

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

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS QUITINOLÍTIICAS E
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA QUITINASE**

ARTUR RIBEIRO DE SÁ ALEXANDRE

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: Artur Ribeiro de Sá Alexandre

Título do trabalho: Bioprospecção de bactérias quitinolíticas e caracterização da atividade da enzima quitinase


3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**

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)¹

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 08 / 05 / 2018

¹ A assinatura deve ser escaneada.

ARTUR RIBEIRO DE SÁ ALEXANDRE

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS QUITINOLÍTICAS E
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA QUITINASE

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.

Alexandre, Artur Ribeiro de Sá

Bioprospecção de bactérias quitinolíticas e caracterização da atividade da enzima quitinase [manuscrito] / Artur Ribeiro de Sá Alexandre. - 2018.

48 f.

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.

1. Bioprospecção. 2. Quitina. 3. Quitinase. 4. Bacteriologia ambiental. 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 065**

2 Aos doze dias do mês de abril do ano de dois mil e dezoito
3 (12/04/2018), às 09hs00min, no (a) Sala 402 do IPTSP, reuniram-se os
4 componentes da banca examinadora: **Prof. Dr. André Correa Amaral, Profa.**
5 **Dra. Lilian Carla Carneiro e Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira** para,
6 em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à
7 avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"Bioprospecção de bactérias**
8 **quitinolíticas e caracterização da atividade da enzima quitinase"**, em
9 nível de mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**,
10 de autoria de **Artur Ribeiro de Sá Alexandre**, 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 oito horas e quinze 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

André Correa Amaral
34 **Prof. Dr. André Correa Amaral**
35 **Presidente da Banca**
36 **UFG/GO**

37

38

39

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

42

43

44

45

46

José Daniel Gonçalves Vieira
46 **Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira**
47 **UFG/GO**

47

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Antônio Anchieta Alexandre Bezerra e Arisneide Ribeiro de Sá Alexandre por todo apoio que me deram.

Ao Prof. Dr. André Corrêa Amaral, por ter me orientado desde os tempos de graduação, me ajudando nos momentos de dúvida e me direcionando ao longo da realização do trabalho.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório Francenya Kelley Lopes da Silva, Samuel Rodrigues dos Santos Júnior, Ariádine Amorim Casas, Maycon Carvalho Ribeiro, Fernanda Garrote, Barbara Carolina Silva, Keli Maria Cardoso de Souza e Viviane Lopes Rocha Corrêa por terem me acompanhado e ajudado sempre que precisei.

Ao grupo do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, LAMAB, pela disposição e gentileza em me ajudar sempre que precisava.

Resumo

A Bioprospecção é definida como a busca por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que possam ter potencial econômico e eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto. Nesse âmbito, as enzimas, catalisadores biológicos de natureza proteica, têm despertado o interesse de indústrias pelo seu modo de conversão de biomassa específico, de baixo custo energético e que não produz resíduos tóxicos. As quitinases são enzimas que catalisam a quebra da quitina (biopolímero composto por monômeros de N-acetilglicosamina), possuindo assim, diversas aplicações, dentre as quais: a obtenção de monômeros de N-acetilglicosamina, usados na produção de pré-bióticos; a degradação de resíduos quitinosos oriundos da pesca e do consumo de crustáceos; e uso no combate de fungos e insetos. O presente trabalho teve como objetivo bioprospectar bactérias produtoras de quitinase a partir de amostras de solo e caracterizar a enzima do melhor isolado bacteriano quanto aos padrões de atividade enzimática. Para tal, foi realizada uma triagem com 17 amostras de solo coletadas nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, utilizando meio de cultura com quitina coloidal. Foram obtidas 13 colônias bacterianas produtoras de quitinase, dentre elas, o isolado Q1 (identificado como *Paenibacillus illinoisensis*), que se mostrou bom produtor da enzima e foi selecionado para testes de determinação e otimização da atividade enzimática quanto ao tempo de reação, temperatura e pH. A quitinase produzida pelo isolado apresentou atividade de 0,098 U, sendo melhorada posteriormente para 0,66 U quando testada nas condições ótimas de 1 hora de reação, a 37 °C e em pH 4, um aumento de 573% em relação ao valor inicial. Os valores obtidos da atividade da quitinase produzida pela *P. illinoisensis* são próximos aos encontrados em outras pesquisas, que destacam também, o potencial de aplicação da enzima, principalmente no combate de pragas fitopatogênicas. A bioprospecção de bactérias produtoras de quitinase é possível e promissora.

Palavras-chave: Bioprospecção, quitina, quitinase, bacteriologia ambiental.

Abstract

Bioprospecting is defined as the search for organisms, genes, enzymes, compounds, processes and any pieces from living beings, that could have economic potential and eventually lead to a product development. Thus, enzymes, protein catalysts, have aroused the interest of industries for its conversion mode specific biomass, low energy cost and not production of toxic waste. Chitinases are enzymes that catalyze the lysis of chitin (biopolymer composed of N-acetylglucosamine monomers), and thus have several applications, among them: obtaining N-acetylglucosamine monomers, used in the production of prebiotics; degradation of chitinous waste from fishing activities; and the use in control of fungi and insects. The present work aimed to bioprospect chitinase producing bacteria from soil samples and to characterize the enzymatic activity patterns of the best bacterial isolate. To do so, a screening with 17 soil samples collected in the states of Minas Gerais, Santa Catarina and Rio Grande do Sul, was carried out using a culture medium with colloidal chitin. Thirteen chitinase producing bacteria were obtained, among them, the isolate Q1 (identified as *Paenibacillus illinoisensis*), demonstrated to be a good producer of the enzyme and thus was selected for determination and optimization of its chitinase activity evaluating reaction time, temperature and pH. The chitinase produced by the isolate showed 0.098 U of activity, which was subsequently improved to 0.66 U when tested under the optimal conditions of 1 hour of reaction at 37 °C and pH 4, an increase of 573% over the initial value. The values of chitinase activity from the isolate *P. illinoisensis* are close to those found in other studies, which also emphasize the potential application of the enzyme, mainly in the control of phytopathogenic pests. Bioprospecting of chitinase producing bacteria is possible and promising.

Keywords: Bioprospecting, chitin, chitinase, environmental bacteriology.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Bioeconomia e bioprospecção	1
1.2. Enzimas.....	3
1.3. Quitina	6
1.4. Quitinase	8
1.4.1. Quitinases bacterianas	10
1.4.2. Métodos de bioprospecção de bactérias quitinolíticas	12
1.4.3. Aplicações das quitinases	13
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Metodologia.....	17
3.1. Seleção e isolamento de bactérias produtoras de quitinase	17
3.1.1. Coleta das amostras de solo	17
3.1.2. Quitina coloidal.....	18
3.1.3. Meio de cultura.....	19
3.1.5. Seleção e repique de bactérias quitinolíticas.....	20
3.2. Caracterização morfo-tintorial.....	20
3.3. Índice enzimático	21
3.4. Caracterização enzimática	21
3.4.1. Produção enzimática.....	22
3.4.2. Atividade enzimática.....	23
3.4.2.1. Preparo do reagente dinitrosalicílico.....	24
3.4.2.2. Reação enzimática.....	24
3.4.2.3. Quantificação proteica	24
3.4.3. Determinação das condições ótimas de atividade enzimática.....	25
3.4.3.1. Tempo	25

3.4.3.2. Temperatura	25
3.4.3.3. pH.....	25
3.5. Análises estatísticas	25
4. Resultados.....	26
4.1. Seleção e isolamento de bactérias produtoras de quitinase e caracterização morfo- tintorial.....	26
4.2. Índice enzimático	27
4.3. Caracterização enzimática	29
4.3.1. Atividade enzimática.....	29
4.3.2. Atividade enzimática em condições ótimas	31
4.3.2.1. Tempo	31
4.3.2.2. Temperatura	32
4.3.2.3. pH.....	33
4.4. Atividade enzimática otimizada.....	34
5. Discussão.....	36
6. Conclusão	41
7. Referências bibliográficas	42

Lista de siglas

BHI.....	<i>Brain Hearted Infusion</i>
CDB.....	Convenção sobre Diversidade Biológica
DMAB.....	Dimetilaminobenzaldeído
DNS.....	Dinitrosalicílico
ECG.....	Etileno Glicol Quitina
GlcNAc.....	N-acetilglicosamina
IE.....	Índice Enzimático
OECD.....	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>

Lista de quadros

Quadro 1. Locais de coleta das amostras de solo.....	17
--	----

Lista de tabelas

Tabela 1. Produtos oriundos da bioprospecção presentes no mercado.	2
Tabela 2. Enzimas e suas aplicações em indústrias.....	5
Tabela 3. Locais de encontro de bactérias produtoras de quitinase.....	12
Tabela 4. Exemplos de bactérias quitinolíticas usadas no biocontrole de fungos fitopatogênicos.	14
Tabela 5. Composição dos meios de cultura descritos por Kamil et al., (2007) e Yamaguchi (2003).....	22
Tabela 6. Amostra origem dos isolados bacterianos produtores de quitinase e caracterização morfo-tintorial.....	27
Tabela 7. Atividade enzimática e quantificação proteica ao longo do período de produção enzimática com o isolado <i>Paenibacillus illinoisensis</i>	29

Lista de figuras

Figura 1. Ação enzimática.....	4
Figura 2. Estrutura molecular da quitina.....	6
Figura 3. Estruturas polimórficas da quitina	7
Figura 4. Ação de endoquitinases e exoquitinases.....	8
Figura 5. Classificação de quitinases quanto a sequência de aminoácidos.....	9
Figura 6. Degradação da quitina por bactérias e fungos.....	11
Figura 7. Aplicações de quitinases bacterianas em fungos e insetos fitopatogênicos....	15
Figura 8. Meio de cultura corado com calcofluor.	19
Figura 9. Repiques de colônias bacterianas em meio de cultura contendo quitina coloidal.	20
Figura 10. Multi-inoculador de Steer.	21
Figura 11. Produção enzimática	23
Figura 12. Isolados bacterianos produtores de quitinase visualizados em microscopia óptica com aumento de 40x.....	26
Figura 13. Experimento de índice enzimático com isolados Q11, Q12, Q13 e Q14.....	28
Figura 14. Índice enzimático dos isolados bacterianos em 72 horas de cultivo.....	28
Figura 15. Atividade enzimática ao longo do tempo de produção com o isolado <i>Paenibacillus illinoisensis</i>	30
Figura 16. Quantidade de açúcar redutor liberado em diferentes tempos da reação quitinase-quitina coloidal.	31
Figura 17. Atividade enzimática em diferentes tempos da reação quitinase-quitina coloidal.....	32
Figura 18. Atividade enzimática em diferentes temperaturas.....	33
Figura 19. Atividade enzimática em diferentes pHs.....	34
Figura 20. Atividades enzimáticas obtidas no início dos ensaios e em condições ótimas de reação.....	35

1. Introdução

1.1. Bioeconomia e bioprospecção

“Um mundo em que a biotecnologia contribui significativamente para a produção econômica”. Foi assim que Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*) definiu a bioeconomia em portfólio sobre o tema, publicado no ano de 2009 (OECD, 2009). Ainda nesse documento, a OECD estimou um fluxo monetário de US\$ 1 trilhão por ano até 2030 atribuídos à bioeconomia, e categorizou também, a agricultura, a saúde e a indústria como os principais setores em que a biotecnologia pode atuar contribuindo para a bioeconomia. Uma prática que acessa todos esses setores e é uma ferramenta fundamental da biotecnologia, é a bioprospecção (OECD, 2009; DIAS; CARVALHO FILHO, 2017).

Saccaro Júnior (2011) define a bioprospecção como a “busca por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que possam ter potencial econômico e eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto”. Desse modo, a prática da bioprospecção já proporcionou o desenvolvimento de diversos produtos que estão presentes atualmente no mercado (Tabela 1).

A bioprospecção é uma das maneiras de se atribuir valor econômico à biodiversidade de um país (HARVEY; GERICKE, 2011). Desta forma, o Brasil, detentor de 13% de toda a biodiversidade do planeta, tem grande potencial para se beneficiar da atividade bioprospectiva e se inserir na bioeconomia (LEWINSOHN; PRADO, 2006). Especialmente após a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), um tratado internacional criado na Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, em 1992, que dentre as medidas apresentadas, reconheceu a soberania de cada país sobre os recursos naturais localizados em seu território (SACCARO JÚNIOR, 2011b).

Tabela 1. Produtos oriundos da bioprospecção presentes no mercado.

Produto	Descrição	Origem	Referências
Blenoxano®	Antibiótico citotóxico utilizado no tratamento de neoplasias	<i>Streptomyces verticillus</i> (Actinobactéria)	Barreiro e Bolzani (2009)
Ziconotide®	Analgésico utilizado no tratamento de dor crônica severa	<i>Conus magus</i> (Caracol marinho)	Barreiro e Bolzani (2009)
Taxol®	Medicamento utilizado no tratamento de tumores sólidos	<i>Taxus brevifolia</i> (Árvore Teixo do Pacífico)	Barreiro e Bolzani (2009)
Esquive®WP	Biofungicida formulado a partir do fungo <i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Trichoderma atroviride</i> (Fungo)	Woo et al., (2014)
Bio 'N' More®	Biofertilizante direcionado ao cultivo de vegetais formulado a partir da bactéria <i>Azotobacter sp.</i>	<i>Azotobacter sp.</i> (Bactéria)	Fendrihan (2016)
Biolacta®	Enzima β -galactosidase	<i>Bacillus circulans</i> (Bactéria)	Geiger et al., (2016)

O governo brasileiro, porém, mesmo após instituição da CDB, precisou lidar com práticas ilícitas de contrabando dos recursos naturais do País, como por exemplo, o registro da marca “cupuaçu” pela empresa japonesa Asahi Foods e a exploração do açaí, copaíba e andiroba por outras empresas estrangeiras (MARQUES, 2014). Para evitar tais casos de biopirataria foram criadas medidas legislativas objetivando a proteção do patrimônio genético brasileiro, o que consequentemente dificultou a prática de bioprospecção no País, tanto para estrangeiros como também para pesquisadores brasileiros (BERLINCK, 2012). A principal legislação a esse respeito foi a Medida Provisória 2186-16/2001, que burocratizou o acesso ao patrimônio genético brasileiro, sendo necessária a autorização prévia da União para pesquisas com a biodiversidade do País (SACCARO JÚNIOR, 2011).

Nos últimos anos, contudo, melhorias em processos burocráticos e no acesso do patrimônio genético do País, estabelecidas pela lei 13.123/2015, progrediram o cenário da bioprospecção no Brasil (BOFF, 2015). Já sendo possível reconhecer nacionalmente, produtos como o Acheflan®, fármaco anti-inflamatório obtido a partir da erva *Cordia verbenacia*, e empresas atuantes na área, como a Natura; a Extracta Moléculas Naturais S/A; e a Phytobios, que para suas aplicações em cosmética e farmacêutica, prospectem principalmente metabólitos secundários e enzimas (BARREIRO, 2009; MARQUES, 2014).

