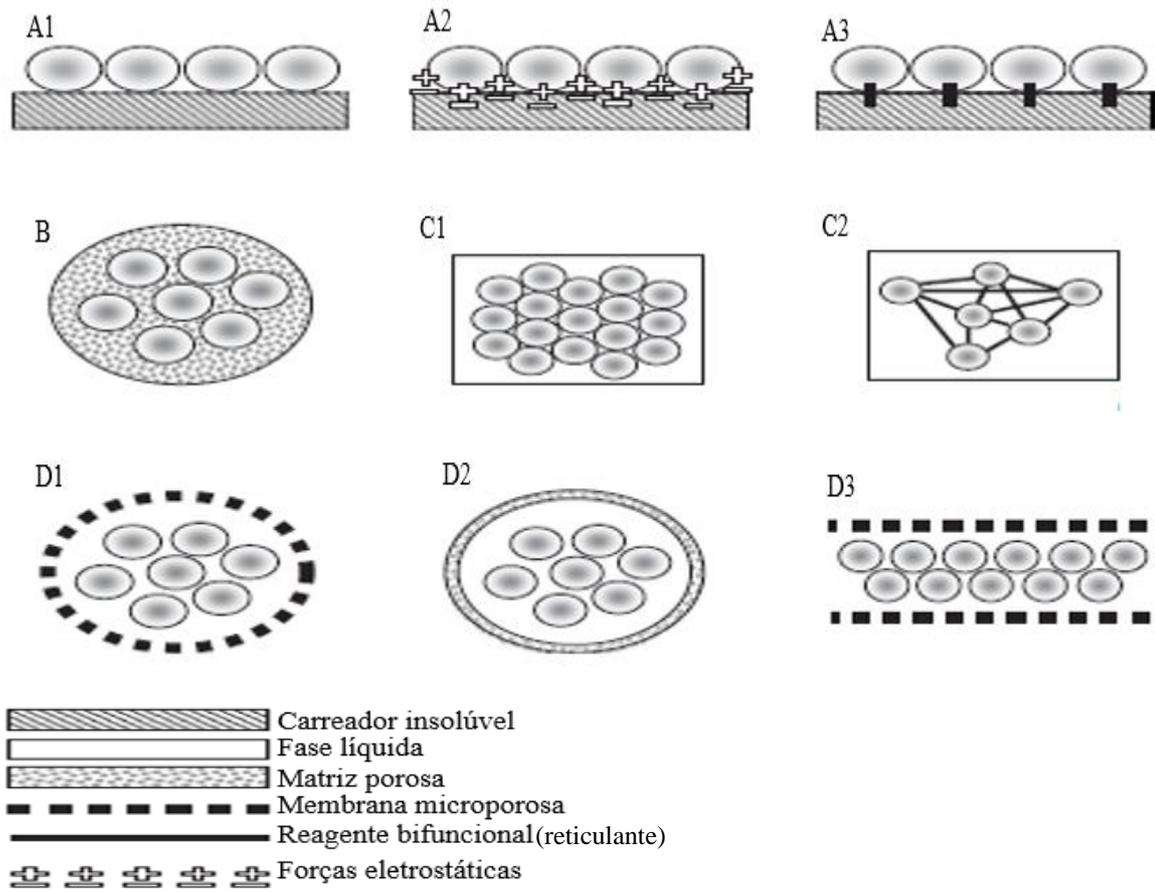
*cerevisiae* em bagaço de uva para produção de vinho branco e constataram que o processo fermentativo foi mais rápido e eficiente e o vinho produzido possuía melhores propriedades sensoriais relacionadas às maiores quantidades de álcool e compostos voláteis.

Outro exemplo de aplicação da imobilização celular é o seu uso nos processos de biorremediação. Angelim et al., (2013) imobilizaram um conjunto bacteriano (*Xanthomonadaceae* PETBA 01, *Martelella sp.* PETBA 03, *Cytophaga sp.* PETBA 04, *Sphingopyxis sp.* PETBA 06, *Bhargavaea sp.* PETBA 08, *Mesorhizobium sp.* PETBA 09, *Mesorhizobium sp.* PETBA 10, *Gordonia sp.* PETBA 11, *Mesorhizobium sp.* PETBA 13, *Pseudomonas sp.* PETBA 14, *Gordonia sp.* PETBA 15, *Gordonia sp.* PETBA 16, *Gordonia sp.* PETBA 19) em esferas de quitosana para biorremediar sedimentos de manguezais contaminados por petróleo. Barreto et al., (2010), imobilizaram também em quitosana *B. subtilis* para degradação de n-hexadecano e recuperação de biosurfactantes. O processo se mostrou eficiente com quase 100% de degradação do n-hexadecano que estava presente no meio de cultivo.

A imobilização celular pode ser utilizada ainda, na agricultura para imobilização de microrganismos auxiliares no crescimento de plantas (BASHAN et al., 2016), para tratamento de efluentes (MARTINS et al., 2013), para produção de iogurtes, ácido acético, ácido propiônico e cervejas (GROBOILLOT et al., 1994), para probióticos (BURGAIN et al., 2011) e também para produção de enzimas de interesse industrial (ZHANG et al., 2013).

### **1.3.1 Técnicas de Imobilização Celular**

Diferentes técnicas são empregadas para a imobilização celular, dentre elas a fixação em suporte sólido, auto agregação ou floculação que pode ser natural ou induzida, a contenção ou encapsulamento de células em barreiras e aprisionamento em matrizes porosas, como mostra a Figura 04 (CANILHA; CARVALHO, 2006).



**FIGURA 04. Principais técnicas de imobilização de células.** A1: Adsorção na superfície, A2: Ligação eletrostática, A3: Ligação covalente, B: Aprisionamento em matriz porosa, C1: Flocculação natural, C2: Flocculação artificial, D1: microencapsulamento, D2: Microencapsulamento interfacial, D3: Contenção entre membrana porosa. Fonte: (KOURKOTAS et al., 2004).

Independente do processo ou matriz utilizada para imobilização celular, alguns requisitos são geralmente desejáveis, tais como: capacidade de imobilização de grandes concentrações celulares, fácil acesso aos nutrientes do meio, procedimento de imobilização simples, material de suporte não tóxico, procedimento economicamente viável e facilidade na separação do produto de interesse do meio de cultivo (WILLAERT, 2011). As principais técnicas de imobilização serão descritas a seguir.

#### *Fixação/ Adsorção*

A técnica de imobilização por fixação em suporte sólido consiste na adsorção física ou ligação das células à superfície do material de suporte escolhido de forma natural ou por meio de forças eletrostáticas ou ligações covalentes com a utilização de agentes ligantes, levando a formação de um biofilme (CANILHA; CARVALHO, 2006; GENISHEVA; TEIXEIRA;

OLIVEIRA, 2014). É uma técnica considerada fácil e por isso, é bastante empregada na indústria, principalmente para fabricação de vinhos. No entanto, a espessura do biofilme formado bem como a força com que as células se ligam ao suporte são muito variáveis podendo as mesmas se desligarem do suporte com facilidade principalmente por não haver uma barreira entre as células e o meio circundante. O desligamento é muito influenciado pelo pH, composição iônica do meio, idade das células e composição da parede celular (KOURKOUTAS et al., 2004; GENISHEVA; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2014).

### *Floculação*

A floculação é uma técnica em que promove a formação de grandes agregados de células que se sedimentam e não há necessidade de utilização de material de suporte. Esses agregados podem se formar naturalmente ou serem induzidos (COVIZZI et al., 2007). Nem todas as células possuem a capacidade de flocularem de forma natural através das ligações entre si e quando isso ocorre os agregados formados geralmente são menos estáveis e sensíveis às tensões de cisalhamento. Visto isso, há a possibilidade da utilização de agentes floculantes artificiais, para a formação de ligações cruzadas entre o biocatalisador propiciando a formação de agregados mais estáveis por meio de interações eletrostáticas (CANILHA; CARVALHO, 2006). É uma metodologia simples e de baixo custo, dependente principalmente de determinados fatores como pH, nutrientes, oxigênio dissolvido, composição do meio e condições da fermentação como temperatura e velocidade de agitação e também a idade das células (GENISHEVA; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2014).

### *Encapsulamento*

A técnica de encapsulamento ou contenção por barreiras consiste no envolvimento das células com uma fina membrana semipermeável, onde as células permanecem livres, ou seja, não estão fixadas ao suporte (CAO, 2005). Uma barreira também pode ser formada e utilizada para imobilizar as células através da interface líquido-líquido entre dois fluídos imiscíveis (GENISHEVA; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2014). Como vantagem dessa metodologia é a capacidade de conter um número alto de células, por isso o material de suporte deve permitir o livre acesso de nutrientes e a saída do produto de interesse (CANILHA; CARVALHO, 2006).

No entanto, são relatados problemas de transferência de massa e rompimento da membrana devido ao crescimento celular (GENISHEVA; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2014).

O método de aprisionamento é realizado com a utilização de uma matriz porosa. Esta técnica vem sendo frequentemente estudada e será descrita em detalhes a seguir.

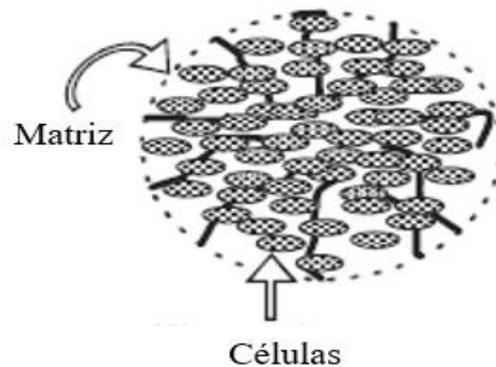
#### 1.4 Imobilização celular por aprisionamento

A técnica de imobilização por aprisionamento, consiste no confinamento em uma matriz porosa, que é formada geralmente durante as etapas da imobilização pela mistura de uma solução polimérica contendo as células em uma solução com agente reticulante, pelo processo de gelificação iônica (CAO, 2005). Esta metodologia é caracterizada pela facilidade de execução, onde ocorre a formação de ligações cruzadas entre o polímero propiciando a produção de hidrogéis (AMINABHAVI et al., 2004). A matriz pode ser obtida em diferentes formatos tais como esferas, fibras, filmes e espumas, como pode ser observado na Figura 05 (CAO, 2005).



**FIGURA 05. Formas de matriz de suporte.** A: esferas, B: fibras, C: membranas, D: espumas. Fonte: (CAO 2005).

A matriz de suporte formada durante a gelificação iônica (Figura 06) atua como uma barreira protetora em torno das células, garantindo a viabilidade por um período prolongado durante o bioprocessamento (MARTINS et al., 2013). Além disso, pelo fato da matriz apresentar poros, estes permitem a troca de gases e nutrientes entre as células e o meio de cultivo, tendo então papel fundamental no crescimento celular, além de que por serem menores que as células, impedem a saída das mesmas do interior do suporte e ainda possibilitam a liberação do produto metabólico de interesse (KOURKOUTAS et al., 2004).



**FIGURA 06. Imobilização celular por aprisionamento.** Formação de uma matriz porosa que aprisionam as células. Fonte Adaptado de: (COVIZZI et al.,2007).

