



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**Produção, caracterização e purificação parcial de quitinase produzida por
Streptomyces sp. DPUA1581**

Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento

RECIFE – PE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento

**Produção, caracterização e purificação parcial de quitinase produzida por
Streptomyces sp. DPUA1581**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito necessário para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Dra. Keila Aparecida Moreira – UAG /UFRPE

Co-orientador: Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto – UFRPE

RECIFE – PE

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

N244p Nascimento, Talita Camila Evaristo da Silva
Produção, caracterização e purificação parcial de
quitinase produzida por *Streptomyces* sp. DPUA1581 / Talita
Camila Evaristo da Silva Nascimento. – Recife, 2012.
61 f. : il.

Orientadora: Keila Aparecida Moreira.
Dissertação (Mestre em Biociência Animal) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2012.
Inclui referências e anexo.

1. Quitina 2. Quitinase 3. Fermentação
4. Caracterização I. Moreira, Keila Aparecida, orientadora
II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de
TALITA CAMILA EVARISTO DA SILVA NASCIMENTO

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE QUITINASE
PRODUZIDA POR *STREPTOMYCES* SP. DPUA1581

Área de concentração: Biotecnologia
Recife, 27 de Julho de 2012.

Dissertação apresentada e aprovada pela comissão examinadora:

Prof. Dra. Keila Aparecida Moreira
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE
(Presidente)

Prof. Dra. Polyanna Nunes Herculano
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE
(Membro Interno)

Prof. Dra. Erika Valente de Medeiros
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE
(Membro Externo)

Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga
Universidade de Pernambuco – UPE
(Membro Externo)

A Minha Mãe Ana Paula, eu dedico todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, por me fornecer todo apoio estrutural e educacional. A FACEPE, por ter me concedido apoio financeiro imprescindível para o desenvolvimento dessa pesquisa. E ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Animal (PPGBA).

A Prof^a. Dr^a. Keila Aparecida Moreira, por toda atenção e paciência com que me acolheu nos momentos bons e ruins, por sua amizade acima de tudo. A colaboração da minha co-orientadora Prof^a Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto.

A todos os meus colegas do laboratório de biotecnologia do CENLAG/UAG e LABTECBIO/UFRPE. Com carinho aos meus amigos e companheiros de trabalho Anna Carolina, Erick Galindo, Sheylla Araújo, Patrícia Lins, Rosângela Falcão, Carolina Notaro, Wandemberg Rocha, Marcos Teixeira, que me ensinaram que juntos podemos muito mais.

A minha afilhada Ana Letícia, que com sua esperteza estonteante diariamente me dá lições que não se aprende na vida acadêmica e é por ela que tento contribuir positivamente na construção de uma sociedade menos nociva.

A minha família, em especial os meus tios Reginaldo Menezes, Paulo Evaristo Filho e Jucicleide Silva, que foram essenciais no meu crescimento e na modulação do meu caráter. Aos meus primos, em especial Tarciana Fernanda, Tacito Fernando, Solange Evaristo, Alex Alam que me fizeram rir nos momentos certos.

Ao meu avô Paulo Evaristo (*in memoriam*) e ao meu tio Jurandir Menezes (*in memoriam*) que estariam muito felizes de participar deste momento.

A Meus grandes amigos Rebecca Braynner, Symone Gondim, Marília Farías, Marcio Luis, Andersom Gustavo, Ismaela Melo.

Contudo, agradeço também as pessoas que me trataram com desdém.

Obrigada.

(...) Nunca me esquecerei desse acontecimento na vida de minhas retinas tão fadigadas. Nunca me esquecerei que no meio do caminho tinha uma pedra. Tinha uma pedra no meio do caminho. No meio do caminho tinha uma pedra.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Sustentabilidade é um tema abordado constantemente nos últimos anos, sendo a produção e utilização de enzimas uma eficiente alternativa na reciclagem de resíduos industriais e agrícolas. A quitinase atua na hidrólise da quitina, esta substância pode ser encontrada em grande quantidade na carapaça de crustáceos. O objetivo desta pesquisa foi selecionar *Streptomyces* spp. com maior potencial na produção da quitinase, caracterizar o extrato bruto e purificar parcialmente. Para seleção foram utilizadas 30 linhagens de *Streptomyces* spp. isoladas de líquens da região Amazônica. Foram avaliados parâmetros como pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e a temperatura a partir do extrato bruto enzimático. A purificação parcial da enzima foi realizada por precipitação em sulfato de amônio na faixa de 0-80% e o perfil eletroforético em SDS-PAGE. *Streptomyces* sp. DPUA1581 produziu quitinase por fermentação submersa com 1% de quitina, agitação de 150 rpm, a 28 °C por 96h. A caracterização enzimática demonstrou melhor atividade no tampão fosfato de sódio 100 mM, no pH 7,0 e manteve-se estável após 180 minutos em todas as variações de pH testadas. A temperatura ótima da quitinase foi 80 °C, mantendo-se estável entre 30 e 100 °C durante 180 minutos. A atividade foi potencializada na presença de Fe²⁺ (134%), Mn²⁺ (71%) e do surfactante aniônico SDS (59%), entretanto, Pb²⁺ (99%), e EDTA (62%) inibiram a função da enzima. Após o fracionamento com sulfato de amônio o extrato enzimático apresentou fator de purificação igual a 7 e rendimento de 108%. A quitinase produzida por *Streptomyces* sp. DPUA1581 nas condições descritas neste trabalho, apresenta grande viabilidade industrial, demonstrando atividade catalítica mesmo quando submetida a altas temperaturas por período prolongado.

Palavras-chave: quitina, quitinase, fermentação, caracterização

ABSTRACT

Sustainability is a theme that has been raised steadily in recent years, the production and use of enzymes in an efficient alternative recycling of industrial and agricultural waste. The chitinase acts in the hydrolysis of chitin, the substance can be found in large quantities in the shells of crustaceans. The objective of this research was to select *Streptomyces* spp. with the greatest potential in the production of chitinase, to characterize the crude and partially purified. For selection we used 30 strains of *Streptomyces* spp. isolated from lichen in the Amazon region. Parameters such as pH and temperature optima, stability to pH and temperature from the crude enzymatic extract. Partial purification of the enzyme was performed by precipitation in ammonium sulfate in the range of 0-80% and the electrophoresis profile by SDS-PAGE. *Streptomyces* sp. DPUA1581 chitinase produced by submerged fermentation with 1% of chitin, agitation 150 rpm, at 28 °C for 96 hours. The enzyme characterization showed the best activity in sodium phosphate buffer 100 mM, pH 7.0 and was stable after 180 minutes in all pHs tested. The optimum temperature was 80 °C chitinase, remained stable between 30 and 100 °C for 180 minutes. The activity was enhanced in the presence of Fe²⁺ (134%), Mn²⁺ (71%) and the anionic surfactant SDS (59%), however, Pb²⁺ (99%) and EDTA (62%) inhibited the enzyme function. After fractionation with ammonium sulfate showed the enzymatic extract purification factor equal to 7 and 108% yield. The chitinase produced by *Streptomyces* sp. DPUA1581 under the conditions described in this work, has a great industrial viability, demonstrating catalytic activity even when subjected to high temperatures for prolonged periods.

Keywords: chitin, chitinase, fermentation, characterization

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Estrutura química da quitina.....	18
Figura 2. Esquema de produção de quitina a partir da carapaça de camarão.....	20
Figura 3. Micrografia da cadeia de esporos de <i>Streptomyces</i> sp. SLO-105.....	23
Figura 4. Micrografia dos estágios de desenvolvimento de uma colônia de <i>Streptomyces</i> (<i>S.lividans</i>) (a) Micélios vegetativos jovens de uma margem da colônia; (b) micélio vegetativo maduro produzindo hifas aéreas; (c) hifa aérea desenvolvendo compartimentos pré-esporos (cadeias de esporos são helicoidais nesta espécie), (d) cadeia de esporos maduros.....	24
Figura 5. <i>Streptomyces</i> spp. esporulado após sete dias de crescimento a 28 °C em placa de Petri com meio sólido ISP-2	25

Capítulo I

Figura 1. pH ótimo (símbolos fechados), e estabilidade ao pH (símbolos abertos), após 180 minutos da quitinase produzida por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1581 nos tampões: Glicina-HCl (◆◇) (pH 2,0; 3,0; 4,0); Acetato (■□) (pH 4,0; 5,0; 6,0); Fosfato (▲△) (pH 6,0; 7,0; 8,0; 8,3); Carbonato-bicarbonato (●○) (pH 9,0; 10,0).....	49
Figura 2. Temperatura ótima (▲); estabilidade a temperatura (△) após 180 minutos da quitinase produzida por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1581.....	50

Figura 3. Eletroforese em gel SDS-PAGE da quitinase produzida por *Streptomyces* sp. DPUA1581: linha 1 padrão de proteínas (GE healthcare), fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa); linha 2: extrato bruto; linha 3: extrato parcialmente purificado por fracionamento em sulfato de amônio (0-80%)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito dos íons na atividade da quitinase produzida por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1581.....	52
Tabela 2. Efeito de substâncias químicas na atividade da quitinase produzida por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1581.....	53
Tabela 3. Purificação parcial da quitinase por precipitação com sulfato de amônio.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA	ácido bicinconinico
BSA	soro albumina bovina
DNSA	ácido 3,5 dinitrosalicílico
DPUA	Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas
GH	glicosilhidrolases
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
EC	Enzyme Comission
KDa	quiloDaltons
kg	quilograma
kV	quilovolts
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitros
µL	microlitros
nm	nanômetros
pH	potencial hidrogeniônico
PM	peso molecular
rpm	rotações por minuto
U	unidades de enzima
UFC	unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Quitina.....	18
2.1.1. Estrutura química da quitina.....	19
2.1.2. Obtenção e aplicabilidade.....	19
2.2. Quitinase.....	21
2.2.1. Ocorrência e mecanismos de ação.....	21
2.2.2. Produção de quitinase por via microbiológica.....	22
2.2.3. Aplicabilidade enzimática.....	22
2.3. Actinomicetos – Gênero <i>Streptomyces</i>	23
2.3.1. Morfologia dos <i>Streptomyces</i> spp.....	24
2.3.2. Habitat.....	25
2.3.3. Importância biotecnológica.....	26
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
4. OBJETIVOS.....	34
4.1. Objetivo Geral.....	34
4.2. Objetivos Específicos	34
CAPITULO I.....	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAIS E MÉTODOS	39
Micro-organismos.....	39
Meios de cultivo, seleção e produção.....	39
Quitina coloidal.....	40
Atividade da quitinase.....	40
Determinação de proteínas totais.....	40
Temperatura ótima e estabilidade térmica.....	40
pH ótimo e estabilidade ao pH.....	41

Efeitos de íons metálicos e outras substâncias na atividade da quitinase.	41
Purificação parcial da quitinase.....	41
Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
Seleção do micro-organismo.....	42
pH ótimo e estabilidade ao pH.....	43
Temperatura ótima e estabilidade térmica.....	43
Efeito de íons.....	44
Comportamento enzimático frente outras substâncias.....	45
Purificação parcial da quitinase.....	45
CONCLUSÃO.....	46
AGRADECIMENTOS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXO: Normas para submissão de artigos a revista BRAZILIAN JOURNAL OF	47
MICROBIOLOGY.....	
	55

1. INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas caracterizadas por apresentar crescimento micelial, produzir esporos e são comumente encontrados em ambientes aquáticos, plantas e solos, preferivelmente, com pH neutro e alcalino (GABRIEL, 2005). São importantes produtores de substâncias bioativas, principalmente antibióticos e enzimas.

