



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PROCESSOS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROCESSOS EM TECNOLOGIA QUÍMICA

Talita Lopes Honorato

PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS HIDROLÍTICAS PARA OBTENÇÃO DE
AMINO-OLIGOSSACARÍDEOS

Campinas – SP
2011

Talita Lopes Honorato

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS HIDROLÍTICAS PARA OBTENÇÃO DE
AMINO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Prof. Dra. Telma Teixeira Franco

Co-orientadora: Prof. Dra. Sueli Rodrigues

Campinas – SP
2011

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

H759p Honorato, Talita Lopes
Produção de enzimas fúngicas hidrolíticas para
obtenção de amino-oligossacarídeos / Talita Lopes
Honorato. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Telma Teixeira Franco, Sueli
Rodrigues.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação em estado sólido. 2. Camarão. 3.
Enzimas microbianas. 4. Quitosana. 5. Compostos
bioativos. I. Franco, Telma Teixeira. II. Rodrigues,
Sueli. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Production of chitinolytic enzymes for the preparation of
potentially bio-active amino-oligosaccharides

Palavras-chave em Inglês: Solid state fermentation, Shrimp, Microbial enzymes,
Chitosan, Bioactive compounds

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Gorete Ribeiro de Macedo, Paula Aparecida Delgado,
Saartje Hernalsteens, Fernando Rodrigo Frederico

Data da defesa: 02-12-2011

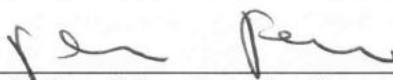
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Talita Lopes Honorato

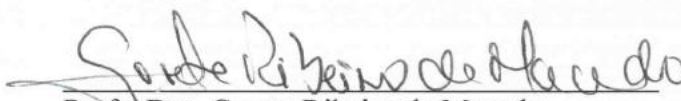
**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS HIDROLÍTICAS PARA OBTENÇÃO DE
AMINO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Engenharia Química da Universidade Estadual de
Campinas como requisito para a obtenção do título de
Doutora em Engenharia Química.

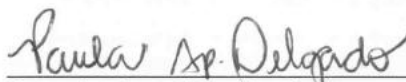
Aprovação em 02/12/2011



Prof. Dra. Telma Teixeira Franco (Orientador)
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo
UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte



Pesquisadora Dra. Paula Aparecida Delgado
AMYRIS Brasil S.A.



Prof. Dra. Saartje Hernalsteens
UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo



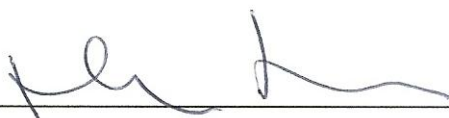
Pesquisador Dr. Fernando Rodrigo Frederico
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

Campinas – SP
2011

Talita Lopes Honorato

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS FÚNGICAS HIDROLÍTICAS PARA OBTENÇÃO DE
AMINO-OLIGOSSACARÍDEOS**

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química



Profa. Dra. Telma Teixeira Franco (Orientadora)

Campinas – SP
2011

Dedico este trabalho a Deus, pela sua presença em minha vida, e aos meus exemplos de garra, coragem e esperança: Meus pais Paulo e Isabel e meu irmão Paulo Jr. por estarem comigo em cada passo, certo ou errado, sempre me apoiando, motivando e ensinando a ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar sonhar, buscar e conquistar esse trabalho.

Aos meus pais Paulo e Isabel e meu irmão Paulinho por sempre estarem presentes em todos os momentos firmes ou incertos da minha vida, ensinando-me a vivê-la com dignidade e pela paciência durante as longas esperas por minha presença.

À minha orientadora Prof. Dra. Telma T. Franco, e minha co-orientadora Prof. Dra. Sueli Rodrigues pela orientação, confiança e oportunidades proporcionadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro ao projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior em cooperação com o Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (FEQ) pela oportunidade de realizar meu doutoramento e à Rosangela Pedroz, pelo enorme auxílio administrativo.

Ao Prof. Dr. Bruno M. Moerschbacher pela orientação, incentivo e oportunidades proporcionadas durante meu período na Alemanha.

À Rosangela Pedroz, pelo enorme auxílio administrativo.

Aos Amigos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Aos amigos do *Institute of Plant Biology and Biotechnology, University of Muenster*, Alemanha, Dr. Nour Eddine El Gueddari, Dr. Christian Gorzelanny, Dr. Fabrice Brunel, Dr. Sonia Chachra, Dr. Roberta Paulert, Dr. Sabine Fehser, Ursula Fassin, Frank Bernard, Nagaraju Dharavath, Mareike Dirks, Stefanie Nicole, Janina Hoßbach, Malati Nampally, Karin Pappelbaum, Govinda, Celina Vila.

Aos amigos e pesquisadores que foram e são do Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renováveis (LEBBPOR) da FEQ, Annamaria, Ana Deckman, Andréia, Arlete, Bianca, Camilo, Cecília, Denise, Edison, Eduardo, Erica Vagetti, Erika Francisco, Érika Marques, Eulália, Giselle, Junko, Kity, Liliana, Lucy, Michelle, Mônica, Paula, Renato, Saartje, Verônica, Vinícius pelo companheirismo no nosso ambiente de trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica do LEBBPOR, em especial à estudante Flávia Granusso, pelo auxílio experimental no desenvolvimento da pesquisa.

À equipe de pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, especialmente aos que estavam presente durante o período que trabalhei no grupo. À Imilena, Mari, Jaqueline, Rosane, Simone, Soraya, Tati Maciel, Tati Cavalcante, Mayra e, em particular, ao Luís pela ajuda e companhia durante os experimentos iniciais da tese. Um muito obrigada mais que especial aos queridos Jonas pelo apoio, a grande amizade e o incentivo desde os meus primeiros passos na área acadêmica, Cris pela parceria e cocas-colas divididas durante o tempo de pesquisa que compartilhamos, Alexandre pela mútua admiração e companheirismo, Anita, Cláudia e Mari pelos agradáveis momentos em suas presenças.

Aos companheiros, que se tornaram amigos, durante minha estadia na Alemanha. Roberta, Ana Clara, Marina, Fernanda, Andrea, Celina e meus queridos amigos alemães: Vocês tornaram minha vida na Alemanha bem menos complicada. Saudades de todos.

Aos amigos conquistados durante o doutorado Carol Costa, Liliana, Erica, Lauren, Paulinha, Luiz Gustavo, Carol e galera da moradia, em especial aos moradores da F1 e M10, que me ajudaram a tornar os dias árduos e atribulados em mais leves.

À Juliana Serio por me ensinar pacientemente como administrar coisas básicas do meu cotidiano. Obrigada por tudo e fico muito feliz por ter conquistado sua amizade.

Aos amigos “G7H2” que, até hoje desfruto de poucos, mas ótimos momentos.

Aos amigos cearenses cabras-da-pesto que decidiram sair de fortaleza para desbravar novos horizontes, desfrutando e dividindo comigo as alegrias, tristezas, dificuldades e saudades, fortalecendo ainda mais nossos laços de amizades. Anayla, James e Mirela muito obrigada pela companhia. Daniele Araújo e Maria da Conceição obrigada por me aceitarem como irmãs, amo vocês.

Ao meu cearense predileto: Querido Euclides, obrigada pela cumplicidade, carinho e paciência durante essa caminhada juntos.

Aos grupos que participei durante esse trajeto, onde conheci pessoas maravilhosas que insistirei em tê-las como amigas. Mira Ira, Capoeira Semente de Esperança, Urucungos e Bateria Alcalina, o convívio com a diversidade de idéias, culturas e estilos de vida que encontrei em vocês são responsáveis por me engradecer como ser humano. **Danke!**

"Eu sou de uma terra que o povo padece
Mas não esmorece e procura vencer.
Da terra querida, que a linda cabocla
De riso na boca zomba no sofrê
Não nego meu sangue, não nego meu nome.
Olho para a fome, pergunto: Que há?
Eu sou brasileiro, filho do Nordeste,
Sou cabra da Peste, sou do Ceará."

Patativa do Assaré

RESUMO

HONORATO, T. L. Produção de enzimas fúngicas hidrolíticas para obtenção de amino-oligossacarídeos. Campinas: UNICAMP, Dezembro, 2011. 223 fls. Tese de Doutorado em Engenharia Química – Departamento de Processos Químicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

Estudos sobre quitina e quitosana têm atraído interesse devido à sua possível conversão em oligossacarídeos, que são solúveis em água e apresentam atraentes atividades biológicas. Para este fim, métodos eficazes para a produção de amino-oligossacarídeos (AGO's) potencialmente bioativos são necessários. O trabalho objetivou estudar a viabilidade de Fermentação em Estado Sólido (FES) para a produção de um extrato enzimático adequado para a obtenção de AGO's. Inicialmente foi identificado um fungo adequado para a FES utilizando cascas de camarão como substrato, sendo uma cepa de *Trichoderma polysporum* selecionada. A otimização das condições da fermentação para obtenção de um extrato enzimático capaz de produzir AGO's com grau de polimerização em torno de 5, grau de polimerização considerado o mínimo adequado para bioatividades foi realizada e as enzimas produzidas por *T. polysporum* sob diferentes condições de fermentação (submersa e sólida) foram analisados por eletroforese, seguida pela atividade de coloração e por atividades enzimáticas utilizando substratos cromogênicos específicos. Atividades enzimáticas de β -N-acetilglucosaminidase, quitobiosidase e uma pequena quantidade de exo-quitinase e endo-quitinase foram observadas. O extrato da FES foi utilizado para degradar parcialmente diferentes quitosanas com fração molar de N-acetilglicosamina (F_A) de valor 0,27 ou 0,56, e uma quitosana comercial com F_A em torno de 0,15. Os AGO's produzidos foram caracterizados por cromatografia em camada delgada e espectrometria de massa. Uma metodologia para separação de padrões oligoméricos acetilados e desacetilados por cromatografia líquida com detecção amperométrica pulsada dos oligossacarídeos foi desenvolvida e otimizou-se a hidrólise enzimática para produção dos AGO's de quitosanas. Hetero-oligômeros bioativos com grau de polimerização entre 2 e 7 foram produzidos, apresentando atividade antimicrobiana em *Pseudomonas syringae* e

potencializando a explosão oxidativa em células de arroz, utilizando quitosana como elicitor (ambas atividades foram encontradas em concentrações de 50 µg/mL de AGO's).

Palavras chaves: Fermentação em estado sólido, casca de camarão, enzimas microbianas, quitosana, compostos bioativos.

ABSTRACT

HONORATO, T. L. Production of chitinolytic enzymes for the preparation of potentially bio-active amino-oligosaccharides. Campinas: UNICAMP, December, 2011. 223 pages. Thesis, D.Sc. in Chemical Engineering – Department of Chemical Process, School of Chemical Engineering, State University of Campinas.

Studies on chitin and chitosan have drawn interest because of their possible conversion into oligosaccharides, which are water-soluble and present attractive biological activities. To this end, cost effective methods for the production of potentially bio-active chito-oligosaccharides (COS) are required. In this work we decided to study the feasibility of using solid state fermentation (SSF) for the production of a suitable enzyme extract for the eventual obtention of COS. The first step was the identification of a suitable fungus for solid state fermentation (SSF) using shrimp shells as a substrate, and a strain of *Trichoderma polysporum* was eventually selected. The second step involved the optimisation of growth conditions to obtain enzyme preparations capable of producing COS with degrees of polymerisation of at least 5, this typically being the minimum DP for reliable bio-activities. The SSF extract was used to partially degrade different well characterised chitosans with a molar fraction of N-acetylglucosamine (F_A) value of 0.27 or 0.56, and a commercial chitosan obtained from Sigma (F_A around 0.15). The chitosanolytic enzymes produced by *T. polysporum* under different fermentation conditions were analysed by electrophoresis followed by activity staining and the enzyme activities of β -N-acetylglucosaminidase, chitobiosidase and a small amount of exo-chitinase and endo-chitinase were observed. After hydrolysis, the complex mixture was precipitated, and the supernatant containing the COS produced was analysed using thin layer chromatography (TLC) and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. We detected the presence of chitinase rather than chitosanase activity and the production of hetero-oligomers with degrees of polymerisation between 2 and 7. The bio-activity of these oligomer mixtures in rice plants cells and against the growth of *Pseudomonas syringae* was founded.

Keywords: solid state fermentation, shrimp shells, fungal enzymes, chitosan, chitooligosaccharides, bioactivity.

SUMÁRIO

RESUMO.....	17
ABSTRACT	19
NOMENCLATURA	23
LISTA DE FIGURAS.....	27
LISTA DE TABELAS.....	33
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	37
1.1 Objetivo	38
1.2 Objetivos específicos.....	38
1.3 Metas utilizadas para o alcance do objetivo	39
1.4 Produções Bibliográficas.....	40
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
2.1 Resíduos da Indústria Pesqueira, Quitina e Quitosana	43
2.2 Atividade Biológica de Quitosana e AGO's como Indutores dos Mecanismos de Respostas em Plantas.....	45
2.3 Eventos desencadeados após o reconhecimento de elicitores	48
2.4 Despolimerização Enzimática de Quito-materiais e Suas Aplicações	50
2.5 Clivagem e Especificidade Enzimática	55
2.6 Obtenção de Enzimas por Fermentação	61
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
3.1 Materiais e Métodos	65
3.1.1 Microrganismos e Células Vegetais	65
3.1.2 Substratos	65
3.1.3 Determinação do Fator de Acetilação da Quitosana	66
3.1.4 Determinação Protéica dos Extratos Enzimáticos por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	67
3.1.5 Determinação da Atividade Enzimática	67
3.1.5.1 Determinação da Atividade Hidrolítica.....	68
3.1.5.2 Determinação de Endoquitinase e Exoquitinase pelo Método Colorimétrico Utilizando Substratos Específicos	68
3.1.5.3 Determinação da Atividade Quitinolítica e Quitosanolítica em Gel	69
3.1.5.4 Especificidade de Enzimas Quitinolíticas para Substratos com Diferentes FA por Focalização Isoelétrica	70
3.1.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos AGO's.....	70
3.1.7 Determinação da Estrutura dos AGO's por Espectrometria de Massas	71
3.1.8 Quantificação de Oligômeros de Quitosana	71
3.2 Procedimento Experimental	72
3.2.1 Seleção das Melhores Linhagens Produtoras	72
3.2.2 Determinação da Temperatura e pH Ótimos para a Atividade Enzimática da enzima produzida pelo <i>T. Polysporum</i>	73

3.2.3 Otimização da Composição do Meio de Cultura em Estado Sólido.....	74
3.2.4 Otimização das Condições de Extração Enzimática	76
3.2.5 Produção de Quitosanase de <i>Trichoderma polysporum</i> em Meio de Cultura Contendo Resíduos Sólidos de Camarão Branco.....	76
3.2.6 Estudo Comparativo das Enzimas Hidrolíticas Produzidas por Diferentes Meios Fermentativos	77
3.2.7 Preparação dos Extratos Enzimáticos.....	77
3.2.8 Otimização da Hidrólise Enzimática da Quitosana para Obtenção dos AGO's.....	78
3.2.9 Atividade Antimicrobiana	79
3.2.10 Bioatividade em Células Vegetais	79
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
4.1 Determinação do Fator de Acetilação da Quitosana	81
4.2 Seleção das Melhores Linhagens Produtoras	83
4.3 Determinação da Temperatura e pH Ótimos para a Atividade Enzimática da enzima produzida pelo <i>T. polysporum</i>	86
4.4 Otimização da Composição do Meio de Cultura em Estado Sólido	88
4.5 Otimização das Condições de Extração Enzimática.....	94
4.6 Aplicação na Casca do Camarão	97
4.7 Caracterização dos Extratos Enzimáticos	99
4.7.1 Determinação Protéica dos Extratos Enzimáticos por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	99
4.7.2 Determinação da Atividade Quitinolítica e Quitosanolítica.....	102
4.7.3 Especificidade de Enzimas Quitinolíticas para Substratos com Diferentes F _A Determinados por Focalização Isoelétrica.....	105
4.7.4 Determinação de Endoquitinase e Exoquitinase pelo Método Colorimétrico Utilizando Substratos Específicos Derivados de p-Nitrofenol	108
4.7.5 Atividade de Exoquitinase.....	108
4.7.6 Atividade de Endoquitinase.....	109
4.8 Otimização da Hidrólise Enzimática da Quitosana para Obtenção dos AGO's.....	111
4.9 Caracterização dos AGO's Produzidos	114
4.9.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos AGO's.....	114
4.9.2 Determinação da Estrutura dos AGO's por Espectrometria de Massas	119
4.10 Quantificação de Oligômeros de Quitosana	125
4.11 Aplicação do AGO's produzidos.....	130
4.11.1 Atividade Antimicrobiana	130
4.11.2 Bioatividade em Células Vegetais	133
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	143
5.1 Conclusões.....	143
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
APÊNDICE I.....	169
APÊNDICE II	207
APÊNDICE III.....	217

NOMENCLATURA

A (GlcNAc)	N-acetil- β -D-glicosamina (2-acetoamino-2-deoxi-D-glicopiranoze)
AGO's	Amino-oligossacarídeos
ART	Açúcares Redutores Totais
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CAZy	Carbohydrate-Active enZymes
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
D (GlcN)	D-glicosamina (2-amino-2-deoxi-D-glicopiranoze)
DAB	3-3'-diaminobenzidina
DNS	3,5-Dinitrosalicílico
DP	Grau de Polimerização
EAO's	Espécies Ativas de Oxigênio
EC	Enzyme Commission Numbers
EPS	Exopolissacarídeo
ESI TOF MS	Ionização por Electrospray - Espectrometria de Massas por Tempo de Voo
F	Razão da média dos quadrados da regressão pelo resíduo
F _A	Fração molar de N-acetilglicosamina
FES	Fermentação em Estado Sólido
FI	Focalização Isoelétrica
FS	Fermentação Submersa
Gds	Gramma de substrato seco
GL	Graus de Liberdade
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
HG	Hidrolases glicosídicas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
kD	kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
MM	Massa molar
MMCO	Massa molar de corte

NAGases	N-acetilglicosaminidase
P _A	Padrão de N-acetilação
PAD	Detecção Amperométrica Pulsada
PAMP's	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PI	Ponto Isoelétrico
PIMP's	Padrões Moleculares Induzidos ao Patógeno
pNP	p-Nitrofenil
PRP's	Proteínas Relacionadas à Patogenicidade
QM	Quadrado Médio
RH	Resposta de Hipersensibilidade
RPM	Rotações Por Minuto
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
RSI	Resistência Sistêmica Induzida
R _t	Tempo de Retenção
SQ	Soma de Quadrados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma apresentando a visão do projeto	39
Figura 2: Estruturas da quitina e quitosana	44
Figura 3: Mecanismo de defesa local e sistêmico das plantas (SOOSAAR <i>et al.</i> , 2005) ..	47
Figura 4: Produtos de degradação de quitosana (MOURYA <i>et al.</i> , 2011)	51
Figura 5: Transformação química, física e enzimática de quitina e quitosana	52
Figura 6: Sítios da ligação de glicosidases segundo DAVIES <i>et al.</i> , 1997	58
Figura 7: Desenho esquemático do padrão de clivagem predominante de enzimas quitinolíticas. As subunidades não redutoras da cadeia de quitina são mostradas em azul claro e redutor em azul-escuro (SEIDL, 2008)	59
Figura 8: Curva de titulação potenciométrica (mL NaOH x mV)	82
Figura 9: Curva de primeira derivada da titulação potenciométrica	82
Figura 10: Crescimento do fungo <i>T. polysporum</i> em meio CDA	84
Figura 11: Superfície de resposta para a atividade enzimática do extrato bruto em função da temperatura e do pH de determinação	88
Figura 12: Superfície de resposta para a atividade enzimática, obtida em 48h de cultivo, em função da quantidade de quitosana e trigo adicionado ao meio de fermentação	90
Figura 13: Superfície de resposta para a atividade enzimática, obtida em 48h de cultivo, em função da quantidade de água e quitosana adicionada ao meio de fermentação	91
Figura 14: Superfície de resposta para a atividade enzimática, obtida em 48h de cultivo, em função da quantidade de água e trigo adicionado ao meio	91
Figura 15: Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da quantidade de quitosana e trigo adicionado ao meio	93
Figura 16: Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da agitação e do tempo de extração	96
Figura 17: Meio de cultura com resíduos sólidos do camarão branco <i>Litopenaeus vannamei</i>	97
Figura 18: Meio de cultura com quitina	97
Figura 19: gel de SDS-PAGE em linhagem de <i>Trichoderma polysporum</i> dos extratos enzimáticos fermentativos. M-marcador de proteína; S1- <i>Trichoderma</i> Complete Medium	

(TCM); S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S4- FES, procedimento padrão; S5-FES (extrato esterilizado em filtro pur S 0,2 e concentrado em vivaspin 20, assim como as amostras de fermentação submersa); CTN-quitinase padrão (controle positivo) 99

Figura 20: gel de SDS-PAGE em linhagem de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. M-marcador de proteína; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM) após 4h de exposição em temperatura ambiente; S2-TCM exposto em temperatura ambiente por 48h (controle positivo); S3-TCM estocado em freezer (controle negativo); S4-TCM com inibidor de protease após 4h de exposição em temperatura ambiente. S5-*Trichoderma* Complete Medium (TCM) em meio induzido com quitina coloidal após 4h de exposição em temperatura ambiente; S6-TCM em meio induzido com quitina coloidal exposto em temperatura ambiente por 48h (controle positivo); S7-TCM em meio induzido com quitina coloidal estocado em freezer (controle negativo); S8-TCM em meio induzido com quitina coloidal com inibidor de protease após 4h de exposição em temperatura ambiente 100

Figura 21: gel de SDS-PAGE em linhagem de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. M-marcador de proteína; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM) em meio induzido com resíduos de camarão após 4h de exposição em temperatura ambiente; S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão exposto em temperatura ambiente por 48h (controle positivo); S3-TCM em meio induzido com resíduos de camarão estocado em freezer (controle negativo); S4-TCM em meio induzido com resíduos de camarão com inibidor de protease após 4h de exposição em temperatura ambiente. S5- FES após 4h de exposição em temperatura ambiente; S6-FES exposto em temperatura ambiente por 48h (controle positivo); S7-FES estocado em freezer (controle negativo); S8-FES com inibidor de protease após 4h de exposição em temperatura ambiente 101

Figura 22: (a) gel de atividade quitinolítica contendo glicol quitina (antes da polimerização do gel) em linhagem de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. (b) gel de atividade quitinolítica contendo glicol quitina, após depolimerização em linhagem de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. M-marcador de proteína; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM); S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S4- FES,

procedimento padrão; S5-FES (extrato esterilizado em filtropur S 0,2 e concentrada em vivaspin 20, como as amostras de fermentação submersa); CDA-quitina desacetilase; CTN-quitinase padrão (controle positivo) 103

Figura 23: géis de atividade quitosanólítica contendo quitosana FA 0,11 e quitosana FA 0,56 de extrato de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. M- marcador de proteína; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM); S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S4-FES, procedimento padrão; S5-FES (extrato esterilizado em filtropur S 0,2 e concentrada em vivaspin 20, como as amostras de fermentação submersa); CTN-quitosanase padrão (controle positivo) 103

Figura 24: Focalização isoeletrica dos extratos enzimáticos fermentativos de *Trichoderma polysporum* (pH 3-10). S5-FES (extrato esterilizado em filtropur S 0,2 e concentrado em vivaspin 20, como as amostras de fermentação submersa); S4- FES, procedimento padrão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM) 106

Figura 25: Focalização isoeletrica dos extratos enzimáticos fermentativos de *Trichoderma polysporum* (pH 3-10). S5-FES (extrato esterilizado em filtropur S 0,2 e concentrado em vivaspin 20, como as amostras de fermentação submersa); S4- FES, procedimento padrão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM) 107

Figura 26: Superfície de resposta e curva de contorno para a produção de açúcares redutores (AR) em função do extrato enzimático quitosana 114

Figura 27: CCD dos hidrolisados utilizando os extratos enzimáticos oriundos da fermentação do *Trichoderma polysporum*. H1-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato de *Trichoderma* Complete Medium (S1); H2-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato de TCM em meio induzido com quitina coloidal (S2); H3-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato de FES (S4); A-Padrões acetilados (de cima para baixo: N-acetil-D-glicosamina; Triacetilquitotriose; Tetracetilquitotetrose; Pentacetilquitopentose; Hexacetilquitohexose); D- Padrões não acetilados (de cima para baixo: D-glicosamina; Dímero de quitosana; Trímero de quitosana; Tetramero de quitosana; Pentâmero de quitosana; Hexâmero de quitosana); H4-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com

extrato de *Trichoderma* Complete Medium (S1); H5-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato de TCM em meio induzido com quitina coloidal (S3); H6- Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato de Fermentação em Estado Sólido (S4) 115

Figura 28: CCD dos hidrolisados utilizando os extratos enzimáticos oriundos da fermentação do *Trichoderma polysporum* filtrados em colunas de exclusão PD-10. H1-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato desnaturado de *Trichoderma* Complete Medium (S1); H11-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato S1; H12-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S1 desnaturado; H13-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S1; H2-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato desnaturado de TCM em meio induzido com quitina coloidal (S3); H21-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato S3; H22-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S3 desnaturado; H23-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S3; A-Padrões acetilados (de cima para baixo: N-acetil-D-glicosamina; Triacetilquitotriose; Tetracetilquitotetrose; Pentacetilquitopentose; Hexacetilquitoheose); D- Padrões não acetilados (de cima para baixo: D-glicosamina; Dímero de quitosana; Trímero de quitosana; Tetrâmero de quitosana; Pentâmero de quitosana; Hexâmero de quitosana); H3-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato desnaturado de TCM em meio induzido com resíduo de camarão (S2); H31-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato S2; H32-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S2 desnaturado; H33-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S2; H4-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato desnaturado de FES (S4); H41-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato S4; H42-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S4 desnaturado; H43-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S4 116

Figura 29: Perfil dos oligossacarídeos de quitosana (F_A 0,11 e F_A 0,56) em cromatografia de camada delgada utilizando os hidrolisados do extrato enzimático da fermentação submersa contendo quitina coloidal (S3 0,11; S3 0,56) e do extrato enzimático da FES em extrato de camarão (S5 0,56; S5 0,11). A-Padrões acetilados (de cima para baixo: N-acetil-D-glicosamina; Triacetilquitotriose; Tetracetilquitotetrose; Pentacetilquitopentose; Hexacetilquitoheose). D-Padrões não acetilados (de cima para baixo: D-glicosamina; Dímero de quitosana; Trímero de quitosana; Tetrâmero de quitosana; Pentâmero de quitosana; Hexâmero de quitosana) 117

Figura 30: Perfil do oligômeros de quitosana produzidos por hidrólise das quitosanas F _A 0,15; 0,27 e 0,56 pelo extrato enzimático S5. Os padrões são listados de cima para baixo: (A) Padrões de N-acetilglicosamina (Grau de polimerização, DP: 1, 3, 4, 5 e 6); (D) Padrões de glicosamina DP 1, 2, 3, 4, 5, 6. (O1) Oligômeros de quitosana F _A 0,15; (O2) Oligômeros de quitosana F _A 0,27; (O3) Oligômeros de quitosana F _A 0,56	118
Figura 31: ESI TOF MS dos oligossacarídeos derivados de quitosana F _A 0,56. Nota: Somente os picos correspondentes aos oligossacarídeos estão listados. Componentes não identificados não estão apresentados	120
Figura 32: ESI TOF MS dos oligossacarídeos derivados de quitosana F _A 0,27. Nota: Somente os picos correspondentes aos oligossacarídeos estão listados. Componentes não identificados não estão apresentados	121
Figura 33: ESI TOF MS dos oligossacarídeos derivados de quitosana F _A 0,15. Nota: Somente os picos correspondentes aos oligossacarídeos estão listados. Componentes não identificados não estão apresentados	121
Figura 34: Padrões de oligossacarídeos acetilados. (1) N-acetil-D-glicosamine, (2) Di-N-acetilquitobiose, (3) Tri-N-acetilquitotriose, (4) Tetra-N-acetilquitotetraose, (5) Penta-N-acetilquitopentaose (6) Sobreposição dos cromatogramas	126
Figura 35: Padrões de oligossacarídeos desacetilados. (1) D-glicosamine, (2) Quitobiose, (3) Quitotriose, (4) Quitotetraose, (5) Quitopentaose, (6) Quito hexaose, (7) Sobreposição dos cromatogramas	127
Figura 36: Cromatograma da mistura compostas por padrões acetilados (DP 1 a 5) e desacetilados (DP 1 a 6)	128
Figura 37: Atividade antimicrobiana em <i>Pseudomonas syringa</i> dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana comercial F _A 0,15, utilizando o extrato enzimático de FES (S5). A leitura foi realizada após 1 semana de incubação	131
Figura 38: Atividade antimicrobiana em <i>Pseudomonas syringa</i> dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana F _A 0,27, utilizando o extrato enzimático de FES (S5). A leitura foi realizada após 1 semana de incubação	131
Figura 39: Gráfico em barras dos resultados de atividade antimicrobiana em <i>Pseudomonas syringa</i> dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana F _A 0,56, utilizando o extrato enzimático de FES (S5). A leitura foi realizada após 1 semana de incubação	132

Figura 40: Reação de explosão oxidativa de suspensão de células de amora induzidas por 10 µg/mL de AGO's e quitosana F _A 0,08	133
Figura 41: Reação de explosão oxidativa de suspensão de células de arroz induzidas por 10 µg/mL de AGO's e quitosana F _A 0,08	134
Figura 42: Efeito potencializador da explosão oxidativa de quitosana F _A 0,08 (1 µg/mL) e de quitina (1 µg/mL) depois do pré-tratamento por 3 horas com os oligossacarídeos (50 µg/mL) produzidos por hidrólise de quitosana comercial (F _A 0,15) quitosana F _A 0,27 e quitosana F _A 0,56, utilizando o extrato enzimático de FES (S5)	135
Figura 43: Curva dose-resposta do efeito potencializador da explosão oxidativa de quitosana F _A 0,8 (1 µg/mL) depois do pré-tratamento por 3 horas com os oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana comercial F _A 0,15 (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), utilizando o extrato enzimático de FES (S5)	136
Figura 44: Curva dose-resposta do efeito potencializador da explosão oxidativa de quitosana F _A 0,8 (1 µg/mL) depois do pré-tratamento por 3 horas com os oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana F _A 0,27 (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), utilizando o extrato enzimático de FES (S5)	136
Figura 45: Curva dose-resposta do efeito potencializador da explosão oxidativa de quitosana F _A 0,8 (1 µg/mL) depois do pré-tratamento por 3 horas com os oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana F _A 0,56 (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), utilizando o extrato enzimático de FES (S5)	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de quitinases microbianas	60
Tabela 2: Exemplos de quitosanases microbianas	61
Tabela 3: Ensaios colorimétricos de atividade enzimática: enzima, substratos e métodos	68
Tabela 4: Condições experimentais para o HPLC – PAD. Legenda: Solução A= NaOH 50mM e Solução B= Acetato de sódio 500 mM em NaOH 50 mM	72
Tabela 5: Valores atribuídos às variáveis do planejamento para determinação analítica da atividade enzimática do extrato bruto	74
Tabela 6: Valores atribuídos às variáveis do primeiro planejamento composto central para otimização do meio de cultura	75
Tabela 7: Valores atribuídos às variáveis do segundo planejamento composto central para otimização do meio de cultura	75
Tabela 8: Valores atribuídos às variáveis do planejamento composto central para otimização da extração enzimática	76
Tabela 9: Meio de fermentação utilizados para produção de enzimas quitinolíticas e quitosanolíticas	77
Tabela 10: Valores atribuídos às variáveis do planejamento composto central para otimização da hidrólise enzimática	78
Tabela 11: Atividade enzimática dos extratos obtidos em 48h e 72h de fermentação das linhagens de <i>Trichodermas</i>	85
Tabela 12: Atividade enzimática dos extratos obtidos em 24h de fermentação das linhagens de <i>Aspergillus niger</i>	85
Tabela 13: Planejamento experimental para análise da atividade quitosanolítica do extrato bruto produzido na fermentação por <i>Trichoderma polysporum</i>	86
Tabela 14: Análise de variância para a atividade enzimática do extrato bruto produzido na fermentação por <i>Trichoderma polysporum</i>	87
Tabela 15: Efeitos estimados para a atividade enzimática do extrato bruto produzido na fermentação por <i>Trichoderma polysporum</i>	87
Tabela 16: Planejamento experimental para otimização do meio de cultura para produção da enzima por <i>Trichoderma polysporum</i>	89

Tabela 17: Efeitos estimados do primeiro planejamento experimental para a atividade enzimática do extrato bruto fermentado	89
Tabela 18: Análise de variância do primeiro planejamento experimental para a atividade enzimática do extrato bruto fermentado	90
Tabela 19: Segundo planejamento experimental para otimização do meio fermentativo de produção enzimática por <i>Trichoderma polysporum sp</i>	92
Tabela 20: Efeitos estimados para a atividade enzimática na otimização das concentrações dos substratos sólidos utilizados	92
Tabela 21: Análise de variância para a atividade enzimática na otimização das concentrações dos substratos sólidos utilizados	92
Tabela 22: Atividade enzimática em diferentes quantidades de trigo no tempo de 30h e 48h	94
Tabela 23: Planejamento experimental para extração da enzima bruta na atividade quitosanolítica	95
Tabela 24: Efeitos estimados para a extração da enzima bruta na atividade enzimática ..	95
Tabela 25: Análise de variância para extração da enzima bruta na atividade enzimática .	95
Tabela 26: Atividade enzimática em diferentes temperaturas de extração após 48h de fermentação	97
Tabela 27: Atividade enzimática em diferentes substratos	97
Tabela 28: Medidas de absorbância no meio reacional e cálculo da quantidade de p-nitrofenol liberada e da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase a partir do método descrito por Nawani e Kapadnis (2001) com 250 μ L de extrato enzimático/25 μ L do substrato	108
Tabela 29: Medidas de absorbância no meio reacional e cálculo da quantidade de p-nitrofenol liberada e da atividade de diacetilquitobiose a partir do método descrito por Nawani e Kapadnis (2001) com 250 μ L de extrato enzimático/25 μ L do substrato	109
Tabela 30: Medidas de absorbância no meio reacional e cálculo da quantidade de p-nitrofenol liberada e da atividade de endoquitinase a partir do método descrito por Nawani e Kapadnis (2001) com 250 μ L de extrato enzimático/25 μ L do substrato	109
Tabela 31: Planejamento experimental para otimização da hidrólise enzimática de quitosana	112

Tabela 32: Coeficientes de regressão para a resposta Y ($\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) a partir da matriz com os valores codificados das variáveis independentes	112
Tabela 33: ANOVA da resposta Y a partir da matriz com os valores codificados das variáveis independentes	113
Tabela 34: Perfil dos oligômeros de quitosana produzidos por hidrólise das quitosanas F_A 0,15; 0,27 e 0,56 pelo extrato enzimático S4, identificados por Espectrometria de massa ESI TOF. Legenda: A= Monômeros acetilados e D= Mônmeros desacetilados	122
Tabela 35: Avanços descritos na literatura atual sobre enzimas fúngicas (quitinases e quitosanases) e produção de AGO's	123

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Amino-oligossacarídeos (AGO's) são compostos solúveis em água cuja produção é de grande interesse desde que estes compostos são conhecidos por apresentarem diversas e atraentes atividades biológicas e aplicações e, conseqüentemente, sua utilização é particularmente promissora (MOURYA *et al.*, 2011; AAM *et al.*, 2010; DETERS *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2006). Dentre as diversas aplicações estão a indução da apoptose de células tumorais (LIANG *et al.*, 2007), atividade antioxidante e efeitos inibitórios sobre o crescimento de fungos (WANG *et al.*, 2006), capacidade de elicitar fitopatógenos, promover o crescimento em sistemas agrícolas sustentáveis (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Quitosanas com grau de polimerização (DP) menor que 20 e massa molar média de até 3900 D (0,2–30 kD) são chamados de oligômeros, quito-oligômeros, quito-oligossacarídeos ou amino-oligossacarídeos (MOURYA *et al.*, 2011). Os AGO's são obtidos principalmente por métodos químicos ou enzimáticos. Processos seletivos para gerar uma grande quantidade de AGO's com características específicas são desejáveis a fim de reduzir os custos de separação. Portanto, a hidrólise enzimática tornou-se mais popular do que os métodos químicos nos últimos anos devido ao menor custo, baixo impacto ambiental e alta reprodutibilidade dos resultados obtidos (LEE *et al.*, 2006; BINOD *et al.*, 2007). Enzimas hidrolíticas são amplamente distribuídas na natureza sendo encontradas em espécies de todos os reinos, (ARAKANE & MUTHUKRISHNAN, 2010) e os microrganismos são os principais degradadores ambientais de quitina e seus derivados sendo, por esta razão, constituídos de um recurso natural de enzimas quitinolíticas (GORTARI & HOURS, 2008).

A utilização de linhagens fúngicas na hidrólise enzimática, para preparação de quitosanas com diferentes pesos moleculares, está se tornando uma prática comum,

pois algumas espécies, como as de *Trichoderma* e *Aspergillus*, estudadas por serem agentes de controle biológico, estão comercialmente disponíveis como biopesticidas e biofertilizantes para a agricultura, como também empregadas para produção de enzimas (ARCHER & WOOD, 1995; HARMAN *et al.*, 2004; VINALE *et al.*, 2008).

Este trabalho aborda a fermentação submersa e em estado sólido para a produção de enzimas quitinolíticas utilizando, como recurso, resíduos agro-industriais abundantes disponíveis, tais como farelo de trigo e cascas de camarão dentre os resíduos orgânicos (SILVA *et al.*, 2010). Os efeitos dos resíduos da casca de camarão cultivado para uso comercial na produção de quito-enzimas, principalmente por Fermentação em Estado sólido (FES) com *T. polysporum* foi estudada. As enzimas presentes no extrato enzimático bruto foram caracterizadas e utilizadas para a produção de AGO's potencialmente bioativos.

1.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de amino-oligossacarídeos (AGO's), com características de bioatividade, utilizando enzimas hidrolíticas fúngicas.

1.2 Objetivos específicos

A Figura 1 representa a estratégia do projeto de doutorado e a integração do processo principal com produtos bioativos. O fluxograma foi desenvolvido considerando a produção enzimática por FES utilizando resíduos da carcinocultura, aumentando a sustentabilidade do processo, bem como reduzindo o custo da formação dos AGO's bioativos, agregando valor ao produto obtido.

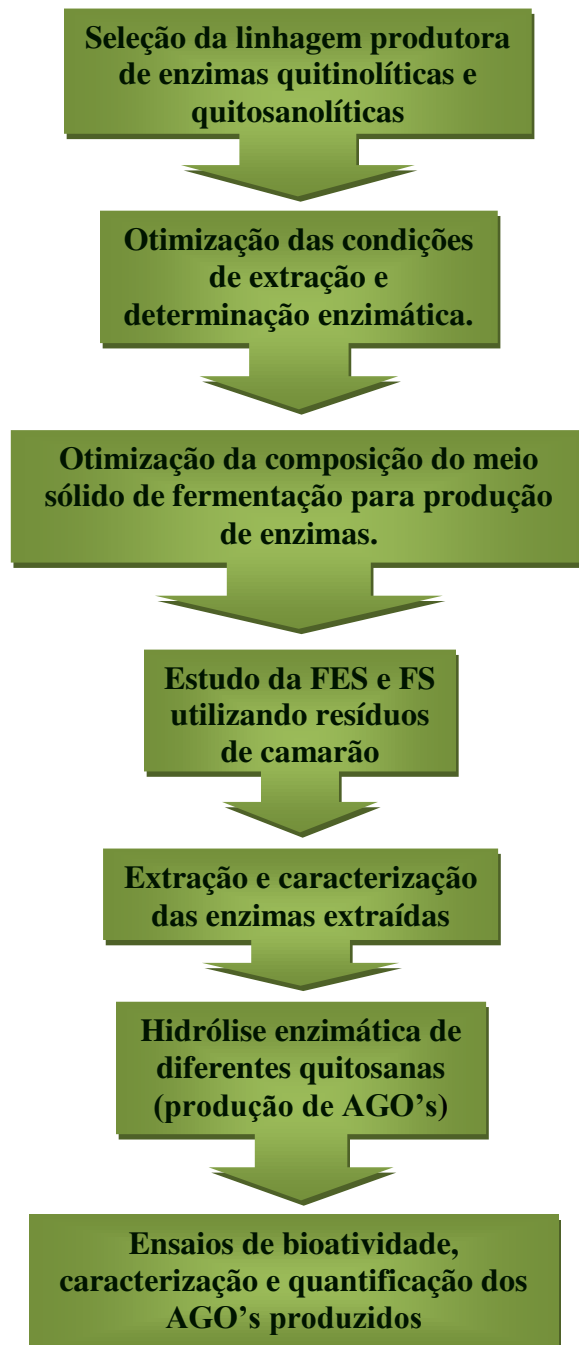


Figura 1: Fluxograma apresentando a visão do projeto.

1.3 Metas utilizadas para o alcance do objetivo

As principais etapas desenvolvidas para atingir o objetivo deste trabalho foram:

- Seleção de linhagem fúngica produtora de quitinase e quitosanase;

- Determinação das condições ótimas de pH e temperatura de atividade das enzimas produzidas pela linhagem selecionada;
- Otimização da composição do meio de cultivo do fungo utilizando a casca do camarão como substrato para FES, visando como respostas à maximização dos teores de quitinases e quitosanases;
- Estudo comparativo das enzimas produzidas por FES e FS;
- Caracterização das enzimas utilizadas na hidrólise de quitosana para produção de oligossacarídeos;
- Hidrólise enzimática de quitosanas parcialmente acetiladas para produção de AGO's;
- Caracterização dos oligossacarídeos formados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Espectrometria de massas (MS) e Cromatografia líquida com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD);
- Ensaios de atividade antimicrobiana dos AGO's em *Pseudomonas syringae*;
- Ensaios de capacidade de indução dos AGO's na explosão oxidativa em células vegetais.

1.4 Produções Bibliográficas

Esta tese de doutorado deu origem, até o momento, aos seguintes trabalhos:

SILVA, L.C.A., HONORATO, T.L., CAVALCANTE, R.S., FRANCO, T.T., RODRIGUES, S. Effect of pH and temperature on enzyme activity of chitosanase produced on solid state fermentation by *Trichoderma* spp. *Indian Journal of Microbiology*, 2012. Publicação online: 20 de julho de 2011.

HONORATO, T.L., FREDERICO, F.R., FRANCO, T.T. *HPLC for Chito-Oligosaccharides Obtained from Enzymatic Hydrolysis of Chitosan*. In: 10th International Conference of the European Chitin Society, Saint-Petersburg, Russia, 20-24 May, 2011.

HONORATO, T.L., MOERSCHBACHER, B.M, FRANCO, T.T. *Chito-Oligosaccharides Produced by Crude Enzyme Extract of Trichoderma polysporum*. In: 10th International Conference of the European Chitin Society, Saint-Petersburg, Russia, 20-24 May, 2011.

SILVA, L.C.A., HONORATO, T.L., FRANCO, T.T., RODRIGUES, S. Optimization of chitosanase production by *Trichoderma koningii* sp. under solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 2011. Publicação online: 03 de dezembro de 2010.

HONORATO, T.L., FRANCO, T.T., MOERSCHBACHER, B.M. *Solid State Fermentation for Chitosan Hydrolysing Enzymes Producing Bioactive Oligomers*. In: V Simpósio Ibero-americano de Quitina – SIAQ, Santiago, Chile, Anais do congresso, 2010.

HONORATO, T.L., SILVA, L.C.A., RODRIGUES, S., FRANCO, T.T. *Otimização de Meio de Cultivo de Fermentação Semi-Sólida de Trichoderma polysporum para a Produção de Enzimas Hidrolíticas*. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, Natal-RN, anais do congresso, 2009.

HONORATO, T.L., SILVA, L.C.A., RODRIGUES, S., FRANCO, T.T. *Estudo da Atividade Enzimática de Linhagens de Trichoderma koningii sp. e Trichoderma polysporum sp. Produtoras de Enzimas Hidrolíticas*. In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, Recife-PE, anais do congresso, 2008.

RODRIGUES, S., HONORATO, T.L., FRANCO, T.T., CAVALCANTE, R.S., SILVA, L.C.A. *Estudo da Atividade Enzimática de Linhagens de Trichoderma harzianum sp. e Trichoderma viride sp.* In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ, Recife-PE, anais do congresso, 2008.

Artigos em fase de submissão:

HONORATO, T.L., GRANUSSO, F., RODRIGUES, S., GUEDDARI, N.E. MOERSCHBACHER, B.M., FRANCO, T.T. *Solid-state fermentation of Trichoderma*

polysporum on shrimp shells yields a chitosanolytic enzyme extract producing bioactive chito-oligosaccharides

HONORATO, T.L., FREDERICO, F.R., FRANCO, T.T. *Quantification of Hetero-Chito-Oligosaccharides Obtained from Enzymatic Hydrolysis of Chitosan by HPLC.*

HONORATO, T.L., MOERSCHBACHER, B.M., FRANCO, T.T. *Priming of the oxidative burst in rice cell cultures by preparation of chito-oligosaccharide of Trichoderma polysporum enzymes-hydrolysing process.*

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos da Indústria Pesqueira, Quitina e Quitosana

Com produção de 30 mil toneladas em 2010, o estado do Ceará ocupa atualmente a liderança na criação de camarão em cativeiro no país (GOMES, 2011). O estado possui potencial de 50 mil hectares localizados ao longo de 600 km da costa cearense e nos 18 bilhões de m³ de água dos seus açudes.

Com o aumento da produção de camarão em cativeiro, torna-se evidente a geração de maior volume de resíduos sólidos durante a etapa de beneficiamento e, dependendo do sistema de produção, representa entre 34% a 50% da massa do camarão inteiro. O resíduo de camarão, associado à atividade de processamento e comercialização tem gerado problemas de caráter ambiental. Geralmente, os resíduos não recebem destino final adequado e sua disposição final, em muitos casos, ocorre em aterros públicos sem nenhum tipo de tratamento. Os aterros sanitários e lagoas de tratamento de efluentes não são alternativas recomendáveis devido ao impacto ambiental que provocam nas áreas costeiras ou em águas interiores, além de comprometer o uso destas áreas como pólo de turismo e lazer.

A quitina, matéria-prima para obtenção da quitosana, é encontrada no exoesqueleto dos artrópodes, crustáceos e insetos na forma de uma matriz biopolimérica impregnada de componentes minerais associada a proteínas e pigmentos (KURITA, 2001). Este polímero é um dos mais abundantes na natureza, perdendo em quantidade apenas para a celulose e hemicelulose (HAI *et al.*, 2003). A utilização racional do rejeito das indústrias de beneficiamento de carnes de crustáceos, por exemplo, pode transformar seus resíduos em produtos de alto valor agregado (TSIGOS *et al.*, 2000).



quitina



quitosana

44

A denominação quitosana refere-se a uma variedade de derivados solúveis de quitina polimérica que podem ser descritas ou classificadas de acordo com a fração de resíduos N-acetilados (F_A) ou grau de N-acetilação (DA), o grau de polimerização (DP) ou massa molar (MM), a distribuição de massa molar (PD, de polidispersão) e o padrão de N-acetilação (P_A) ou sequência (MOURYA *et al.*, 2011; AAM *et al.*, 2010). Em contraste com a quitina, a presença de grupos de amina livres ao longo da cadeia de quitosana permite a dissolução desta macromolécula em solução aquosa ácida devido à protonação desses grupos sendo variáveis como F_A , MM, pH, força iônica e a adição de um solvente não aquoso consideradas quando se trabalha com soluções de quitosana (ARANAZ *et al.*, 2009). A insolubilidade em água da quitosana descarta muita das suas utilizações potenciais, sendo a conversão de quitosana em seus oligômeros um caminho para a resolução do problema.

2.2 Atividade Biológica de Quitosana e AGO's como Indutores dos Mecanismos de Respostas em Plantas

As plantas estão constantemente expostas a patógenos, como por exemplo, microrganismos com acesso ao interior da planta, penetrando diretamente na superfície de folhas e raízes ou entrando por aberturas como estômatos ou ferimentos (ZAPAROLI, 2007). Estes invasores superam defesas primárias das plantas, barreiras físicas e químicas pré-formadas como cutículas, camadas de cera e compostos antimicrobianos produzidos constitutivamente (CHISHOLM *et al.*, 2006). Uma vez no interior da planta, os microrganismos enfrentam uma rígida parede celular de celulose. Após atravessar a parede celular, o invasor tem acesso à membrana celular da planta, local onde ocorrem as principais interações patógeno/hospedeiro. Quando um patógeno consegue ultrapassar todas as barreiras iniciais a ele impostas, ocorre interação direta com o hospedeiro (ZAPAROLI, 2007).

Ao contrário dos mamíferos, as plantas não possuem células móveis envolvidas em reações de defesa e um sistema imune adaptativo. Em vez disso, elas possuem um sistema imune rápido (de minutos a horas) e local, em associação com as respostas de defesa sistêmicas induzidas (RI) e sinais sistêmicos das partes infectadas (JONES E DANGL, 2006; PARKER, 2009). A defesa induzida contra vários patógenos é mediada pela detecção

de microrganismos ou padrões moleculares associados ao patógeno (MAMP/PAMP), que são produzidos por agentes infecciosos externos, além de padrões moleculares induzidos da própria planta hospedeira (padrões moleculares induzidos ao patógeno – PIMP) (PAULERT *et al.*, 2010), após o reconhecimento do patógeno via percepção destas moléculas sinalizadoras (TROUVELOT *et al.*, 2008). Acredita-se que essas moléculas podem imitar a invasão do patógeno (MÉNARD *et al.*, 2004).

Elicitores endógenos são, tipicamente, oligogalacturanos derivados de pectinas, ou celodextrinas, xiloglucanos ou poliglucanos derivados da celulose ou hemicelulose (AZIZ *et al.*, 2007). Compostos químicos dos mais variados grupos (metais pesados, como o Hg) podem atuar como elicitores exógenos de mecanismos de defesa (OOSTENDORP *et al.*, 2001; FAIZE *et al.*, 2004) assim como vírus (MARTE *et al.*, 1993), bactérias (ROMEIRO & GARCIA, 2007), fungos (MEERA *et al.*, 1995) e nematóides (KOSAKA *et al.*, 2001), tanto por células vivas e intactas, como por seus extratos e frações (ROMEIRO *et al.*, 2005). Fragmentos de quitina (BAIER *et al.*, 1999; ORTMANN & MOERSCHBACHER, 2006), oligômeros e polímeros de quitosana (DOS SANTOS *et al.*, 2008), oligoglucanos (SHINYA *et al.*, 2006) são exemplos de elicitores exógenos das paredes celulares fúngicas, além de outros exemplos como glicanos obtidos a partir de macroalgas (PAULERT *et al.*, 2010; TROUVELOT *et al.*, 2008). Nestes e em muitos outros casos, os compostos elicitores ativos demonstraram ser carboidratos atuando nas respostas de defesa, ou provocando um estado da chamada resistência induzida.

Estudos constantes sobre elicitores e sua relação na interação patógeno-hospedeiro são apresentados, mas ainda há muito a ser encontrado experimentalmente com relação ao modo de atuação destas moléculas no interior da planta. Entretanto, eventos desencadeados por plantas após o reconhecimento de elicitores foram caracterizados, incluindo respostas rápidas como a fosforilação e/ou ativação de proteínas da membrana plasmática (alterando o fluxo de entrada de íons na célula), ativação de proteínas quinase, explosão oxidativa, mobilização ou geração de moléculas sinalizadoras (como cálcio livre - Ca^{2+} , óxido nítrico - NO e espécies ativas de oxigênio – EAO's) (GARCIA-BRUGGER *et al.*, 2006). Mecanismos de defesa mais lentos incluem a produção de compostos antimicrobianos como fitoalexinas, espessamento da parede celular, indução de proteínas relacionadas à patogenicidade (PRP's) e de enzimas de proteção ao estresse oxidativo e lignificação da

parede celular (MÉNARD *et al.*, 2004; SCHEEL, 1998). Muitas vezes, essas reações de resistência são acompanhadas pela morte programada da célula hospedeira, caso em que a totalidade das respostas de resistência é denominada resposta de hipersensibilidade (RH) (KLARZYNSKI *et al.*, 2000; MERCIER *et al.*, 2001). O processo é desencadeado quando um sinal externo (elicitador) se liga a um possível receptor na superfície da célula vegetal e através dele o sinal primário é transmitido para o interior da célula, ativando os mensageiros secundários, que amplificam o sinal e regulam a expressão de genes específicos, determinando o desenvolvimento de interações compatíveis (doença) ou incompatíveis (resistência) (LEITE *et al.*, 1997). RH constitui a resposta local primária de plantas e está geralmente associada com a resistência a doenças. Acontece, geralmente, como uma rápida necrose localizada, gerada por uma morte celular programada no local de infecção a fim de limitar a invasão do patógeno (STASKAWICZ *et al.*, 1995; LORRAIN *et al.*, 2003). Durante a resistência, diversas moléculas de sinalização são induzidas localmente. Na sequência do RH, a resistência sistêmica adquirida é induzida no tecido infectado distal, entretanto o sinal sistêmico atualmente ainda é pouco conhecido (SOOSAAR *et al.*, 2005).

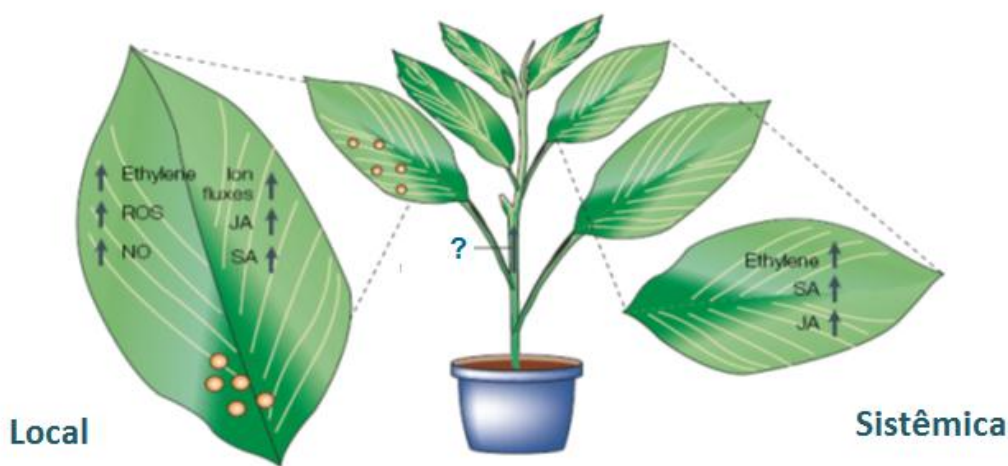


Figura 3: Mecanismo de defesa local e sistêmico das plantas (SOOSAAR *et al.*, 2005).

Vários tipos de RI foram descritas de acordo com as diferentes vias de sinalização como a resistência sistêmica induzida (RSI), resistência sistêmica adquirida (RSA), dentre outros (GOELLNER & CONRATH, 2008). A imunização da planta denominada

resistência sistêmica adquirida (RSA) – no Inglês, *systemic acquired resistance* – SAR, desenvolve-se frequentemente após infecções foliares localizadas por diversos patógenos. Neste processo, as folhas distais à infecção localizada difundem sinais de defesa pela planta, induzindo resistência a ataques subsequentes do patógeno (JUNG *et al.*, 2009). Resistência sistêmica induzida em plantas (RSI) – no inglês, *induced systemic resistance* – ISR, é frequentemente associada com uma maior habilidade para mobilizar rapidamente e efetivamente as respostas de defesa celular preparando a planta para a ativação de uma resposta de defesa mais forte sob uma infecção secundária, induzindo resistência a ataques subsequentes de patógenos, um estado denominado “*primed*” (CONRATH *et al.*, 2002).