Embora a técnica de aprisionamento permita uma alta resistência mecânica, algumas desvantagens podem ser observadas, tais como: destruição da matriz de suporte devido ao crescimento celular, levando a consequente saída das células para o meio de cultivo, limitação de difusão de nutrientes e gases, esta que é dependente do tamanho dos poros da matriz e a baixa capacidade de carga celular em comparação com as outras técnicas de imobilização (COVIZZI et al., 2007; MARTINS et al., 2013).

O aprisionamento é o método mais estudado na imobilização celular, principalmente pela facilidade de execução e pela possibilidade de utilização de polímeros hidrofílicos biocompatíveis (COVIZZI et al., 2007; MARTINS et al., 2013). Estes polímeros ainda podem ser manipulados para mudanças de suas propriedades em relação à permeabilidade, estabilidade química e mecânica, fazendo-os ainda mais vantajosos para a utilização como suportes de imobilização para as células (ANNA et al., 1996).

## 1.5 Suportes de Imobilização

Os suportes utilizados em técnicas de imobilização são os mais diversos, desde géis poliméricos fabricados de alginato, quitosana, colágeno e carragena e até mesmo suportes sólidos como o vidro e alumina. Dentre esses materiais, é necessário a escolha de acordo com a técnica que será empregada para imobilização, bem como a célula que será imobilizada. Deve-se também levar em consideração as seguintes características para o material de suporte: baixo custo, alta disponibilidade, fácil manuseio e atoxicidade (CANILHA; CARVALHO, 2006). A tabela 01, destaca as principais características que devem ser analisadas em um material para suporte.

**TABELA 01. Características ideais de um material de suporte.**

<b>Características de um material de suporte ideal</b>
1. Ter grande área superficial com espaço intersticial para o crescimento celular
2. Ser facilmente regenerável e passível de reuso
3. Proporcionar a viabilidade celular e atividade catalítica por longo período de tempo
4. Apresentar porosidade uniforme para permitir trocas gasosas e entrada de substrato
5. Ter boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica
6. Não ser degradável facilmente por enzimas ou solventes envolvidos no processo
7. Ser estável a mudanças drásticas de pressão, temperatura e pH do meio
8. Proporcionar imobilização fácil, acessível e viável para uso em escala industrial

Fonte: adaptado de Covizzi et al., 2007.

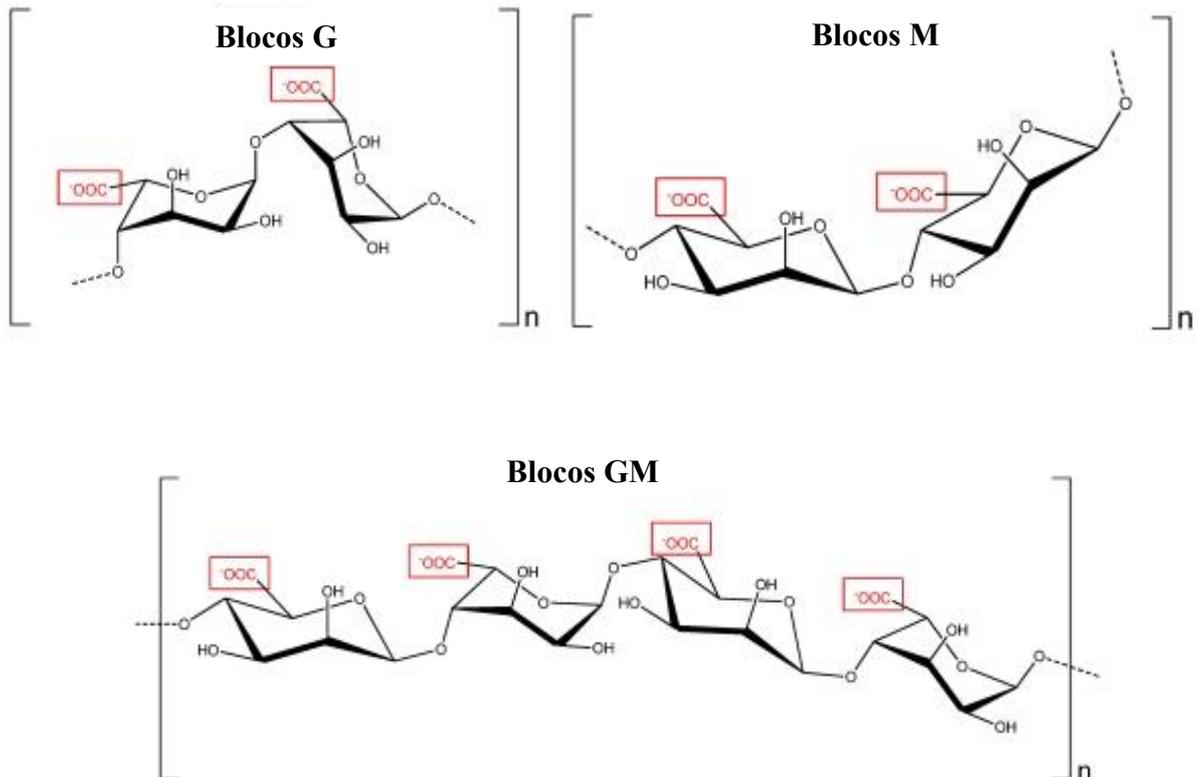
Muitos estudos vem sendo desenvolvidos aplicando-se diferentes biopolímeros como materiais de suporte, principalmente objetivando a busca pelo caráter atóxico e a habilidade de formação de géis e matrizes porosas que garantam a integridade celular durante e após a imobilização (GROBOILLOT et al., 1994). Dentre os biopolímeros mais utilizados para o aprisionamento de células, destaca-se o alginato devido às condições brandas e simples do procedimento da formação da matriz (MARTINS et al., 2013).

### **1.5.1 Alginato**

O alginato é um copolímero natural linear constituído de monômeros de ácidos  $\alpha$ -L-gulurônicos (G) e  $\beta$ -D-manurônicos (M) com ligações glicosídicas 1-4 e apresenta caráter polianiônico devido a presença de grupos carboxila ao longo de sua cadeia. É o polissacarídeo mais abundante das algas marinhas marrons fazendo parte da constituição da sua parede celular, cuja função é promover a rigidez, flexibilidade, elasticidade e retenção de água (AVEDAÑO-ROMERO; LÓPEZ- MALO; PALOU, 2013).

Os monômeros G e M são distribuídos de tal maneira que formam blocos de homopolímeros que são os blocos do tipo G (-GGG-) e blocos do tipo M (-MMM-) ou podem

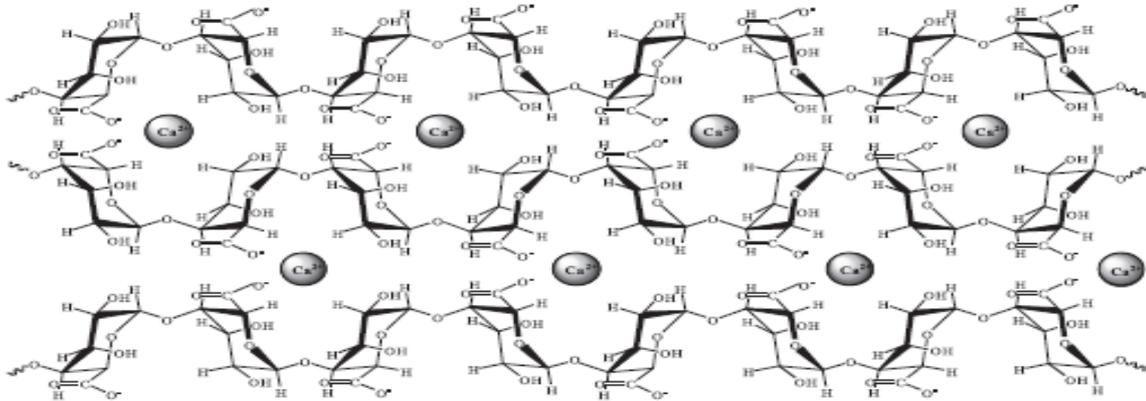
se organizar em heteropolímeros contendo tanto blocos G quanto M de forma alternada, sendo denominados de blocos alternativos (-MGMG-). Quando há maior quantidade de blocos G, o gel formado apresenta alta porosidade, rigidez e fragilidade, enquanto que a maior quantidade de blocos M o gel é elástico, suave e com presença de poros menores (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012). A Figura 07 representa a estrutura do alginato bem como seus monômeros.



**FIGURA 07. Estrutura do alginato.** Unidades de ácidos  $\alpha$ -L-gulurônicos (Bloco G), unidades de ácidos  $\beta$ -D-manurônicos (Blocos M) e unidades alternadas de  $\alpha$ -L-gulurônicos e ácidos  $\beta$ -D-manurônicos (Blocos GM) em alginato de algas marron. Fonte: (VERA et al., 2011).

Os géis de alginato são formados por meio da mistura de uma solução do polímero com as células, seguido de gotejamento em uma solução com íons bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$ ). Os íons bivalentes, à exemplo do mais utilizado,  $\text{Ca}^{2+}$ , são responsáveis pela formação de ligações cruzadas com o alginato, pois os mesmos se alojam em cavidades internas do polímero que são formadas quando há o alinhamento de duas cadeias de blocos G. Este alojamento resulta em uma rede tridimensional de fibras de alginato unidas entre si por ligações iônicas, aumentando sua viscosidade até a formação de um gel consistente e insolúvel. Esse modelo de gelificação do alginato é conhecido como “caixa de ovos”, como pode ser observado no esquema da Figura

08 (GEORGE; ABRAHAM, 2006; KAWAGUTI; SATO, 2008; AVEDAÑO-ROMERO; LÓPEZ- MALO, PALOU, 2013).



**FIGURA 08. Formação do gel de alginato.** Formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio. Fonte: (KAWAGUTI, 2008).

O alginato é utilizado em diversos estudos principalmente pelo fato da formação do gel ocorrer de forma rápida e sem a necessidade de alterações drásticas quanto à temperatura e pH, garantindo a manutenção da viabilidade das células. Outras características que se fazem importantes para sua utilização é a atoxicidade, baixo custo e boa disponibilidade no mercado (CANILHA; CARVALHO, 2006; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009; PAQUES et al., 2014).

Sendo assim, este trabalho propõe o emprego da imobilização de bactérias produtoras de quitinase por meio da técnica de aprisionamento em matriz de alginato, visando o aumento da produção da enzima quitinolítica em comparação com as células livres. A metodologia aqui empregada, em caso de resultados positivos, poderá ainda ser aprimorada para a uma futura utilização em processos industriais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Produzir quitinase por meio da imobilização de *Paenibacillus illinoisensis* em matriz polimérica de alginato.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Padronizar a metodologia de aprisionamento em matriz polimérica de alginato.
- Avaliar o tamanho das esferas.
- Mensurar a eficiência de imobilização.
- Comparar a atividade da quitinase produzida por bactérias livres e imobilizadas em alginato.
- Avaliar o crescimento e saída de células do suporte de imobilização durante a produção.
- Avaliar o reuso das células imobilizadas.
- Determinar por imagens de microscopia eletrônica de varredura a estrutura das esferas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Microrganismo

Foi utilizada uma bactéria isolada pelo Laboratório de Nano&Biotecnologia (LANAB/IPTSP/UFG; SOARES, 2016; ALEXANDRE, 2018) à partir de amostras de solo de regiões litorâneas da cidade de Laguna, Santa Catarina. Esta bactéria foi caracterizada em estudos anteriores como sendo *Paenibacillus illinoisensis*, gram positiva, crescida em meio líquido, 30 °C em *shaker* à 150 rpm. O microrganismo foi mantido armazenado em solo previamente esterilizado.