Enzimas são fundamentais no desencadeamento de todos os processos bioquímicos, elas catalisam organizadamente centenas de reações sucessivas nas quais moléculas de nutrientes são degradadas, energia química é conservada e transformada, e as macromoléculas sintetizadas a partir de simples moléculas precursoras (NELSON; COX, 2002). De acordo com Bon; Ferrara; Corvo, (2008) dentre as principais enzimas de interesse biotecnológico produzidas por actinomicetos estão as quitinases, celulasas e xilanases, sendo a quitinase uma enzima responsável pela degradação da quitina.

De acordo com Annamalai e colaboradores (2011) quitinases são enzimas que hidrolisam as ligações β -1,4- da molécula de quitina, que é um polímero linear insolúvel, composto de ligações β -1,4- ligados a N-acetilglucosamina (SEIDL, 2008). A quitina é um dos polissacarídeos mais abundantes da natureza, é uma substância extremamente versátil, de grande interesse industrial (BRASIL, 2010). Este polímero é sintetizado por muitos eucariontes, componente essencial na cutícula de artrópodes e na parede celular dos fungos, encontrada geralmente na composição de defensivos agrícolas no combate a fungos, na fabricação de fios cirúrgicos biodegradáveis, membranas para hemodiálise, confecção de pele artificial, cápsulas de remédios, liberadores de insulina, cremes de barbear, hidratantes, biorremediação de rios, remoção de óleo e metais pesados (BRASIL, 2010; CHANDLER et al., 2011).

Quitinases estão presentes em diversos organismos como bactérias, fungos, plantas e animais (HAN et al., 2009). Nas plantas atuam na proteção contra fungos patogênicos, atuando na hidrólise da quitina presente na parede fúngica (TAIRA, 2010). Nos mamíferos a quitinase é chamada de quitotriosidase comumente encontrada nos macrófagos e no soro humano (BOOT et al., 1995). Entretanto, além da quitotriosidase foi identificada uma quitinase nos pulmões e no trato digestivo de

mamíferos (BOOT et al., 2001). A quitinase tem demonstrado uma gama de aplicações na agricultura, indústrias farmacêuticas, alimentícias e de bioconversão (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006). Segundo Annamalai et al., (2011) as enzimas quitinolíticas podem ser produzidas por um grande número de micro-organismos que utilizam como fonte de carbono a quitina ou a quitina coloidal, produzindo quitinases (EC 3.2.1.14) e N-acetilglucosaminidase (EC 3.2.1.52).

Sendo os actinomicetos importantes micro-organismos produtores de substâncias bioativas incluindo antibióticos e enzimas, torna-se relevante a procura por novas espécies com potencial de aplicação biotecnológica. Portanto, este trabalho objetivou selecionar uma espécie de *Streptomyces* spp. a partir de linhagens isoladas de líquens da floresta Amazônica com potencial na produção de quitinase, caracterizar o extrato bruto enzimático e purificar parcialmente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Quitina

A quitina é um polissacarídeo que apresenta cadeia linear formada por unidades de N-acetil-2-dioxi-D-glicopirranose interligadas por ligações glicosídicas β (1-4) (Figura 1).

É o segundo polissacarídeo mais abundante da terra (ANTONINO, 2007; RATTANAKIT et al., 2007). Substancia insolúvel em água, solventes orgânicos e ácidos diluídos, sendo despolimerizada por ácidos fortes e parcialmente solúvel em solução de dimetilacetamida com 5% de cloreto de lítio (ANTONINO, 2007; MOURA et al., 2006).

Apresenta baixa toxicidade, é biodegradável e inerte no trato gastrointestinal dos mamíferos. Pode ser hidrolisada por bases, ácidos ou enzimas, como lisozimas e quitinases (LIUA et al., 2010; MATSUI, 2007).

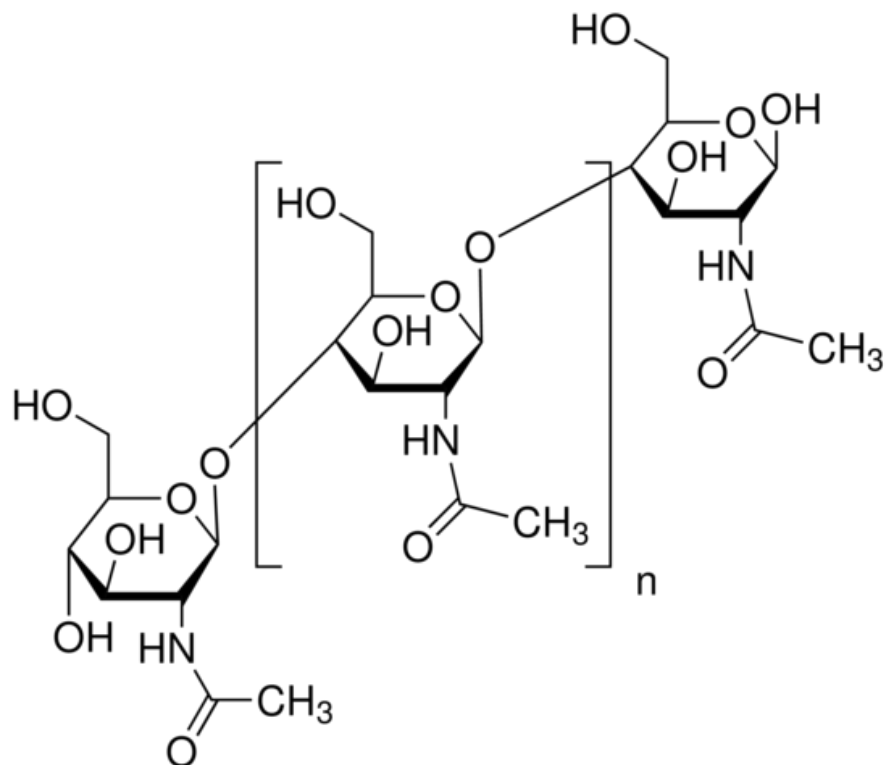


Figura 1. Estrutura química da quitina (Fonte: SIGMA ALDRICH).

Segundo Dahiya; Tewari; Hoondal (2006) a quitina é amplamente distribuída na natureza, particularmente como polissacarídeo estrutural da parede celular de fungos, no exoesqueleto de artrópodes, crustáceos e nematóides.

A capacidade de degradar a quitina é mais comum entre organismos procariotos do que a habilidade de sintetizá-la, isto é, organismos que não contem quitina podem mesmo assim produzir quitinase para degradar o polímero e utilizar os produtos como alimento, como é o caso das bactérias do solo (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

2.1.1 Formas polimórficas da quitina

Quimicamente a quitina possui três diferentes formas polimórficas, descritas como α -quitina, β -quitina e γ -quitina, dependendo de sua estrutura cristalina, da disposição de suas cadeias e da presença de moléculas de água. As estruturas polimórficas possivelmente estão relacionadas com diferentes funções no organismo.

A forma α é encontrada onde há necessidade de extrema dureza, como em cutículas de artrópodes frequentemente associada com proteínas e materiais inorgânicos, ou com ambos. Já as formas β e γ são encontradas onde se faz necessária flexibilidade e resistência. A α -quitina é mais estável que as forma β e γ , entretanto, β e γ , podem ser convertidas à forma α por tratamentos adequados (ANTONINO, 2007; MOURA et al., 2006).

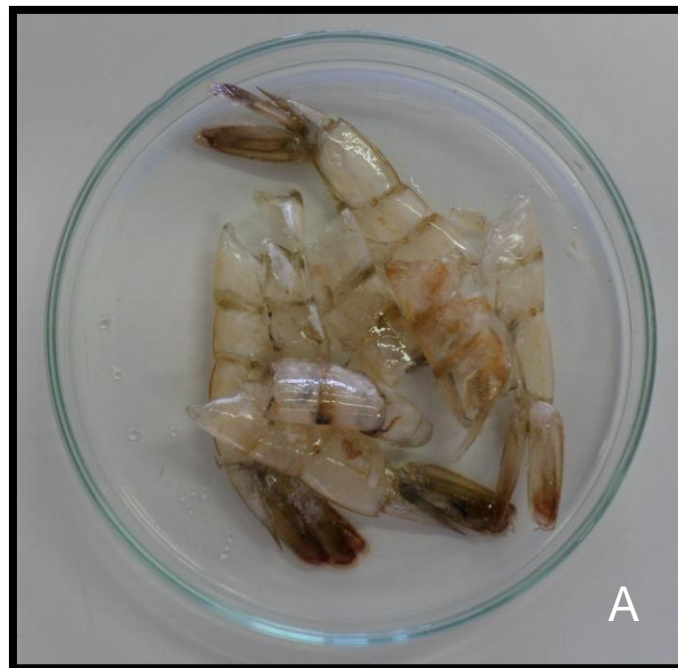
2.1.2 Obtenção e aplicabilidade

Comumente, toda quitina produzida comercialmente é obtida a partir de carapaças de caranguejos e cascas de camarões, oriundos de resíduos da indústria de processamentos desses crustáceos. Carapaças de crustáceos são resíduos abundantes na indústria pesqueira, considerados poluentes (ANTONINO, 2007; AZEVEDO et al., 2007), contudo, os distribuidores de quitina comercial geralmente não relatam a fonte utilizada para obter a quitina, procedimentos, origem da matéria-prima e quais partes do exoesqueleto dos crustáceos são usadas para extração do polissacarídeo (BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008).

Porém, alguns trabalhos já descrevem métodos de extração da quitina em laboratório, como o de Cahú et al., (2012) que obtiveram quitina a partir de carapaça de camarão (*Litopenaeus vannamei*) através de um processo químico que envolve etapas de desmineralização, desproteinização e despigmentação das carapaças com soluções diluídas de HCl, NaOH, KMnO_4 e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (Figura 2).