2.3 Eventos desencadeados após o reconhecimento de elicitores

RSA e RSI são fenômenos distintos quanto à forma por meio da qual são induzidos e desencadeados e governados por mecanismos bioquímicos diferentes (STICHER *et al.*, 1997), mas fenotipicamente semelhantes, no sentido em que as plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada. Em ambos os casos o “*priming*” celular é uma importante componente da maquinaria de RI (GOELLNER & CONRATH, 2008). A RSA envolve o acúmulo de Proteínas Relacionadas com Patogênese (PRP’s) como mecanismo de defesa da planta, a indução é salicilato dependente, podendo resultar em alterações visuais, como necroses. A RSI não acumula PRP’s, a planta que sofreu indução não exhibe alterações e o fenômeno não é salicilato dependente, parecendo haver outra rota de sinalização associada a jasminatos e etileno (BARROS *et al.*, 2010).

Um efeito *priming* foi descrito para alguns componentes bacterianos específicos, principalmente lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas (NEWMAN *et al.*, 2007). Em diversos artigos, estes compostos são moléculas sinalizadoras importantes para a percepção de patógenos, tendo sido demonstrado que eles atuam não para mobilizar diretamente as respostas de defesa das plantas, mas para aumentar a velocidade e/ou a força de várias respostas a estresses bióticos ou abióticos (NEWMAN *et al.*, 2007). Da mesma forma, exopolissacarídeos (EPS) isolados de uma rizobactéria promotora do crescimento de

plantas atuaram como “*primed*” em culturas de células de trigo e arroz para subsequente elicitação por oligômeros de quitina ou polímeros de quitosana. (ORTMANN *et al.*, 2006). A aplicação direta de EPS nas células cultivadas em suspensão não induziu a explosão oxidativa, mas o pré-tratamento das células com EPS por algumas horas potencializou (*primed*) a indução da explosão oxidativa por hexâmeros de quitina (ORTMANN & MOERSCHBACHER, 2006; ORTMANN *et al.*, 2006). Já em suspensão de culturas celulares de gimnosperma *Araucaria angustifolia*, oligômeros e polímeros de quitosana induziram uma explosão oxidativa e a atividade elicitora aumentou com o aumento do F_A (DOS SANTOS *et al.*, 2008).

A explosão oxidativa é uma das respostas mais rápidas e mais estudadas de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno. Vários indícios sugerem a participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas respostas de defesa de plantas (LIN *et al.*, 2005; IRITI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008; IRITI & FAORO 2009). Processos oxidativos em geral parecem ter papel crucial nos estágios iniciais da indução dessas respostas. Embora o oxigênio molecular, essencial ao metabolismo aeróbico, seja muito pouco reativo, é fonte potencial de formas reativas. Nos vegetais, os cloroplastos (onde ocorre a fotossíntese, liberando oxigênio) são fontes particularmente ricas de radicais livres, moléculas muito reativas por terem um elétron livre, tóxicas para as células (BARROS *et al.*, 2010). Normalmente os níveis de espécies reativas de oxigênio são baixos nas células vegetais, mas sua produção cresce em infecções por organismos vivos ou em processos foto-oxidativos decorrentes de estresses não biológicos, conforme descrito por MARGIS-PINHEIRO *et al.*, (1999). A primeira molécula originada do oxigênio, muito reativa, é o íon superóxido (O_2^-), que pode não só romper certas ligações químicas de compostos orgânicos, mas também originar outras espécies oxidantes, como o H_2O_2 . Este é, além de tóxico para as células (por inativar certas enzimas do ciclo de Calvin fixadoras de carbono atmosférico), pode reagir com o íon superóxido gerando outros radicais livres, como a hidroxila ($OH^\cdot$), ainda mais reativa e tóxica (DOS SANTOS *et al.*, 2008).

Quitina, um dos principais componentes da parede celular de fungos, atua como um MAMP (DENOUX *et al.*, 2008). A aplicação de oligômeros de quitina purificados às plantas ou culturas de células de plantas elicitou diversas reações de defesa bem como pré-tratamento de quitina nas plantas também reduziu a suscetibilidade de um subsequente

ataque patógeno fúngico (TANABE *et al.*, 2006). Quitosana induziu a síntese de fitoalexinas em vagens de ervilha (HADWIGER E BECKMAN, 1980), em culturas em suspensão de células de soja (KÖHLE *et al.*, 1984), e células de salsa (CONRATH *et al.*, 1989) e também induziu a resposta de lignificação em folhas de trigo danificadas (PEARCE E RIDE, 1982). Além disso, a quitosana ativa a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (LEE *et al.*, 1999.), inibe o crescimento de fungos e provoca uma variedade de reações de defesa em plantas superiores, aumentando consequentemente a resistência da planta contra patógenos, como por exemplo a capacidade de conferir resistência a *Botrytis cinerea* em folhas de *Arabidopsis* (POVERO *et al.*, 2011). Essas habilidades destacam a importância potencial do uso da quitosana e seus oligômeros como um elicitador e como um componente de interação fungo-hospedeiro.

Priming é tipicamente induzido por PAMP's, tais como fragmentos de parede celular, ou lipo ou exopolissacarídeos bacterianos, modulando as respostas de defesa da planta (ORTMANN & MOERSCHBACHER, 2006; NEWMAN *et al.*, 2007; GOELLNER & CONRATH, 2008). Um estado *primed*, também chamado de potencialização, pode também ser obtido com elicitores utilizados em concentrações insuficientes para induzir respostas mensuráveis sozinhos (VAL *et al.*, 2008).

Novas abordagens para o tratamento de doenças de plantas estão sendo exploradas e uma opção importante é a indução de resistência no hospedeiro usando moléculas sinalizadoras naturais, ou seja, compostos *priming*. Apesar de existir uma ampla abordagem sobre a atuação de polímeros e oligômeros de quitosana como elicitores nos mecanismos de defesa de plantas pouca informação é disponível hoje em RSI de oligômeros de quitosana obtidos enzimaticamente. Esta pesquisa descreve, dentre os demais objetivos expostos, a habilidade de oligômeros de quitosana obtidos enzimaticamente a partir de extratos enzimáticos brutos de FES de potencializar, para um subsequente reconhecimento de elicitores, potencializando e melhorando a resistência de células vegetais.

2.4 Despolimerização Enzimática de Quito-materiais e Suas Aplicações

Quitosanas com DP <20, e de massa molar média entre 0,2 a 30 kD, são chamadas oligômeros de quitosana, quito-oligômeros ou amino-oligossacarídeos (AGO's). E pode ser despolimerizada, produzindo polímeros de menor massa molar, oligossacarídeos e

monômeros (MOURYA & INAMDAR, 2008). A despolimerização pode ocorrer por métodos químicos, físicos ou enzimáticos (ARANAZ *et al.*, 2009). Os métodos químicos compreendem a hidrólise utilizando HCl, H₂O₂, NaNO₂ ou HNO₂ (EINBU & VÅRUM, 2007; LIN *et al.*, 2009a; MORRIS *et al.*, 2009; ALLAN & PEYRON, 1995), enquanto os métodos físicos compreendem despolimerização por meio de microondas, ultra-som, radiação gama, calor (XING *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2008; YOKSAN *et al.*, 2004). A degradação por meio de ultrassom é capaz de produzir quitosana de massas molares relativamente uniformes, no entanto, devido à baixa eficiência e alto custo de produção, a degradação física ainda necessita ser desenvolvida. Quitosana é capaz de sofrer hidrólise (degradação hidrolítica) devido à presença de ligações glicosídicas na molécula. Estas ligações são bastante instáveis quando tratadas com compostos químicos envolvendo soluções aquosas de ácidos. A reação pode ser vista no esquema da figura 4 (MOURYA *et al.*, 2011). Os métodos químicos e físicos não são considerados ideais para a obtenção de amino-oligosacarídeos (AGO's) definidos e biologicamente ativos.

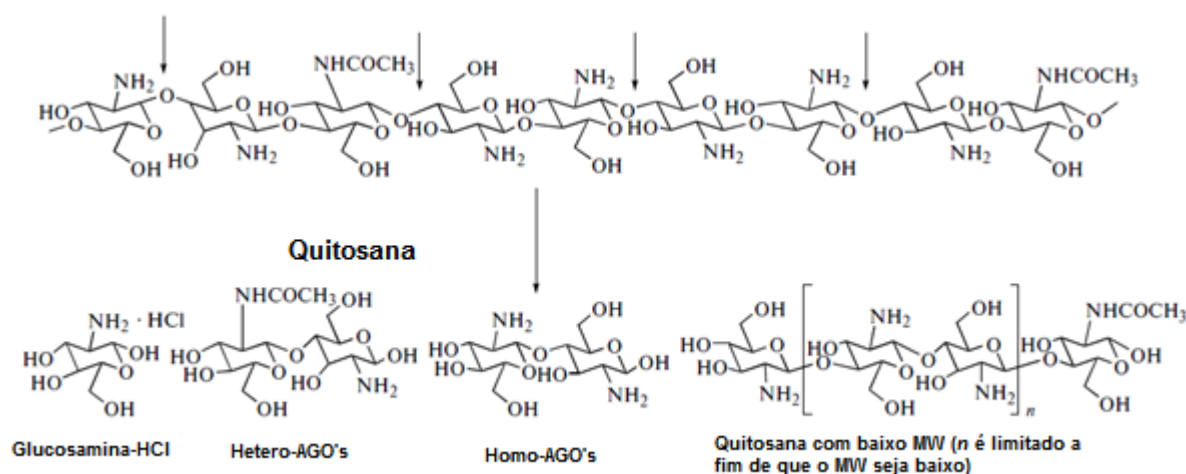


Figura 4: Produtos de degradação de quitosana (MOURYA *et al.*, 2011).

A despolimerização enzimática, baseada ou não em enzimas específicas, possui vantagens em relação aos outros dois métodos, uma vez que apresenta seletividade escolhendo pontos específicos para o rompimento das cadeias, visando à obtenção de massas molares específicas (XIE *et al.*, 2010). Além disso, a hidrólise e a distribuição da massa molar do produto podem ser melhor controladas por meio do pH, temperatura e

tempo de reação, minimizando também as alterações químicas dos produtos (LIN *et al.*, 2009b; MOUYRA & INAMDAR, 2008). Uma vez que a síntese enzimática por microrganismo é controlada pela repressão e indução metabólica (GOTO *et al.*, 1998; GUPTA *et al.*, 2003), a presença de polímero no meio de cultura induz a produção de enzimas capazes de hidrolizá-lo.

A Figura 5 apresenta um diagrama representando a produção de quitosana e seus oligômeros por métodos físicos, químicos e enzimáticos a partir de crustáceos, fungos e alguns moluscos cefalópodes (Lula).

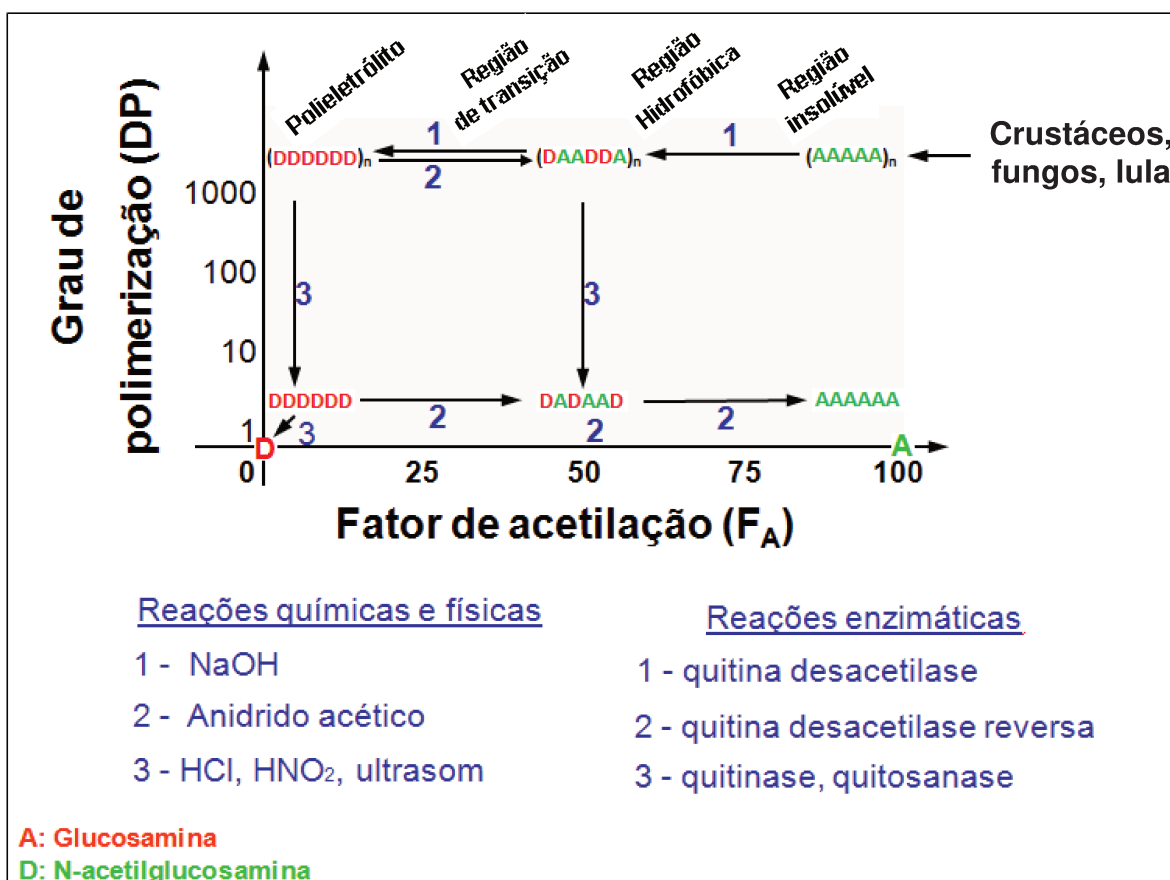


Figura 5: Transformação química, física e enzimática de quitina e quitosana.

A utilização de enzimas puras em processo industrial pode torná-lo inviável devido o alto custo e disponibilidade limitada das enzimas, no entanto, diversos estudos tem sido realizados com o intuito de reduzir esses custos (COUTO, 2008; MAZUMDER *et al.*, 2009, FLORIDO *et al.*, 2009; BRZEZINSKA *et al.*, 2010).

Quitina e quitosana podem ser naturalmente biodegradadas por uma variedade de hidrolases, tais como lisozima, pectinases, celulases, hemicelulases, lipases e amilases, papaína, além de quitinase, quitosanase e quitina desacetilases (MOUYRA & INAMDAR, 2008) produzindo quitosanas de menores massas molares e maior solubilidade (ARANAZ *et al.*, 2009). Quando estes produtos possuem entre 3 a 20 unidades monoméricas são então classificados como oligossacarídeos (STOYACHENKO *et al.*, 1994).

A quitina é degradada enzimaticamente por um sistema quitinolítico com sinergismo e ação consecutiva, que hidrolisa totalmente a quitina em N-acetil- β -D-glicosamina (GlcNAc) (SHAIKH & DESHPANDE 1993; FELSE & PANDA 2000; PATIL *et al.*, 2000). Quitinases são amplamente distribuídas na natureza sendo encontradas em espécies de todos os reinos, como arqueos e eubactérias, protistas, fungos, plantas e animais, incluindo artrópodes e mamíferos, possuindo diferentes funções e estão envolvidas em atividades como digestão, muda de artrópodes, imunidade e patogenicidade (ARAKANE & MUTHUKRISHNAN, 2010; DUO-CHUAN 2006; NEUHAS 1999). Microrganismos são os principais degradadores ambientais de quitina, e por esta razão eles constituem um importante recurso natural de enzimas quitinolíticas (GORTARI & HOURS, 2008). Estudos sobre a produção de quitinases e quitosanases são diversos (NAWANI *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2010; BRZEZINSKA *et al.*, 2010, WANG *et al.*, 2011), entretanto a obtenção destas enzimas em escala industrial, para aplicações comerciais, ainda é restrita devido ao alto custo e a sua disponibilidade limitada (XIE *et al.*, 2010; NAWANI *et al.*, 2010; AKHIR *et al.*, 2009; AL AHMADI *et al.*, 2008). Por ser a hidrólise enzimática bastante efetiva para a produção de oligossacarídeos, existem diversos trabalhos propondo a utilização da mesma. O primeiro trabalho citado utilizando protease comercial (papaína) para despolimerização da quitosana foi publicado por MUZZARELLI *et al.* (1994). GRIGOLON (2001) utilizou papaína livre e imobilizada para produção de polímeros de baixa massa molar e quitoooligômeros onde, a ação da papaína imobilizada, atuou majoritariamente na geração de polímeros de massa molar 2 kD. A utilização de papaína imobilizada no processo de despolimerização da quitosana apresentou maior eficácia (LIN *et al.*, 2002). Atualmente, a utilização de pectinase comercial de *Aspergillus Niger* na hidrólise enzimática para preparação de quitosanas com diferentes pesos moleculares é prática comum (ABD-ELMOHDY *et al.*, 2010). Estas preparações comerciais são misturas

de diversas enzimas e possuem, provavelmente, quitinases e quitosanases como contaminantes.

A literatura a respeito dos efeitos biológicos de quitosanas é extensa, mas relativamente pouco se sabe sobre os efeitos dos seus oligômeros (KIM & RAJAPAKSE, 2005; YIN *et al.*, 2009) e os mecanismos diversos de bioatividade dos mesmos. Uma hipótese sugere que os AGO's interagem com proteínas que podem atuar na quitina (por exemplo, quitinases) ou que os mesmos são utilizados supostamente para se ligar à quitina, detectando-a (YIN *et al.*, 2009). O pH do meio de cultura na produção dos AGO's, o grau de polimerização (DP) e o fator de acetilação (F_A) dos oligossacarídeos podem ser considerados importantes na determinação da bioatividade (OLIVEIRA JR *et al.*, 2008). Na medicina, há indícios de que os AGO's podem ser utilizados como medicação contra asma (KAWADA *et al.*, 2007), agentes antibacterianos (RHOADES *et al.*, 2006) e vetores na terapia gênica (KÖPING-HÖGGÅRD *et al.*, 2004). Além disso, segundo a literatura, AGO's podem reduzir a metástase e crescimento do tumor em câncer (SHEN *et al.*, 2009), aumentar a força óssea na osteoporose (RATANAVARAPORN *et al.*, 2009), atuar contra doenças intestinais crônicas (DETERS *et al.*, 2008) e podem inibir quitinases em parasitas *Plasmodium*, prevenindo a malária (SHAHABUDDIN *et al.*, 1993). Outros efeitos potenciais dos AGO's como os imune-modulatórios (KIM *et al.*, 2006), as atividades anti-fúngicas (OLIVEIRA JR *et al.*, 2008; SEYFARTH *et al.*, 2008) e a diminuição nos níveis séricos de glicose nos diabéticos (LEE *et al.*, 2003) também foram descritos.

Estudos têm demonstrado que quitosanas de baixa massa molar, na faixa de 5 a 20 kD, apresentam atividade biológica superior quando comparadas aos efeitos da quitosana. Existem relatos de que estas apresentam alta atividade bactericida sobre bactérias patogênicas (JEON *et al.*, 2001). Bioensaios executados com misturas de oligossacarídeos com uma média de DP10 com massa molar em torno de 1 kD foram mais efetivos que quitosanas de alto DP na inibição do crescimento micelial de uma variedade de fungos fitopatogênicos (OLIVEIRA JR *et al.*, 2008). O efeito anti-fúngico de quitosanas de baixa massa molar parece ser causada pela interação com lipídios na membrana plasmática, levando a alterações morfológicas e a perturbações da superfície celular (PARK *et al.*, 2008). A composição da membrana plasmática fúngica parece ser importante para a sensibilidade à quitosana e um elevado teor de ácidos graxos polinsaturados torna os fungos

mais sensíveis (PALMA-GUERRERO *et al.*, 2010). Convém destacar que alguns dos efeitos biológicos relatados pela quitosana podem ser, de fato, devido aos AGO's que surgem naturalmente quando a quitosana é degradada por enzimas hidrolíticas (AAM *et al.*, 2010).

2.5 Clivagem e Especificidade Enzimática

Quitinases e quitosanases são hidrolases glicosídicas que convertem quitina e quitosanas a produtos de baixa massa molar (AGO's) por hidrólise das ligações glicosídicas (1-4) (HEGGSET *et al.*, 2009). Hidrolases glicosídicas podem ser divididas em diferentes famílias baseadas na sequência primária, estrutura tridimensional e mecanismo catalítico. Hidrolases glicosídicas (HG) estão classificadas na base de dados *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZy) (CANTAREL *et al.*, 2009), que fornece uma lista continuamente atualizada das famílias HG e, desde alguns anos, também outras famílias de enzimas ativas em carboidratos tais como glicosil transferases e carboidrato esterases.

A classificação CAZy baseia-se puramente na sequência de aminoácidos, o que dá uma informação muito útil, visto que sequência, estrutura e mecanismo estão relacionados. Quitinases ocorrem nas famílias HG18, HG19 e têm a capacidade única de hidrolisar ligações entre dissacarídeos N-acetilglicosaminados (AA), discriminando-as, devido essa propriedade, das enzimas quitosanases. No entanto quitinases são perfeitamente capazes de hidrolisar quitosana, embora em graus diferentes, apesar de não hidrolisar ligações dissacarídicas desacetiladas (DD) (AAM *et al.*, 2010). A família 18 contém principalmente quitinases de fontes fúngicas, mas inclui algumas enzimas de bactérias, vírus, animais, insetos, plantas e, conseqüentemente a família é diversificada em termos evolutivos. A Família 19 consiste em quitinases de plantas (Classes I, II e IV) e algumas de origem bacteriana como a quitinase C de *Streptomyces griseus* (GORTARI & HOURS, 2008).

Enzimas com atividade de quitosanase são encontradas nas famílias HG 5, 7, 8, 46, 75 e 80. HG7 é uma família de celulasas e em muito poucos casos atividade quitosanólítica foi detectada como uma atividade destas misturas de enzimas. HG5 contém uma variedade de atividades enzimáticas, incluindo quitosanases, celulasas, liqueninases, mananases e xilanases. Novamente, a atividade quitosanólítica foi detectada em apenas alguns poucos casos, a qual parece estar relacionada às celulasas. Em HG8, enzimas quitosanases ocorrem

com mais frequência (ao lado, por exemplo, de celulasas e xilanases) e esta família parece conter algumas quitosanases verdadeiras (ADACHI *et al.*, 2004). As outras três famílias, HG46, HG75 e HG80 contêm exclusivamente quitosanases. Famílias HG75 e HG80 têm apenas alguns membros e existem poucas informações estruturais. As quitosanases mais estudadas são aquelas pertencentes à família 46 (LACOMBE-HARVEY *et al.*, 2009). CHENG *et al.* (2006), explorando uma quitosanase da família 75 produzida por *Aspergillus fumigatus* concluíram que a quitosanase estudada era uma enzima que atuava invertendo e clivando as ligações de **A-D** e **D-D** nos substratos. Em comparação com quitosanases bacterianas os mecanismos catalíticos de quitosanases fúngicas permaneceram pouco estudados (WANG *et al.*, 2008).

Baseado na especificidade do tipo de quitosana, as quitosanases foram classificadas em subclasses I, II e III (AAM *et al.*, 2010). Quitosanases na subclasse I podem hidrolisar ligações **A-D** e **D-D**, subclasse de enzimas II pode hidrolisar somente ligações **D-D**, enquanto que as enzimas subclasse III podem hidrolisar ligações **D-D** e **D-A**. Enzimas da subclasse I têm sido encontradas em ambas as famílias 46 e 75 (CHENG *et al.*, 2006). Na família 46, enzimas da subclasse III também foram encontradas (HORN *et al.*, 2006a).

A hidrólise da ligação glicosídica é uma substituição nucleofílica no carbono anomérico, e pode levar à retenção ou inversão da configuração anomérica (AAM *et al.*, 2010). Ambas as reações de hidrólise ocorrem em geral por meio de catálise ácida e requerem um par de ácidos carboxílicos no sítio ativo da enzima. Um ácido carboxílico atua como um doador de prótons, facilitando a saída do grupo de partida, e os outros atuam como uma base (mecanismo de inversão) ou como um nucleófilo (mecanismo de conservação). Em ambos os mecanismos, a posição do doador de prótons é na ligação de hidrogênio distante do oxigênio glicosídico. O mecanismo de inversão (também chamado de mecanismo de deslocamento simples) é uma reação "*one-step*", onde a protonação do oxigênio glicosídico ocorre simultaneamente com um ataque nucleofílico no carbono anomérico por uma molécula de água ativada. Esta molécula de água situa-se entre um grupo carboxílico e o carbono anomérico e é ativada pelo grupo carboxílico que atua como uma base. Uma vez que a molécula de água aproxima-se do carbono anomérico do lado da base catalítica, este mecanismo leva à inversão da configuração anomérica. Quitosanases pertencentes às famílias HG46, HG75 e HG80 e quitinases da família 19 utilizam o

mecanismo de inversão (CANTAREL *et al.*, 2009; ADACHI *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2006).

O mecanismo de conservação (também conhecido como mecanismo de deslocamento duplo) é uma reação de duas etapas, onde a primeira etapa envolve a protonação do oxigênio glicosídico (pela catálise ácida) e um ataque nucleofílico congruente no átomo de carbono anomérico pelo nucleófilo (o segundo ácido carboxílico). Este ataque leva à quebra da ligação glicosídica e à formação de uma ligação covalente entre o carbono anomérico e o nucleófilo catalítico (VOCADLO *et al.*, 2001). Posteriormente, este intermediário é hidrolisado por uma molécula de água que aproxima o carbono anomérico para uma posição próxima à do oxigênio glicosídico original, levando à retenção da configuração do carbono anomérico.

Quitinases da família 18 utilizam uma variante especial do mecanismo de deslocamento duplo, conhecido como o mecanismo de deslocamento duplo, assistida pelo substrato. Nesse caso, o átomo de oxigênio da carbonila do grupo N-acetil do açúcar vinculado no subsítio -1 atua como nucleófilo, levando à formação de um íon oxazolínic intermediário. Devido a esta participação do grupo N-acetil na catálise, as quitinases da família 18 requerem que uma A esteja ligada no subsítio -1 nos substratos ligantes-produtivos de quitosana e oligômeros de quitosana (SØRBOTTEN *et al.*, 2005; VAN AALTEN *et al.*, 2001).

A Figura 6 representa esquematicamente os subsítios do sítio ativo das hidrolases glicosídicas. Propõe-se que o sítio ativo das hidrolases glicosídicas é dividido em subsítios responsáveis pela interação com os diferentes resíduos de monossacarídeos presentes no carboidrato (FERREIRA, 2001). A nomenclatura para esses subsítios foi unificada por DAVIES *et al.* (1997) que propuseram que o ponto de clivagem da ligação glicosídica seria o ponto de partida para a numeração desses subsítios (Figura 6). Assim os subsítios que interagem com os monossacarídeos da região não redutora do substrato têm uma numeração negativa decrescente a partir do ponto de clivagem, já os da região redutora apresentam numeração positiva crescente. Por convenção, a extremidade não redutora é localizada a esquerda e a redutora à direita. O sítio de ligação que acomoda o resíduo de monossacarídeo que fica a esquerda do ponto de clivagem é denominado subsítio -1 e o que fica a direita de +1 (DAVIES *et al.*, 1997). Após a quebra da ligação, a unidade

monossacarídea ligada ao sítio -1 se transforma na extremidade redutora ao passo que àquela ligada ao sítio +1 se transforma na extremidade não redutora do oligossacarídeo formado. A maior parte das quitinases possuem sítios -2 à +4 e/ou -3 à +3. As endoglicanases são enzimas que costumam apresentar diversos subsítios para a interação de monossacarídeos na região não redutora do carboidrato. As glicosidades apresentam apenas 1 subsítio (-1) para a interação com resíduos de monossacarídeos pela clivagem enzimática do substrato. Os subsítios que interagem com os resíduos da extremidade redutora podem variar em número nas β – glicosidades (FERREIRA, 2001).

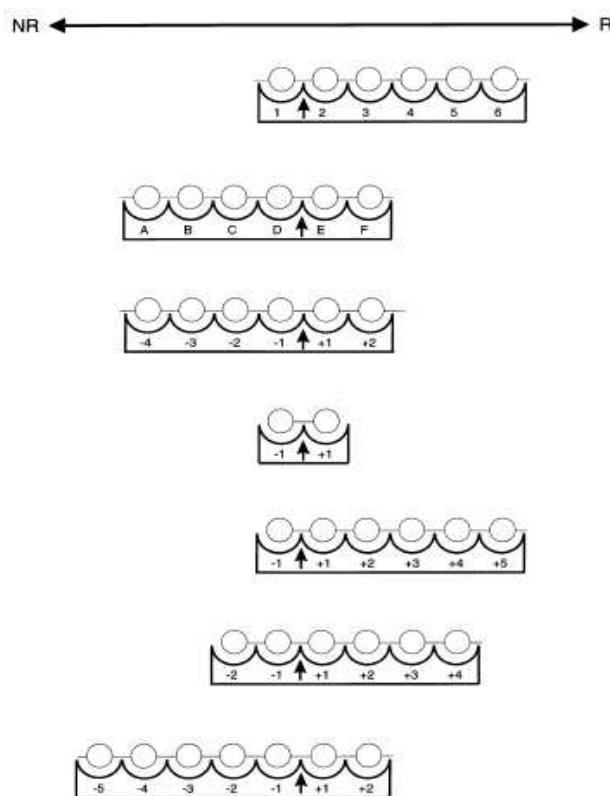


Figura 6: Sítios da ligação de glicosidases segundo DAVIES *et al.*, 1997.

Quitinases e quitosanases podem ter atividade endo ou exo (Figura 7), onde tanto os modos endo e exo de ação podem estar combinados com mecanismo de processividade da enzima. A processividade é o resultado da ligação alternada do substrato a mais de um sítio de ligação (GENTA, 2004) assim, as enzimas processivas não liberam o substrato após a primeira clivagem, mas permanecem associadas ao mesmo de modo que uma nova clivagem pode ocorrer com o polímero como substrato, deslizando pela fenda de ligação do substrato. A processividade é difícil de avaliar quanto à degradação de substratos insolúveis

como a quitina, mas pode ser estudado utilizando quitosana como substrato (AAM *et al.*, 2010; HORN *et al.*, 2006b; SØRBOTTEN *et al.*, 2005; EIJSINK *et al.*, 2008). Enquanto a processividade geralmente é considerada favorável para a hidrólise de substratos cristalinos, ela tem demonstrado reduzir a eficiência da enzima em relação à solubilidade (HORN *et al.*, 2006b; ZAKARIASSEN *et al.*, 2009).

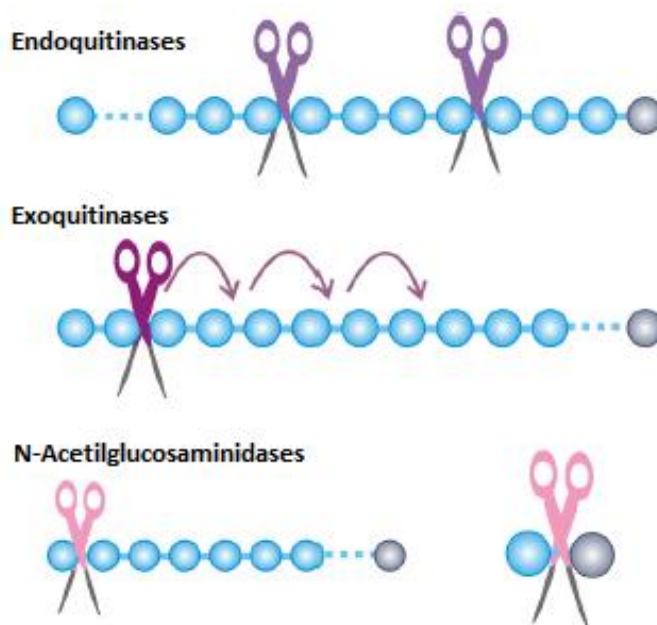


Figura 7: Desenho esquemático do padrão de clivagem predominante de enzimas quitinolíticas. As subunidades não redutoras da cadeia de quitina são mostradas em azul claro e redutor em azul-escuro (SEIDL, 2008).

Família 18 de quitinases são quase exclusivamente endoquitinases e hidrolisam preferencialmente as ligações β -1,4 nas posições internas da quitina polimérica produzindo β anômeros na parte redutora dos produtos. Elas têm pouca ou nenhuma atividade de exoquitinases, ou seja, a capacidade de remover os açúcares a partir da extremidade não-redutora do polímero. Esta atividade, denominada N-acetilglicosaminidase (NAGases) atividade, é exibida pela família 20 de glicosil hidrolases, segundo classificação CAZy que muitas vezes agem em conjunto com as endoquitinases (ARAKANE & MUTHUKRISHNAN, 2010). Algumas quitinases microbianas estão apresentadas na Tabela 1. Por definição, as NAGases catalisam a liberação hidrolítica dos resíduos A não-redutores, tendo maior afinidade de substrato com o dímero quitobiose A₂, que é convertido em dois monômeros A (LÓPEZ-MONDÉJAR *et al.*, 2009).

Endo-quitosanases quebram as ligações da quitosana e seus oligômeros $D_{n>2}$. Os produtos finais de degradação vão de dímeros à octâmeros. O menor dos oligômeros degradáveis depende da enzima e pode ser desde o D_3 à D_6 . Oligômeros entre DP 3 a DP 6 são degradados por endo enzimas com produtos típicos: $D_6 \rightarrow 2 D_3$; $D_6 \rightarrow D_2 + D_4$; $D_5 \rightarrow D_2 + D_3$ e $D_4 \rightarrow 2 D_2$. A classificação das quitosanases é baseada também na seletividade de quebra das ligações com respeito às ligações glicosídicas **A-A**, **A-D** e **D-A** (Tabela 2). Exo-quitosanases quebram uma única unidade **D** de uma quitosana ou de oligômeros D_n . Elas são chamadas também (exo)-glicosaminidases, já definido. Em alguns poucos casos heterooligossacarídeos contendo unidades monossacarídeas **D** e **A** são descritos como produtos de degradação de quitosanas por quitosanases, por exemplo, *Bacillus* sp (LIU *et al.*, 2009), *Streptomyces griseus* (EC 3.2.1.132), *Streptomyces* sp. N174 (FUKAMIZO *et al.*, 1995), *Paecilomyces lilacinus* (CHEN, 2005), *Mucor circinelloides* (STRUSZCZYK *et al.*, 2009). Em geral a atividade de quitosanases é maior com quitosanas com menor F_A . A despolimerização da quitosana resulta sempre em complexas misturas de oligômeros, homólogos e isômeros (OLIVEIRA JR *et al.*, 2008).

Tabela 1: Exemplos de quitinases microbianas

Microrganismos	Extremidade Redutora	Extremidade Não redutora	Referência
<i>Trichoderma atroviride</i>	A-A	A	(HOELL <i>et al.</i> , 2005)
<i>Streptomyces griseus</i>	A-A-A	D ou A	(MITSUTOMI <i>et al.</i> , 1995)
<i>Bacillus circulans</i> WL-12 <i>ChiA1</i>	A-D-A D-A-A D-D-A	D ou A	(IKEGAMI <i>et al.</i> , 2000)
<i>Lecanicillium fungicola</i>	D-A A-D	D ou A	(RAMÍREZ-COUTIÑO <i>et al.</i> , 2006)
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	A-A-A A-A-D D-D-A	A	(HEGGSET <i>et al.</i> , 2009)
<i>Serratia marcescens</i>	A-D-A	D ou A	(HORN <i>et al.</i> , 2006a)

Tabela 2: Exemplos de quitosanases microbianas

Microrganismos	DP dos AGO's produzidos	Extremidade redutora	Extremidade não redutora	Classe de quitosanase	Referência
<i>Bacillus pumilus</i> BN-262	2 – 4	D-A-D A-D-D A-A-D D-D-D	D ou A	III	(KUROIWA <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus</i> sp	2 – 9	D-D-D	D	II	(LIU <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1 – 6	D-D-D	D	II	(LEE <i>et al.</i> , 2007)
<i>Streptomyces</i> sp. N174	2 – 4	A-A-A D-A-A D-D-A D-D-D	D	I	(FUKAMIZO <i>et al.</i> , 1995)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	2 – 5	D-A A-D D-D	D	I	(HEGGSET <i>et al.</i> , 2010)
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	2 – 6	D-D-D	D	II	(DENNHART <i>et al.</i> , 2008)
<i>Penicillium islandicum</i>	2 – 3	D-D-A	D	II	(MITSUTOMI <i>et al.</i> , 1996)
<i>Gongronella</i> sp. JG	2 – 5	D-D-D	D	II	(WANG <i>et al.</i> , 2008)
<i>Anabaena fertilissima</i>	2 – 5	D-D-D	D	II	(GUPTA <i>et al.</i> , 2010)

2.6 Obtenção de Enzimas por Fermentação

Os dois principais fatores que controlam a atividade ou produção enzimática dos microrganismos são a repressão e indução metabólica. O conhecimento dos mecanismos de indução e repressão metabólica de microrganismos confirma que a presença de quitina e quitosana no meio de fermentação induzem a síntese de enzimas hidrolíticas pelos microrganismos, uma vez que as mesmas são induzidas na presença de substrato no meio ou de compostos com estruturas similares (FLORIDO *et al.*, 2009). Os microrganismos capazes de degradar quitina estão amplamente distribuídos na natureza, entre bactérias, arqueobactérias e fungos (BRZEZINSKA *et al.*, 2010; KARLSSON & STENLID, 2009). Devido à insolubilidade, tamanho, complexidade molecular e composição heterogênea, quitina e quitosana não conseguem atravessar a membrana celular dos microrganismos. As células, percebendo a presença do polímero (indutor), aceleram a síntese e secretam

enzimas com especificidade diferente, para transformar ou hidrolisar o polímero (MATSUMOTO, 2006). Fungos são capazes de utilizar quitina (com maior ou menor grau de eficiência) como fonte carbono e energia, sintetizando quitinases, quitosanases (endo / exo) e β -N-acetilglicosamidases (DE ASSIS *et al.*, 2010; LÓPEZ-MONDÉJAR *et al.*, 2009; RAMIREZ-COUTIÑO *et al.*, 2010; STRUSZCZYK *et al.*, 2009).

A maioria dos fungos quitinolíticos descritos produzem mais que uma quitinase, com efeitos sinérgicos e complementares entre si (FLORIDO *et al.*, 2009; LI 2006). Alguns fungos conhecidos como entomopatogênicos produzem quitinases e grande parte do conhecimento atual sobre as quitinases fúngicas foi obtida a partir de espécies micoparasitas, em particular espécies de *Verticillium*, *Metarhizium* e *Trichoderma* que podem ser agentes de controle biológico ou agentes biotecnológicos para produção de quitinases (DE ASSIS *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010; IHRMARK *et al.*, 2010; FLORIDO *et al.*, 2009; LI 2006). Estes fungos são utilizados para controle de pragas na agricultura (controle biológico) ou agentes biotecnológicas para produção de quitinases. O micoparasitismo é um processo que a maioria das espécies de *Trichoderma* usa para atacar e parasitar outros fungos. Portanto, o mecanismo molecular subjacente de biocontrole baseado no parasitismo é altamente conservado (GORTARI & HOURS, 2008). Fungos quitinolíticos são frequentemente isolados de solos, onde eles competem com, ou excedem a atividade quitinolítica de bactérias. Os mais comuns são Mucorales (especialmente *Mortierella* spp.), fungos imperfeitos e ascomicetos como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Thielavia*, *Penicillium* e *Humicola* (TAGAWA *et al.*, 2010; KELLNER & VANDENBOL 2010; MATSUMOTO, 2006). A produção de enzimas extracelulares fúngicas como agentes de biocontrole demonstra convincentemente o envolvimento na redução de infecções por patógenos. Proteases e quitinases estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas (PEREIRA *et al.*, 2007).

A biotecnologia tem permitido a identificação e desenvolvimento de linhagens com altos níveis de produção de uma ampla variedade de enzimas de interesse industrial. A aplicação industrial de fungos filamentosos em processos biotecnológicos expandiu-se rapidamente no século passado desde a descoberta de que *Aspergillus niger* era um excelente produtor de ácido cítrico em fermentação submersa. Além disso, outros produtos fúngicos têm contribuído para a rápida expansão das aplicações dos fungos filamentosos;

excelentes exemplos sobre isso são as enzimas purificadas utilizadas em uma variada gama de indústrias e os metabólitos secundários que apresentam uma ampla gama de utilização como antibiótico, aromas naturais e atividades imunossupressoras. A identificação e desenvolvimento de linhagens, com altos níveis de produção, de uma ampla variedade de enzimas de interesse industrial, têm permitido a utilização de enzimas de fungos filamentosos em diversas aplicações (BIESEBEKE & RECORD, 2008; CHEN *et al.*, 2011; SCHUSTER & SCHMOLL, 2010; SURESH *et al.*, 2011; ROJAS *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2011).

Quitinases microbianas são em geral produzidas por fermentação líquida em batelada simples, batelada alimentada e processo contínuo. A produção de quitinases extracelulares é influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio, aeração, pH e temperatura de incubação (RAMIREZ-COUTIÑO *et al.*, 2010; FLORES *et al.*, 2009; BINOD *et al.*, 2007; GRIM *et al.*, 2005; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2004). Imobilização celular, sistemas celulares bifásicos e FES têm sido utilizados para melhorar a produção de quitinases de diferentes microrganismos (KUROIWA *et al.*, 2009; GOHEL *et al.*, 2006; NAWANI & KAPADNIS, 2005).

Dentre as alternativas tecnológicas no setor de produção de enzimas industriais destaca-se a FES por apresentar alta produtividade, simplicidade de operação, formação de produtos concentrados e condição menos favorável a contaminação quando comparada com fermentações submersas, além de possibilitar o uso de resíduos de origem vegetal e animal como substratos de baixo custo (SURVASE *et al.*, 2009; MAZUMDER *et al.*, 2009). FES é definida como o crescimento de microrganismos em meio isento de água livre. A FES é uma alternativa à fermentação submersa para diversos produtos como antibióticos, ácidos graxos poli-insaturados, enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustíveis e aromas. Esta técnica reduz o custo do processo, tornando os produtos mais baratos para os consumidores (COUTO, 2008; BHARGAV *et al.*, 2008).

Foi observada evolução significativa da tecnologia FES nos últimos vinte anos. Em geral nas FES, fungos são mais adequadas do que as cepas de bactérias e leveduras (COUTO, 2008). No entanto, esse tipo de processo envolve algumas dificuldades como: Escalonamento, controle da temperatura e do calor gerado pelos microrganismos no interior do reator e falta de procedimentos analíticos diretos para determinação da biomassa no leito

do substrato. A análise da literatura recente revelou que muitos produtos de alto valor agregado podem ser produzidos, em maiores quantidades, por FES do que pela fermentação submersa como, por exemplo, a produção de enzimas termoestáveis de elevado valor científico e comercial (Celulases, amilases, pectinases) (LIU *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2011), diversas outras enzimas como tanases e fitases (MADEIRA *et al.*, 2011), antibióticos e compostos fenólicos bioativos (AJILA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2011), sendo a otimização do substrato adequado e de aditivos uma parte importante do processo (BHARGAV *et al.*, 2008; JOHN *et al.*, 2006).

Os materiais de suporte utilizados em FES podem ser divididos em duas categorias: inertes (materiais sintéticos) e não inertes (materiais orgânicos). A primeira opção atua somente como local de fixação, enquanto o segundo também funciona como fonte de nutrientes, sendo denominado substrato de suporte. Substratos de suporte apresenta algumas vantagens tais como a redução dos custos de produção, uma vez que eles fornecem algumas substâncias nutritivas para os microrganismos. Resíduos agroindustriais são bons exemplos deste tipo de material. A seleção de um substrato sólido adequado desempenha um papel importante no desenvolvimento de um eficiente processo de FES. O tamanho da partícula, composição química dos substratos, custo e disponibilidade são considerações importantes (SURVASE *et al.*, 2009; VISHWANATHA *et al.*, 2010; COUTO, 2008).

Fungos filamentosos constituem a principal classe de microrganismos empregados em FES devido à sua facilidade de crescimento em meio com limitação de água (FLORIDO *et al.*, 2009). Entre os organismos de interesse biotecnológico *Trichoderma harzianum* foi selecionado e utilizado para a produção industrial de enzimas, biocontrole e como modelo de pesquisa em FES (SCHUSTER & SCHMOLL 2010; SINGH *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2009). Estudos aprofundados sobre fisiologia das espécies de *Trichoderma* disponíveis na literatura bem como os em progresso fazem deste fungo um modelo de organismo versátil para pesquisa em fermentações industriais (SCHMOLL *et al.*, 2010).

Este doutorado é centrado no estudo do uso de resíduos da carcinicultura (fonte de quitina) para obtenção de enzimas hidrolíticas brutas por FES. As enzimas produzidas foram utilizadas na hidrólise de quitosanas para produção de AGO's potencialmente bioativos.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Microrganismos e células vegetais

As linhagens de microrganismos estudadas foram selecionadas a partir de linhagens isoladas como agentes de biocontrole pela Embrapa Semi-Árido (Petrolina - PE, Brazil). As cepas foram gentilmente cedidas para o Laboratório de Biotecnologia da UFC (LABIOTEC/DETAL/UFC) e transferidas para o Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefinaria e Produtos de Origem Renovável (LEBBPOR/FEQ/DEPro/UNICAMP) pela co-orientadora do projeto, Profa. Dra. Sueli Rodrigues. Foram utilizadas as seguintes linhagens de fungos: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii* e *Trichoderma polysporum*, *Aspergillus niger* NRRL 322, *Aspergillus niger* NRRL 2270 e *Aspergillus niger* NRRL 2001 identificadas como produtoras de enzimas hidrolíticas (quitosanases e quitinases) a partir de uma ampla revisão bibliográfica e seleção em meio específico.

Para os ensaios de bioatividade dos AGO's produzidos, utilizou-se a bactéria *Pseudomonas syringae* nos testes de atividade antimicrobiana e, para os testes de explosão oxidativa, utilizou-se suspensões de culturas de células vegetais dicotiledôneas de amora-silvestre (*Rubus fruticosus*) e monocotiledôneas de arroz (*Oryza sativa*).

3.1.2 Substratos

Meio BDA (Batata, Dextrose, Agar).

Quitosana de grau comercial (Polymar; F_A 0,21).

Quitosana de grau comercial (Sigma; F_A 0,15).

Quitosana (NBS/Lyon) DP 400 e F_A 0,08.

Quitosana (NBS/Lyon) DP 737 e F_A 0,11 (MM 165,620 g/mol).

Quitosana (NBS/Lyon) DP 818 e F_A 0,27 (MM 143,000 g/mol).

Quitosana (NBS/Lyon) DP 1442 e F_A 0,56 (MM 184,520 g/mol).

Quitina de crustáceos cedida pela UFSC.

Quitina coloidal e glicol quitina foram preparadas de acordo com BERGER & REYNOLDS (1988) e TRUDEL & ASSELIN (1989), respectivamente.

Resíduo sólido de camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, descartado pelas indústrias processadoras de camarão do estado do Ceará.

Farelo de trigo comercial.

3.1.3 Determinação do Fator de Acetilação da Quitosana

Para a determinação do fator de acetilação utilizou-se o método proposto por RAYMOND *et al.* (1993) onde graficamente podem-se verificar dois picos de neutralização na titulação da quitosana, cuja diferença de volume corresponde ao volume necessário para a neutralização dos grupos amino protonados da quitosana solubilizada.

Quitosana Polymar 2% (m/v) foi solubilizada em solução de ácido clorídrico 0,1 mol/dm³ e filtrada em cadinho de Gouche tarado. Em seguida secou-se o cadinho em estufa a 105° C, e verificou-se a diferença de massa. O filtrado foi titulado com solução de NaOH 0,1 mol/dm³, sob monitoramento do potencial do titulado (RAYMOND *et al.*, 1993). O fator de acetilação da amostra é calculado a partir da equação:

$$FA = 1 - \frac{V \times C}{m_q / MM_{gluc.}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo,

$MM_{gluc.}$ = Massa molar da unidade de glicosamina,

V = Diferença de volume entre os picos de neutralização,

C = Concentração da solução alcalina e

m_q = Massa de quitosana solubilizada

3.1.4 Determinação Protéica dos Extratos Enzimáticos por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A técnica de eletroforese baseia-se na diferença de mobilidade das macromoléculas com diferentes massas expressa pela migração das moléculas ionizadas do polo negativo (cátodo) para o polo positivo (ânodo). As amostras protéicas foram desnaturadas por aquecimento na presença de 2-mercaptoetanol, que rompe as ligações dissulfeto em tampão contendo o detergente dodecil sulfato de sódio, SDS. Os polipeptídios adquirem a carga negativa do detergente SDS. Desta forma, a separação no gel dá-se unicamente pela diferença de massas moleculares. A eletroforese em SDS-PAGE foi conduzida, de acordo com LAEMMILI (1970), pelo método vertical com placas de 20x20 cm, com gel de separação a 12% e gel de empilhamento a 4%, utilizando-se 10 mA constante na corrida. Foi utilizado padrão de marcadores de proteína “All Blue” da Bio-Rad o qual possui proteínas com diferentes pesos moleculares (10 a 250 kD). Os géis foram corados com “Coomassie Blue R250” (Comassie Blue 0,15%, metanol 53% e ácido acético 7% em água Mili-Q) durante uma noite e descoradas com uma solução de metanol/ácido acético/H₂O (40: 10: 50), durante 1 hora. Foram realizados ensaios com extratos enzimáticos adicionados de inibidores de protease para avaliação do comportamento dos extratos perante aos inibidores.

3.1.5 Determinação da Atividade Enzimática

A Tabela 3 apresenta os ensaios colorimétricos utilizados para a determinação da atividade enzimática.

Tabela 3: Ensaios colorimétricos de atividade enzimática: enzima, substratos e métodos.

Atividade	Substrato	Referência
Endoquitinase	p-nitrofenil - β -D-N, N',N''-triacetilquitotriose	NAWANI & KAPADNIS (2001)
Exoquitinase	p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina e p-nitrofenil- β -D-N,N'-diacetilquitobiose	NAWANI & KAPADNIS (2001)
Hidrolítica	Quitosana	MILLER, 1959

3.1.5.1 Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade enzimática foi determinada após incubação do extrato enzimático bruto isento de células (100 μ L) com 400 μ L de solução de 0,4% de quitosana em tampão acetato de sódio 200 mM. Esta mistura foi incubada por 1 hora (a 37°C e/ou 50°C) sendo a reação interrompida pela adição do reagente DNS (500 μ L). A atividade hidrolítica foi determinada pela quantificação de açúcares redutores totais (ART) liberados pelo método de DNS (MILLER, 1959).

A atividade enzimática foi expressa em unidades internacionais, sendo 1 UI definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto por mL de solução enzimática, por gramas de substrato sólido fermentado (gds), sob as condições de ensaio descritas (BINOD *et al.*, 2007).

3.1.5.2 Determinação de Endoquitinase e Exoquitinase pelo Método Colorimétrico Utilizando Substratos Específicos

A atividade da endoquitinase foi analisada pela liberação de p-nitrofenol do substrato p-nitrofenil - β -D-N, N',N''-triacetilquitotriose [pNP-(GlcNAc)₃] (Sigma) e a atividade de exoquitinase foi analisada pela liberação de p-nitrofenol dos substratos p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminide (pNP-GlcNAc) e p-nitrofenil- β -D-N-N'-

diacetilquitobiose [pNP-(GlcNAc)₂] (Sigma) como descrito por NAWANI & KAPADNIS (2001).

Foram realizados testes para a detecção e quantificação de atividade enzimática com substratos específicos segundo metodologia descrita por NAWANI & KAPADNIS (2001) modificada, visando à identificação das enzimas que atuam na hidrólise da quitina. Para a quantificação utilizou-se uma curva-padrão de p-nitrofenol em solução tampão de citrato-fosfato 50 mM e pH 5,5, em concentrações que variavam de 10 a 250 ppm.

O teste foi conduzido adicionando 250 µL do extrato enzimático bruto em 25 µL de solução 0,3% (m/v) do respectivo substrato em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,5. O meio foi incubado a 50°C em diferentes tempos (30 minutos ou 1 hora) e a reação foi encerrada com a adição de 1,25 mL de NaOH 12 mM. A mistura de reação no tempo zero foi utilizada como branco biológico.

A liberação de p-nitrofenol foi medida pela da absorbância do meio reacional a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar p-nitrofenol por minuto sob as condições específicas do ensaio. O branco para as leituras foi obtido com a mistura de 50 µL de tampão citrato-fosfato 50 mM e 1,25 mL de NaOH 10 mM.

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro Thermo Fisher científico, modelo Genesys 6.

3.1.5.3 Determinação da Atividade Quitinolítica e Quitosanolítica em Gel

Atividades quitinolítica e quitosanolítica dos extratos enzimáticos foram determinadas qualitativamente por eletroforese em gel de poliacrilamida para verificação de atividade enzimática. A eletroforese foi realizada segundo LAEMMILI (1970), pelo método vertical com placas de 20X20 cm com gel de separação a 12%. O gel de empilhamento continha 4 % de solução de glicol quitina (0,1%) para o gel de determinação da atividade quitinolítica, e solução de quitosana F_A 0,11 ou F_A 0,56 (0,1%) para determinação da atividade quitosanolítica. A corrida eletroforética ocorreu a 10 mA. O gel foi agitado suavemente por uma noite a 37°C em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 para hidrólise enzimática do gel de atividade. Em seguida o gel foi corado com uma

solução de calcofluor (0,01 % calcofluor em 500 mM Tris-buffer, pH 8,9) por 10 minutos e descorado com água por 30 minutos, observado sob luz UV e fotodocumentado.

3.1.5.4 Especificidade de Enzimas Quitinolíticas para Substratos com Diferentes F_A por Focalização Isoelétrica

Focalização Isoelétrica (FI) é uma eletroforese em poliacrilamida nativa para determinação do ponto isoelétrico (pI) de proteínas. Após separação das enzimas com diferentes valores de ponto isoelétrico, a especificidade das enzimas pelos diferentes substratos foi identificada pela sobreposição de um novo gel (contendo diferentes substratos com diferentes frações acetiladas – F_A) sobre a superfície do gel FI.

A atividade as enzimas com diferentes valores de pI foi determinada qualitativamente pela habilidade de hidrolisarem os diferentes substratos presentes no novo gel sobreposto contendo os diferentes substratos (F_A 0,11 e F_A 0,56). Os géis foram incubados por uma noite a 40°C e as bandas coradas com calcofluor (0,01 % calcofluor em 500 mM Tris-buffer, pH 8,9 por 10 min). Este corante se liga aos polissacarídeos exibindo coloração azul fluorescente e as regiões aonde o polissacarídeo foi hidrolisado apresentaram bandas escuras não fluorescentes.