#### 3.2 Meios de cultura

##### 3.2.1 Meio de cultura para crescimento bacteriano e produção de quitinase

Para o crescimento bacteriano e produção de quitinase, foi utilizado meio de cultura contendo quitina coloidal descrito por Yamaguchi (2003) com a seguinte composição: 1,5 % de quitina coloidal, 0,28 % de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,12 % de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 % de MgSO<sub>4</sub>, 0,4 % de extrato de levedura e 0,2 % de triptona. Para o meio sólido usado nas placas, foram acrescidos 1,5 % de ágar bacteriológico.

##### 3.2.2 Meio de cultura para contagem de microrganismos em placas

Para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), foi utilizado o meio *Plate Count Agar* (PCA), com a seguinte composição por litro: 5g de triptona, 1g de dextrose, 2,5 g de extrato de levedura e 15 g de ágar bacteriológico.

##### 3.2.3 Esterilização dos meios de cultura

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 15 minutos.

### 3.3 Quitina coloidal

A quitina coloidal foi preparada pela adição de 5 g de quitina em pó (Sigma-Aldrich®) em 60 mL de HCl concentrado. A mistura foi submetida à agitação vigorosa e em temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, a solução resultante foi filtrada em lã de vidro para remoção de resíduos de quitina não dissolvida durante a preparação. O filtrado foi adicionado em 200 mL de etanol 50 % sob agitação vigorosa. Posteriormente, foi adicionado 1 L de água destilada para a lavagem da quitina. Após precipitação da quitina, foi repetido o processo de adição de água até o sobrenadante da mesma atingir o pH 7. Seguiu-se posteriormente para filtração da quitina em papel filtro e estocagem à 4 °C.

### 3.4 Análise qualitativa da produção de quitinase

Antes do processo de imobilização as células de *P. illinoisensis* mantidas em solo foram verificadas quanto a viabilidade de produção de quitinase. Foi realizado cultivo em 10 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Himedia Laboratories, Pensilvânia, EUA) a 30 °C, em *shaker* à 150 rpm, por 24 horas. Após crescimento, foram inoculados 3 uL em placa com meio sólido descrito no item 3.2.1, contendo 1,5 % de quitina coloidal e adição de 0,001 % de Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich®) e seguiu-se para incubação em estufa a 30 °C por 72 horas. A confirmação da produção de quitinase foi observada pela formação de halo de degradação ao redor da colônia, indicando consumo do substrato. O halo foi visualizado na presença de luz Ultra Violeta (U.V.).

### 3.5 Imobilização em matriz de alginato

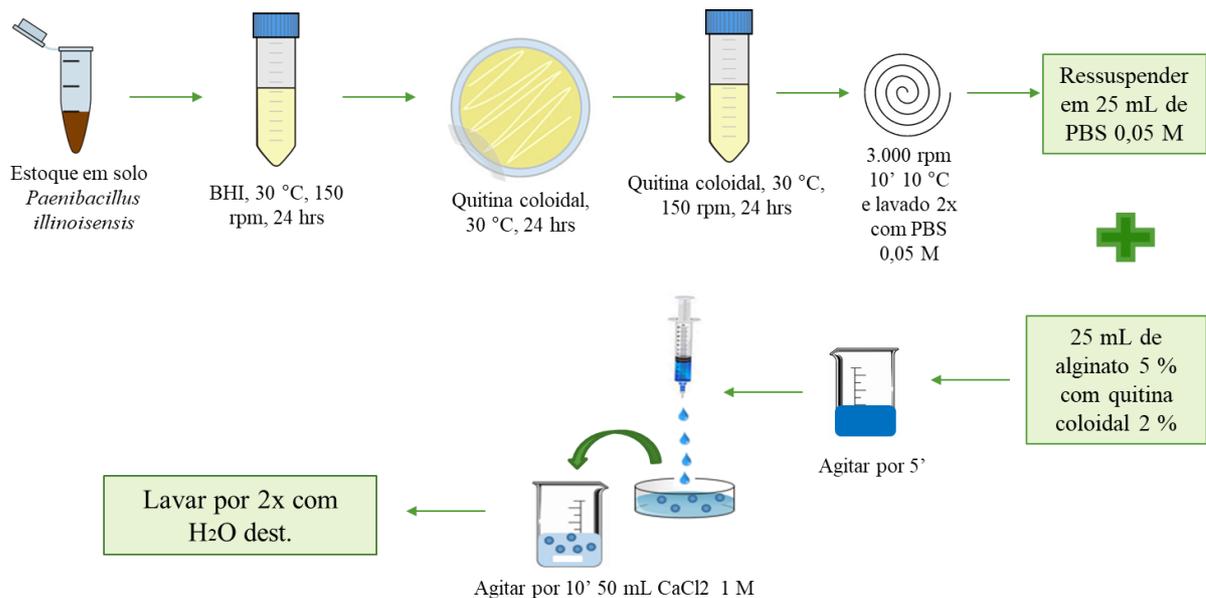
A imobilização celular foi realizada de acordo com a metodologia modificada de Halder et al. (2014). Primeiramente, realizou-se o crescimento do isolado bacteriano em 10 mL de caldo BHI a 30 °C, em *shaker* a 150 rpm, por 24 horas. Posteriormente, foi inoculado em meio sólido de quitina coloidal e incubado em estufa a 30 °C, por 24 horas. Após o crescimento, uma alçada da colônia bacteriana foi inoculada em 10 mL de meio líquido de quitina coloidal e incubado a 30 °C, em *shaker* a 150 rpm, por 24 horas.

Após o crescimento, o meio de cultivo foi recolhido e centrifugado a 3000 rpm por 10 min, a 10 °C, o *pellet*, formado por células, foi lavado duas vezes com PBS 0,05 M (3000 rpm por 10 min, a 10 °C) e ressuspenso pela adição de 25 mL de PBS 0,05 M. A suspensão celular

preparada foi misturada a 25 mL de uma solução de alginato (5 %) (Sigma-Aldrich®) com quitina coloidal (2 %), previamente esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 min e permaneceu sob agitação por 5 minutos.

Após este procedimento, a mistura composta da suspensão celular e alginato de sódio foi gotejada, com a utilização de uma seringa de 3 mL sem agulha, em uma placa de Petri contendo solução esterilizada de cloreto de cálcio 1 M. As esferas formadas foram imediatamente transferidas para um béquer contendo 50 mL de solução de cloreto de cálcio 1M, sob agitação branda.

Ao final do processo de gotejamento da solução de alginato e transferência das esferas, estas permaneceram em agitação branda por 10 minutos, para estabilização do sistema. Posteriormente, as esferas foram filtradas em uma peneira e lavadas por três vezes com água destilada esterilizada para remoção do excesso de íons de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esferas sem células também foram preparadas seguindo o mesmo protocolo. Para medida de tamanho, foram coletadas 30 esferas de forma aleatória. A Figura 09 esquematiza a produção das esferas de alginato.



**FIGURA 09. Formação das esferas de alginato com células.** O isolado bacteriano foi primeiramente reativado, para posterior utilização para imobilização pelo processo de gelificação iônica, baseado nas cargas opostas dos componentes. Fonte: Próprio autor.

### 3.6 Eficiência da imobilização em matriz de alginato

A eficiência de imobilização foi calculada de acordo com a equação descrita por Eş et al., (2016), que leva em consideração a quantidade de células antes da imobilização e as células não

imobilizadas presentes na solução de  $\text{CaCl}_2$ . Foram realizadas diluições seriadas e cultivo em meio PCA por 24 horas em estufa a 30 °C. O cálculo foi feito de acordo com a equação 1:

$$EI (\%) = \frac{UFC \text{ células antes da imobilização} - UFC \text{ células no } CaCl_2}{UFC \text{ células antes da imobilização}} \times 100 \quad eq. 1$$

### 3.7 Produção de quitinase por células livres e imobilizadas

Para a produção de quitinase com as células imobilizadas, foram produzidas esferas de acordo com o item 3.5, inoculadas em 100 mL de meio líquido de quitina coloidal, item 3.2.1, em frascos do tipo Erlenmeyers de volume de 500 mL e incubadas a 30 °C, em *shaker* a 150 rpm por 144 horas. Para a produção com células livres, foi utilizada a mesma quantidade de células que foi imobilizada ( $1,91 \times 10^7$  UFC/ mL). Primeiramente, foi realizado o crescimento do isolado bacteriano em 10 mL de caldo BHI a 30 °C, em *shaker* a 150 rpm, por 24 horas. Posteriormente, foi inoculado em meio sólido de quitina coloidal e incubado em estufa a 30 °C, por 24 horas. Após o crescimento, uma alçada da colônia bacteriana foi inoculada em 10 mL de meio líquido de quitina coloidal e seguiu-se para incubação a 30 °C, em *shaker* a 150 rpm, por 24 horas. Seguido o crescimento, os 10 mL foram vertidos em 90 mL de meio líquido de quitina coloidal em Erlenmeyers de volume de 500 mL para início da produção que ocorreu a 30 °C, em *shaker* a 150 rpm por 144 horas.

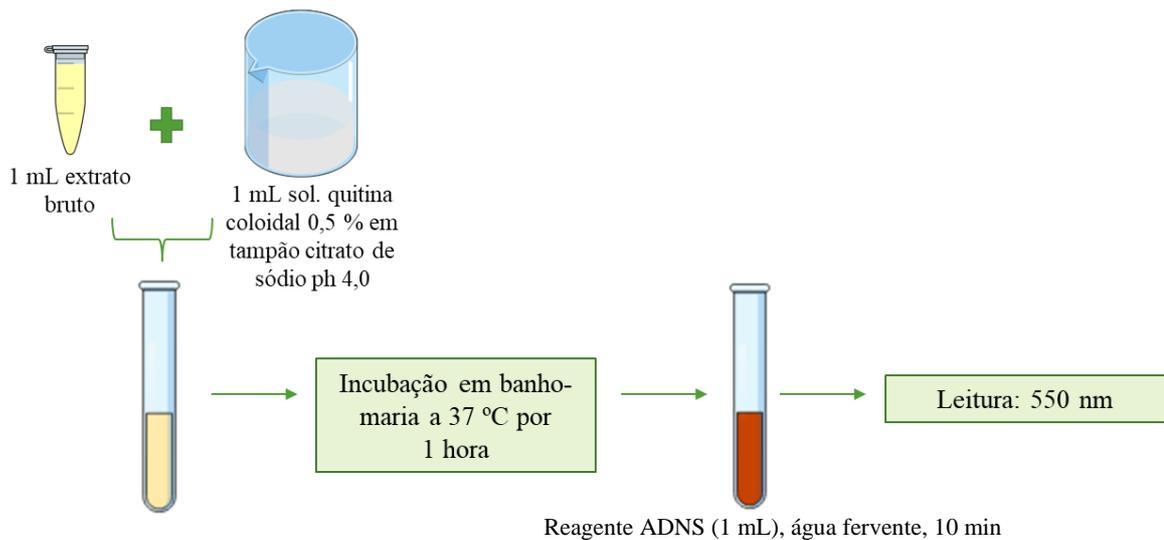
Amostras de 5 mL do meio de produção com células livres e imobilizadas, foram coletadas em intervalos de 24 horas, centrifugadas a 10.000 g, por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes resultantes, denominados extratos brutos foram utilizados para realizar o ensaio de atividade enzimática. O volume total retirado foi repostado com meio de quitina coloidal esterilizado.