1.2. Enzimas

Para que uma reação química ocorra, é necessário que os componentes envolvidos obtenham uma quantidade mínima de energia que os permitam entrar em estado reativo, tal energia denominada energia de ativação, é a barreira que separa os reagentes dos produtos (ILLANES; ALTAMIRANO; WILSON, 2008). Quanto menor a energia de ativação, maior será a velocidade de uma reação, algo que pode ser alcançado utilizando-se catalisadores, substâncias que diminuem a energia de ativação sem alterar o equilíbrio entre reagentes e produtos e sem serem consumidos durante o processo (RIBEIRO; SOUZA, 2011).

Do mesmo modo, as reações bioquímicas também estão sujeitas à ação de catalisadores. De fato, a ampla escala de reações bioquímicas que ocorrem a todo o momento nos seres vivos só são possíveis graças à ação de catalisadores biológicos, as enzimas. Se não fosse pela ação de catálise das enzimas, reações de metabolismo celulares que normalmente duram minutos, demorariam horas, dias ou até anos para completarem, algo inviável principalmente para microrganismos, que necessitam de reações rápidas para se dividirem em curto espaço de tempo (BORZANI et al., 2001).

As enzimas são estruturas complexas, a maioria de origem proteica, que apresentam elevada velocidade e especificidade para a reação que catalisam (Figura 1) (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

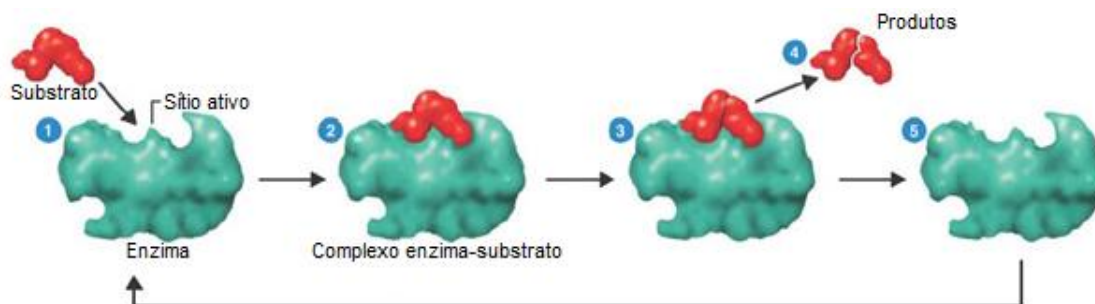


Figura 1. Ação enzimática. Durante uma reação, as enzimas se ligam especificamente ao substrato através de uma região chamada sítio ativo (1), formando o complexo enzima-substrato (2). Devido a tal ligação, a conformação espacial da enzima sofre alterações. A reação procede catalisada pela enzima (3), quando terminada, os produtos formados são liberados (4) e a enzima volta a sua conformação original (5). **Fonte:** adaptado de Tortora, Funke e Case (2010).

Desta forma, as enzimas têm despertado o interesse de uma variedade de indústrias e já são utilizadas em muitas delas (Tabela 2). A velocidade e especificidade pela reação que catalisam, permitem a conversão de substratos específicos em produtos específicos, além de evitar a produção de resíduos tóxicos normalmente gerados em processos químicos (PAQUES; MACEDO, 2006; ZHANG; SUN; MA, 2016). As condições amenas e compatíveis à vida, em que ocorrem as biocatálises, fazem com que os processos enzimáticos sejam de baixo custo energético (POSORSKE, 1984). E a existência de uma variedade de enzimas possibilita a criação e simplificação de diversos processos industriais. Todas essas características tornam os biocatalisadores uma alternativa aos catalisadores e processos químicos clássicos (PAQUES; MACEDO, 2006).

Tabela 2. Enzimas e suas aplicações em indústrias.

Enzima	Indústria	Aplicação	Referências
Fitase	Alimentação animal	Melhora da nutrição de avinos e suínos a partir da quebra de ácido fítico	Campestrini, Silva e Appelt, (2005)
Nitrila hidratase	Química	Produção de acrilamida a partir de acrilonitrila	Gavrilescu e Chisti (2005)
Bromelina	Farmacêutica	Auxílio na digestão e em processos anti-inflamatórios pela ação fibrinolítica	Monteiro e Silva (2009)
Lacase	Têxtil	Oxidação fibras de algodão para alveijamento	Monteiro e Silva (2009)
Celulase	Papel	Amaciamento do papel pela hidrólise de fibras de celulose	Li et al., (2012)
Lipase	Alimentícia	Confere sabor e aroma ao queijo pela quebra da gordura do leite	Li et al., (2012)
Amilase	Detergente	Remoção de machas de carboidrato	Singh et al., (2016)
Peroxidase	Cosmética	Ação antienvelhecimento pela eliminação de peróxido de hidrogênio	Singh et al., (2016)

Com demandas e aplicações crescentes, empresas como Novozymes (Dinamarca), DuPont (Estados Unidos) e Roche (Suíça) investem cada vez mais em pesquisa, produção e comercialização de enzimas, fazendo assim, parte de um mercado que movimentará até 2024 um valor estimado de US\$ 17,5 bilhões (LI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2017).

Dentro do contexto comercial de enzimas, os microrganismos ganham destaque por serem os principais produtores dos biocatalisadores comerciais, apresentando características como: rápido desenvolvimento em meio de cultura; grande quantidade de produto em tempo relativamente curto; possibilidade de produção em larga escala; baixos custos de produção, devido ao uso de substratos baratos; produção independente de fatores sazonais; e possibilidades de manipulações genéticas para melhor rendimento produtivo (SOARES et al., 2012; LUZ et al., 2016). As enzimas fitase, celulase e amilase, por exemplo, para seus usos industriais, podem ser produzidas por *Aspergillus niger*, *Bacillus sp.* e *Bacillus subtilis*, respectivamente (SINGH et al., 2016).

A quitinase, enzima abordada neste trabalho também possui suas aplicações e interesses industriais, conferidos pela capacidade de hidrolise da quitina.

1.3. Quitina

Encontrada na parede celular de fungos, exoesqueleto de artrópodes e no tegumento de nematóides e moluscos, a quitina é depois da celulose o composto orgânico natural de maior abundância no planeta, com a vantagem de apresentar uma taxa de reposição duas vezes maior que a celulose (GOHEL et al., 2006; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008). Trata-se de um polissacarídeo composto por monômeros de N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidos por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 2) (RINAUDO, 2006).

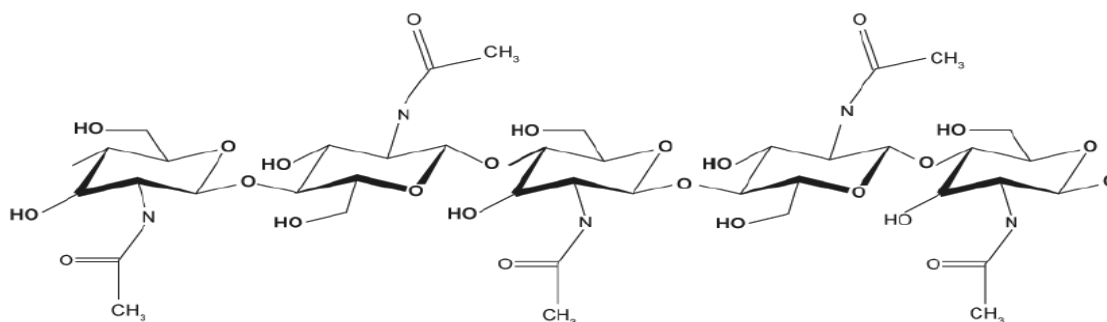


Figura 2. Estrutura molecular da quitina. Fonte: Borgognoni, Polakiewicz e Pitombo (2006).

A estrutura como um todo, possui uma extremidade redutora (carbono 1 não participante da ligação glicosídica) e outra não redutora (carbono 4 não participante da ligação glicosídica). A presença da extremidade redutora, porém, coloca a quitina na

classificação de açúcar redutor (CAMPANA-FILHO et al., 2007). Dependendo da disposição de suas cadeias, o bioplímero apresenta três diferentes estruturas polimórficas: α -quitina, β -quitina e γ -quitina (Figura 3) (SOUZA; FERREIRA; BARBOSA, 2015).

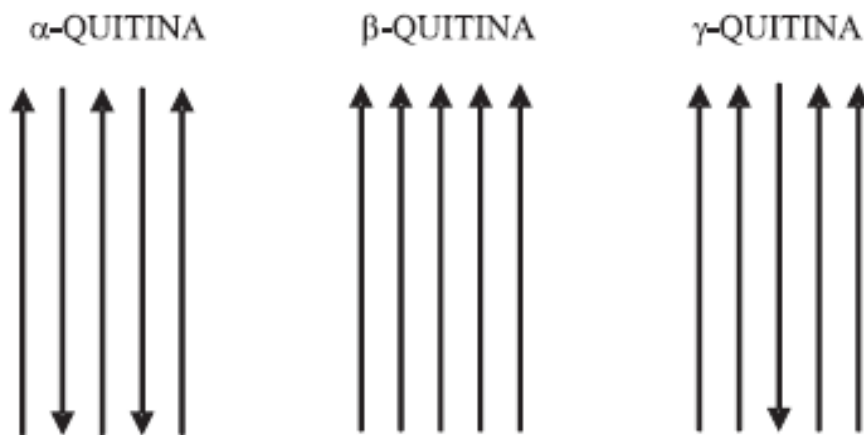


Figura 3. Estruturas polimórficas da quitina. A α -quitina é composta por cadeias poliméricas de N-acetilglicosamina dispostas de forma antiparalela. Enquanto que a β -quitina é composta por cadeias poliméricas de N-acetilglicosamina dispostas paralelamente. Já a γ -quitina é composta por cadeias poliméricas de N-acetilglicosamina paralelas intercaladas por uma cadeia antiparalela. **Fonte:** Campana-Filho et al., (2007).

A α -quitina, forma mais abundante e comercial da quitina, caracteriza-se por ser uma estrutura mais densa, podendo ser encontrada na parede celular de fungos, carapaças de caranguejos, lagostas e camarões e na cutícula de insetos. A disposição antiparalela de suas cadeias poliméricas favorece a existência de ligações hidrogênio inter e intra-cadeias. Algo que não ocorre na β -quitina, forma mais rara da quitina, é encontrada em gládios de cefalópodes e caracteriza-se como estrutura menos densa. Já a γ -quitina, ainda pouco estudada, pode ser encontrada em casulos de insetos (RINAUDO, 2006; CAMPANA-FILHO et al., 2007; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008).

Em relação às características físico-químicas, a quitina é altamente hidrofóbica, sendo insolúvel também na maioria dos ácidos orgânicos (KUMAR, 2000). Porém, por mais lenta que seja, sua dissolução pode ser alcançada em soluções concentradas de ácidos fortes, como em ácido clorídrico ou em ácido tricloroacético (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

A biocompatibilidade e biodegradabilidade são outras importantes características da quitina, tornando-a aplicável em áreas farmacêuticas e médicas. Contudo, são os derivados da quitina, especialmente a quitosana, que têm despertado interesses tecnológicos e econômicos. Esses por sua vez, podem ser obtidos por ação enzimática de quitinases (AZEVEDO et al., 2007).

1.4. Quitinase

As quitinases são enzimas que catalisam a quebra da quitina. Possuem peso molecular variado de 20 a 90 kilodaltons (kDa) e são produzidas por diferentes organismos, incluindo bactérias, fungos, nematóides, insetos, plantas, peixes e humanos (GOHEL *et al.*, 2006; HAMID et al., 2013).

Para que a total degradação enzimática da quitina ocorra, as quitinases agem como um sistema quitinolítico sinérgico e consecutivo (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). Desse modo, existem diversos tipos da enzima, que são classificadas quanto ao mecanismo catalítico e estrutura molecular (HAMID et al., 2013).

Dois grandes grupos envolvem as quitinases de mecanismos catalíticos diferentes: as endoquitinases e as exoquitinases (Figura 4).

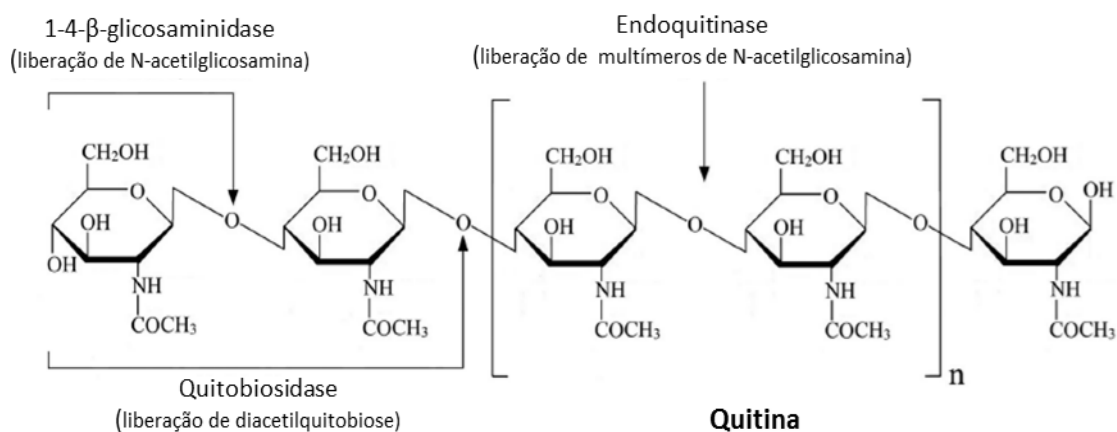


Figura 4. Ação de endoquitinases e exoquitinases. As endoquitinases atuam clivando aleatoriamente sítios internos da quitina, produzindo multímeros de N-acetilglicosamina de baixo peso molecular. As exoquitinases por sua vez, são divididas em dois subgrupos: quitobiosidases, que clivam a quitina a partir da extremidade não redutora liberando diacetilquitobiose (dímero de N-acetilglicosamina); e 1-4-β-glicosaminidase, que clivam os oligômeros da quitina liberados pelas endoquitinases e quitobiosidases produzindo monômeros GlcNAc. **Fonte:** adaptado de Stoykov et al., (2014).

Quanto à estrutura molecular, as quitinases são agrupadas em famílias de acordo com a sequência de aminoácidos, integrando assim, as famílias 18, 19 e 20 das glicosil hidrolases. Quitinases de famílias diferentes apresentam sequências de aminoácidos diferentes e conseqüentemente estruturas tridimensionais diferentes (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). As quitinases da família 18, por exemplo, possuem um domínio catalítico organizado em 8 α -hélices e 8 folhas- β , enquanto que as quitinases da família 19 possuem um domínio catalítico com alto conteúdo de α -hélices (STOYKOV et al., 2014).

Dentro das famílias 18 e 19 existem ainda 5 classes de quitinases (Figura 5), classes I, II e IV pertencentes a família 19 e classes III e V pertencentes a família 18. As classes se diferem principalmente quanto ao sítio de ligação à quitina e quanto ao domínio catalítico (HAMID et al., 2013).