3.1.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos AGO's

Para a verificação da existência de oligômeros em CCD, 10 μ L do sobrenadante da mistura de reação (fonte de AGO's) foram aplicados em placas de alumínio sílica gel 60 (Merck Co., Berlim, Alemanha). A fase móvel para a corrida cromatográfica era composta de butanol-metanol-25% de solução de amônia-água (5:4:2:1, v/v/v/v). A revelação ocorreu da seguinte forma: Resíduos de glicosamina foram corados com spray de anilina/difenilamina (4mL de anilina, 4g de difenilamina, 200 mL de acetona e 30 mL de ácido fosfórico 85%) e revelados a 180°C por 3 min. Foram utilizados os padrões acetilados (N-acetilglicosamina, tri-N-acetilquitotriose, tetra-N-acetilquitotetraose, penta-N-acetil-quitopentose e hexa-N-acetilquitohexose) e os padrões desacetilados (monômero, dímero, trímero, tetrâmero, pentâmero e hexâmero de quitosana) da Seikagaku Corporation (Japão). Uma alíquota da mistura de padrões, na concentração de 5 mg/mL cada, foi

aplicada na placa de sílica. O índice de retenção dos oligossacarídeos das amostras foi comparado ao dos padrões de N-acetilglicosamina (grau de polimerização, DP, 1,3,4,5,6) e D-glicosamina (DP 1 to 6).

O procedimento descrito acima foi realizado novamente com a seguinte modificação: os extratos obtidos foram parcialmente purificados em colunas de exclusão Sephadex G25 (minicolunas PD-10, Amershan Bioscience), que separa proteínas de outras moléculas de massa menor que 5 kD. A eluição das proteínas da coluna foi feita com tampão acetato de amônia 50 mM, pH 5,5 e o extrato mantido a 4°C.

3.1.7 Determinação da Estrutura dos AGO's por Espectrometria de Massas

As amostras contendo derivados de oligossacarídeos aminados foram analisadas por espectrometria de massas *nanoelectrospray* quadrupolo com analisadores de Tempo-de-Vôo em múltiplos estágios (Sistema em Tandem), nanoESI-Q-ToF-MS/MS, em um espectrômetro de massa quadrupolo tempo-de-vôo, Q-TOF (Micromass, Manchester, UK) no modo íon positivo. O espectrômetro QTOF estava conectado a software MassLynx para controle instrumental, aquisição e processamento dos espectros de massa. Íons em fase gasosa foram gerados a partir de soluções contendo aproximadamente 7,5 pmol/ μL^{-1} do analito em água/metanol/ácido fórmico (49/49/2, v/v/v) por nanoESI no modo íon positivo utilizando uma fonte Z-spray. Os parâmetros de fontes típicos foram os seguintes: Temperatura da fonte de 80 °C, vazão do gás de dessolvatação (N_2) de 75 L/h, potencial de tensão capilar de 1,1 kV e tensão do cone de 40 V.

3.1.8 Quantificação de oligômeros de quitosana

Foi desenvolvida, com o auxílio da cromatografia líquida com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD), uma metodologia analítica para a separação e quantificação dos oligossacarídeos acetilados e desacetilados bioativos.

A metodologia utilizou um cromatógrafo de íons da marca Metrohm, constituído por uma bomba 850 Professional IC Gradiente MCS-LP Anion, com injeção automática por um auto-sampler Compact 863, uma detector de corrente avançado Bioscan 871, um dispositivo de interface Compact IC 771 e duas colunas de separação Metrosep Carb 1-150

(150 x 4,0 mm, partículas de 5µm de um copolímero de poliestireno / divinilbenzeno) conectadas em série. A fase móvel do sistema cromatográfico foi equilibrado com NaOH 50 mM (solução A) e eluída com um gradiente linear de acetato de sódio 500 mM em NaOH 50 mM de acordo com o melhor programa de eluição encontrado experimentalmente (Tabela 4). Padrões de oligossacarídeos da Seikagaku Corporation foram preparados em solução aquosa em uma concentração de 10 ppm, isolados e em misturas, para desenvolvimento da metodologia.

Tabela 4: Condições experimentais para o HPLC – PAD. Legenda: Solução A= NaOH 50 mM e Solução B= Acetato de sódio 500 mM em NaOH 50 mM.

Tempo	Solução A (%)	Solução B (%)	Vazão
Início	99	1	0.5 mL/min
2 min	99	1	0.5 mL/min
40 min	95	5	0.5 mL/min
40,1 min	99	1	1.0 mL/min
70 min	99	1	0.5 mL/min

3.2 Procedimento Experimental

3.2.1 Seleção das Melhores Linhagens Produtoras

Os esporos fúngicos, mantidos em solo estéril à -20 °C e meio BDA a 4 °C para conservação de longo e curto prazo respectivamente, foram inoculados em meio CDA contendo 1,5 g/L de Na₂HPO₄; 3,0 g/L de KH₂PO₄; 0,5 g/L de NaCl; 1,0 g/L de NH₄Cl; 0,24 g/L de MgSO₄; 0,01 g/L de CaCl₂; 20 g/L de ágar e 10g de quitosana (fonte de carbono) dissolvida em ácido acético 1%. A seleção foi realizada pela detecção das linhagens produtoras de quitinase e quitosanase e acompanhamento do crescimento do micélio sob condições variadas de pH (4,5; 5,5 e 6,5) à temperatura de 30°C. Um pique de esporos foi efetuado no centro das placas de Petri contendo o meio seletivo e as mesmas foram incubadas em estufa incubadora tipo BOD a temperatura de 30°C. O crescimento microbiano foi avaliado visualmente, diariamente durante sete dias. As linhagens que apresentaram melhor crescimento em diâmetro no cultivo em placas de Petri foram selecionadas para um estado mais aprofundado.

O ensaio preliminar que conduziu aos demais procedimentos foi realizado segundo BINOD *et al.* (2007) em Erlenmeyers fechados com tampões de algodão contendo 5g de farelo de trigo e 1g de quitosana comercial (Polymar) ou 1g de quitina para a indução da produção da enzima, adicionados de 2,5 mL de uma solução mineral contendo: 1 g/L de NaNO_3 ; 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 1g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L de NaCl (BINOD *et al.*, 2007). O pH 5,5 foi escolhido por ter sido observado que todas as linhagens cresceram bem nesse valor, sem diferenças de diâmetro. O meio foi então autoclavado a 121 °C por 15 min.

Os esporos das linhagens fúngicas foram então coletados de cultura estoque após adição de solução estéril de Tween 80 a 0,01 % (v/v) e contados em câmara de Neubauer. Para padronização em 10^7 esporos/mL. A seguir os frascos foram inoculados com 1 mL da solução de esporos e incubados a 30 °C. As amostras foram retiradas após 48h e 72h de cultivo para a análise de atividade hidrolítica.

O microrganismo que apresentou maior atividade de quitinase e/ou quitosanase, sendo capaz de formar AGO's biologicamente ativos, foi selecionado.

3.2.2 Determinação da Temperatura e pH Ótimos Para a Atividade Enzimática da Linhagem Selecionada

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers fechados com tampões de algodão contendo 5g de farelo de trigo e 1g de quitosana comercial (Polymar) para a indução da produção da enzima, adicionados de 2,5 mL de uma solução mineral contendo: 1 g/L de NaNO_3 ; 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 1g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L de NaCl (BINOD *et al.*, 2007). O meio foi então autoclavado a 121 °C por 15 min.

Os esporos da linhagem fúngica selecionada (*Trichoderma polysporum sp*) foram então coletados e inoculados segundo procedimento descrito no tópico 3.2.1. Os fungos foram incubados a 30°C e as amostras foram retiradas após 48h de fermentação para a análise de atividade quitosanolítica. Tempos superiores de fermentação resultaram em esporulação do fungo e queda da atividade enzimática.

Realizou-se um planejamento experimental, onde foi avaliada a influência da temperatura e do pH na determinação da atividade enzimática, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Valores atribuídos às variáveis do planejamento para determinação analítica da atividade enzimática do extrato bruto.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH	4,5	5,0	5,5
Temperatura (°C)	40	50	60

O extrato enzimático foi obtido pela extração com 20 mL de solução tampão acetato de sódio, pH ajustado ao valor desejado para o meio sólido fermentado e agitação manual por 2 minutos. O material sólido foi removido por filtragem em papel Whatman n° 1 e atividade hidrolítica foi determinada no filtrado.

Todos os delineamentos experimentais executados no trabalho foram construídos utilizando técnica de planejamento experimental e os resultados analisados pela metodologia de análise de superfície de resposta (BARROS NETO *et al.*, 2002). Esta metodologia permite a variação simultânea de mais de uma variável reduzindo com isso o número de experimentos necessários e, portanto o custo e o tempo de desenvolvimento das pesquisas. O software Statistica (Statsoft) foi utilizado para análise e tratamento dos dados.

3.2.3 Otimização da Composição do Meio de Cultura em Estado Sólido

A otimização das condições de fermentação visando o aumento da produção de enzima foi realizado por uma sequência de planejamentos experimentais alterando-se a composição do meio fermentativo (Farelo de trigo, quitosana e água).

O primeiro delineamento para otimização do meio de cultura foi um planejamento experimental composto central avaliando a influência de quitosana, farelo de trigo (para enriquecimento e suporte da FES) e quantidade de água do meio de cultura (Tabela 6) sobre o aumento da atividade enzimática do extrato bruto.

Tabela 6: Valores atribuídos às variáveis do primeiro planejamento composto central para otimização do meio de cultura.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Farelo de Trigo (g)	1,6	3,0	5,0	7,0	8,4
Quitosana (g)	0,2	0,5	1,0	1,5	1,8
Água (mL)	5,0	6,0	8,0	10,0	11,0

O segundo delineamento foi um planejamento experimental composto central, que avaliou a influência do farelo de trigo (para enriquecimento e suporte da FES) e da quitosana sobre a concentração de açúcares redutores do extrato bruto. A quantidade de água adicionada ao meio foi na proporção de 1:2,2 (% m/m), relação de material sólido (trigo+quitosana)/água encontrada nos resultados do planejamento anterior.

Tabela 7: Valores atribuídos às variáveis do segundo planejamento composto central para otimização do meio de cultura.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Farelo de Trigo (g)	0,8	1,0	1,5	2,0	2,2
Quitosana (g)	0,3	0,5	1,0	1,5	1,7

Após o segundo planejamento, os valores de água e quitosana foram estabelecidos e um novo ensaio foi realizado variando as quantidades de trigo (21, 22 e 23% m/m) adicionadas ao meio de fermentação. Para esse caso as amostras foram retiradas após 30h e 48h de fermentação para a análise de atividade quitosanólítica, visto que nessas condições os fungos apresentaram crescimento visual em 30h de fermentação e meios totalmente esporulados em 72h.

Os resultados foram analisados pela metodologia de análise de superfície de resposta (BARROS NETO *et al.*, 2002) e o software Statistica (Statsoft) foi utilizado para análise e tratamento dos dados.

Para a determinação da umidade as análises foram feitas em triplicata seguindo os mesmos passos do procedimento experimental para elaboração do meio de fermentação (Quitosana + trigo + solução mineral + água). Após a autoclavagem dos erlenmeyers os

procedimentos posteriores de avaliação da umidade do meio fermentativo foram determinados segundo metodologia da AOAC, 1990.

3.2.4 Otimização das Condições de Extração Enzimática

Há a necessidade de determinação das condições ótimas de extração da enzima bruta da FES. Para isso foi realizado um planejamento experimental composto central avaliando a influência do tempo da extração e da agitação sobre a concentração de açúcares redutores do extrato bruto (Tabela 8). As amostras foram retiradas após 48h de fermentação para análise da atividade quitosanólítica.

Tabela 8: Valores atribuídos às variáveis do planejamento composto central para otimização da extração enzimática.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Tempo (min)	2	6	10
Agitação (RPM)	50	100	150

Após a determinação do melhor tempo e agitação na extração enzimática, foi avaliada a influência da temperatura (4°C a 50°C) para a extração enzimática sobre a concentração de açúcares redutores do extrato bruto.

3.2.5 Produção de Quitosanase de *Trichoderma polysporum* em Meio de Cultura Contendo Resíduos Sólidos de Camarão Branco

Este procedimento visou à substituição de quitosana comercial pelos resíduos sólidos de camarão branco, *Litopenaeus vannamei* e de quitina. Foram utilizadas as condições otimizadas de acordo com os itens 3.2.3 e 3.2.4, sendo o tempo de fermentação de 48h.

3.2.6 Estudo Comparativo das Enzimas Hidrolíticas Produzidas por Diferentes Meios Fermentativos

Com a finalidade de realizar um estudo comparativo entre as enzimas produzidas na fermentação em estado sólido (FES) e na fermentação submersa (FS), realizaram-se fermentações com o microrganismo *Trichoderma polysporum* em diferentes meios fermentativos (Tabela 9). Para a FS foi utilizado um meio completo (*Trichoderma* complete medium, TCM) contendo (g/L): bactopectona 1,0; uréia 0,3; KH_2PO_4 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005; MnSO_4 0,002; ZnSO_4 0,002; CoCl_2 0,002. O pH do meio foi ajustado a 5,5 e suplementado com 0,3% (m/v) de glicose. Outros meios submersos foram preparados suplementando, além de glicose, 0,5% (m/v) de quitina coloidal ou resíduo de camarão sólido. A FS foi conduzida em erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio em agitação (120 RPM) a 28°C.

Tabela 9: Meios de fermentação utilizados para produção de enzimas quitinolíticas e quitosanolíticas.

Meio	Condição de fermentação	Código
TCM	Submersa	S1
TCM + 0.5% (m/v) de casca de camarão	Submersa	S2
TCM + 0.5% (m/v) de quitina coloidal	Submersa	S3
Meio sólido otimizado (2:1, m/m) de acordo com item 3.2.3, extração simples.	Sólida	S4
Meio sólido otimizado (2:1, m/m) de acordo com item 3.2.3, submetido à extração similar a ocorrida com os extratos submersos	Sólida	S5

3.2.7 Preparação dos Extratos Enzimáticos

Para a FES, após 48 horas de fermentação, o extrato enzimático foi obtido pela extração do resíduo com 20 mL de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 5,5, agitação a 150 RPM e tempo de 6 minutos (Definidos no item 3.2.4). O material sólido foi removido por filtragem em papel Whatman n° 1 e a atividade quitinolítica e quitosanolítica foram determinadas no filtrado. Para as fermentações submersas o material sólido (micélios) foi removido por filtragem em papel Whatman n° 1 e o extrato enzimático foi esterilizado em

membrana Filtropur S, 0,2 μm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e concentrado por ultrafiltração em concentradores Vivaspin 20 com “*cut of*” de 10,000 MMCO (Sartorius, Goettingen, Alemanha). Uma parte do extrato enzimático da FES foi submetida aos mesmos procedimentos experimentais (extração, filtração e concentração das amostras submersas) para comparação dos resultados.

3.2.8 Otimização da Hidrólise Enzimática da Quitosana para Obtenção dos Oligômeros

O procedimento inicial para hidrólise da quitosana comercial (Sigma, F_A 0,15) e quitosanas com F_A 0,27 e F_A 0,56, utilizando a enzima bruta, considera a adição de 200 μL de solução de quitosana (2 mg/mL), 150 μL de tampão acetato de amônia 50 mM (pH 5,5) e 100 μL do extrato enzimático, incubação a 40°C por 18 horas. As amostras foram precipitadas adicionando um volume três vezes maior de solução de etanol/amônia, 7:3. A solução, além de hidrofóbica, neutraliza as cargas da quitosana. A mistura foi centrifugada, o sobrenadante foi liofilizado após a evaporação do solvente em “*Speed vacuum Concentrator*” e ressuspenso em água, e estocado a temperatura de 4°C. A técnica de cromatografia de camada delgada foi utilizada para separação dos oligossacarídeos obtidos.

Após analisarmos o funcionamento da hidrólise enzimática, caracterizando os produtos obtidos e avaliando sua bioatividade, foi realizado um delineamento (Tabela 10) para otimizar a metodologia de hidrólise enzimática, avaliando a influência da concentração de quitosana de grau comercial (Sigma, a 1% m/v) e de extrato enzimático sobre a concentração de açúcares redutores do hidrolisado. Foi utilizada uma escala de volume final 10 vezes maior (4,5 mL).

Tabela 10: Valores atribuídos às variáveis do planejamento composto central para otimização da hidrólise enzimática.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Extrato enzimático (mL)	0,3	0,5	1,0	1,5	1,7
Quitosana 1% (mL)	0,6	1,0	2,0	3,0	3,4

3.2.9 Atividade Antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos AGO's *in vitro* contra *Pseudomonas syringae*, bactérias responsáveis pela podridão em tomate, foi avaliada utilizando meio completo (CM), pH 5,5 preparado como descrito por PONTECORVO (1953) que contém aproximadamente 6,2 g/L de carbono e 0,6 g/L de nitrogênio considerando a contribuição de extrato de levedura, peptona, caseína e sacarose. Alíquotas de CM estéril (150 µL) contendo o volume requerido da solução de AGO's (1 mg/mL) para a dose-resposta e água estéril foram adicionadas em microplacas de poliestireno com 96 poços (Roth®, Karlsruhe, Germany) contendo, em cada poço, 10 µL de uma solução de *P. syringae* ou 10 µL de água (branco). As placas foram incubadas a 28°C, sobre agitação a 200 RPM por 18 horas. O crescimento bacteriano foi acompanhado por medição da densidade ótica do meio de cultura a 600 nm em intervalos de 1 hora. Os experimentos foram realizados em triplicata e as médias dos valores foram utilizadas para tratamentos dos dados.

3.2.10 Bioatividade em Células Vegetais

Culturas de suspensão de células de amora-silvestre (*Rubus fruticosus*) e arroz (*Oryza sativa*) foram mantidas em 50 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), universalmente usado para cultura de plantas, suplementado com ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e sacarose como descrito por ORTMANN & MOERSCHBACHER (2006). As culturas foram mantidas sobre agitação em ambiente escuro a 26°C.

As células foram utilizadas após 3-4 dias depois do subcultivo em meio fresco, cuidadosamente separadas do meio através de um filtro de vidro sinterizado. Alíquotas de 300 mg de células foram suspensas em 5 mL de meio de pré-incubação [3% de sacarose (w/v) e 10 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico (MES) em 5% (v/v) de meio de cultura, pH 5,8] em placas contendo 6 poços e incubadas sobre condições da cultura por 5 horas como descrito por ORTMANN *et al.* (2006). A explosão oxidativa foi determinada utilizando uma metodologia baseada na quimioluminescência do luminol dependente de H₂O₂ de acordo com WARM & LATIES (1982) utilizando um luminômetro (Lumat LB 9501 Berthold). Em diferentes intervalos de tempo seguindo os tratamentos, a concentração

de peróxido de hidrogênio foi quantificada da seguinte forma: alíquotas de 200 μL de células de arroz ou amora foram misturadas com 700 μL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,9). A reação foi iniciada pela adição automática de 100 μL de luminol (Sigma; em tampão fosfato 1,21 mM) e 100 μL de ferricianeto de potássio 14 mM (Fluka) seguido pela detecção de luz (10s de tempo de integração, 430 nm). A concentração micromolar (μM) de H_2O_2 foi determinada utilizando uma curva de calibração padrão.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação do Fator de Acetilação da Quitosana

O fator de acetilação (F_A) corresponde à quantidade percentual de anéis carbônicos da quitina com o segundo carbono substituído pelo grupo acetoamido (-NHAc). A obtenção da quitosana ocorre por meio da reação de desacetilação da quitina e o fator de acetilação final varia com o método empregado (GOOSEN, 1997).

Em geral, a qualidade e as propriedades da quitosana, como pureza, grau de desacetilação, viscosidade, massa molar e estrutura morfo-polimérica, são influenciadas por diversos fatores no processo de obtenção da mesma (GOOSEN, 1997). E para verificação da remoção de grupos de acetil utilizam-se métodos de espectroscopia de infravermelho, cromatografia gasosa, titulação, absorção.

O F_A da quitosana (2% em HCl) foi determinado por titulação. A Figura 8 representa a curva de titulação potenciométrica (mL de NaOH x mV) obtida a partir do volume gasto da solução de NaOH 0,1 mol/dm³ na titulação e do potencial do titulado.

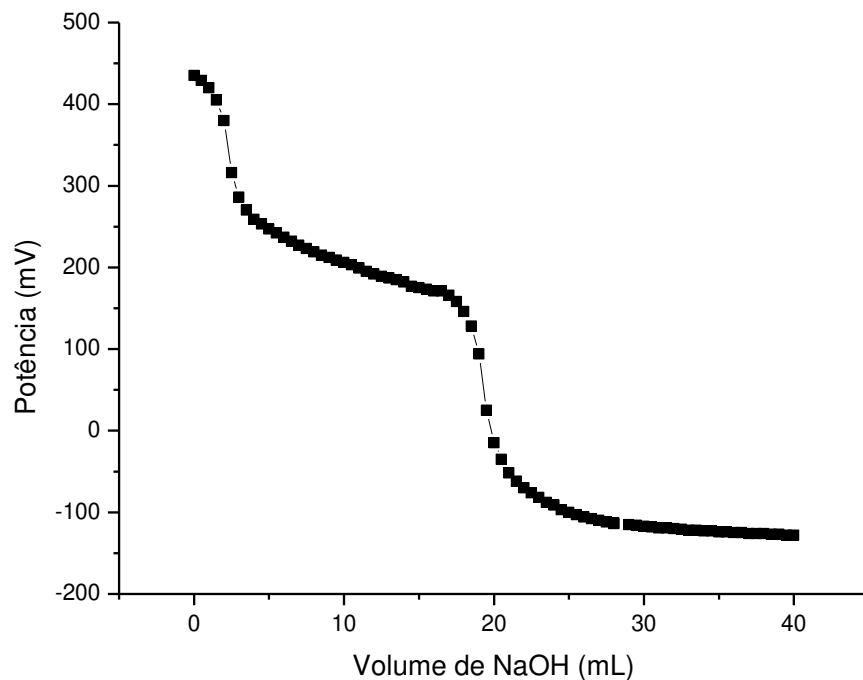


Figura 8: Curva de titulação potenciométrica (mL NaOH x mV).

A Figura 9 apresenta a representação gráfica da curva de primeira derivada da titulação para melhor visualização dos picos de neutralização.

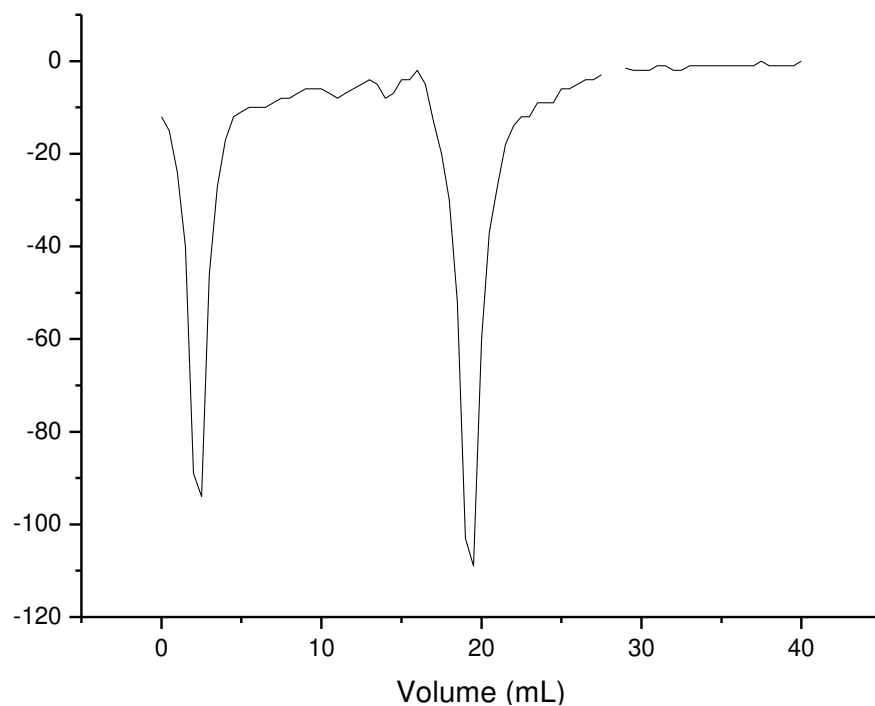


Figura 9: Curva de primeira derivada da titulação potenciométrica.

Com a aferição da diferença de volume entre os picos calculou-se o fator de acetilação (FA) da amostra a partir da equação:

$$FA = 1 - \frac{V \times C}{m_q / MM_{gluc.}} \quad (\text{Eq. 1})$$

sendo ($MM_{gluc.}$) a massa molar da unidade de glicosamina, (V) a diferença de volume entre os picos de neutralização, (C) a concentração da solução alcalina e (m_q) a massa de quitosana solubilizada (RAYMOND *et al.*, 1993). Portanto,

$$FA = 1 - \frac{17 (mL) \times 0,1156 (mol / L)}{0,39164 (g) / 161 (g / mol)}$$

$$F_A = 0,1921$$

A quitosana comercial Polymar que foi utilizada nos experimentos apresenta fator de acetilação, $F_A = 0,1921$.

A determinação precisa do fator de acetilação (F_A) da quitosana faz-se muito importante quando se avaliam as suas possíveis aplicações industriais (MIYA *et al.*, 1980), e pode ser feita por diferentes métodos, cuja precisão varia com as características da amostra analisada. Já foram propostos como métodos determinações por espectrometria de ressonância magnética nuclear (DOMARD & RINAULDO, 1983) e CANELA & GARCIA (2000) conseguiram valores concordantes na determinação do fator de acetilação de amostras de quitosana por espectroscopia de UV e por RMN. RAYMOND *et al.* (1993) caracterizaram quitosana de baixo fator de acetilação por titulação potenciométrica, como a realizada neste trabalho. A mesma metodologia foi utilizada por OLIVEIRA JUNIOR (2006), para quitonasa com F_A 0,21, que comparou os métodos de titulação potenciométrica e de RMN H1, obtendo resultados similares para ambas as técnicas.

4.2 Seleção das Melhores Linhagens Produtoras

Dentre as quatro linhagens de *Trichoderma* utilizadas (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii* e *Trichoderma polysporum*), todas apresentaram

resultados significativos em placas de Petri, pH 5,5, ao contrário das 3 linhagens de *Aspergillus* que além de necessitarem de maior período para o crescimento, não apresentaram crescimento radial significativo.

Apesar de todas as linhagens de *Trichoderma* apresentarem crescimento semelhante em placa de Petri em meio contendo quitosana como única fonte de carbono, os testes preliminares de atividade enzimática evidenciaram 2 linhagens (Tabela 11), apresentando resultados semelhantes: *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma polysporum*.

Entre as três linhagens de *Aspergillus* apenas uma apresentou crescimento em placa de Petri, e os estudos com esta linhagem demonstraram resultados inferiores (em torno de 50%) dos *Trichodermas*, segundo apresentado na Tabela 12. Também foram observados que após 24h de cultivo os *Aspergillus* esporularam e deixavam de apresentar atividade enzimática.

Por existir na literatura uma grande quantidade de artigos e pesquisas voltadas à linhagem *Trichoderma harzianum*, o microrganismo *Trichoderma polysporum* (Figura 10) foi escolhido para utilização nos testes posteriores, devido ao seu caráter inovador.

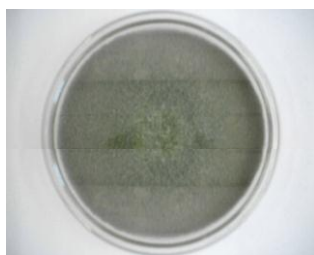


Figura 10: Crescimento do fungo *Trichoderma polysporum* em meio CDA.

Tabela 11: Atividade enzimática dos extratos obtidos após 48h e 72h de fermentação das linhagens de *Trichodermas*.

Linhagens	Substrato	Temperatura	Atividade (UI/gds)	Atividade (UI/gds)
			48h	72h
<i>T. harzianum</i>	Quitosana	37	0,56	0,00
		50	0,90	0,26
	Quitina	37	0,44	0,12
		50	0,58	0,30
<i>T. viride</i>	Quitosana	37	0,15	0,00
		50	0,00	0,00
	Quitina	37	0,04	0,30
		50	0,00	0,00
<i>T. koningii</i>	Quitosana	37	0,19	0,13
		50	0,34	0,00
	Quitina	37	0,11	0,09
		50	0,13	0,00
<i>T. polysporum</i>	Quitosana	37	0,66	0,14
		50	0,88	0,00
	Quitina	37	0,15	0,03
		50	0,27	0,02

Tabela 12: Atividade enzimática dos extratos obtidos em 24h de fermentação de *Aspergillus niger* em quitosana.

Linhagens	Temperatura	Atividade (UI/gds)
		24h
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 322	37	0,34
	50	0,45
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2270	37	0,10
	50	0,13
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2001	37	0
	50	0

A entomopatogenicidade do *Trichoderma* está intimamente relacionada à sua capacidade de sintetizar enzimas hidrolíticas e vários estudos sobre a produção de quitinase foram publicados (BINOD *et al.*, 2007; DONZELLI *et al.*, 2005; FELSE & PANDA, 2000; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2004). Algumas espécies de *Trichoderma* são micoparasitas, invadindo, destruindo células fúngicas e se alimentando do conteúdo da célula morta. As quitinases parecem atuar na hidrólise da parede celular durante o ataque micoparasítico.

Uma quitinase ainda não identificada é supostamente responsável por liberar oligômeros das paredes celulares do hospedeiro, que, então, atuam como indutores para formação de mais quitinases (SEIDL, 2008). A maioria dos estudos concentram-se na cepa *T. harzianum* e não há relatos sobre a produção de enzimas por *T. polysporum*.

4.3 Determinação da Temperatura e pH Ótimos para a Atividade Enzimática da enzima produzida pelo *T. polysporum*.

A Tabela 13 apresenta os resultados do planejamento experimental aplicado para a investigação das melhores condições de temperatura e pH na determinação da atividade da enzima produzida na fermentação do *Trichoderma polysporum*.

Tabela 13: Planejamento experimental para análise da atividade quitosanólítica do extrato bruto produzido na fermentação por *Trichoderma polysporum*.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade (UI/gds)
1	4,5	40	0,07 ± 0,04
2	4,5	60	0,13 ± 0,07
3	5,5	40	1,34 ± 0,56
4	5,5	60	1,41 ± 0,11
5	4,5	50	0,10 ± 0,01
6	5,5	50	1,44 ± 0,06
7	5,0	40	0,22 ± 0,58
8	5,0	60	0,27 ± 0,02
9 (C)	5,0	50	0,34 ± 0,10
10 (C)	5,0	50	0,28 ± 0,01

A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão é apresentada na Tabela 14. Já a Tabela 15 apresenta os efeitos das variáveis independentes na atividade enzimática para o microrganismo *Trichoderma polysporum*, respectivamente.

Tabela 14: Análise de variância para a atividade enzimática do extrato bruto produzido na fermentação por *Trichoderma polysporum*.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F
Regressão	3,051	5	0,610	610,2
Residual	0,004	4	0,001	
Total	3,055	9		
Coeficiente de determinação	0,999			
F Tabelado (95%)				$F_{5,4}= 6,26$

Tabela 15: Efeitos estimados para a atividade enzimática do extrato bruto produzido na fermentação por *Trichoderma polysporum*.

Fator	Atividade Enzimática	
	Efeito	Erro padrão
Média	0,30*	0,02*
pH (L)	1,29*	0,02*
pH (Q)	0,96*	0,04*
Temperatura (L)	0,06	0,02
Temperatura (Q)	-0,09	0,04
pH x Temperatura	0,005	0,03

* Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

Pode-se observar na Tabela 13 que a atividade variou de 0,07 a 1,44 UI/gds, sendo que as maiores atividades foram observadas nos ensaios 3, 4 e 6, todos em pH 5,5. No pH 4,5 a atividade ficou por volta de 0,1 UI/gds e, no pH 5, em torno de 0,3. Segundo a Tabela 14, o modelo para a linhagem do microrganismo *Trichoderma polysporum* pode ser considerado estatisticamente significativo, pois o valor de F , com 95% de confiança, foi 610,2 valor 97,5 vezes maior que o valor de $F_{5,4}$ Tabelado (6,26). A análise estatística dos dados indica que a temperatura não apresentou efeito significativo na determinação da atividade enzimática dentro a faixa estudada (40°C a 60°C).

A variável pH influenciou significativamente os resultados e a máxima atividade para a enzima bruta de *Trichoderma polysporum* foi obtida em pH 5,5.

Estes resultados podem ser observados também na superfície de resposta da determinação da atividade enzimática para a linhagem do fungo *Trichoderma polysporum* (Figura 11).

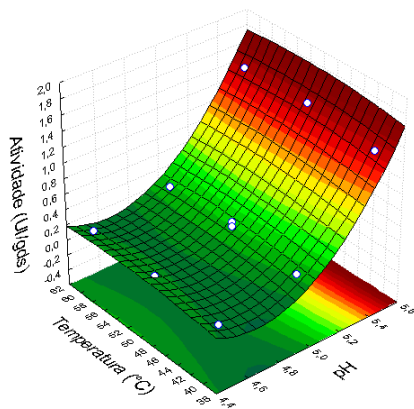


Figura 11: Superfície de resposta para a atividade enzimática do extrato bruto em função da temperatura e do pH de determinação.

4.4 Otimização da Composição do Meio de Cultura em Estado Sólido

Este planejamento investigou o efeito das concentrações de trigo, quitosana e água sobre a atividade enzimática bruta do extrato obtido na fermentação do microrganismo *Trichoderma polysporum*. A Tabela 16 apresenta a matriz do planejamento realizado com os resultados de atividade enzimática para o *Trichoderma polysporum*, após 48h de fermentação. Foi considerado este tempo de processo porque após 72h de fermentação observou-se a esporulação do fungo no meio de cultura e, conseqüentemente, a diminuição ou perda da atividade enzimática.

Tabela 16: Planejamento experimental para otimização do meio de cultura para produção da enzima por *Trichoderma polysporum*.

Ensaio	Trigo (g)	Quitosana (g)	Água (mL)	Atividade (UI/gds)
1	3,0	0,5	6,0	0,84 ± 0,05
2	3,0	0,5	10,0	1,67 ± 0,07
3	3,0	1,5	6,0	1,06 ± 0,01
4	3,0	1,5	10,0	1,21 ± 0,12
5	7,0	0,5	6,0	0,29 ± 0,01
6	7,0	0,5	10,0	0,48 ± 0,10
7	7,0	1,5	6,0	0,30 ± 0,01
8	7,0	1,5	10,0	0,56 ± 0,06
9	1,6	1,0	8,0	2,44 ± 0,06
10	8,4	1,0	8,0	0,39 ± 0,03
11	5,0	0,2	8,0	0,74 ± 0,03
12	5,0	1,8	8,0	0,84 ± 0,18
13	5,0	1,0	5,0	0,42 ± 0,02
14	5,0	1,0	11,0	1,00 ± 0,07
15 (C)	5,0	1,0	8,0	0,77 ± 0,07
16 (C)	5,0	1,0	8,0	0,79 ± 0,01

A Tabela 17 apresenta os efeitos das variáveis independentes na atividade enzimática para o microrganismo *Trichoderma polysporum*. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão é apresentada na Tabela 18.

Tabela 17: Efeitos estimados do primeiro planejamento experimental para a atividade enzimática do extrato bruto fermentado.

Fator	Atividade Enzimática	
	Efeito	Erro padrão
Média	0,81*	0,16*
Trigo (L)	-0,96*	0,12*
Trigo (Q)	0,36*	0,15*
Quitosana (L)	0,00	0,12
Quitosana (Q)	-0,08	0,15
Água (L)	0,37*	0,13*
Água (Q)	-0,19	0,18
Trigo x Quitosana	0,08	0,16
Trigo x Água	-0,13	0,16
Quitosana x Água	-0,16	0,16

*Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

Tabela 18: Análise de variância do primeiro planejamento experimental para a atividade enzimática do extrato bruto fermentado.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F
Regressão	4,32	9	0,48	9,20
Residual	0,31	6	0,05	
Total	4,63	15		
Coeficiente de determinação	0,93			
F Tabelado (95%)				$F_{9,6} = 4,099016$

Segundo a Tabela 18, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, pois o valor de F , com 95% de confiança, calculado para o modelo foi 9,20, valor 2,2 vezes maior que o valor de $F_{9,6}$ Tabelado (4,099). De acordo com os resultados apresentados, a quitosana não apresentou efeito significativo na atividade enzimática, nos cultivos sob as condições adotadas no delineamento (de 0,2 a 1,8g). Entretanto, os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos em quantidades mais elevadas de água. As Figuras 12, 13 e 14 apresentam a superfície de resposta da atividade enzimática do planejamento experimental da Tabela 16.

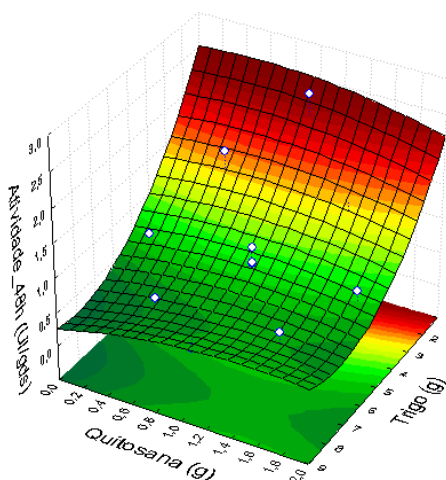


Figura 12: Superfície de resposta para a atividade enzimática, obtida em 48h de cultivo, em função da quantidade de quitosana e trigo adicionado ao meio de fermentação.

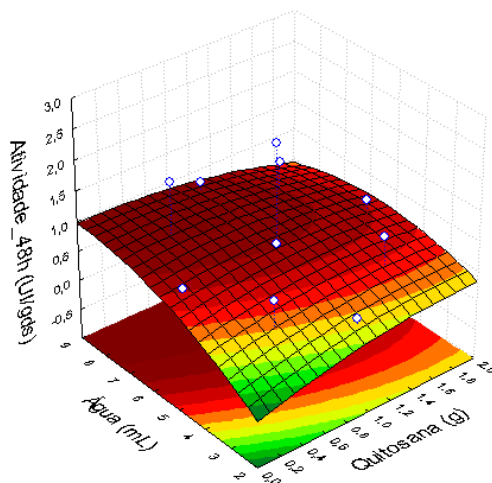


Figura 13: Superfície de resposta para a atividade enzimática, obtida em 48h de cultivo, em função da quantidade de água e quitosana adicionada ao meio de fermentação.

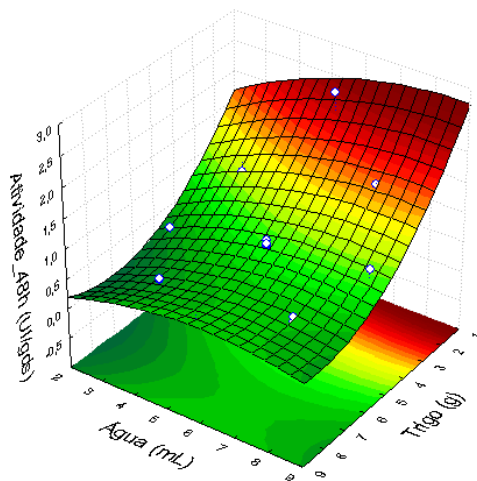


Figura 14: Superfície de resposta para a atividade enzimática, obtida em 48h de cultivo, em função da quantidade de água e trigo adicionado ao meio.

A partir da análise dos resultados foi fixada a quantidade de água adicionada ao meio de fermentação em 1:2,2 (% m/m), relação de material sólido (trigo+quitosana)/água, pois verificou-se se baixas concentrações de água diminuem a atividade enzimática do extrato. Após fixar a quantidade de água, o segundo planejamento variou as quantidades de trigo e quitosana para avaliar se, dentro da faixa estudada, haverá interferência dos componentes do meio em relação a atividade enzimática. A Tabela 19 apresenta a matriz do segundo planejamento realizado com os resultados de atividade enzimática para o *Trichoderma polysporum*, após 48h de fermentação.

Tabela 19: Segundo planejamento experimental para otimização do meio fermentativo de produção enzimática por *Trichoderma polysporum* sp.

Ensaio	Trigo (g)	Quitosana (g)	Atividade (UI/gds)
1	1,0	0,5	2,09 ± 0,74
2	1,0	1,5	1,66 ± 0,05
3	2,0	0,5	3,01 ± 0,65
4	2,0	1,5	3,24 ± 0,02
5	0,8	1,0	2,60 ± 0,03
6	2,2	1,0	3,93 ± 0,31
7	1,5	0,3	2,04 ± 0,20
8	1,5	1,7	2,04 ± 0,08
9 (C)	1,5	1,0	3,27 ± 0,53
10 (C)	1,5	1,0	3,02 ± 0,34
11 (C)	1,5	1,0	2,75 ± 0,12

A Tabela 20 apresenta os efeitos das variáveis independentes na atividade enzimática para o microrganismo *Trichoderma polysporum*. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão é apresentada na Tabela 21.

Tabela 20: Efeitos estimados para a atividade enzimática na otimização das concentrações dos substratos sólidos utilizados.

Atividade Enzimática		
Fator	Efeito	Erro padrão
Média	3,01*	0,12*
Trigo (L)	1,10*	0,15*
Trigo (Q)	0,17	0,18
Quitosana (L)	-0,05	0,15
Quitosana (Q)	-1,05*	0,18*
Trigo x Quitosana	0,33	0,22

*Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

Tabela 21: Análise de variância para a atividade enzimática na otimização das concentrações dos substratos sólidos utilizados.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F
Regressão	4,45	5	0,89	19,11
Residual	0,23	5	0,05	
Total	4,68	10		
Coeficiente de determinação	0,95			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,050329$

Segundo a Tabela 21 (ANOVA), o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, pois o valor de F , com 95% de confiança, calculado para o modelo foi 19,11, valor 3,8 vezes maior que o valor de $F_{5,5}$ Tabelado (5,05). De acordo com os resultados apresentados, a interação dos substratos não apresentou efeito significativo na determinação da atividade enzimática segundo planejamento experimental elaborado. A Figura 15 apresenta a superfície de resposta da determinação da atividade enzimática do segundo planejamento experimental (Tabela 19).

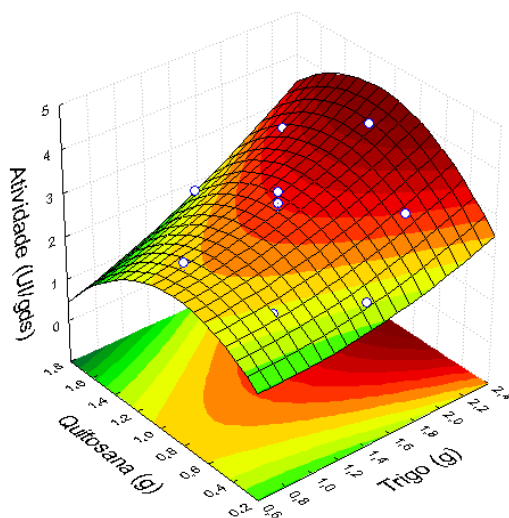


Figura 15: Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da quantidade de quitosana e trigo adicionado ao meio.

A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos com relação à atividade enzimática produzida no estudo onde foram avaliadas diferentes concentrações de trigo no meio de cultura, cujos resultados foram analisados pelo Teste de Tukey com 95% de confiança, no qual foi verificado que não houve diferença significativa entre os resultados. Entretanto para todos os resultados os valores em 48h de fermentação mostraram-se superiores.

O comportamento da atividade enzimática com relação à quantidade de quitosana adicionada ao meio de cultura (Figura 15) indica que, dentro da faixa estudada, os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos em torno de 1g de quitosana. Quantidades mais elevadas de quitosana levam a uma possível saturação do meio de fermentação para a produção de enzimas hidrolíticas. Sabe-se que muitas enzimas quitinolíticas e quitosanólíticas são induzidas pelo substrato (SEIDL, 2008). Alguns estudos esclarecem

que elevadas quantidades de substrato podem inibir a produção da enzima pelo substrato (CHOI *et al.*, 2004; . PELLETIER & SYGUSCH, 1990). Provavelmente o aumento da quantidade de quitosana, na faixa estudada, é susceptível a saturação para produção de enzimas quitinolíticas e quitosanólíticas.

Tabela 22: Atividade enzimática em diferentes quantidades de trigo no tempo de 30h e 48h.

% Suporte (Trigo)	Atividade (UI/gds)	Atividade (UI/gds)
	30 h	48h
21	5,01 ^a ± 0,26	7,22 ^a ± 0,55
22	5,19 ^a ± 0,18	5,93 ^a ± 1,38
23	4,27 ^a ± 0,50	5,65 ^a ± 1,18

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

O farelo de trigo é freqüentemente utilizado como substrato para a fermentação em estado sólido visando, por exemplo, a produção de insumos para a indústria de alimentos, devido às sua riqueza em nutrientes como proteínas e vitaminas, além de servir como suporte para FES (SILVEIRA & FURLONG, 2007).

Foi estabelecido, portanto, que para os testes posteriores a menor concentração de trigo será utilizada. A formulação final do meio de cultura otimizado para FES foi a seguinte: 21% de farelo de trigo, 11% de quitosana, 68% de água e umidade do meio de cultura final em 64,24%.

4.5 Otimização das Condições de Extração Enzimática

A Tabela 23 apresenta a matriz do planejamento realizado e os resultados de atividade enzimática para as diferentes condições de extração da FES com *Trichoderma polysporum*, após 48h de fermentação.

Tabela 23: Planejamento experimental para extração da enzima bruta na atividade quitosanólítica.

Ensaio	Tempo (min)	Agitação (RPM)	Atividade (UI/gds)
1	2	50	2,86 ± 0,14
2	2	150	3,90 ± 0,06
3	10	50	3,97 ± 0,27
4	10	150	3,80 ± 0,63
5	2	100	3,08 ± 0,22
6	10	100	4,08 ± 0,36
7	6	50	3,56 ± 0,23
8	6	150	4,84 ± 0,23
9 (C)	6	100	4,49 ± 0,43
10 (C)	6	100	3,73 ± 0,39
11 (C)	6	100	3,84 ± 0,49

A Tabela 24 apresenta os efeitos das variáveis independentes na atividade enzimática para o microrganismo *Trichoderma polysporum*. A análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão é apresentada na Tabela 25, respectivamente.

Tabela 24: Efeitos estimados para a extração da enzima bruta na atividade enzimática.

Atividade Enzimática		
Fator	Efeito	Erro padrão
Média	4,76*	0,19*
Tempo (L)	1,16*	0,30*
Tempo (Q)	-1,56*	0,46*
Agitação (L)	0,79*	0,30*
Agitação (Q)	-0,01	0,46
Tempo x Agitação	-0,19	0,36

*Significativo em um intervalo de 95% de confiança.

Tabela 25: Análise de variância para extração da enzima bruta na atividade enzimática

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F
Regressão	4,66	5	0,93	7,10
Residual	0,66	5	0,13	
Total	5,32	10		
Coeficiente de determinação	0,88			
F Tabelado (95%)				$F_{5,5} = 5,050329$

Segundo a Tabela 25 (ANOVA), o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo pois o valor de F , com 95% de confiança, calculado para o modelo foi 7,10,

valor 1,5 vezes maior que o valor de $F_{5,5}$ Tabelado (5,05). De acordo com os resultados apresentados, o tempo e a agitação foram significativos sendo os melhores resultados obtidos para o tempo de 6 minutos e agitação de 100 RPM. A Figura 16 apresenta a superfície de resposta da determinação da atividade enzimática do terceiro planejamento experimental (Tabela 23). Os principais fatores relacionados à extração dizem respeito à agitação, temperatura e ao tempo necessário para executá-los. A agitação pode diminuir o tempo gasto na extração, mas alguns produtos, como as enzimas podem ser instáveis a variações na agitação, tempo ou temperatura. Observamos na Figura 16 que os melhores resultados foram na região de 6 minutos e 150 RPM, entretanto os valores encontrados na região do ponto central (6 minutos a 100 RPM) estão próximos da região ótima, confirmadas pela validação experimental. Portanto, a fim de reduzir gastos energéticos oriundos de uma rotação mais elevada, a agitação de 100 RPM foi escolhida.

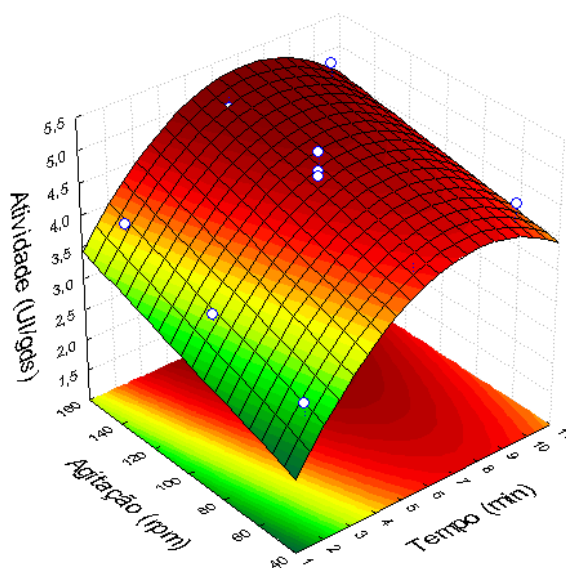


Figura 16: Superfície de resposta para a atividade enzimática em função da agitação e do tempo de extração.

A Tabela 26 apresenta os resultados obtidos com relação a atividade enzimática no estudo onde foram avaliados diferentes temperaturas durante a extração, cujos resultados foram analisados pelo teste de Tukey com 95% de confiança. Por não haver diferença significativa entre os resultados, a temperatura de 40 °C foi escolhida, baseada na literatura encontrada para ensaios de atividade enzimática hidrolítica e quitinolítica.

Tabela 26: Atividade enzimática em diferentes temperaturas de extração após 48h de fermentação.

Temperatura (°C)	Atividade (UI/gds)
4	7,52 ^a ± 0,65
20	7,35 ^a ± 1,36
30	5,82 ^a ± 0,54
40	6,11 ^a ± 0,12
50	6,25 ^a ± 0,77

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.6 Aplicação na Casca do Camarão

A Tabela 27 apresenta os resultados obtidos com relação à atividade enzimática produzida no estudo onde foram substituídos a quitosana comercial pelos resíduos sólidos de camarão branco *Litopenaeus vannamei* (1g) ou quitina (1g). Os resultados foram analisados pelo Teste de Tukey com 95% de confiança, no qual foi verificado que não houve diferença significativa entre as atividades enzimáticas.

Tabela 27: Atividade enzimática em diferentes substratos.

Meio	Substrato	Atividade (UI/gds)
1	Quitina	2,01 ^a ± 0,24
2	Camarão	1,53 ^a ± 0,33

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

As Figuras 17 e 18 apresentam as fotos dos meios fermentados em erlenmeyers de 250 mL com boca larga após 48h de inoculação.



Figura 17: Meio de cultura com resíduos sólidos do camarão branco *Litopenaeus vannamei*.



Figura 18: Meio de cultura com quitina.

SURESH & CHANDRASEKARAN (1998) utilizaram resíduos industriais do processamento de camarão para produção de quitinase por *Beauveria bassiana* BTMF S10 utilizando meio de FES indicando possibilidades de utilização do processo. Entretanto a otimização teve como parâmetros a razão resíduo/água do mar, NaCl e KH₂PO₄ e a fermentação procedeu-se em placas de petri durante 5 dias. A produção de N-acetil-D-glicosamina utilizando enoquitinases e quitobiase de culturas fúngicas de *Trichoderma harzianum* TUBF 927 em FES utilizando resíduos agroindustriais mostraram a máxima atividade de quitobiase (BINOD *et al.*, 2007). Neste caso foram otimizados parâmetros físico-químicos como o período de incubação e umidade inicial, além de parâmetros nutricionais como fonte de quitina, nitrogênio orgânico e inorgânico resultando em um rendimento de 2,25 U/gds. A otimização de níveis de nutrientes para produção de quitinase por *Enterobacter* sp. NRG4 em FES foi conduzida utilizando a metodologia de superfície de resposta baseado em um planejamento composto central (DAHIYA *et al.*, 2005). O planejamento utilizou como parâmetros a razão farelo de trigo/quitina, o nível de umidade e o tempo de incubação e os resultados mostraram que todas as variáveis independentes possuem efeito significativo na produção de quitinase, tendo como melhor concentração para produção a razão 1 para farelo de trigo/quitina, 80% de umidade, e tempo de incubação de 168h. Um modelo de otimização próximo ao estudado na tese encontrou um nível de umidade em torno de 51% para produção de quitosanase por *Trichoderma koningii* em FES utilizando uma mistura de farelo de trigo e quitosana com rendimento de 4,84 IU/gds. MARIN-CERVANTES *et al.* (2008) sugere que a repressão catabólica da produção enzimática depende do nível de umidade, devendo ser maior para um menor teor de umidade para a produção de exochitinases e mais leve ou insignificante para a produção de endo-quitinases. Estudos detalhados sobre as características das enzimas produzidas no extrato, bem como seu comportamento frente à hidrólise de diferentes tipos de quitosana são apresentado nos tópicos seguintes.

4.7 Caracterização dos Extratos Enzimáticos

4.7.1 Determinação Protéica dos Extratos Enzimáticos por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A abordagem utilizando eletroforese pode nos dar uma visão mais ampla dos componentes protéicos presentes nos extratos fermentativos, possibilitando identificar em diferentes extratos a presença das proteínas e correlacionar os dados das atividades. A Figura 19 mostra o perfil da fração total de proteínas extraídas das fermentações (Tabela 9). Os resultados demonstraram variações dos perfis dos diferentes caldos fermentativos de *T. polysporum*. Os perfis protéicos dos extratos de FES (S4 e S5) apresentaram similaridade nas bandas, independente da forma de extração aplicada, que resultou somente numa maior concentração do extrato destacando em ambos, apesar da dispersão das bandas, cinco bandas protéicas (100 kD, 50 kD, entre os marcadores 50 e 37 kD, um pouco acima de 25 kD e uma superior ao marcador 15 kD). Os extratos da fermentação submersa S1, S2 e S3 apresentaram perfis diferentes, tendo em comum uma proteína de massa molar 60 kD e outra correspondente a 50 kD. Os extratos S2, S4 e S5 apresentaram em comum uma proteína de massa molar 50 kD.

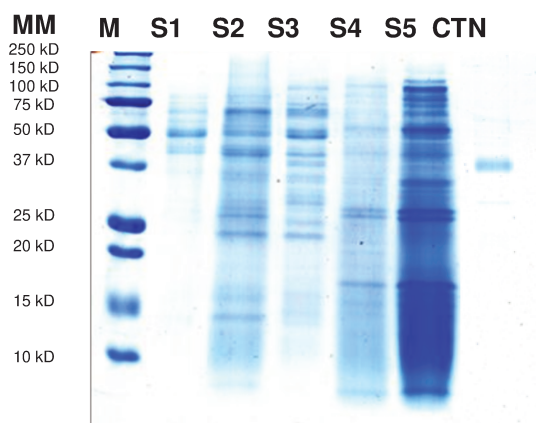


Figura 19: gel de SDS-PAGE em linhagem de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. M-marcador de proteína; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM); S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S4-FES, procedimento padrão; S5-FES (extrato esterilizado em filtropur S 0,2 e concentrado em vivaspin 20, assim como as amostras de fermentação submersa); CTN-quitinase padrão (controle positivo).