### 3.8 Atividade enzimática da quitinase

A metodologia empregada para determinação da atividade enzimática, foi baseada em Miller (1959), em que há a quantificação de açúcares redutores por meio do reagente colorimétrico Ácido Dinitrosalicílico (ADNS). O trabalho em questão descreveu a determinação do açúcar redutor N-acetil-D-Glicosamina gerado pela hidrólise da quitina pela quitinase.

Para o preparo do reagente ADNS, dissolveu-se 10g de ADNS em 200 mL de NaOH 2 M, a 70 °C. Esta solução foi adicionada lentamente a uma solução de tartarato de sódio e potássio preparada previamente com a dissolução de 300g em 500 mL de água destilada. Posteriormente completou-se o volume final para um litro, com água destilada.

A atividade enzimática (Figura 10) foi realizada para os extratos brutos da produção com células livres e imobilizadas, seguindo o protocolo de Lima et al., (2001). A reação foi realizada com a adição de 1 mL de extrato bruto à 1 mL de solução 0,5 % de quitina coloidal em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,0. Em seguida, a reação foi incubada em banho-maria à 37 °C por 1 hora. Após incubação, 200 µL dessa mistura foram adicionados a 1 mL de ADNS e incubados em banho-maria fervente por 10 minutos, para ocorrer a reação observada pela mudança de cor. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de ELISA em comprimento de onda de 550 nm. Para o branco da reação, foi utilizado sobrenadante do meio de cultura esterilizado após centrifugação à 10.000 g, por 15 minutos a 4 °C e seguiu-se os mesmos passos da atividade descritos anteriormente.

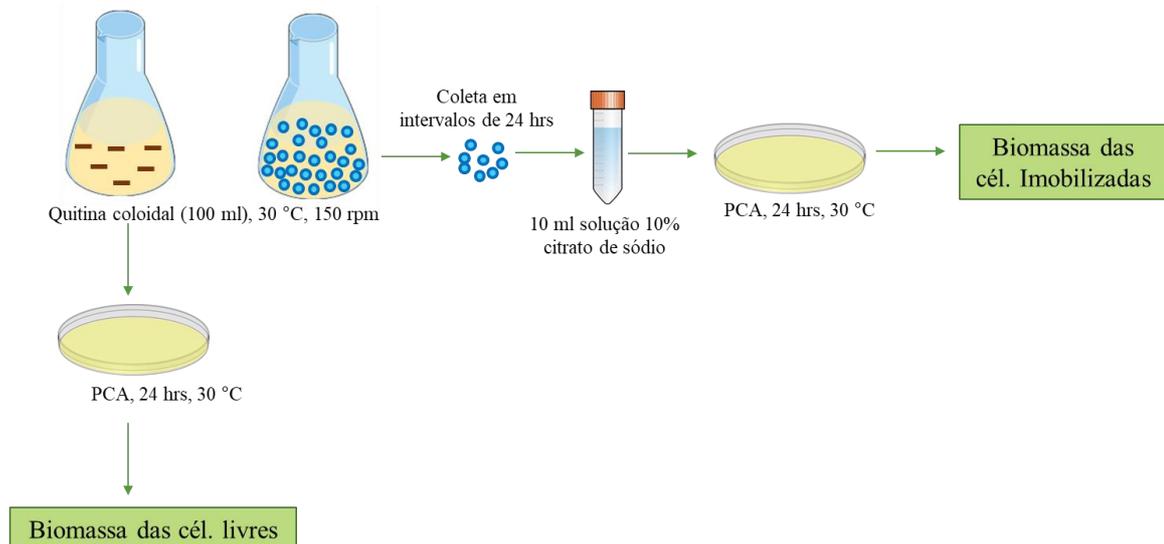


**FIGURA 10. Atividade enzimática da quitinase.** Método baseado na reação colorimétrica do reagente ADNS para quantificação de açúcares redutores após reação entre o extrato bruto contendo a enzima e a solução contendo o substrato, quitina coloidal.

Para a quantificação dos açúcares liberados na reação, foi feita uma curva padrão de N-acetilglicosamina (Sigma-Aldrich®), nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL e 400 µg/mL. Os valores da atividade enzimática foram expressos em Unidades (U), em que uma Unidade representa 1µmol de açúcar redutor liberado por hora na reação.

### 3.9 Determinação de biomassa e saída de células do suporte durante a produção

Para a determinação do crescimento de biomassa nas esferas de alginato durante o cultivo e produção de quitinase (Figura 11), seguiu-se o protocolo adaptado de Idris e Suzana (2006), Gabardo et al., (2015) e Yeung et al., (2016). Foi realizada a contagem de UFC a partir da dissolução de oito esferas em 10 ml de solução 10 % citrato de sódio, diluições seriadas e cultivo em meio PCA por 24 horas a 30 °C. Amostras de esferas foram coletadas em intervalos de 24 horas durante as 144 horas de produção. A determinação de biomassa do cultivo com células livres também foi realizada com a coleta no mesmo intervalo de tempo e condições de crescimento descritos anteriormente.



**FIGURA 11. Determinação da biomassa das células livres e imobilizadas.** Amostras de esferas foram coletadas em intervalos de 24 horas e dissolvidas com agente quelante (citrato de sódio) para quantificação do número de células. Amostras de células livres também foram coletadas nos mesmos intervalos.

O teste de saída de células do suporte de imobilização foi realizado de acordo com Victorelli (2011). Para tal, foram feitas medidas de UFC à partir da coleta de amostras do meio de cultura com as células imobilizadas, diluições seriadas e cultivo em meio PCA por 24 horas a 30 °C. As amostras foram coletadas em intervalos de 24 horas, durante as 144 horas de fermentação. Para o cálculo foi utilizada a equação 2:

$$Saída (\%) = \frac{UFC \text{ saída células do suporte}}{UFC \text{ células imobilizadas} + UFC \text{ saída células do suporte}} \times 100 \quad eq. 2$$

### 3.10 Reuso das células imobilizadas em bateladas sequenciais

Para determinar a capacidade de reutilização das células imobilizadas em diversos ciclos de produção, as esferas foram removidas do meio de cultivo a cada 96 horas, lavadas com uma solução 0,9 % NaCl e adicionadas à 100 mL de meio de quitina coloidal esterilizado para um novo ciclo produtivo até a máxima utilização das esferas. Amostras de 5 mL do meio de cultivo foram coletadas no mesmo intervalo de tempo, centrifugadas à 10.000 g, por 15 minutos a 4 °C e utilizadas para cálculo da atividade enzimática.

### 3.11 Preparação das amostras para visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras para visualização em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram preparadas pelo Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás e a geração de imagens foi realizada no Laboratório de Microscopia (LabMic- UFG). Imagens em MEV foram coletadas para células bacterianas livres e para esferas sem e com células bacterianas.

Em uma lâmina limpa e seca foram pipetados 100 µL da amostra de células bacterianas livres. Em seguida, foram adicionados 200 µL de reagente fixador (2,5% glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7.2) e seguiu-se para incubação por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente, a lâmina foi lavada em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 por três vezes, durante 5 minutos. Em seguida, a amostra foi desidratada com etanol 30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %, em intervalos de cinco minutos para cada etapa. Após a desidratação, a lâmina foi coberta com hexa-metil-disilazano (HDMS) durante 6 minutos e seca a temperatura ambiente.

As amostras das esferas sem e com células bacterianas foram primeiramente tratadas com reagente fixador (2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.2), *overnight*, a 4 °C e em seguida, foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, por três vezes, durante 15 minutos. Posteriormente, foram desidratadas com etanol 30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %, em intervalos de 15 minutos para cada etapa. Seguiu-se então, para o secador de ponto crítico para completa secagem das esferas. As esferas foram colocadas em lâminas e armazenadas na presença de gel de sílica para posterior análise. Para a captura das imagens foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura Jeol, JSM - 6610, equipado com EDS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, EUA).

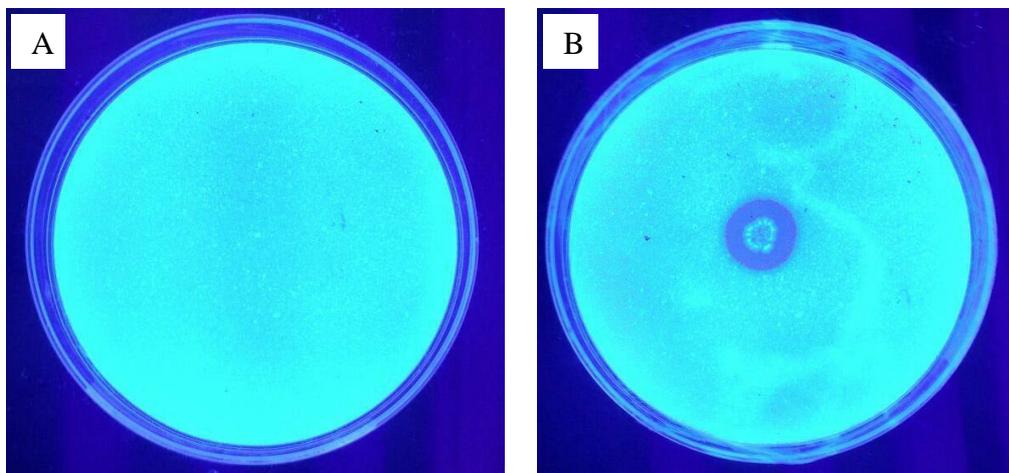
### **3.12 Análises estatísticas**

Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e as diferenças estatísticas para mais de três grupos amostrais foram calculadas com o teste ANOVA, considerando-se  $p < 0,05$ , por meio do software Microsoft Office Excel 2010.