Battisti; Campana-Filho (2008) extraíram quitina do exoesqueleto (casca do cefalotórax, abdômen e quelípodos) de *Macrobrachium rosenbergii* através de duas sequências distintas: desmineralização e desproteinização.

Uma forma de agregar valor aos resíduos de camarão e do siri pode ser a produção de quitina, que poderá ser utilizada na medicina, agricultura e nas indústrias alimentícias, farmacêutica e química. A quitina é utilizada como agente floculante no tratamento de efluentes, na clarificação de óleos como adsorvente, na produção de quitosana (MOURA et al., 2006) e na preparação de quitooligosacarídeos (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010). Os derivados da quitina podem ser produzidos por clivagem química ou por degradação com quitinases (LIU et al., 2009).



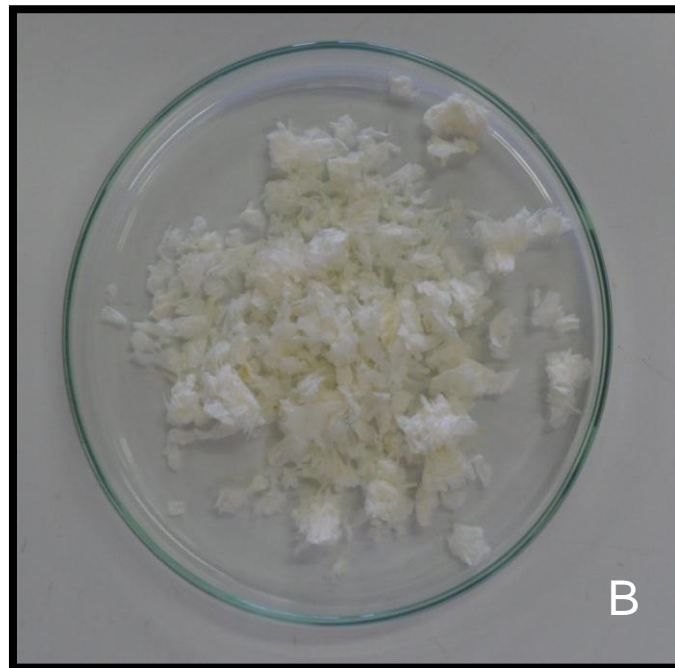


Figura 2. Esquema de produção da quitina. (A) Carapaça de camarão *in natura*. (B) Quitina obtida através dos processos de desmineralização, desproteíntização e despigmentação da carapaça de camarão (Fonte: O autor).

2.2. Quitinase

Quitinases são enzimas que podem hidrolisar a quitina, catalisando a clivagem de ligações β -(1-4) entre resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) (ALCAZAR-FUOLI et al., 2011). Elas podem ser classificadas como endoquitinases e exoquitinases. Endoquitinases clivam de maneira randômica liberando oligômeros como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose. Já as exoquitinases liberam progressivamente diacetilquitobiose da extremidade não redutora do polímero de quitina (FLEURI et al., 2009).

De acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos elas podem ser agrupadas dentro das famílias 18 e 19 de glicosil hidrolases (GH) que não são estruturalmente relacionadas (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010) e ainda na família 20 com β -N-acetilhexosaminidases estreptomicetos e humanos (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006).

2.2.1 Ocorrência e mecanismos de ação

Quitinases ocorrem em diversos organismos como vírus, bactérias, fungos, insetos, plantas e animais. O papel desta enzima nestes organismos é diverso, nos animais vertebrados as quitinases são encontradas no trato digestório, de insetos e crustáceos essas enzimas estão associadas com a necessidade de degradação parcial da cutícula velha (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; PARK et al., 1997).

Nas plantas, ela é sugerida como parte de seu mecanismo de defesa contra patógenos fúngicos (HARIGHI; ZAMANI; MOTALLEBI, 2007). Entretanto, essa defesa em alguns casos é ineficiente, pois, já foram isolados inúmeros inibidores de quitinase de plantas em bactérias (BISHOP, 2000).

Especialmente em humanos, acredita-se que a quitinase esteja relacionada com o metabolismo de carboidratos e também atue nos mecanismos de defesa contra agentes patogênicos. A presença da quitotriosidase é associada ao desenvolvimento da arteriosclerose e a quitinase ácida em mamíferos (AMCase) com a asma (NEIVA, 2005).

2.2.2 Produção da quitinase por via microbiológica

Entre as quitinases obtidas por micro-organismos estão as produzidas por *Streptomyces* sp. TH-11 (HOANG et al., 2011); *Alcaligenes faecalis* AU02 (ANNAMALAI et al., 2011); *Bacillus* sp. Hu1 (DAI et al., 2011); *Alternaria alternata* (GHANEM; AL-FASSI; FARSI, 2011); *Aeromonas veronii* CD3 (LIU et al., 2011); *Serratia* sp. TKU017 (WANG et al., 2010); *Bacillus cereus* TKU006 (WANG et al., 2009); *Bacillus licheniformis* (WAGHMARE; GHOSH, 2010); *Streptomyces* sp. DA11 (HAN et al., 2009); *Streptomyces cyaneus* SP-27 (YANO et al., 2008); *Pseudomonas* sp. TKU015 (WANG; CHEN; WANG, 2008); *Clostridium paraputrificum* (MORIMOTO et al., 2007). Características bioquímicas das quitinases produzidas pelo gênero *Streptomyces* spp. são de grande interesse industrial, especialmente com aplicações na área ambiental e no controle de fungos (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

2.2.3 Aplicabilidade enzimática

A quitinase apresenta grande potencial na bioconversão da quitina a partir de resíduos de crustáceos e mariscos, transformando-os em importantes fontes renováveis (HAN et al., 2009). Annamalai e colaboradores (2011) relataram que a bioconversão de material quitinoso tem sido proposta como um tratamento alternativo para eliminação de resíduos da indústria pesqueira.

Dentre outras aplicações, destacam-se as enzimas quitinolíticas atuantes na preparação farmacológica de importantes quitoligosacarídeos e de N-acetil-D-glicosamina, isolamento de protoplastos de fungos e leveduras, controle de fungos patogênicos e controle da transmissão da malária (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006).

Trabalhos recentes relatam a atividade antifúngica de quitinase produzida por via microbiológica contra *Rhizoctonia solani*; *Bipolaris* sp., *Aphanomyces raphani*, *Alternaria brassicicola* (ZAREI et al., 2011); combatendo o *Rhizoctonia solani* (LIU et al., 2011); *Aspergillus niger*, *Candida albicans* (HAN et al., 2009); *Rhizoctonia solani* (AG 2-2) (HARIGHI; ZAMANI; MOTALLEBI, 2007); *Botrytis cinerea*, *Physalasporea piricola*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* (WANG; SHAO; FU; RAO, 2009).

2.3. Actinomicetos – Gênero *Streptomyces*

Actinomicetos são bactérias Gram-positivas caracterizadas pela formação de micélios aéreos em meio sólido, produção de esporos (Figura 3) e de alto conteúdo de guanina e citosina em seu DNA (YADAV et al., 2009). Apresentam semelhanças diretas com fungos, tanto na sua estrutura filamentosa, muitas vezes ramificada, como por produzirem cadeias de esporos semelhantes a conídios (PELCZAR et al., 2009). São micro-organismos aeróbios, entretanto, alguns gêneros são facultativos, ou anaeróbios obrigatórios (RODRIGUES, 2006).

O gênero *Streptomyces* spp. pertence à família Streptomycetaceae, que compreende os gêneros *Streptomyces* spp., *Kitasatospora* spp. e *Streptoverticillium* spp. (BERGEY'S, 2002)

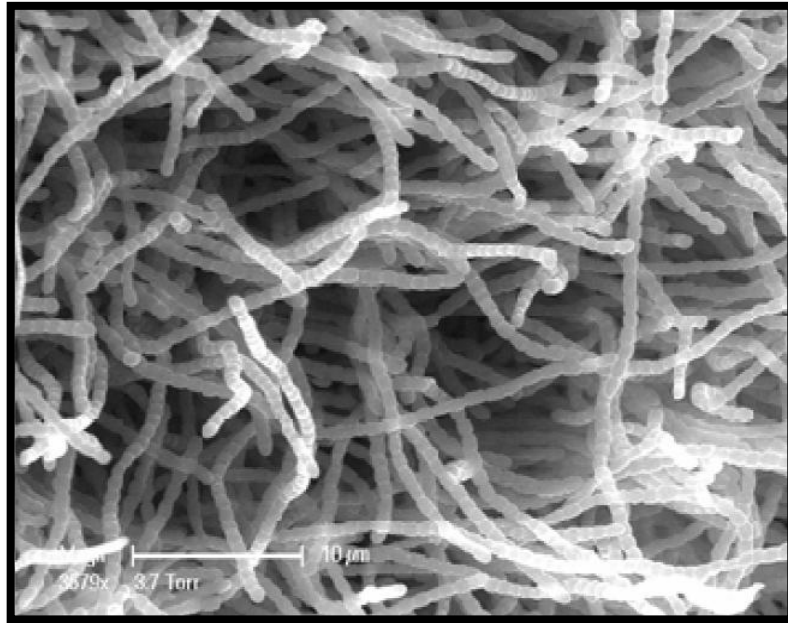


Figura 3. Micrografia da cadeia de esporos do *Streptomyces* sp. SLO-105 (Fonte: MORAKCHI et al., 2009).

2.3.1. Morfologia dos *Streptomyces* spp.

Streptomyces spp. desenvolvem colônias arredondadas, formando grumos em meio de cultura líquido, filamentos finos semelhantes às hifas fúngicas com diâmetro entre 0,5 a 2,0 μm , tipicamente ramificados denominados micélios e a reprodução por fragmentos das hifas ou por produção de esporos assexuados em áreas especializadas do micélio (BERGEY'S, 2002).

Seu crescimento ocorre no extremo das hifas e a fase vegetativa é formada por um entremeado de hifas que formam a colônia, esta por sua vez à medida que envelhece desenrola elementos aéreos denominados esporóforos (Figura 4). Conseqüentemente, um esporóforo multicromosomal por tabicação vai gerar um esporo ou conídio (MADIGAN et al., 2004).