Devido a grande dispersão de bandas dos extratos, principalmente os extratos resultantes da FES, uma nova eletroforese foi realizada, onde cada extrato foi dividido em quatro diferentes amostras: 1- extrato recém-extraído, estocado imediatamente a -20 °C (para evitar a atuação de proteases), 2- extrato estocado em temperatura ambiente (25°C), por 48h, 3- extrato estocado a 4°C, após 48h de estocagem e 4- extrato estocado a 4°C, contendo inibidores de proteases, após 4h em temperatura ambiente. Os perfis protéicos das amostras estão apresentados nas figuras 20 e 21.

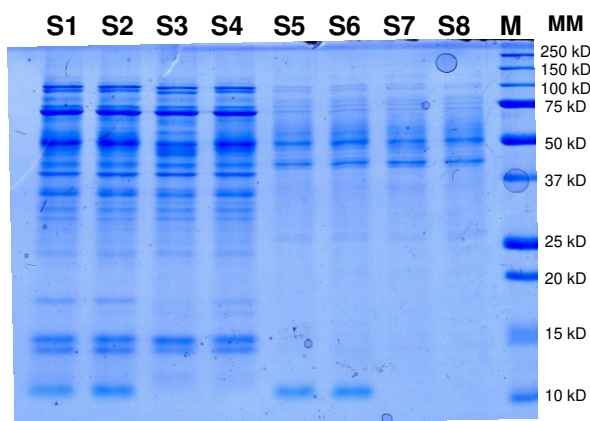


Figura 20: gel de SDS-PAGE em linhagem de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. M-marcador de proteína; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM), após 4h de exposição em temperatura ambiente; S2-TCM exposto em temperatura ambiente, por 48h (controle positivo); S3-TCM estocado em freezer (controle negativo); S4-TCM com inibidor de protease, após 4h de exposição em temperatura ambiente. S5-*Trichoderma* Complete Medium (TCM) em meio induzido com quitina coloidal, após 4h de exposição em temperatura ambiente; S6-TCM em meio induzido com quitina coloidal, exposto em temperatura ambiente por 48h (controle positivo); S7-TCM em meio induzido com quitina coloidal, estocado em freezer (controle negativo); S8-TCM em meio induzido com quitina coloidal, com inibidor de protease, após 4h de exposição em temperatura ambiente.

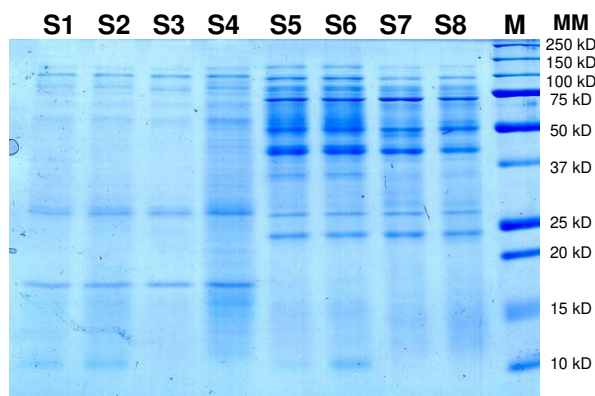


Figura 21: gel de SDS-PAGE em linhagem de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. M-marcador de proteína; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM) em meio induzido com resíduos de camarão, após 4h de exposição em temperatura ambiente; S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão, exposto em temperatura ambiente por 48h (controle positivo); S3-TCM em meio induzido com resíduos de camarão, estocado em freezer (controle negativo); S4-TCM em meio induzido com resíduos de camarão, com inibidor de protease, após 4h de exposição em temperatura ambiente. S5- FES após 4h de exposição em temperatura ambiente; S6-FES exposto em temperatura ambiente por 48h (controle positivo); S7-FES estocado em freezer (controle negativo); S8-FES com inibidor de protease, após 4h de exposição em temperatura ambiente.

Os perfis protéicos dos extratos dos meios fermentativos das amostras apresentaram a ausência da proteína de massa molar 10 kD entre as amostras estocadas a 4 °C e as outras. Os resultados surpreenderam as expectativas, pois não houve variação nos perfis da amostra congelada ou exposta à temperatura ambiente, indicando que as proteases não atuaram nos extratos e o inibidor de protease não se faz necessário (critério de grande relevância considerando-se o custo acrescido no processo caso fosse necessário a adição incondicional de inibidores) pois não influenciou no comportamento das proteínas.

Como apresentado nas Figuras 20 e 21, os extratos produzidos por *T. polysporum* utilizando diferentes substratos indutores diferem em termos de quantidade e qualidade das iso-enzimas produzidas (Figura 19) e, conseqüentemente, diferentes produtos oligoméricos possivelmente poderão ser obtidos quando misturas de enzima bruta forem incubadas com polímeros de quitosana. Os resultados de SDS-PAGE (Figura 19) mostraram que *T. polysporum* produz um grande quantidade de proteínas, quando em crescimento com meio de cultura suplementado com quitina ou resíduo da casca de camarão.

Extrato enzimático bruto produzido por *Lecanicillium lecanii* após 48h de FES com casca de camarão apresentou três bandas protéicas (31, 48 e 58 kD), cujos autores relatam

ser possíveis β -N-acetilglicosaminidases (FLORIDO *et al.*, 2009). A análise do gel de eletroforese preparado após a purificação do extrato enzimático produzido por *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 após 72h de FES de farelo de trigo com quitina, também apresentou três bandas protéicas, com pesos moleculares 82,6; 33,9 e 29,1 kD, diferentes dos valores encontrados pelo autor supracitado (BINOD *et al.*, 2005). Quatro bandas de proteínas com massa molar de 123,1; 85,5; 33,1 e 23 kD foram detectadas em extrato enzimático bruto de fermentação submersa de *Lecanicillium fungicola* contendo quitina como substrato (RAMIRÉZ-COUTIÑO, *et al.*, 2006). Uma quitosanase de massa molar 28 kD, denominada como Csn2 foi purificada a partir de caldo de cultura fermentado pelo fungo *Gongronella* sp. JG (WANG *et al.*, 2008). STRUSZCZYK *et al.* (2009) descreve na literatura que endo-quitosanases de bactérias e fungos são caracterizadas por baixa massa molar, geralmente na faixa de 20 a 50 kD, enquanto que exo-chitosanases (β -GlcNase) variam entre 97 e 135 kD. β -N-acetil-hexosaminidase de extratos enzimáticos brutos de *P. monoverticillium* CFR 2 foram examinadas por SDS-PAGE, apresentando uma banda de massa molar de aproximadamente 110 kDa (SURESH *et al.*, 2011).

Quitinase de 42 kD foi purificada do sobrenadante de *T. artroviride* crescido em meio contendo quitina coloidal como fonte de carbono (HARIGHI *et al.*, 2007). Isolados de *T. harzianum* crescidos em meio PDA sob diferentes temperaturas produziram de 3 a 5 isoenzimas (ASRAN-AMAL *et al.*, 2010). Apesar da utilização de substratos complexos e impuros para a FES utilizando o fungo *T. polysporum*, o extrato enzimático bruto apresentou um comportamento semelhante ao encontrado para sua categoria e entre as diferentes espécies de *Trichoderma*.

4.7.2 Determinação da Atividade Quitinolítica e Quitosanólítica

Para confirmar a excreção de enzimas quitinolíticas e quitosanólíticas foi analisado gel de atividade onde se observa a produção de múltiplas quitinases e quitosanases. A Figura 22 corresponde aos géis de atividade contendo quitina glicol como substrato e a Figura 23, aos géis de atividade contendo quitosanas F_A 0,11 e 0,56 como substrato.

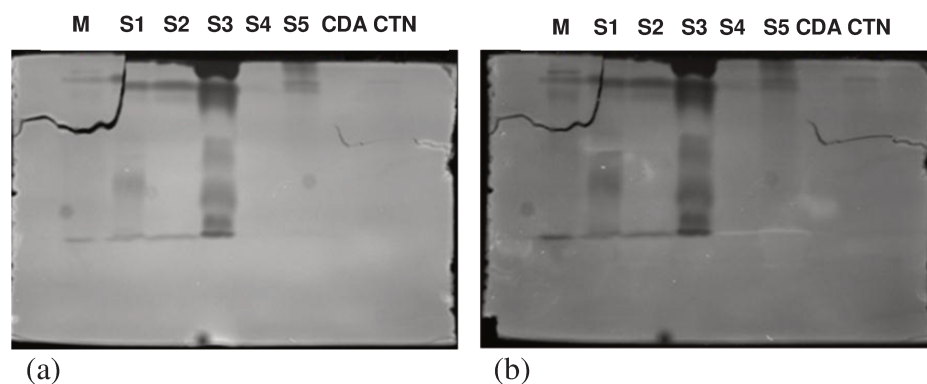


Figura 22: (a) gel de atividade quitinolítica contendo glicol quitina (antes da polimerização do gel) em linhagem de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. (b) gel de atividade quitinolítica contendo glicol quitina, após depolimerização em linhagem de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. M-marcador de proteína; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM); S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S4- FES, procedimento padrão; S5-FES (extrato esterilizado em filtro pur S 0,2 e concentrada em vivaspin 20, como as amostras de fermentação submersa); CDA-quitina desacetilase; CTN-quitinase padrão (controle positivo).

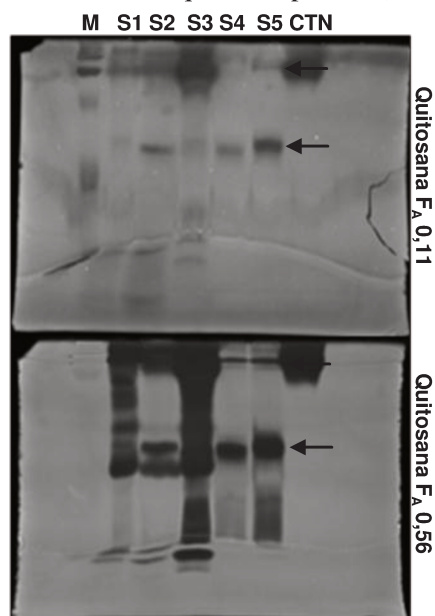


Figura 23: géis de atividade quitosanólítica contendo quitosana F_A 0,11 e quitosana F_A 0,56 de extrato de *Trichoderma polysporum* dos extratos enzimáticos fermentativos. M-marcador de proteína; S1-*Trichoderma* Complete Medium (TCM); S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S4- FES, procedimento padrão; S5-FES (extrato esterilizado em filtro pur S 0,2 e concentrada em vivaspin 20, como as amostras de fermentação submersa); CTN-quitosanase padrão (controle positivo).

Para o gel contendo glicol quitina (Figura 22) foi observada atividades semelhantes para o extrato de fermentação submersa contendo somente glicose e resíduo de camarão (S1 e S2), entretanto o extrato contendo somente glicose apresentou mais uma banda de atividade na faixa de 16 kD. O extrato contendo quitina coloidal apresentou diferentes

bandas de atividade, sugerindo a presença de múltiplas quitinases, fato já esperado por sabermos que a quitina coloidal do meio de cultura na fermentação de *Trichoderma* estimula a produção de enzimas quitinolíticas.

Nos géis de quitosana F_A 0,11 e F_A 0,56 (Figura 23), cujos resultados serão de maior relevância já pretende-se produzir os AGO's a partir da hidrólise de quitosanas com diferentes F_A , os extratos fermentativos de FES (S4 e S5) apresentaram duas bandas distintas e com forte expressão em uma delas. Uma hipótese é que existe apenas duas enzimas, sendo uma de grande expressão, sugerindo maior especificidade na fermentação utilizando resíduo de camarão (S2, S4 e S5), sendo ainda mais específica para a FES (S4 e S5). Isto seria de grande interesse para produção de oligômeros (provavelmente a especificidade na hidrólise da quitosana será mais elevada) e para uma possível etapa de purificação da enzima. Outra hipótese a ser considerada é que as duas bandas podem não ser necessariamente duas enzimas pois sabe-se que uma banda poderia ser desdobrada em diversas outras ou o contrário, onde uma proteína pode se dissociar em dois polipeptídeos. No caso dos extratos com grande variedade de diferentes enzimas, provavelmente o hidrolisado da quitosana deve conter monômeros ou dímeros que em estudos anteriores mostraram não possuir efeito biológico em fungos (OLIVEIRA JUNIOR, 2006).

A degradação de quitosana em oligômeros depende da enzima produzida e, no caso de endoquitosanases, estes podem ser desde D_3 a D_6 . Já as exoquitosanases quebram uma única unidade **D** do polímero a ser degradado. Em alguns casos heterooligosacarídeos contendo unidades monossacarídeas **D** e **A** são descritos como produtos de degradação de quitosanas por quitosanases, em geral a atividade de quitosanases é maior com quitosanas com menor F_A (LIU *et al.*, 2009; FUKAMIZO *et al.*, 1995; CHEN, 2005; STRUSZCZYK *et al.*, 2009), sugerindo que o extrato enzimático de FES de *T. polysporum* produziu, provavelmente, quitinases. A atividade mais forte para quitosana F_A 0,56 pode indicar que o extrato enzimático bruto atua mais facilmente em substratos mais acetilados. A diferença entre os extratos pode indicar a produção de produtos oligoméricos com algumas particularidades como bioatividade.

A análise do gel de atividade agarose – 4-methylumbelliferil-*N*-acetil- β -D-glicosaminida (4-MU) mostrou a fluorescência do 4-MU no gel, com atividade enzimática visível sobre luz UV, como consequência da atividade de β -Nacetilglicosaminidase.

(FLORIDO *et al.*, 2009). β -N-acetil-hexosaminidase de extratos enzimáticos bruto de FES utilizando resíduo industrial foi analisada por zimografia com 4-UM e apresentou uma banda fluorescente de atividade de β -N-acetil-hexosaminidase, revelando um monômero com aparente massa molar em torno de 110 kD (SURESH *et al.*, 2011). Quitinase extracelular de *A. fumigatus* CS-01 foi isolada, purificada e caracterizada. O gel de atividade indicou que a enzima é um monômero com massa molecular relativa de 4,5kD (JIN-LAN *et al.*, 2009). Quatro bandas (24, 40, 55 e 63 kD) obtidas do extrato enzimático bruto após 144h de fermentação submersa de *V. fungicola* contendo quitina como substrato apresentaram atividade de quitinase em gel de atividade contendo quitina F_A 0,64 (RAMIREZ-COUTIÑO *et al.*, 2010). A maior parte da atividade quitinolítica aparece associada à banda de proteína de 24 kD, entretanto os autores relatam que uma difusão que conduz ao alargamento da banda eletroforética não pode ser excluída com certeza.

As bandas múltiplas do extrato bruto observadas neste trabalho sugerem a presença de iso-enzimas que poderia explicar a capacidade da estirpe de *T. polysporum* de hidrolisar diferentes quitosana e quitina em diferentes condições de hidrólise. Este fato não é surpreendente uma vez que vários fungos são conhecidos por produzirem proteínas múltiplas para a clivagem de quitina por quitinases ou quitosanases, como por exemplo, cepas do micoparatisa *T. harzianum* (DE LA CRUZ *et al.*, 1992) e *V. fungicola* (RAMIREZ-COUTIÑO *et al.*, 2010).

4.7.3 Especificidade de Enzimas Quitinolíticas para Substratos com Diferentes F_A Determinados por Focalização Isoelétrica

A partir dos resultados dos géis de atividade enzimática, foi desenvolvida eletroforese com focalização isoeletrica para estudar o ponto isoeletrico das enzimas. As Figuras 24 e 25 representam estes géis para quitosana F_A 0,11 e F_A 0,56, respectivamente.

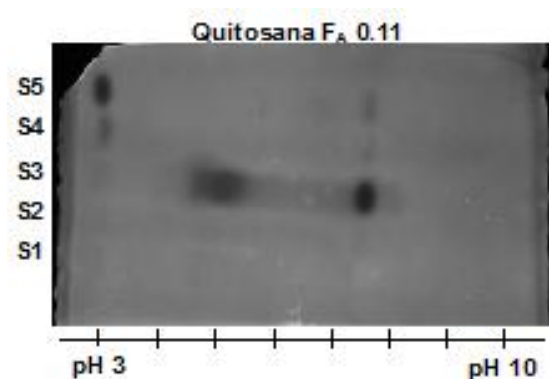


Figura 24: Focalização isoeétrica dos extratos enzimáticos fermentativos de *Trichoderma polysporum* (pH 3-10). S5-FES (extrato esterilizado em filtropur S 0,2 e concentrado em vivaspin 20, como as amostras de fermentação submersa); S4- FES, procedimento padrão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S1- *Trichoderma* Complete Medium (TCM).

Os resultados mostram que para os extratos de FES as enzimas apresentam pontos isoeletrônicos (pI) no pH 3, enquanto o extrato da fermentação líquida em meio induzido com quitina apresenta pI no pH 5, possivelmente correspondente a enzima de menor MM do gel de atividade e estimado em torno de 7,5 para a enzima de maior MM. Para o extrato contendo quitina coloidal as enzimas encontradas no gel de atividade contendo quitosana com F_A 0,11 são de maior massa molar mas com ponto isoeletrônicos diferentes. Com tantas distinções entre as MMs e o ponto isoeletrico das enzimas produzidas nos extratos fermentativos de FES uma possível purificação seria menos dispendiosa que no caso das demais amostras. Comportamento similar ao encontrado no gel de atividade enzimática foi observado no gel da Figura 25, com exceção da amostra S2 que, possivelmente corresponde à mesma amostra S1, com um possível erro na hora da aplicação, pois o resultado da amostra S2 nesse caso não confere, nem se correlaciona com comportamento enzimático do extrato, a partir dos resultados apresentados anteriormente e no caso da amostra S3 que também apresentou uma banda com pI no pH 3 e diversas outras bandas entre o pH 3 e 10. A observação do gel deixa claro que a especificidade enzimática do extrato de FES é grande e provavelmente facilitará o manuseio posterior das enzimas.

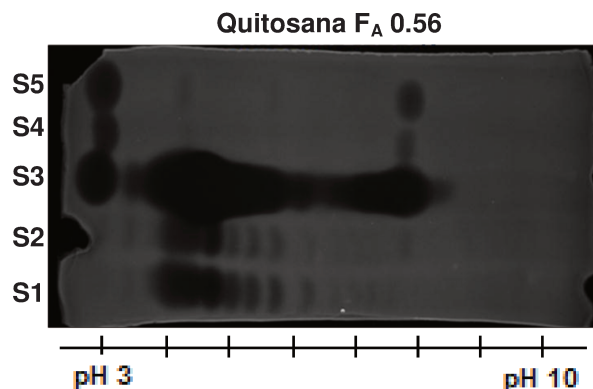


Figura 25: Focalização isoeétrica dos extratos enzimáticos fermentativos de *Trichoderma polysporum* (pH 3-10). S5-FES (extrato esterilizado em filtropur S 0,2 e concentrado em vivaspin 20, como as amostras de fermentação submersa); S4- FES, procedimento padrão; S3-TCM em meio induzido com quitina coloidal; S2-TCM em meio induzido com resíduos de camarão; S1- *Trichoderma* Complete Medium (TCM).

Quitinases fúngicas tem uma ampla faixa de pIs que podem variar de 3 a 8 (DUO-CHUAN, 2006). Sobrenadantes do fermentado de *T. harzianum* CECT 2413 em meio mínimo suplementado com quitina produziram três proteínas com atividade quitinolítica que, após purificação e caracterização apresentaram pIs de 6,2; 4,6 e 7,8, para quitinases de CHIT42 (42kD), CHIT37 (37kD) e CHIT33 (33kD), respectivamente (DE LA CRUZ, *et al.*, 1992). Frações coletadas do extrato enzimático, produzido por fermentação submersa de *Lecanicillium lecanii* contendo quitina como substrato, por RAMIREZ-COUTIÑO *et al.* (2010) detectaram atividades de duas N-acetihexosaminidases (HexNases), com pIs 3,2 e 13 e três quitinases/quitosanases com pIs de 4,7; 6,8 e 10. LORITO *et al.* (1993) afirma por suas análises que quitinases de *T. harzianum* são substancialmente mais bioativas e eficazes que enzimas quitinolíticas de plantas e outros microrganismos. Por apresentar quitinases especialmente atraentes, o gênero *Trichoderma* tem sido pensado como uma fonte rica de enzimas quitinolíticas para biocontrole.

4.7.4 Determinação de Endoquitinase e Exoquitinase pelo Método Colorimétrico Utilizando Substratos Específicos Derivados de *p*-Nitrofenol

4.7.4.1 Atividade de Exoquitinase

A Tabela 28 descreve os resultados de atividade enzimática obtidos para o extrato enzimático bruto após 48 horas de fermentação de *T. polysporum* em casca de camarão (S4) e extrato enzimático bruto de fermentação de *T. polysporum* em meio contendo quitosana utilizando o substrato *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminida. A fermentação conduzida em meio contendo quitosana foi utilizada como controle, a fim de comparação dos resultados obtidos.

Tabela 28: Medidas de absorbância no meio reacional e cálculo da quantidade de *p*-nitrofenol liberada e da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase a partir do método descrito por Nawani e Kapadnis (2001) com 250 μ L de extrato enzimático/25 μ L do substrato.

Extrato bruto fermentado	Tempo	Concentração de <i>p</i> -nitrofenol (ppm)	<i>p</i> -nitrofenol liberado (ppm)	Atividade (μ mol/min. L)
Casca de camarão – 48h	0h	224	58	14
	30 min	282		
Quitosana – 48h	0h	46	176	42
	30 min	222		

A atividade enzimática de meio contendo quitosana foi maior do que a produzida em meio contendo casca de camarão (202% maior para o ensaio com 250 μ L de extrato enzimático). Uma hipótese para tal fato seria que a quitosana, por ser um substrato menos complexo que a casca de camarão, favorece a produção de uma maior diversidade de enzimas hidrolíticas, fato observado nos géis de atividade utilizando meio fermentativos com substratos menos complexos que a casca de camarão (glicose e quitina coloidal). A maior atividade pode conduzir também a uma maior produção de monômeros e dímeros, sendo menos efetiva na produção de oligômeros de maior tamanho, objetivo do trabalho.

A Tabela 29 relata os resultados de atividade enzimática obtidos para o extrato enzimático bruto após 48 horas de fermentação de *T. polysporum* em casca de camarão (S4) e extrato enzimático bruto de fermentação de *T. polysporum* em meio contendo quitosana utilizando o substrato *p*-nitrofenil- β -D-N-N'-diacetilquitobiose para a determinação de

exoquitinase. A fermentação conduzida em meio contendo quitosana foi utilizada como controle, a fim de comparação dos resultados obtidos.

Tabela 29: Medidas de absorbância no meio reacional e cálculo da quantidade de *p*-nitrofenol liberada e da atividade de diacetilquitobiose a partir do método descrito por Nawani e Kapadnis (2001) com 250 μ L de extrato enzimático/25 μ L do substrato.

Extrato bruto fermentado	Tempo	Concentração de <i>p</i> -nitrofenol (ppm)	<i>p</i> -nitrofenol liberado (ppm)	Atividade (μ mol/min. L)
Casca de camarão – 48h	0h	124	-	-
	30 min	124		
Quitosana – 48h	0h	50	101	24
	30 min	151		

Não foi registrada atividade de exoquitinase para os extratos brutos produzidos em meio contendo casca de camarão.

4.7.4.2 Atividade de Endoquitinase

A Tabela 30 apresenta os resultados dos experimentos para endoquitinase, conduzido os extratos brutos fermentados de casca de camarão e quitosana com 48h de fermentação utilizando *p*-nitrofenil- β -D-N-N'-N''-triacetilquitotriose como substrato.

Tabela 30: Medidas de absorbância no meio reacional e cálculo da quantidade de *p*-nitrofenol liberada e da atividade de endoquitinase a partir do método descrito por Nawani e Kapadnis (2001) com 250 μ L de extrato enzimático/25 μ L do substrato.

Extrato bruto fermentado	Tempo	Concentração de <i>p</i> -nitrofenol (ppm)	<i>p</i> -nitrofenol liberado (ppm)	Atividade (μ mol/min. L)
Casca de camarão – 48h	0h	125	11	3
	30 min	136		
Quitosana – 48h	0h	49	53	13
	30 min	102		

Os resultados para as atividades de endoquitinase apresentaram valores menores que as atividades de exoquitinase.

A habilidade do extrato enzimático bruto de FES utilizando resíduo de camarão de hidrolizar os substratos *p*-NP-GlcNAc₁₋₃ mostrou que a atividade enzimática mais elevada foi observada para *p*-NP-GlcNAc e a mais fraca para o substrato dimérico *p*-NP-GlcNAc₂.

Uma intermediária atividade enzimática foi encontrada para o substrato trímero *p*-NP-GlcNAc₃. Estes substratos foram empregados para diferenciar as enzimas de acordo com o tipo de atividade: β -N-acetilglicosaminidase (ativa para todos os substratos), quitobiosidase (ativa para pNP- GlcNAc), exo-quitinase (ativa para pNP-GlcNAc₂) ou endo-quitinase (normalmente ativa em pNP-GlcNAc₃ e, possivelmente, também em pNP-GlcNAc₂) (NAWANI & KAPADNIS, 2001). Nossos resultados indicam que o extrato enzimático bruto de FES em casca de camarão contém, principalmente, β -N-acetilglicosaminidase, quitobiosidase e exo-quitinase e endo-quitinase com menos atividade.

Na maioria dos fungos quitinolíticos estudados foram encontrados mais de um tipo de quitinase. *T. harzianum* pode produzir sete quitinases: duas N-acetil-glicosaminidases (102 e 73 kD), quatro endochitinases (52, 42, 33 e 31 kD) e uma quitobiosidase (40 kD) (DUO-CHUAN, 2006). Estas enzimas quitinolíticas são importantes durante o ciclo de vida dos fungos para degradação da quitina exógena e remodelação da parede celular fúngica (RAMÍREZ-COUTIÑO *et al.*, 2006). Fungos filamentosos ascomicetos têm até 35 quitinases, mas apenas duas N-acetilglicosaminidases extracelulares, a questão coloca o quão importante essas últimas enzimas realmente são para vários aspectos de degradação da quitina (LÓPEZ-MONDÉJAR *et al.*, 2009). Relatou-se que a análise do perfil enzimático de *T. atroviride* indica que esta cepa não consegue metabolizar quitobiase, mas apenas o monômero N-acetilglicosamina e que N-acetilglicosaminidases são essenciais para a utilização da quitina como fonte de nutrientes (LÓPEZ-MONDÉJAR *et al.*, 2009).

Silagem de resíduo de camarão e bagaço de cana-de-açúcar induziu o fungo *Verticillium lecanii* para produzir N-acetil-hexosaminidase por FES. Esta silagem mostrou ser um indutor eficiente para produção desta enzima extracelular. Entretanto os meios suplementados com sacarose não apresentaram qualquer atividade da enzima (MATSUMOTO *et al.*, 2004).

Diversas enzimas incluindo amilases, celulasas, pectinases, proteases e glicoamilases têm sido produzidas por FES (PANDEY *et al.*, 2001). β -N-acetil-hexosaminidase foram produzidas a partir de *P. monoverticillium* e *F. oxysporum* por FES contendo resíduo de camarão e farelo de trigo comercial como fonte de carbono (SURESH *et al.*, 2011). *Lecanicillium lecanii* produziu quitinases em meios contendo bagaço de cana como suporte (MATSUMOTO *et al.*, 2004) e N-acetil-hexosaminidases foram induzidas e

secretadas em espumas de poliuretano como suporte para FES com quitina como única fonte de carbono (MARIN-CERVANTES *et al.*, 2008). A produção de quitinase em FES contendo misturas de farelo de trigo e quitina por diferentes cepas de *Penicillium aculeatum* também foi relatada (BINOD *et al.*, 2005). Quinze cepas fúngicas foram avaliadas quanto à produção de endoquitinase e quitobiase por FES utilizando resíduos agro-industriais, dos quais *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 apresentou máxima atividade de endoquitinase enquanto *Trichoderma harzianum* TUBF 927 apresentou máxima atividade de quitobiase (BINOD *et al.*, 2007).

T. polysporum, isolados e fornecidos pela Embrapa Semi-Arido (Petrolina - PE, Brazil), foram eficazes na produção de enzimas por FES utilizando casca de camarão. Foi demonstrado também que a degradação de quitosana com diferentes F_A produziu diferentes combinações de misturas de AGO's por enzimas não purificadas. Estima-se que o extrato enzimático produzido atua mais eficientemente na liberação de N-acetil-quitoooligosacarídeos e que foram produzidos principalmente β -N-acetilglicosaminidase (GlcNAcase) e quitobiosidase nos testes utilizando derivados cromogênicos acetilados. Como a enzimas GlcNAcase produz somente monômeros, as enzimas encontradas no extrato enzimático podem ser quitobiosidasas e, provavelmente, quitosanases devido alguns oligômeros completamente desacetilados produzidos na hidrólise. Oligossacarídeos com alto DP foram obtidos quando o substrato da hidrólise enzimática tinha baixo F_A , indicando a presença, principalmente, de quitinases.

4.8 Otimização da Hidrólise Enzimática da Quitosana para Obtenção dos AGO's

O planejamento investigou o efeito das concentrações de enzima e quitosana sobre a produção dos hidrolisados. A Tabela 31 apresenta a matriz do planejamento realizado com os resultados dos açúcares redutores produzidos após 18h de hidrólise.

Tabela 31: Planejamento experimental para otimização da hidrólise enzimática de quitosana.

Ensaio	Extrato enzimático (mL)	Quitosana 1% (mL)	AR (g/L)
1	0,5	1,0	0,38
2	1,5	1,0	0,75
3	0,5	3,0	0,19
4	1,5	3,0	1,89
5	0,3	2,0	0,02
6	1,7	2,0	0,98
7	1,0	0,6	0,80
8	1,0	3,4	1,32
9 (C)	1,0	2,0	0,62
10 (C)	1,0	2,0	0,62
11 (C)	1,0	2,0	0,33

A Tabela 32 apresenta os coeficientes de regressão calculados a partir dos resultados obtidos.

Tabela 32: Coeficientes de regressão para a resposta Y ($\text{mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) a partir da matriz com os valores codificados das variáveis independentes.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	0,5233	0,0917	5,7040	0,0023
Extrato enzimático (L)	0,4284	0,0562	7,6259	0,0006
Extrato enzimático (Q)*	-0,0060*	0,0669*	-0,0903*	0,9315*
Quitosana (L)	0,2107	0,0562	3,7497	0,0133
Quitosana (Q)	0,2740	0,0669	4,0967	0,0094
Extrato enzimático x Quitosana	0,3325	0,0794	4,1847	0,0086

*Não-significativo em um intervalo de 95% de confiança.

O termo quadrático da variável extrato enzimático não foi estatisticamente significativo ao nível de significância de 5% ($p < 0,05\%$). A equação a seguir descreve a taxa de açúcar redutor produzido previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, no modelo reparametrizado que contém apenas os termos estatisticamente significativos.

$$Y = 0,52 + 0,43 x_1 + 0,21 x_2 + 0,28 x_2^2 + 0,33 x_1 x_2$$

A análise de variância (ANOVA) indicou uma porcentagem de variação explicada de 95,6%; o valor calculado da regressão pelo resíduo bem superior ao tabelado e o Fcal da falta de ajuste pelo erro puro é bem inferior que o Ftab (Tabela 33), podendo o modelo ser considerado.

Tabela 33: ANOVA da resposta Y (concentração de açúcares redutores) a partir da matriz com os valores codificados das variáveis independentes

Fonte de variação	SQ	g.l	QM	Fcal	Ftab
Regressão	2,7359	4	0,6840	32,45	4,53
Resíduo	0,1265	6	0,0211		
F. ajuste	0,0704	4	0,0176	0,63	19,25
Erro puro	0,0561	2	0,0280		
Total	2,8624	10		$R^2 = 0,956$	

Analisando-se a curva obtida (Figura 26) concluímos que, para obtermos as melhores concentrações de açúcar redutor, a razão de enzima (extrato enzimático bruto) e substrato (solução de quitosana) na proporção de 1:2 atingiram os melhores níveis de hidrólise (indicando a efetividade da hidrólise enzimática do extrato, pelo substrato). Tais resultados evidenciam o fato de que o aumento do volume da reação é proporcional à geração dos açúcares redutores e, conseqüentemente, de oligossacarídeos. Uma validação experimental na faixa de ótimo foi realizada para constatar a utilização do ponto ótimo, na otimização das condições experimentais das variáveis analisadas.

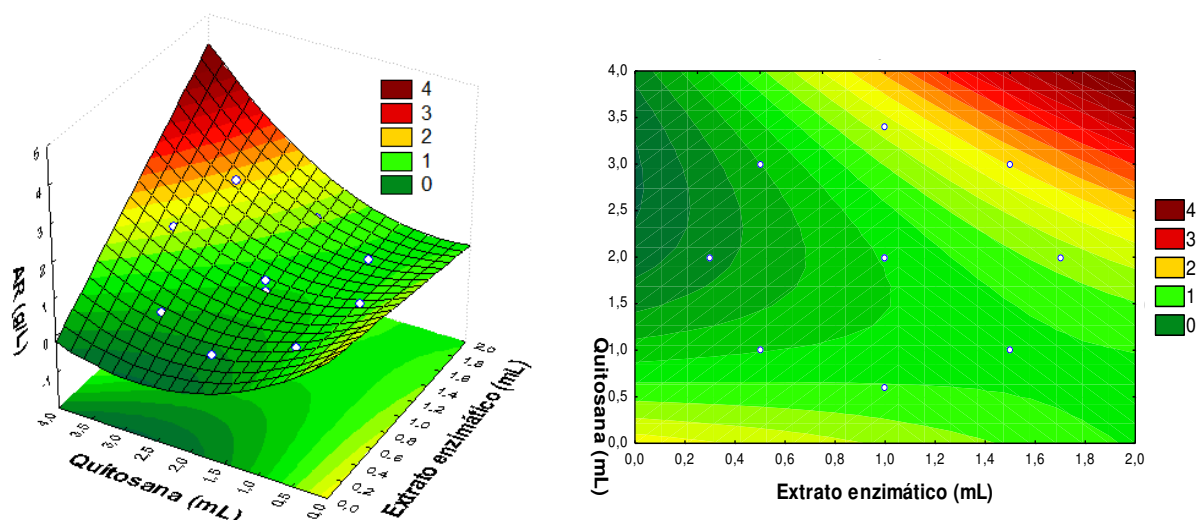


Figura 26: Superfície de resposta e curva de contorno para a produção de açúcares redutores (AR) em função do extrato enzimático quitosana.

AGO's têm um potencial considerável para ser utilizado em uma série de aplicações úteis, entretanto é necessário uma compreensão detalhada dos mecanismos moleculares, não esclarecidos até o presente momento (KIM & RAJAPAKSE, 2005). Evidências atualmente disponíveis sugerem que oligômeros de quitosana parcialmente acetilada com grau de polimerização seis ou mais elevado são melhores para atividades biológicas (DOS SANTOS *et al.*, 2008) e o trabalho desenvolvido neste doutorado apresenta a seguir resultados inéditos e promissores de bioatividade. O uso do extrato enzimático de SSF de *T. polysporum* em cascas de camarão moído recalcitrantes como substrato é crucial neste processo de baixo custo de produção de enzimática, pois este procedimento parece reduzir a complexidade do coquetel de enzimas quitosanólíticas produzidas pelo fungo, pervertendo a degradação excessiva de quitosana e rendendo AGO's mais interessantes com maior grau de polimerização (DP).

4.9 Caracterização dos AGO's produzidos

4.9.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos AGO's

A capacidade hidrolítica dos extratos enzimáticos e formação dos AGO's foram investigadas e, a seguir, os produtos tiveram sua bioatividade testada. Para as hidrólises

foram utilizados os extratos da fermentação submersa (S1 e S3) e da FES (S4) e os hidrolisados foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD) (Figura 27).

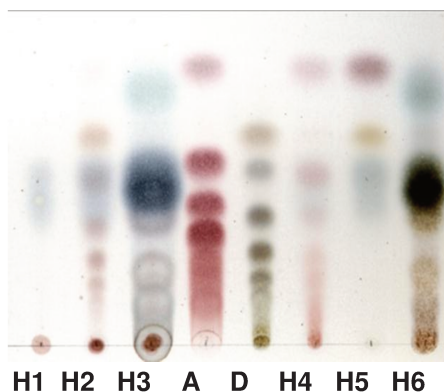


Figura 27: CCD dos hidrolisados utilizando os extratos enzimáticos oriundos da fermentação do *Trichoderma polysporum*. H1-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato de *Trichoderma* Complete Medium (S1); H2-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato de TCM em meio induzido com quitina coloidal (S2); H3-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato de FES (S4); A- Padrões acetilados (de cima para baixo: N-acetil-D-glicosamina; Triacetilquitotriose; Tetracetilquitotetose; Pentacetilquitopentose; Hexacetilquitohexose); D- Padrões não acetilados (de cima para baixo: D-glicosamina; Dímero de quitosana; Trímero de quitosana; Tetrâmero de quitosana; Pentâmero de quitosana; Hexâmero de quitosana); H4-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato de *Trichoderma* Complete Medium (S1); H5-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato de TCM em meio induzido com quitina coloidal (S3); H6- Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato de FES (S4).

Em todas as amostras apareceram bandas azuladas na placa cromatográfica que não correspondem aos amino-açúcares. As bandas provavelmente correspondem a contaminações das amostras, contaminações essas que podem ser outros açúcares ou diferentes metabólitos gerados durante a fermentação que não foram separados das amostras durante a extração. Para uma melhor visualização dos hidrolisados na CCD os extratos foram então filtrados em colunas de exclusão Sephadex G25 (minicolunas PD-10, Amershan Pharmacia), as quais separam proteínas de outras moléculas de massa menor que 5 kDa. Após a filtração em PD-10 uma nova hidrólise foi realizada e os hidrolisados foram analisados por CCD. Foram adicionados controles (mesmo procedimento da hidrólise com a enzima desnaturada em banho-maria a 95°C por 15 minutos) para comparação. A Figura 28 apresenta os resultados da CCD.

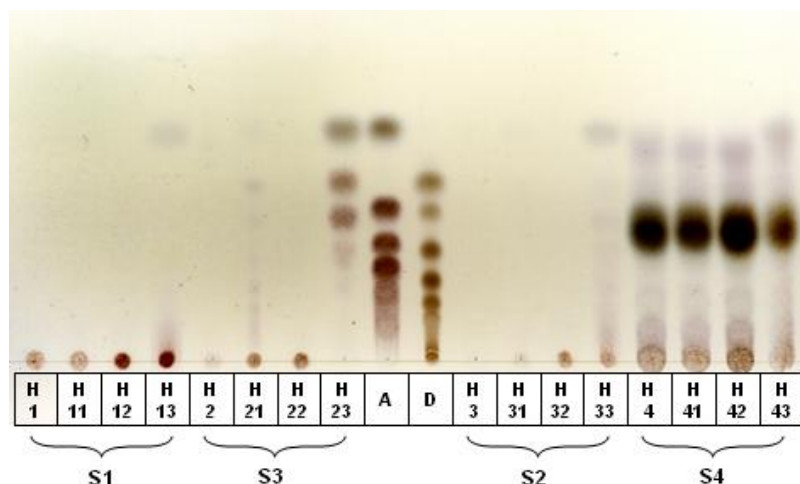


Figura 28: CCD dos hidrolisados utilizando os extratos enzimáticos oriundos da fermentação do *Trichoderma polysporum* filtrados em colunas de exclusão PD-10. H1-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato desnaturado de *Trichoderma* Complete Medium (S1); H11-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato S1; H12-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S1 desnaturado; H13-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S1; H2-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato desnaturado de TCM em meio induzido com quitina coloidal (S3); H21-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato S3; H22-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S3 desnaturado; H23-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S3; A-Padrões acetilados (de cima para baixo: N-acetil-D-glicosamina; Triacetilquitotriose; Tetracetilquitotetose; Pentacetilquitopentose; Hexacetilquitohexose); D-Padrões não acetilados (de cima para baixo: D-glicosamina; Dímero de quitosana; Trímero de quitosana; Tetrâmero de quitosana; Pentâmero de quitosana; Hexâmero de quitosana); H3-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato desnaturado de TCM em meio induzido com resíduo de camarão (S2); H31-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato S2; H32-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S2 desnaturado; H33-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S2; H4-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato desnaturado de FES (S4); H41-Hidrolisado do substrato quitosana 0,11 com extrato S4; H42-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S4 desnaturado; H43-Hidrolisado do substrato quitosana 0,56 com extrato S4.

Após a filtração das amostras em PD-10 as bandas azuis correspondentes a contaminações desapareceram nas amostras dos extratos de fermentação submersa. Pode-se também verificar que ocorreu hidrólise total da quitosana F_A 0,56 produzindo monômeros, dímeros, trímeros e talvez tetrâmeros (extrato da fermentação na presença de quitina coloidal). Os hidrolisados dos extratos de FES ainda apresentaram bandas bem expressivas de contaminantes. Optou-se então utilizar os extratos de FES filtrados em coluna PD-10 e ultrafiltrados visando à retirada das impurezas (Figura 29).



Figura 29: Perfil dos oligossacarídeos de quitosana (F_A 0,11 e F_A 0,56) em cromatografia de camada delgada utilizando os hidrolisados do extrato enzimático da FS contendo quitina coloidal (S3 0,11; S3 0,56) e do extrato enzimático da FES em extrato de camarão (S5 0,56; S5 0,11). A- Padrões acetilados (de cima para baixo: N-acetil-D-glicosamina; Triacetilquitotriose; Tetracetilquitotetose; Pentacetilquitopentose; Hexacetilquitohexose). D-Padrões não acetilados (de cima para baixo: D-glicosamina; Dímero de quitosana; Trímero de quitosana; Tetrâmero de quitosana; Pentâmero de quitosana; Hexâmero de quitosana).

Apesar de ainda aparecer uma ligeira mancha azulada pode-se agora observar claramente os produtos. A hidrólise pelos extratos da FES geraram oligômeros de maior tamanho (acima de trímeros) utilizando quitosana F_A 0,11 como substratos e para quitosana F_A 0,56 houve produção de monômeros, dímeros e trímeros. Os hidrolisados obtidos a partir da hidrólise pelo extrato de FES apresentaram maior quantidade de oligômeros de maior grau de polimerização. A partir desse resultado comparativo, o extrato enzimático de FES foi empregado para a produção dos oligossacarídeos e o método padronizado foi utilizando quitosana comercial (Sigma; F_A 0,15), uma quitosana de F_A intermediário (0,27) e a quitosana de alto fator de acetilação (0,56). A Figura 30 apresenta os perfis dos oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise da quitosana com o extrato enzimático da FES (S5).

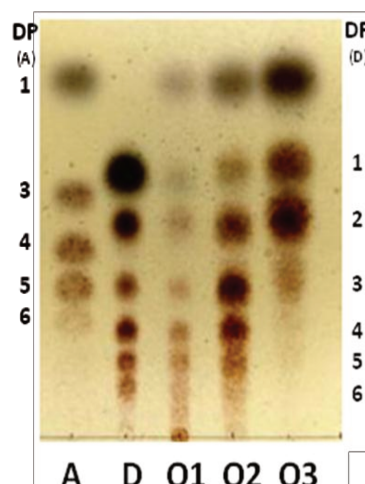


Figura 30: Perfil do oligômeros de quitosana produzidos por hidrólise das quitosanas F_A 0,15; 0,27 e 0,56 pelo extrato enzimático S5. Os padrões são listados de cima para baixo: (A) Padrões de N-acetilglicosamina (Grau de polimerização, DP: 1, 3, 4, 5 e 6); (D) Padrões de glicosamina DP 1, 2, 3, 4, 5, 6. (O1) Oligômeros de quitosana F_A 0,15; (O2) Oligômeros de quitosana F_A 0,27; (O3) Oligômeros de quitosana F_A 0,56.

Correlacionando o resultado da CCD com os géis de atividade enzimática pode-se constatar que as enzimas produzidas pela FES atuaram mais especificamente gerando produtos que podem sugerir alguma funcionabilidade. Foram obtidos produtos distintos com diferentes graus de polimerização quando a quitosana utilizada como substrato foi incubada com o extrato enzimático da FES. Quitosanas com menores valores de F_A geraram produtos com grau de polimerização mais elevado, indicando claramente a presença de atividade mais elevada de quitinases que atividade de quitosanases.

Segundo a literatura, extratos enzimáticos fúngicos (*Trichoderma viride* e *Acremonium cellulolyticus*) foram utilizados para produzir A de quitina (SASHIWA *et al.*, 2003). Um complexo enzimático multi-quitinolítico produzido por *Paenibacillus illinoisensis* ATJ-424 foi relatado como eficaz na produção de A e N-acetil-quitoooligosacarídeos, analisados por HPLC, facilitando seu uso potencial em aplicações industriais (JUNG *et al.*, 2007). AGO's (dímeros até pentâmeros) produzidos a partir da hidrólise enzimática de quitosana, utilizando um extrato bruto enzimático de *Metarhizium anisopliae*, foram detectados e identificados em pequenas concentrações por HPLC (DE ASSIS *et al.*, 2010) e a degradação de quitosanas com diferentes F_A por quitinase bacteriana de *Serratia marcescens* foi monitorada pela distribuição de tamanho dos

oligômeros seguido pelo isolamento e sequenciamento parcial por espectroscopia de RMN-¹H (SØRBOTTEN *et al.*, 2005).

Onze substratos (isolados e em combinação com quitina) foram utilizados para maximizar a produção enzimática que, mais tarde, estas enzimas foram utilizadas para degradar quitina coloidal a **A**, onde a melhor eficiência foi obtida quando endoquitinase e quitobiase foram usadas em combinação (BINOD *et al.*, 2007). Um mecanismo diferente foi observado para a quitosanase bacteriana de *Bacillus cereus* NTU-FC-4, que catalisou uma reação para produzir octâmeros a partir de uma mistura contendo dímeros até heptâmeros, possivelmente por transglicosilação (HSIAO *et al.*, 2008). A comparação das enzimas endoquitosanólíticas de *Bacillus cereus* P16 com preparados comerciais de quitosanas de *Bacillus circulans* WL-12 e *Streptomyces* sp mostrou que este bacilo foi uma valiosa fonte de enzimas industriais para a produção de AGO's (JO *et al.*, 2003). Nesta presente tese de doutorado os AGO's com maior DP foram obtidos quando o substrato da hidrólise enzimática possui menor F_A , indicando uma possível atividade de quitinases.

A cromatografia de camada delgada auxiliou a presente investigação por ser um método de visualização rápida e simples da ocorrência ou não de formação de oligômeros e dos possíveis tamanhos de oligossacarídeos formados. Entretanto análises mais específicas para caracterização dos oligossacarídeos, como a espectrometria de massa foram realizadas.

4.9.2 Determinação da Estrutura dos AGO's por Espectrometria de Massas

A composição dos oligossacarídeos foi analisada por ESI-TOF-MS (Tabela 34). Trímeros (D_2A_1 , D_1A_2) foram detectados como os produtos mais abundantes nos hidrolisados derivados da quitosana com F_A 0,56 (Figura 31). Dímeros (D_1A_1) e tetrâmeros (D_2A_2) também estão presentes em intensidade considerável. Surpreendentemente, nenhum dímero completamente acetilado foi identificado, embora estes fossem esperados ser os principais produtos de quitinases típicas.

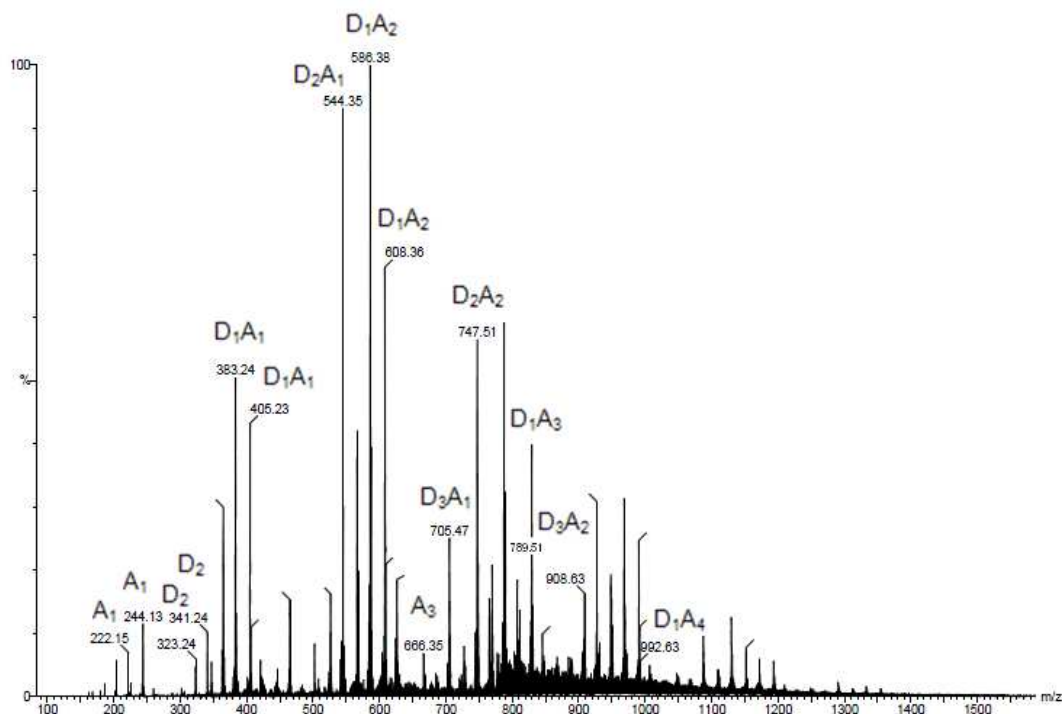


Figura 31: ESI TOF MS dos oligossacarídeos derivados de quitosana F_A 0,56. Nota: Somente os picos correspondentes aos oligossacarídeos estão listados. Componentes não identificados não estão apresentados.

No hidrolisado de quitosana F_A 0,27 (Figura 32) um trímero (D₂A₁), dois tetrâmeros (D₃A₁, D₂A₂) e dois pentâmeros (D₄A₁, D₃A₂) foram os mais abundantes. Para os hidrolisados de quitosana F_A 0,56 os AGO's com grau de polimerização (DP) até 5 foram encontrados já nos hidrolisados de quitosana F_A 0,27 e F_A 0,15 os AGO's com DP 6 (D₄A₂, D₃A₃) e DP 7 (D₅A₂) podem ser vistos, respectivamente, embora em baixa intensidade. Os mais abundantes AGO's derivados de quitosana F_A 0,15 (Figura 33) foram dois trímeros (D₃, D₁A₂), um tetrâmero (D₄) e um pentâmero (D₅).

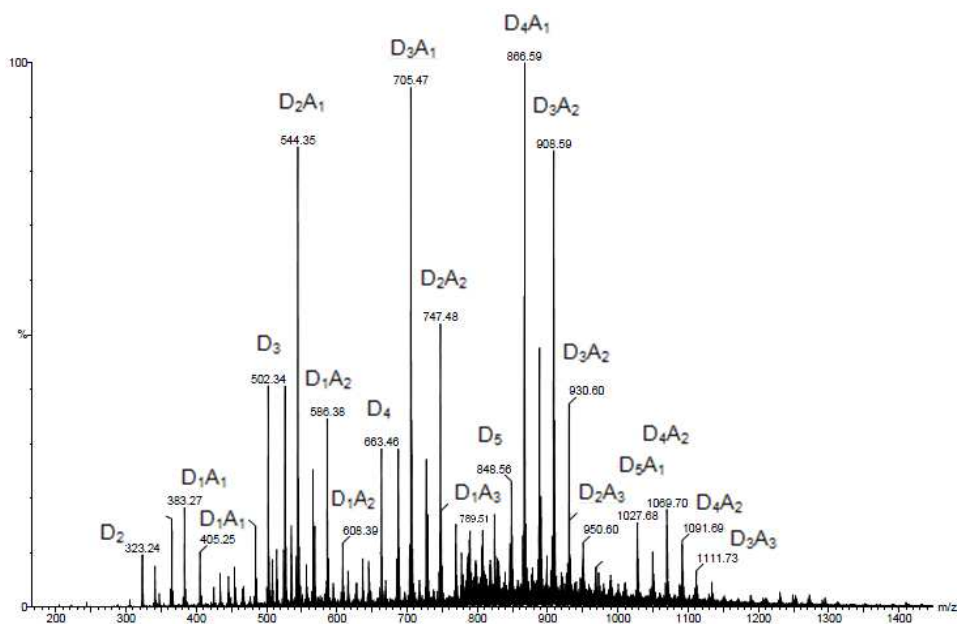


Figura 32: ESI TOF MS dos oligossacarídeos derivados de quitosana F_A 0,27. Nota: Somente os picos correspondentes aos oligossacarídeos estão listados. Componentes não identificados não estão apresentados.

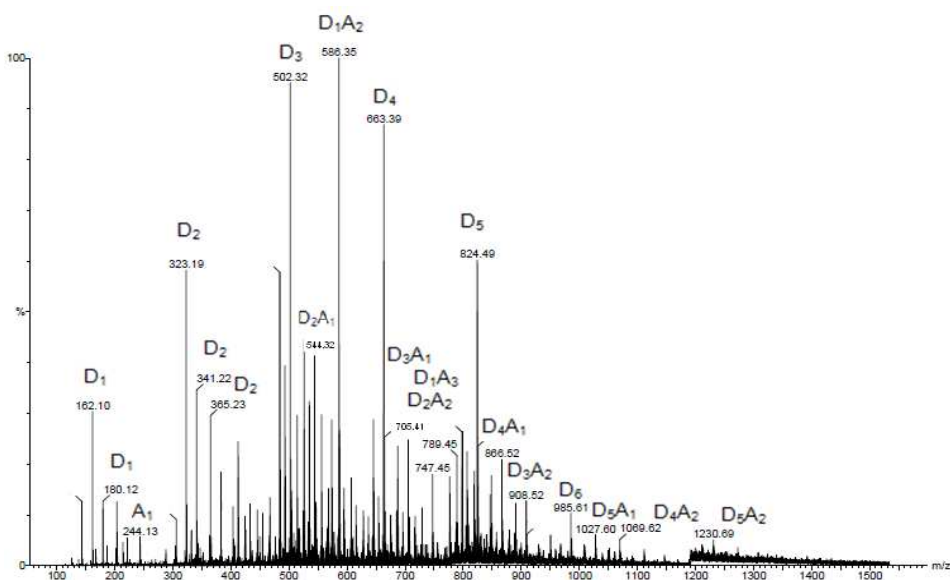


Figura 33: ESI TOF MS dos oligossacarídeos derivados de quitosana F_A 0,15. Nota: Somente os picos correspondentes aos oligossacarídeos estão listados. Componentes não identificados não estão apresentados.

A maioria deles são desacetilados, provavelmente devido ao alto grau de desacetilação da quitosana utilizada como substrato. Curiosamente, produtos completamente desacetilados requerem a clivagem de uma ligação glicosídica entre duas unidades de glicosamina e, assim, a presença de uma quitosanase.

Tabela 34: Perfil dos oligômeros de quitosana produzidos por hidrólise das quitosanas F_A 0,15; 0,27 e 0,56 pelo extrato enzimático S4, identificados por Espectrometria de massa ESI TOF. Legenda: A= Monômeros acetilados e D= Monômeros desacetilados.