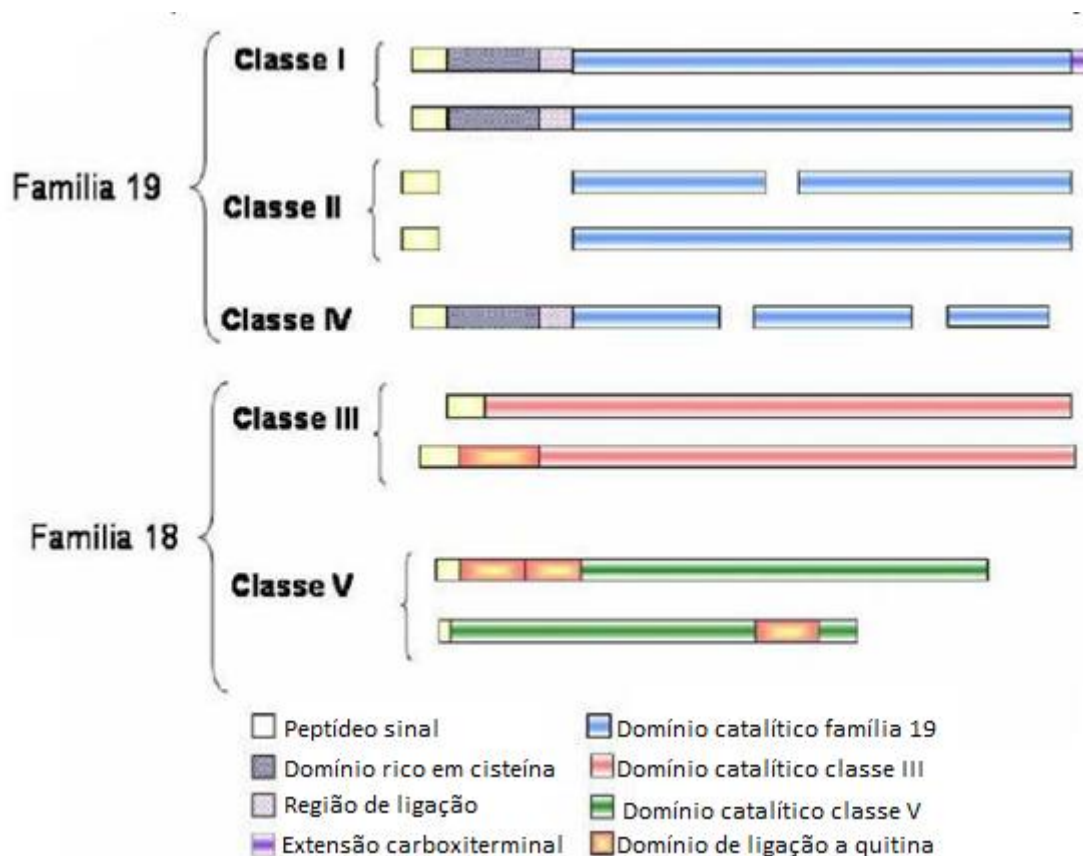


Figura 5. Classificação de quitinases quanto a sequência de aminoácidos. As quitinases que integram as famílias enzimáticas 18 e 19 das glicosil hidrolases são subclassificadas em cinco classes. **Fonte:** Galante (2008).

Quitinases de vírus, fungos, bactérias, insetos e de algumas plantas compõem a família 18 das glicosil hidrolases (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; HAMID et al., 2013) Enquanto que quitinases de plantas e de bactérias *Streptomyces* compõem a família 19 (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; HAMID et al., 2013). Já a família 20 é composta por quitinases de humanos, do ameboide *Dictyostelium discoideum* e da bactéria *Vibrio harveyi* (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000).

1.4.1. Quitinases bacterianas

Enquanto plantas produzem quitinases para defesa contra patógenos, e artrópodes para o processo de degradação da cutícula em seus diferentes estágios larvais, as bactérias produzem quitinases para obtenção de nutrientes a partir da molécula de quitina (GOHEL et al., 2006).

Uma vez que a degradação enzimática da quitina é realizada por um sistema quitinolítico sinérgico e consecutivo, as bactérias utilizam diferentes tipos de quitinases, que atuam em diferentes locais no espaço celular para poderem catalisar a quebra completa do polissacarídeo (Figura 6).

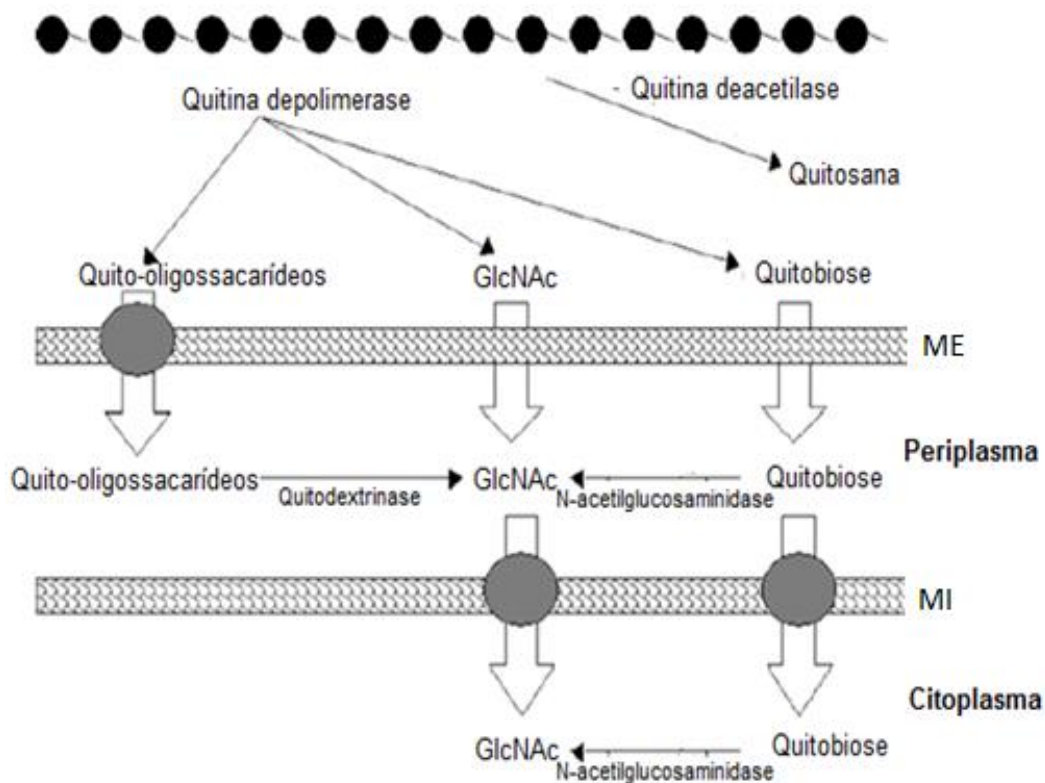


Figura 6. Degradação da quitina por bactérias e fungos. A reação se inicia com quitina depolimerases (classificadas como endoquitinases) que agem extracelularmente sobre a quitina, convertendo-a em GlcNAc, quitobiose e quito-oligossacarídeos. Esses componentes entram então no espaço periplasmático celular, onde quitodextrinases e N-acetilglucosaminidases (ambas classificadas como 1-4- β -glicosaminidase), agem convertendo produtos da quitina depolimerase em GlcNAc's. Algumas bactérias e fungos também produzem quitina deacetilases, que catalisam a reação de desacetilação da quitina por meio do rompimento de ligações N-acetil, convertendo-a em quitosana. ME e MI representam a bicamada lipídica da membrana citoplasmática. Sendo, ME a membrana externa em contato com o meio extracelular e MI a membrana interna em contato com o citoplasma celular. **Fonte:** adaptado de Howard et al., (2003).

Diversas espécies bacterianas foram relatadas como produtoras de quitinases. Bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. alvei*, *B. brevis*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. macerans* e *B. thuringiensis* por Cody (1989); *Vibrio furnissii* por Bassler et al., (1991); *Enterobacter agglomerans* por Chernin et al., (1995); *Pseudomonas aeruginosa* por Gupta et al., (2006); *Paenibacillus illinoisensis* por Jung et al., (2008); *Aeromonas hydrophila* por Halder et al., (2012). Outros gêneros bacterianos como *Serratia* e *Streptomyces* também já foram relatadas como quitinolíticas (BHATTACHARYA; NAGPURA; GUPTA, 2007).

1.4.2. Métodos de bioprospecção de bactérias quitinolíticas

A primeira etapa na execução de uma atividade bioprospectiva é a busca pelos locais de encontro da biomolécula ou do organismo desejado. As bactérias estão presentes nos mais diversos ambientes, sendo eles, aquáticos, terrestres e até mesmo ambientes com condições extremas de temperatura, pH e salinidade (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). Assim, especificamente para o encontro de bactérias produtoras de quitinase, locais de depósito de quitina são os mais promissores (Tabela 3). Rizosferas de plantas e regiões litorâneas, por exemplo, são bons ambientes a serem explorados devido a presença de insetos e crustáceos, respectivamente (STOYKOV et al., 2014).

Tabela 3. Locais de encontro de bactérias produtoras de quitinase.

Ambientes	Espécies quitinolíticas encontradas	Referências
Rizosfera de videira	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Chernin et al., (1995)
Solo de dunas litorâneas	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Streptomyces sp.</i>	Boer et al., (1998)
Água do mar	<i>Vibrio mimicus</i>	Souza et al., (2009)
Depósito de casca de camarão	<i>Streptomyces sp.</i>	Kumaran et al., (2012)

Coletas de amostras ambientais são então realizadas nos locais designados para a prospecção e a partir delas é feito uma triagem em busca de bactérias produtoras da enzima de interesse. Para bactérias cultiváveis, a triagem é efetuada em meios de cultura sólidos e no caso das bactérias produtoras de quitinase, os meios de cultura são acrescidos com quitina, substrato da enzima, permitindo a identificação e seleção dos microrganismos de interesse (HOWARD et al., 2003). Diferentes formas do substrato podem ser utilizadas no meio de cultura, as mais comuns são a quitina coloidal, a quitina azure (quitina coloidal acrescida com o corante Violeta Brilhante 5R Remazol) e a etileno glicol quitina (ECG) (THOMPSON et al., 2001).

As quitinases secretadas pelas bactérias durante o cultivo se difundem pelo meio de cultura e degradam a quitina, formando halos transparentes ao redor das colônias produtoras da enzima. Na triagem em meios de cultura sólidos é a presença desses halos que indicam bactérias como sendo quitinolíticas. Para facilitar a visualização dos halos, a quitina coloidal pode ser corada com Calcofluor White M2R, um corante fluorescente que se liga à quitina, enquanto a ECG pode ser corada tanto com o Calcofluor quanto com azul de tripan (HOWARD et al., 2003, VAIDYA et al., 2003).

Uma vez selecionadas, as bactérias são devidamente estocadas e suas quitinases podem ser caracterizadas quanto ao tamanho, por eletroforese com gel de poliacrilamida em condições desnaturantes ou não-desnaturantes, ou por zimografia (TRUDEL; ASSELIN, 1989). A atividade enzimática por sua vez, pode ser avaliada pela detecção dos produtos enzimáticos, empregando metodologias como as descritas por Miller (1959) e Sandhu, Wadhwa e Bagga (1989), que utilizam respectivamente, os reagentes colorimétricos dinitrosalicílico (DNS) e dimetilaminobenzaldeído (DMAB). Aplicações desejadas são então realizadas em ensaios utilizando tanto as enzimas quanto os microrganismos produtores.

1.4.3. Aplicações das quitinases

Enzimas que despertam interesses industriais são principalmente aquelas que hidrolisam polímeros insolúveis (MANDIGAN et al., 2012). As quitinases estão entre essas enzimas, possuindo uma gama de aplicações que vão desde a degradação eficiente e não poluente de resíduos quitinosos (grandes poluidores de regiões costeiras), até o combate de fitopatógenos, sendo esses, fungos (por possuírem quitina na parede celular), ou insetos (por possuírem quitina no exoesqueleto) (KUMAR, 2000; DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; GOHEL et al., 2006).

Os produtos da ação enzimática sobre a quitina também possuem aplicações. Os monômeros GlcNAc, por exemplo, são utilizados em produtos alimentícios como pré-bióticos, promovendo o crescimento de bifidobactérias (KUMAR, 2000). Alguns quitooligosacarídeos, por sua vez, podem ser utilizados em curativos, mimetizando a estrutura ordenada do tecido e facilitando a agregação de plaquetas (OKAMOTO et al., 2003). Já a quitosana, assim como a quitina, possui propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de ser um ótimo agente adsortivo, podendo ser integrado a biomateriais, compor sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos e até ser utilizada como agente de remediação ambiental (KUMAR, 2000).

Aplicações de quitinases bacterianas são amplamente descritas na literatura, principalmente para o biocontrole fungos (Tabela 4) e insetos fitopatogênicos.

Tabela 4. Exemplos de bactérias quitinolíticas usadas no biocontrole de fungos fitopatogênicos.

Espécie bacteriana quitinolítica	Fungo fitopatogêno	Planta hospedeira
<i>Pseudomonas fluorescens</i> V061	<i>Pythium ultimum</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
<i>Bacillus subtilis</i> BACT-D	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Tomate
<i>Paenibacillus</i> sp. 300	<i>Fusarium oxysporum</i>	Pepino
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> AB244	<i>Pythium</i> spp.	Milho doce
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS358	<i>Fusarium oxysporum</i>	Linho
<i>Pseudomonas putida</i> BTP1	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Pepino
<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Pythium ultimum</i>	Pepino
<i>Bacillus brevis</i>	<i>Fusarium udum</i>	Ervilha-de-pombo

Fonte: adaptado de Gohel et al., (2006).

Boer et al., (1998) relataram *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Streptomyces* produtores de quitinase que inibiram o crescimento dos fungos *Fusarium culmorum*, *Mucor hiemalis* e *Phoma exigua*. Enquanto Yan et al., (2011) relataram uma quitinase produzida por *Bacillus subtilis* SL-13 que causou a morte de células de uma colônia do fungo *Rhizoctonia solani* (Figura 7).

Em relação ao biocontrole de insetos, Nurdebyandaru, Mubbarik e Prawasti (2010) isolaram uma bactéria gram-positiva, cuja quitinase foi capaz de degradar a quitina do

exoesqueleto do piolho-do-algodão, *Aphis gossypii*. E Chandrasekaran et al., (2012), estudando uma quitinase de *Bacillus subtilis*, observaram que a enzima era capaz de causar a morte de larvas de *Spodoptera litura* (Figura 7).

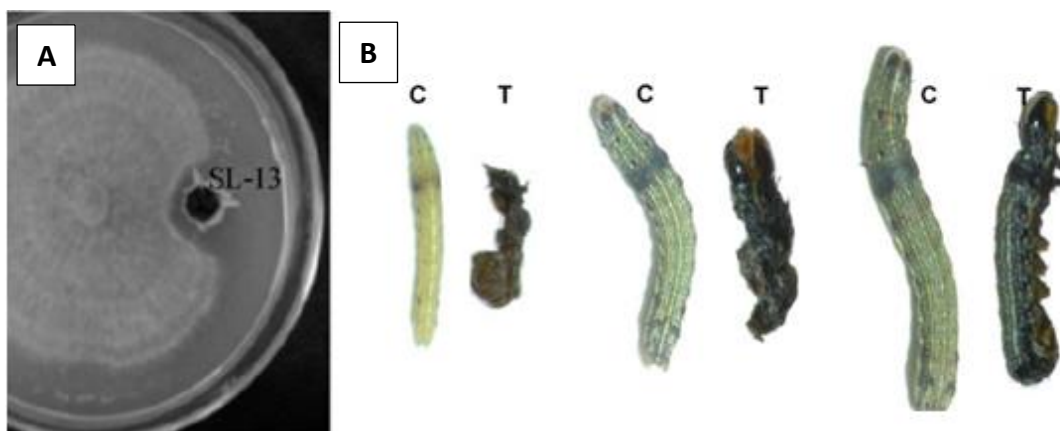


Figura 7. Aplicações de quitinases bacterianas em fungos e insetos fitopatogênicos. (A): Quitinase produzida por *Bacillus subtilis* SL-13, representada por SL-13 na figura, usada no combate do fungo *Rhizoctonia solani* no trabalho de Yan et al., (2011). (B): Quitinase produzida por *Bacillus subtilis* utilizada no combate de diferentes estágios de desenvolvimento das larvas *Spodoptera litura* no trabalho de Chandrasekaran et al., (2012). As larvas não tratadas com a enzima estão indicadas pela letra C, enquanto as larvas tratadas com a enzima estão indicadas pela letra T.