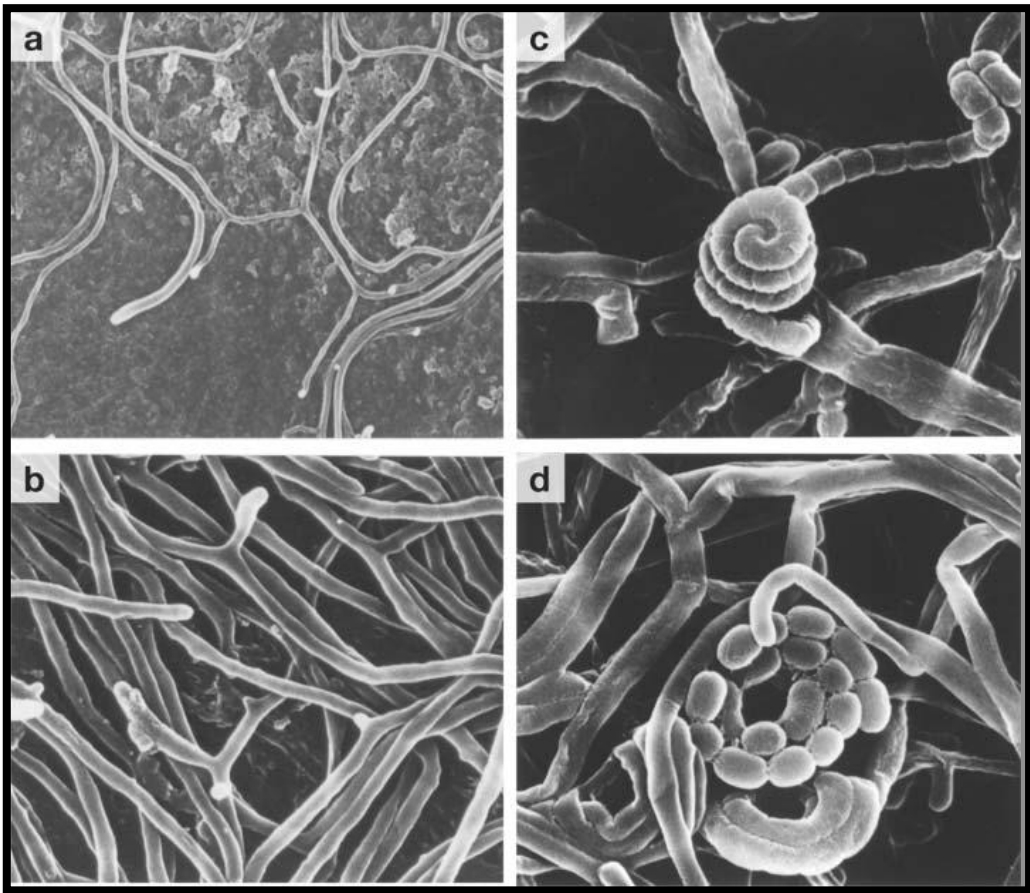


Figura 4. Micrografia dos estágios de desenvolvimento de uma colônia de *Streptomyces sp.* (*S. lividans*) (a) Micélios vegetativos jovens de uma margem da colônia; (b) micélio vegetativo maduro produzindo hifas aéreas; (c) hifa aérea desenvolvendo compartimentos pré-esporos (cadeias de esporos são helicoidais nesta espécie), (d) cadeia de esporos maduros (Fonte: HOPWOOD, 2006).

Os esporos de *Streptomyces spp.* são pouco resistentes ao calor, são metabolicamente menos ativos do que as células vegetativas, entretanto, eles possuem enzimas e sintetizam substratos (RODRIGUES, 2006).

2.3.2. Habitat

Streptomyces spp. (Figura 5), podem estar presentes nos mais diversos ambientes como águas, plantas e até mesmo em associação com líquens

(GONZÁLEZ et al., 2005). Podem ser encontrados também em solos bem drenados, calcários arenosos ou solos recobridos por rochedos calcários, requerem baixo potencial de água para seu crescimento, sendo os solos alcalinos e neutros mais favoráveis para o seu desenvolvimento (MADIGAN et al., 2004).

A maioria dos solos contém 10^4 a 10^7 unidades formadoras de colônia por grama (ALBERTON et al., 2006). Cerca de 80% ocorrem na camada mais superficial do solo (0 – 10 cm), diminuindo conseqüentemente com o aumento da profundidade (RODRIGUES, 2006).

O odor característico de terra é devido à produção de metabólitos, denominados geosminas que são sesquiterpenóides, compostos aromáticos de carbono, oxigênio e hidrogênio, com anel insaturado (MADIGAN et al., 2004).



Figura 5. *Streptomyces* spp. esporulado após sete dias de crescimento a 28 °C em placa de Petri com meio sólido ISP-2 (Fonte: O autor).

2.3.3. Importância biotecnológica

Os actinomicetos possuem grande capacidade de produzir metabólitos secundários, como enzimas e antibióticos. As vantagens de obter enzimas de origem microbiana vão desde redução de custos na produção, alto rendimento, substituição de fontes tradicionais (animal e vegetal) e susceptibilidade a manipulação genética (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Sendo cruciais ao meio ambiente por desempenhar inúmeros processos metabólicos e de biotransformações, como a degradação de resíduos insolúveis de organismos, tais como lignocelulose e quitina (BENTLEY et al., 2002).

Este gênero é considerado um importante grupo de micro-organismos do ponto de vista industrial, sendo descrito como principais produtores de antibióticos (MCNEIL; BROWN, 1994).

Os metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* spp. podem ser usados como agentes antitumorais, imunomoduladores, anti-helmíntico e no controle de insetos (BALTZ, 2012).

Os principais agentes terapêuticos fornecidos comercialmente, obtidos através de *Streptomyces* spp., são os antibacterianos (tetraciclina, estreptomicina, espectinomicina, neomicina, eritromicina, clorafenicol, clindamicina) e os antifúngicos nistatina e anfotericina (MADIGAN et al., 2004; HOPWOOD, 2007). A grande maioria destes micro-organismos produz mais de um antibiótico, podendo ou não estar quimicamente relacionados (MADIGAN et al., 2004).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTON, L.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; JOINEAU, M.E.; MARTINS, L.A.; PACHALY, J.R.; ASSMAN, R.; CIFFONI, E.M.G.; SOCCOL, C.R. Evaluación del potencial de uso del extracto bruto de la fermentación por *Streptomyces viridosporus* T7A en Medicina Veterinaria. **Arquivos de Ciência Veterinaria e Zoologia**, v.9, p.41-47, 2006.

ALCAZAR-FUOLI, L.; CLAVAUD, C.; LAMARRE, C.; AIMANIANDA, V.; SEIDL-SEIBOTH, V.; MELLADO, E.; LATGÉ J.P. Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigates*. **Fungal Genetics and Biology**, v.48, p.418–429, 2011.

ANNAMALAI, N.; RAJESWARI, M. V.; VIJAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes faecalis* AU02 by utilizing marine wastes and its antioxidant activity. **Annals of Microbiology**, v.61, p.801–807, 2011.

ANTONINO, N.A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana. João Pessoa, 2007. 88p. **Dissertação** (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; COSTA, A.C.F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p.27-34, 2007.

BALTZ, R.H. *Streptomyces* temperate bacteriophage integration systems for stable genetic engineering of actinomycetes and other organisms. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 661-672, 2012.

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

BENTLEY, S.D.; CHATER, K.F.; CERDENO-TARRAGA, A.M.; CHALLIS, G.L.; THOMSON, N.R.; HOPWOOD, D. et al. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Nature**, v.417, p.141–147, 2002.

BERGEY'S. **Manual of Systematic Bacteriology**, 2^a Ed., 5 vol. 2002, 721p.

BISHOP, J. G.; DEAN; A. M.; MITCHELL-OLDS, T. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targetsof selection in plant-pathogen coevolution. **PNAS**, v.97, p.5322–5327, 2000.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. 1 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 154p.

BOOT, R.G.; RENKEMA, G.H.; STRIJLAND, A.; VAN ZONNEVELD, A.J.; AERTS, J.M. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase: a human chitinase produced by macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.26252-26256, 1995.

BOOT, R.G.; BLOMMART, E.F.; SWART, E.; GHARALI-VAN-DER, VLUGT. K.; BIJL, N.; MOE, C.; PLACE, A.; AERTS, J.M. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinctfrom chitotriosidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.67770-67778, 2001.

BRASIL. **Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil**.1. ed. Brasília: MS, 2010, 134p.

CAHÚ, T.B.; SANTOS, S.D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C.R.; CHAVANTE, S.F.; CARVALHO, L.B.; JR NADER, H.B.; BEZERRA, R.S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 570-577, 2012.

CHANDLER, J.C.; MOLINS, C.R.; PETERSEN, J.M.; BELISLE, J.T. Differential chitinase activity and production within *Francisella* species, subspecies, and subpopulations. **Journal of Bacteriology**, v.193, p.3265–3275, 2011.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.71, p.773–782, 2006.

DAI, D.H.; HU, W.L.; HUANG, G.R.; LI, W. Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1. **African of Journal Biotechnology**, v.10, p.2476-2485, 2011.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H.; GARCIA, J.S.; FRANCO, T.T. Elucidação parcial da estrutura de aminoglucanooligossacarídeos (AGO's) produzidos enzimaticamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.19, p.111-116, 2009.

GABRIEL, B. **Wastewater Microbiology**. 3. ed. New Jersey/Canadá: John Wiley & Sons, 2005, 765p.

GHANEM, K.M.; AL-FASSI, F.A.; FARSI, R.M. Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from shrimp shellfish waste by *Alternaria alternate*. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, p.1649-1659, 2011.

GONZÁLEZ, I.; SACIDO, A.A.; ANDERSON, A.; GENILOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.401-415, 2005.

HAN, Y.; LI, Z.; MIAO, X.; ZHANG, F. Statistical optimization of medium components to improve the chitinase activity of *Streptomyces* sp. Da11 associated with the South China Sea sponge *Craniella australiensis*. **Process Biochemistry**, v.43, p.1088–1093, 2009.

HARIGHI, M.J.; ZAMANI, M.R.; MOTALLEBI, M. Evaluation of antifungal activity of purified chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. **Biotechnology**, v.6, p.28-33, 2007.

HOANG, K.C.; LAI, T.H.; LIN, C.S.; CHEN, Y.T.; LIAU, C.Y.I. The chitinolytic activities of *Streptomyces* sp. TH-11. **International Journal of Molecular Science**, v.12, p.56-65, 2011.

HOPWOOD, D.A. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. **Annual Review of Genetics**, v.40, p.1–23, 2006.

HOPWOOD, D.A. Therapeutic treasures from the deep. **Nature Chemical Biology**, v.3, p.457-458, 2007.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin research revisited. **Marine Drugs**, v.8, p.1988-2012, 2010.

LIU, C.L.; SHEN, C.R.; HSU, F.F.; CHEN, J.K.; WU, P.T.; GUO, S.H.; LEE, W.H.; YU, F.W.; MACKEY, Z.B.; TURK, J.; GROSS, M.L. Isolation and identification of two novel SDS-Resistant secreted chitinases from *Aeromonas schubertii*. **Biotechnology Progress**, v.25, p.124-131, 2009.