## 4 RESULTADOS

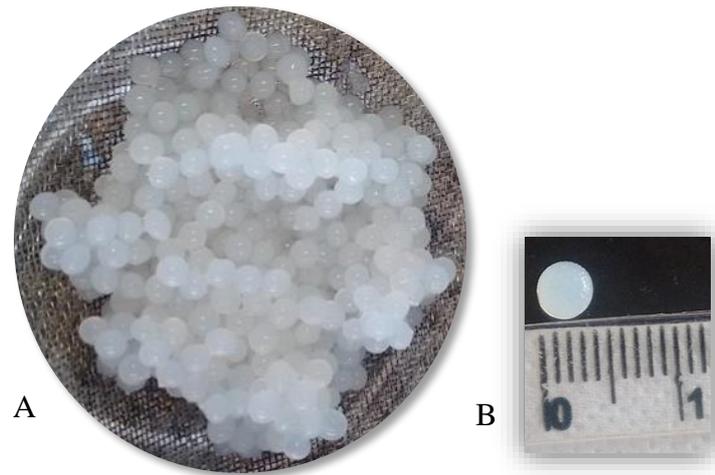
### 4.1 Imobilização em matriz de alginato

O estoque de *P. illinoisensis* armazenado em solo se mostrou viável para a produção de quitinase, cuja atividade foi comprovada pela formação de halo de degradação (zona clara) ao redor da colônia o que indica o consumo de quitina, como mostrado na Figura 12. Após a confirmação, seguiu-se para as etapas de imobilização.



**FIGURA 12.** Confirmação da produção de quitinase pelo isolado *Paenibacillus illinoisensis*. A: meio de quitina estéril e B: produção de quitinase observada pela formação de halo de degradação ao redor da colônia.

As esferas de alginato contendo as células imobilizadas foram preparadas de acordo com a técnica de aprisionamento em matriz porosa, por meio da gelificação iônica que é baseada na diferença de cargas entre os componentes utilizados. A solução polimérica de alginato de carga negativa contendo as células foi gotejada em uma solução de  $\text{CaCl}_2$  que possui carga positiva e tem por função agir como o agente reticulante. Assim, ocorre a formação de ligações cruzadas que levam ao surgimento de esferas consistentes e insolúveis, como podem ser observadas na Figura 13. A solução de alginato contendo as células (50mL) resultou em  $802 \pm 3,6$  esferas, com total de  $41,41 \pm 0,97$  g e tamanho médio de 4 mm.



**FIGURA 13. Imobilização em matriz de alginato.** A: esferas formadas contendo as células imobilizadas. B: tamanho das esferas.

#### 4.2 Eficiência de imobilização em matriz de alginato

A eficiência de imobilização foi calculada de acordo com a equação 1, que leva em consideração a quantidade de células utilizadas para a imobilização e a quantidade livre na solução de  $\text{CaCl}_2$ , como mostra a Tabela 02. Foi alcançado o excelente valor de  $99,99\% \pm 0,01$  para a eficiência de imobilização.

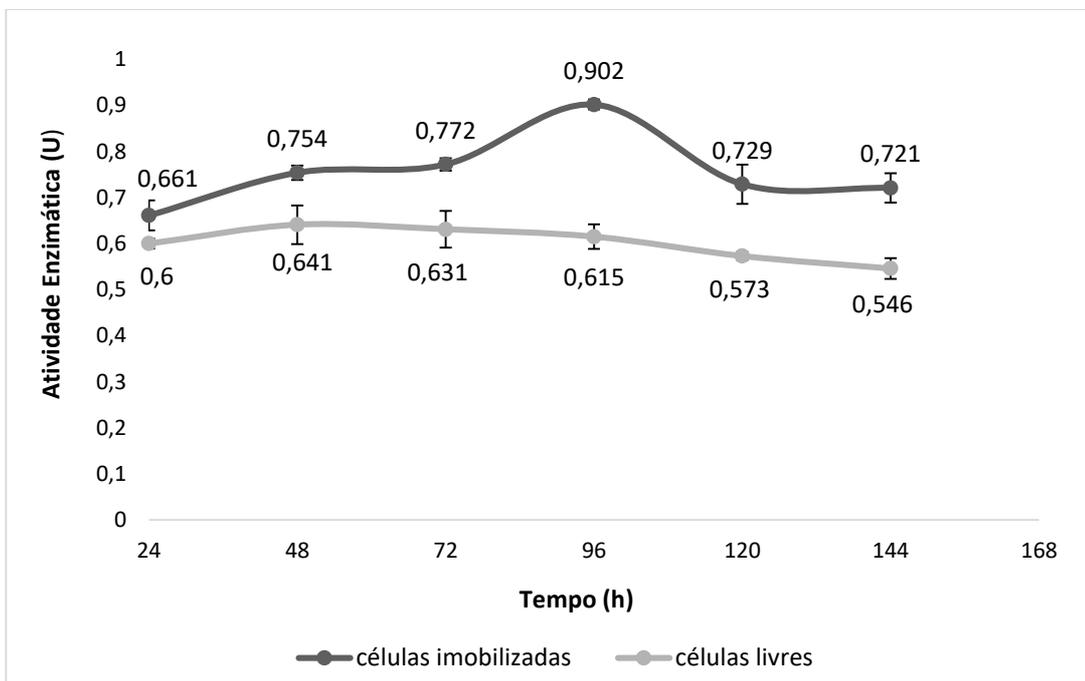
**TABELA 02. Unidade Formadora de Colônia (UFC) das células antes da imobilização e na solução de  $\text{CaCl}_2$ .** Os valores de células para cálculo da eficiência de imobilização estão expressos em UFC.

	UFC/ mL
Células antes da imobilização	$1,91 \times 10^7$
Células no $\text{CaCl}_2$	$1,73 \times 10^3 \pm 0,03$

#### 4.3 Atividade enzimática da quitinase

Os valores de atividade enzimática da quitinase produzida pela *P. illinoisensis* imobilizada em alginato e livre estão representados na Figura 14. A curva padrão de N-acetilglicosamina usada como referência para os valores de atividade enzimática apresentou  $R^2 = 0,997$ , demonstrando uma boa linearidade. De acordo com a Figura 14, pela análise ANOVA  $p \leq 0,005$ , foi constatada diferença estatística entre os tempos de produção. Sendo assim, foi observado valor máximo de 0,641 U em 48 horas, seguido de um leve decréscimo a

partir de 72 horas com valor de 0,631 U. Em relação às células imobilizadas, nota-se aumento gradativo em 24, 48 e 72 horas até a atividade máxima em 96 horas com valor de 0,902 U e queda nos tempos seguintes. Os dados também apresentaram diferença estatística com  $p \leq 0.005$ . Nota-se, que a imobilização das células em matriz de alginato levou ao aumento da atividade em 40,71 % em 96 horas, comparado com a atividade máxima das células livres em 48 horas. Percebe-se também que a imobilização aumentou o tempo necessário para se alcançar a atividade máxima para 96 horas nas células imobilizadas em comparação com as células livres, em 48 horas.



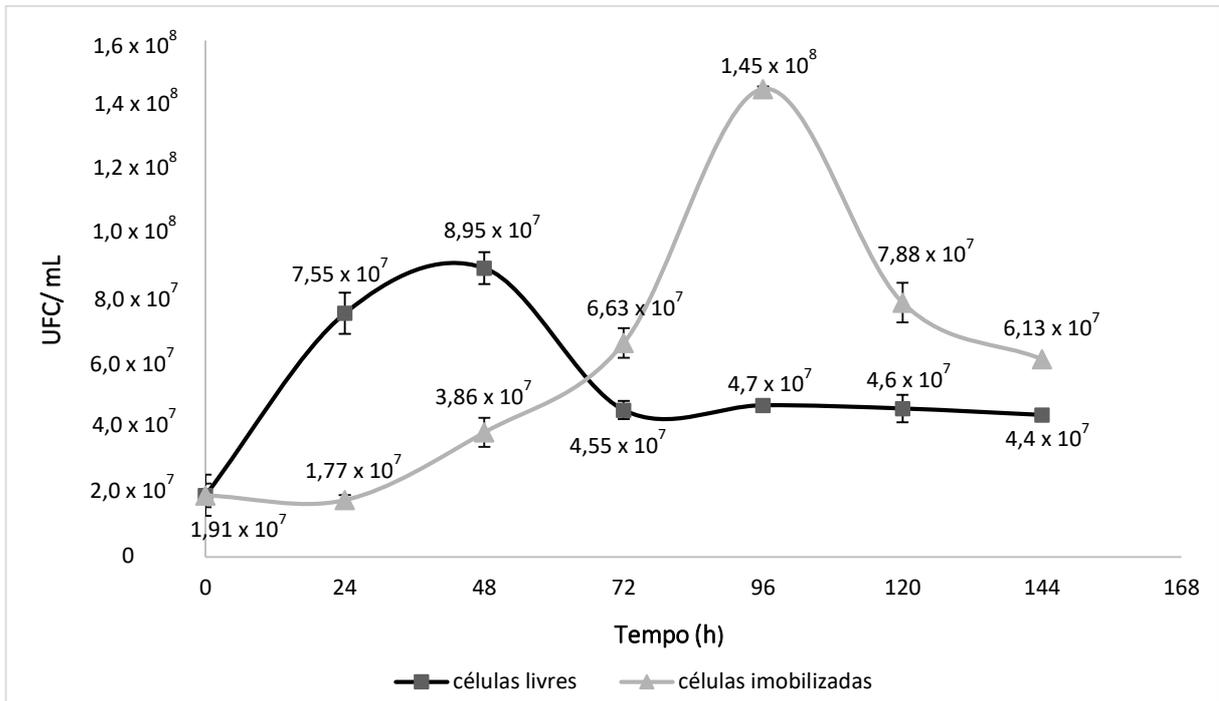
**FIGURA 14. Comparação entre a atividade enzimática de células imobilizadas e livres.** Atividade realizada em intervalos de 24 horas, durante 144 horas de produção. Os valores da atividade são expressos em Unidades (U), em que uma Unidade representa 1  $\mu$ mol de açúcar redutor liberado por hora na reação.  $p \leq 0.005$

#### 4.4 Determinação da biomassa e saída de células do suporte de imobilização durante a produção

A determinação da biomassa foi calculada por meio de medidas de UFC tanto pela produção com as células imobilizadas quanto com a produção pelas células livres, em intervalos de 24 horas. A análise da saída de células das esferas de alginato também foi realizada seguindo o mesmo intervalo de tempo.

Na Figura 15, pode-se observar que tanto as células imobilizadas quanto as livres apresentaram padrões de crescimento semelhantes, indicando um pico e posterior queda no

número de UFC. O crescimento exponencial das células imobilizadas ocorreu entre 72 e 96 horas e das células livres entre 0 e aproximadamente 48 horas. Nota-se então, o retardo no tempo de crescimento das células imobilizadas, com maior biomassa produzida de  $1,45 \times 10^8$  UFC/ mL em 96 horas em comparação com as livres de  $8,95 \times 10^7$  UFC/ mL em aproximadamente 48 horas. Quando comparados os maiores valores encontrados para biomassa, percebe-se um aumento de 62,01 % da quantidade de células nas esferas de alginato em comparação com as livres.



**FIGURA 15. Biomassa imobilizada e livre.** A quantidade de biomassa de células imobilizadas e livres estão expressas em UFC/ mL.  $p \leq 0.005$ .