Observa-se desse modo, o potencial de aplicação das quitinases, sendo promissora a bioprospecção da enzima e de seus produtores.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Bioprospectar bactérias quitinolíticas em solos brasileiros e caracterizar a enzima quitinase produzida pelo melhor isolado bacteriano quanto aos padrões de atividade enzimática.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar e isolar bactérias produtoras de quitinase em amostras de solo coletadas de rizosferas e regiões litorâneas;
- Caracterizar os isolados quanto à morfologia e coloração de Gram;
- Determinar o índice enzimático dos isolados bacterianos e selecionar o melhor dentre esses;
- Avaliar a atividade enzimática do melhor isolado bacteriano;
- Determinar as condições ótimas de tempo de atividade, temperatura e pH da quitinase produzida pelo melhor isolado bacteriano.

3. Metodologia

3.1. Seleção e isolamento de bactérias produtoras de quitinase

A primeira etapa da pesquisa foi direcionada na prospecção e obtenção das bactérias quitinolíticas. As amostras de solo foram coletadas e inoculadas em meio de cultura sólido contendo quitina coloidal, em seguida, as bactérias que cresceram formando halos de degradação de quitina foram selecionadas e isoladas.

3.1.1. Coleta das amostras de solo

As amostras de solo utilizadas no estudo foram coletadas em rizosferas de plantas, na cidade de Correntinho (Minas Gerais), e em solos que continham restos de caranguejo e camarão, nas cidades de Capão da Canoa (Rio Grande do Sul) e Laguna (Santa Catarina). A coleta ocorreu com cerca de 10 cm de profundidade em relação à superfície e as amostras foram armazenadas a temperatura ambiente em tubos do tipo Falcon esterilizados.

Foram coletadas 17 amostras, as quais foram codificadas em função dos locais de coleta e estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Locais de coleta das amostras de solo.

Amostras de solo	Região	Coordenadas geográficas	
		Latitude	Longitude
MG-RZ 1	Rizosfera de plantas, Correntinho, MG	18°40'32" Sul	42°46'28" Oeste
MG-RZ 2	Rizosfera de plantas, Correntinho, MG	18°40'32" Sul	42°46'28" Oeste
RS-PC 1	Praia do Curumim, Capão da Canoa, RS	29°37' 25" Sul	49°56'7" Oeste
RS-PC 2	Praia do Curumim, Capão da Canoa, RS	29°37'28" Sul	49°56'3" Oeste
RS-PC 3	Praia do Curumim, Capão da Canoa, RS	29°38'0" Sul	49°56'24" Oeste
SC-PT 1	Praia da Teresa, Laguna, SC	28°29'45" Sul	48°45'44" Oeste

SC-PT 2	Praia da Teresa, Laguna, SC	28°29'42" Sul	48°45'49" Oeste
SC-PT 3	Praia da Teresa, Laguna, SC	28°28'55" Sul	48°45'56" Oeste
SC-LAG 3	Laguna, SC	28°29'30" Sul	48°46'49" Oeste
SC-LAG 4	Laguna, SC	28°36'30" Sul	48°51'37" Oeste
SC-LAG 5	Laguna, SC	28°36'29" Sul	48°51'36" Oeste
SC-LAG 6	Laguna, SC	28°29'51" Sul	48°45'15" Oeste
SC-LAG 7	Laguna, SC	28°29'41" Sul	48°44'60" Oeste
SC-LAG 8	Laguna, SC	28°31'22" Sul	48°46'22" Oeste
SC-LAG 9	Laguna, SC	28°31'50" Sul	48°46'45" Oeste
SC-LAG 10	Laguna, SC	28°31'27" Sul	48°45'48" Oeste
SC-LAG 11	Laguna, SC	28°31'28" Sul	48°45'47" Oeste

3.1.2. Quitina coloidal

A quitina coloidal, preparada de acordo com o protocolo descrito por Souza et al., (2009), foi o tipo de substrato escolhido para ser incrementado ao meio de cultura nas etapas de seleção das bactérias quitinolíticas e produção enzimática. Para sua obtenção, 5 g de quitina em pó (Sigma-Aldrich®) foram adicionados à 60 mL de ácido clorídrico 37% (HCl) e mantidos a temperatura ambiente sob agitação vigorosa durante uma hora. A preparação foi então filtrada em lã de vidro para reter frações da quitina que não foram dissolvidas, sendo adicionada depois a 200 mL de etanol 50%, também sob agitação vigorosa. Por fim, adicionou-se 1 L de água destilada para a

lavagem da quitina. Após a decantação da quitina, a água destilada foi trocada constantemente até atingir um pH próximo a 7. A quitina coloidal foi estocada à 4 °C.

3.1.3. Meio de cultura

O meio de cultura sólido (Figura 8), utilizado na seleção e isolamento de bactérias produtoras de quitinase, foi preparado segundo Kamil et al., (2007) com modificações, sendo composto em m/v por: 0,6% de fosfato dissódico (Na_2HPO_4); 0,3% de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4); 0,1% de cloreto de amônio (NH_4Cl); 0,05% de cloreto de sódio (NaCl); 0,005% de extrato de levedura; 1,5% de ágar; 1% de quitina coloidal; e 0,001% do corante Calcofluor White M2R (1 g/L; Sigma-Aldrich®). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave à 120 °C por 15 minutos e vertido em placas de Petri esterilizadas.

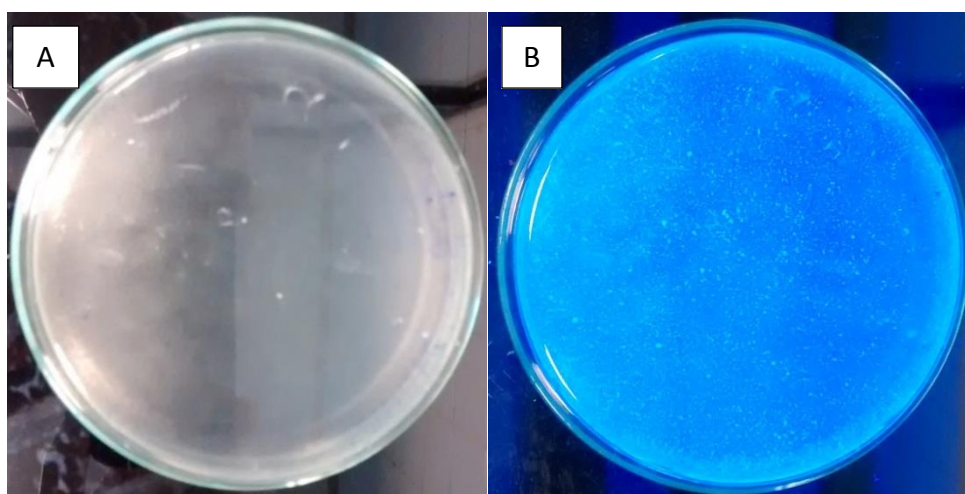


Figura 8. Meio de cultura corado com calcofluor. (A): em luz ambiente. (B): em luz ultra-violeta (UV). A fluorescência indica a presença de quitina.

3.1.4. Preparo e inoculação das amostras de solo

As dezessete amostras de solo foram primeiro processadas em solução aquosa para então serem inoculadas no meio de cultura. Para isto, 1 g de cada amostra foi adicionado à 10 mL de água destilada, homogeneizado em vórtex por 1 minuto e deixado em repouso à temperatura ambiente por 45 minutos. Em seguida, as soluções foram submetidas à temperatura de 80 °C em banho-maria por 10 minutos, seguido por uma breve homogeneização em vórtex. Um volume de 100 µL das amostras processadas foi então inoculado no meio de cultura contendo quitina coloidal, e

espalhado com o auxílio de pérolas de vidro esterilizadas. O cultivo dos inóculos ocorreu em estufa a 30°C por 72 horas.

3.1.5. Seleção e repique de bactérias quitinolíticas

As colônias bacterianas que cresceram formando halos transparentes no meio de cultura, indicando a degradação de quitina e por meio da produção de quitinase (Figura 9), foram selecionadas e repicadas em novas placas de Petri contendo o meio de cultura.



Figura 9. Repiques de colônias bacterianas em meio de cultura contendo quitina coloidal. As áreas transparentes indicam a degradação de quitina pela quitinase produzida pelas colônias bacterianas.

Os repiques, realizados com a técnica de esgotamento em estrias múltiplas, ocorreram sucessivamente até a obtenção de colônias bacterianas isoladas. As bactérias repicadas foram cultivadas em estufa a 30 °C por 72 horas, enquanto que as isoladas foram dissolvidas em 200 µL de água destilada esterilizada e adicionadas em 1 g de solo esterilizado (contido em tubos do tipo Eppendorf) para estocagem.

3.2. Caracterização morfo-tintorial

A caracterização morfo-tintorial das bactérias isoladas foi realizada por análise morfológica das células e pela coloração de Gram. Para corar as colônias, amostras de cada isolado foram primeiro, fixadas em lâminas de vidro. Em seguida foram adicionados sobre as lâminas, em ordem: cristal violeta, por 1 minuto; lugol, por 1 minuto; solução decolorante; e fucsina fenicada, por 30 segundos. Entre a adição de cada

um dos reagentes citados, as lâminas foram lavadas suavemente com água. A visualização das células bacterianas foi realizada por microscopia óptica com captura de imagens em microscópio Leica ICC50 HD.

3.3. Índice enzimático

O índice enzimático (IE), que indica preliminarmente a capacidade de produção enzimática pelos isolados bacterianos, foi calculado pela relação entre o diâmetro do halo de degradação da quitina e o diâmetro das colônias bacterianas.

Para tal, utilizando o multi-inoculador de Steer (Figura 10), inoculou-se 25 μL das bactérias isoladas crescidas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), em placas de Petri contendo o meio de cultura com quitina coloidal. O cultivo ocorreu em estufa a 30 °C por 72 horas, medindo-se os diâmetros dos halos de degradação de quitina e das colônias após o período.

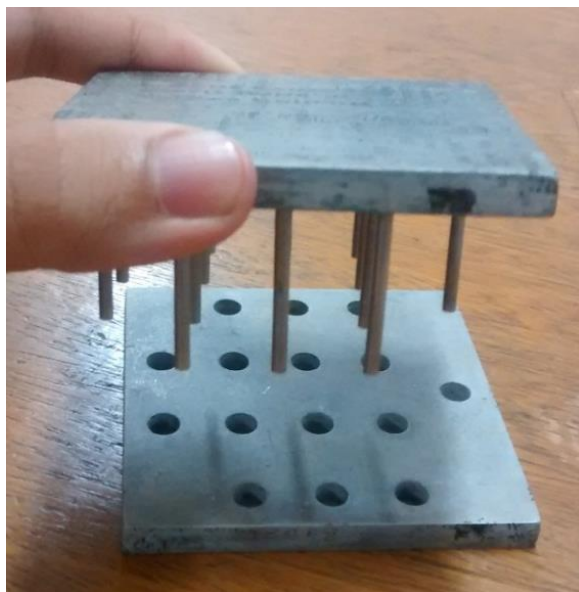


Figura 10. Multi-inoculador de Steer. O instrumento foi utilizado na inoculação dos isolados bacterianos em meio de cultura com quitina coloidal para os testes de índice enzimático.

3.4. Caracterização enzimática

A caracterização enzimática foi realizada para a quitinase produzida e secretada pelo melhor isolado bacteriano, selecionado a partir dos resultados de índice enzimático. Assim, a produção enzimática foi realizada para obtenção da enzima quitinolítica, que por sua vez, foi caracterizada quanto aos padrões de atividade enzimática.

3.4.1. Produção enzimática

Antes da caracterização enzimática, foi realizada a produção enzimática para obtenção da quitinase produzida pelo isolado bacteriano selecionado. A produção foi realizada em meio de cultura líquido descrito por Yamaguchi (2003), que apresenta composição diferente em relação ao meio de cultura descrito por Kamil et al., (2007), utilizado na etapa de seleção e isolamento das bactérias quitinolíticas (Tabela 5). O meio descrito por Yamaguchi (2003) é composto em m/v por: 0,4% de extrato de levedura; 0,2% de triptona; 0,5% de sulfato de magnésio ($MgSO_4$); 0,12% de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4); 0,28% de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4); e 1,5% de quitina coloidal.

Tabela 5. Composição dos meios de cultura descritos por Kamil et al., (2007) e Yamauchi (2003).

Meio de cultura descrito por Kamil et al., (2007)	Meio de cultura descrito por Yamaguchi (2003)
0,6% de fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	0,2% de triptona
0,1% de cloreto de amônio (NH_4Cl)	0,5% de sulfato de magnésio ($MgSO_4$)
0,05% de cloreto de sódio ($NaCl$)	0,12% de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4)
0,3% de fosfato bibásico de potássio (K_2HPO_4)	0,28% de fosfato bibásico de potássio (K_2HPO_4)
0,005% de extrato de levedura	0,4% de extrato de levedura
1% de quitina coloidal	1,5% de quitina coloidal

Desse modo, o isolado estocado em solo, foi primeiramente reativado em 10 mL de caldo BHI para posteriormente ser inoculado e cultivado em meio de cultura de Yamaguchi (2003), acrescido com 1,5% (m/v) de ágar. O cultivo no meio sólido foi realizado por 24 horas em estufa a 30 °C. Após esse período, uma alçada da colônia bacteriana crescida foi inoculada em 10 mL do meio de cultura Yamaguchi líquido e incubada por 24 horas em *shaker* a 30 °C e 150 rpm (rotações por minuto). Esse pré-

inoculo foi então vertido em 90 mL do meio de cultura líquido contido em frasco do tipo Erlenmeyer de 500 mL, dando início à produção enzimática em si.

A produção ocorreu em *shaker* a 30 °C, 150 rpm por 120 horas. O sobrenadante da cultura (extrato bruto), foi coletado a cada 24 horas, centrifugando-se 5 mL do cultivo a 10.000 x g, 4 °C, por 15 minutos. O volume de 5 mL coletados diariamente foram repostos com meio de cultura esterilizado. Todos os procedimentos dessa etapa foram conduzidos em câmara de fluxo laminar com materiais esterilizados em autoclave à 120 °C por 15 minutos. A Figura 11 esquematiza a etapa de produção enzimática.