LIU, Y.; TAO, J.; YAN, Y.; LI, B.; LI, H.; LI, C. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. **Biotechnology and Bioengineering**. Chinese Journal of Chemical Engineering, v.19, p.128-134, 2011.

LIU, Y.; ZHOU, Z.; MIAO, W.; ZHANG, Y.; CAO, Y.; et al. A chitinase from *Aeromonas veronii* CD3 with the potential to control *Myxozoan* disease. **Plos One**, v. 6, p. e29091, 2011.

LIUA, D.; CAIA, J.B.C.; XIEA, CHI-CHU.; LIUA, C.; CHEN, YUE-HUA. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. colmeri, and its biocontrol potential. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.252–256, 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Pearson, 2004, 1089p.

MATSUI, M. Correlações entre estrutura química, super-estrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano. Curitiba, 2007, 136p. **Tese** (Doutorado em Engenharia e Ciências dos Materiais) - Universidade Federal do Paraná.

MCNEL, M.M.; BROWN, L.M. The medically important aerobic actinomycetes epidemiology and microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, p.357-417, 1994.

MORAKCHI, H.; AYARI, A.; TAOK, M.; KIRANE, D.; COCHET, N. Characterization of *Streptomyces* strain SLO-105 isolated from lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.6332-6336, 2009.

MORIMOTO, K.; YOSHIMOTO, M.; KARITA, S.; KIMURA, T.; OHMIYA, K.; SAKKA, K. Characterization of the third chitinase Chi18C of *Clostridium paraputrificum* M-21. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73, p.1106-1113, 2007.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, v.16, p.37-45, 2006.

NEIVA, M. Expressão em *Escherichia coli* de Quitinase (E.C. 3.2.1.14) de *Chromobacterium violaceum*. Manaus, 2005, 97p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Amazonas.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 1002p.

PARK, J.K.; MORITA, K.; FUKUMOTO, I.; YAMASAKI, Y.; NAKAGAWA, T.; KAWAMUKAI, M.; MATSUDA, H. Purification and characterization of the chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. G-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.684–689, 1997.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson, 2009, 524p.

RATTANAKIT, N.; YANO, S.; PLIKOMOL, A.; WAKAYAMA, M.; TACHIKI, T. Purification of *Aspergillus* sp. S1-13 chitinases and their role in saccharification of chitin in mash of solid-state culture with shellfish waste. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.103, p.535–541, 2007.

RODRIGUES, K. Identificação, produção de antimicrobianos e complexo enzimáticos isolados de actinomicetos. Porto alegre, 2006, 129p. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; Universidade Federal do Amazonas.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v.2, p.36–42, 2008.

SIGMA ALDRICH, Estrutura química da quitina. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9752?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 02 Mai 2012.

WAGHMARE, S.R.; GHOSH, J.S. Chitobiose production by using a novel thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a mushroom bed. **Carbohydrate Research**, v.345, p.2630–2635, 2010.

WANG, S.; SHAO, B.; FU, H.; RAO, P. Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p. 313-321, 2009.

WANG, S.L.; CHAO, C.H.; LIANG, T.W.; CHEN, C.C. Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. **Marine Biotechnology**, v.11, p.334–344, 2009.

WANG, S.L.; CHEN, S.J.; WANG, C.L. Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as a substrate. **Carbohydrate Research**, v.343, p.1171–1179, 2008.

WANG, S.L.; LI, J.Y.; LIANG, T.W.; HSIEH, J.L.; TSENG, W.N. Conversion of shrimp shell by using *Serratia* sp. TKU017 fermentation for the production of enzymes and antioxidants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.117–126, 2010.

TAIRA, T. Structure and antifungal activity of plant chitinase. **Journal Applied Glycoscience**, v.57, p.167-176, 2010.

YADAV, A.K.; KUMAR, R.; SAIKIA, R.; BORA, T.C.; ARORA, D.K. Novel copper resistant and antimicrobial *Streptomyces* isolated from bay of bengal, India. **Journal de Mycologie Médicale**, v.19, p.234-240, 2009.

YANO, S.; RATTANAKIT, N.; HONDA, A.; NODA, Y.; WAKAYAMA, M.; PLIKOMOL, A.; TACHIKI, T. Purification and characterization of chitinase A of *Streptomyces cyaneus* SP-27: an enzyme participates in protoplast formation from *Schizophyllum commune* mycelia. **Bioscienc Biotechnology Biochemical**, v.72, p.54-61, 2008.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Caracterizar e purificar parcialmente a quitinase produzida por *Streptomyces* spp. isolados de líquens da floresta Amazônica.

4.2. Objetivos específicos

- Selecionar a partir de 30 isolados de *Streptomyces* spp. de líquens da região Amazônica, a linhagem com maior potencial de produção de quitinase;
- Produzir quitinase por fermentação submersa;
- Caracterizar o extrato enzimático quanto ao pH e temperatura ótima, estabilidade ao pH e à temperatura;
- Avaliar o efeito de íons e substâncias químicas na atividade da enzima;
- Purificar parcialmente a quitinase;
- Avaliar o grau de pureza da quitinase.

CAPITULO I

**Caracterização e purificação parcial de quitinase produzida por *Streptomyces*
sp. DPUA1581**

A ser submetido à revista:



1 **Caracterização e purificação de quitinase produzida por**
2 ***Streptomyces* sp. DPUA1581**

3
4 Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento^{1,3}, Anna Carolina da Silva^{1,3}, Sheylla
5 Araujo da Silva^{1,3}, José Erick Galindo Gomes^{1,3}, Maria Francisca Simas Teixeira²,
6 Ana Lúcia Figueiredo Porto¹, Keila Aparecida Moreira^{1,3}.

7

8 ⁽¹⁾ Universidade Federal Rural de Pernambuco. Avenida Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos,
9 CEP 52171-900 Recife, PE. E-mail: moreiralab@yahoo.com.br

10 ⁽²⁾ Universidade Federal do Amazonas. Avenida General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000,
11 Campus Universitário, CEP 69077-000 Coroado I – Manaus, AM.

12 ⁽³⁾ Unidade Acadêmica de Garanhuns. Avenida Bom Pastor, s/nº, CEP 55292-270 Boa vista,
13 Garanhuns – PE.

14

15 **Resumo** - A quitinase tem se destacado no quadro de sustentabilidade mundial,
16 atuando na reciclagem da quitina presente comumente nos resíduos da indústria
17 pesqueira. O objetivo deste trabalho foi selecionar *Streptomyces* spp. com maior
18 potencial na produção da quitinase, caracterizar o extrato bruto e purificar
19 parcialmente. Para seleção foram utilizadas 30 linhagens de *Streptomyces* spp.
20 isoladas de líquens da região Amazônica. Foram determinados pH e temperatura
21 ótimos, estabilidade ao pH e a temperatura. Também foram avaliados o
22 fracionamento do extrato enzimático com sulfato de amônio (0-80%) e perfil
23 eletroforético. *Streptomyces* sp. DPUA1581 foi o melhor produtor da quitinase por
24 fermentação submersa utilizando quitina 1% (p/v), a 150 rpm, por 96 horas, a 28 °C.
25 O extrato apresentou melhor atividade frente ao pH 7,0 e manteve-se estável após
26 180 minutos em todas as variações de pH avaliados. A temperatura ótima foi aos 80
27 °C e termoestável por 180 minutos entre 30 e 90 °C. A atividade relativa da

28 quitinase foi potencializada na presença dos íons Fe^{2+} (234%), Mn^{2+} (171%), e
29 surfactante aniônico SDS (159%), entretanto, EDTA (62%) inibiu a função
30 enzimática. Após o fracionamento com sulfato de amônio o extrato enzimático
31 apresentou fator de purificação igual a 7 e rendimento de 108%. A quitinase
32 produzida através de *Streptomyces* sp. DPUA1581 apresenta viabilidade industrial,
33 já que, apresenta atividade catalítica mesmo quando submetida a altas temperaturas
34 por prolongado período.

35

36 **Palavras-chave:** caracterização, quitina, quitinase, *Streptomyces*

37

38 **Abstract** - The chitinase has been highlighted in the context of global sustainability,
39 working in the recycling of chitin commonly present in the waste of the fishing
40 industry. The objective of this study was to select the *Streptomyces* spp. with the
41 greatest potential in the production of chitinase, to characterize the crude and
42 partially purified. For selection we used 30 strains of *Streptomyces* spp. isolated from
43 lichen in the Amazon region. Were determined optimum pH, temperature, pH and
44 temperature stability. We also evaluated the fractionation of the enzyme extract with
45 ammonium sulfate (0-80%) and electrophoretic profile. The *Streptomyces* sp.
46 DPUA1581 was the best producer chitinase by submerged fermentation using chitin
47 1% (w / v), 150 rpm for 96 hours at 28 °C. The extract showed a better activity
48 compared to pH 7.0 and was stable after 180 minutes in all variations of pH
49 analyzed. The optimum temperature was at 80 °C for 180 minutes and thermostable
50 between 30 and 90 °C. The relative activity of chitinase was enhanced in the
51 presence of Fe^{2+} (234%), Mn^{2+} (171%), and the anionic surfactant SDS
52 (159%). However, EDTA (62%) inhibited the enzyme function. After fractionation with

53 ammonium sulfate showed the enzymatic extract purification factor equal to 7 and
54 108% yield. However chitinase obtained from *Streptomyces* sp. DPUA1581 present
55 industrial feasibility, since it has catalytic activity when subjected to high
56 temperatures for prolonged periods.

57

58 **Keywords:** characterization, chitin, chitinase, *Streptomyces*

59

60 **INTRODUÇÃO**

61 A quitina é um polímero linear β -(1-4) ligado a N-acetil-D-glicosamina
62 (GlcNAc), é o segundo polissacarídeo mais abundante da terra (17). É amplamente
63 distribuído na natureza, particularmente como polissacarídeo estrutural da parede
64 celular de fungos, no exoesqueleto de artrópodes, crustáceos e nematóides (5).

65 A capacidade de degradar a quitina é mais comum entre organismos
66 procariotos do que a habilidade de sintetizá-la, isto é, organismos que não contem
67 quitina podem mesmo assim produzir quitinase para degradar o polímero e utilizar
68 os produtos como alimento, como é o caso das bactérias do solo (4).

69 Quitinases são enzimas que podem hidrolisar a quitina catalisando a clivagem
70 de ligações β -(1-4) entre resíduos de GlcNAc (1). Enzimas quitinolíticas apresentam
71 inúmeras aplicações, preparação de quitina-oligossacarídeos e N-acetil-D-
72 glucosamina com importância farmacêutica, isolamento de protoplastos de fungos e
73 leveduras, controle de fungos patogênicos, tratamento de resíduos que contenham
74 quitina e controle da transmissão da malária (5).