A saída de células (Tabela 03) também foi monitorada e está apresentada em valores de UFC/ mL e em porcentagem, calculada de acordo com a equação 02. Pode-se observar que os valores de saída de células das esferas de alginato apresentaram-se baixos quando comparados aos valores do crescimento celular. No tempo zero não foi observada a saída de células e em 24 horas (3,35 %) o valor foi maior que os observados em 48 (1,64 %), 72 (1,28 %) e 96 (1,70 %) horas. Possivelmente este maior valor de saída em 24 horas se dá pela liberação de células que não se encontravam totalmente integradas à matriz de alginato. Os valores voltaram a aumentar em 3,76 % em 120 horas e 6,46 % em 144 horas, provavelmente por rupturas nas esferas de alginato provocadas pela alta produção de biomassa ocorrida no período de 96 horas, levando a um maior extravasamento das células para o meio de cultivo.

**TABELA 03. Saída de células do suporte de imobilização.** Saída de células calculada com a equação 2.

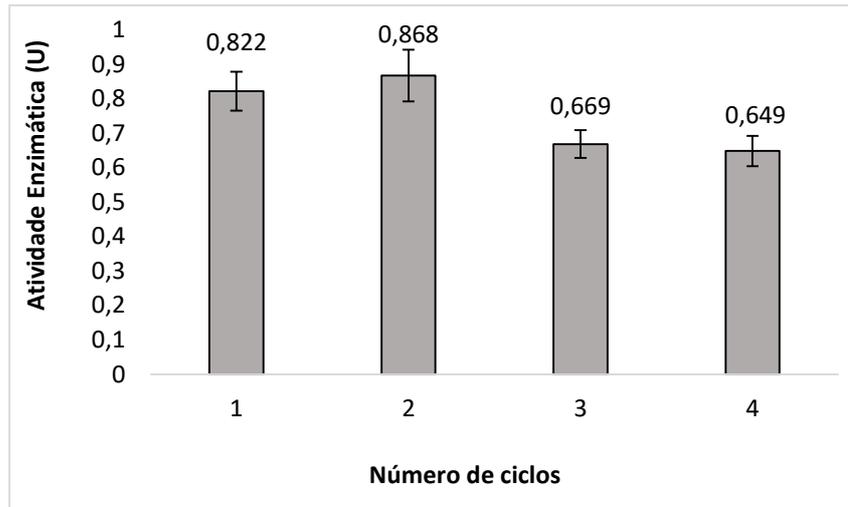
<b>Tempo (h)</b>	<b>C.I. (UFC/mL)</b>	<b>S.C. (UFC/mL)</b>	<b>Saída de células (%)</b>
<b>0</b>	$1,91 \times 10^7$	0	0
<b>24</b>	$1,77 \times 10^7 (\pm 3,65 \times 10^6)$	$6,15 \times 10^5 (\pm 4,53 \times 10^5)$	3,35 ( $\pm 2,397$ )
<b>48</b>	$3,86 \times 10^7 (\pm 1,53 \times 10^6)$	$6,47 \times 10^5 (\pm 1,03 \times 10^5)$	1,64 ( $\pm 0,24$ )
<b>72</b>	$6,63 \times 10^7 (\pm 4,51 \times 10^6)$	$8,60 \times 10^5 (\pm 7,07 \times 10^4)$	1,28 ( $\pm 0,106$ )
<b>96</b>	$1,45 \times 10^8 (\pm 4,58 \times 10^6)$	$2,51 \times 10^6 (\pm 4,37 \times 10^5)$	1,70 ( $\pm 0,321$ )
<b>120</b>	$7,88 \times 10^7 (\pm 7,64 \times 10^5)$	$3,08 \times 10^6 (\pm 1,09 \times 10^6)$	3,76 ( $\pm 1,273$ )
<b>144</b>	$6,13 \times 10^7 (\pm 6,11 \times 10^6)$	$4,24 \times 10^6 (\pm 3,54 \times 10^3)$	6,46 ( $\pm 0,007$ )

\* C.I: crescimento de células imobilizadas

S.C: saída de células do suporte

#### 4.5 Reuso das células imobilizadas em bateladas sequenciais

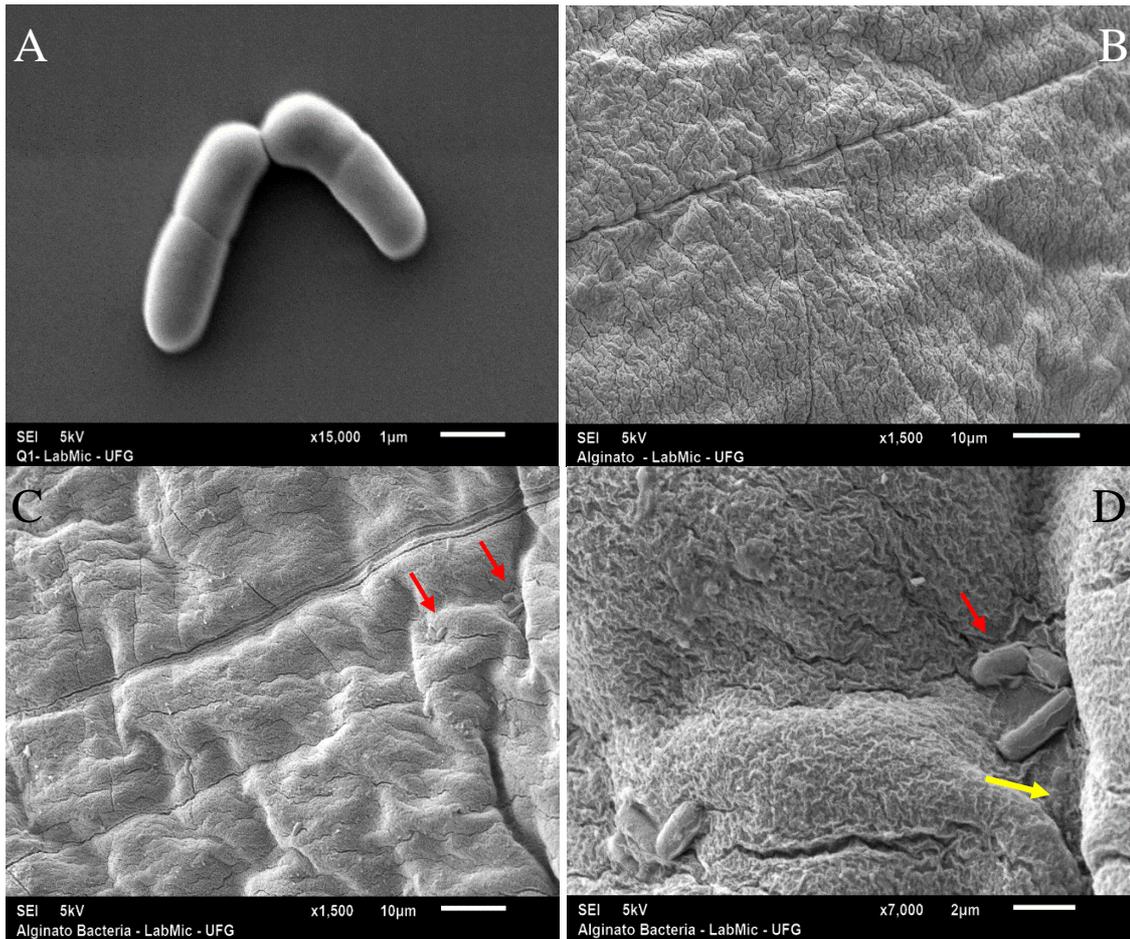
A capacidade de reuso das células de *P. illinoisensis* imobilizadas em alginato foi avaliada por meio da transferência das esferas para um meio novo de quitina coloidal a cada 96 horas, tempo em que foi observada a atividade máxima da quitinase e que corresponde a um ciclo de produção no regime de bateladas sequenciais. Os resultados, Figura 16, mostraram que as células imobilizadas podem ser reutilizadas por no máximo 384 horas, correspondentes a quatro ciclos. Após este período, as esferas se desintegraram. Os dois primeiros ciclos apresentaram uma alta capacidade de produção, sendo o primeiro com 0,822 U e o segundo com valor superior de 0,868 U. Ao final do quarto ciclo foi observado um valor de 0,649 U caracterizando uma perda de 21,04 % da atividade inicial.



**FIGURA 16. Reuso de células imobilizadas para produção de quitinase.** Cada ciclo corresponde à 96 horas de fermentação e os valores da atividade foram expressos em Unidades (U), em que uma Unidade representa 1 $\mu$ mol de açúcar redutor liberado por hora na reação.  $p \leq 0.005$

#### 4.6 Visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de células bacterianas e esferas de alginato sem e com células imobilizadas foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura para coleta de imagens, afim de se verificar a imobilização e a estrutura da matriz formada. A Figura 17 A, representa o *P. illinoisensis* livre que foi utilizado para o processo de imobilização por aprisionamento. A Figura 17 B foi coletada de esferas preparadas sem células afim de se obter uma análise da estrutura sem interferência das mesmas. Foi observada uma superfície rugosa com presença de inúmeros relevos e pequenas rachaduras. Nas imagens das Figuras 17 C e D, podem ser observadas as esferas com células imobilizadas. Pode-se observar também uma estrutura rugosa com pequenas rachaduras e depressões. Além disso, nota-se a presença de poucas células, inferindo que a maior quantidade encontra-se em seu interior. Não foi possível realizar capturas de imagens do interior das esferas, uma vez que, a secção das mesmas foi impossibilitada após a etapa de secagem no secador de ponto crítico, sendo coletadas então, somente das superfícies.



**FIGURA 17. Micrografia de amostras de bactéria e esferas de alginato. A: *Paenibacillus illinoisensis*. B: matriz de alginato sem células, C: matriz de alginato com células e D: aumento da imagem C. Seta vermelha: presença de células e Seta amarela: depressão na superfície.**

## 5 DISCUSSÃO

O processo de imobilização por aprisionamento em matriz porosa é uma técnica bastante difundida pelo seu baixo custo de produção e pela relativa facilidade de execução. Tem como princípio a gelificação iônica, que no presente trabalho consistiu no gotejamento de uma solução polimérica de alginato 5 % (m/v), com carga negativa, em uma solução de  $\text{CaCl}_2$  como agente reticulante, de carga positiva. As interações geradas entre as cargas opostas levaram a formação instantânea das esferas que apresentaram tamanho médio de 4 mm. Este tamanho é próximo ao obtido no estudo de Gabardo et al., (2015) no qual foram imobilizadas células de *Kluyveromyces marxianus* para produção de etanol, cujo tamanho foi de 3,8 mm com solução de alginato 4 %.

As concentrações das soluções poliméricas utilizadas são bem diversas nos diferentes trabalhos, assim como os tamanhos das esferas. Waluyo et al., (2016), imobilizaram *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bioetanol em alginato na concentração de 4 % (m/v) e obtiveram esferas de tamanho entre 1-3 mm. Já Kurbanoglu et al., (2010), imobilizaram *Rhodotorula glutinis* para biocatálise de acetofenonas à álcoois quirais, em alginato 3 % (m/v) e resultaram em esferas de 2-3 mm e Kawaguti, Manrich e Sato (2006), imobilizaram *Erwinia sp.* para produção de isomaltose em alginato 2 % (m/v) e as esferas apresentaram tamanho de 3 mm. O tamanho obtido pode ser influenciado tanto pela concentração de alginato quanto pelo diâmetro da agulha da seringa utilizada no gotejamento, dado que geralmente não é mostrado nos trabalhos.