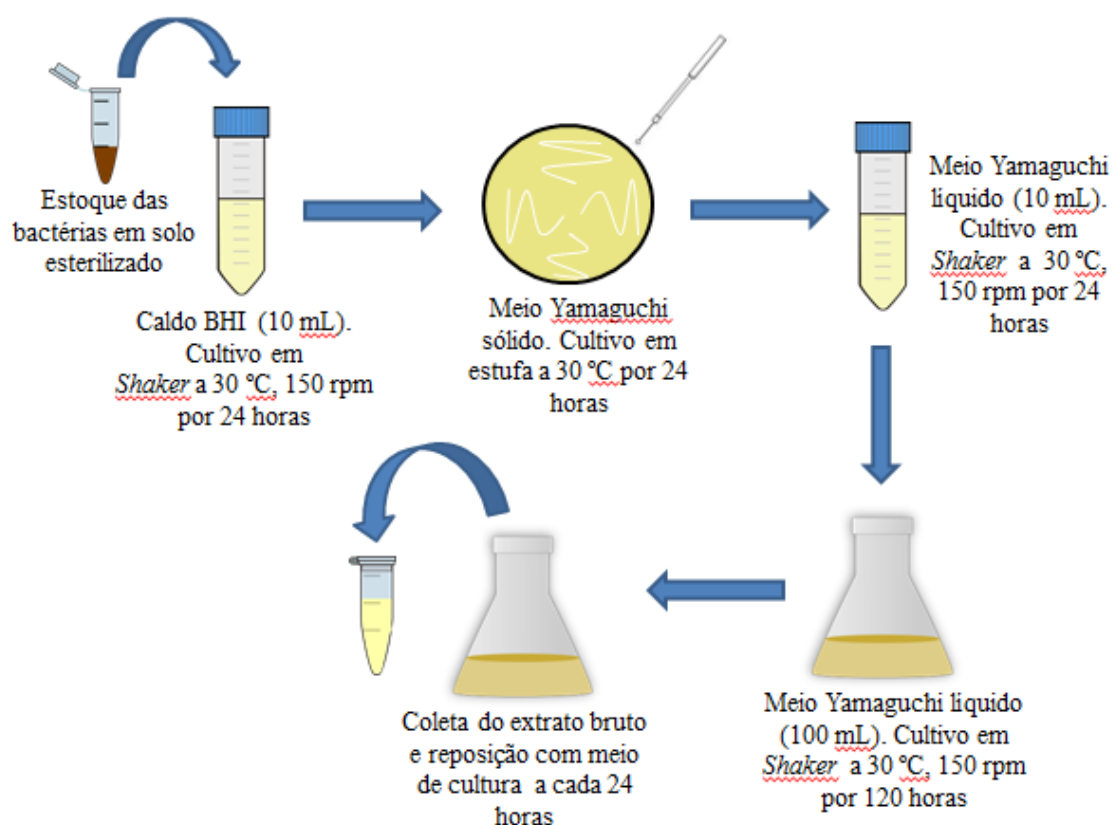


Figura 11. Produção enzimática. O isolado bacteriano utilizado nessa etapa foi primeiramente reativado em caldo *Brain Hearted Infusion* (BHI), para depois ser empregado nas etapas de produção com o meio de cultura descrito por Yamaguchi (2003). Os extratos brutos foram coletados por centrifugação e o volume foi repostado com meio de cultura esterilizado.

3.4.2. Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Miller (1959), utilizando o reagente colorimétrico dinitrosalicílico (DNS) na detecção

dos açúcares redutores produzidos pela ação da quitinase sobre a quitina coloidal. Para a reação enzimática, foram utilizados os extratos brutos coletados diariamente durante a produção, com a finalidade de verificar o período de maior atividade enzimática.

3.4.2.1. Preparo do reagente dinitrosalicílico

Para o preparo do reagente DNS, 10 g de ácido dinitrosalicílico foram dissolvidos em 200 mL de hidróxido de sódio 2M (NaOH), a solução foi misturada sob aquecimento a 70 °C. Outra solução foi preparada dissolvendo-se 300 g de tartarato de sódio e potássio (Sal de Rochelle) em 500 mL de água destilada. Por fim, a solução de ácido dinitrosalicílico foi adicionada lentamente à solução de tartarato de sódio e potássio e o volume final foi completado para 1000 mL com água destilada.

3.4.2.2. Reação enzimática

A reação enzima-substrato foi realizada seguindo protocolo de Lima et al., (2001). Para tal, 1 mL dos extratos brutos coletados foram misturados com 1 mL de quitina coloidal 0,5% em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. A reação foi incubada a 37 °C em banho-maria por seis horas.

Após esse período, foram retiradas alíquotas de 200 µL das reações, às quais foram adicionados 1mL do reagente DNS. A mistura foi então aquecida em banho-maria fervente por 10 minutos para proporcionar a mudança de cor, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm. O branco para medida de absorbância foi realizado a partir da mistura da solução de quitina coloidal 0,5%, descrita anteriormente, com o sobrenadante do meio de cultura de Yamaguchi (2003) esterilizado.

Para quantificar a atividade enzimática, uma curva padrão de N-acetilglicosamina (Sigma-Aldrich®), foi construída com o reagente DNS nos mesmos moldes da reação enzimática. As concentrações de GlcNAc utilizadas na curva foram: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL e 400 µg/mL do açúcar. Os valores da atividade foram expressos em Unidades (U), em que uma Unidade representa 1µmol de açúcar redutor liberado por hora na reação.

3.4.2.3. Quantificação proteica

O conteúdo proteico dos extratos brutos utilizados nas reações de atividade enzimática foi quantificado pelo método colorimétrico de Bradford (1976), medindo-se a absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para o branco

da absorbância foi utilizado o sobrenadante do meio de cultura de Yamaguchi (2003) esterilizado. Os valores foram obtidos utilizando como referência, uma curva padrão construída com albumina nas concentrações de: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,062 mg/mL e 0,031 mg/mL. Os valores da quantificação proteica foram expressos em mg/mL.

3.4.3. Determinação das condições ótimas de atividade enzimática

As condições ótimas de atividade enzimática foram testadas quanto ao tempo, temperatura e pH, utilizando o extrato bruto coletado no período de maior atividade enzimática.

3.4.3.1. Tempo

O tempo de melhor atividade enzimática foi verificado realizando o ensaio descrito no tópico de reação enzimática (tópico 3.4.2.2), nos tempos: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas e 6 horas.

3.4.3.2. Temperatura

A temperatura de melhor atividade enzimática foi verificada realizando o ensaio descrito no tópico de reação enzimática (tópico 3.4.2.2), nas temperaturas: 30 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C.

3.4.3.3. pH

O pH de melhor atividade enzimática foi verificado realizando o ensaio descrito no tópico de reação enzimática (tópico 3.4.2.2), com soluções de quitina coloidal 0,5% preparadas nos tampões: citrato de sódio pH 3, pH 4, pH 5 e pH 6; fosfato pH 6, pH 7,4 e pH 8; e glicina-NaOH pH 8, pH 9 e pH 10. Todos os tampões foram preparados na concentração de 50 mM. Curvas padrões com N-acetilglicosamina foram construídas para os diferentes tampões.

3.5. Análises estatísticas

Os experimentos de índice enzimático e atividade enzimática foram realizados em triplicata. Assim, as diferenças estatísticas para até dois grupos amostrais foram calculadas com o Teste T considerando-se $p < 0,05$. Enquanto que as diferenças estatísticas para mais de três grupos amostrais foram calculadas com o teste ANOVA, considerando-se $p < 0,05$. Ambos os testes foram realizados com o software Microsoft Office Excel 2010.

4. Resultados

4.1. Seleção e isolamento de bactérias produtoras de quitinase e caracterização morfo-tintorial

A partir das amostras de solo analisadas, foram obtidos 13 isolados bacterianos produtores de quitinase, nomeados como Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9, Q11, Q12, Q13 e Q14.

A caracterização morfo-tintorial, verificada em microscopia óptica, revelou que todos os isolados possuem morfologia de bacilo e são bactérias gram-positivas, estando coradas em roxo (Figura 12).

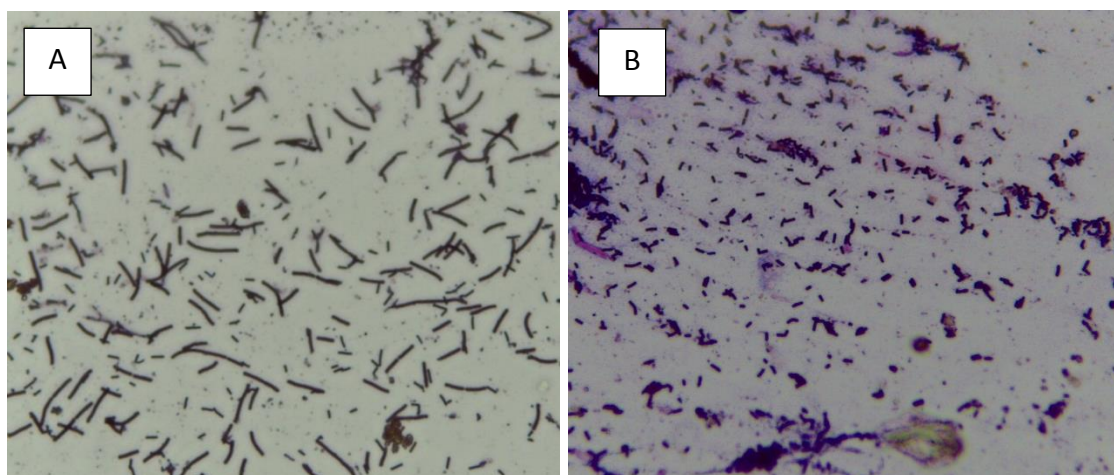


Figura 12. Isolados bacterianos produtores de quitinase visualizados em microscopia óptica com aumento de 400x. (A): isolado Q11. (B): isolado Q8.

Na Tabela 6 estão apresentados os isolados bacterianos assim como suas amostras origem e caracterização morfo-tintorial. Nota-se que as bactérias conseguidas foram isoladas de oito das dezessete amostras de solo coletadas. Sendo essas: MG-RZ 2 (três isolados); RS-PC 1 (um isolado); RS-PC 2 (um isolado); RS-PC 3 (um isolado); SC-PT 1 (um isolado); SC-LAG 5 (dois isolados); SC-LAG 10 (um isolado); e SC-LAG 11 (três isolados).

Tabela 6. Amostra origem dos isolados bacterianos produtores de quitinase e caracterização morfo-tintorial.

Isolados bacterianos	Amostra origem	Morfologia	Coloração de Gram
Q1	RS-PC 1	Bacilo	gram +
Q2	RS-PC 2	Bacilo	gram +
Q3	RS-PC 3	Bacilo	gram +
Q4	SC-PT 1	Bacilo	gram +
Q5	SC-LAG 5	Bacilo	gram +
Q6	SC-LAG 5	Bacilo	gram +
Q7	MG-RZ 2	Bacilo	gram +
Q8	MG-RZ 2	Bacilo	gram +
Q9	MG-RZ 2	Bacilo	gram +
Q11	SC-LAG 10	Bacilo	gram +
Q12	SC-LAG 11	Bacilo	gram +
Q13	SC-LAG 11	Bacilo	gram +
Q14	SC-LAG 11	Bacilo	gram +

4.2. Índice enzimático

Nomeadas e caracterizadas quanto a morfologia e coloração de Gram, os isolados foram então avaliados quanto ao índice enzimático. A partir da Figura 13, observa-se a diferença na capacidade produtiva de quitinase entre algumas das colônias bacterianas.

Os resultados de índice enzimático de cada um dos isolados bacterianos se encontram no gráfico da Figura 14.

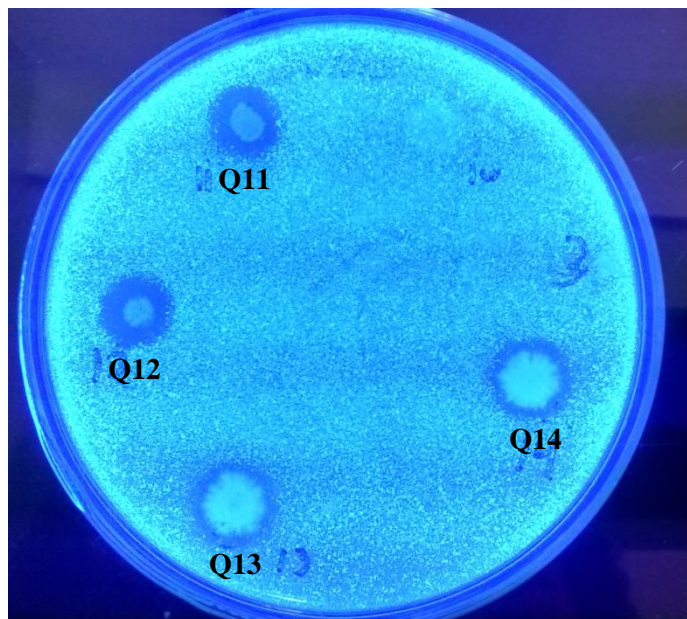


Figura 13. Experimento de índice enzimático com os isolados Q11, Q12, Q13 e Q14. As áreas transparentes indicam a degradação da quitina pela quitinase produzida pelos isolados bacterianos.

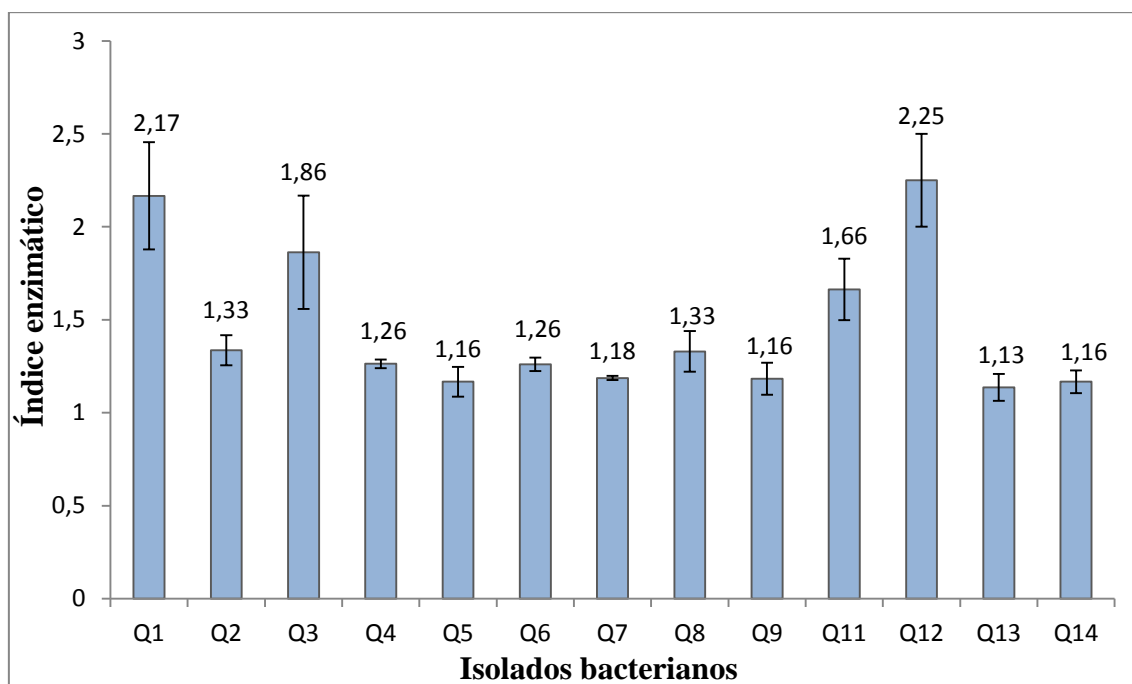


Figura 14. Índice enzimático dos isolados bacterianos em 72 horas de cultivo. Os valores são referentes à média da triplicata do experimento. As barras de erros representam os desvios padrões.