75 A produção de quitinase por via microbiológica tem se mostrado promissora
76 nos últimos anos, entre os micro-organismos produtores estão *Chitinolyticbacter*

77 *meiyuanensis* SYBC-H1 (10); *Cellulosimicrobium cellulans* 191 (7); *Serratia*
78 *Marcescens* (22); *Streptomyces* sp. TH-11 (12) entre outros.

79 As características bioquímicas das quitinases produzidas pelo gênero
80 *Streptomyces* spp. são de grande interesse industrial, especialmente nas aplicações
81 na área ambiental e no controle de fungos(4).

82 *Streptomyces* spp. são bactérias Gram positivas caracterizadas pela
83 formação de micélios aéreos em meio sólido e formação de esporos. Estes micro-
84 organismos podem estar presentes nos mais diversos ambientes como águas,
85 plantas e até mesmo em associação com líquens (8).

86 Os metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* spp. podem ser
87 usados como antibióticos, agentes antitumorais, imunomoduladores, anti-helmíntico
88 e no controle de insetos (3).

89 Este trabalho objetivou selecionar dentre trinta linhagens de *Streptomyces*
90 spp. isolados de líquens da floresta Amazônica o melhor produtor de quitinase,
91 caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático bruto e purificar parcialmente.

92 **MATERIAL E MÉTODOS**

93 **Micro-organismos**

94 Foram testadas 30 linhagens de *Streptomyces* spp. isoladas de líquens da
95 floresta Amazônica, depositadas na coleção de culturas do Departamento de
96 Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA).

97 **Meio de cultivo, seleção e produção**

98 O meio ISP-2 constituído de extrato de malte 1,0% (p/v) e extrato de levedura
99 0,4% (p/v), autoclavados a 121 °C durante 20 minutos (16) foi utilizado para ativar os
100 micro-organismos. O inóculo dos *Streptomyces* spp. foi padronizado a 10⁸ UFC/mL
101 por espectrofotometria no comprimento de onda de 600nm.

102 A seleção e produção da enzima decorreu utilizando o meio constituído de
103 quitina em pó 1% (Sigma, St. Louis, EUA), K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05% (20),
104 incubado em agitador orbital a 140 rpm por 96 horas, a 34 °C. O extrato bruto foi
105 obtido ao fim da fermentação por filtração em papel de filtro qualitativo e utilizado
106 para as determinações analíticas.

107 **Quitina coloidal**

108 Dez gramas de quitina em pó foram acrescentadas em 100 mL de ácido
109 ortofosfórico 85%, a 25 °C sob agitação vigorosa por 2 horas. A esta mistura foi
110 adicionado 1000 mL de etanol 95%, mantida sob agitação por 30 minutos e
111 estocada a -20 °C. Posteriormente 10 mL da solução estoque foi centrifugada e o
112 precipitado lavado três vezes com 50 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH
113 7,0 e o precipitado foi dissolvido em 90 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH
114 6,0 (11).

115 **Atividade da quitinase**

116 A determinação da atividade da quitinase foi realizada conforme o método de
117 Waghmare e Ghosh, (21) com modificações no tempo de incubação. A mistura
118 reacional continha 1 mL de quitina coloidal 1% (p/v), 0,5 mL de tampão fosfato de
119 sódio 25 mM, pH 7,4, e 0,5 mL do extrato enzimático bruto. A mistura foi incubada a
120 37 °C por 30 minutos.

121 Para detectar os açúcares redutores da atividade foi usado o método descrito
122 por Miller (15). Uma unidade de atividade da quitinase foi definida como a
123 quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de N-acetilglicosamina por
124 minuto. As análises foram conduzidas em triplicata.

125

126

127 **Determinação de proteínas totais**

128 Para determinar as proteínas totais das amostras utilizou-se o kit baseado no
129 método do ácido bicinconínico (Pierce, Rockford, USA). Utilizando como padrão soro
130 albumina bovina em diferentes concentrações. As dosagens de proteína foram
131 expressas em mg.mL^{-1} .

132 **Temperatura ótima e estabilidade térmica**

133 Para análise da temperatura ótima da atividade quitinolítica utilizou-se
134 temperaturas de incubação de 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C. As atividades
135 enzimáticas foram expressas em atividade relativa (%). A estabilidade térmica foi
136 detectada incubando-se o extrato enzimático nas mesmas temperaturas do estudo
137 da temperatura ótima, perfazendo um total de 180 minutos de ensaio. A atividade
138 enzimática foi expressa em atividade residual (%).

139 **pH ótimo e estabilidade ao pH**

140 Para a determinação do pH ótimo da atividade enzimática, utilizou-se os
141 tampões glicina-HCl 100 mM (pH: 2,0; 3,0; 4,0), acetato 100 mM (pH: 4,0; 5,0; 6,0),
142 fosfato de sódio 100 mM (pH: 6,0; 7,0; 8,0; 8,3), e carbonato-bicarbonato 100 mM
143 (pH 9,0; 10,0). As atividades enzimáticas foram expressas em atividade relativa (%).
144 A estabilidade ao pH da enzima foi mensurada a partir da diluição do extrato
145 enzimático nos mesmos tampões do estudo de pH ótimo, perfazendo um total de
146 180 minutos. A atividade enzimática foi expressa em atividade residual (%).

147 **Efeitos de Íons metálicos e outras substancias na atividade da quitinase**

148 O efeito de diferentes íons metálicos e outros reagentes na atividade
149 quitinolítica foi mensurado por adição do íon correspondente a concentração de 5
150 mM ao extrato enzimático, durante 60 minutos, em seguida submetido a atividade de
151 quitinase. Os íons avaliados foram Zn^{2+} ; Mg^{2+} ; Mn^{2+} ; Fe^{2+} ; K^{+} ; Cu^{2+} ; Ca^{2+} ; Ni^{2+} ; Ba^{2+} ;

152 Pb^{2+} . Foram testadas também as substâncias ácido etilenodiaminotetracético
153 (EDTA), ácido iodoacético e dodecil sulfato de sódio (SDS). Os resultados foram
154 expressos em atividade relativa (%).

155 **Purificação parcial da quitinase**

156 Foi realizada precipitação com sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$ nas faixas de 0-
157 20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 0-80%. O sulfato de amônio foi adicionado ao
158 extrato enzimático bruto a 4 °C e em seguida foi dialisado em membrana de diálise
159 (Sigma, St. Louis) contra tampão fosfato de sódio 1 mM, pH 7,0 por 72h.

160 **Eletroforese da quitinase em SDS-PAGE**

161 A eletroforese em gel SDS-PAGE foi realizada de acordo com o método de
162 Laemmli (14), usando-se gel de concentração a 4% e de separação a 12%. Corados
163 em solução de Comassie brilliant blue 0,25% e descorados em solução de metanol
164 45% e ácido acético 10%. Posteriormente o gel foi corado com nitrato de prata. Foi
165 utilizado o padrão de proteínas (GE healthcare), fosforilase b (97 kDa), albumina (66
166 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1
167 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

168

169 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

170 **Seleção do micro-organismo**

171 Dentre as 30 espécies de *Streptomyces* spp. testadas, cinco destacaram-se
172 quanto a produção da quitinase, a linhagem de *Streptomyces* sp. DPUA1581
173 apresentou resultado mais eficiente na produção da enzima. A atividade total da
174 quitinase detectada através do extrato bruto de *Streptomyces* sp. DPUA1581 foi de
175 $0,190 \text{ U.mL}^{-1}$, com proteína total $0,065 \text{ mg.mL}^{-1}$ e atividade específica de $2,923$
176 U.mg^{-1} . No entanto Han (9), com o extrato bruto da quitinase produzida por

177 *Streptomyces* sp. DA11 apresentou atividade total de 1,075 U.mL⁻¹, proteína total de
178 2,206 U.mg⁻¹ e atividade específica de 0,487 U.mg⁻¹. Kim; Yang; Kim (13),
179 trabalhando com *Streptomyces* sp. M-20 obteve atividade total de 3,078 U.mL⁻¹,
180 proteína total de 425 mg.mL⁻¹, contudo, apesar de Han (9) e Kim; Yang; Kim (13)
181 apresentarem significativa atividade quitinolítica, observou-se a baixa especificidade
182 da enzima resultante da alta concentração de proteínas totais em ambos os casos.

183 **pH ótimo e estabilidade ao pH**

184 Foi observado que o extrato bruto da quitinase de *Streptomyces* sp.
185 DPUA1581 apresentou seu pH ótimo frente o tampão fosfato de sódio pH 7,0
186 (Figura 1). Han et al. (9) estudando o pH ótimo da quitinase produzida por
187 *Streptomyces* sp. DA11; Annamalai et al. (2) com *Alcaligenes faecalis*; e também
188 Waghmare e Ghosh, (21) trabalhando com *Bacillus licheniformis* AU02 verificaram
189 que a atividade da quitinase foi melhor em pH 8,0, determinando assim predileção
190 catalítica das enzimas em meio alcalino. Entretanto, Kim; Yang; Kim, (13)
191 trabalhando com extrato enzimático de *Streptomyces* sp. M-20; Wang; Chen; Wang,
192 (19) com *Pseudomonas* sp. TKU015 observaram melhor eficiência da quitinase em
193 pH 5,0.

194 Nos ensaios de avaliação da estabilidade da quitinase produzida por
195 *Streptomyces* sp. DPUA1581 foi observado que o extrato enzimático apresentou ser
196 estável em todas as variações de pH estudados, apresentando comportamento
197 linear mesmo após 180 minutos de ensaio. Han et al. (9) avaliando a estabilidade da
198 enzima produzida por *Streptomyces* sp. DA11 observaram que a quitinase manteve-
199 se estável até pH 11,0. Kim; Yang; Kim, (13) trabalhando com *Streptomyces* sp. M-
200 20 manteve-se estável até pH 8,0.

201

202 **Temperatura ótima e estabilidade enzimática**

203 A temperatura ótima do extrato bruto da quitinase de *Streptomyces* sp.
204 DPUA1581 foi a 80 °C (Figura 2). Resultados obtidos por Han et al. (9) com
205 *Streptomyces* sp. DA11 obteve uma quitinase com melhor atividade a 50 °C. Kim;
206 Yang; Kim, (13) trabalhando com *Streptomyces* sp. M-20 produziu enzima com
207 temperatura ótima de 30 °C. Annamalai et al. (2) trabalhando com quitinase de
208 *Alcaligenes faecalis* AU02 demonstraram que o desempenho máximo da atividade
209 da enzima foi a 40 °C comprometendo o desempenho enzimático a 70 °C.