O controle do tamanho das esferas é de suma importância, pois, segundo observações de Halder et al., (2014), na produção de quitinase com esferas menores que 3 mm, as células permaneceram sob estresse devido à alta quantidade de células em um espaço reduzido, o que pode ter resultado em um estado fisiológico menos ativo e conseqüentemente, reduziu a produção enzimática. No entanto, também foi observado pelo mesmo autor que esferas muito grandes, maiores que 3 mm, podem ocasionar o desenvolvimento de uma barreira de transferência de massa e nutrientes, limitando então a disponibilidade para as células presentes no interior e levando também a uma queda na produção. As esferas produzidas neste trabalho foram maiores que as obtidas por Halder et al., (2014), ideais com 3 mm, porém, proporcionaram a viabilidade celular e o aumento da atividade enzimática (Figuras 15 e 14). Desta forma, o tamanho da esfera neste caso, foi eficiente como sendo de 4 mm.

A eficiência de imobilização leva em consideração a quantidade de células inicialmente utilizada para o aprisionamento e a quantidade encontrada na solução em que foi realizado o gotejamento, ou seja, que não foram integradas à matriz das esferas durante o processo. A eficiência obtida neste trabalho foi de 99,99 %, o que demonstra a excelente eficácia da técnica empregada. Este valor obtido foi igual ao de Victorelli, (2011) e maior que Gao et al., (2016), cuja eficiência foi inferior a 95 %.

Vários são os estudos que utilizam a imobilização celular com o intuito de melhorar a eficiência de produção. No entanto, há relatos tanto de aumento quanto de redução da atividade enzimática de acordo com a metodologia de imobilização ou suporte empregado. De acordo com Kiran, Koteswaraiah e Chandra (2012), a imobilização de *Bacillus* sp. em matriz de ágar levou ao aumento de 149,84 % na atividade de  $\alpha$ -amilase, no entanto, foi relatado neste mesmo trabalho que a imobilização em matriz de alginato provocou uma redução de 33,63 %. Foi descrito também que pela imobilização em poliacrilamida e gelatina não foi possível a detecção de atividade.

Embora Kiran, Koteswaraiah e Chandra (2012), tenham observado uma redução na atividade com o uso de alginato, muitos estudos relatam o oposto. Segundo Adinarayana, Jyothi e Ellaiah (2005), a imobilização de *B. subtilis* PE-11 em alginato resultou em aumento de 79,03 % da atividade de uma protease alcalina em relação a atividade das células livres. O mesmo foi observado por Unver et al., (2014) com aumento de 11,57 % na atividade de protease, Chandorkar, Gomashe e Parlewar (2014) com aumento de 9,09 % na atividade de lipase e Zhang et al., (2013) com aumento de 60 % na atividade de quitosanase.

No presente trabalho foi obtido um aumento de 40,71 % na atividade da quitinase como sendo a máxima atividade das células imobilizadas em relação a máxima atividade das células livres. Este valor foi mais alto que o encontrado por Halder et al., (2014), com aumento de 33,37 % na atividade de quitinase de *Aeromonas hydrophila* SBK1. Pode-se observar nas Figuras 14 e 15 que a máxima atividade foi diretamente ligada à máxima produção de biomassa, sendo 0,641 U em 48 horas e 0,902 U em 96 horas, para células livres e imobilizadas respectivamente. Tais dados sugerem a ocorrência de uma direta correlação entre o número de células produtoras e a atividade enzimática.

Há estudos que relatam que o crescimento das células imobilizadas durante o bioprocessamento é reduzido e apresenta um comportamento diferente perante as células livres. Um exemplo a ser citado é o de Eş et al., (2016), em que imobilizaram *Bacillus* sp. em uma matriz polimérica de quitosana para produção de CGTase e observaram que o perfil de desenvolvimento entre as células imobilizadas e livres foi distinto. Os resultados indicaram que as células livres

apresentaram rápido e elevado crescimento quando comparado com as células imobilizadas, as quais tiveram um lento crescimento ao longo de toda a fermentação.

Neste trabalho, os resultados mostraram que as células imobilizadas e livres apresentaram um padrão de crescimento semelhante, porém, com tempos diferentes até alcançarem a concentração máxima de células. A produção máxima de biomassa das células livres foi de  $8,95 \times 10^7$  UFC/ mL em 48 horas e das células imobilizadas foi de  $1,45 \times 10^8$  UFC/ mL em 96 horas. O crescimento mais lento das células imobilizadas provavelmente se deve ao período de adaptação da bactéria ao microambiente das esferas.

A produção máxima de biomassa pelas células imobilizadas em relação a das células livres teve um aumento de 62,01 %, que pode ser devido às vantagens do emprego da imobilização para os processos fermentativos. Destacam-se, dentre elas: a proteção garantida pelo suporte contra a força de cisalhamento, alterações de pH, nutrientes e metabólitos tóxicos. Uma elevada densidade celular em sistema imobilizado também foi observado por Berlowska, Kregiel e Ambroziak (2013).

Segundo Nguyen, Le e Le (2015), células de *S. cerevisiae* imobilizadas em bainha de folha de nipa, uma espécie de palmeira típica asiática, apresentaram durante todo o bioprocessamento, uma densidade celular máxima e taxa média de crescimento sempre superiores em relação às células livres, com valores de 1,8 e 3,7 vezes respectivamente, provavelmente pela proteção garantida contra a alta concentração de etanol presente no meio. Krisch e Szajáni (1997), também demonstraram que células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato e celulose, tiveram maiores densidades celulares correspondente à 72 % e 62 % respectivamente do valor inicial, enquanto que não foram detectadas células livres vivas em meio contendo 20% de ácido acético. Tais estudos demonstram portanto, a capacidade do suporte de imobilização em garantir proteção às células contra fatores adversos e assim, promover o seu melhor crescimento.

Entretanto, o aumento exagerado de biomassa pode levar a rupturas no suporte de imobilização e conseqüente liberação das células para o meio externo. Outros fatores também podem provocar a saída como: desintegração da matriz de aprisionamento, presença de poros no suporte maiores que as células e ação de agentes quelantes como, citrato de sódio, fosfatos de sódio e EDTA, que agem quebrando as ligações entre o alginato e os íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , resultando na perda da estabilidade mecânica do gel e no seu rompimento. O monitoramento da saída deve ser feito principalmente para que não tenham células livres no meio de cultura e assim facilitar o processo de purificação do produto de interesse.

O volume de saída de células neste trabalho correspondeu ao final das 144 horas de produção a 6,46 % do total de células, valor menor que o obtido por Victorelli (2011) com a

saída de 10,97 % em 120 horas. O extravasamento das células para o meio de cultivo provavelmente foi influenciado pelo crescimento celular, visto que a produção máxima de biomassa ocorreu em 96 horas e o aumento da saída se deu nas horas subsequentes.

Uma alternativa para redução da saída de células é o revestimento das esferas com outra camada polimérica. De acordo com Obradović et al., (2015), o recobrimento de esferas de alginato com quitosana levou à uma redução na saída de células para o valor de 4,98 %, comparada ao número da saída de células de esferas não recobertas que foi de 5,33 %. A redução pode ser explicada pelo fato que, durante a fermentação, a interação eletrostática entre o alginato e a quitosana levou a uma supressão da evasão de células e assim aumentou a retenção das mesmas dentro da matriz de suporte.

A imobilização celular possui entre suas principais vantagens, a possibilidade de reuso do biocatalisador por mais de um ciclo de fermentação em regime de bateladas sequenciais, por garantir a viabilidade do mesmo. A investigação da capacidade das células imobilizadas em produzir quitinase por mais de um ciclo, equivalente a 96 horas cada, foi realizada e notou-se que estavam viáveis, uma vez que, demonstraram alta capacidade de produção, com valores de atividade de 0,822 U no primeiro e 0,868 U no segundo ciclo.

A maior atividade observada no segundo ciclo de reuso, também foi vista por Maity et al., (2011), que sugere que tal aumento se deu pela demora na adaptação das células ao microambiente das esferas de alginato. Ao final do reuso, totalizando 4 ciclos, equivalentes à 384 horas, foi observada redução de 21,04 % da atividade inicial, valores próximos aos de Maity et al., (2011), que obtiveram diminuição de 25 % ao final dos 10 ciclos que somaram 300 horas. Esta estabilidade apresentada é vantajosa para ser usada em bioprocessos industriais para produção de quitinase.

Outros estudos também relataram a possibilidade de reuso de células imobilizadas em matriz de alginato. De acordo com Zhang et al., (2013), esferas contendo *Gongronella* sp. JG foram estáveis por sete ciclos, totalizando 588 horas, apresentando redução de somente 15 % da atividade enzimática de quitosanase ao final do experimento. Boa estabilidade também foi demonstrada por Anisha e Prema (2008), com queda de 25 % da atividade enzimática de  $\alpha$ -galactosidase mesmo após oito ciclos, no total de 576 horas, por meio da imobilização de *Streptomyces griseoloalbus*. No entanto, também é passível de apresentar menor eficiência, como relatado por Guleria et al., (2016), que observaram redução de 74 % da atividade inicial durante seis ciclos no total de 360 horas de fermentação.

As diferentes estabilidades das esferas demonstradas nos ensaios de reuso pelos diversos trabalhos citados, podem ser influenciadas por fatores que vão desde a concentração da solução

de alginato utilizada para a confecção da matriz, o tempo de contato das esferas com a solução de  $\text{CaCl}_2$ , a concentração da solução de  $\text{CaCl}_2$ , o padrão de crescimento celular e até mesmo a presença de agentes quelantes no meio de cultivo.

O estudo em relação à estrutura da matriz formada durante a imobilização é de extrema importância, uma vez que, irá influenciar de forma direta na transferência de massa e gases entre as células e o meio de cultivo. Estará ligada também na saída do metabólito de interesse do interior das esferas para o meio externo e de células durante o processo de fermentação (KOURKOUTAS et al., 2004).

A superfície das esferas obtidas neste trabalho não apresentaram poros evidentes, o que seriam interessantes para transferência de massa. Porém, percebe-se a presença de pequenas rachaduras que contribuem para esse fluxo e uma superfície rugosa e extremamente irregular (Figura 17 D) que aumenta a área de contato entre as esferas e o meio de cultivo, facilitando o processo de difusão. As mesmas características nas superfícies de esferas de alginato foram observadas por Ortiz (2017). Portanto, pode-se concluir que a estrutura da matriz se mostrou adequada, uma vez que, permitiu a viabilidade celular, expressa pela alta densidade de células ao longo da fermentação bem como a produção da enzima de interesse, com aumento significativo de 40,71 % na atividade enzimática.

## 6 CONCLUSÃO

A imobilização de *P. illinoisensis* foi realizada por aprisionamento em matriz polimérica de alginato e se mostrou uma técnica simples, reprodutível, eficiente, de baixo custo e com uma excelente eficiência de imobilização de 99,99 %.