Como pode ser observado, quatro isolados bacterianos se destacaram dentre os demais apresentando maiores valores de índice enzimático, esses são: Q1 (RS-PC 1),

Q3 (RS-PC 3), Q11 (SC-LAG 10) e Q12 (SC-LAG 11). Os isolados Q1 e Q12, porém, foram os que obtiveram índices enzimáticos mais altos e bastante próximos, não havendo diferença estatística entre eles ao considerar o Teste T. Ambos os isolados foram cogitados para a caracterização enzimática, mas como Q1 foi identificado quanto sua espécie no trabalho de Soares (2016), foi então escolhido para os próximos passos.

4.3. Caracterização enzimática

O isolado bacteriano Q1, previamente identificado como *Paenibacillus illinoisensis*, foi selecionado para os testes de caracterização de sua quitinase quanto aos padrões de atividade enzimática. Para fins de confirmação dos dados, o isolado foi testado novamente quanto ao índice enzimático, mas dessa vez no meio de cultura de Yamaguchi (2003), utilizado na etapa de produção enzimática. O valor do índice enzimático foi de 2,67, valor maior do que o verificado no meio de cultura de Kamil et al. (2007).

4.3.1. Atividade enzimática

Os valores de atividade enzimática da quitinase produzida pela *P. illinoisensis* ao longo do tempo de produção, assim como os valores de quantidade de proteína dos extratos brutos utilizados, encontram-se representados na Tabela 7. A curva padrão de N-acetilglicosamina usada como referência para os valores de atividade enzimática apresentou $R^2 = 0,997$. Enquanto que a curva padrão de albumina usada como referência para os valores de quantificação proteica apresentou $R^2 = 0,991$.

Tabela 7. Atividade enzimática e quantificação proteica ao longo do período de produção enzimática com o isolado *Paenibacillus illinoisensis*.

Isolado bacteriano	Parâmetros	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Q1 (<i>P. illinoisensis</i>)	Atividade enzimática	0,07 U	0,07 U	0,098 U	0,08 U	0,078 U
	Quantidade de proteína	0,134 mg/mL	0,280 mg/mL	0,195 mg/mL	0,280 mg/mL	0,382 mg/mL

1U = 1 μ mol de açúcar redutor liberado por hora na reação quitinase-quitina coloidal.

Com exceção do período de 48 horas, a quantidade de proteína analisada aumentou gradativamente ao longo da produção enzimática. Entretanto, pode-se inferir que os valores de proteína obtidos não necessariamente referem-se à quitinase, já que não acompanharam os valores de atividade enzimática. Em relação a esses, observa-se que o período de maior atividade enzimática ocorreu em 72 horas de produção, dentro do intervalo de tempo analisado. Para melhor comparação dos dados de atividade, considerando os desvios padrões, os resultados são também apresentados no gráfico da Figura 15.

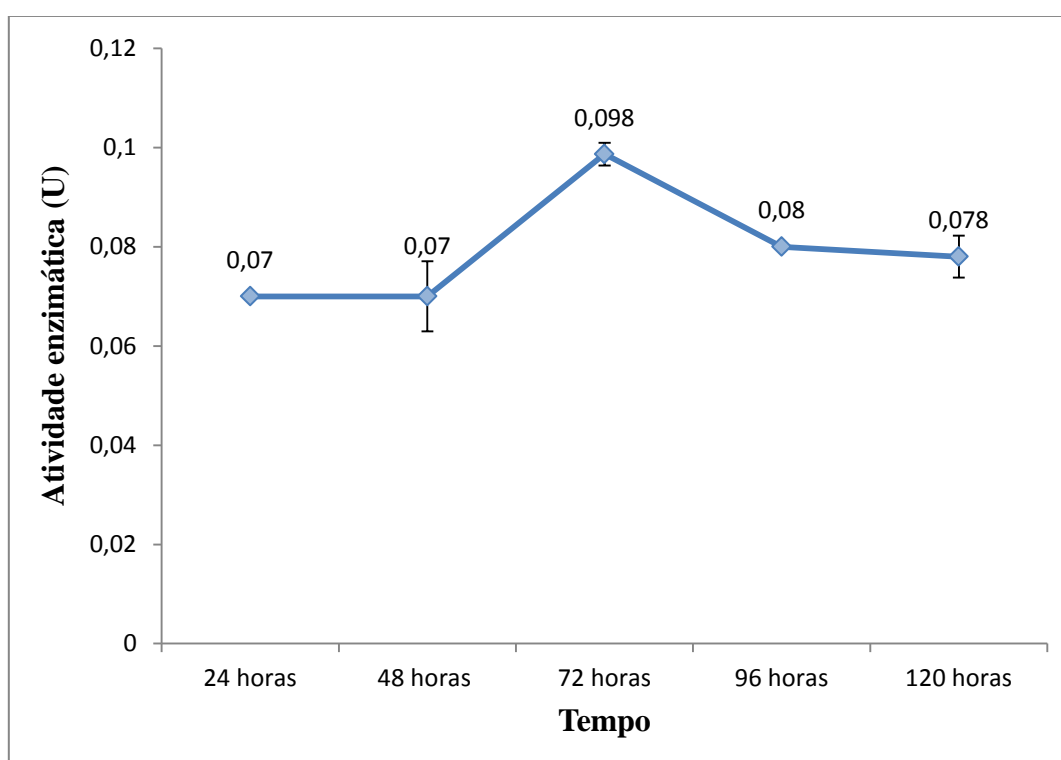


Figura 15. Atividade enzimática ao longo do tempo de produção com o isolado *Paenibacillus illinoisensis*. Os valores são referentes à média da triplicata do experimento e estão expressos em Unidade (U), em que uma Unidade representa 1 μmol de açúcar redutor liberado por hora na reação quitinase-quitina coloidal. As barras de erros representam os desvios padrões.

A atividade enzimática se manteve praticamente constante nos períodos de 24 e 48 horas, para depois alcançar seu auge em 72 horas de produção. Enquanto que nos períodos de 96 e 120 horas a redução da atividade foi observada. O tempo de produção de 72 horas de fato confirmou-se como o período de maior atividade, havendo diferença estatística entre os tempos analisados ao considerar o teste ANOVA.

4.3.2. Atividade enzimática em condições ótimas

Considerando que o isolado *P. illinoisensis* apresentou maior atividade enzimática da quitinase em 72 horas de produção, os extratos brutos coletados nesse período foram utilizados para os testes de condições ótimas de atividade.

4.3.2.1. Tempo

Os tempos de atividade enzimática analisados no ensaio foram 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. No gráfico da Figura 16, observa-se que com o passar do tempo, a quantidade de μmol de açúcar redutor liberado nas reações aumentou: 0,43 μmol em 1 hora; 0,45 μmol em 2 horas; 0,47 μmol em 3 horas; 0,56 μmol em 4 horas; 0,59 μmol em 5 horas; e 0,59 μmol em 6 horas.

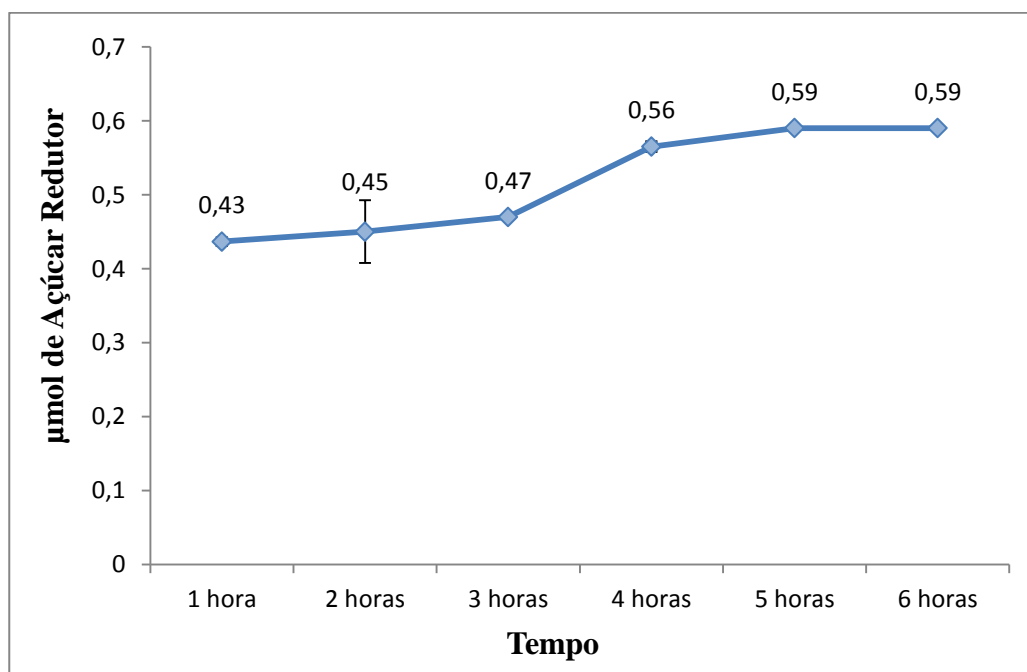


Figura 16. Quantidade de açúcar redutor liberado em diferentes tempos da reação quitinase-quitina coloidal. Os valores são referentes à média da triplicata do experimento. As barras de erros representam os desvios padrões.

Entretanto, como os resultados de atividade enzimática são expressos em Unidades, o tempo de reação é levado em consideração. Desse modo, como mostrado no gráfico da Figura 17, verifica-se que com o aumento do tempo de reação os valores de atividade enzimática diminuem. Sendo esses: 0,43 U em 1 hora; 0,225 U em 2 horas; 0,156 U em 3 horas; 0,141 U em 4 horas; 0,118 U em 5 horas; e 0,098 U em 6 horas. O tempo de melhor atividade enzimática foi determinado como sendo 1 hora de reação.

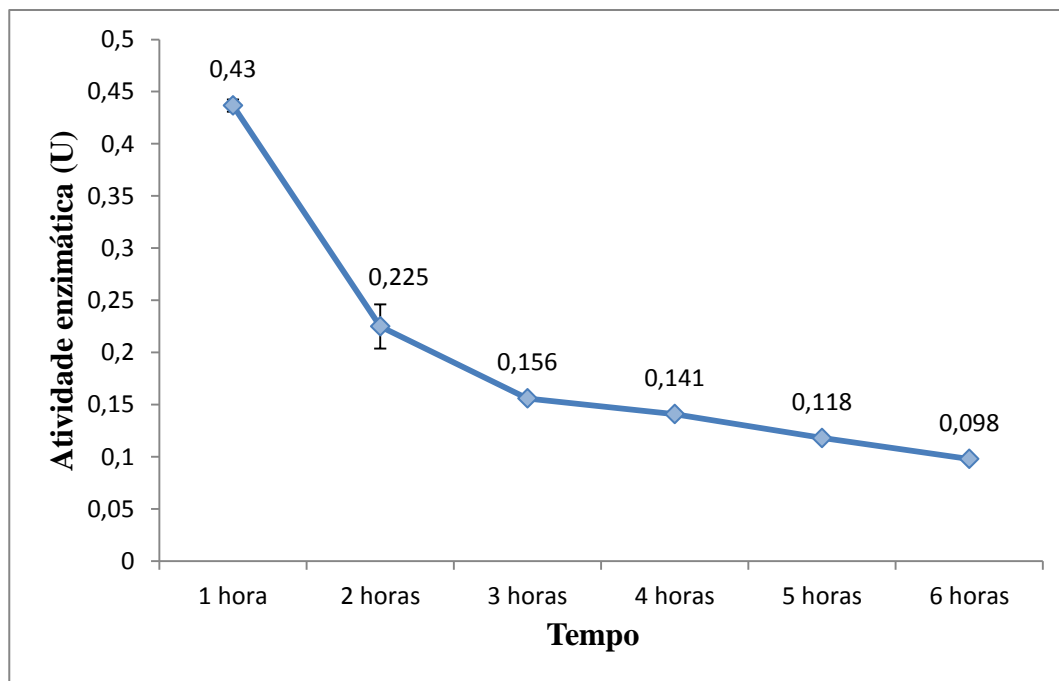


Figura 17. Atividade enzimática em diferentes tempos da reação quitinase-quitina coloidal. Os valores são referentes à média da triplicata do experimento e estão expressos em Unidades (U), em que uma Unidade representa $1\mu\text{mol}$ de açúcar redutor liberado por hora na reação quitinase-quitina coloidal. As barras de erros representam os desvios padrões.

4.3.2.2. Temperatura

Os valores de atividade enzimática obtidos em diferentes temperaturas, representados no gráfico da Figura 18, foram de: 0,087 U em 30 °C; 0,096 U em 37 °C; 0,071 U em 40 °C; 0,061 U em 50 °C; e 0,032 U em 60 °C.

A quitinase secretada pela *P. illinoisensis*, apresentou as melhores atividades quando sujeita às temperaturas de 30 °C e 37 °C. Porém, foi em 37 °C, temperatura escolhida para o início dos ensaios, que o maior valor foi obtido (havendo diferença estatística entre as atividades enzimáticas obtidas em 30 °C e 37 °C ao se considerar o Teste T). Já a partir de 40 °C, notou-se uma diminuição gradual na atividade, que caiu bastante, em relação à temperatura ótima, quando testada a 60 °C.

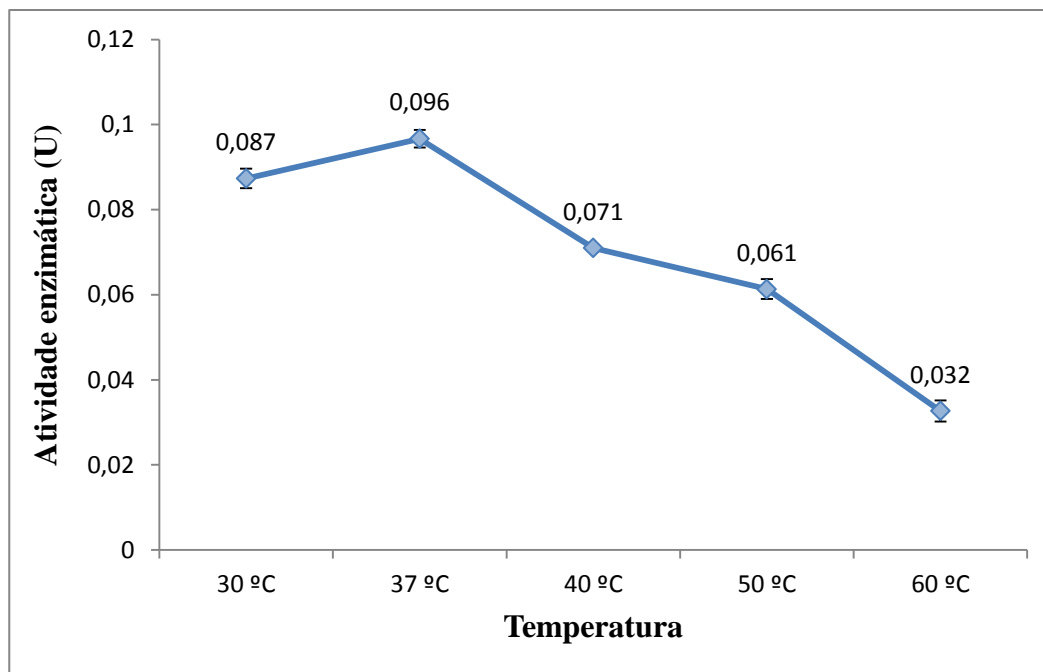


Figura 18. Atividade enzimática em diferentes temperaturas. Os valores são referentes à média da triplicata do experimento e estão expressos em Unidades (U), em que uma Unidade representa 1 μ mol de açúcar redutor liberado por hora na reação quitinase-quitina coloidal. As barras de erros representam os desvios padrões.