Oligômeros	Grau de polimerização (DP) dos oligômeros						
	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7
Oligômeros de quitosana F _A 0,15	D ₁ A ₁	D ₂	D ₃ D ₁ A ₂ D ₂ A ₁	D ₄ D ₁ A ₃ D ₂ A ₂ D ₃ A ₁	D ₅ D ₄ A ₁ D ₃ A ₂	D ₆ D ₅ A ₁ D ₄ A ₂	D ₅ A ₂
Oligômeros de quitosana F _A 0,27		D ₂ D ₁ A ₁	D ₃ D ₁ A ₂ D ₂ A ₁	D ₄ D ₁ A ₃ D ₂ A ₂ D ₃ A ₁	D ₅ D ₄ A ₁ D ₃ A ₂ D ₂ A ₃	D ₅ A ₁ D ₄ A ₂ D ₃ A ₃	
Oligômeros de quitosana F _A 0,56	A ₁	D ₂ D ₁ A ₁	D ₁ A ₂ D ₂ A ₁ A ₃	D ₁ A ₃ D ₂ A ₂ D ₃ A ₁ A ₄	D ₁ A ₄ D ₃ A ₂		

SØRBOTTEN *et al.* (2005) mostraram que a distribuição de MM dos produtos de uma mistura de hidrolisados de quitosanas com diferentes fatores de acetilação produzidos por quitinases bacterianas era alterada para oligômeros de comprimento maior utilizando substratos com baixo F_A e, assim, trechos mais longos não-clivados de unidades D consecutivas. Comportamento similar utilizando quitosana com baixo F_A foi encontrado, como mostrado por espectrometria de massa (Figuras 31, 32 e 33), entretanto utilizando enzimas não purificadas. Provavelmente o extrato enzimático fúngico bruto possui alguma quitinases com comportamento similar às encontradas em bactérias. A Tabela 35 apresenta alguns trabalhos publicados nos últimos anos relacionados com a produção de AGO's, enzimas quitinolíticas e quitosanólíticas fúngicas.

Recentemente foi descoberto que a aplicação de oligômeros de quitosana, produzidos por hidrólise química parcial de poliglicosamina, seguido por reacetilação química parcial, induz explosão oxidativa em células de *Araucaria angustifolia* e esta atividade elicitora aumentou com o aumento do F_A (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Oligossacarídeos de quitina (DP2, DP3, DP4, DP5 e DP7) foram investigados por seus efeitos em células epiteliais e tecidos (DETERS *et al.*, 2008). A atividade antimicrobiana e a indução de resistência a doenças em células de plantas, do AGO's produzidos no trabalho, foram analisadas.

Tabela 35: Avanços descritos na literatura atual sobre enzimas fúngicas (quitinases e quitosanases) e produção de AGO's.

<i>Fungo</i>	<i>Fermentação</i>	<i>Substratos</i>	<i>Enzimas</i>	<i>Principais produtos</i>	<i>Comentários</i>
<i>Trichoderma polysporum</i>	FES em resíduo de casca de camarão.	Quitosanas poliméricas: F _A 0,15 F _A 0,27 F _A 0,56	Quitobiase e/ou β -N-acetilglicosaminidase; endo-quitinase	Dependendo do substrato: F _A 0,15: DP 1 - >6 (D ₃ , D ₁ A ₂ , D ₄ , D ₅) F _A 0,27: DP 2 - 6 (D ₂ A ₁ , D ₃ A ₁ , D ₂ A ₂ , D ₄ A ₁ , D ₃ A ₂) F _A 0,56: DP 1 - 3 (D ₂ A ₁ , D ₁ A ₂)	As enzimas foram analisadas utilizando pNP-substratos e zimografia (quitosana F _A 0,11 e F _A 0,56); Os produtos foram analisados utilizando TLC e ESI QTOF MS <i>Trichoderma</i> isolado em solo nacional (Tese de doutorado).
<i>Penicillium monoverticillium</i>	FES em farelo de trigo comercial e resíduo de camarão.	Quitina coloidal	β -N-acetil-hexosaminidase	N-acetilquitotriose e N-acetil quitohexose	As enzimas foram analisadas utilizando pNP-GlcNAc e zimografia com 4-MU e os produtos foram analisados por HPLC (SURESH <i>et al.</i> , 2011).
<i>Verticillium fungicola</i>	FS + quitina.	Quitosana preparada por desacetilação homogênea parcial de α -quitina, F _A 0,43	CHI1 (MM 41 kD; pI 4,5); CHI2 (MM 46 kD; pI 7,6)	Inicialmente DP 1 e DP 4, posteriormente DP 2 - 11 (D ₁ A ₁ , D ₁ A ₂ , D ₂ A ₂ , D ₁ A ₃ , D ₂ A ₃ , D ₃ A ₃)	As enzimas foram analisadas utilizando quitina coloidal e zimografia com substrates GlcNAc-pNP Os produtos foram analisados por MALDI-TOF MS (RAMIREZ-COUTIÑO <i>et al.</i> , 2010).
<i>Metarhizium anisopliae</i>	FS + quitosana.	quitosana F _A 0,15	quitosanase	Durante a fermentação: DP 2 – 5 (D ₂ -D ₅) Utilizando o extrato enzimático: DP 1- 6 (D ₁ , D ₂)	As enzimas foram analisadas por método DNS; Os produtos foram analisados por (DE ASSIS <i>et al.</i> , 2010).
<i>Lecanicillium (Verticillium) lecanii</i> ATCC 26854	FES em casca de camarão.	Não foram produzidos AGO's	β -N-acetilglicosaminidases	Não foram produzidos AGO's	As enzimas foram analisadas utilizando substrato GlcNAc-pNP e zimografia (FLORIDO <i>et al.</i> , 2009).

<i>Trichoderma harzianum</i>	FS + quitina coloidal ou casca de camarão.	α -quitosana F_A 0,26; β -quitosana: F_A 0,10 F_A 0,17 F_A 0,30	quitinases	F_A 0,26: DP 1-6 (A_2) F_A 0,10: DP 1-6 (A_2 , A_3)	As enzimas foram analisadas utilizando atividade enzimática de α -quitina-coloidal, induzida pelo método DNS; Os produtos foram analisados por HPLC, TLC e viscosidade média MM (LIN <i>et al.</i> , 2009b).
<i>Trichoderma virens</i> UKM1	Meio mínimo para <i>Trichoderma</i> + substratos de quitina.	Quitina coloidal, Casca de camarão secas ao sol, moídas ou não.	exoquitinase and endoquitinase	glicosamina, N-acetilglicosamina, quitobiose e quitotriose	As enzimas foram analisadas pelo método DNS; Os produtos foram analisados por HPLC (ABD-AZIZ <i>et al.</i> , 2008).
<i>Penicillium aculeatum</i> NRRL 2129 e <i>Trichoderma harzianum</i> TUBF 927	FES em resíduos agro-industriais.	Quitina coloidal.	quitobiase and endoquitinase	N-acetil-D-glicosamina	As enzimas foram analisadas utilizando quitina coloidal e substratos GlcNAc-pNP substrates; os produtos foram analisados utilizando TLC e HPLC (BINOD <i>et al.</i> , 2007).

4.10 Quantificação de oligômeros de quitosana

Inicialmente padrões comerciais de AGO's acetilados e desacetilados (2-deoxi-2-acetoamido-D-glicose e 2-amino-2-deoxi-D-glicose) com DP variando de 1 a 6 foram injetados no cromatógrafo e eluídos com NaOH 50 mM, segundo procedimento sugerido no manual da coluna utilizada (Metrosep Carb 1-150). No entanto, com este procedimento verificou-se que a maioria dos tempos de retenção (R_t) dos AGO's acetilados coincidiram com o R_t dos AGO's desacetilados, prejudicando a análise das misturas.

Metodologias encontradas na literatura para análise, por cromatografia líquida com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD), de oligossacarídeos não aminados, os fruto-oligossacarídeos, foram adaptadas (HERNALSTEENS & MAUGERI, 2010) a fim de aperfeiçoar a quantificação dos oligossacarídeos individualmente. Uma fase móvel gradiente com NaOH 50mM (solução A) e eluída linearmente ao longo da corrida com acetato de sódio 500mM, em NaOH 50mM, foi testada. Testou-se a variação da composição e vazão da fase móvel para obtenção de uma boa separação do AGO's, com diferentes R_t , mas apenas as condições descritas na Tabela 10 foram capazes de separar a maioria dos padrões acetilados e desacetilados dos AGO's (Figura 36). As Figuras 34 e 35 apresentam os cromatogramas dos padrões de oligossacarídeos acetilados e desacetilados, respectivamente, injetados separadamente, e a Figura 36 apresenta o cromatograma da mistura de todos os padrões dos oligossacarídeos.

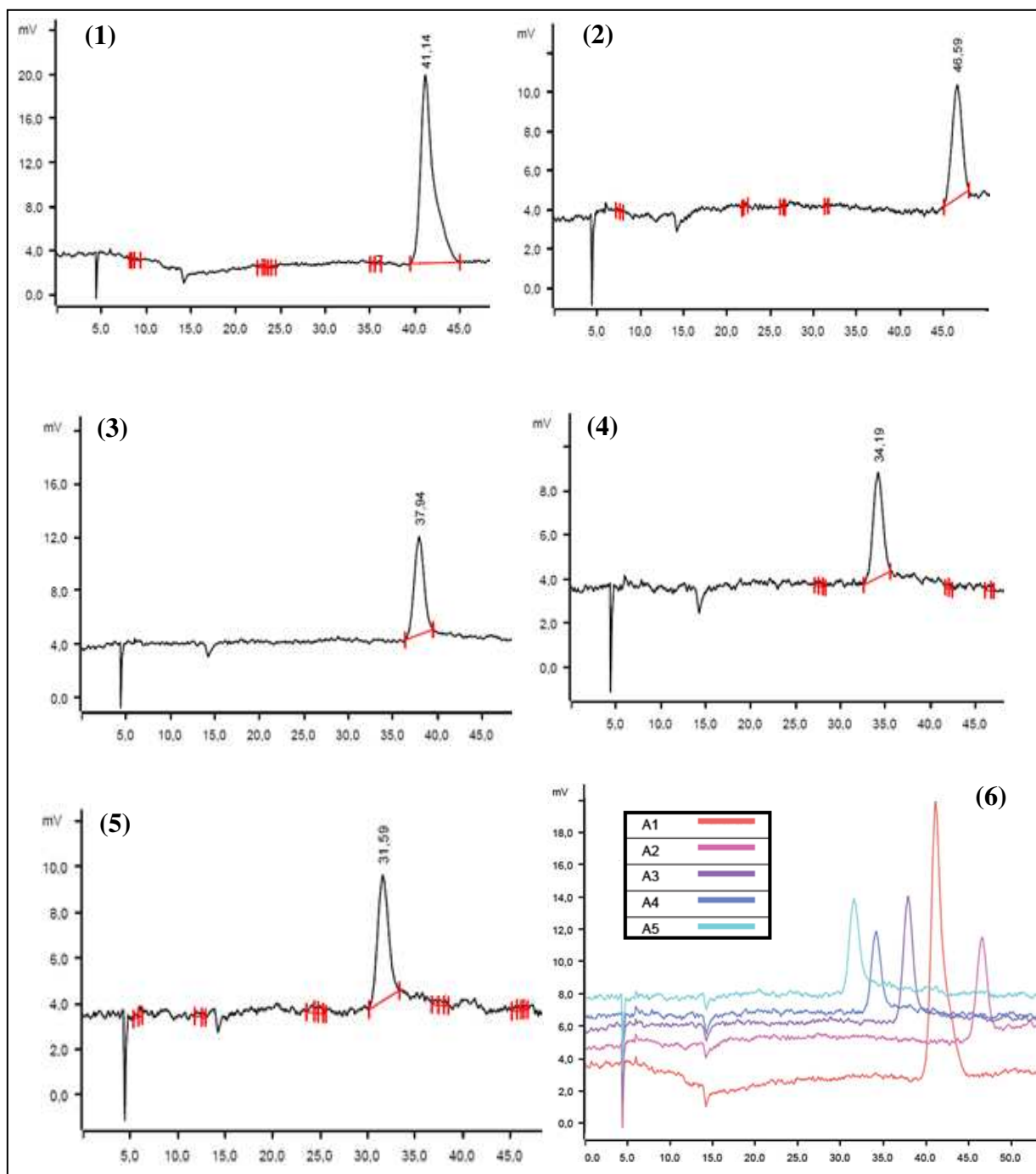


Figura 34: Padrões de oligossacarídeos acetilados. (1) N-acetil-D-glicosamina, (2) Di-N-acetilquitobiose, (3) Tri-N-acetilquitotriose, (4) Tetra-N-acetilquitotetraose, (5) Penta-N-acetilquitopentaose (6) Sobreposição dos cromatogramas.

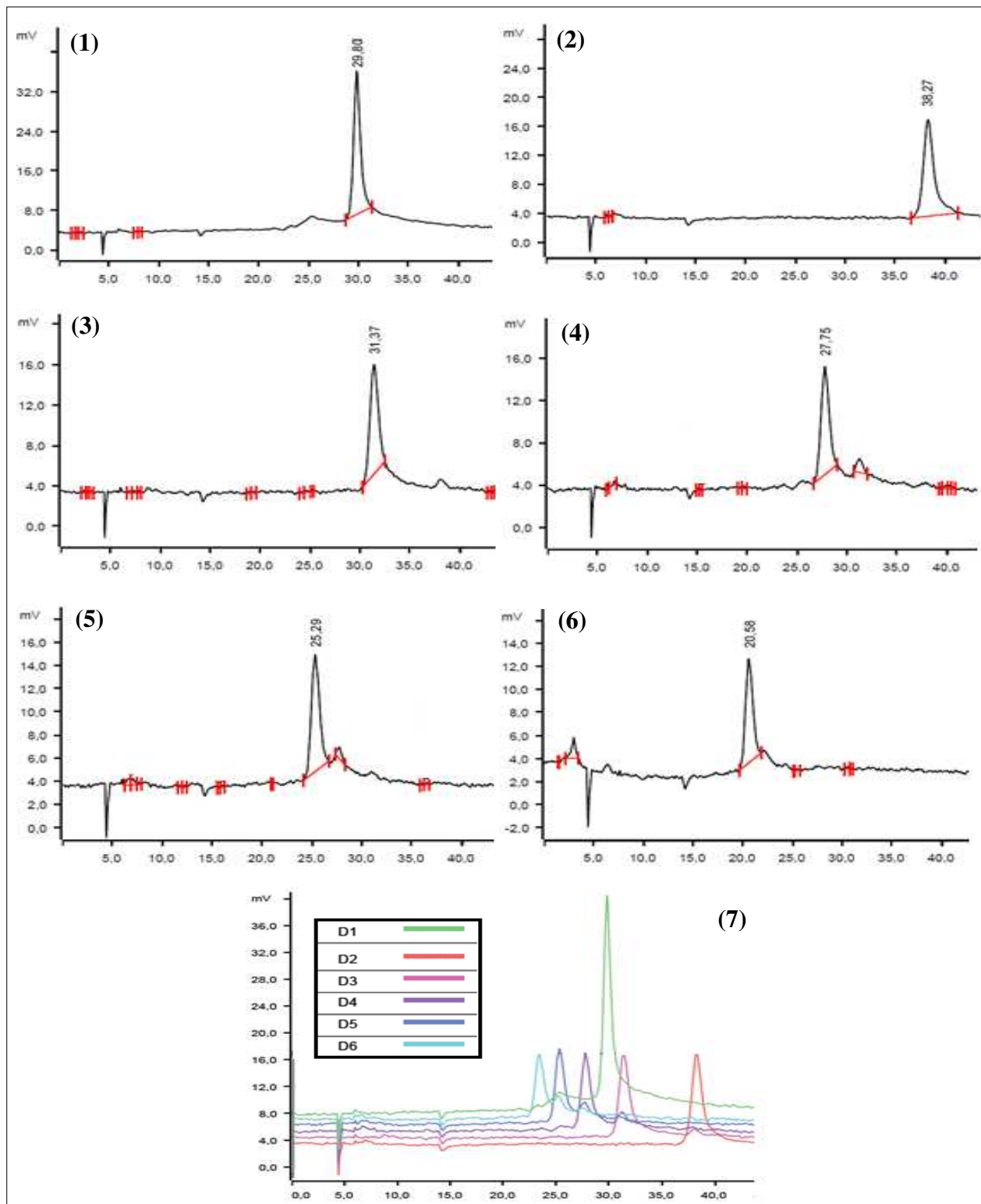


Figura 35: Padrões de oligossacarídeos desacetilados. (1) D-glicosamina, (2) Quitobiose, (3) Quitotriose, (4) Quitotetraose, (5) Quitopentaose, (6) Quitoheptose, (7) Sobreposição dos cromatogramas.

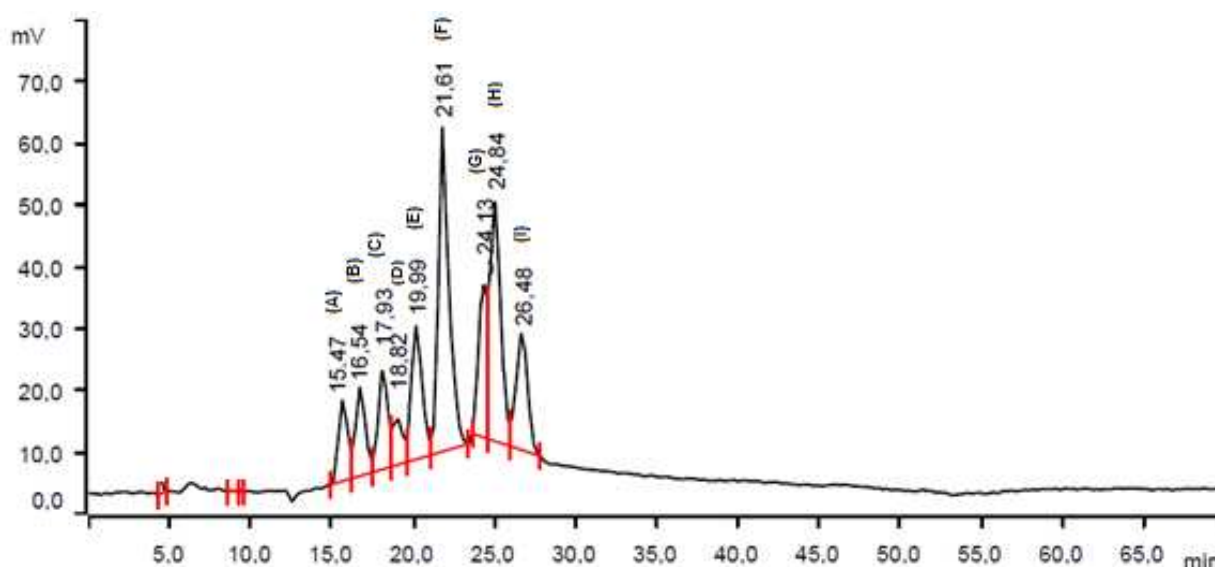


Figura 36: Cromatograma da mistura composta por padrões acetilados (DP 1 a 5) e desacetilados (DP 1 a 6).

Quitosanas com diferentes frações molares de N-acetilglicosamina (F_A) foram hidrolisadas enzimaticamente por extrato enzimático de *Trichoderma polysporum* e a composição dos AGO's foi inicialmente caracterizada por nanoESI-TOF-MS. AGO's heterogêneos com DP entre 2 e 7 foram identificados. Em seguida trabalhamos na padronização de uma metodologia, elaboração da curva de calibração e posterior aplicação dos AGO's produzidos no HPLC-PAD para comparar com os resultados previamente obtidos no ESI-TOF-MS.

Os AGO's utilizados para estudos biológicos são geralmente preparados por hidrólise enzimática da quitosana, produzindo claramente misturas complexas de oligômeros. Estes oligômeros diferem em seu grau de polimerização (DP; número de unidades de monômero), bem como na fração molar de resíduos A (isto é, homólogos) e nas seqüências de resíduos D e A (isto é, isômeros) (CEDERKVIST *et al.*, 2006).

Uma das técnicas mais utilizadas para separação, identificação e quantificação de oligômeros não acetilados é a cromatografia líquida de alta eficiência (HERNALSTEENS & MAUGERI, 2010; JARDIM *et al.*, 2006). Cromatografia líquida com detecção

amperométrica pulsada (HPLC-PAD) pode fornecer determinações eficientes e precisas de concentrações de carboidratos (ROCKLIN & POHL, 1983) como, por exemplo, a separação de monômeros de açúcares aminados e monômeros de açúcares neutros (CHENG & KAPLAN, 2003) e análise de frutooligossacarídeos (HERNALSTEENS & MAUGERI, 2010). KROKEIDE *et al.* (2007), detectaram concentrações de produtos resultantes da hidrólise do substrato tetra-N-acetilquitotetraose (GlcNAc)₄ utilizando HPLC com detecção espectrofotométrica a 210 nm e, recentemente, FU *et al.* (2010) estudaram a purificação de oligossacarídeos acetilados por cromatografia líquida de interação hidrofóbica onde as frações coletadas foram analisadas por uma coluna analítica com “click” de maltose desenvolvida pelos mesmos e a espectrometria de massa foi utilizada para confirmar as massas molares do oligômeros com DP variando de 5 a 20. Até o presente momento não há metodologia experimental que quantifique amino-oligossacarídeos acetilados e desacetilados concomitantemente. A metodologia desenvolvida permitiu a visualização de 9 picos dentre os 11 padrões contidos na mistura de oligossacarídeos acetilados e desacetilados, entretanto foi observado que quando é feita a mistura dos padrões os tempos de retenção dos picos não coincidem com os tempos obtidos quando as mesmas são injetadas separadamente. A distribuição aleatória dos picos ainda não nos permite classificar qual o tipo de interação ocorrida entre as amostras, a coluna e sua fase móvel. Uma hipótese seria de que a carga dos padrões desacetilados interfira na determinação da análise, pois grande parte dos estudos da literatura utilizam AGO's acetilados (XIONG *et al.*, 2009; DE ASSIS *et al.*, 2010; FU *et al.*, 2010), entretanto a aleatoriedade no comportamento das amostras também foi visualizado nos padrões acetilados. Estudos mais aprofundados sobre a técnica e a interação dos reagentes e materiais envolvidos no procedimentos estão sendo realizados para entendimento do comportamento encontrado e posterior submissão de um artigo no assunto.

O HPLC-PAD é uma boa ferramenta para analisar padrões de AGO's e determinar as frações relativas de cada aminoforma individual. No entanto, como padrões comerciais de AGO's com uma grande variedade de DP e F_A não estão disponíveis comercialmente, é difícil determinar e quantificar uma mistura ampla de AGO's, quando surgem novos picos. A combinação com a metodologia de espectrometria de massa (MS) é uma ferramenta

valiosa para fornecer informações estruturais diretas sobre a população de AGO's. Não é possível uma integração direta da cromatografia com o MS, pois a alta concentração de sal da fase móvel interfere com a identificação da amostra e sensibilidade geral. Idealmente, MS tais como a nanoESI-Q-Tof-MS/MS, poderia ser utilizada para identificar picos de interesse do IC-PAD, após a coleta e dessalinização das frações. Uma forma de analisar diretamente a fase móvel do IC-PAD por MS seria com o uso de um dispositivo de dessalinização por membrana da linha, eliminando a necessidade da coleta de frações e dessalinização da amostra, como por exemplo, um HPLC em fase reversa acoplado a um espectrômetro de massa (ADAMO *et al.*, 2009).

A otimização realizada no trabalho para a produção dos hetero-AGO's a partir de hidrólise enzimática possibilita a obtenção de uma grande quantidade de AGO's. Os espectrogramas do AGO's produzidos (Figuras 31, 32 e 33) apresentam amostras com elevado grau de purificação, isentas de interferentes. Sugere-se, para trabalhos futuros, a separação desses AGO's por cromatografia de permeação em gel (GPC), aplicação das frações em HPLC-PAD e caracterização em MS. Esse procedimento possibilitaria a obtenção de padrões de hetero-AGO's que, por não existirem até o presente momento, limitam as pesquisas envolvendo amino-oligosacarídeos heterogêneos.

4.11 Aplicação do AGO's produzidos

4.11.1 Atividade Antimicrobiana

OLIVEIRA JR *et al.* (2008) estudaram os efeitos de quitoligosacarídeos parcialmente acetilados no crescimento de fungos patogênicos onde a taxa de crescimento de *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* por uma mistura de oligossacarídeos de DP2–DP10 foi inibida.

A repetição de um estudo semelhante em nosso laboratório seria repetitiva e de pouco interesse para a pesquisa, assim, foi dada maior ênfase na abordagem da bioatividade dos oligossacarídeos em células vegetais, cujos resultados apresentados no item seguinte sugerem algo inédito e de bastante agregação de valor. Entretanto, alguns testes de

atividade microbiana foram realizados investigando os efeitos dos oligossacarídeos sobre *Pseudomonas syringae*. As Figuras 37, 38 e 39 representam os resultados de atividade microbiana dos oligossacarídeos de quitosana comercial (F_A 0,15), quitosana F_A 0,27 e quitosana F_A 0,56 aplicados em diferentes concentrações nas células bacterianas após 1 semana de incubação.

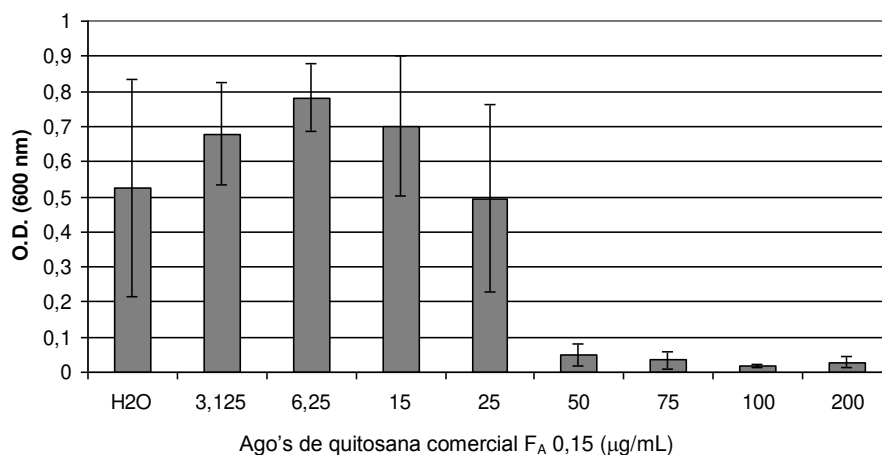


Figura 37: Atividade antimicrobiana em *Pseudomonas syringa* dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana comercial F_A 0,15, utilizando o extrato enzimático de FES (S5). A leitura foi realizada após 1 semana de incubação.

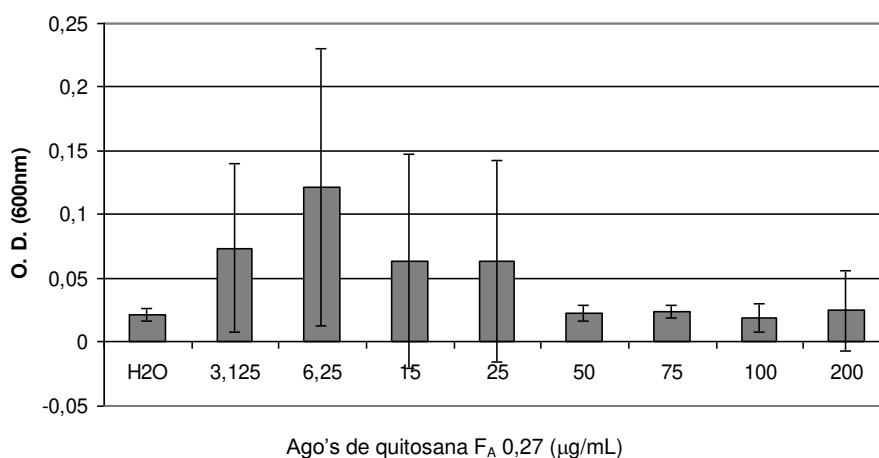


Figura 38: Atividade antimicrobiana em *Pseudomonas syringa* dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana F_A 0,27, utilizando o extrato enzimático de FES (S5). A leitura foi realizada após 1 semana de incubação.

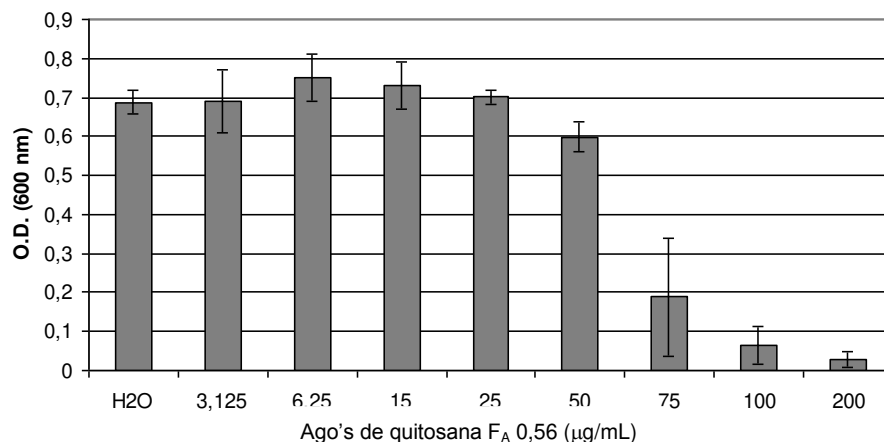


Figura 39: Atividade antimicrobiana em *Pseudomonas syringa* dos oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana F_A 0,56, utilizando o extrato enzimático de FES (S5). A leitura foi realizada após 1 semana de incubação.

A metodologia descreve que as leituras devem ser feitas a cada hora por um período de 18 horas. Entretanto após 18 horas não houve qualquer crescimento bacteriano, incluindo os controles positivos, observado pelas leituras de absorbância extremamente baixas. Após as 18h o sistema foi estocado e uma nova leitura foi realizada após 1 semana. Os resultados conduzem a suposição de que concentrações acima de 50 µg/mL de AOG's induzem a atividade antimicrobiana em células bacterianas de *Pseudomonas syringae*. Estudos de atividade antimicrobiana realizados em fungos mostraram que os efeitos de AGO's na taxa de crescimento de *A. alternata*, *B. cinerea*, *P. expansum* e *R. stolonifer* foram dependentes principalmente, das diferentes concentrações dos oligômeros no meio de cultura e, em diversos casos, da média de DP dos AGO's (OLIVEIRA JR *et al.*, 2008). A taxa de crescimento de *A. alternata*, por exemplo, foi inicialmente inibida por AGO's com DP acima de 7, seguido por uma estimulação no crescimento após a degradação dos AGO's em fragmentos menores quando a concentração de AGO's variava de 200 a 1000 µg/mL (OLIVEIRA JR. *et al.*, 2008). A atividade antimicrobiana em células bacterianas de *P. syringae* mostra maior eficácia no tratamento com AGO's, entretanto os resultados não podem ser considerados conclusivos devido ao elevado desvio-padrão apresentados em algumas análises.

4.11.2 Bioatividade em Células Vegetais

Após a avaliação dos hidrolisados em CCD e MS, os hidrolisados dissolvidos em água foram aplicados nas células vegetais para avaliar a capacidade dos produtos em induzir a liberação de H_2O_2 na célula vegetal. Quitosana com F_A 0,08 foi utilizada como elicitor geral para controle positivo dos experimentos. As células vegetais de amora (Figura 40), quando tratadas com os AGO's de quitosana, sofreram uma alteração na concentração de peróxido de hidrogênio, em comparação ao elicitor utilizado (Quitosana F_A 0,08), mais elevada do que os resultados para as células de arroz (Figura 41). A concentração de peróxido de hidrogênio foi monitorada por quimiluminescência. Os dados apresentados são representantes de três experimentos independentes com resultados similares.

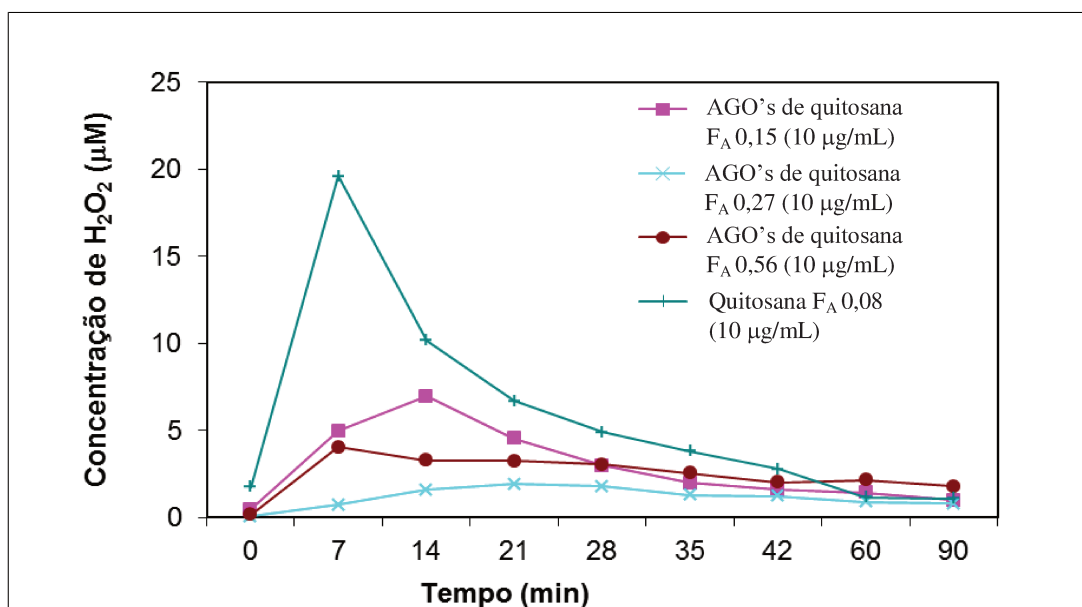


Figura 40: Reação de explosão oxidativa de suspensão de células de amora induzidas por 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AGO's e quitosana F_A 0,08.

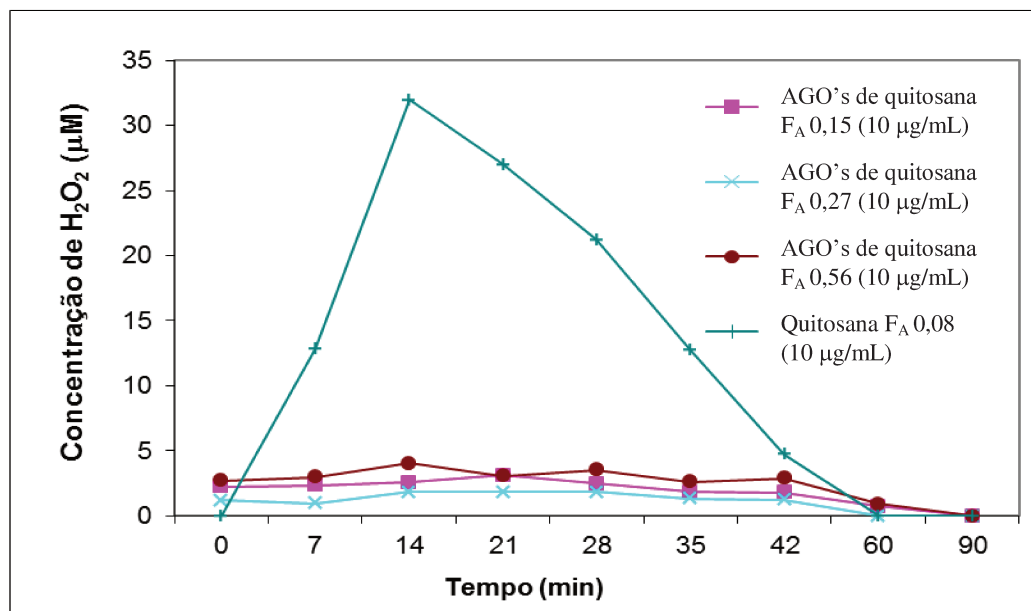


Figura 41: Reação de explosão oxidativa de suspensão de células de arroz induzidas por 10 µg/mL de AGO's e quitosana F_A 0,08.

A produção de H_2O_2 alcançou o valor máximo entre 7 e 14 min de reação, decrescendo e retornando ao nível inicial depois de 1 hora.

Por apresentarem menor efeito de indução à explosão oxidativa em células de arroz, e dada à maior significância das mesmas em termos de pesquisa, as mesmas foram escolhidas para dar continuidade aos experimentos. Portanto, foi testado se os oligossacarídeos produzidos eram capazes de potencializar a indução elicitora da explosão oxidativa. Para esta reação, as células de arroz foram pré-tratadas com 50 µg/mL de oligossacarídeos (AGO's) por um período de 3 horas. Depois do tempo de pré-incubação, as células foram tratadas com 1 µg/mL de quitina ou quitosana F_A 0,08, em baixas concentrações para que fosse observado, caso ocorresse, o efeito potencializador dos oligossacarídeos. A explosão oxidativa, após a adição do elicitor, nas células pré-tratadas com os AGO's de quitosana foi notavelmente mais elevada que nas células não tratadas. A produção de peróxido de hidrogênio iniciou após 6 minutos de adição do elicitor atingindo níveis máximos em 36 minutos (Figura 42). Os oligossacarídeos apresentaram ação potencializadora para a atividade elicitora de quitosana, mas não apresentaram os mesmos resultados para a elicitação com quitina.

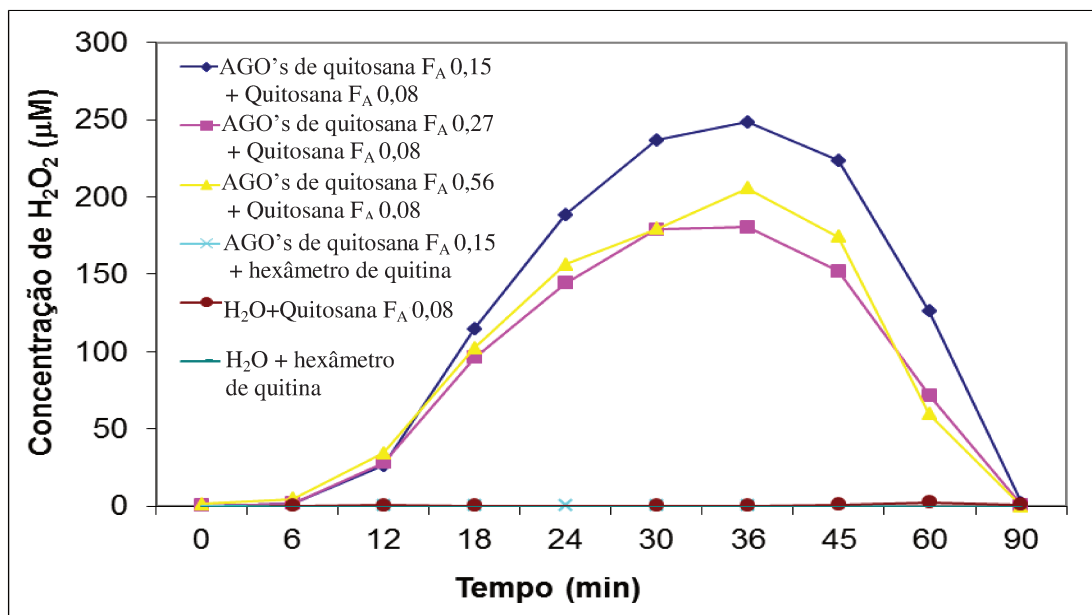


Figura 42: Efeito potencializador da explosão oxidativa de quitosana F_A 0,08 (1 $\mu\text{g/mL}$) e de quitina (1 $\mu\text{g/mL}$) depois do pré-tratamento por 3 horas com os oligossacarídeos (50 $\mu\text{g/mL}$) produzidos por hidrólise de quitosana comercial (F_A 0,15), quitosana F_A 0,27 e quitosana F_A 0,56, utilizando o extrato enzimático de FES (S5).

Após o conhecimento da atividade dos oligossacarídeos formados em potencializar a explosão oxidativa, um novo experimento foi realizado para análise da quantidade mínima de oligossacarídeos responsável pela potencialização da explosão oxidativa, bem como investigar a existência de nível de saturação para o tratamento das células vegetais com os oligômeros. As Figuras 43, 44 e 45 apresentam os resultados das células pré-tratadas com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de oligossacarídeos hidrolisados de quitosana comercial, quitosana F_A 0,27 e quitosana F_A 0,56, respectivamente, pelo extrato enzimático do fermentado da casca de camarão. As células de arroz foram pré-tratadas por um período de 3 horas. Depois do tempo de pré-incubação, as células foram tratadas com quitosana F_A 0,08 (1 $\mu\text{g/mL}$) e a concentração de H_2O_2 foi determinada.

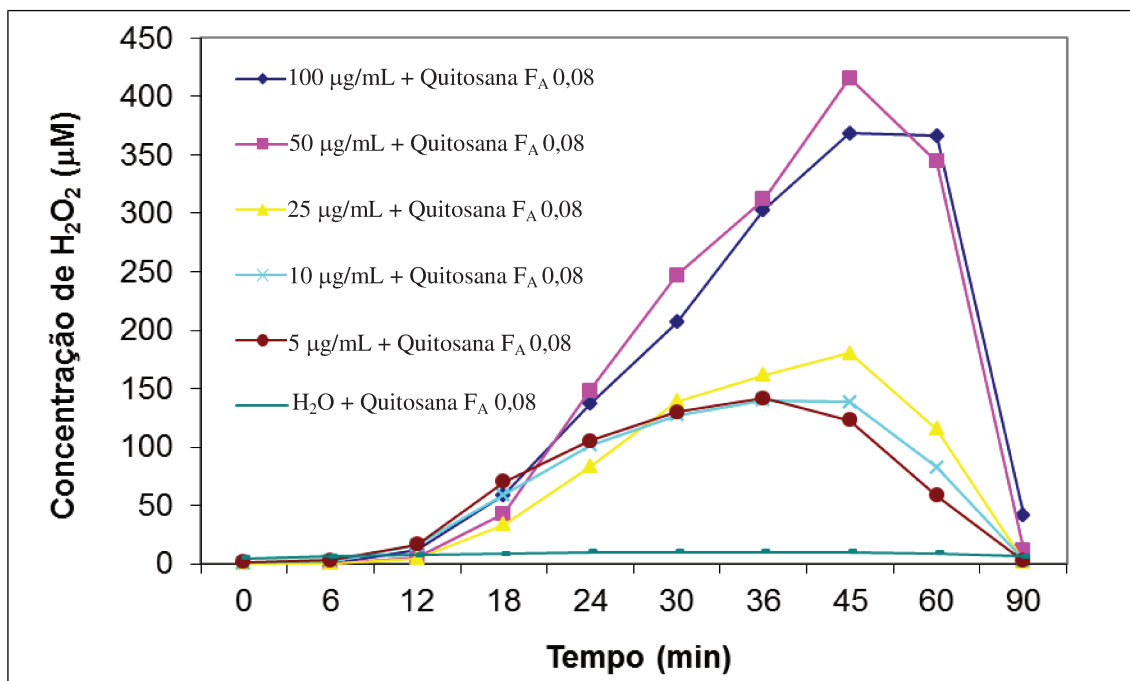


Figura 43: Curva dose-resposta do efeito potencializador da explosão oxidativa de quitosana F_A 0,08 (1 $\mu\text{g/mL}$) depois do pré-tratamento por 3 horas com os oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana comercial F_A 0,15 (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), utilizando o extrato enzimático de FES (S5).

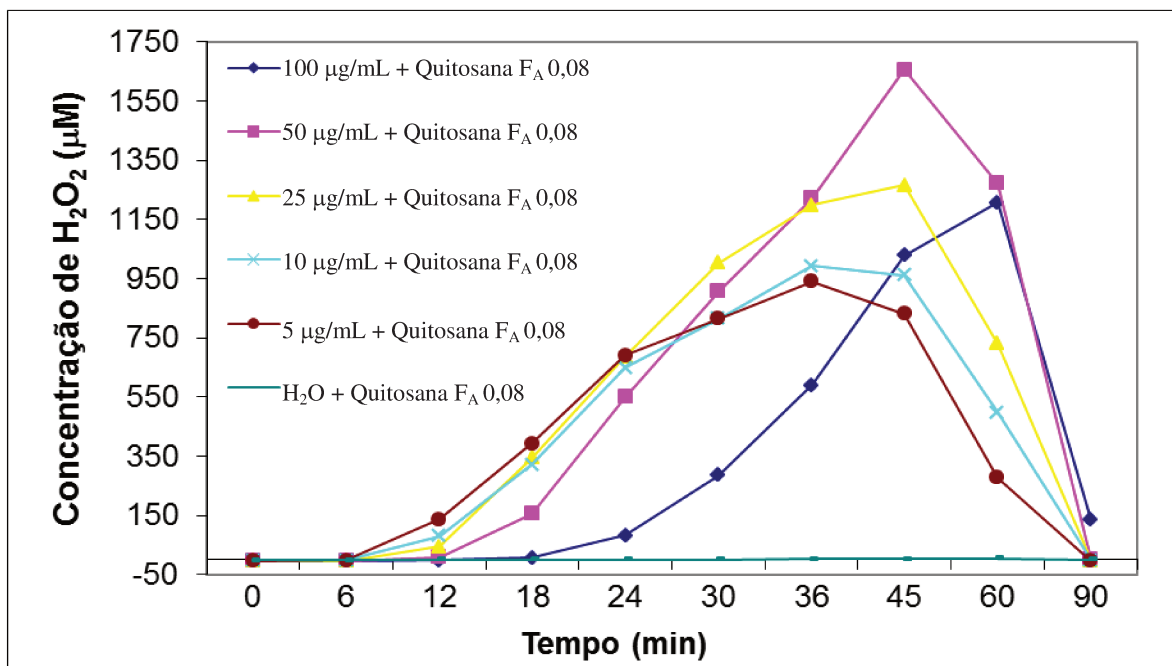


Figura 44: Curva dose-resposta do efeito potencializador da explosão oxidativa de quitosana F_A 0,08 (1 $\mu\text{g/mL}$) depois do pré-tratamento por 3 horas com os oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana F_A 0,27 (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), utilizando o extrato enzimático de FES (S5).

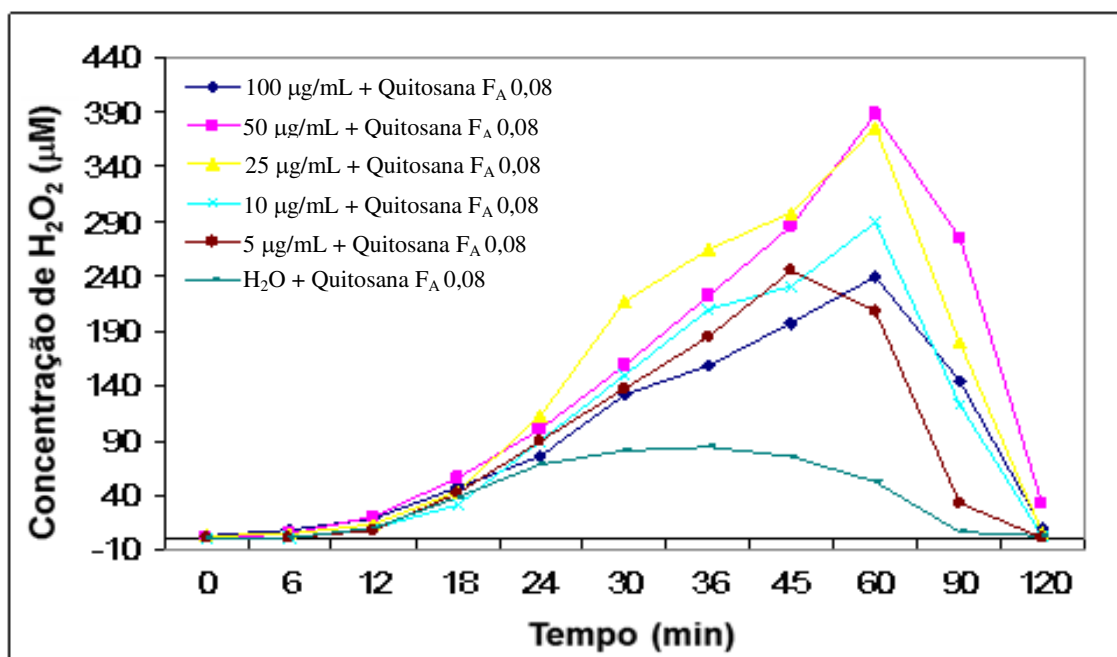


Figura 45: Curva dose-resposta do efeito potencializador da explosão oxidativa de quitosana F_A 0,08 (1 µg/mL) depois do pré-tratamento por 3 horas com os oligossacarídeos produzidos por hidrólise de quitosana F_A 0,56 (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), utilizando o extrato enzimático de FES (S5).

O pré-tratamento com pequenas doses (5 µg/mL) de oligossacarídeos foi suficiente para a liberação de peróxido de hidrogênio após 12 minutos da adição do elicitor. O máximo foi alcançado em 45 minutos para os oligossacarídeos formados a partir de quitosana comercial e quitosana F_A 0,27 e em 60 minutos para quitosana F_A 0,56. Doses de 50 µg foram responsáveis pelos maiores valores de concentração de peróxido de hidrogênio enquanto doses mais elevadas (100 µg/mL) ocasionaram um declínio nos valores de produção de peróxido de hidrogênio. Para os AGO's de quitosana comercial e F_A 0,27 não houve diferenças significativas entre as concentrações 5, 10, 25 e 100 µg/mL, e para os AGO's F_A 0,56 não houve diferenças significativas entre as concentrações 5, 10 e 100 µg/mL, entretanto a concentração de 25 µg/mL obteve o mesmo comportamento para a liberação de peróxido de hidrogênio que a concentração de 50 µg/mL, sugerindo que pequenas concentrações de oligossacarídeos já são suficientes para a produção de peróxido de hidrogênio pelas células de arroz e concentrações muito elevadas reduzem a potencialização da atividade elicitora de quitosana F_A 0,08.

Existem evidências de que H_2O_2 está envolvido em diversos mecanismos de resistência da planta, atuando no reforço da parede celular, pela ligação cruzada de proteínas estruturais ou fenólicos, formando uma barreira mecânica efetiva (IRITI & FAORO, 2009). O peróxido de hidrogênio no apoplasto da célula hospedeira pode agir diretamente como um agente antimicrobiano (DOS SANTOS *et al.*, 2008). H_2O_2 pode matar bactérias patogênicas diretamente e conter a sua propagação e formação de poros, como também a produção de H_2O_2 pode reforçar a parede celular da planta por indução de proteínas associadas *cross-linking*. H_2O_2 também pode atuar como um mensageiro para induzir ou aumentar a transcrição de genes relacionados com o sistema imunológico da planta (LIN *et al.*, 2005). LEE *et al.* (1999) observaram que células guarda em folhas de plantas, produzem H_2O_2 , composto mediador do estímulo promovido pela quitosana que induz a redução das aberturas estomatais.

Vários métodos já foram empregados para monitorar espécies ativas de oxigênio em tecidos vegetais. Análises quantitativas da explosão oxidativa podem ser melhor alcançadas em cultura de células vegetais em suspensão tratadas com um elicitor definido como oligômeros de quitina, por exemplo (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Mesmo que as culturas de células vegetais representem sistemas de complexidade reduzida comparado com plantas intactas, elas provaram ser modelos muito atrativos na análise de compostos isolados por sua capacidade de interagir com o sistema de defesa da planta em um nível molecular (ALBUS *et al.*, 2001).

A explosão oxidativa determinada por H_2O_2 -quimiluminescência luminol-dependente, utilizando um luminômetro, avaliou a atividade elicitora e potencializadora (*primed*) de um polissacarídeo natural de algas (PAULERT *et al.*, 2010). O polissacarídeo não apresentou atividade elicitora nas células de plantas, entretanto, células de trigo e arroz pré-tratadas com o polissacarídeo aumentou a atividade elicitora de hexâmero de quitina e polímeros de quitosana por explosão oxidativa, sendo o condicionamento mais expressivo em células de arroz onde a explosão oxidativa provocada pelos elicitores aumentou em 150 vezes para a quitina e 80 vezes para quitosana. Testes realizados em plantas intactas pelos autores relacionam a diminuição de sintomas de doenças nas plantas infectadas devido à

atividade de condicionamento (*priming*) do polissacarídeo de alga verde na explosão oxidativa (PAULERT *et al.*, 2010).

A detecção de depósitos de H_2O_2 com 3-3'-diaminobenzidina (DAB), após 24h de tratamento de folhas de *Phaseolus vulgaris* com quitosana 6 kD, indicou que as lesões sofridas na folha são constituídas por necrose celular como consequência da extensa deposição de H_2O_2 . Ao mesmo tempo, folhas tratadas com quitosana 76 kD mostraram uma moderada deposição limitada às mesmas células mesófilas envolvidas na formação de calos, e frequentemente localizada ao redor da cavidade subestomática em que a quitosana pode permear (IRITI & FAORO, 2009).

Observações em plantas intactas tratadas com quitosana demonstraram que a supressão da produção de H_2O_2 por catalisadores bloqueou as respostas de defesas contra a infecção patógena (LIN *et al.*, 2005). Os autores mostraram que a supressão da produção de H_2O_2 por catalisadores inibe a transcrição de genes relacionados com a defesa diminuindo a atividade de enzimas relacionadas com a defesa e também que a aplicação direta de H_2O_2 pode provocar acúmulo de proteínas relacionadas com a patogênese, apontando o H_2O_2 para um papel de segundo mensageiro seguinte a sua indução por quitosana. Observações em plantas intactas demonstraram que a remoção de H_2O_2 por catalisadores em plantas tratadas com quitosana teve o efeito de redução da inibição da infecção patógena comparado com controles.

Produção de H_2O_2 intracelular em células de tabaco, tratadas com oligômeros de quitosana e catalase, foi medida utilizando 2', 7'diacetato diclorofluorescente (DCFH-DA) como sonda, seguida pela observação sob um microscópio de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 480 nm (WANG *et al.*, 2008). A fração extracelular de H_2O_2 foi determinada a partir de uma alíquota do sobrenadante da cultura celular, pela formação de um complexo Fe^{3+} -laranja de xilenol a 560 nm de absorbância. Nesse estudo, porém, os resultados sugeriram que a morte celular por apoptose de células de tabaco induzida por oligômeros de quitosana é independente do caminho sinalizado pelo H_2O_2 (WANG *et al.*, 2008).

Sobre a bioatividade dos AGO's, recentemente foi encontrado que a aplicação de oligômeros de quitosana produzidos por hidrólise química induz a explosão oxidativa em

Araucaria angustifolia e esta atividade elicitora aumentou com o maior F_A (DOS SANTOS *et al.*, 2008). AGO's de quitina (DP2, DP3, DP4, DP5 e DP7) foram investigados por seus efeitos em células epiteliais e tecidos (DETERS *et al.*, 2008).

O efeito de AGO's na sobrevivência de células de tabaco foram investigados por Wang *et al* (2008) onde os resultados mostraram que cerca de 40% das células de tabaco morreram quando cultivados por 72h após tratamento com 500 $\mu\text{g/mL}$ de oligômeros de quitosana. Os oligômeros também induziram o acúmulo de H_2O_2 em cultura de suspensão de células de tabaco. Quitosana e oligômeros de quitina são reconhecidos como elicitores por muitas plantas como alfafa, tabaco, trigo e arroz (BAIER *et al.*, 1999; ORTMANN *et al.*, 2006), provavelmente devido à elevada afinidade do sítio de ligação para fragmentos de quitina na superfície da membrana (BAUREITHEL *et al.*, 1994). A literatura descreve que polímeros de quitosana podem atuar por interagirem com a membrana de plantas físico-quimicamente como resultado das suas fortes cargas positivas (KAUSS *et al.*, 1989). É possível que baixas concentrações de quitosana não incorreram em mudança física em plantas de feijão, ativando mecanismos “*priming*” em vez da ativação direta de reações de defesa antimicrobiana ao contrário da indução de resistência direta (IRITI *et al.*, 2010). (VAN HULTEN *et al.*, 2006; GOELLNER & CONRATH, 2008). PAULERT *et al.* (2010) obtiveram a potencialização da atividade elicitora de quitosana F_A 0,8 em células de arroz, utilizando elevadas concentrações (200 $\mu\text{g/mL}$) de ulvan, um heteropolissacarídeo sulfatado de macroalgas verdes. A aplicação direta de exopolissacarídeo (EPS), isolado de *Pantoea agglomerans*, em suspensão de cultura de células de arroz e trigo não induziu a explosão oxidativa, mas o pré-tratamento das células com EPS por algumas horas potencializou a indução da explosão oxidativa do elicitor de quitina (ORTMANN & MOERSCHBACHER, 2006; ORTMANN *et al.*, 2006).