210 O extrato enzimático produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1581 mostrou-se
211 bastante estável frente às temperaturas que fora submetido, assim também, em
212 relação ao tempo de exposição, sendo este no total de 180 minutos, com atividade
213 residual acima de 100% em todas as temperaturas do ensaio, caracterizando-se
214 como uma enzima termoestável e com viabilidade de utilização industrial, já que boa
215 parte dos produtos industrializados são comumente submetidos a altas
216 temperaturas. Resultados obtidos por Han et al. (9) que a partir de *Streptomyces* sp.
217 DA11 obteve quitinase estável em todas as temperaturas testadas.

218 **Efeito de íons**

219 O efeito de íons frente à atividade quitinolítica está apresentado na Tabela 1,
220 onde, observou-se que a maioria dos íons potencializou a atividade enzimática, com
221 destaque para a influencia do ferro (Fe^{2+}), que amplificou em 134% a atividade da
222 quitinase. Os resultados encontrados no presente trabalho discordam com os
223 obtidos por Wang et al. (18); Dai et al. (6); Han et al. (9); Wang et al. (20), já que, em
224 todos os trabalhos a quitinase foi inibida na presença do Fe^{2+} adicionado a mistura
225 reacional. A presença do íon Mn^{2+} também potencializou a atividade da quitinase
226 neste trabalho, resultados que corroboram com os dados obtidos por Han et al. (9)

227 que observou representativa ativação da enzima da presença do íon Mn^{2+} . O cálcio
228 também mostrou bastante influencia na função catalisadora da quitinase de
229 *Streptomyces* sp. DPUA1581, aumentando-a em 64%. A potencialização da enzima
230 na presença deste íon também foram encontrados por Dai et al. (6) com acréscimo
231 de 26% na atividade.

232 **Comportamento enzimático frente outras substâncias**

233 A presença de algumas substâncias na mistura reacional pode comumente
234 suprimir ou potencializar a atividade das enzimas, o que pôde ser verificado através
235 dos resultados apresentados na Tabela 2, pois a atividade da quitinase de
236 *Streptomyces* sp. DPA1581 sofreu supressão na presença de EDTA com atividade
237 relativa de 62%. Resultados similares de inibição frente ao EDTA foram obtidos por
238 Wang et al. (18) com 57%; Wang et al. (19) tendo 25% e Han et al. (9) com 43,6%
239 de atividade relativa. Entretanto, a presença de SDS na mistura reacional da enzima
240 produzida por *Streptomyces* sp. DPUA1581 potencializou a atividade catalítica da
241 quitinase, resultante em 159% de atividade relativa. Resultados que diferem dos
242 obtidos por Wang et al. (18); Han et al. (9); Kim; Yang; Kim, (13); já que, nestes
243 casos a presença do SDS inibiu a atividade enzimática.

244 **Purificação parcial da quitinase e eletroforese em gel de poliacrilamida**

245 Dentre as faixas de fracionamento com sulfato de amônio testadas a mais
246 eficiente para o particionamento da quitinase produzida por *Streptomyces* sp.
247 DPUA1581 foi a 0-80% que resultou na atividade específica de $19,25 \text{ U.mg}^{-1}$, fator
248 de purificação de 7 vezes, e rendimento de 108% (Tabela 3). Resultados
249 diferenciados foram obtidos por Annamalai et al. (2) que mostraram atividade
250 específica de $69,25 \text{ U.mg}^{-1}$, fator de purificação 8,71 e rendimento de 58,90%. Foi
251 observado através do perfil eletroforético do extrato bruto enzimático (linha 2, Figura

252 3) proteínas com peso molecular de 39,88; 32,46; 28,2 e 21,18 kDa
253 respectivamente. Quando analisado o extrato fracionado com sulfato de amônio 0-
254 80%, foi observada a presença de proteínas cujo peso molecular foram
255 respectivamente de 47,79; 41,18; 34,75; 29,17; 21,51; 20,01 kDa (linha 3, Figura 3).
256 Muito embora o extrato parcialmente purificado tenha apresentado uma quantidade
257 maior de proteínas em relação ao bruto, o fracionamento foi eficiente na separação
258 das proteínas, já que, no extrato bruto uma grande massa de proteínas concentrou-
259 se abaixo da banda com 28,2 kDa, fato que não permitiu a determinação do peso
260 molecular de todas as bandas na linha 2 (Figura 3). Zarei et al. (22) purificou uma
261 quitinase produzida por *Serratia marcescens* B4A com peso molecular de 54 kDa.
262 Fleuri et al. (7) observou que a enzima produzida por *Cellulosimicrobium cellulans*
263 191 tem peso de 61 KDa.

264 **CONCLUSÃO**

265 *Streptomyces* sp. DPUA1581 foi o melhor produtor de quitinase dentre 30
266 linhagens avaliadas. O extrato bruto da quitinase apresentou sua melhor atividade
267 em pH 7,0 e a 80 °C, potencializada na presença de íons e SDS, com fator de
268 purificação de 7 e rendimento de 108% após fracionamento com sulfato de amônio.
269 Este trabalho apresenta os primeiros relatos de *Streptomyces* spp. DPUA isolados
270 de líquens da região Amazônica como produtores de quitinase.

271

272 **AGRADECIMENTOS**

273 Os autores agradecem pelo auxílio financeiro a FACEPE, CAPES Procad NF
274 Projeto N.0921/2010. E a professora Cíntia Renata Rocha Costa (UFPE) por ter cedido o
275 Software Loccus.

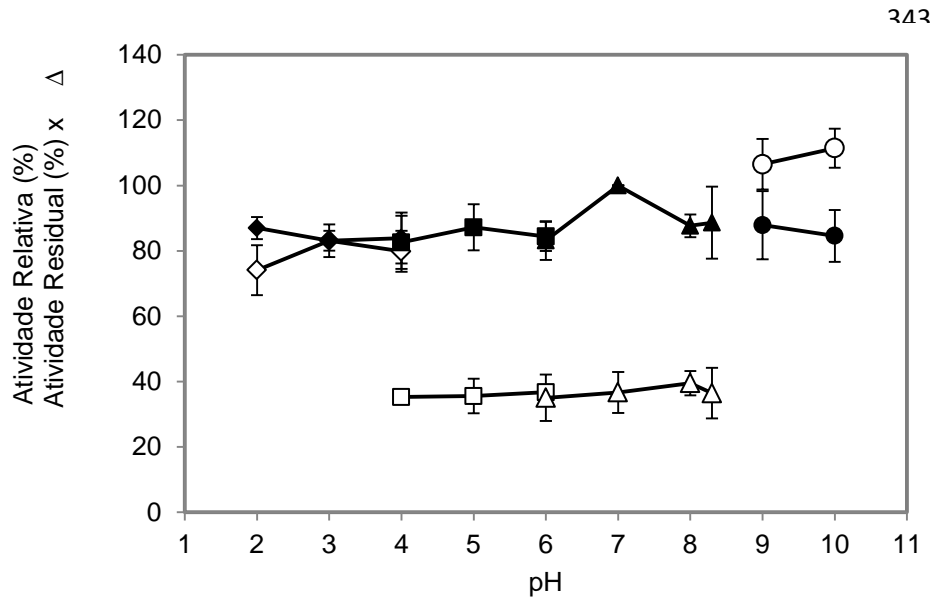
276

277 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

278

- 279 1. Alcazar-Fuoli, L.; Clavaud, C.; Lamarre, C.; Aïmanianda, V.; Seidl-Seiboth, V.;
280 Mellado, E. et al. (2011). Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family
281 in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 418–429.
- 282 2. Annamalai, N.; Rajeswari, M.V.; Vijayalakshmi, S.; Balasubramanian, T.
283 (2011). Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes faecalis* AU02
284 by utilizing marine wastes and its antioxidant activity. *Ann. Microbiol.* 61, 801–807.
- 285 3. Baltz, R.H. (2012). *Streptomyces* temperate bacteriophage integration
286 systems for stable genetic engineering of actinomycetes (and other organisms). *J.*
287 *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39 (5), 661-667.
- 288 4. Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (2008). Enzimas em Biotecnologia:
289 produção, aplicação e mercado. Primeira edição, Interciência. Rio de Janeiro. p. 154.
- 290 5. Dahiya, N.; Tewari, R.; Hoondal, G.S. (2006). Biotechnological aspects of
291 chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 773–782.
- 292 6. Dai, D.H.; Hu, W.L.; Huang, G.R.; Li, W. (2011). Purification and
293 characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1.
294 *Afr. J. Biotechnol.* 10 (13), 2476-2485.
- 295 7. Fleuri, L.F.; Kawaguti, H.Y.; Sato, H.H. (2009). Production, purification and
296 application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Braz. J.*
297 *Microbiol.* 40, 623-630.
- 298 8. González, I.; Sacido, A.A.; Anderson, A.; Geniloud, O. (2005). Actinomycetes
299 isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene
300 sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 401-415.
- 301 9. Han, Y.; Yang, B.; Zhang, F.; Miao, X.; Li, Z. (2009). Characterization of
302 antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with south China
303 sea sponge *Craniella australiensis*. *Mar. Biotechnol.* 11, 132–140.
- 304 10. Hao, Z.; Cai, Y.; Liao, X.; Zhang, X.; Fang, Z.; Zhang, D. (2012). Optimization
305 of nutrition factors on chitinase production from a newly isolated *Chitoliyticbacter*
306 *meiyuanensis* SYBC-H1. *Braz. J. Microbiol.* 43 (1), 177-186.
- 307 11. Harighi, M.J.; Zamani, M.R.; Motallebi, M.(2007). Evaluation of antifungal
308 activity of purified chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. *Biotechnol.* 6,
309 28-33.