A imobilização celular proporcionou o aumento da atividade enzimática em 40,71 % em comparação com a atividade das células livres e um aumento de 62,01% da produção máxima de biomassa. Foi demonstrado também que, embora alto crescimento de biomassa, o suporte foi capaz de assegurar pouca saída de células de seu interior durante o bioprocessamento, chegando ao máximo de 6,46 % em 144 horas.

A capacidade de reuso tanto do biocatalisador como da matriz de suporte se mostrou eficiente, com utilização por 4 ciclos totalizando 384 horas de cultivo, com alta atividade nos dois primeiros ciclos e perda 21,04 % da atividade inicial, sendo então passível de uso em um processo contínuo de produção de quitinase.

A estrutura da matriz polimérica se mostrou rugosa e irregular, aumentando a área de contato entre as esferas e o meio de cultivo, facilitando a difusão de nutrientes e gases, bem como saída do produto de interesse e retenção das células.

A metodologia de aprisionamento empregada resultou em esferas com alta capacidade de aplicação podendo, após ensaios para aumento de escala e possível emprego em processos industriais, ser usada para produção de quitinases para as mais diversas aplicações desde controle de fungos patogênicos, biorremediação de biomassa quitinosa derivada do mercado de pesca e produção de insumos de interesse farmacêutico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMAJEED, N. A.; HJELIL, O. A.; DANIAL, E. N. Immobilization technology for enhancing bio-products industry. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 71, p. 13528–13539, 2012.
- ADINARAYANA, K.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 3, p. E391-7, 2005.
- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1786–1785, 2013.
- ANGELIM, A. L. et al. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 10–17, 2013.
- ALEXANDRE, A. R. S. **Bioprospeção de bactérias quitinolíticas e caracterização da atividade da enzima quitinase**. 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.
- ANISHA, G. S.; PREMA, P. Cell immobilization technique for the enhanced production of  $\alpha$ -galactosidase by *Streptomyces griseoalbus*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3325–3330, 2008.
- ANNA, C. et al. Review: Review: Hydrogels Hydrogels for Cell Cell Immobilization Immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 357–364, 1996.
- AVEDAÑO-ROMERO, G.C.; LÓPEZ- MALO, A.; PALOU, E. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, v. 1, p. 87–96, 2013.
- BARRETO, R. V. G. et al. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2121–2125, 2010.
- BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014–2019, 2008.
- BERLOWSKA, J.; KREGIEL, D.; AMBROZIAK, W. Physiological tests for yeast brewery cells immobilized on modified chamotte carrier. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 703–714, 2013.
- BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R. K. Bacterial chitinases: Properties and potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 21–28, 2007.
- BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467–483, 2011.
- CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. **Química**

**Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.

CANILHA, L.; CARVALHO, W. DE. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, ciência e Desenvolvimento ano IX**, n. 36, p. 48–57, 2006.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes**. Weinheim: [s.n.].

CHANDORKAR, V.; GOMASHE, A. V; PARLEWAR, S. Original Research Article Production of lipase by Immobilized Cells of *Aspergillus niger*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 8, p. 703–707, 2014.

COVIZZI, L. G. et al. Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, p. 143–160, 2007.

DANIŞMAZOĞLU, M. et al. Cloning and expression of chitinase A, B, and C (chiA, chiB, chiC) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, n. 1, p. 78–87, 2015.

DI ROSA, M. et al. Chitinases and immunity: Ancestral molecules with new functions. **Immunobiology**, v. 221, n. 3, p. 399–411, 2015.

DUARTE, J. C. et al. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 31, 2013.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. **International Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 3, p. 411–427, 2017.

EŞ, I. et al. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by immobilized *Bacillus* sp. on chitosan matrix. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 10, p. 1487–1500, 2016.

EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065–2082, 2015.

FAN, Y.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Preparation of chitin nanofibers from squid Pen  $\beta$ -chitin by simple mechanical treatment under acid conditions. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1919–1923, 2008.

FARAG, M. A. et al. Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 14, p. 1567–1578, 2014.

FU, X. et al. Purification and biochemical characterization of novel acidic chitinase from *Paenicibacillus barengoltzii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 973–979, 2016.

GABARDO, S. et al. The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 9, p. 1243–1253, 2015.

- GAO, H. et al. Immobilization of Multi-biocatalysts in Alginate Beads for Cofactor Regeneration and Improved Reusability. **Journal of Visualized Experiments**, n. 110, p. 1–9, 2016.
- GENISHEVA, Z. et al. Production of white wine by *saccharomyces cerevisiae* immobilized on grape pomace. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 2, p. 163–173, 2012.
- GENISHEVA, Z.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, J. M. Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking. **Trends in Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 33–47, 2014.
- GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1–14, 2006.
- GROBOILLOT, A. et al. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 75–107, 1994.
- GROVER, A. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 57–73, 2012.
- GULERIA, S. et al. Immobilization of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 and its alkaline protease in various matrices for effective hydrolysis of casein. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–12, 2016.
- GUO, X. et al. Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* CS0611. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, v. 38, n. 4, p. 665–672, 2017.
- HALDER, S. K. et al. Chitinases biosynthesis by immobilized *Aeromonas hydrophila* SBK1 by prawn shells valorization and application of enzyme cocktail for fungal protoplast preparation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 2, p. 170–177, 2014.
- HAMID, R. et al. Chitinases : An update. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 21–40, 2013.
- HOWARD, M. B. et al. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 627–635, 2003.
- IDRIS, A.; SUZANA, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1117–1123, 2006.
- IQBAL, M.; SAEED, A. Novel method for cell immobilization and its application for production of organic acid. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 178–182, 2005.
- ITOH, T. et al. Cooperative degradation of chitin by extracellular and cell surface-expressed chitinases from *Paenibacillus* sp. strain FPU-7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7482–7490, 2013.

- JAWORSKA, M. M. Kinetics of enzymatic deacetylation of chitosan. **Cellulose**, v. 19, n. 2, p. 363–369, 2012.
- KAWAGUTI, H. Y.; MANRICH, E.; SATO, H. H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: Culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, n. 3, p. 270–277, 2006.
- KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Quimica Nova**, v. 31, n. 1, p. 134–143, 2008.
- KAYA, M. et al. On Chemistry of  $\gamma$ -chitin. **Carbohydrate Polymers**, 2017.
- KIRAN, K. K.; KOTESWARAIAH, P.; CHANDRA, T. S. Production of Halophilic  $\alpha$ -Amylase by Immobilized Cells of Moderately Halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, n. 3, p. 146–157, 2012.
- KOURKOUTAS, Y. et al. Storage of immobilized yeast cells for use in wine-making at ambient temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 654–658, 2003.
- KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.
- KRISCH, J.; SZAJÁNI, B. Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 525–528, 1997.
- KUMAR, A. et al. A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus* sp. AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 263–272, 2018.
- KUMIRSKA, J. et al. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1567–1636, 2010.
- KURBANOGLU, E. B. et al. Asymmetric reduction of substituted acetophenones using once immobilized *Rhodotorula glutinis* cells. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 3825–3829, 2010.
- LUCIANA F. FLEURI\*, HAROLDO Y. KAWAGUTI, H. H. S. PRODUCTION, PURIFICATION AND APPLICATION OF EXTRACELLULAR CHITINASE FROM *Cellulosimicrobium cellulans* 191. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 623–630, 2009.
- MAITY, C. et al. Isozymes of  $\alpha$ -amylases from newly isolated *Bacillus thuringiensis* CKB19: Production from immobilized cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 2, p. 312–319, 2011.
- MAN, L. V. V.; QUYEN, V. T. LE. Effect of acetic acid on fermentation performance of the immobilized yeast *Kluyveromyces marxianus* on *Nypa fruticans* leaf sheath pieces. **Science and technology development**, v. 19, 2016.

- MARTINS, S. C. S. et al. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 28, p. 4412–4418, 2013.
- MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals. **Journal of Chemical Education**, p. 938–942, 1990.
- NGUYEN, H. P.; LE, H. DU; LE, V. V. M. Effect of ethanol stress on fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on *Nypa fruticans* leaf sheath pieces. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 96–101, 2015.
- OBRADOVIĆ, N. S. et al. Influence of Chitosan Coating on Mechanical Stability of Biopolymer Carriers with Probiotic Starter Culture in Fermented Whey Beverages. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015.
- OKAY, S.; ÖZDAL, M.; KURBANOĞLU, E. B. Characterization, antifungal activity, and cell immobilization of a chitinase from *Serratia marcescens* MO-1. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, n. 6, p. 639–644, 2013.
- PAQUES, J. P. et al. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163–171, 2014.
- PASIN, B. L.; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 130–151, 2012.
- PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: An exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 473–483, 2000.
- PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 7, p. 641–678, 2009.
- POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 17–21, 2002.
- RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. **Enzyme Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- SAIMA et al. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, 2013.
- SENOL, M. et al. Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2014.
- SOARES, E. S. **IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE QUITINASES**. 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em Genética

e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

SOWMYA, B. et al. Production and Purification of Chitinase by *Streptomyces* sp . from Soil. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 3, n. 3, p. 25–29, 2012.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 1, p. 30–38, 2015.

SURESH, P. V. Biodegradation of shrimp processing bio-waste and concomitant production of chitinase enzyme and N-acetyl-D-glucosamine by marine bacteria: Production and process optimization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 2945–2962, 2012.

VELÁSQUEZ, C. L. Quitina y quitosano : materiales del pasado para el presente y el futuro. **Avances en Química**. v. 1, n. 2, p. 15–21, 2006.

VERA, J. et al. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2514–2525, 2011.

WALUYO, J. et al. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* using Ca-alginate for bioethanol production from empty fruit bunch of oil palm. In: International Symposium on Applied Chemistry, 2016, Tangerang. **AIP Conference Proceedings**. American Institute of Physics, 2016. p. 1-8.

WAN, A. C. A.; TAI, B. C. U. CHITIN — A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1776–1785, 2013.

WANG, K.; YAN, P. S.; CAO, L. X. Chitinase from a novel strain of *Serratia marcescens* JPP1 for biocontrol of aflatoxin: Molecular characterization and production optimization using response surface methodology. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115–129, 2005.

WILLAERT, R. Cell Immobilization and Its Applications in Biotechnology. **Fermentation Microbiology and Biotechnology, Third Edition**, n. December, p. 313–367, 2011.

WOO, C. J.; PARK, H. D. An extracellular *Bacillus* sp. chitinase for the production of chitotriose as a major chitinolytic product. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 5, p. 409–412, 2003.

YANG, S. et al. Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. **Food Chemistry**, v. 192, p. 1041–1048, 2016.

YEUNG, T. W. et al. Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of *Bifidobacterium longum* for oral delivery. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR,

p. 1–11, 2016.

ZHANG, P. et al. Enhancement of chitosanase production by cell immobilization of *Gongronella* sp. JG. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 189–195, 2013.

ZUR, J.; WOJCIESZYŃSKA, D.; GUZIK, U. Metabolic responses of bacterial cells to immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 7, 2016.