Os AGO's produzidos a partir de quitosana prepararam as células (atividade “*priming*”) para um melhor reconhecimento dos elicitores de quitosana, ou seja, as células pré-tratadas com os AGO's produzidos e em seguida incubados com quitosana de baixa massa molar como elicitor apresentou maior atividade que as células controle estimulada somente pelo elicitor, o que sugere um efeito *priming*, induzindo a resistência das células

das plantas sem a necessidade de morte celular, ao contrário dos resultados supracitados onde os AGO's de quitosana atuaram somente como elicitores.

É sabido que oligômeros de quitina atuam como elicitores em muitas plantas (DENOUX *et al.*, 2008), provavelmente as mesmas têm evoluído um mecanismo de reconhecimento desses oligômeros como um meio de detectar a presença de patógenos e pragas de insetos, que contém quitina como um dos principais componentes da parede celular.

Como consequência, alguns fungos evoluíram produzindo quitina desacetilase (CDA). Quitina desacetilase (CDA) cataliza a conversão de quitina em quitosana pela desacetilação de resíduos de N-acetil-D-glicosamine (LIU E HE, 2011). Com isso os fungos alteram suas propriedades superficiais, expondo quitosana parcialmente acetilada em vez de quitina para as plantas. Desta forma, eles escapam da maquinaria de detecção e podem ser protegido contra a ação nociva das quitinases das plantas, atacando e enfraquecendo suas paredes celulares. No entanto, algumas plantas podem ter desenvolvido um mecanismo de reconhecimento de quitosanas parcialmente acetilada, para que nessas plantas, a quitosana também atue como um elicitor. A hipótese aqui apresentada é que alguns oligômeros de quitosana, com um determinado grau de acetilação ou talvez um padrão específico de acetilação, são requeridos para serem reconhecidos pelas células de plantas como elicitores. Talvez seja necessário ter um alto grau de acetilação, para que possam se ligar aos receptores de oligômeros de quitina. Se o grau ou padrão de acetilação corresponde ao necessário, os oligômeros de quitosana podem atuar como oligômeros elicitores. Porém se o grau ou o padrão de acetilação não for exatamente o correto as células da planta ainda podem reconhecer os oligômeros, mas como este não é o sinal correto para revelar a presença de um patógeno, a célula pode "decidir" não ativar ainda a resposta de defesa completa (como acontece com o reconhecimento de um elicitor), mas apenas preparar suas defesas (ou seja, a atividade "*priming*") de modo que, no caso da vinda de um real elicitor, a célula vegetal pode, então, reagir com rapidez e eficiência.

Não há até o presente momento nenhum trabalho publicado onde oligossacarídeos produzidos a partir da hidrólise enzimática de quitosana atuaram na potencialização da explosão oxidativa em células monocotiledôneas (efeito "*priming*"). Os resultados aqui

apresentados podem ajuda a elucidar os mecanismos de defesa envolvendo padrões de acetilação de quitosana e seus oligômeros além de fortalecer a hipótese apresentada.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

O fungo *Trichoderma polysporum* foi capaz de produzir enzimas quitinolíticas em FES e FS a partir de quitosana e resíduos de casca de camarão. O extrato enzimático da FES apresenta quatro principais proteínas de forte expressão (100 kD, 60 kD, 26 kD e entre o marcador 15 e 20kD), no entanto foram observados somente duas bandas por focalização isoeletrica, uma com pI igual a 3, e outra com pI em torno de 7,5. A presença de enzimas com pIs tão distintos e diferentes MM provavelmente permitem a purificação das enzimas de maneira menos dispendiosa. O extrato enzimático apresentou atividade enzimática mais eficiente para o substrato *p*-NP-GlcNAc, indicando a presença de β -N-acetilglicosaminidase e quitobiosidase.

Quitosanas com baixo F_A quando hidrolisadas pelas enzimas de *T. polysporum* por FES produziram AGO's maiores, indicando uma possível presença de maior atividade quitinolítica do que quitosanolítica do extrato.

Os estudos de aplicação dos AGO's indicam que os oligômeros produzidos por FES a partir da casca do camarão tem atividade antimicrobiana em *Pseudomonas syringae* em concentrações acima de 50 μ g/mL. Os AGO's também potencializaram a explosão oxidativa (Atividade “*priming*”), em células de arroz, utilizando quitosana como elicitor, mas não apresentaram os mesmo resultados para a elicitação com hexâmero de quitina. Concentrações de 50 μ g/mL ocasionaram máxima potencialização da explosão oxidativa. A atividade “*priming*” para AGO's, de acordo com nossos conhecimentos, foi evidenciada

pela primeira vez e poderá elucidar mecanismos de defesa de plantas envolvendo quitosana e seus oligômeros.

A casca de camarão extraída de resíduo de produção em cativeiro favorece a produção de quito-enzimas por FES de *T. polysporum*. Estas podem ser utilizadas na forma bruta para obtenção de AGO's bioativos. A conexão das técnicas de quantificação e caracterização apresentadas na tese por meio da HPLC-PAD, MS e técnicas de separação nos direcionam a possibilidade de produção de padrões de hetero-AGO's devido ao elevado grau de pureza dos mesmos. Portanto, o bioprocessos para produção de AGO's (FES de farelo de trigo + casca de camarão, seguida pela extração aquosa das enzimas brutas e subsequente hidrólise de quitosanas pelo extrato) desenvolvido neste trabalho, pode custar substancialmente menos do que os processos convencionais que requerem inúmeras etapas, com obtenção de produtos do gênero.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Produção de enzimas quitinolíticas e quitosanolíticas

Purificação, separação e quantificação dos AGO's para entendimento dos mecanismos de ação direcionados a bioatividade dos mesmos.

Elaboração de ensaios de bioatividade *in vivo* utilizando plantas intactas.

Aprofundamento dos estudos da atividade antimicrobiana dos AGO's.

Estudar o mecanismo de resposta inflamatória em macrófagos humanos pelo AGO's produzidos.

Purificação, caracterização e clonagem das enzimas produzidas no extrato bruto.

Separação dos AGO's produzidos por cromatografia de permeação em gel (GPC), aplicação das frações em HPLC-PAD e caracterização em MS para obtenção de possíveis padrões de hetero-AGO's.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B.B., HEGGSET, E.B., NORBERG, A.L., SØRLIE, M., VÅRUM, K.M., EIJSINK, V.G.H. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine Drugs* 8 (5), 1482-1517, 2010.

ABD-AZIZ, S., SIN T.L., ALITHEEN N., SHAHAB N., KAMARUDDIN K. Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. *Journal of Biological Sciences* 8 (1), 52-59, 2008.

ABD-ELMOHDY, F.A., EL SAYED, Z., ESSAM, S., HEBEISH, A. Controlling chitosan molecular weight via bio-chitosan analysis. *Carbohydrate Polymers*, Article in Press, 2010.

ADACHI, W., SAKIHAMA, Y., SHIMIZU, S., SUNAMI, T., FUKAZAWA, T., SUZUKI, M., YATSUNAMI, R., NAKAMURA, S., TAKENAKA, A. Crystal structure of family GH-8 chitosanase with subclass II specificity from *Bacillus* sp. K17. *J. Mol. Biol.*, 343, 785–795, 2004.

ADAMO, M., QIU, D., DICK JR., L. W. ET AL. Evaluation of oligosaccharide methods for carbohydrate analysis in a fully human monoclonal antibody and comparison of the results to the monosaccharide composition determination by a novel calculation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 181–192, 2009.

AJILA, C.M., BRAR, S.K., VERMA, M., TYAGI, R.D., VALÉRO, J.R. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* - Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 126 (3), 1071-1080, 2011.

AKHIR, S.M., ABD-AZIZ, S., SALLEH, M.M., RAHMAN, R.A., ILLIAS, R.M., HASSAN, M.A. Medium optimisation of chitinase enzyme production from shrimp waste using *Bacillus licheniformis* TH-1 by response surface methods. *Biotechnology* 8 (1), 120-125, 2009.

AL AHMADI, K.J., YAZDI, M.T., NAJAFI, M.F., SHAHVERDI, A.R., FARAMARZI, M.A., ZARRINI, G., BEHRAVAN, J. Optimization of medium and cultivation conditions for chitinase production by the newly isolated: *Aeromonas* sp. *Biotechnology* 7 (2), 266-272, 2008.

ALBUS, U., BAIER, R., HOLST, O., PUHLER, A., NIEHAUS, K. Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytologist* 151 (3), 597-606, 2001.

ALLAN, G.G., PEYRON, M. Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate Research*, 277, 257-272, 1995.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. In: Official methods of analysis (16th edition). Washington, USA: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

ARAKANE, Y., MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67 (2), 201-216, 2010.

ARANAZ, I., MENGÍBAR, M., HARRIS, R., PAÑOS, I., MIRALLES, B., ACOSTA, N., GALED, G., HERAS, Á. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3 (2), 203-230, 2009.

ARCHER, D.B., WOOD, D.A. Fungal exoenzymes. In: Gow NAR, Gadd GM (eds) The growing fungus. Hapman & Hall 137-162, 1995.

ASRAN-AMAL, A., MOUSTAFA-MAHMOUD S.M., SABET K.K., EL BANNA O.H. In vitro antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17, 153-157, 2010.

AZIZ, A., GAUTHIER, A., BÉZIER, A. Elicitor and resistance inducing activities of b-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with b-1,3 glucans and a-1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1463-72, 2007.

BAIER, R., SCHIENE, K., KOHRING, B., FLASCHEL, E., NIEHAUS, K. Alfafa and tobacco cells react differently to chitin oligosaccharides and *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors. *Planta*, 210, 157-64, 1999.

BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56 (3), 290-299, 2010.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 2ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2002.

BARROS, F.C., SAGATA, E., DE CASTRO FERREIRA L.C., JULIATTI F.C. Induction of resistance in plants against phytopathogens. *Bioscience Journal*, 26 (2), 231-239, 2010.

BAUREITHEL, K., FELIX, G., BOLLER T. Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes: competitive inhibition of binding by derivatives of chitoooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 17931-17938, 1994.

BERGER, L.R., REYNOLDS, D.M. Colloidal chitin preparation. *Methods Enzymology*, 161, 140-142, 1988.

BHARGAV, S., PANDA, B.P., ALI, M., JAVED, S. Solid-state Fermentation: An Overview, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22 (1), 49–70, 2008.

BIESEBEKE, R.T., RECORD, E. Scientific advances with *Aspergillus* species that are used for food and biotech applications. *Microbes and Environments*, 23 (3), 177-181, 2008.

BINOD, P., PUSZTAHELYI, T., NAGY, V., SANDHYA, C., SZAKÁCS, G., PÓSCI, I., PANDEY, A. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 880–887, 2005.

BINOD, P., SANDHYA, C., SUMA, P., SZAKACS, G., PANDEY, A. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin. *Bioresource Technology*, 98, 2742–2748, 2007.

BRZEZINSKA, M.S., WALCZAK, M., LALKE-PORCZYK, E., DONDESKI, W. Utilization of Shrimp-Shell Waste as a Substrate for the Activity of Chitinases Produced by Microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19 (1), 177-182, 2010.

CANELA, K.M.N.C., GARCIA, R.B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Química Nova*, 44 (1), 13-17, 2001.

CANTAREL, B.L., COUTINHO, P.M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V., HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active enZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37, D233–D238, 2009.

CEDERKVIST, F. H., ZAMFIR, A. D., BAHRKE, S., EIJSINK, V.G.H., SØRLIE, M., PETER-KATALINIĆ, J., PETER, M.G.. Identification of a High-Affinity-Binding Oligosaccharide by (+) Nanoelectrospray Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry of a Noncovalent Enzyme–Ligand Complex. *Angewandte Chemie Internacional*, 45, 2429 –2434, 2006.

CHAUDHURY, A., DAS, S. Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents. *AAPS PharmSciTech*, 12 (1), 10-20, 2011.

CHEN, H.-Q., CHEN, X.-M., CHEN, T.-X., XU, X.-M., JIN, Z.-Y. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 86 (1), 249-254, 2011.

CHEN, Y.Y., CHENG, C.Y., HAUNG, T.L., LI, Y.K. A chitosanase from *Paecilomyces lilacinus* with binding affinity for specific chito-oligosaccharides. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 41, 145-150, 2005.

CHENG, C.Y., CHANG, C.H., WU, Y.J., LI, Y.K. Exploration of glycosyl hydrolase family 75, a chitosanase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 3137–3144, 2006.

CHENG, X., KAPLAN, L. A. Simultaneous Analyses of Neutral Carbohydrates and Amino Sugars in Freshwaters with HPLC–PAD. *Journal of Chromatographic Science*, 41, 434–438, 2003.

CHISHOLM, S.T., COAKER, G., DAY, B., STASKAWICZ, B.J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124 (4), 803-14, 2006.

CHOI, Y.J., KIM, E.J., PIAO, Z., YUN, Y.C., SHIN, Y.C. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4522–4531, 2004.

CONRATH, U., DOMARD, A., KAUSS, H. Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 8, 152–155, 1989.

CONRATH, U., PIETERSE, C.M.J., MAUCH-MANI, B. Priming in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 7, 210–6, 2002.

COUTO, S.R. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnology Journal*, 3, 859–870, 2008.

DAHIYA, N., TEWARI, R., TIWARI, R.P., HOONDAL, G.S. Chitinase production in solid-state fermentation by *Enterobacter* sp. NRG4 using statistical experimental design. *Current Microbiology*, 51, 222–228, 2005.

DAVIES, G.J., WILSON, K.S., HENRISSAT, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321 (2), 557-559, 1997.

DE ASSIS, C.F., ARAÚJO, N.K., PAGNONCELLI, M.G.B., PEDRINI, M.R.S., MACEDO, G.R., SANTOS, E.S. Chitoooligosaccharides enzymatic production by *Metarhizium anisopliae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(7), 893-899, 2010.

DE LA CRUZ, J., HIDALGO-GALLEGU, A., LORA, J.M., BENITEZ, T., PINTOR-TORO, J.A., LLOBEL, A. Isolation and characterization of 3 chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*, 206, 859–867, 1992.

DENNHART, N., FUKAMIZO, T., BRZEZINSKI, R., LACOMBE-HARVEY, M., LETZEL T. Oligosaccharide hydrolysis by chitosanase enzymes monitored by realtime electrospray ionization–mass spectrometry. *Journal of Biotechnology*, 134, 253–260, 2008.

DENOUX, C., GALLETTI, R., MAMMARELLA, N., GOPALAN, S., WERCK, D., DE LORENZO, G., FERRARI, S., AUSUBEL, F.M., DEWDNEY, J. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis seedlings*. *Molecular Plant* 1, 423–445, 2008.

DETERS, A., PETEREIT, F., SCHMIDGALL, J., HENSEL, A. N-Acetyl-D-glucosamine oligosaccharides induce mucin secretion from colonic tissue and induce differentiation of human keratinocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, 1–8, 2008.

DOMARD, A., RINAUDO, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5 (1), 49-52, 1983.

DOMARD. A. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 696-703, 2011.

DONZELLI, B.G.G., SIEBERT, K.J., HARMAN, G.E. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and beta-1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 82-92, 2005.

DOS SANTOS, A.L.W., EL GUEDDARI, N.E., TROMBOTTO, S., MOERSCHBACHER, B.M. Partially acetylated chitosan oligo- and polymers induce an oxidative burst in suspension cultured cells of the gymnosperm *Araucaria angustifolia*. *Biomacromolecules*, 9, 3411–5, 2008.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161:345–360, 2006.

EIJSINK, V.G., VAAJE-KOLSTAD, G., VÅRUM, K.M., HORN, S.J. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends Biotechnology*, 26, 228–235, 2008.

EINBU, A., VÅRUM, K.M. Depolymerization and de-N-acetylation of chitin oligomers in hydrochloric acid. *Biomacromolecules*, 8, 309–314, 2007.

ELWAKEEL, K.Z. Environmental application of chitosan resins for the treatment of water and wastewater: A review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31 (3), 273-288, 2010.

FAIZE, M., FAIZE, L., KOIKE, N., ISHIZAKA, M., ISHII, H. Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense responses. *Phytopathology*, 94, 604-612, 2004.

FELSE, P.A., PANDA, T. Production of microbial chitinases – A revisit. *Bioprocess Engineering*, 23, 127–134, 2000.

FERREIRA, A.H.P. *Purificação, caracterização, clonagem e sequenciamento de β -glicosidases de Tenebrio molitor (Coleoptera)*. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

FLORES, C., VIDAL, C., TREJO-HERNÁNDEZ, M.R., GALINDO, E., SERRANO-CARREÓN, L. Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 106 (1), 249-257, 2009.

FLORIDO, E.B., CAMILO, P.B., MAYORGA-REYES, L., CERVANTES, R.G., CRUZ, P.M., AZAOLA, A. β -N-acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium (verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciência*, 34, 5, 2009.

FU, Q., LIANG, T., ZHANG, X., DU, Y., GUO, Z., LIANG, X. Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a ‘click’ maltose column. *Carbohydrate Research*, 345, 2690–2697, 2010.

FUKAMIZO, T., HONDA, Y., GOTO, S., BOUCHER, I., BRZEZINSKI, R. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174. *Biochemical Journal*, 311, 377-383, 1995.

GARCIA-BRUGGER, A., LAMOTTE, O., VANDELLE, E., BOURQUE, S., LECOURIEUX, D., POINSSOT, B., WENDEHENNE, D., PUGIN, A. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 711-24, 2006.

GENTA, F.A. *Purificação e caracterização de β -1,3-glucanases de insetos*. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GOELLNER, K., CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 233–42, 2008.

GOELLNER, K., CONRATH, U. Priming: It's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 121 (3), 233-242, 2008.

GOHEL, V., SINGH, A., VIMAL, M., ASHWINI, P., CHHATPAR, H.S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 5(2), 54–72, 2006.

GOMES, W. *Camocim é sede para a aquicultura*. Diário do Nordeste, Ceará, Folha Regional, Litoral oeste, 25 de fevereiro de 2011.

GOOSEN, M.F.A. Applications of chitin and chitosan. *Technomic Publishing Company*, Pennsylvania, 1997.

GORTARI, M.C., HOURS, R.A. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. *Mycological Progress*, 7(4), 221-238, 2008.

GOTO, C.E., BARDOSA, E.P., KISTNER, L.C.L., MOREIRA, F.G., LENARTOVICS, V., PERALTA, R.M. Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing methylglycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 139-143, 1998.

GRIGOLON, L.B. *Modificação de quitina e quitosana por via enzimática*. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

GRIM, L.H., KELLY, S., KRULL, R., HEMPEL, D.C. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 375–384, 2005.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K., CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38, 1599-1616, 2003.

GUPTA, V., PRASANNA, R., NATARAJAN, C., SRIVASTAVA A.K., SHARMA J. Identification, Characterization, and Regulation of a Novel Antifungal Chitosanase Gene (cho) in *Anabaena* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (9), 2769-2777, 2010.

HADWIGER, L.A., BECKMAN, J.M. Chitosan as a component of pea *Fusarium solani* interactions. *Plant Physiology*, 66, 205–211, 1980.

HAI, L., DIEP, T.B., NAGASAWA, N., YOSHII, F., KUME, T. Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 208 (1-4), 466-470, 2003.

HARIGHI, M.J., ZAMANI, M.R., MOTALLEBI, M. Evalution of antifungal activity of purified chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. *Biotechnology*, 6 (1), 28-33, 2007.

HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43–56, 2004.

HEGGSET, E.B., DYBVIK, A.I., HOELL, I.A., NORBERG, A.L.; EIJSINK, V.G.H., SØRLIE, M., VÅRUM, K.M. Degradation of Chitosans with a novel family 46 Chitosanase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biomacromolecules*, 11, 2487-2497. 2010.

HEGGSET, E.B., HOELL, I.A., KRISTOFFERSEN, M., EIJSINK, V.G.H., VÅRUM K.M. Degradation of Chitosans with Chitinase G from *Streptomyces coelicolor* A3(2): Production of Chito-oligosaccharides and Insight into Subsite Specificities. *Biomacromolecules*, 10, 892–899, 2009.

HERNALSTEENS, S., MAUGERI, F. Partial Purification and Characterization of Extracellular Fructofuranosidase with Transfructosylating Activity from *Candida* sp. *Food Bioprocess Technol*, 3, 568–576, 2010.

HOELL, I.A., KLEMSDAL, S.S., VAAJE-KOLSTAD, G., HORN, S.J., EIJSINK, V.G.H. Overexpression and characterization of a novel chitinase from *Trichoderma atroviride* strain P1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1748, 180– 190, 2005.

HORN S.J., SØRBOTTEN A., SYNSTAD B., SIKORSKI P., SØRLIE M., VÅRUM K.M., EIJSINK V.G. Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS Journal*, 273, 491–503, 2006a.

HORN, S.J., SIKORSKI, P., CEDERKVIST, J.B., VAAJE-KOLSTAD, G., SØRLIE, M., SYNSTAD, B., VRIEND, G., VÅRUM, K.M., EIJSINK, V.G.H. Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 18089–18094, 2006b.

HSIAO, Y., LIN, Y., SU, C., CHIANG, B. High degree polymerized chitooligosaccharides synthesis by chitosanase in the bulk aqueous system and reversed micellar microreactors. *Process Biochemistry*, 43, 76–82, 2008.

IHRMARK, K., ASMAIL, N., UBHAYASEKERA, W., MELIN, P., STENLID, J., KARLSSON, M. Comparative molecular evolution of *Trichoderma* chitinases in response to mycoparasitic interactions. *Evolutionary Bioinformatics*, (6), 1-26, 2010.

IKEGAMI, T., OKADA, T., HASHIMOTO, M., SEINO, S., WATANABE, T., SHIRAKAWA, M. Solution Structure of the Chitin-binding Domain of *Bacillus circulans* WL-12 Chitinase A1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 13654-13661, 2000.

IRITI, M., FAORO, F. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant Signaling & Behavior*, 4 (1), 66-68; 2009.

IRITI, M., GIULIA, C., SARA, V., ILARIA, M., SOAVE, C., FICO, G., FAORO, F. Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. *Biological Control*, 54, 241–247, 2010.

IRITI, M., SIRONI, M., GOMARASCA, S., CASAZZA, A.P., SOAVE, C., FAORO, F. Cell death-mediated antiviral effect of chitosan in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 893–900, 2006.

JARDIM, I.C.S.F., COLLINS, C.H., GUIMARÃES, L.F.L. Princípios básicos de cromatografia. In Fundamentos de cromatografia (Collins, C. H., Braga, G. L. & Bonato, P. S. Ed.) pp. 273-397, Editora Unicamp, 2006.

JEON, Y.-J., PARK, P.-J., KIM, S.-K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44 (1), 71-76, 2001.

JIN-LAN, X., JING, X., TAO, X., CHENG-GUI, Z., RUI-YONG, Z., QIAN, Z., SHUN, W., GUAN-ZHOU, Q. Purification and characterization of extracellular chitinase from a novel strain *Aspergillus fumigatus* cs-01. *Journal of Central South University of Technology*, 16, 0552-0557, 2009.

JO, Y., JO, K., JIN Y., JUNG, W., KUK, J., KIM, K., KIM T., PARK, R. Characterization of endochitinases-producing *Bacillus cereus* p16. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13 (6), 960-968, 2003.

JOHN, R.P., NAMPOOTHIRI, K.M., PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41, 759-763, 2006.

JONES, J.D.G., DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature*, 444 (7117), 323-329, 2006.

JUNG, H.W., TSCHAPLINSKI, T.J., WANG, L., GLAZEBROOK, J., GREENBERG, J.T. Priming in systemic plant immunity. *Science* (3); 324(5923):89-91, 2009.

JUNG, W.-J., SOULEIMANOV, A., PARK, R.-D., SMITH, D.L. enzymatic production of n-acetyl chitooligosaccharides by crude enzyme derived from *Paenibacillus illioisensis* kja-424. *Carbohydrate Polymers*, 67, 256–259, 2007.

KARLSSON, M., STENLID, J. Comparative Evolutionary Histories of Fungal Chitinases. *Evolutionary Biology*, Part 3, 323-337, 2009.

KAUSS, H., JEBLICK, W., DOMARD, A. The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 178, 385–92, 1989.

KAWADA, M., HACHIYA, Y., ARIHIRO, A., MIZOGUCHI, E. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *The Keio Journal of Medicine*, 56, 21–27, 2007.

KELLNER, H., VANDENBOL, M. Fungi Unearthed: Transcripts Encoding Lignocellulolytic and Chitinolytic Enzymes in Forest Soil. *PLoS ONE*, 5(6), e10971, 2010.

KIM, H.M., HONG, S.H., YOO, S.J., BAEK, K.S., JEON, Y.J., CHOUNG, S.Y. Differential effects of chitooligosaccharides on serum cytokine levels in aged subjects. *Journal of Medicinal Food*, 9, 427–430, 2006.

KIM, S.-K., RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 62, 357–368, 2005.

KLARZYNSKI, O., PLESSE, B., JOUBERT, J.M., YVIN, J.C., KOOP, M., KLOAREG, B., FRITIG, B. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, 124, 1027–1037, 2000.

KÖHLE, H., YOUNG, D.H., KAUSS, H. Physiological changes in suspension-cultured soybean cells elicited by treatment with chitosan. *Plant Sci Lett*, 33, 221–230, 1984.

KÖPING-HÖGGÅRD, M., VÅRUM, K.M., ISSA, M., DANIELSEN, S., CHRISTENSEN, B.E., STOKKE, B.T., ARTURSSON, P. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Therapy*, 11, 1441–1452, 2004.

KOSAKA, H., AIKAWA, T., OGURA, N., TABATA, K., KIYOHARA, T. Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: The induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematode. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 667–675, 2001.

KROKEIDE, I., SYNSTAD, B., GÅSEIDNES, S., HORN, S.J., EIJSINK, V.G.H., SØRLIE, M. Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: A comparison with existing assays. *Analytical Biochemistry*, 363, 128–134, 2007.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 26, 1921–1971, 2001.

KUROIWA, T., IZUTA, H., NABETANI, H., NAKAJIMA, M., SATO, S., MUKATAKA, S., ICHIKAWA, S. Selective and stable production of physiologically active chitosan oligosaccharides using an enzymatic membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, 44, 283–287, 2009.

LACOMBE-HARVEY, M.E., FUKAMIZO, T., GAGNON, J., GHINET, M.G., DENNHART, N., LETZEL, T., BRZEZINSKI, R. Accessory active site residues of *Streptomyces* sp N174 chitosanase. *FEBS Journal*, 276, 857–869, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970.

LEE, D., NOH, H.J., LEE, K.M. Purification and characterization of a chitinase from *Cytophaga* sp. HJ isolated from sea sand. *J Microbiol Biotechnol*, 9, 839–846, 1999.

LEE, H., JANG, J.S., CHOI, S. K., LEE, D.W., KIM, E.J., JUNG, H., PAN, J. Identification and expression of GH-8 family chitosanases from several *Bacillus thuringiensis* subspecies. *FEMS Microbiology Letters*, 277, 133–141, 2007.

LEE, H.W., PARK, Y.S., CHOI, J.W., YI, S.Y., SHIN, W.S. Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26, 1100–1103, 2003.

LEE, S., CHOI, H., SUH, S., DOO, I.S., OH, K.Y., CHOI, E.J., SCHROEDER TAYLOR, A.T., LOW, P.S., LEE, Y. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant physiology*, 121(1), 147-52, 1999.

LEE, Y.S., YOO, J.S., CHUNG, S.Y., LEE, Y.C., CHO, Y.S., CHOI, Y.L. Cloning, purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 113–121, 2006.

LEITE, B., RONCATO, L.D., PASCHOLATI, S.F., LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. In: LUZ, C.W., FERNANDES, J.M.S., PRESTES, A.M., PICININI, E.C. (Ed.) *Revisão anual de patologia de plantas*, Passo Fundo, 5, 235-281, 1997.

LI, D-C. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161, 345–360, 2006.

LIANG, T.W., CHEN, Y.J., YEN, Y.H., WANG, S.L. The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656. *Process Biochemistry*, 42, 527-534, 2007.

LIN, F., JIA, X.G., LEI, W.X., LI, Z.J., ZHANG, T.Y. Spectra Analyses of Chitosans Degraded by Hydrogen Peroxide under Optimal Conditions. *Spectroscopy and spectral analysis*, 29, 43–47, 2009a.

LIN, H., WANG, H.Y., XUE, C.H., YE, M. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(5), 588-592, 2002.

LIN, S., CHEN, S., PENG, K. Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of β -chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 238–244, 2009b.

LIN, W., HU, X., ZHANG, W., ROGERS, W.J., CAI, W. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *Journal of Plant Physiology*, 162, 937-944, 2005.

LIU, D., ZHANG, R., YANG, X., WU, H., XU, D., TANG, Z., SHEN, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65 (5), 717-725, 2011.

LIU, J.A., HE, Y.H. Study on enzymatic characteristics of chitin deacetylase. *Advanced Materials Research* 236-238, 996-999, 2011.

LIU, Y., JIANG, S., KE, Z., WU, H., CHI, C., GUO, Z. Recombinant expression of a chitosanase and its application in chitosan oligosaccharide production. *Carbohydrate Research*, 344(6), 21, 815-819, 2009.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R., CATALANO, V., KUBICEK, C. P., SEIDL, V. The β -N-acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. *FEBS Journal*, 276, 5137–5148, 2009.

LORITO, M., HAYES, C.K., DI PIETRO, A., HARMAN, G.E. Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Current Genetics*, 24, 349–356, 1993.

LORRAIN, S., VAILLEAU, F., BALAGUE, C., ROBY, D. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends in Plant Science*, 8(6), 263-271, 2003.

MADEIRA, J.V., MACEDO, J.A., MACEDO, G.A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology*, 102 (15), 7343-7348, 2011.

MARGIS-PINHEIRO, M., SANDRONI, M., LUMMERZHEIM, M., OLIVEIRA, D.E. A defesa das plantas contra as doenças. *Ciência Hoje on line*, 147, 1999.

MARIN-CERVANTES, M.C., MATSUMOTO, Y., RAMÍREZ-COUTIÑO, L., ROCHA-PINO, Z., VINIEGRA, G., SHIRAI, K. Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. *Process Biochemistry*, 43, 24–32, 2008.

MARTE, M., BUONAURO, R., TORRE, G., DELLA, TORRE G. Induction of systemic resistance to tobacco powdery mildew by tobacco mosaic virus, tobacco necrosis virus or ethephon. *Journal of Phytopathology*, 138, 137-144, 1993.

MARTINS, S., MUSSATTO, S.I., MARTÍNEZ-AVILA, G., MONTAÑEZ-SAENZ, J., AGUILAR, C.N., TEIXEIRA, J.A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29 (3), 365-373, 2011.

MATSUMOTO, K.S. Fungal chitinases. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 289-304, 2006.

MATSUMOTO, Y., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., REVAH, S., Shirai K. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*, 39, 665–671, 2004.

MAZUMDER, S., BASU, S.K.L., MUKHERJEE, M. Laccase production in solid-state and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. *Engineering in Life Sciences*, 9 (1), 45–52, 2009.

MEERA, M.S., SHIVANNA, M.B., KAGEYAMA, K., HYAKUMACHI, M. Persistence of induced systemic resistance in cucumber in relation to root colonization by plant-growth promoting fungal isolates. *Crop Protection*, 14, 123-130, 1995.

MÉNARD, R., ALBAN, S., RUFFRAY, P., JAMOIS, F., FRANZ, G., FRITIG, B., YVIN, J-C., KAUFFMANN, S. β -1,3 glucan sulfate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16, 3020–32, 2004.

MERCIER, L., LAFITTE, C., BORDERIES, G., BRIAND, X., ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M-T., FOURNIER, J. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. *New Phytologist* 149, 43–51, 2001.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428, 1959.

MITSUTOMI, M., HATA, T., KUWAHARA, T. Purification and Characterization of Novel Chitinases from *Streptomyces griseus* Hut 6037. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 153–158, 1995.

MITSUTOMI, M., UEDA, M., ARAI M., ANDO, A., WATANABE, T. *Chitin Enzymology: Proceedings of the International Symposium on Chitin Enzymology*; Senigallia, Italy, 273, 1996.

MIYA, M., IWAMOTO, R., YOSHIKAWA, S., MIMA, S. IR spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2 (5), 323-324, 1980.

MORRIS, V.B., NEETHU, S., ABRAHAM, T.E., PILLAI, C.K.S., SHARMA, C.P. Studies on the Condensation of Depolymerized Chitosans with DNA for Preparing Chitosan-DNA Nanoparticles for Gene Delivery Applications. *The Journal of Biomedical Materials Research*, 89B, 282–292, 2009.

MOURYA, V.K., INAMDAR, N.N. Chitosan modifications and applications. Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*, 68, 1013–1051, 2008.

MOURYA, V.K., INAMDAR, N.N., CHOUDHARI, Y.M. Chitooligosaccharides: Synthesis, Characterization and Applications. *Polymer Science, Series A*, 2011, 53 (7), 583–612, 2011.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologica Plantarum*, 15, 473–97, 1962.

MUZZARELLI, R.A.A., TOMASETTI, M., ILARI, P. Depolymerization of chitosan with the aid of papain. *Enzyme and microbial technology*, 16, 110-114, 1994.

NAMPOOTHIRI, K.M., BAIJU, T.V., SANDHYA, C., SABU, A., SZAKACS, G., PANDEY, A. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 39, 1583–1590, 2004.

NAWANI, N.N., KAPADNIS, B.P. One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 803-808, 2001.

NAWANI, N.N., KAPADNIS, B.P. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. *Process Biochemistry*, 40, 651–660, 2005.

NAWANI, N.N., PRAKASH, D., KAPADNIS B.P. Extraction, purification and characterization of an antioxidant from marine waste using protease and chitinase cocktail. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1509-1517, 2010.

NEUHAS, J-M. Plant Chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 PR-11). In: Datta SK, MUTHUKRISHNAN, S. (eds) *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press, Boca Raton, 77–105, 1999.

NEWMAN, M-A., DOW, J.M., MOLINARO, A., PARRILLI, M. Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Endotoxin Research*, 13, 69– 84, 2007.

OLIVEIRA JR., E.N., EL GUEDDARI, N.E., MOERSCHBACHER, B.M., PETER, M.G., FRANCO, T.T. Growth of phytopathogenic fungi in the presence of partially acetylated chitooligosaccharides. *Mycopathologia*, 166 (3), 163-174, 2008.

OLIVEIRA JUNIOR, E.N. *Caracterização dos Efeitos de Quitosanas na Inibição de Fungos Fitopatogênicos*. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

OOSTENDORP, M., KUNZ, W., DIETRICH, B., STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 19-28, 2001.

ORTMANN, I., CONRATH, U., MOERSCHBACHER, B.M. Exopolysaccharides of *Pantoea* agglomerans have different priming and eliciting activities in suspension-cultured cells of monocots and dicots. *FEBS Letters*, 580, 4491–4, 2006.

ORTMANN, I., MOERSCHBACHER, B.M. Spent growth medium of *Pantoea* agglomerans primes wheat suspension cells for augmented accumulation of hydrogen peroxide enhanced peroxidase activity upon elicitation. *Planta*, 224, 963–70, 2006.

PALMA-GUERRERO, J., LOPEZ-JIMENEZ, J.A., PÉREZ-BERNÁ A.J., HUANG, I.-C., JANSSON, H.-B., SALINAS, J., VILLALÁIN J., READ, N.D., LOPEZ-LLORCA, L.V. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology*, 75(4), 1021-32, 2010.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., RODRIGUEZ-LEÓN, J. A., NIGAM, P. Production of organic acids by solid-state fermentation. In: *Solid-state fermentation in biotechnology - fundamentals and applications*. New Delhi: Asiatech Publishers, 113-126, 2001.

PARK, Y., KIM, M.H., PARK, S.C., CHEONG, H., JANG, M.K., NAH, J.W., HAHM, K.S. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 1729–1734, 2008.

PARKER, J.E. The quest for long-distance signals in plant systemic immunity. *Science Signaling*, 2 (70), 31, 2009.

PATEL, A.K., SINGH, V.K., YADAV, R.P., MOIR, A.J.G., JAGANNADHAM, M.V. Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*. *Process Biochemistry*, 45(5), 675-681, 2010.

PATIL, R.S., GHORMADE, V., DESHPANDE M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 473–483, 2000.

PAULERT, R., EBBINGHAUS, D., URLASS, C., MOERSCHBACHER, B.M. Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green

macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants. *Plant Pathology*, 59 (4), 634–642, 2010.

PEARCE, R.B., RIDE, J.P. Chitin and related compounds as elicitors of lignification response in wounded wheat leaves. *Physiol Plant Pathol*, 20, 119–123, 1982.

PELLETIER, A., SYGUSCH, J. Purification and Characterization of Three Chitosanase Activities from *Bacillus megaterium* P1, *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (4), 844–848, 1990.

PEREIRA, J.L., NORONHA, E.F., MILLER, R.N.G., FRANCO, O.L. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 573–581, 2007.

PONTECORVO, G. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advanced Genetics*, 5, 150–1, 1953.

POVERO, G., LORETI, E., PUCCIARIELLO, C., SANTANIELLO, A., DI TOMMASO, D., DI TOMMASO, G., KAPETIS, D., ZOLEZZI, F., PIAGGESI, A., PERATA, P. Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. *Journal of Plant Research*, 124(5), 619–629, 2011.

RAMIREZ-COUTIÑO, L., ESPINOSA-MARQUEZ, J., PETER, M.G., SHIRAI, K. The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. *Bioresource Technology*, 101(23), 9236–40, 2010.

RAMIREZ-COUTIÑO, L., MARIN-CERVANTES, M.C., HUERTA, S., REVAH S., SHIRAI, K. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*, 41, 1106–10, 2006.

RAMOS, A.S., MARTINS, P.S.O., FIAUX, S.B., LEITE, S.G.F. Solid-phase microextraction of 6-pentyl- α -pyrone produced by solid-state fermentation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(3), 523–528, 2009.

RATANAVARAPORN, J., KANOKPANONT, S., TABATA, Y., DAMRONGSAKKUL, S. Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films. *Carbohydrate Polymers*, 78, 873–878, 2009.

RAYMOND, L., MORIN, F.G., MARCHESSAULT, R.H. Degree of deacetylation using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*, 246, 331–336, 1993.

REPO, E., MALINEN, L., KOIVULA, R., HARJULA, R., SILLANPÄÄ, M. Capture of Co(II) from its aqueous EDTA-chelate by DTPA-modified silica gel and chitosan. *Journal of Hazardous Materials*, 187, 1-3, 122-132, 2011.

RHOADES, J., GIBSON, G., FORMENTIN, K., BEER, M., RASTALL, R. Inhibition of the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* strains to HT-29 cells in culture by chito-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 64, 57–59, 2006.

ROCKLIN, R.D., POHL, C.A. Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Liq. Chromatogr.* 6, 1577–90, 1983.

ROJAS, J.A., CRUZ, C., MIKÁN, J.F., VILLALBA, L.S., CEPERO DE GARCÍA, M.C., RESTREPO, S. Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(2), 169-175, 2009.

ROMEIRO, R.S., GARCIA, F.A.O. Metabólitos e constituintes bacterianos como indutores de resistência em plantas a patógenos. In: Romeiro, R.S. & Rodrigues, F.A. (Eds.) *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos*. Rio Branco. Suprema Gráfica e Editora Ltda, 131-160, 2007.

ROMEIRO, R.S., VIEIRA JÚNIOR, J.R., SILVA, H.S.A., BARACAT-PEREIRA, M.C., CARVALHO, M.G. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. *Journal of Phytopathology*, 153, 120-123. 2005.

SASHIWA, H., FUJISHIMA, S., YAMANO, N., KAWASAKI, N., NAKAYAMA, A., MURAKI, E., SUKWATTANASINITT, M., PICHYANGKURA, R., AIBA, S. Enzymatic production of *N*-acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of *N*-acetylchitoooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 51, 391–395, 2003.

SCHEEL, D. Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in plant Biology*, 1(4), 305-10, 1998.

SCHMOLL, M., ESQUIVEL-NARANJO, U.E., HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* in the light of day—physiology and development. *Fungal Genetics and Biology*, 47(11), 909-16, 2010.

SCHUSTER, A., SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 787–799, 2010.

SEYFARTH, F., SCHLIEMANN, S., ELSNER, P., HIPLER, U.C. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan

oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *International Journal of Pharmaceutics*, 353, 139–148, 2008.

SHAHABUDDIN, M., TOYOSHIMA, T., AIKAWA, M., KASLOW, D.C. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 4266–4270, 1993.

SHAIKH, S.A., DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 468–475, 1993.

SHEN, K.-T., CHEN, M.-H., CHAN, H.-Y., JENG, J.-H., WANG, Y.-J. Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1864–1871, 2009.

SHINYA, T., MÉNARD, R., KOZONE, I. MATSUOKA, H., SHIBUYA, N., KAUFFMANN, S., MATSUOKA, K., SAITO, M. Novel β -1,3-, 1,6- oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco. *FEBS Journal* 273, 2421–31, 2006.

SILVA, L.C.A., HONORATO, T.L., FRANCO, T.T., RODRIGUES, S. Optimization of chitosanase production by *Trichoderma koningii* sp. under solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, published online, 2010.

SILVEIRA, C.M., FURLONG, E.B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. Characterization of nitrogenated compounds in solid state fermented bran. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(4), 805-811, 2007.

SINGH, H.B., SINGH, B.N., SINGH, S.P., NAUTIYAL, C.S. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. *Bioresource Technology*, 101(16), 6444-53, 2010.

SOOSAAR, J.L.M., BURCH-SMITH, T.M. E DINESH-KUMAR, S. P. Mechanisms of Plant Resistance to Viruses. *Nature Reviews Microbiology* 3 (10), 789-98, 2005.

SØRBOTTEN, A., HORN, S.J., EIJSINK, V.G., VÅRUM, K.M. Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *FEBS Journal*, 272, 538–549, 2005.

STASKAWICZ, B.J., ASUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.E., JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268, 661-667, 1995.

STICHER, L., MAUCH MANI, B., METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 235-270, 1997.

STOYACHENKO, I.A., VARLAMOV, V.P., DAVANKOV, V.A. Chitinases of *Streptomyces kurssanovii*: purification and some properties. *Carbohydrate Polymers*, 24(1), 47-54, 1994.

STRUSZCZYK, K., SZCZESNA-ANTCZAK, M., WALCZAK, M., POMIANOWSKA, E., ANTCZAK, T. Isolation and purification of *Mucor circinelloides* intracellular chitosanolytic enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 78, 16–24, 2009.

SURESH, P.V., ANIL KUMAR, P.K., SACHINDRA, N.M. Thermoactive β -N-acetylhexosaminidase production by a soil isolate of *Penicillium monoverticillium* CFR 2 under solid state fermentation: Parameter optimization and application for N-acetyl chitooligosaccharides preparation from chitin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (6), 1435-1447, 2011.

SURESH, P.V., CHANDRASEKHARAN, M. Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 655–660, 1998.

SURVASE, S.A., BACIGALUPI, C., ANNAPURE, U.S., SINGHAL, R.S. Use of Coconut Coir Fibers as an Inert Solid Support for Production of Cyclosporin A. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 769-774, 2009.

TAGAWA, M., TAMAKI, H., MANOME, A., KOYAMA, O., KAMAGATA, Y. Isolation and characterization of antagonistic fungi against potato scab pathogens from potato field soils. *FEMS Microbiology Letters*, 305(2), 136-142, 2010.

TANABE, S., OKADA, M., JIKUMARU, Y., YAMANE, H., KAKU, H., SHIBUYA, N., MINAMI, E. Induction of resistance against rice blast fungus in rice plants treated with a potent elicitor, N-acetylchitooligosaccharide. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, 1599–1605, 2006.

TROUVELOT, S., VARNIER, A-L., ALLÉGRE, M., MERCIER, L., BAILLIEUL, F., ARNOULD, C., GIANINAZZI-PEARSON, V., KLARZYNSKI, O., JOUBERT, J.-M., PUGIN, A., DAIRE, X. A β -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 232–43, 2008.

TRUDEL, J., ASSELIN, A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 178, 362-366, 1989.

TSIGOS, I., MARTINOU, A., KAFETZOPOULOS, D., BOURIOTIS, V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18, 305, 312, 2000.

- VAL, F., DESENDER, S., BERNARD, K., POTIN, P., HAMELIN, G., ANDRIVON, D. A culture filtrate of *Phytophthora infestans* primes defense reaction in potato cell suspensions. *Biochemistry and Cell Biology*, 98, 653–8, 2008.
- VAN AALTEN, D.M., KOMANDER, D., SYNSTAD, B., GÅSEIDNES, S., PETER, M.G., EIJSINK, V.G. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 8979–8984, 2001.
- VAN HULTEN, M., PELSER, M., VAN LOON, L.C., PIETERSE, C.M.J., TON, J. Costs and benefits of priming for defence in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103:5602–7, 2006.
- VINALE, F., SIVASITHAMPARAMB, K., GHISALBERTIC, E.L., MARRA, R., WOO, S.L., LORITO, M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil biology and soil biochemistry*, 40, 1–10, 2008.
- VISHWANATHA, K.S., APPU RAO, A.G., SINGH, S.A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 129–138, 2010.
- VOCADLO, D.J., DAVIES, G.J., LAINE, R., WITHERS, S.G. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, 412, 835–838, 2001.
- WANG, J., ZHOU, W., YUAN, H., WANG, Y. Characterization of a novel fungal chitosanase Csn2 from *Gongronella* sp. JG. *Carbohydrate Research*, 343, 2583–2588, 2008.
- WANG, S.-L., LIANG, T.-W., YEN, Y.-H. Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydrate Polymers*, 84 (2), 732–742, 2011.
- WANG, S.L., LIN, T.Y., YEN, Y.H., LIAO, H.F., CHEN, Y.J. Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Research*, 341, 2507–2515, 2006.
- WARM, E., LATIES, G.G. Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry*, 21, 827–31, 1982.
- WU, J.H., ALI, S., REN, S.X. Evaluation of chitinase from *Metarhizium anisopliae* as biopesticide against *Plutella xylostella*. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(5), 521–528, 2010.
- WU, T., ZIVANOVIC, S., HAYES, D.G., WEISS, J. Efficient reduction of chitosan molecular weight by high-intensity ultrasound: Underlying mechanism and effect of process parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5112–5119, 2008.

XIA, W., LIU, P., ZHANG, J., CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170-179, 2011.

XIE, Y., WEI, Y., HU, J. Depolymerization of Chitosan with a Crude Cellulase Preparation from *Aspergillus Niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 1074–1083, 2010.

XING, R.E., LIU, S., YU, H.H., GUO, Z.Y., WANG, P.B., LI, C.P., LI, Z., LI, P.C. Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation. *Carbohydrate Research*, 340, 2150–2153, 2005.

XIONG, C. N., WU, H. G., WEI, P., PAN, M., TUO, Y. Q., KUSAKABE, I., & DU, Y. G. Potent angiogenic inhibition effects of deacetylated chitohexaose separated from chitooligosaccharides and its mechanism of action in vitro. *Carbohydrate Research*, 344(15), 1975-1983, 2009.

YANG, G., HOU, L.L., ZHANG, F.L. Study on the solid-state fermentation conditions for producing thermostable xylanase feed in a pressure pulsation bioreactor. *Advanced Materials Research*, 236-238, 72-76, 2011.

YIN, H., DU, Y.G., ZHANG, J.Z. Low molecular weight and oligomeric chitosans and their bioactivities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9, 1546–1559, 2009.

YOKSAN, R., AKASHI, M., MIYATA, M., CHIRACHANCHAI, S. Optimal gamma-ray dose and irradiation conditions for producing low-molecular-weight chitosan that retains its chemical structure. *Radiation Research*, 161, 471–480, 2004.

ZAKARIASSEN, H., AAM, B.B., HORN, S.J., VÅRUM, K.M., SØRLIE, M., EIJSINK, V.G. Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 10610–10617, 2009.

ZAPAROLI, G.H.A. *Uma segunda família de proteínas indutoras de necrose encontrada em Moniliophthora perniciosa, causador da doença Vassoura-de-Bruxa em cacaueiros*. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

APÊNDICE I

Solid-state fermentation of *Trichoderma polysporum* on shrimp shells yields a chitosanolytic enzyme extract producing bioactive chito-oligosaccharides

Abstract

The aim of this work was to develop a simple fermentation process yielding a chitosanolytic enzyme extracts which can convert partially acetylated chitosan polymers into bioactive chito-oligosaccharides (COS). Submerged and solid state fermentations (SSF) of *Trichoderma polysporum* were performed with or without induction by colloidal chitin or shrimp shells. The resulting crude enzyme extracts were analysed using SDS-PAGE followed by protein staining as well as semi-native PAGE and IEF followed by zymography using chitosans with different fractions of N-acetylglucosamine (F_A) as a substrate. SSF crude enzyme extract was selected for further analysis due to the low complexity of its chitosanolytic activities. SSF extract catalysed the hydrolysis of three different chitosans with F_A 0.15, 0.27, and 0.56, and the resulting COS were analysed by thin layer chromatography (TLC) and ESI-quadrupole-TOF-tandem-MS. Results showed that the SSF extract was dominated by chitobiase and/or N-acetylglucosaminidase, with low but significant endo- and possibly exo-chitinase activity. *Rubus fruticosus* suspension-cultured cells elicited with COS reacted with a rapid and transient generation of H₂O₂, with chitosans F_A 0.56 oligomers being the most active ones.

Keywords: chito-oligosaccharides, fungal enzymes, solid state fermentation, chitosanases, shrimp shells, oxidative burst.

Solid-state fermentation of *Trichoderma polysporum* on shrimp shells yields a chitosanolytic enzyme extract producing bioactive chito-oligosaccharides

Talita L. Honorato^{a,c}, Flávia Granusso^a, Sueli Rodrigues^b, Nour Eddine El Gueddari^c,
Bruno M. Moerschbacher^c and Telma T. Franco^{a*}.

^a School of Chemical Engineering – State University of Campinas, UNICAMP, Av Albert Einstein, 500 – Postal Code 13083-852 – Campinas – SP, Brazil.

^b Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici – Bloco 858, Caixa Postal 1268, 60021-970, Fortaleza – CE, Brazil.

^c Institute of Plant Biology and Biotechnology – University of Muenster, Hindenburgplatz 55, Postal Code 48143, Muenster, Germany.

* Correspondence author: School of Chemical Engineering– University of Campinas - Av. Albert Einstein, 500 - CEP 13083-852 Campinas-SP/Brazil. Tel.: +55 19 3521 3966. Fax: +55 19 3521 3910. E-mail address: franco@feq.unicamp.br (Franco, T.T.).

Abstract

The aim of this work was to develop a simple fermentation process yielding a chitosanolytic enzyme extracts which can convert partially acetylated chitosan polymers into bioactive chito-oligosaccharides (COS). Submerged and solid state fermentations (SSF) of *Trichoderma polysporum* were performed with or without induction by colloidal chitin or shrimp shells. The resulting crude enzyme extracts were analysed using SDS-PAGE followed by protein staining as well as semi-native PAGE and IEF followed by zymography using chitosans with different fractions of N-acetylglucosamine (F_A) as a substrate. SSF crude enzyme extract was selected for further analysis due to the low

complexity of its chitosanolytic activities. SSF extract catalysed the hydrolysis of three different chitosans with F_A 0.15, 0.27, and 0.56, and the resulting COS were analysed by thin layer chromatography (TLC) and ESI-quadrupole-TOF-tandem-MS. Results showed that the SSF extract was dominated by chitobiase and/or N-acetylglucosaminidase, with low but significant endo- and possibly exo-chitinase activity. *Rubus fruticosus* suspension-cultured cells were used to analyze the activation of defense responses using the hydrolysates as elicitors. Suspension cultured cells elicited with chitosan oligomers reacted with a rapid and transient generation of H_2O_2 , with chitosans F_A 0.56 oligomers being the most active ones.

Keywords: chito-oligosaccharides, fungal enzymes, solid state fermentation, chitosanases, shrimp shells, oxidative burst.

1. Introduction

Chitin and its partially de-N-acetylated counterpart chitosan are among the most versatile and the most promising biomaterials. While the unique physico-chemical properties of chitosan polymers are typically exploited for applications in the material sciences, life science applications rather rely on specific biological functionalities of chitosan oligomers, and food sciences and biotechnological applications often profit from both. Water-soluble chito-oligosaccharides (COS) have been reported to possess attractive biological activities [1,2,3], i.e. to induce apoptosis of tumour cells [4], to have antioxidant activity, to inhibit growth of fungi [1,5], to elicit resistance against phytopathogens in crop plants, and to promote plant growth in sustainable agricultural systems [6]. As the biological activities of COS have been proposed to be governed by their degree of

polymerisation (DP), their degree of acetylation (DA) or fractions of N-acetylglucosamine (F_A), and their patterns of acetylation (PA) [5,6,7], enzymatic methods of COS production appear to be more promising compared to chemical means. Due to their selectivity, a given enzymatic process allows to generate rather large amounts of a rather narrow spectrum of COS, thus reducing the costs for separation, provided a suitable enzyme substrate combination can be found that gives rise to the right mixture of COS exhibiting the desired biological functionalities. Therefore, enzymatic hydrolysis has become popular in recent years due to the lower cost, low environmental impact, and high reproducibility of the results [8,9].

One of the main constraints of the enzymatic approach for COS synthesis is the often prohibitory price of producing the enzyme or enzyme mixtures required. Therefore, the aim of the present study was to identify a microorganism suited to grow on raw shrimp shells in Solid State Fermentation (SSF) and producing a mixture of chitosanolytic enzymes suitable to convert polymeric chitosans into potentially bioactive COS. In a first step, we aimed at producing COS with a DP of 6 to 10, a size we assume to be optimal for bioactivity.

In a screening of potentially suitable fungi, *Trichoderma polysporum* was identified as the most promising due to its good growth in SSF on shrimp shells (unpublished results of the authors). *Trichoderma* species are the most intensely studied biocontrol agents commercially available as biopesticides and biofertilisers for agriculture, and they are also employed to produce enzymes [10,11,12]. As entomopathogenic fungi, *Trichoderma* are known to synthesise a range of hydrolytic enzymes, including chitinases [9,13,14,15]. Some species of *Trichoderma* are mycoparasites, invading and destroying fungal cells and then feeding on the dead cell contents, and chitinases have been implicated in cell wall

hydrolysis during mycoparasitic attack. An unidentified chitinase is supposed to release oligomers from the host cell walls which then act as inducers of further chitinase formation [16].

However, most studies have focussed on *T. harzianum*, and there are no reports on the production of enzymes by *T. polysporum*. Submerged and solid state fermentation were employed here for the production of chitinolytic enzymes using abundantly available agro-industrial residues such as wheat bran and shrimp shells [17]. The enzymes thus produced were then employed to produce CHO from partially acetylated chitosans, followed by their characterization.