- 310 12. Hoang, K.C.; Lai, T.H.; Lin, C.S.; Chen, Y.T.; Liao, C.Y.I. (2011). The
311 Chitinolytic Activities of *Streptomyces* sp. TH-11. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 56-65.
- 312 13. Kim, K.J.; Yang, Y.J.; Kim, J.G. (2003). Purification and characterization of
313 chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36 (2), 185-189.
- 314 14. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of
315 the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259), 680–685.
- 316 15. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of
317 reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-429.
- 318 16. Pridham, T.G.; Anderson, P.; Foley, C.; Lindenfelser, L.A.; Hesseltine, C.W.;
319 Benedict, R.G. (1957). Selection of media for maintenance and taxonomic study of
320 307 *Streptomyces*. *Antibiotc. Ann.* 947–953.
- 321 17. Rattanakit, N.; Yano, S.; Plikomol, A.; Wakayama, M.; Tachiki, T. (2007).
322 Purification of *Aspergillus* sp. S1-13 chitinases and their role in saccharification of
323 chitin in mash of solid-state culture with shellfish waste. *J. Biosci. Bioeng.* 103 (6),
324 535–541.
- 325 18. Wang, S.L.; Chao, C.H.; Liang, T.W.; Chen, C.C. (2009). Purification and
326 characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and
327 conversion of marine wastes by these enzymes. *Marin. Biotechnol.* 11, 334–344.
- 328 19. Wang, S.L.; Chen, S.J.; Wang, C.L. (2008). Purification and characterization of
329 chitinases and chitosanases from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU015
330 using shrimp shells as a substrate. *Carbohydr. Res.* 343, 1171–1179.
- 331 20. Wang, S.L.; Li, J.Y.; Liang, T.W.; Hsieh, J.L.; Tseng, W.N. (2010). Conversion
332 of shrimp shell by using *Serratia* sp. TKU017 fermentation for the production of
333 enzymes and antioxidants. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20 (1), 117–126.
- 334 21. Waghmare, S.R.; Ghosh, J.S. (2010). Chitobiose production by using a novel
335 thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a
336 mushroom bed. *Carbohydr. Res.* 345 (18), 2630–2635.
- 337 22. Zarei, M.; Aminzadeh, S.; Zolgharnein, H.; Safahieh, A.; Daliri, M.; Noghabi,
338 K.A.; Ghoroghi, A.; Motallebi, A. (2011). Characterization of a chitinase with
339 antifungal activity from a native *Serratia marcescens* b4a. *Braz. J. Microbiol.* 42,
340 1017-102
- 341
- 342



349

350 **Figura 1.** pH ótimo (símbolos fechados) e estabilidade ao pH (símbolos abertos),
 351 após 180 minutos da quitinase produzida por *Streptomyces* sp. DPUA1581 nos
 352 tampões: Glicina-HCl (◆◇) (pH 2,0; 3,0; 4,0); Acetato (■□) (pH 4,0; 5,0; 6,0); Fosfato
 353 (▲△) (pH 6,0; 7,0; 8,0; 8,3); Carbonato-bicarbonato (●○) (pH 9,0; 10,0).

354

355

356

357

358

359

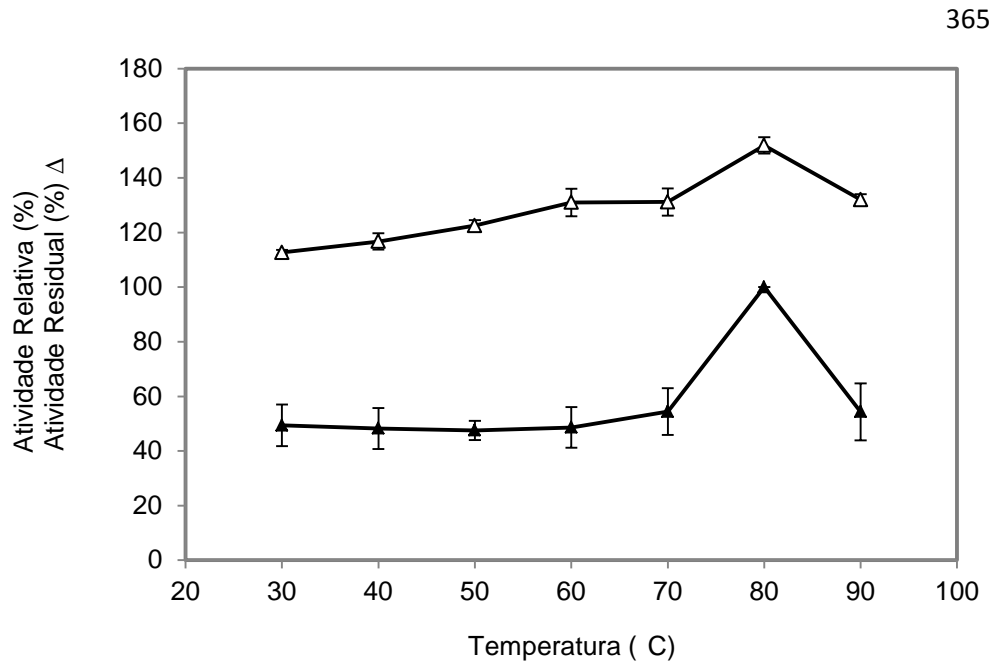
360

361

362

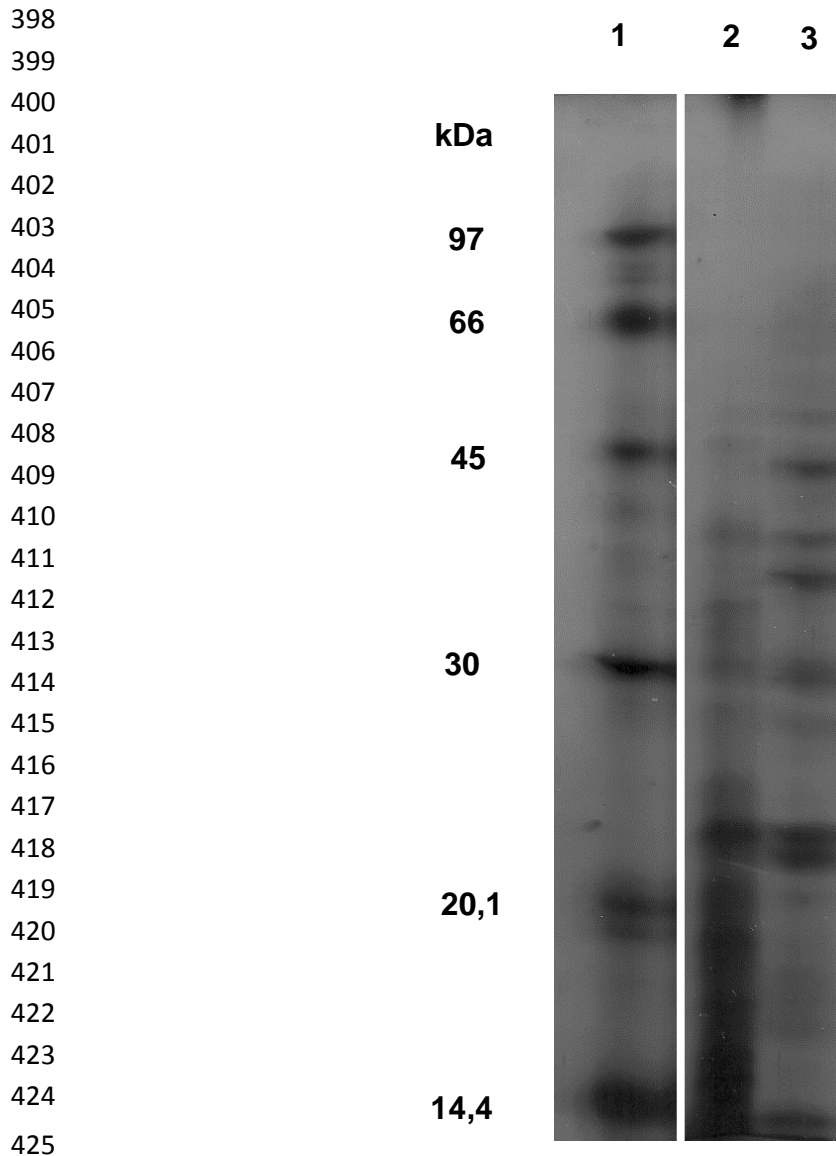
363

364



378 **Figura 2.** Temperatura ótima (▲) e estabilidade a temperatura (Δ), após 180 minutos
379 da quitinase produzida por *Streptomyces* sp. DPUA1581.

380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397



426

427 **Figura 3.** Eletroforese em gel SDS-PAGE da quitinase produzida por *Streptomyces*
428 sp. DPUA1581. Linha 1 padrão de proteínas (GE healthcare), fosforilase b (97 kDa),
429 albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de
430 tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa); linha 2: extrato bruto; linha 3:
431 extrato parcialmente purificado por fracionamento em sulfato de amônio (0-80%).

432

433

434

435 **Tabela 1.** Efeito dos íons na atividade da quitinase produzida por *Streptomyces* sp.
436 DPUA1581.

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

Íons	Atividade relativa (%)
Controle	100±0
Zn ²⁺	148±12
Mg ²⁺	107±2
Mn ²⁺	171±5
Fe ²⁺	234±5
K ⁺	129±9
Cu ²⁺	141±9
Ca ²⁺	164±2
Ni ²⁺	120±8
Ba ²⁺	117±6
Pb ²⁺	99±2

459 **Tabela 2.** Efeito de substâncias químicas na atividade da quitinase produzida por
460 *Streptomyces* sp. DPUA1581.

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

Substâncias	Atividade relativa (%)
Controle	100±0
EDTA	62±6
Ácido iodoacético	100±10
SDS	159±5

491 **Tabela 3.** Purificação parcial da quitinase por precipitação com sulfato de amônio.

Parâmetros	Atividade total (U.mL⁻¹)	Proteína total (mg.mL⁻¹)	Atividade específica (U.mg⁻¹)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato Bruto	0,190	0,065	2,923	100	1
Sulfato de Amônio 80%	0,204	0,011	19,25	108	7

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

ANEXO

NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS A REVISTA *BRASILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY*.

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **notas prévias**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (até 50 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto não dividido em tópicos
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Notas prévias devem conter 10 páginas. Figuras e tabelas devem estar restritas a, no máximo, duas figuras ou duas tabelas ou uma figura e uma tabela.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

As referências no texto devem ser citadas pelos seus números. As citações de autores no texto devem ser feitas de acordo com o seguinte exemplo: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número) mentioned that... Não use caixa alta para redigir o nome completo dos autores.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de

grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser numeradas seqüencialmente em ordem alfabética, pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As referências devem ser citadas no texto por seus números com um espaço entre o número das referências (3, 7, 22). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo do *Biosis*. Todas as referências listadas devem ser citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem ser incluídas na lista final.

Exemplos:

a. Artigos de Periódicos

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S.; Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Artigos ou Capítulos de Livro

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Livros

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology - an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patentes

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat.3, 117, 870.

e. Teses e Dissertações

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publicações na Web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection.

Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

Referências como "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheça que às vezes elas devam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências. Referências consistem de artigos que são "aceitos para publicação" ou "no prelo". No entanto, referências de artigos que são "submetidos" ou "em preparo" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: cada tabela deve ser apresentada em folha separada e numerada seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos

necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: cada figura deve ser apresentada em folha separada e numerada seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. _____

Título do Artigo:" _____ "

Nome(s) do(s) Autor(es)

Assinatura(s)

Data: ____/____/____