4.3.2.3. pH

Os valores de atividade enzimática em diferentes pHs, assim como os tampões utilizados, encontram-se representados no gráfico da Figura 19. As curvas padrões de N-acetilglicosamina preparadas com os tampões citrato de sódio, fosfato e glicina-NaOH apresentaram respectivamente, $R^2 = 0,999$, $R^2 = 0,997$ e $R^2 = 0,995$.

A quitinase produzida pela *P. illinoisensis* apresentou maior atividade enzimática em pH 4, com destaque também para a reação em pH 5. Ambos os valores foram consideravelmente superiores ao valor da atividade enzimática em pH 7,4, escolhido para o início dos ensaios. As atividades avaliadas em pH 3 e nos pHs básicos 8, 9 e 10, apresentaram os menores valores. É importante destacar, que além do pH, os tampões também interferiram na atividade enzimática. A reação em pH 8 com tampão fosfato por exemplo, apresentou atividade significativamente maior do que a reação em pH 8 com tampão glicina-NaOH.

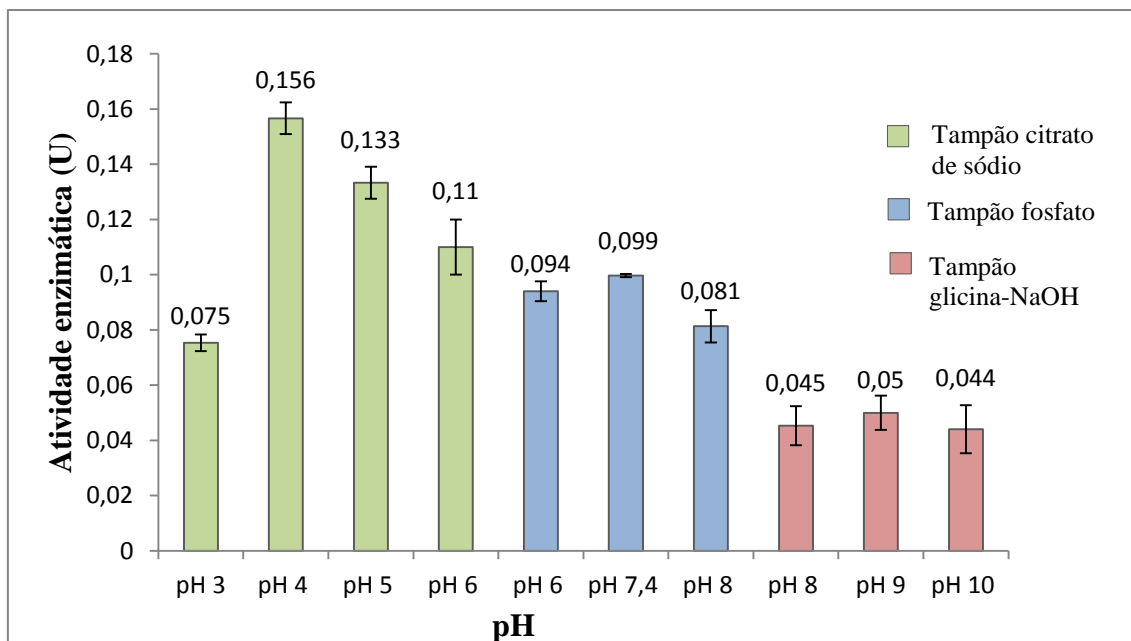


Figura 19. Atividade enzimática em diferentes pHs. Os valores são referentes à média da triplicata do experimento e estão expressos em Unidades (U), em que uma Unidade representa 1 μ mol de açúcar redutor liberado por hora na reação quitinase-quitina coloidal. As barras de erros representam os desvios padrões.

4.4. Atividade enzimática otimizada

Um ensaio de atividade enzimática foi realizado testando-se as condições ótimas estabelecidas. Desse modo, a reação enzimática, com a quitinase do isolado *P. illinoisensis* ocorreu por 1 hora, 37°C e em pH 4, com tampão citrato de sódio.

A atividade obtida foi de 0,66 U, um valor 573% maior que a atividade enzimática inicial de 0,098 U averiguada em 6 horas, 37°C e em pH 7,4, com tampão fosfato (Figura 20).

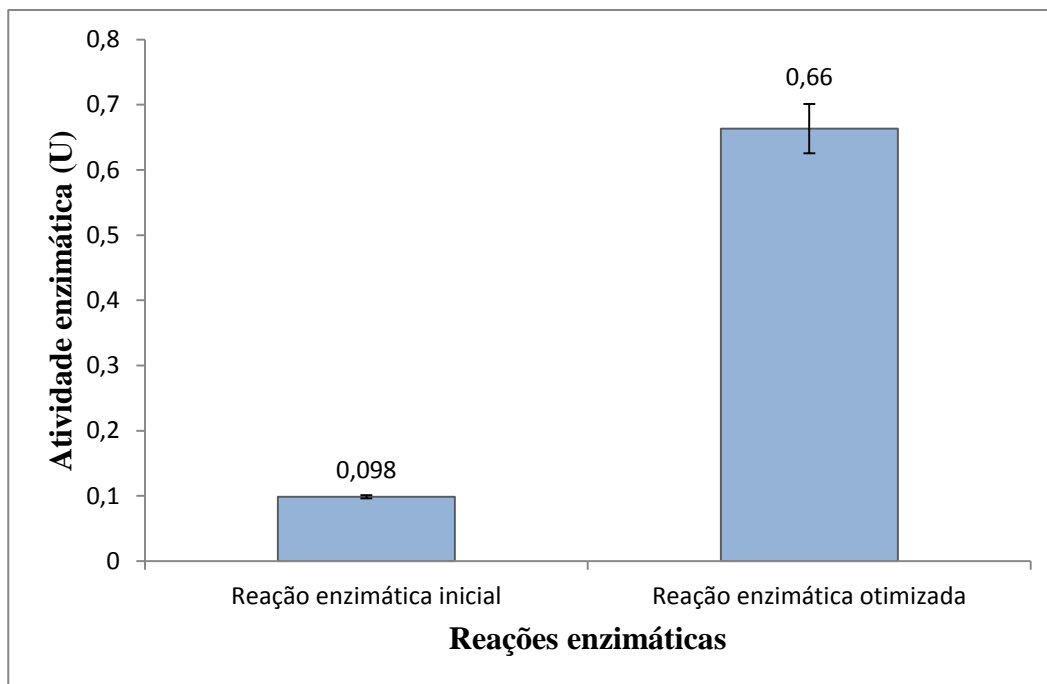


Figura 20. Atividades enzimáticas obtidas no início dos ensaios e em condições ótimas de reação. A reação enzimática inicial foi realizada por 6 horas, a 37 °C e em pH 7,4 com tampão fosfato. Enquanto que a reação enzimática otimizada foi realizada por 1 hora, a 37 °C e em pH 4 com tampão citrato de sódio. Os valores são referentes à média da triplicata do experimento e estão expressos em Unidades (U), em que uma Unidade representa 1 μ mol de açúcar redutor liberado por hora na reação quitinase-quitina coloidal. As barras de erros representam os desvios padrões.

5. Discussão

Com a prática da bioprospecção, a biodiversidade brasileira pode ser explorada de modo sustentável para o crescimento econômico do País. Desse modo, investigando solos de rizosferas de plantas, coletados no interior de Minas Gerais, e solos com restos de frutos do mar, coletados em regiões litorâneas do sul do País, foram obtidos 13 isolados bacterianos produtores de quitinase.

Apesar de terem sido obtidos um bom número de isolados, em mais da metade das amostras de solo analisadas não foi detectada a presença de bactérias quitinolíticas. Isso provavelmente, por causa da metodologia de processamento das amostras, em que ao aquecê-las à temperatura de 80 °C, podem ter sido eliminadas as formas vegetativas de células bacterianas, proporcionando o crescimento apenas das formas esporuladas (MORIYA; MÓDENA, 2008). Já em contraste, em amostras como MG-RZ 2 e SC-LAG 11, foram isoladas até três colônias bacterianas produtoras de quitinase, as quais acredita-se que sejam cepas ou espécies diferentes. Isso porque durante as fases de seleção e isolamento, foi observado que as colônias possuem formas e cores diferentes.

Por meio da caracterização morfo-tintorial, foi possível classificar todos os isolados como sendo bacilos gram-positivos. Bactérias quitinolíticas em morfologia de bacilos também foram predominantes nas atividades prospectivas de Kamil et al., (2007) e Mubarik et al.,(2010), que isolaram respectivamente, 5 e 25 bacilos quitinolíticos.

Dentre as 13 colônias bacterianas isoladas no presente trabalho, Q1 (RS-PC 1) e Q12 (SC-LAG 11) se destacaram quanto aos índices enzimáticos, apresentando valores superiores a 2. Segundo Oliveira et al., (2006), o índice enzimático consiste em um parâmetro semi-quantitativo comumente utilizado nas triagens de bactérias de solo, sendo que os valores iguais ou acima de 2, podem indicar que um microrganismo possui boa capacidade de produção enzimática. O isolado Q1, identificado como *Paenibacillus illinoisensis*, que já havia apresentado um bom índice enzimático de 2,17 no meio de cultura descrito por Kamil et al., (2007), apresentou um valor ainda maior, de 2,67, quando testado no meio de cultura descrito por Yamaguchi (2003).

Inicialmente, a produção enzimática havia sido realizada com o meio de cultura de Kamil et al., (2007), utilizado na etapa de prospecção das bactérias quitinolíticas. Porém, como não houve detecção de atividade enzimática e nem de proteína nos

extratos brutos coletados, o meio de cultura utilizado na produção foi substituído pelo descrito por Yamaguchi (2003). A composição do meio, com sulfato de magnésio e maior concentração de extrato de levedura (Tabela 5), foi o que provavelmente permitiu as quantificações de atividade enzimática e de proteína. O íon Mg^{+2} , liberado a partir do sulfato de magnésio, pode ter atuado como co-fator enzimático, possibilitando não só a melhora na ação catalítica enzimática, mas também conferindo-a maior estabilidade para se manter no meio extracelular (BORZANI et al., 2001). Gohel et al., (2006b) e Lee et al., (2007), relataram em seus trabalhos a melhora na produção de quitinase por *Pantoea dispersa* e *Bacillus sp.*, respectivamente, devido a presença de $MgSO_4$. O extrato de levedura por sua vez, utilizado em meios de cultura de microrganismos quitinolíticos como fonte de nitrogênio, exerce papel crucial nas etapas iniciais de crescimento, ocasionando assim, em uma melhor de produção enzimática ao longo do tempo. Monreal e Resse (1969), Nawani e Kapadnis (2005) e a própria Yamaguchi (2003) descreveram uma melhor produção de quitinase por suas cepas bacterianas com o incremento de extrato de levedura nos meios de cultura.

A quitinase secretada pelo isolado *P. illinoisensis* apresentou maior atividade em 72 horas de produção, sendo notado após esse período, o declínio de sua ação. Felse e Panda (1999) relatam que não só a quitina, mas também a N-aceilglicosamina atuam como sinal indutor na produção de quitinase. Desse modo, o desenvolvimento bacteriano, a disponibilidade de quitina e também a maior concentração de N-acetilglicosamina (oriunda da ação da quitinase no meio), no período de 72 horas, podem explicar o pico de atividade enzimática ocorrido. Enzimas já sintetizadas, porém, não possuem atividade constante, estando sujeitas a inibições reguladas pelo próprio microrganismo produtor (BORZANI et al., 2001). Com a redução na disponibilidade de quitina ao longo do tempo de produção enzimática, o isolado pode ter liberado substâncias inibidoras para regular a atividade das quitinases produzidas, o que poderia explicar a não relação entre atividade enzimática e quantificação proteica nos dois últimos dias de produção. É também sugerido um sistema de *feedback* com enzimas proteolíticas para cessar a ação das quitinases produzidas, o que também explicaria ao aumento de proteína e a redução da atividade enzimática (FELSE; PANDA, 1999).

A atividade enzimática da quitinase produzida pela *P. illinoisensis* apresentou valor de 0,098 U, sendo otimizada depois para 0,66 U. Tais valores podem ser considerados baixos se comparados com os verificados por Singh, Ghodke e Chhaptar

(2009), que descreveram uma atividade enzimática de 100 U da quitinase produzida por *Paenibacillus sp.*, e Chandrasekaran et al., (2012), que relataram uma quitinase produzida por *Bacillus subtilis* com atividade de 2954 U. Possivelmente, os altos valores de atividade enzimática obtidos por esses isolados se deve a maior produção de quitinase, que pode ter sido alcançada pela composição dos meios de cultura.

Contudo, a maior parte dos valores encontrados na literatura se mostram próximos aos obtidos no presente trabalho. Wang e Hwang (2001) relataram a atividades enzimáticas de 1,34 U, 1,29 U e 0,68 U das bactérias *Bacillus alvei*, *Bacillus sphaericus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. Enquanto Chang, Cheng e Jao (2007) obtiveram uma atividade enzimática de 1,1 U da quitinase produzida por *Bacillus cereus*, que foi também, capaz de inibir o desenvolvimento de esporos dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, e *Pythium ultimum*. Já Suryanto, Irawati e Munir (2011), descreveram cinco isolados bacterianos, KR05, KR07, LK08, BK07, BK08 e BK09, que apresentaram enzimas com atividade de 0,088 U, 0,036 U, 0,06 U, 0,092 U, 0,363 U e 0,726 U, respectivamente. Os isolados foram ainda capazes de inibir o crescimento dos fungos *Ganoderma boninense*, *F. oxysporum* e *Penicillium citrinum*.

O tempo de reação enzimática foi provavelmente o parâmetro que mais influenciou nos valores de atividade da quitinase, sendo sua otimização crucial para a obtenção de resultados melhores. Ao longo das seis horas de reação, não houve um aumento considerável na formação de produtos da atividade quitinolítica, e como a medida de Unidade leva em consideração o tempo de reação, os valores de atividade enzimática obtidos inicialmente foram baixos. Foi definido assim, o tempo ótimo de atividade enzimática como sendo 1 hora.