2. Experimental

2.1. Microorganisms and inoculum preparation

T. polysporum was isolated by Embrapa Semi-Arido (Petrolina - PE, Brazil) as a biocontrol agent and kindly donated to our laboratory. The spore culture of *T. polysporum* was maintained in wheat bran at 4°C. Sterile 0.01% (v/v) Tween 80 solution (30 mL) was added to an Erlenmeyer flask containing the spore culture. The spores were counted in a haemocytometer (10^7 spores mL⁻¹).

2.2. Preparation of solid and liquid culture media

Shrimp shell waste from commercial shrimp farming operations in Ceará, Brazil, was used as a substrate. Prior to storage, the shells were washed with water and dried for 24 h at 60°C. Wheat bran was purchased from the local market (Mercado São Sebastião, Fortaleza-CE, Brazil).

Growth of *T. polysporum* under different fermentation conditions was investigated and crude enzyme extracts were compared and analysed. *T. polysporum* was grown on a solid substrate containing 2 g wheat bran, 1 g shrimp shells and 2.5 mL of a mineral medium (pH 5.5) containing 1 g L⁻¹ each of: NaNO₃, (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, NaCl. The optimization of the production of chitinolytic enzymes by solid state fermentation was previously studied [17]. Liquid *Trichoderma* complete medium (TCM) [18], pH 5.5, was used for the cultivation in submerged fermentation containing 3 g L⁻¹ glucose, 1 g L⁻¹ bactopectone, 0.3 g L⁻¹ urea, 2 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1.4 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.3 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0.3 g L⁻¹ CaCl₂·6H₂O, 0.005 g L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 0.002 g L⁻¹ MnSO₄, 0.002 g L⁻¹ ZnSO₄, 0.002 g L⁻¹ CoCl₂. The medium was supplemented with 0.5% (w/v) shrimp shells, colloidal chitin or chitosan (Table 1), sterilised and inoculated with 10⁷ spores. The contents were then mixed thoroughly and incubated at 27°C for 72 h, statically for SSF and at 120 RPM for submerged fermentation.

2.3. Preparation of enzyme extracts

Enzymes were extracted from the fermented solid substrate by adding 20 mL of 200 mM, pH 5.5 acetate buffer to the flask and shaking at 27°C, 150 RPM, for 6 min. The enzyme extracts were then separated by filtration through analytical filter paper (70 mm) and then through 0.2 µm pore size Filtropur S (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) syringe filters. The filtrates (enzyme extract) were concentrated in Vivaspin20 10,000 MWCO (Sartorius, Goettingen, Germany), desalted on prepacked Sephadex G-25 columns (PD-10, Amersham Bioscience), equilibrated with ammonium acetate buffer 50 mM, pH 5.5, eluted with the same buffer and stored in vials at 4°C.

2.4 Detection of proteins, isoelectric focusing electrophoresis and chitinase activity

SDS-PAGE of the proteins in the enzyme extract was performed according to Laemmli [19], gels were run at 15 mA constant current, and after electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 to visualize protein bands. For zymography of chitinase and chitosanase, the SDS-PAGE gels (12%) contained 0.1% (w/v) chitosan with a mol fraction of N-acetylglucosamine (F_A) value of 0.11 or 0.56 [20]. After electrophoresis, the gel was washed twice for 20 min in 50 mM ammonium acetate buffer (pH 5.2, with 1% Triton X-100) and rinsed twice with the same buffer without Triton X-100 for 20 min. The gel was incubated at 37°C overnight under shaking in 50 mM ammonium acetate buffer (pH 5.2) and stained for 10 min in a freshly prepared solution of 0.01% calcoflour in 0.5 M Tris-buffer (pH 8.9). Finally, the gel was washed in deionized water for 1 h. Chitinolytic activities appeared as dark zones within a homogeneously fluorescent background upon illumination with a UV transilluminator.

For isoelectric focusing, extracellular proteins were separated over the pH range 3-10 in a polyacrylamide gel containing Ampholine (Amersham Bioscience). Proteins showing chitinolytic activity were detected using an overlay gel containing 0.01% (w/v) chitosan F_A 0.11 or F_A 0.56. After incubation in 50 mM ammonium acetate buffer (pH 5.2) overnight at 37 °C, overlay gels were incubated for 5 min in solution containing 0.01% (w/v) calcofluor M2R (Sigma) in 500 mM Tris-HCl (pH 8.9). After 5 min, the calcofluor solution was removed and the overlay gel was rinsed overnight in distilled water. Lytic zones were visualized and recorded under UV light.

Three chromogenic derivatives, p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (pNP-GlcNAc), p-nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiose [pNP-(GlcNAc)₂] and p-nitrophenyl-

β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose [pNP-(GlcNAc)₃] (Sigma), were used as substrates for the determination of chitinolytic activity [21]. A 250 μ l volume of the enzyme was incubated with 25 μ l 0.3% solution of the respective substrate in 50 mmol L⁻¹ citrate phosphate buffer, pH 5.5, at 50°C for 30 min, followed by the addition of 1.25 ml of 10 mmol L⁻¹ NaOH. The release of the chromophore p-nitrophenol from the substrates was determined by measuring the absorbance at 410 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount that released one micromole of p-nitrophenol per min under the specified conditions.

2.5 Enzymatic hydrolysis

The enzyme extracts were incubated overnight at 37°C with 2 g L⁻¹ chitosans with three different F_A (commercial chitosan from Sigma F_A 0.15, chitosan F_A 0.27 with Mw 143.000 g mol⁻¹ and chitosan F_A 0.56 with Mw 184.520 g mol⁻¹) in 50 mM, pH 5.5 ammonium acetate buffer. Chitosans F_A 0.27 and F_A 0.56 were prepared by acetylation of purified chitosan with F_A of 1.5 from Mahtani Chitosan Pvt. Ltd. (India). The chitosans were dissolved in a 0.1% acetic acid/1,2-propanediol mixture and different amounts of a solution of pure and fresh acetic anhydride in 1,2-propanediol were added, in stoichiometric conditions, to reach the desired F_A. At the end of the reaction, reacylated chitosans were fully precipitated by addition of dilute aqueous ammonia and washed several times with deionized water at pH 7.5 in order to preserve the -NH₂ form. The F_A value was determined by ¹H NMR spectroscopy (Bruker UltraShieldTM Spectrometer, 300 MHz). Each hydrolysate was mixed with a solution of ethanol/ammonia (7:3, v/v) in a 1:3

(v/v) proportion. The precipitated fraction was discarded and the supernatant was freeze-dried and then resuspended in distilled water.

2.6 Thin layer chromatography

Aliquots of hydrolyzates were applied on silica gel thin-layer chromatography (TLC) plates 60 (Merck Co., Berlin, Germany) using *n*-butanol–methanol–25% ammonia solution–water (5:4:2:1, v/v/v/v) as a solvent system. The plates were sprayed with aniline-diphenylamine reagent (4 ml of aniline, 4 g of diphenylamine, 200 ml of acetone and 30 ml of 85% phosphoric acid) to visualise the oligomers and the spots developed by heating at 180°C for 3 min. The R_f of the samples was compared with R_f of authentic N-acetylglucosamine (degree of polymerization, DP, 1, 3, 4, 5, 6) and D-glucosamine (DP 1 to 6) from Seikagaku Corporation patterns, Japan.

2.6 Mass Spectrometry

Nanoelectrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (nanoESI-Q-ToF-MS/MS) experiments were carried out with a quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) in the positive ion mode. The QTOF mass spectrometer was interfaced to a personal computer running MassLynx software to control the instrument and to acquire and process the mass spectra. Gas-phase ions were generated from solutions containing approx. 7.5 pmol μL^{-1} of the freeze-dried hydrolyzate dissolved in water/methanol/formic acid (49/49/2, v/v/v) by nanoESI in the positive ion mode using a Z-spray source. Typical source parameters were as follows: source temperature 80 °C,

desolvation gas (N_2) flow rate of 75 L h^{-1} , capillary voltage potential of 1.1 kV and a cone voltage of 40 V.

2.7 Oxidative burst measurement in cell cultures

Blackberry (*Rubus fruticosus*) cell-suspension cultures were maintained in 50 mL cell culture medium supplemented with sucrose as described by Gamborg et al. [22]. The cell cultures were kept at 26°C in the dark under agitation. The cells were used 3–4 days after subcultivation in a fresh medium, gently separated from the medium through a sintered glass filter. Aliquots of 300 mg cells were suspended in 5 mL pre-incubation medium {3% sucrose (w/v) and 10 mM MES in 5% (v/v) MS medium [23] supplemented with 2,4-D and sucrose, pH 5.8, as described by Ortmann et al. [24]} in a six-well plate and incubated under culture conditions for 5 h as described before by Paulert et al. [24]. Oxidative burst was determined using a method based on the H_2O_2 -dependent chemiluminescence of luminol according to Warm & Laties [25] using a luminometer (Lumat LB 9501 Berthold). At different time intervals following the treatments, the hydrogen peroxide concentration was quantified as follows: aliquots of 200 μL blackberry cells were mixed with 700 μL 50 mM phosphate buffer (pH 7.9). The reaction was started by automatically adding 100 μL luminol (Sigma; 1.21 mM in phosphate buffer) and 100 μL 14 mM potassium hexacyanoferrate (Fluka) followed by light detection (10 s integration time, 430 nm). The micromolar (μM) H_2O_2 concentration was determined using a standard calibration curve (Paulert et al., 2010) [24].

3. Results and discussion

Four different nutrient sources were tested to culture *T. polysporum*. Three submerged fermentations had a synthetic culture medium (TCM) as a basis, used plain or complemented with shrimp shells or colloidal chitin. The growth medium for SSF contained shrimp shells, wheat bran, and minerals (Table 1). The three fermentation broths S1, S2, and S3 as well as the raw SSF extract S4 were analyzed using SDS-PAGE followed by protein staining and semi-native zymography to reveal the secretion of chitosanolytic enzymes (Figure 1a, b and c).

SDS–PAGE (Figure 1a) showed that *T. polysporum* produces a very large number of proteins in the MW range of 15 to 100 kD, especially when grown on TCM media supplemented with shrimp shells (S2) or colloidal chitin (S3). Interestingly, the major bands dominating the protein spectra differed between all four samples. Similarly, the semi-native zymography gels (Figures 1b and c) showed greatly varying chitosanolytic enzyme activities. The two zymography gels containing different chitosans showed predominant activities towards chitosan with a F_A of 0.56 rather than 0.11, indicating the presence of chitinases rather than chitosanases. Both zymograms showed highest enzyme activities and isoenzyme numbers in the spent growth medium containing colloidal chitin (S3), and lowest enzyme activities and isoenzyme numbers in the SSF extract (S4). Interestingly, the presence of shrimp shells in the medium (S2) appears to repress the secretion of chitinases compared to the plain liquid medium (S1), possibly also explaining the low complexity of isoenzyme forms in the SSF extract (S4).

As the goal of the current study was the the production of medium size chitosan oligomers rather than complete degradation of the polymers, the SSF raw enzyme extract S4 was analysed using isoelectric focusing followed by activity staining (Figure 2). Two major and two minor bands of chitosanolytic activity were seen, all of them being more active on chitosan with F_A 56 than on chitosan with F_A 11, again indicating chitinase rather than chitosanase activity. The pIs of the two major bands were determined to be 3.0 and 8.7. The production of both acidic and basic chitinolytic enzymes has been reported for other fungi before, e.g. in the case of submerged fungal fermentation of *Lecanicillium lecanii* supplemented with chitin as a substrate, where CHI1 with MW 40.9 and CHI2 with MW 45.9 kDa were identified, having pIs of 4.5 and 7.61, respectively [26]. Lu et al. [27] suggested that the acidic chitinase may play a protective role within the fungal cell, whereas the basic chitinase may be secreted out of the cell for chitin digestion.

The reduced complexity of the chitin/chitosanolytic enzymes found in the fermentation broths S2 and SSF raw extract S4 originating from culture media which contained shrimp shells, a highly complex and recalcitrant material, as a carbon source, compared to the more bio-available material colloidal chitin present in S3 broth and even compared to the non-induced control broth S1 at first may seem counter-intuitive. We speculate that the complexity and cristalinity of the shrimp shells may have increased the selectivity of the culture media S2 and S4 to reduce the number of chitinolytic enzymes and to restrict it to the biosynthesis of specialised chitinase isoforms capable of handling this specific substrate. Florido et al. [28] found three bands of chitinolytic proteins (31, 48 and 58 kDa) in the crude extract of SSF of *Lecanicillium lecanii* grown on shrimp shells, whereas

Ramirez-Coutino et al. [29] reported on four bands of chitinolytic activity (23, 33.1, 85.5, and 123.1 kDa) when a closely related fungus, *Lecanicillium fungicola*, selected as a good chitinase producer, was grown in submerged fermentation in a medium containing chitin.

The mode of action of the chitinolytic enzymes of *T. polysporum* was investigated using the chromogenic substrates pNP-GlcNAc, pNP-(GlcNAc)₂, and pNP-(GlcNAc)₃ commonly employed to differentiate the activities of different chitinolytic enzymes [21] (Table 2). Our results indicate that the SSF extract S4 contains mostly β -N-acetylglucosaminidase (active on all substrates) and/or chitobiosidase (active only on pNP-GlcNAc), while exo-chitinase (active only on pNP-(GlcNAc)₂) and endo-chitinase (typically active on pNP-(GlcNAc)₃ and possibly also on pNP-(GlcNAc)₂) had lower activity. Similarly, Florido et al. [28] reported on the prevalence of β -N-acetylglucosaminidase active on the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide in the crude extract of SSF of *Lecanicillium lecanii* grown on shrimp shells.

Several groups have focused on the production of fungal chitinases on different substrates. Matsumoto et al. [30] investigated *Verticillium lecanii* on a mixture of shrimp waste silage and sugar cane pith bagasse and obtained highest activity of *N*-acetylhexosaminidase in a crude dark enzymatic extract. Marin-Cervantes et al. [31] grew *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 and *T. harzianum* on a solid wheat bran-chitin mixture. When their target was a one-step hydrolysis of chitin to *N*-acetylglucosamine, a mixture of *T. harzianum* and *P. aculeatum* enzyme extracts was more effective than any single enzyme preparation [27], revealing the presence of synergistically acting chitin degrading enzymes,

including N-acetylglucosaminidases and/or chitobiases. Silva et al. [17] studied the optimization of the production of chitosanase in solid culture using a mixture of wheat bran and chitosan by *T. koningii*.

According to López-Mondéjar et al. [32], fungal chitinolytic enzymes consist of chitinases and N-acetylglucosaminidases, important during the fungal life cycle for degradation of exogenous chitin and fungal cell-wall remodelling. Ascomycetous filamentous fungi have up to 15 chitinases, but only two extracellular N-acetylglucosaminidases, raising the question of how important the latter enzymes actually are for various aspects of chitin degradation [32]. Analyses of an enzyme pool of *T. atroviride* indicated its capacity to metabolise chitobiose, but only acetylglucosaminidase was essential to use chitin as a nutrient source [32].

For *T. polysporum*, the high activity of extracellular chitobiase and/or β -N-acetylglucosaminidase indicates the conversion of chitin from shrimp shells into small products and its utilisation as a carbon source and suggests the presence of endo-acting chitinases, too. Indeed, the large variability of chitinases from *Trichoderma* species similarly suggests that some of the enzymes seen in IEF zymography will be chitinases which can randomly cleave chitin or chitosan into chito-oligomers. As indicated above, a low complexity of endo-acting enzymes is essential for our goal of producing medium size, partially acetylated chitosan oligomers. The presence of even strong activities of chitobiase and N-acetylglucosaminidase is not particularly troublesome in this respect, as the former will not be active on the target oligomers while the latter will only shorten them to the first glucosamine residue closest to the non-reducing end. Only in the additional presence of a glucosaminidase would this be truly detrimental to the desired COS production.

In a next step, the crude SSF enzyme extract S4 was incubated with polymeric chitosans of different F_A 's, namely F_A 0.15, 0.27, and 0.56, and the resulting oligomeric products were analysed using TLC (Figure 3). As expected and corroborating the presence of chitinases rather than chitosanases, the DP of the products decreased with increasing F_A of the substrate. The major products of the most highly acetylated chitosan were monomers to trimers, while the chitosan with a medium DA yielded mostly dimers to hexamers. In contrast, the chitosan with the lowest DA gave rise to a broad range of oligomers with DPs ranging from one to more than six. Similar results were reported by de Assis et al. [33] who found a small concentration of acetylated dimer to pentamer products when hydrolysing chitosan with F_A 0.15 using an SF enzyme extract of *Metarhizium anisopliae* and by Sørbotten et al. [34] who found higher oligomer lengths for substrates with lower F_A values in the degradation of chitosans with varying degrees of acetylation by bacterial chitinase from *Serratia marcescens* overexpressed in *Escherichia coli*.

The composition of the oligosaccharide mixtures were further analysed using ESI-QTOF-MS (Table 3 and Fig. 4), corroborating the trend of higher DP oligomers resulting from lower F_A polymers, and thus the presence of chitinases rather than chitosanases. Trimers (D_2A_1 , D_1A_2) were detected as the most abundant products in the hydrolysate derived from chitosan with a F_A of 0.56, but dimer (D_1A_1) and tetramer (D_2A_2) as well as traces of other small oligomers were also present. A trimer (D_2A_1), two tetramers (D_3A_1 , D_2A_2) and two pentamers (D_4A_1 , D_3A_2) were the most abundant oligomers in the hydrolysate from chitosan of F_A 0.27, and traces of oligomers with DP 2 to 6 were also seen. Only the chitosan with a F_A of 0.15 yielded products of DP 7 (D_5A_2), but the most abundant CHO in this material were two trimers (D_3 , D_1A_2), a tetramer (D_4), and a

pentamer (D₅). The complete absence of the fully acetylated dimer, which would be expected to occur more abundantly than the larger fully acetylated chitin oligomers, corroborates the presence of chitobiase, and the near absence of other fully acetylated oligomers tends to indicate the presence of low N-acetylglucosaminidase activities. This enzyme is most likely also responsible for the presence of fully deacetylated oligomers which probably result from partial digestion of the products of a chitinase cleaving the glycosidic linkage between a deacetylated and an acetylated unit [35]. Such a cleavage would yield oligomers with a glucosamine unit at the reducing and an N-acetylglucosamine unit at the non-reducing end, which can then be removed by the action of the N-acetylglucosaminidase. The alternative explanation for the occurrence of the fully deacetylated oligomer products, namely the action of a chitosanase cleaving the glycosidic linkage between two deacetylated glucosamine units, is highly unlikely given that such an enzyme would most likely also digest the larger glucosamine oligomers into dimers and trimers [3]. The presence of these fully deacetylated oligomers also proves the absence of a glucosaminidase. All of the major products contain not more than two acetylated units, and almost all of them contain more deacetylated than acetylated units. Most likely, none of the major products contains two adjacent acetylated units which would be the preferred cleavage site of chitinases.

When cells of *R. fruticosus* cells were treated with COS (10 µg mL⁻¹), an oxidative burst response (Fig. 5) was induced. H₂O₂ production reached a peak value in the first 7-14 min of reaction and after this period the generation of H₂O₂ was reduced progressively. Chitosan oligomers induced burst was slightly increased by treatments with

chitosan F_A 0.56 oligomers, but the oxidative burst kinetics did not significantly change compared with the chitosan F_A 0.15 and 0.27 oligomers (Fig. 5).

CHO have been described in a number of useful applications, but detailed understanding of the molecular mechanisms is missing [36]. Currently available evidence suggests that a DP of six and higher is best for biological activities of partially acetylated chitosan oligomers [6]. Thus, the products of the SSF enzyme extract of *T. polysporum* when incubated with a chitosan polymer of low to intermediate F_A may be the best candidates for bioactivity studies. The rapid and transient production of huge amounts of reactive oxygen species, the so-called oxidative burst, is one the earliest reactions of plant cells against pathogen attack [6]. The application of chitosan oligomers induced an oxidative burst, and the elicitor activity increased with increasing F_A of the chitosan polymer. Chitin oligomers are recognized as elicitors by plants such as tobacco, wheat and rice [24]. Chitosan polymers chitosan and chitosan oligomers of different F_A haave shown to induce oxidative burst in suspension cultured cells of the gymnosperm *Araucaria angustifolia* [6]. It was suggested that this action could be due to physicochemical interaction between the COS and cell membrane as a result of their strong positive charge [37]. Studies suggest that some species of fungi develop a strategy to protect cell walls of pathogenic hyphae from hydrolysis by host chitinases, converting chitin into chitosan by de-N-acetylation and avoiding the generation of an autocatalytic defense response system in the invaded host tissue [38]. In our case, the chitosan oligomers elicited the generation of H_2O_2 . The generation and characterization of chitosans oligomers with nonrandom P_A by chitosan modifying enzymes argued the theoretical considerations which the P_A of chitosans could have a major effect on the biological activities of both chitosan polymers

and chitosan oligomers [39]. The preliminary results presented here corroborates this hypothesis, therefore, more experimental verifications must be performed in suspension cultured cells of dicot and monocot angiosperm species with elicitor with different features and concentrations.

4. Conclusions

The use of shells of milled shrimps as SSF substrate is crucial to produce a chitosanolytic enzyme extract by *Trichoderma* with a reduced number of protein bands and consequently less complex than extracts commonly produced by submerged fermentation. Excessive chitosan degradation is avoided and important bioactive COS are generated. The generation of hydrogen peroxide was quantified in suspension cultured cells of *R. fruticosus* elicited with COS. The integrated bioprocess for production of potentially bioactive COS using SSF of wheat bran combined with milled shrimp shells followed by aqueous extraction of crude enzymes and subsequent hydrolysis of partially acetylated chitosan of low to intermediate F_A developed in this work dramatically reduces the complexity and the costs to obtain such bioactive COS, indicating the potential for scaling up the production of high-added value compounds from a waste fraction of the fisheries.

5. Acknowledgements

This research was supported by São Paulo Research Foundation – FAPESP, The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for

the Improvement of Higher Level Personnel (Capes) – German Academic Exchange Service (DAAD) and the European Union (EU) through its PolyModE project.

References

- [1] Wang SL, Lin TY, Yen YH, Liao HF, Chen YJ. Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. Carbohydr Res 2006;341:2507-15.
- [2] Deters A, Petereit F, Schmidgall J, Hensel A. N-Acetyl-D-glucosamine oligosaccharides induce mucin secretion from colonic tissue and induce differentiation of human keratinocytes. J Pharm Pharmacol 2008;60:1-8.
- [3] Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sørli M, Vårum KM, Eijsink VGH. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. Mar Drugs 2010;8:1482–517.
- [4] Liang TW, Chen YJ, Yen YH, Wang SL. The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656. Process Biochem 2007;42:527-34.
- [5] Oliveira Jr EN, El Guedari NE, Moerschbacher BM, Peter MG, Franco TT. Growth of phytopathogenic fungi in the presence of partially acetylated chitooligosaccharides. Mycopathologia 2008;166:163–74.
- [6] dos Santos AL, El Gueddari NE, Moerschbacher BM. Partially acetylated chitosan oligo- and polymers induce an oxidative burst in suspension cultured cells of the gymnosperm *Araucaria angustifolia*. Biomacromolecules 2008;9:3411-15.

- [7] Vander P, Varum KM, Domard A, El Gueddari NE, Moerschbacher BM. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol* 1998;118:1353-9.
- [8] Lee YS, Yoo JS, Chung SY, Lee YC, Cho YS, Choi YL. Cloning, purification and characterization of chitosanase from *Bacillus sp.* DAU101. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;73:113–21.
- [9] Binod P, Sandhya C, Suma P, Szakacs G, Pandey A. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin. *Bioresour Technol* 2007;98:2742-8.
- [10] Archer DB, Wood DA. Fungal exoenzymes. In: Gow NAR, Gadd GM, editors. *The growing fungus*, Hapman & Hall; 1995, p. 137–62.
- [11] Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:43–56.
- [12] Vinale F, Sivasithamparamb K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol Biochem* 2008;40:1–10.
- [13] Felse PA, Panda T. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors – the influence of agitator speed. *Biochem Eng J* 2000;4:115-20.
- [14] Nampoothiri KM, Baiju TV, Sandhya C, Sabu A, Szakacs G, Pandey A. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochem* 2004;39:1583-93.

- [15] Donzelli BGG, Siebert KJ, Harman GE. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and beta-1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Enzyme Microb Technol* 2005;37:82-92.
- [16] Seidl, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev* 2008;22:36 – 42.
- [17] Silva LCA, Honorato TL, Franco TT, Rodrigues S. Optimization of chitosanase production by *Trichoderma koningii* sp. under solid state fermentation. *Food Bioprocess Tech* 2010;published online.
- [18] Deane EE, Whipps JM, Lynch JM, Pederby JF. The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase. *Biochim Biophys Acta*;1383:101-10.
- [19] Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- [20] Trudel J, Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1989;178:362-6.
- [21] Nawani NN, Kapadnis BP. One step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. *J Appl Microbiol* 2001;90:803-8.
- [22] Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp Cell Res* 1968;50(1):151-&.
- [23] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 1962;15:473–97.
- [24] Ortmann I, Conrath U, Moerschbacher BM. Exopolysaccharides of *Pantoea* agglomerans have different priming and eliciting activities in suspension-cultured cells of monocots and dicots. *FEBS Letters* 2006;580:4491–4.

- [25] Warm E, Laties GG. Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry* 1982;21:827–31.
- [26] Ramirez-Coutiño L, Espinosa-Marquez J, Peter MG, Shirai K. The effect of pH on the production of chitinolytic enzymes of *Verticillium fungicola* in submerged cultures. *Bioresour Technol* 2010;101(23):9236–40.
- [27] Lu ZX, Laroche A, Huang HC. Isolation and characterization of chitinases from *Verticillium lecanii*. *Can J Microbiol* 2005;51:1045–55.
- [28] Florido EB, Camilo PB, Reyes LM, Cervantes RG, Cruz PM, Azaola A. β -N-Acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia* 2009;34:356–60.
- [29] Ramírez-Coutiño L, Marín-Cervantes M, Huerta S, Revah S, Shirai K. Enzymatic hydrolysis of chitin for production of N-acetylglucosamine using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochem* 2006;41:1106–10.
- [30] Matsumoto Y, Saucedo-Castañeda G, Revah S, Shirai K. Production of b-N-acetylhexosamidase fo *Verticillium lecanii* by solid state fermentation using shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochem* 2004;39(6):665–71.
- [31] Marin-Cervantes MC, Matsumoto Y, Ramírez-Coutiño L, Rocha-Pino Z, Viniegra G, Shirai KMC. Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. *Process Biochem* 2008;43:24–32.

- [32]López-Mondéjar R, Catalano V, Kubicek CP, Seidl V. The beta-N-acetylglucosaminidases NAG1 and NAG2 are essential for growth of *Trichoderma atroviride* on chitin. FEBS J 2009; 276:5137–48.
- [33]de Assis CF, Araújo NK, Pagnoncelli MGB, da Silva Pedrini MR, de Macedo GR & dos Santos ES. Chitooligosaccharides enzymatic production by *Metarhizium anisopliae*. Bioprocess Biosyst Eng 2010;33(7):893-9.
- [34]Sørbotten A, Horn SJ, Eijsink VGH, Varum KM. Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens* Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. FEBS J 2005;272:538–49.
- [35]Zhao Y, Ju W-T, Park, R-D. Enzymatic Modifications of Chitin and Chitosan. In: Kim S-K, editor. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives, 2010, p. 185-92.
- [36]Kim S-K, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. Carbohydr Polym 2005;62:357–68.
- [37]Kauss H, JeblickW, Domard A. The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. Planta 1989;178:385–92.
- [38]El Gueddari NE, Rauchhaus U, Moerschbacher BM, Deising HB. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. New Phytol 2002;156(1):103-12.
- [39]El Gueddari NE, Schaaf A, Kohlhoff M, Gorzelanny C, Schneider SW, Moerschbacher BM. In Advances in Chitin Science, Proceeding of the 13th International Chitin Chitosan Conference, Antalya, Turkey, 2007 Senel S, Vårum KM, Sumnu MM, Hincal AA. 2007; X:119.

- [40] Lin S-B, Chen S-H, Peng K-C. Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of β -chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. J Sci Food Agric 2008;89:238–44.
- [41] Abd-Aziz S, Sin TL, Alitheen N, Shahab N, Kamaruddin K. Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. J Biol Sci 2008;8:52-9.

Table 1 Medium and type of fermentation for the production of chitosanolytic enzymes.

<i>Medium</i>	<i>Condition of fermentation</i>	<i>Name</i>
TCM	submerged	S1
TCM + 0.5% (w/v) of shrimp shells	submerged	S2
TCM + 0.5% (w/v) of colloidal chitin	submerged	S3
wheat bran and shrimp shells (2:1, w/w) in mineral solution	solid state	S4

TCM (*Trichoderma* complete medium) containing (g/L): bactopectone (1.0), urea (0.3), KH_2PO_4 (2.0), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.4), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.3), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.005), MnSO_4 (0.002), ZnSO_4 (0.002), CoCl_2 (0.002), and glucose (3.0). Solid substrate medium containing wheat bran (2.0 g), shrimp shells (1.0 g), and 2.5 mL of a mineral solution containing 1.0 g/L each of: NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl .

Table 2. Hydrolytic activity of SSF raw enzyme extract S4 towards *p*-NP-(GlcNAc)₁₋₃.

<i>substrate</i>	<i>type of enzyme</i>	<i>enzyme activity</i> ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$)
p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide [pNP-GlcNAc]	β -N-acetylglucosaminidase or chitobiosidase	14
p-nitrophenyl- β -D-N-N'-diacetylchitobiose [pNP-(GlcNAc) ₂]	β -N-acetylglucosaminidase or exo-chitinase	1
p-nitrophenyl- β -D-N-N'-N''-triacylchitotriose [pNP-(GlcNAc) ₃]	β -N-acetylglucosaminidase or endo-chitinase	3

Table 3. Chitosan oligomer profile produced by hydrolysis of chitosans with different F_A 's using the SSF enzyme extract S4, identified by ESI-QTOF-MS; major products are given in bold, products present in trace amounts only are given in parentheses.

F_A of substrate	DP of products						
	1	2	3	4	5	6	7
0.15	D ₁ (A ₁)	D₂	D₃ D₁A₂ D ₂ A ₁	D₄ D ₁ A ₃ D ₂ A ₂ D ₃ A ₁	D₅ D ₄ A ₁ (D ₃ A ₂)	(D ₆) (D ₅ A ₁) (D ₄ A ₂)	(D ₅ A ₂)
0.27		(D ₂) (D ₁ A ₁)	D ₃ D ₁ A ₂ D₂A₁	D ₄ (D ₁ A ₃) D₂A₂ D₃A₁	(D ₅) D₄A₁ D₃A₂ (D ₂ A ₃)	(D ₅ A ₁) (D ₄ A ₂) (D ₃ A ₃)	
0.56	(A ₁)	(D ₂) D ₁ A ₁	D₁A₂ D₂A₁ (A ₃)	(D ₁ A ₃) D ₂ A ₂ (D ₃ A ₁) (A ₄)	(D ₁ A ₄) (D ₃ A ₂)		

Table 4. Advances described by current literature in fungal chitinase and chitosanase as well as chito-oligosaccharide production.

<i>fungus</i>	<i>fermentation</i>	<i>substrates</i>	<i>enzymes</i>	<i>products (major products)</i>	<i>comments</i>
<i>Trichoderma polysporum</i>	SSF in shrimp shell	polymeric chitosans: F _A 0.15 F _A 0.27 F _A 0.56	chitobiase and/or β -N-acetylglucosaminidase; endo-chitinase	depending on substrate: F _A 0.15: DP 1 - >6 (D ₃ , D ₁ A ₂ , D ₄ , D ₅) F _A 0.27: DP 2 - 6 (D ₂ A ₁ , D ₃ A ₁ , D ₂ A ₂ , D ₄ A ₁ , D ₃ A ₂) F _A 0.56: DP 1 - 3 (D ₂ A ₁ , D ₁ A ₂)	enzymes were analysed using pNP-substrates and zymography (chitosan F _A 0.11 and F _A 0.56); products were analysed using TLC and ESI QTOF MS <i>Trichoderma</i> from Brazilian soil (this work).
<i>Verticillium fungicola</i>	SF + chitin	chitosan prepared by partial homogeneous deacetylation of α -chitin, F _A 0.43	CHI1 (Mw 41 kDa; pI 4.5); CHI2 (Mw 46 kDa; pI 7.6)	initially DP 1 and DP 4, later DP 2 - 11 (D ₁ A ₁ , D ₁ A ₂ , D ₂ A ₂ , D ₁ A ₃ , D ₂ A ₃ , D ₃ A ₃)	enzymes were analysed using colloidal chitin and GlcNAc-pNP substrates and zymography;... products were analysed using MALDI-TOF MS [26].
<i>Metarhizium anisopliae</i>	SF + chitosan	chitosan F _A 0.15	chitosanase	during the fungus cultivation: DP 2 – 5 (D ₂ -D ₅) Using the crude extract: DP 1- 6 (D ₁ , D ₂)	enzymes were analysed by determining the reducing sugars generated (DNS method); products were analysed using high-performance liquid chromatography (HPLC) [33].
<i>Lecanicillium (Verticillium) lecanii</i> ATCC 26854	SSF in shrimp shell	there was no production of COS.	β -N-acetylglucosaminidases	there was no production of COS.	enzymes were analysed using GlcNAc-pNP substrate and zymography [28].
<i>Trichoderma harzianum</i>	SF + colloidal chitin	α -chitosan F _A 0.26; β -chitosan: F _A 0.10 F _A 0.17 F _A 0.30	chitinases	F _A 0.26: DP 1-6 (A ₂) F _A 0.10: DP 1-6 (A ₂ , A ₃)	enzymes were analysed using enzyme activity of colloidal α -chitin-induced crude chitinases by DNS method; products were analysed using HPLC, TLC and viscosity average MW [40].

<i>Trichoderma virens</i> UKM1	SF + chitin substrates	colloidal chitin, sun dried ground and sun dried unground shrimp shells	exochitinase and endochitinase	glucosamine, N-acetylglucosamine, chitobiose and chitotriose	enzymes were analysed by DNS method; products were analysed using HPLC [41].
<i>Penicillium aculeatum</i> NRRL 2129 and <i>Trichoderma harzianum</i> TUBF 927	SSF in agro-industrial residues	colloidal chitin	chitobiase and endochitinase	N-acetyl-D-glucosamine	enzymes were analysed using colloidal chitin and GlcNAc-pNP substrates; products were analysed using TLC and HPLC [19].

Figure Captions

Fig. 1 (a) SDS-PAGE analysis of the proteins present in enzymatic extracts of *Trichoderma polysporum*. (b) Zymography of chitosanolytic enzymes produced during SSF and submerged fermentation (SF) in a gel containing 0.01% (w/v) chitosan F_A 0.11. (c) Zymography of chitosanolytic enzymes produced during SSF and SF in a gel containing 0.01% (w/v) chitosan F_A 0.56. M – protein molecular marker; S1 – extract of SF from *Trichoderma* complete medium (TCM); S2 – extract of SF (TCM + shrimp shell); S3 – extract of SF (TCM + colloidal chitin); S4 – extract of SSF (filtration in paper filter and centrifugation); CTN – chitosanase standard.

Fig. 2 Isoelectric focusing of S4 (SSF) raw enzyme extract followed by activity staining using an overlay gel containing chitosan: (a) Chitosan F_A 0.11; (b) Chitosan F_A 0.56.

Fig. 3 TLC analysis of chitosan oligomer profile produced by hydrolysis of chitosans F_A 0.15, 0.27 and 0.56 by enzyme extract S4 (SSF). Standards are listed from top to bottom: (A) N-acetylglucosamine standards DP 1, 3, 4, 5 and 6; (D) glucosamine standards DP 1, 2, 3, 4, 5 and 6; (1) Chitosan F_A 0.15 oligomers; (2) Chitosan F_A 0.27 oligomers; (3) Chitosan F_A 0.56 oligomers.

Fig. 4 ESI QTOF MS of the oligosaccharides: (a) Chitosan F_A 0.15 oligomers; (b) Chitosan F_A 0.27 oligomers; (c) Chitosan F_A 0.56 oligomers. Note: Only peaks corresponding to oligosaccharides are listed; unidentified components are not shown.

Fig. 5 Time-response curves of H_2O_2 generation by suspension cultured cells of *R. fruticosus* elicited with chitosan oligosaccharides F_A 0.15, 0.27 and 0.56 in a concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. ($\circ$) Chitosan F_A 0.56 oligomers; ($\square$) Chitosan F_A 0.27 oligomers; ($\blacksquare$) Chitosan F_A 0.15 oligomers; ($\bullet$) Buffer.

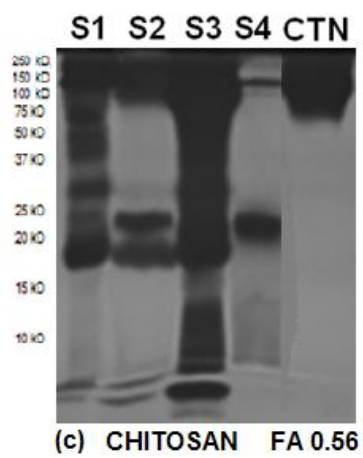
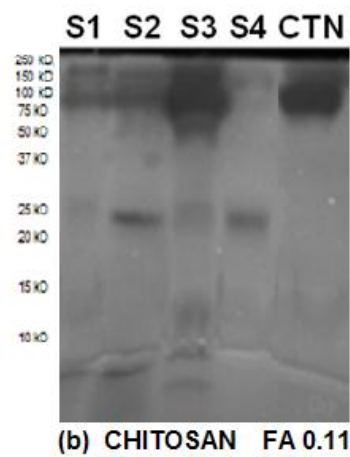
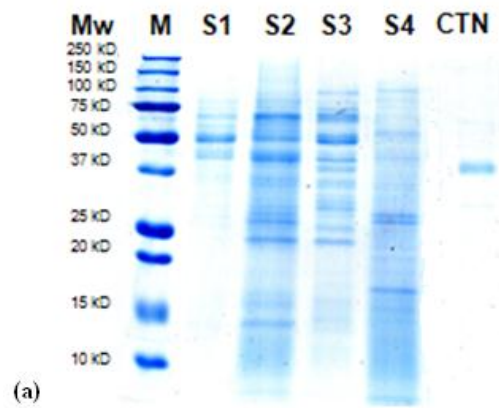


Figure 1

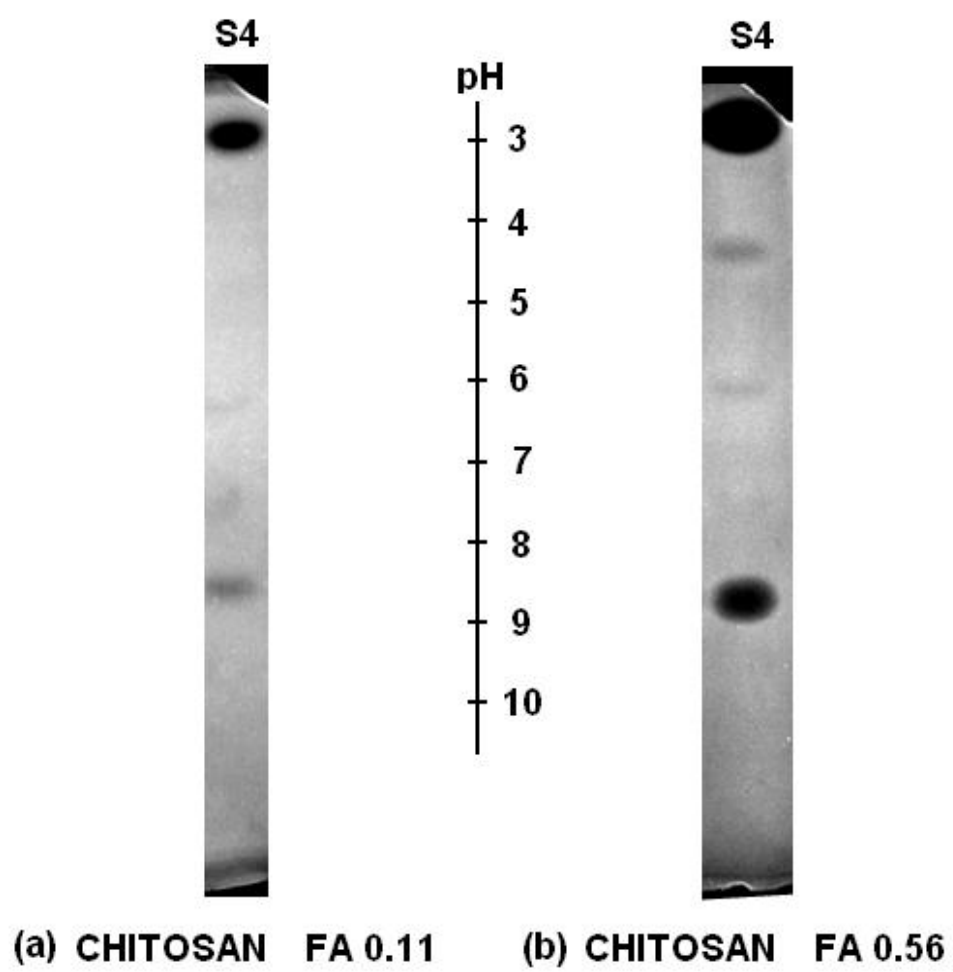


Figure 2

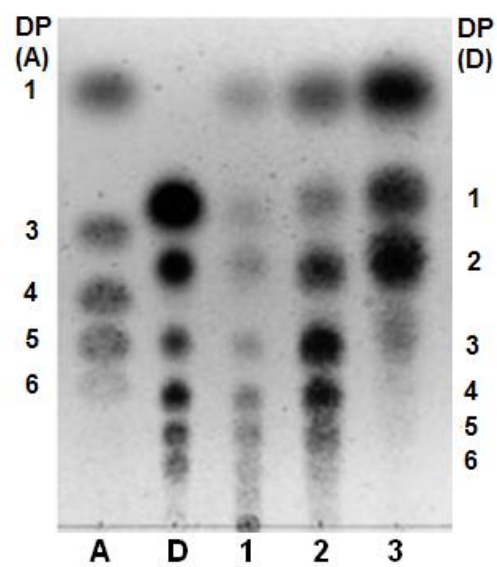
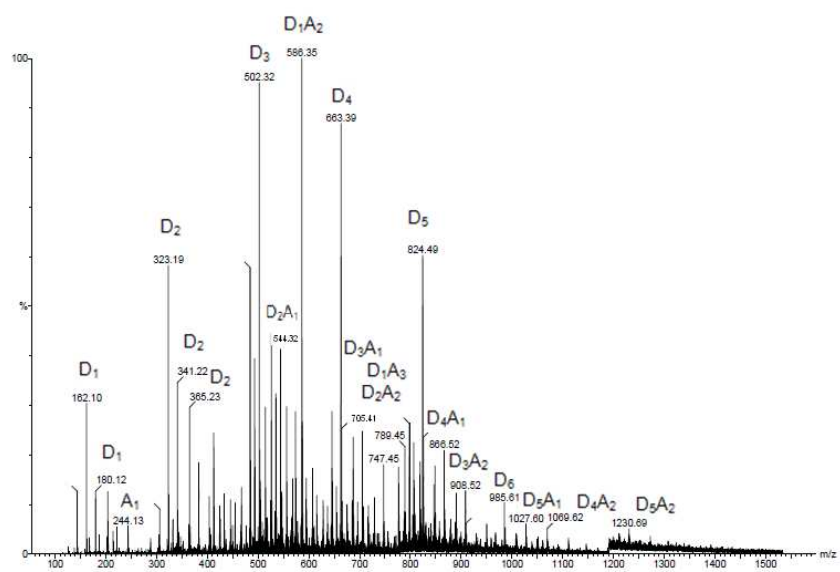
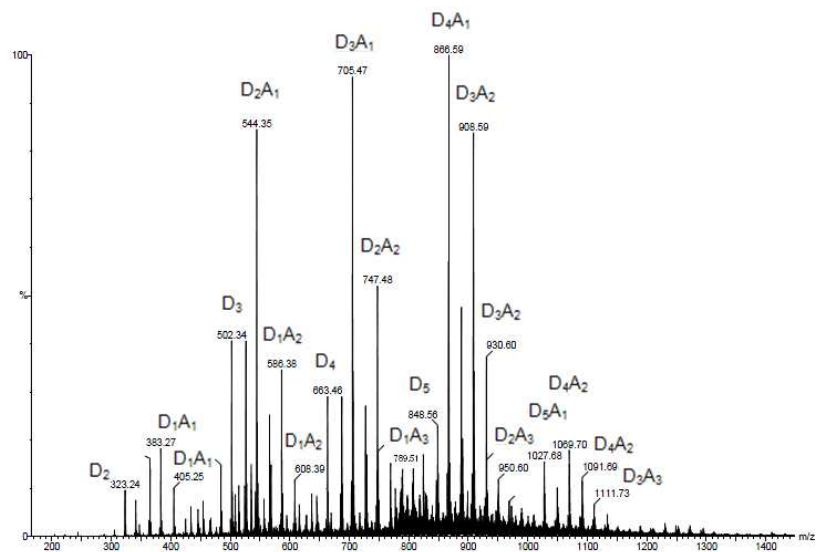


Figure 3

(a)



(b)



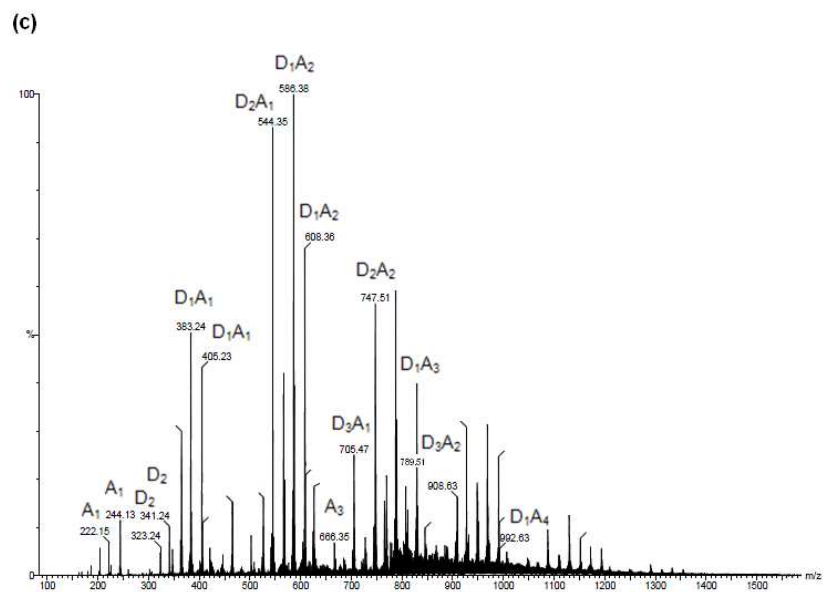


Figure 4

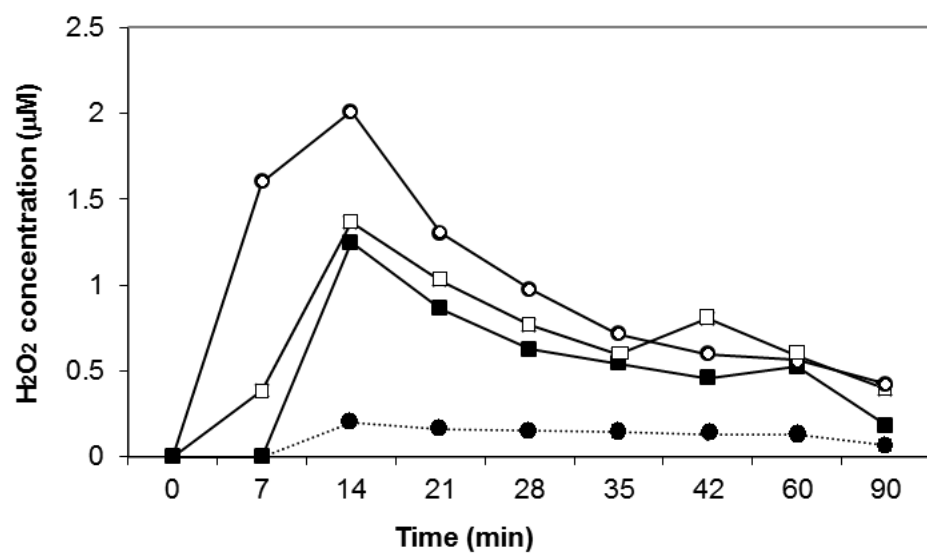


Figure 5

APÊNDICE II

Optimization of Chitosanase Production by *Trichoderma koningii* sp. Under Solid-State Fermentation

Luis C. A. da Silva · Talita L. Honorato ·
Telma T. Franco · Sueli Rodrigues

Received: 12 June 2010 / Accepted: 17 November 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract This study aimed at the optimization of the production of chitosanase in solid culture. *Trichoderma koningii* sp., an entomopathogenic fungus, was used to produce chitosanase under solid-state fermentation using a mixture of wheat bran and chitosan. The incubation period; addition of moistening water and culture medium composition were optimized. The protocol to extract the enzyme was also optimized. The optimal conditions for chitosanase production by *T. koningii* were obtained using a mixture of 3.0 g of wheat bran and 1.5 g of chitosan, with the addition of 2.5 mL of moistening water (pH 5.5) and of 2.5 mL of saline solution (pH 5.5) containing NaNO₃ (1.0 g/L), (NH₄)₂HPO₄ (1.0 g/L), MgSO₄·7H₂O (1.0 g/L), and NaCl (1.0 g/L). Optimal enzyme extraction was carried out adding 20 mL of sodium acetate buffer (200 mM, pH 5.5) at 30 °C under orbital agitation at 150 rpm for 6 min. The optimized production yielded 4.84 IU/gds.

Keywords Solid-state fermentation · Chitosanase · *Trichoderma koningii* · Response surface methodology · Process optimization

Introduction

Chitin is the second most abundant polysaccharide with an annual production of 10¹⁰ to 10¹¹ tons (Wang et al. 2006). Chitin and chitosan are commercially obtained from shrimp and crab shells, which waste from the seafood industry. Chitosan, a D-glucosamine polymer, is a totally or partially deacetylated derivative of chitin. Chitosan is usually obtained by deacetylation of chitin with alkali (Wang et al. 2006). Recent studies on chitin and chitosan have drawn interest for their conversion into oligosaccharides. These oligosaccharides are water-soluble and present antitumor and antimicrobial activities (Suzuki et al. 1986; Wang et al. 2008). Traditionally, chitosan-derived oligosaccharides were obtained by chemical methods. These chemical processes produce a large amount of short-chain oligosaccharides, have low yields, have high separation cost, and are not environmentally friendly. Alternatively, chitosanase hydrolysis became more popular in recent years because of low production cost, low environmental impact, and high reproducibility (Su et al. 2006; Lee et al. 2006).

Chitosanases (E.C. 3.2.1.132) hydrolyze the β-1,4-glycosidic linkage of chitosan, a polysaccharide consisting mainly of D-glucosamine with a variable content of N-acetyl-D-glucosamine. The oligosaccharides of chitin/chitosan, prepared by hydrolyzing chitin/chitosan with chitinase/chitosanase, have several potential applications in the food industry, agriculture, and in the pharmaceutical industry (Aam et al. 2010; Xia et al. 2010).

Chitosanases are still unavailable in bulk quantities for commercial applications (Lee et al. 2008) and several enzymes, such as lysozyme, cellulase, hemicellulase, proteases, and lipase have been used in chitosan hydrolysis (Lin et al. 2009; Lee et al. 2008).

L. C. A. da Silva · S. Rodrigues (✉)
Departamento de Tecnologia de Alimentos,
Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici—Bloco 858,
Caixa,
Postal 1268, 60021-970, Fortaleza, CE, Brazil
e-mail: sueli@ufc.br

T. L. Honorato · T. T. Franco
Departamento de Processos Químicos,
Universidade Estadual de Campinas,
Caixa,
Postal 6066, 13081-970, Campinas, SP, Brazil

Trichoderma species are among the most frequently isolated soil fungi and are present in plant root ecosystems (Harman et al. 2004). These fungi are opportunistic, non-virulent plant symbionts, and function as parasites and antagonists of many phytopathogenic fungi, protecting plants from disease. So far, *Trichoderma* species are among the most studied BCA fungi, and it is commercially marketed as biopesticides and biofertilizers (Harman 2000; Harman et al. 2004; Bionod et al. 2007; Vinale et al. 2008). Its entomopathogenicity is closely related to its ability to synthesize hydrolytic enzymes. Several studies on the production *Trichoderma* chitinase have been published (Deane et al. 1999; Felse and Panda 1999; Felse and Panda 2000; Nampoothiri et al. 2004; Donzelli et al. 2005), and most studies are related to *Trichoderma harzianum*. To date, there are no reports on the production of chitosanase or chitinase by *Trichoderma koningii* sp.

Solid-state fermentation is a suitable technology for the development of several bioprocesses and products, including large-scale production of industrial enzymes (Oberoi et al. 2010). Herein, the fermentation process parameters were optimized aiming the maximal production of extra-cellular chitosanase by *T. koningii* under solid-state fermentation using a mixture of wheat bran and chitosan as substrate.

Materials and Methods

Microorganisms and Maintenance

The fungal strain (*T. koningii* sp.) used in this work belongs to the collection of Embrapa Semi-Arido (Petrolina, PE, Brazil) and was isolated as a biocontrol agent. The suspension of spores was obtained growing the fungus on wheat bran at 30 °C for 7 days and harvesting the spores with 0.01% (v/v) Tween-80 in distilled water. The spore count was adjusted to 1×10^7 spores/mL. The fungus was maintained in spore supported in wheat bran at 4 °C (Cavalcante et al. 2008).

Determination of Optimal pH for Microbial Growth

The optimal pH for microbial growth was determined by fungal radial growth in chitosan detector agar (CDA). The CDA was prepared by mixing 1.3 g/L of Na_2HPO_4 ; 3.0 g/L of KH_2PO_4 ; 0.5 g/L of NaCl; 1.0 g/L of NH_4Cl ; 0.24 g/L of MgSO_4 ; 0.01 g/L of CaCl_2 ; 20 g/L of agar, and 10 g of chitosan dissolved in acetic acid 1% (v/v). The pH was adjusted to 4.5, 5.5, or 6.5 with NaOH. The culture medium was sterilized at 121 °C for 15 min and used in Petri dishes. After cooling and solidification of the agar, *T. koningii* sp. spores were inoculated at the center of the agar and incubated at 30 °C for 5 days. The microbial growth was

accompanied by the radial mycelium growth in the Petri dish.

Optimization of Chitosanase Production

The fungal (*T. koningii* sp.) was cultivated in solid substrate containing wheat bran, commercial chitosan, and 2.5 mL of a saline solution containing NaNO_3 (1.0 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1.0 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 g/L); and NaCl (1.0 g/L). The pH of the saline solution was adjusted to 5.5 because the best microbial growth in CDA plates was observed at this pH value. The amount of wheat bran, chitosan, and moistening water (pH 5.5) were changed according to a faced centered central composite experimental design (Table 2). The medium was autoclaved at 121 °C for 15 min, cooled, and inoculated with 1 mL of spore inoculums, prepared as described above, and incubated statically at 30 °C for 72 hours. Samples were taken after 48 and 72 hours of fermentation. Assays were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks covered with cotton plugs.

Wheat bran was purchased from the local market (Mercado São Sebastião, Fortaleza, CE, Brazil) and presented an ash content of $1.47 \pm 0.05\%$ (w/w), determined according to AOAC methodology (AOAC 2010).

Commercial chitosan, from shrimp shell with 80% of deacetylation degree, 0.23% (w/w) of ash, and MW of 2×10^6 kDa was purchased from Polymar (Fortaleza, CE, Brazil). Based on the results obtained from the first experimental design (Table 2), a second experimental design was built, where chitosan and moistening water were changed according to a central composite rotated design. The central point was set as the best result found in the first experimental design (Table 3). Functional relationships (fitted regression models) between the responses and the factors were expressed by a second-degree polynomial function, obtained by multiple regressions, as presented in Eq. 1. The moisture content of the optimized culture medium was determined according to the AOAC method (AOAC 2010).

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Where: Y_i is the response variable; β_0 is a constant; β_i is the coefficient for the linear effect; β_{ii} is the coefficient for the quadratic effect; β_{ij} is the coefficient for the interaction effect, and X_i and X_j are the independent variables.

Enzyme Extraction

The content of each Erlenmeyer flask was mixed with 20 mL of sodium acetate buffer solution (200 mM, pH 5.5).

The flasks were gently hand shaken at room temperature for 1 min, and the liquid was filtrated in Whatman n° 1 filter paper. The filtrate was immediately used to determine the chitosanase activity. All experiments were carried out in duplicate, and the enzyme assay was done in triplicate. Results were expressed as mean $\pm$ SD.

Enzyme Activity Assay

Chitosanase activity was measured in culture filtrates at the optimum assay conditions, previously determined (pH 5.5 and 50 °C), using a solution containing 0.4% (w/v) of chitosan dissolved in sodium acetate buffer (200 mM, pH 5.5) as substrate. The assay was carried out by mixing 100 μ L of the crude enzyme with 400 μ L of substrate and incubating for 60 min at 50 °C. Enzyme activity was determined by measuring the released reducing sugar by DNS method (Miller 1959). A blank was done, and the released reducing sugar was determined by measuring the reducing sugar presented in the sample aliquot before and after the incubation period. The difference between the final reducing sugar content and the initial content was used to calculate the enzyme activity.

The results were expressed as international unit per gram of dry substrate (IU/gds). As dry substrate, the sum of chitosan and wheat bran was considered. One IU is the amount of enzyme that releases 1 μ mol of reducing sugar per minute at the assay conditions.

Optimization of the Enzyme Extraction

After optimizing the fermentation parameters, the enzyme extraction protocol was optimized beginning with optimizing the temperature. Enzyme extraction was carried out as described above using the buffer solution at temperatures ranging from 4 °C to 50 °C. After the temperature selection, a 2² central composite experimental design was carried out to optimize the extraction time and agitation at the best temperature determined previously (30 °C).

Specific Activity

Total protein in the crude extract was quantified by the Bradford methodology (Bradford 1976). Results were expressed as IU per unit of milligram of protein (IU/mg) in the crude extract.

Statistical Analysis

The software Statistica 7.0 (Statsoftware) was used to build and analyze the experimental designs (ANOVA, *F* test, and *R*²).

Results and Discussions

Optimization of Chitosanase Production by Response Surface Methodology

Table 1 presents the microbial radial growth in CDA. The culture medium with pH adjusted to 5.5 presented the best microbial growth. Table 2 presents the experimental design carried out to optimize the production of chitosanase by *T. koningii* in solid-state fermentation. According to the results, the enzyme activity decreased after 48 hours of fermentation in all assays probably due to the beginning of the fungi sporulation at the assays conditions. Thus, the data obtained for 72 hours of fermentation was not analyzed. Before 48 hours, no enzyme production was observed, and after 72 hours, the fungi sporulated.

Table 3 presents the effects of independent variables on enzyme activity obtained at 48 hours of fermentation. The solid-state fermentation of *T. koningii* (48 hours) yielded chitosanase activities ranging from 0.73 to 2.09 IU/gds in the first experimental planning.

An increase of chitosan amount in the solid medium enhanced the production of enzyme (positive linear effect) while the increase of wheat bran did not favor the production of enzyme (negative linear effect). Chitosan acts as an enzyme inducer, while wheat bran was added to the culture medium because of its high ability to absorb water (Cavalcante et al. 2008). Wheat bran was added to the culture medium because the use of chitosan alone is not suitable for solid-state fermentation. Chitosan is a fine powder with low water retention. Wheat bran was necessary to provide moisture and to increase the medium porosity allowing the solid-state fermentation process. Wheat bran may also be used for production of other enzymes by fungi species. Thus, high amounts of wheat bran may shift the microbial metabolism to the production of other enzymes such as cellulases; proteases, and amylases instead of chitosanase (Hashemi et al. 2010; Lima et al. 2005; Romero et al. 1999). The increase of chitosan and wheat bran decreased the enzyme activity (negative interaction) due to the inhibition effect of high amounts of chitosan, which presented a negative quadratic effect. However, the interaction effect of water and chitosan was positive on enzyme production.

The quadratic effect of water was negative and statistically significant, meaning that the addition of high amounts

Table 1 *T. koningii* radial growth in CDA

pH	Radial growth, (mm)
4.5	64 $\pm$ 2
5.5	73 $\pm$ 3
6.5	55 $\pm$ 2

Table 2 Experimental design and chitosanase activity (first experimental design)

Assay	Wheat bran (g)	Chitosan, g	H ₂ O, mL	Enzyme activity, IU/gds, 48 hours	Enzyme activity, IU/gds, 72 hours
1	3	0.5	1.5	1.16±0.05	0.80±0.01
2	3	0.5	3.5	0.83±0.14	0.38±0.03
3	3	1.5	1.5	1.79±0.02	0.56±0.04
4	3	1.5	3.5	2.09±0.14	1.08±0.04
5	7	0.5	1.5	0.73±0.08	0.56±0.04
6	7	0.5	3.5	0.90±0.12	0.59±0.21
7	7	1.5	1.5	0.87±0.05	0.36±0.08
8	7	1.5	3.5	1.50±0.02	0.88±0.09
9	3	1.0	2.5	1.62±0.03	0.79±0.01
10	7	1.0	2.5	1.34±0.04	0.86±0.13
11	5	0.5	2.5	1.06±0.02	0.77±0.08
12	5	1.5	2.5	1.55±0.08	0.96±0.17
13	5	1.0	1.5	1.04±0.09	0.69±0.02
14	5	1.0	3.5	1.15±0.08	0.67±0.01
15	5	1.0	2.5	1.71±0.16	0.48±0.12
16	5	1.0	2.5	1.32±0.08	0.68±0.04
17	5	1.0	2.5	1.34±0.12	0.73±0.09

of moistening water reduced the excretion of enzyme due to the moisture effect on microbial growth and spore formation. According to a previous published work on *Trichoderma* sp. cultivation in solid-state, the substrate, the moisture content, and the water activity affect the fungi growth and spore formation. *T. koningii* cultivated in wheat bran showed a non-linear relationship between spore formation and the culture medium moisture (Cavalcante et al. 2008).

The coefficients of the fitted mode are presented in Table 6. The ANOVA and the *F* test showed that the model was statistically significant at confidence level of 95% because the calculated *F* value ($F_{9,7}=13.80$) was higher

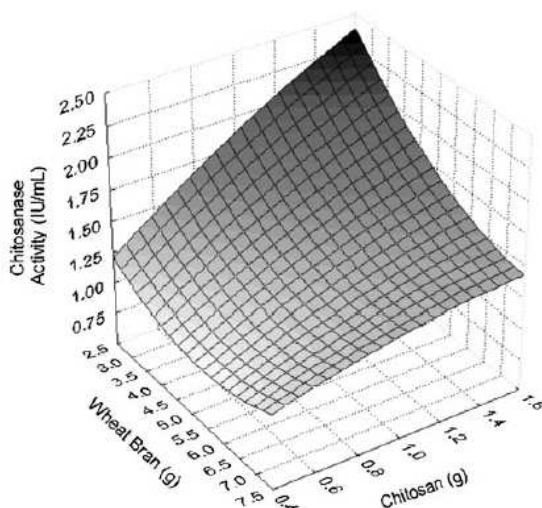
than the listed *F* value ($F_{9,7}=3.67$) with R^2 value of 0.9334 (Rodrigues et al. 2006; Honorato et al. 2007). Figures 1, 2, and 3 present the response surface graphs built using the fitted model.

According to the response graphs, the enzyme production was enhanced at high chitosan levels and low wheat

Table 3 Effects of the independent variables on chitosanase activity (48 hours of fermentation)

Factor	Effect	Standard error
Mean/interception	1.4024 ^a	0.0622
Wheat bran (L)	-0.4137 ^a	0.0920
Wheat bran (Q)	0.2440	0.1779
Chitosan (L)	0.6078 ^a	0.0920
Chitosan (Q)	-0.1019	0.1779
Water (L)	0.1941	0.0920
Water (Q)	-0.5214 ^a	0.1779
Wheat bran×chitosan	-0.2631 ^a	0.1029
Wheat bran×Water	0.1864	0.1029
Chitosan×water	0.2993 ^a	0.1029

^a Statistically significant at 95% of confidence interval

**Fig. 1** Enzyme activity as function of wheat bran and chitosan obtained in the first experimental design after 48 hours of fermentation (water=2.5 mL)

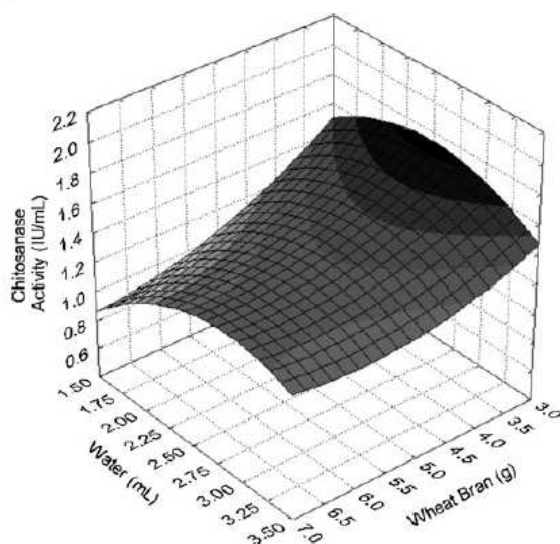


Fig. 2 Enzyme activity as function of wheat bran and water obtained in the first experimental design after 48 hours of fermentation (chitosan=1.0 g)

bran levels. The enzyme activity was maximized at the surface graph edge (1.5 g of chitosan and 3.0 g of wheat bran; Fig. 1). This behavior depicts the inducer effect of chitosan on the excretion of the enzyme, which is in agreement to the inductor effect of chitin, previously reported for the production of chitinase by *Trichoderma* spp. (Nampoothiri et al. 2004; Donzelli et al. 2005; Bionod et al. 2007). The addition of water to the solid medium in the range of 2.0 and 3.0 mL, when low amounts of wheat bran (3.0 g) were applied, maximized the enzyme activity (Fig. 2). The RSM (response surface methodology) confirmed that the highest enzyme production was obtained by adding water in the range of 2.0–3.0 mL to the solid medium containing 1.5 g of chitosan and 3.0 g of wheat bran (Fig. 3). The addition of moistening water directly affected the solid moisture content, which is a key factor on solid-state microbial growth and spore formation. Water also contributes to chitosan solubilization and availability. Based on these results, a second experimental design changing only the amount of moistening water and chitosan was carried out to optimize these factors, maintaining the amount of wheat bran constant at 3.0 g.

The second experimental design and the enzyme activities obtained for 48 and 72 hours of fermentation are presented in Table 4. The decrease in enzyme activity was observed in some assays for 72 hours of fermentation. However, unlike what was observed in the first experimental design, in some experimental runs, similar activities were obtained for both fermentation periods. This behavior might be attributed to the effect of moisture and water

activity in fungi spore formation (Cavalcante et al. 2008) and on chitosan solubilization. Higher enzyme activities were obtained in the second experimental design when compared with the results of the first experimental design. This behavior is explained by the experimental domain that was closer to the optimal region.

Table 5 presents the effects of the independent variables on enzyme activity. All independent variables presented significant effect on the production of enzyme. The interaction between chitosan and water was not statistically significant. The regression coefficients for RSM models obtained from the second experimental design are presented in Table 6. Both fitted models were statistically significant at 95% of confidence level, presenting calculated F values of 23.47 for 48 hours of fermentation and 13.07 for 72 hours of fermentation, which were higher than the listed F value ($F_{5,5}=5.05$) (Rodrigues et al. 2006; Honorato et al. 2007). The fitted model presented R^2 values of 0.9587 and 0.9336, respectively, for 48 and 72 hours of fermentation. Figs. 4 and 5 present the response surface graphs built using the fitted models.

A clear maximal was obtained at the center of surface graph (1.5 g of chitosan and 2.5 mL of water) for 48 hours of fermentation. The maximal activity range for 72 hours of fermentation shifted the maximal activity to different amounts of water (2.0–3.5 mL). Lower enzyme activities were obtained at the maximal region depicted by the surface graph obtained from the data for 72 hours of fermentation indicating that 48 hours of fermentation was enough for the fermentation process. Moisture of the optimum solid-state culture medium

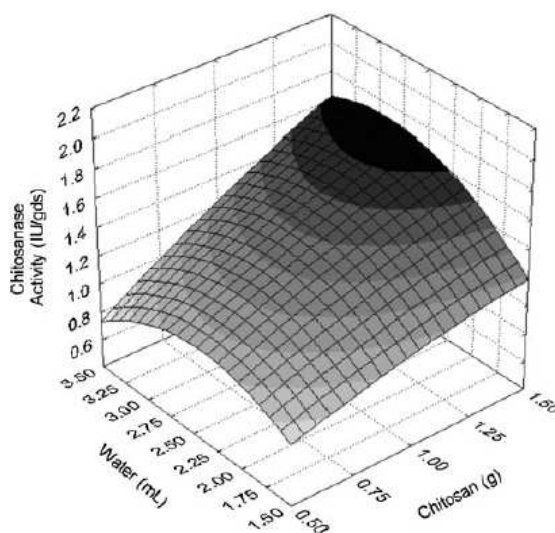


Fig. 3 Enzyme activity as function of chitosan and water obtained in the first experimental design after 48 hours of fermentation (wheat bran=5.0 g)

Table 4 Experimental design and chitosanase activity (second experimental design)

Assay	Chitosan, g	H ₂ O, mL	Enzyme activity, IU/gds, 48 hours	Enzyme activity, IU/gds, 72 hours
1	1.0	1.5	1.98±0.11	1.98±0.02
2	1.0	3.5	2.77±0.09	2.42±0.07
3	2.0	1.5	2.02±0.06	1.55±0.12
4	2.0	3.5	2.25±0.01	1.52±0.07
5	0.8	2.5	2.35±0.10	1.61±0.05
6	2.2	2.5	2.00±0.06	1.29±0.05
7	1.5	1.0	2.37±0.04	1.62±0.14
8	1.5	4.0	2.37±0.25	2.70±0.30
9	1.5	2.5	3.66±0.07	2.78±0.05
10	1.5	2.5	3.44±0.09	2.80±0.09
11	1.5	2.5	3.56±0.07	2.96±0.18

(containing 3.0 of wheat bran, 1.5 g of chitosan, 2.5 mL of described saline solution, and 2.5 mL of moistening water) was $51.47 \pm 0.60\%$ according to the AOAC methodology (AOAC 2010).

Effect of Temperature on the Extraction of Enzyme

Fig. 6 presents the effect of temperature on the extraction of enzyme. The extraction carried out at 4 °C reduced the enzyme activity compared with the activity obtained near to room temperature (20 °C to 30 °C). This result might be attributed to the lower enzyme solubility at low temperature. Applying extraction temperatures higher than 30 °C also reduced the enzyme activity. Further assays were carried out at 30 °C because no statistically significant differences were observed for extraction carried out at 20 °C and 30 °C.

Optimization of Enzyme Extraction by Response Surface Methodology

Table 7 shows the results obtained from the experimental design carried out to optimize the enzyme extraction time and agitation. Table 8 presents the effects on enzyme

activity in the crude extracts and the regression coefficients of the fitted polynomial model. The strongest effect on enzyme extraction was the time.

According to ANOVA and *F* test, the fitted model was statistically significant at 95% level of confidence. The *R*² value was 0.8966 and the calculated *F* value was 8.71, which was higher than the listed *F* value (*F*_{5,5}=5.05).

Figure 7 presents the surface response graph obtained for enzyme activity as a function of extraction time and agitation. Enzyme extraction is a mass transfer phenomenon between the fermented solid matrix and the extraction solvent (buffer solution). The process is usually enhanced by agitation, and the mass transfer stops when the equilibrium between the solid and the liquid is reached. For the particular case of enzyme extraction, additional care must be taken to avoid enzyme denaturation caused by long periods of agitation. No significant differences were observed on enzyme activity for extraction times higher than 6 min at 150 rpm (Fig. 7) Thus, the extraction carried out for 6 min at 150 rpm was considered the optimum operating condition for chitosanase extraction at 30 °C, a condition that yielded an activity of 4.84 ± 0.13 IU/gds (~1.08 IU/mL in the liquid extract with a total protein content of 10.1 ± 1.2 µg/mL).

Table 5 Effects of the independent variables on chitosanase activity

Factor	48 hours of fermentation		72 hours of fermentation	
	Effect	SE	Effect	SE
Mean	3.5534 ^a	0.1070	2.8490 ^a	0.1320
Chitosan (L)	-0.2460 ^a	0.1318	-0.4487 ^a	0.1626
Chitosan (Q)	-1.4436 ^a	0.1599	-1.4075 ^a	0.1971
Water (L)	0.2410 ^a	0.1272	0.4766 ^a	0.1569
Water (Q)	-1.0800 ^a	0.1422	-0.5956 ^a	0.1754
Chitosan × water	-0.28212	0.1855	-0.2330	0.2288

^a Statistically significant at 95% of confidence interval

Table 6 Regression coefficients of RSM model

Factor	Y_1	Y_2	Y_3
Mean	0.67	-7.30	-6.14
Wheat bran (L)	-0.39	—	—
Wheat bran (Q)	0.03	—	—
Chitosan (L)	0.92	9.12	8.57
Chitosan (Q)	-0.20	-2.88	-2.81
Water (L)	0.86	3.24	2.08
Water (Q)	-0.26	-0.54	-0.30
Wheat bran×chitosan	-0.13	—	—
Wheat bran×water	0.05	—	—
Chitosan×water	-0.13	-0.28	-0.23

Y_1 enzyme activity for 48 hours of fermentation (first experimental design), Y_2 and Y_3 enzyme activity for 48 and 72 hours, respectively (second experimental design)

The specific activity of chitosanase in the crude extract was 108 IU/mg.

Chitosanase can be produced constitutively, and inducible and fungal chitosanase might play a role in a process of cell division or autolysis (Somashekar and Joseph 1996; Alfonos et al. 1992). According to the results presented in this work, chitosan can act as an enzyme inducer and as an inhibitor of enzyme excretion depending on the amount of chitosan used in the solid culture medium (Fig. 4). This inhibitor effect was not

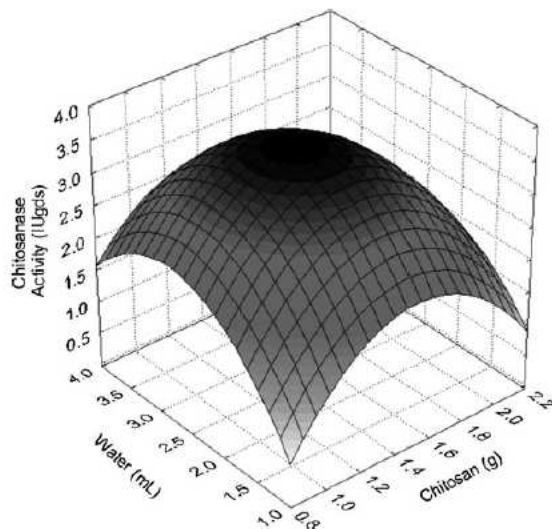


Fig. 4 Enzyme activity as function of chitosan and water obtained in the second experimental design (carried out with 3 g of wheat bran) after 48 hours of fermentation

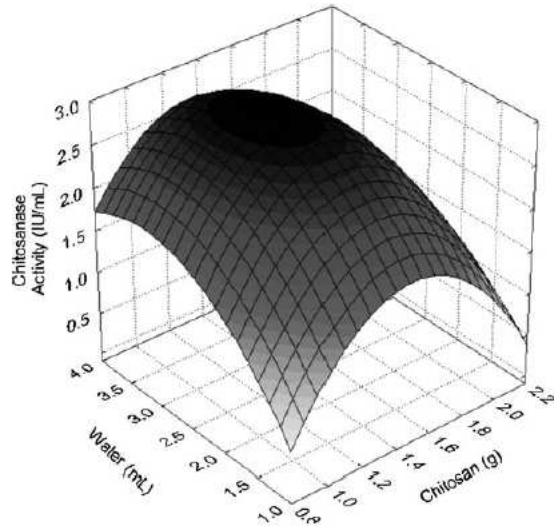


Fig. 5 Enzyme activity as function of chitosan and water obtained in the second experimental design after 72 hours of fermentation

previously reported for the production of chitinase by *Trichoderma* using chitin as inducer and might be related to the antifungal effect of chitosan that was previously reported by several authors and that will be subject of future investigations.

It is difficult to compare the results obtained herein to other published works on chitosanase production under solid-state fermentation by *Trichoderma* species because the published studies with these fungi have been focused on the production of chitinase and cellulases due to their biocontrol ability against insects and other plant pathogens.

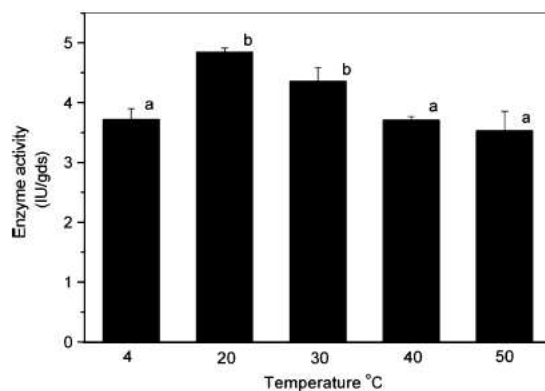


Fig. 6 Enzyme activity as function of temperature of extraction (different letters means significant differences at 95% of confidence level according to the Tukey's test)

Table 7 Experimental design and chitosanase activity (enzyme extraction parameters optimization)

Assay	Extraction Time (min)	Agitation (rpm)	Enzyme Activity (IU/gds) 48 hours
1	2	50	2.86±0.31
2	2	150	3.90±0.04
3	10	50	3.97±0.35
4	10	150	5.22±0.04
5	2	100	3.08±0.14
6	10	100	4.08±0.32
7	6	50	3.56±0.15
8	6	150	4.84±0.13
9	6	100	4.48±0.08
10	6	100	4.40±0.04
11	6	100	4.32±0.01

Assays carried out at 30 °C

Ike et al. (2007) reported the production of a cellobiohydrolase from recombinant *Trichoderma reesei* and *Aspergillus oryzae* with chitosanase activity for enzyme production in submerged fermentation with yields in the range of 0.030 to 0.080 U/mL-culture. For *T. reesei*, the same authors reported chitosanase excretion of approximately 0.23 mg/mL-culture in 6 days of fermentation. The substrate consisted of purified chitosan with a high degree of deacetylation (> 98%), and the activity assay was carried out at pH 5.0. Zhou et al. (2008) reported the production of 0.8 IU/mL of chitosanase from *Gongronella* sp. in submerged fermentation applying chitosan as inducer. Nampoothiri et al. (2004) reported a maximal production of 3.18 IU/gds of chitinase by solid-state fermentation of *Trichoderma harzianum* using yeast extract as nitrogen source after 96 hours of fermentation.

Comparing the maximal enzyme activity obtained at the optimized conditions (4.84 IU/gds or 1.08 IU/mL) to the previous values reported for chitosanase and chitinase production (Nampoothiri et al. 2004; Ike et al. 2007; Zhou et al. 2008), chitosanase production by *T. koningii* sp.

yielded higher enzyme activity with lower processing times (48 hours of fermentation).

Conclusions

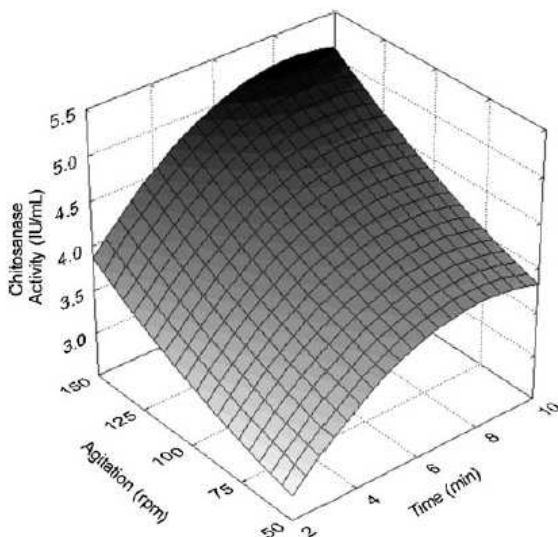
Trichoderma species have been studied for the production of chitinases and cellulases because of their cell-wall-degrading enzymes associated to their plant–pathogen interaction such as insect's chitin–exoskeleton attack and perforation.

T. koningii sp. is a suitable strain to produce chitosanase enzymes by solid-state fermentation. After optimization of the enzyme production, the processing yield was enhanced 2.3 times the maximal yield found in the first

Table 8 Effects of the independent variables on chitosanase activity (enzyme extraction optimization design) and regression coefficients of RSM model

Factor	Estimated effects		Regression coefficients (Fitted model)
	Effect	SE	
Mean	4.4024 ^a	0.1737	1.37
Extraction time (L)	1.1411 ^a	0.2764	0.54
Extraction time (Q)	−1.1533 ^a	0.4254	3.0×10^{-2}
Agitation (L)	1.1920 ^a	0.2764	7.0×10^{-5}
Agitation (Q)	0.0843	0.4254	1.7×10^{-8}
Time×agitation	0.1027	0.3386	2.6×10^{-4}

^a Statistically significant at 95% of confidence interval

**Fig. 7** Enzyme activity as function of extraction time and agitation (fermentation carried out at the optimized conditions)

experimental design and 5.83 times the minimal yield found in the first experimental design. Enzyme purification, molecular characterization, and the use of the enzyme to produce chitosan oligomers were outside the scope of the present work and will be subject of future studies.

Acknowledgments The authors thank the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and *Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) for the research scholarship and financial support and the *Embrapa Semi-Árido* (CPATSA-Brazil) for the microbial strain.

References

- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M., & Eijsink, V. G. H. (2010). Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine Drugs*, 8, 1482–1517.
- Alfonos, C., Martinez, M., & Reyes, F. (1992). Purification and properties of two endochitinase from *Mucor rouxii* implication on its cell wall degradation. *FEMS Microbiology Letters*, 95, 187–194.
- AOAC—Association of Official Analytical Chemists. (2010). *In official methods of analysis* (18th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- Bionod, O., Snadhya, C., Pradeep, S., Szakacs, G., & Pandey, A. A. (2007). Fungal biosynthesis of endochitinase and chitinase in solid state fermentation and their application for the production of *N*-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin. *Bioprocess Technology*, 14, 2742–2748.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Cavalcante, R. S., Lima, H. L. S., Pinto, G. A. S., Gava, C. A. T., & Rodrigues, S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 100–104.
- Deane, E. E., Whipps, J. M., Lynch, J. M., & Peberdy, J. F. (1999). Transformation of *Trichoderma reesei* with a constitutively expressed heterologous fungal chitinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 419–424.
- Donzelli, B. G., Siebert, K. J., & Haman, G. E. (2005). Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and β -1, 3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 82–92.
- Felse, P., & Panda, T. (1999). Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. *Process Biochemistry*, 34, 563–566.
- Felse, P. A., & Panda, T. (2000). Submerged culture production of chitosanase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors—the influence of agitation speed. *Biochemical Engineering Journal*, 4, 115–120.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84, 377–393.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2, 43–56.
- Hashemi, M., Razavi, S. H., Shojasodati, S. A., Mousavi, S. M., Khajeh, K., & Safari, M. (2010). Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 333–337.
- Honorato, T. L., Rabelo, M. C., Gonçalves, L. R. B., Pinto, G. A. S., & Rodrigues, S. (2007). Fermentation of cashew apple juice to produce high added value products. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 23, 1409–1415.
- Ike, M., Ko, Y., Yokoyama, Y., Sumitani, J. I., Kawaguchi, T., Ogasawara, W., et al. (2007). Cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Trichoderma reesei* has chitosanase activity. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 47, 159–163.
- Lee, D.-X., Xia, W.-X., & Zhang, J.-L. (2008). Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase. *Food Chemistry*, 111, 291–295.
- Lee, Y. S., Yoo, J. S., Chung, S. Y., Lee, Y. C., Cho, Y. S., & Choi, Y. L. (2006). Cloning, purification, and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. DAU101. *Applied Microbiol. Biotechnology*, 73, 113–121.
- Lima, A. L. G., Nascimento, R. P., Bom, E. P. S., & Coelho, R. R. (2005). *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial byproducts and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 272–277.
- Lin, S.-B., Lin, Y.-C., & Chen, H.-H. (2009). Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity. *Food Chemistry*, 116, 47–53.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428.
- Nampoothiri, K. M., Bajju, T. V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2004). Process optimization of antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 39, 1583–1593.
- Oberoi, H. S., Chavan, Y., Bansal, S., & Dhillon, G. S. (2010). Production of cellulases through solid state fermentation using kinnow pulp as a major substrate. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 528–536.
- Rodrigues, S., Lona, L. M. F., & Franco, T. T. (2006). Optimizing panose production by modeling and simulation using factorial design and surface response analysis. *Journal of Food Engineering*, 75, 433–440.
- Romero, M. D., Aguado, J., Gonzalez, L., & Ladero, M. (1999). Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 244–250.
- Somashekar, D., & Joseph, R. (1996). Chitosanases—properties and applications: A review. *Bioresource Technology*, 55, 35–45.
- Su, C., Wang, D., Yao, L., & Yu, Z. J. (2006). Purification, characterization, and gene cloning of a chitosanase from *Bacillus* species strain S65. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4208–4214.
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., & Suzuki, M. (1986). Antitumor effect of hexa-*N*-acetylchitoheptaose and chitoheptaose. *Carbohydrate Research*, 151, 403–408.
- Vinale, F., Sivasithamparab, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*—plant–pathogen interactions. *Soil Biological Biochemistry*, 40, 1–10.
- Wang, S. L., Lin, T. Y., Yen, Y. H., Liao, H. F., & Chen, Y. J. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate Research*, 341, 2507–2515.
- Wang, S. L., Peng, J. H., Liang, T. W., & Liu, K. C. (2008). Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011. *Carbohydrates Research*, 343, 1316–1323.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2010). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.03.003.
- Zhou, W., Yuan, H., Wang, J., & Yao, J. (2008). Production, purification and characterization of chitosanase produced by *Gongronella* sp. JG. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 49–54.

APÊNDICE III

Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of Chitosanase Produced Under Solid Stated Fermentation by *Trichoderma* spp.

Luis C. A. da Silva · Talita L. Honorato ·
Rosane S. Cavalcante · Telma T. Franco ·
Sueli Rodrigues

Received: 15 February 2011 / Accepted: 7 July 2011
© Association of Microbiologists of India 2011

Abstract *Trichoderma* strains were extensively studied as biocontrol agents due to their ability of producing hydrolytic enzymes, which are considered key enzymes because they attack the insect exoskeleton allowing the fungi infection. The present work aimed to evaluate the ability of chitosanase production by four *Trichoderma* strains (*T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride* and *T. polysporum*) under solid stated fermentation and to evaluate the effect of pH and temperature on enzyme activity. pH strongly affected the enzyme activity from all tested strains. Chitosanase from *T. harzianum* and *T. viride* presented optimum activity at pH 5.0 and chitosanase from *T. koningii* and *T. polysporum* presented optimum activity at pH 5.5. Temperature in the range of 40–50°C did not affect enzyme activity. *T. polysporum* was found as the most promising strain to produce chitosanase with maximal enzyme activity of about 1.4 IU/gds, followed by *T. viride* (~1.2 IU/gds) and *T. harzianum* (1.06 IU/gds).

Keywords *Trichoderma* spp. · Chitosanase · Enzyme activity parameters optimization · Response surface methodology

Introduction

Chitin is the second-most abundant polysaccharide with an annual production of 10^{10} – 10^{11} tons, which is only next to that of cellulose. Chitin and chitosan are commercially obtained from shrimp and crab shells from the fishing industry. Chitosan, a D-glucosamine polymer, is a totally or partially deacetylated derivative of chitin. It is usually obtained by the artificial deacetylation of chitin in the presence of alkali [1]. Recent studies on chitin and chitosan have attracted interest for their conversion to oligosaccharides, because these oligosaccharides are not only water-soluble, but also possess versatile functional properties such as antitumor and antimicrobial activities [2, 3].

Chitosanases (E.C. 3.2.1.132) hydrolyze β -1,4-glycosidic linkage of chitosan, a polysaccharide consisting mainly of D-glucosamine with a variable content of N-acetyl-D-glucosamine. Chitoooligosaccharides can induce the expression of pathogenesis-related proteins in higher plants. They can even act as immuno-potentiating effectors [4]. The oligosaccharides of chitin/chitosan, prepared by hydrolyzing chitin/chitosan with chitinase/chitosanase, have various potential applications in food, agricultural, and pharmaceutical industry [2].

Trichoderma spp. are among the most frequently isolated soil fungi and present in plant root ecosystems [5]. These fungi are opportunistic, avirulent plant symbionts, and function as parasites and antagonists of many phytopathogenic fungi, protecting plants from disease. So far, *Trichoderma* spp. is among the most studied BCAs fungal and it is commercially marketed as biopesticides and biofertilizers [6–8]. Its entomopathogenicity is close related to its ability of synthesize hydrolytic enzymes. Despite several studies on *Trichoderma* chitinase production has been published [5, 9–12], the most studied strains are

L. C. A. da Silva · R. S. Cavalcante · S. Rodrigues (✉)
Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade
Federal do Ceara, Av. Mister Hull, 2977, Bloco 858—Campus
do Pici, Fortaleza, CE 60356-000, Brazil
e-mail: sueli@ufc.br

T. L. Honorato · T. T. Franco
Departamento de Processos Químicos, Universidade Estadual de
Campinas, Caixa Postal 6066, Campinas, SP 13081-970, Brazil

T. harzianum and *T. viride*, and to date, in the published studies, no reports on the production of chitosanase by *Trichoderma* spp. were found.

Before considering a process optimization for large scale enzyme production, to check the strain ability to produce the desired enzyme and a suitable method to assay the enzyme activity are needed. For industrial purposes, a suitable low cost and easy method is desirable. Even belonging to the same species each microbial strain might present different optimum conditions for enzyme activity determination. This work aimed to evaluate the suitability of chitosanase production from *Trichoderma* spp. and the study of pH and temperature effect on enzyme activity (optimization of the environmental assay parameters for *Trichoderma* spp. chitosanase activity determination).

Materials and Methods

Microorganisms and Maintenance

The fungal strains (*T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride* and *T. polysporum*) used in the present work belongs to the collection of Embrapa Semi-Arido (Petrolina—PE, Brazil) and were isolated as a biocontrol agent. Spores suspension was obtained by growing the fungus in wheat bran at 30°C for 7 days and harvesting the spore with 0.01% (v/v) Tween-80 in distilled water. Spore count was adjusted to 1×10^7 spores/ml. Fungus was maintained in spore form supported in wheat bran at 4°C [13].

Determination of Optimum pH for Chitosanase Production

The best pH for chitosanase production was determined by fungal radial growth in chitosan detector agar (CDA). The CDA was prepared by mixing 1.3 g/l of Na_2HPO_4 ; 3.0 g/l

of KH_2PO_4 ; 0.5 g/l of NaCl; 1.0 g/l of NH_4Cl ; 0.24 g/l of MgSO_4 ; 0.01 g/l of CaCl_2 ; 20 g/l of agar and 10 g of chitosan dissolved in acetic acid 1% (v/v). The pH was adjusted to 4.5; 5.5 or 6.5 with NaOH. The culture medium was sterilized at 121°C for 15 min and used in the Petri dishes. After cooling and the agar solidification, *Trichoderma* spores were seeded at the center of the Petri-dish and incubated at 30°C for 5 days. The microbial growth was accompanied by the radial mycelium growth in the Petri dish.

Solid-state Fungal Cultivation

The fungal strains were cultivated in solid substrate containing wheat bran (5 g) commercial chitosan (1 g), and 2.5 ml of a saline solution containing NaNO_3 (1.0 g/l); $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1.0 g/l); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 g/l); NaCl (1.0 g/l) [14]. The pH of the saline solution was adjusted to 5.5 because the best microbial growth in CDA plates was observed at this pH value for all strains. The medium was autoclaved at 121°C/15 min, cooled, inoculated with 1 ml of spore inoculums, prepared as described above, and incubated statically at 30°C for 48 h. Fermentations were carried out in 250 ml Erlenmeyer's flasks covered with cotton plugs.

Wheat bran was purchased from the local market (Mercado São Sebastião, Fortaleza-CE, Brazil). Commercial chitosan, from shrimp shell with 80% of deacetylation degree, was purchased from a local industry (Polymar, Fortaleza-CE, Brazil).

Enzyme Extraction

The content of each Erlenmeyer flask was mixed with 20 ml of sodium acetate buffer solution (200 mM), with pH values changing according to a Faced Centered Central Composite experimental design (Table 1). The flasks were

Table 1 Experimental design and chitosanase *Trichoderma* spp. activity

Run	pH	Temperature (°C)	<i>T. harzianum</i> (IU/gds)	<i>T. koningii</i> (IU/gds)	<i>T. viride</i> (IU/gds)	<i>T. polysporum</i> (IU/gds)
1	4.5	40	0.000 ± 0.016	0.036 ± 0.056	0.181 ± 0.005	0.073 ± 0.045
2	4.5	60	0.098 ± 0.005	0.007 ± 0.007	0.180 ± 0.004	0.129 ± 0.071
3	5.5	40	0.092 ± 0.005	0.606 ± 0.1,1	0.051 ± 0.021	1.342 ± 0.563
4	5.5	60	0.298 ± 0.014	0.196 ± 0.019	0.053 ± 0.031	1.408 ± 0.110
5	4.5	50	0.001 ± 0.004	0.051 ± 0.084	0.119 ± 0.004	0.105 ± 0.014
6	5.5	50	0.260 ± 0.016	0.531 ± 0.086	0.150 ± 0.051	1.435 ± 0.061
7	5.0	40	0.900 ± 0.045	0.012 ± 0.055	0.618 ± 0.005	0.220 ± 0.583
8	5.0	60	0.890 ± 0.003	0.025 ± 0.013	1.172 ± 0.004	0.268 ± 0.025
9	5.0	50	1.020 ± 0.051	0.197 ± 0.025	0.920 ± 0.003	0.340 ± 0.098
10	5.0	50	1.061 ± 0.053	0.189 ± 0.069	0.941 ± 0.001	0.278 ± 0.011
11	5.0	50	1.0451 ± 0.042	0.195 ± 0.058	0.930 ± 0.035	0.298 ± 0.045

gentle hand shake at room temperature ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) for 1 min and the liquid was filtrated in Whatman no 1 filter paper. The filtrate was immediately used to determine the chitosanase activity.

Chitosanase Activity Environmental Parameters Optimization

Chitosanase activity was measured in culture filtrates using as substrate a solution containing 0.4% (w/v) of chitosan dissolved in sodium acetate buffer (200 mM), with the same pH used to extract the enzyme (Table 1). The assay was carried out by mixing 100 μl of the crude enzyme with 400 μl of substrate and incubating for 60 min at the desired temperature, which was changed according to the experimental design presented in Table 1. Enzyme activity was determined by measuring the released reducing sugar by DNS method [15] and results were expressed as IU/gds.

One IU is the amount of enzyme that releases 1 μmol of reducing sugar per minute at the assay conditions.

Functional relationships (fitted regression models) between the responses and the factors were expressed by a second-degree polynomial function, obtained by multiple regression, as presented in Eq. 1.

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

where Y_i is the response variable; β_0 a constant; β_i is the coefficient for the linear effect; β_{ii} is the coefficient of the quadratic effect; β_{ij} is the coefficient of the interaction effect. X_i and X_j are the independent variables.

Statistical Analysis

The software Statistica v7.0 (Statsoft) was used to built and analyze the experimental designs.

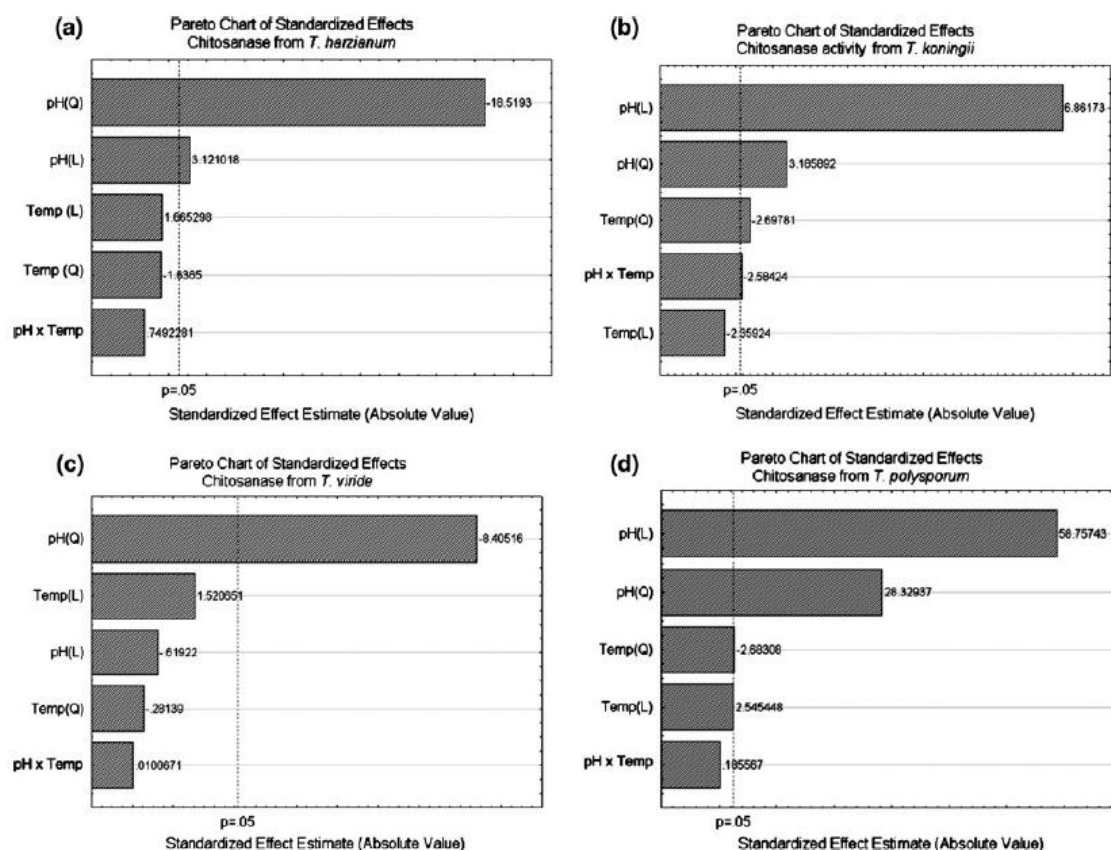


Fig. 1 Pareto chart of standardized effects on chitosanase activity. a Chitosanase from *T. harzianum*, b chitosanase from *T. koningii*, c chitosanase from *T. viride*, d chitosanase from *T. polysporum*

Table 2 Regression coefficients of RSM model

Factor	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
Mean	-84.51	5.33	-78.46	40.64
pH (L)	33.45	-4.53	31.39	-17.92
pH (Q)	-3.35	0.59	-3.15	1.91
Temperature (L)	5.20×10^{-2}	0.21	3.48×10^{-2}	4.57×10^{-2}
Temperature (Q)	-7.00×10^{-4}	-1.25×10^{-3}	-3.00×10^{-4}	-5.00×10^{-4}
pH $\times$ temperature (L)	5.40×10^{-3}	-1.91×10^{-2}	1.00×10^{-4}	5.00×10^{-4}

Y_1 enzyme activity from *T. harzianum*, Y_2 enzyme activity from *T. koningii*, Y_3 enzyme activity from *T. viride*, Y_4 enzyme activity from *T. polysporum*

Results and Discussions

Table 1 depicts the experimental design and the enzyme activity obtained for chitosanase produced by the studied *Trichoderma* spp. In some experimental runs, mainly the ones with low pH values, enzyme activity was null or very low. Pareto charts of the estimated effects of the independent variables on the studied response (enzyme activity) are presented in Fig. 1. A confidence interval of 95% was considered and the pH effect was statistically significant for all chitosanase produced by the tested *Trichoderma* strains. On chitosanase from *T. harzianum* and *T. viride*, pH presented negative effect. The negative pH quadratic effect on *T. harzianum* was higher than the observed on *T. viride*. On *T. koningii* and *T. polysporum*, pH presented positive effect with the highest effect on chitosanase from *T. polysporum*. Temperature was significant only on *T. koningii*, chitosanase activity but its effect was slightly negative. Interaction between pH and temperature was not significant on chitosanase activity from any studied strain.

Regression coefficients of the fitted quadratic model (Eq. 1) obtained for chitosanase activity as function of pH and temperature are presented in Table 2. Statistical significance was evaluated by ANOVA and *F* test (Table 3) considering a confidence interval of 95%. All fitted models were statistically significant since $F_{\text{calculated}} > F_{\text{listed}}$ [16]. The regression coefficients were also good for all fitted models ($R^2 > 0.90$).

Figure 2 present the response graphs built using the fitted models. As previously mentioned, temperature did not presented significant effect on chitosanase activity from *Trichoderma* strains under study. A slight effect was observed only on chitosanase activity from *T. koningii* for temperature in the range of 50°C at low pH values. Maximal activity was observed for pH-values around 5.0 for chitosanase from *T. harzianum* and *T. viride* for any considered temperature. For these strains, the maximal enzyme activity was obtained around pH 5.0 and higher or lower pH-values strongly decreased the chitosanase activity.

Table 3 ANOVA analysis for the fitted regression models

Variation source	Quadratic sum	Degrees of freedom	Mean square	<i>F</i> value
<i>T. harzianum</i>				
Regression	2.090	5	0.418	80.38
Error	0.026	5	0.0052	
Total	2.110	10		
R^2	0.988			
F_{listed} (95%)				$F_{5,5} = 5.05$
<i>T. koningii</i>				
Regression	0.398	5	0.080	14.81
Error	0.027	5	0.0054	
Total	0.425	10		
R^2	0.936			
F_{listed} (95%)				$F_{5,5} = 5.05$
<i>T. viride</i>				
Regression	1.780	5	0.356	16.18
Error	0.111	5	0.022	
Total	1.891	10		
R^2	0.940			
F_{listed} (95%)				$F_{5,5} = 5.05$
<i>T. polysporum</i>				
Regression	3.112	5	0.622	889.14
Error	0.004	5	0.007	
Total	3.116	10		
R^2	0.999			
F_{listed} (95%)				$F_{5,5} = 5.05$

Chitosanase activity from *T. koningii* was also strongly affected by pH and enzyme activity was enhanced at pH values above 5.0 presenting maximal values around pH 5.5 and temperature in the range of 40–50°C. *T. polysporum* chitosanase activity was also strongly affected by pH values with a sharply increase for values above 5.2. Again maximal activity was found around pH 5.5 for any temperature.

Although the four tested strains belongs to the same genera and were cultivated in the same substrate and under the same environmental condition, they excreted different

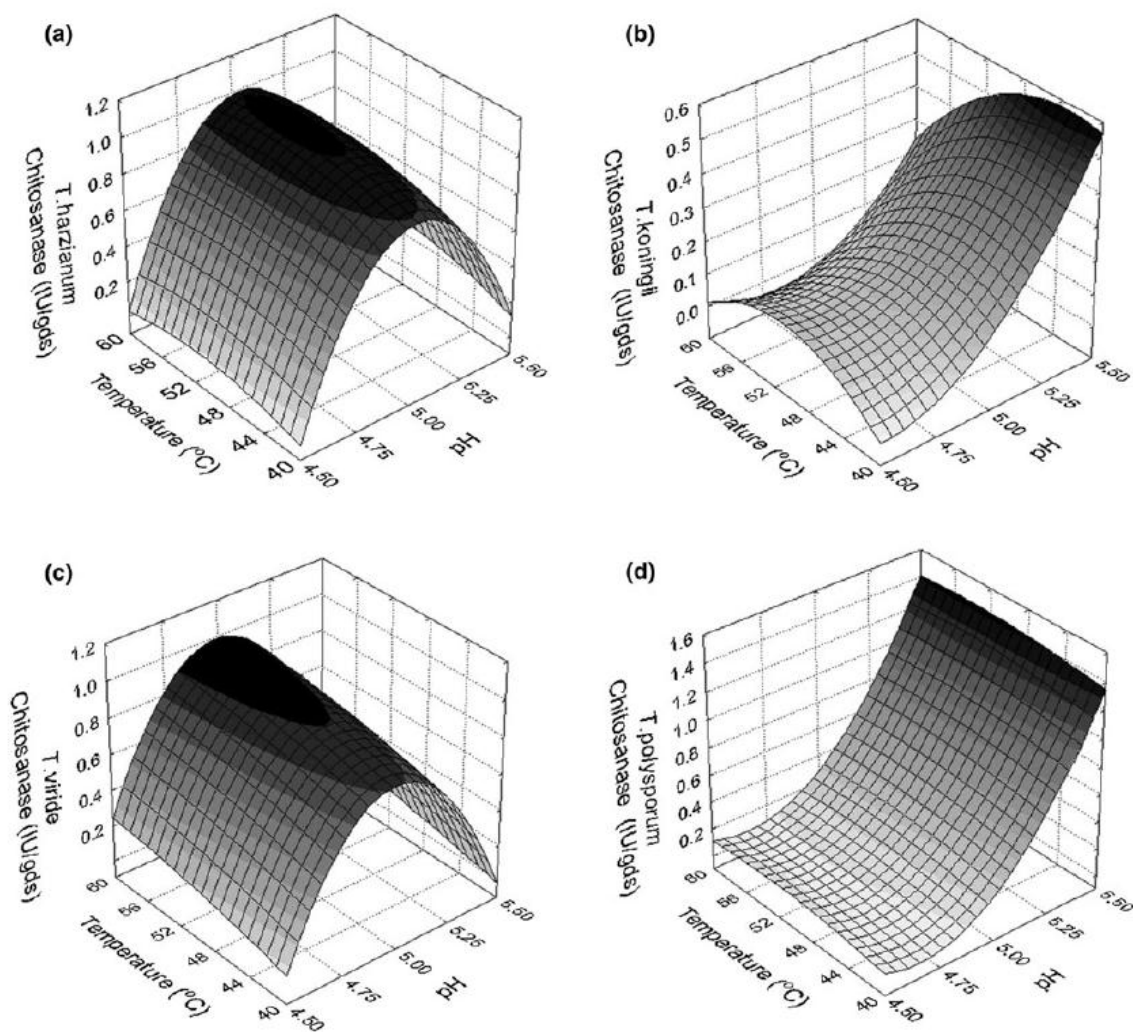


Fig. 2 Response surface graph for the chitosanase activity. a Chitosanase from *T. harzianum*, b chitosanase from *T. koningii*, c chitosanase from *T. viride*, d chitosanase from *T. polysporum*

amounts of chitosanase, which presented different behavior due to pH changes. Chitosanase produced from *T. harzianum* and *T. viride* presented similar enzyme behavior with maximal activity around 1.0 IU/gds. *T. koningii* and *T. polysporum* presented maximal enzyme activity at pH 5.5. However *T. koningii* presented the enzyme activity (~ 0.6 IU/gds) and *T. polysporum* presented the highest enzyme activity compared to the other strains (>1.4 IU/gds).

It is difficult to compare the results obtained herein to other published works on chitosanase production under solid-state fermentation by *Trichoderma* species because the published studies with these fungi have been focused

on the production of chitinase and cellulases due their biocontrol ability against insects and other plant pathogens. To our knowledge, this is the first study on *Trichoderma* spp. chitosanase production because no previous studies on chitosanase production by the strains studied herein were found.

Conclusions

Trichoderma spp. is a suitable microorganism to produce chitosanase enzymes by solid-state fermentation. Temperature

effect on enzyme activity was only significant for *T. koningii*. On the other hand, pH presented a strong and significant effect on enzyme activity for all studied strains. The effect of pH on chitosanase activity depends on the strain under study. Chitosanase activity from the *Trichoderma* species studied herein can be determined at any temperature in the range of 40 to 50°C. Chitosanase from *T. harzianum* and *T. viride* presented optimum activity at pH 5.0 and chitosanase from *T. koningii* and *T. polysporum* presented optimum activity at pH 5.5. According to the results presented herein, *T. polysporum* is the most promising strain to produce chitosanase with maximal enzyme activity of about 1.4 IU/gds, followed by *T. viride* (~1.2 IU/gds). *T. harzianum* (1.06 IU/gds). The lowest enzyme activity was obtained from *T. koningii* (~0.6 IU/gds).

Acknowledgments The authors thank the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and *Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) for the research scholarship and financial support and to *Embrapa Semi-Árido* (CPATSA-Brazil) for the microbial strain.

References

1. Wang SL, Lin TY, Yen YH, Liao HF, Chen YJ (2008) Bio-conversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydr Res* 341:2507–2515
2. Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, Suzuki M (1986) Antitumor effect of hexa-*N*-acetylchitoheptaose and chitoheptaose. *Carbohydr Res* 151:403–408
3. Wang SL, Peng JH, Liang TW, Liu KC (2008) Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011. *Carbohydr Res* 343:1316–1323
4. Le-Houx JG, Grodin F (1993) Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology* 132:1078–1084
5. Felse P, Panda T (1999) Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. *Process Biochem* 37:563–566
6. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2:43–56
7. Vinale F, Sivasithamparamb K, Ghisalberti EL, Marraa R, Wooa SL, Lorito M (2008) *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol Biochem* 40:1–10
8. Harman GE (2005) Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis* 84:377–393
9. Donzelli BG, Siebert KJ, Harman GE (2005) Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and β -1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Enzym Microb Technol* 37:82–92
10. Nampoothiri KM, Baiju TV, Sandhya C, Sabu A, Szakacs G, Pandey A (2004) Process optimization of antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochem* 39:1583–1593
11. Felse PA, Panda T (2000) Submerged culture production of chitosanase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors—the influence of agitation speed. *Biochem Eng J* 4:115–120
12. Deane EE, Whipps JM, Lynch JM, Peberdy JF (1999) Transformation of *Trichoderma reesei* with a constitutively expressed heterologous fungal chitinase. *Enzym Microb Technol* 24:419–424
13. Cavalcante RS, Lima HLS, Pinto GAS, Gava CAT, Rodrigues S (2008) Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food Bioprocess Technol* 1:100–104
14. Bionod O, Snadhya C, Pradeep S, Szakacs G, Pandey AA (2007) Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of *N*-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin. *Bioresour Technol* 14: 2742–2748
15. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
16. Rodrigues S, Lona LMF, Franco TT (2005) The effect of maltose on dextran yield and molecular weight distribution. *Bioprocess Biosyst Eng* 28:9–14