A temperatura e o pH também foram outros parâmetros avaliados para otimização da atividade enzimática. Ao aumentar a temperatura de uma reação enzimática, a energia cinética dos componentes do sistema também aumenta, possibilitando assim, maiores ocorrências de interações enzima-substrato. Por outro lado, o aumento de temperatura pode também, provocar a quebra de ligações químicas que mantêm a estrutura enzimática, causando a diminuição de suas funções e desnaturação (BORZANI et al., 2001). Desse modo, observa-se que o aumento de temperatura, a partir de 40 °C, ocasionou na diminuição das funções da quitinase produzida pelo isolado *P. illinoisensis*, que mesmo assim, não desnaturou, apresentando

atividade até 60 °C. Porém, a temperatura em que se obteve o maior valor de atividade enzimática foi 37 °C, sendo essa, definida como a temperatura ótima para atividade da quitinase produzida pelo isolado *P. illinoisensis*.

A concentração de prótons (H^+), a qual se refere a medida de pH, exerce influência em uma atividade enzimática pelas suas interações tanto com os aminoácidos constituintes da enzima, quanto com o substrato. Dependendo de como ocorrem essas interações, a atividade pode aumentar ou diminuir, estando as enzimas também, sujeitas a desnaturação em pHs extremos (BORZANI et al., 2001). Os componentes dos tampões utilizados para a manutenção do pH de uma reação também podem interagir com as enzimas e exercer influência nos valores de atividade enzimática (SASSÁ et al., 2008). Desse modo, o pH ótimo é definido pelas interações entre pH, tampão, enzima e substrato. A quitinase produzida pela *P. illinoisensis* apresentou melhores atividades quando sujeita a pHs mais baixos com tampão citrato de sódio, no intervalo de 4 a 6. Um melhor equilíbrio nas interações entre os componentes do sistema pode ter ocorrido nessas condições, onde nota-se uma vantagem do tampão citrato de sódio sobre os demais. É importante acrescentar também, que a interação entre quitina e pH pode ter exercido papel importante nos valores obtidos, visto que o substrato apresenta melhor dissolução em pHs mais baixos. O pH ótimo de atividade enzimática foi assim, definido como sendo 4, em tampão citrato de sódio.

Diversos valores referentes a temperatura e pH ótimos de quitinases bacterianas foram descritos na literatura. A quitinase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* descrita no trabalho de Wang et al., (2002) apresentou maiores valores de atividade enzimática na temperatura de 40 °C e em pH 7. Suzuki et al., (2002) relataram temperatura ótima de 65 °C e pH ótimo de 4,5 para a quitinase produzida por *Serratia marcescens*. Toharisman et al., (2005) verificaram uma quitinase produzida por *Bacillus licheniformis* que apresentou melhor atividade em temperatura de 70 °C e em pH 6. E Saima e Roohi (2013), relataram uma quitinase produzida por *Aeromonas hydrophila* cuja temperatura e pH ótimos de atividade foram 37 °C e 8 respectivamente.

Não é de agora que a bioprospecção de quitinases bacterianas ocorre. Diversas pesquisas descreveram a prática relatando o encontro de uma variedade de espécies bacterianas produtoras da enzima, assim como uma variedade das enzimas produzidas pelos microrganismos. A diferença de quitinases entre as espécies bacterianas

produtoras é notável, assim como seus parâmetros de ação e aplicações, que caminham para um controle sustentável de pragas fitopatogênicas.

6. Conclusão

Por meio deste trabalho foram bioprospectadas 13 colônias bacterianas produtoras de quitinase. Os isolados foram obtidos de oito das dezessete amostras coletadas, podendo inferir numa diversidade de bactérias quitinolíticas encontradas em alguns dos ambientes analisados.

Os isolados Q1 e Q12, obtidos de solos com restos de frutos do mar, se destacaram dentre as demais quanto ao índice enzimático, sendo o isolado Q1, identificado como *Paenibacillus illinoisensis*, escolhido para as etapas seguintes do trabalho.

A caracterização da quitinase produzida pelo isolado *P. illinoisensis* quanto aos padrões de sua atividade foram de grande relevância para a pesquisa, visto que houve um aumento de 573% nos valores de atividade da enzima, que apresentou melhor ação em uma hora de reação, a 37°C e em pH 4. Demonstra-se assim, a importância e as possibilidades que o estudo de caracterização enzimática pode proporcionar.

Para melhor caracterização enzimática foram também realizados experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) com a finalidade de determinar o tamanho molecular da quitinase produzida pela *P. illinoisensis*, porém até o momento, não se obteve resultados conclusivos.

Nota-se o potencial da bioprospecção de bactérias produtoras de quitinase em solos brasileiros, visto que a biodiversidade e a bioprospecção andam lado a lado e que o Brasil é o maior detentor da biodiversidade mundial, há muito que se explorar no País.

7. Referências bibliográficas

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte Potencial Para Descoberta de Fármacos. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.679-688, abr. 2009.

BASSLER, B. L. et al. Chitin utilization by marine bacteria. **The Journal Of Biological Chemistry**, Estados Unidos, v. 268, n. 36, p.24276-24286, 1991.

BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 8, p.2014-2019, 2008.

BERLINCK, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.27-30, 2012.

BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R. K. Bacterial Chitinases: Properties and Potential. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.21-28, jan. 2007.

BOER, W. et al. ANTI-FUNGAL PROPERTIES OF CHITINOLYTIC DUNE SOIL BACTERIA. **Soil Biology And Biochemistry**, Grã-bretanha, v. 30, n. 2, p.193-203, 1998.

BOFF, S. O. Acesso aos conhecimentos tradicionais: repartição de benefícios pelo “novo” marco regulatório. **Revista Direito Ambiental e Sociedade**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.110-127, 2015.

BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p.502-508, set. 2006.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial volume 1**. São Paulo: Editora Blucher, 2001. 254 p.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Estados Unidos, v. 72, p.248-254, jan. 1976.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. EXTRAÇÃO, ESTRUTURAS E PROPRIEDADES DE α - E β -QUITINA. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.644-650, 2007.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, MG, v. 2, n. 6, p.259-272, 2005.

CHANDRASEKARAN, R. et al. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 104, n. 1, p.65-71, set. 2012.

CHANG, W.; CHEN, Y.; JAO, C. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 98, n. 6, p.1224-1230, abr. 2007.

CHERNIN, L. et al. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 61, n. 5, p.1720-1726, 1995.

CODY, R. M. Distribution of Chitinase and Chitobiase in *Bacillus*. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 19, p.201-205, 1989.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 71, n. 6, p.773-782, 21 jul. 2006.

DIAS, R. F.; CARVALHO FILHO, Carlos Alberto Aragão de. Bioeconomia no Brasil e no Mundo: Panorama Atual e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 1, p.410-430, 2017.

FELSE, P. A.; PANDA, T.. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 51, p.141-151, 1999.

FENDRIHAN, S. THE USE OF BIOPRODUCTS BASED ON MICROORGANISMS - POSSIBLE FACTORS FOR A SUSTAINABLE AGRICULTURE. **Romanian Journal For Plant Protection**, [s.l.], v. 9, p.10-14, 2016.

GALANTE, R. S. ESTUDOS DE QUITINASES DE *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* (STAHEL) AIME & PHILLIPS-MORA, FUNGO CAUSADOR DA VASSOURA-DE-BRUXA NO CACAUEIRO: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MODELAGEM COMPARATIVA. 2008. 101 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology - A sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7-8, p. 471-499, 2005.

GEIGER, B. et al. From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 116, p. 45-53, 2016.

GOHEL, V. et al. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.54-72, 2006.

GOHEL, V. et al. Statistical screenings of medium components for the production of chitinase by the marine isolate *Pantoea dispersa*. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.50-56, fev. 2006b.

GUPTA, C. P. et al. Chitinase-mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. **Biocontrol**, [s.l.], v. 51, n. 6, p.821-835, 23 set. 2006.

HAMID, R. et al. Chitinases: An update. **Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.21-40, 2013.

HARVEY, A. L.; GERICKE, N. Bioprospecting: Creating a Value for Biodiversity. In: PAVLINO, I. Y. **Research in Biodiversity - Models and Applications**. [s.l.]: Intech, 2011. Cap. 15. p. 323-338.

HALDER, S. K. et al. Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas hydrophila* SBK1: study of the mosquitocidal activity. **Biocontrol**, [s.l.], v. 57, n. 3, p.441-449, 27 ago. 2012.

HOWARD, M. B. et al. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 30, n. 11, p.627-635, 1 nov. 2003.

ILLANES, A.; ALTAMIRANO, C.; WILSON, L. Homogeneous Enzyme Kinetics. In: ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis Principles and Applications**. [s.l.]: Springer Science, 2008. Cap. 3. p. 107-151.

JUNG, W. et al. Chitinases produced by *Paenibacillus illinoisensis* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistanii* degrade Nod factor from *Bradyrhizobium japonicum*. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 163, n. 3, p.345-349, maio 2008.

KAMIL, Z. et al. Isolation and Identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. **Global Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.57-66, 2007.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, [s.l.], v. 46, p.1-27, 2000.

KUMARAN, S. et al. Evaluation of Chitinase producing and antimicrobial properties of streptomyces isolated from shrimp shell disposable area. **Asian Pacific Journal Of Tropical Disease**, [s.l.], p.861-864, 2012.

LEE, Y. et al. Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 98, n. 14, p.2734-2741, out. 2007.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. **Síntese do Conhecimento Atual da Biodiversidade Brasileira**. [s.l.]: Ministério do Meio Ambiente, 2006. 109 p.

LI, S. et al. TECHNOLOGY PROSPECTING ON ENZYMES: APPLICATION, MARKETING AND ENGINEERING. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.1-11, set. 2012.

LIMA, L. H. C. et al. **Método de purificação de uma quitinase de *Trichoderma harzanium* com atividade sobre a parede celular de fungos fitopatogênicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 32 p.

LUZ, B. D. S. et al. BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL REALIZADA NO PARQUE ESTADUAL SERRA DO OURO BRANCO, BRASIL. **Interbio**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.13-24, 2016.

MANDIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 13. ed. San Francisco: Pearson Education, 2012. 1043 p.

MARQUES, L. G. A. **Mapeamento e abordagens legais das redes de bioprospecção**

no Brasil. 2014. 235 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

MELO, R. DE; FERREIRA, S.; CARDOSO, R. Utilização da casca de camarão para produção de quitina. **Scire**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.426-428, 1959.

MONREAL, J.; RESSE, E. T. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Canadian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 15, p.689-696, 1969.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. do N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Processos Químicos**, Goiânia, v. 3, n. 5, p.9-23, jun. 2009.

MORIYA, T.; MÓDENA, J. L. P. ASSEPSIA E ANTISSEPSIA: TÉCNICAS DE ESTERILIZAÇÃO. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p.265-273, 2008.

MUBARIK, N. R. et al. Chitinolytic Bacteria Isolated from Chili Rhizosphere: Chitinase Characterization and Its Application as Biocontrol for Whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.). **American Journal Of Agricultural And Biological Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.430-435, 2010.

NAWANI, N. N.; KAPADNIS, B. P. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.651-660, fev. 2005.

NURDEBYANDARU, N.; MUBARIK, N. R.; PRAWASTI, T. S. Chitinolytic Bacteria Isolated from Chili Rhizosphere: Chitinase Characterization and Application as Biocontrol for *Aphis gossypii*. **Microbiology Indonesia**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.103-107, dez. 2010.

OECD. The Bioeconomy to 2030 - Main Findings and Conclusions. p. 18, 2009.

OKAMOTO, Y. et al. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.337-342, ago. 2003.

OLIVEIRA, A. N. de et al. ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES DE ISOLADOS DE RIZÓBIA NATIVOS DA AMAZÔNIA CENTRAL, AMAZONAS, BRASIL. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p.853-860, 2006.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.742-756, 2009.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. LIPASES DE LÁTEX VEGETAIS: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.93-99, 2006.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 26, 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**, [s.l.], v. 34, n. 7, p.641-678, jul. 2009.

POSORSKE, L. H. Industrial-Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 61, n. 11, p.1758-1760, 1984.

RIBEIRO, N. F. P.; SOUZA, M. M. V. M. Nanocatálise: aspectos fundamentais e aplicações. **Comciência**, Campinas, n. 130, p.1758-1760, 2011.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress In Polymer Science**, [s.l.], v. 31, n. 7, p.603-632, jul. 2006.

RODRIGUES, É. F. et al. Production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 225, p.134-141, fev. 2017.

SACCARO JUNIOR, N. L. **DESAFIOS DA BIOPROSPECÇÃO NO BRASIL**. Brasília: Njobs Comunicação, 2011. 32 p.

SACCARO JÚNIOR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. 14, n. 1, p. 229–244, 2011b.

SAIMA, M. K.; ROOHI, I. Z. A. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.39-46, jun. 2013.

SANDHU, D. K.; WADHWA, V.; BAGGA, P. S. Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 11, p.21-25, 1989.

SASSÁ, D. C. et al. Avaliação de parâmetros cinéticos de quitinases produzidas por *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p.807-814, dez. 2008.

SINGH, A. K.; GHODKE, I.; CHHATPAR, H. S. Pesticide tolerance of *Paenibacillus* sp. D1 and its chitinase. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 91, n. 2, p.358-362, nov. 2009.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, [s.l.], v. 6, n. 174, p.1-15, 2016.

SOARES, I. et al. Microorganism-Produced Enzymes in the Food Industry. In: VALDEZ, B. **Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry**. [s.i]: Intech, 2012. Cap. 5. p. 83-94

SOARES, E. S. **IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE QUITINASES**. 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2016.

SOUZA, C. P. et al. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 11, p.2079-2082, 28 jun. 2009.

SOUZA, F. M.; FERREIRA, R. M. S.; BARBOSA, R. C. UTILIZAÇÃO DA CASCA

DE CAMARÃO PARA PRODUÇÃO DE QUITINA. **Scire Revista Acadêmico-científica**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-11, 2015.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. **Engineering In Life Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.30-38, 3 dez. 2014.

SURYANTO, D.; IRAWATI, N.; MUNIR, E. Isolation and Characterization of Chitinolytic Bacteria and Their Potential to Inhibit Plant Pathogenic Fungi. **Microbiology Indonesia**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.144-148, jun. 2011.

SUZUKI, K. et al. Chitinases A, B and C1 of *Serratia marcescens* 2170 Produced by Recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic Properties and Synergism on Chitin Degradation. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 66, n. 5, p.1075-1083, 2002.

THOMPSON, S. E. et al. Identification and Characterization of a Chitinase Antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Strain 385. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 67, n. 9, p.4001-4008, 2001

TOHARISMAN, A. et al. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.733-738, jul. 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. 10. ed. San Francisco: Pearson Education, 2010. 812 p.

TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 178, p. 362–366, 1989.

VAIDYA, R. J. et al. The novel method for isolating chitinolytic bacteria and its application in screening for hyperchitinase producing mutant of *Alcaligenes xylosoxydans*. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 36, p.129-134, 2003.

WANG, S. et al. Purification and Characterization of Two Antifungal Chitinases Extracellularly Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 8, p.2241-2248, abr. 2002.

WANG, S.; HWANG, J. Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 28, p.376-382, 2001.

WOO, S. L. et al. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, p. 71–126, 2014.

YAMAGUCHI, M. M. **Produção, Purificação e Caracterização da Quitinase de *Cellulomonas cellulans* Fxx**. 2003. 83 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

YAN, L. et al. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. **Biotechnology And Bioengineering: Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.128-134, 2011.

ZHANG, Y. P.; SUN, J.; MA, Y. Biomanufacturing: history and perspective. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 4-5, p. 773-784, 2016.