FLÁVIO AUGUSTO CARDOZO

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE *N*-ACETIL-GLICOSAMINA POR *Aeromonas* sp. ISOLADA DO ECOSSISTEMA MARINHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2017

FLÁVIO AUGUSTO CARDOZO

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE *N*-ACETIL-GLICOSAMINA POR *Aeromonas* sp. ISOLADA DO ECOSSISTEMA MARINHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Orientadora: Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memoriam*)

Versão Corrigida

A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cardozo, Flávio Augusto
Produção enzimática de N-acetil-glicosamina por Aeromonas sp. isolada do ecossistema marinho / Flávio Augusto Cardozo; orientador Prof. Dr Adalberto Pessoa Junior. -- São Paulo, 2017.
170 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Aeromonas. 2. Quitina. 3. Quitinases. 4. N-acetil-glicosamina. 5. Bactérias Quitinolíticas. I. Pessoa Junior, Prof. Dr Adalberto, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): **Flávio Augusto Cardozo**

Título da Tese: **Produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina por *Aeromonas* sp. isolada do ecossistema marinho**

Orientador(a): **Prof. Dr Adalberto Pessoa Junior**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **605/13** referente ao projeto intitulado: "*Produção enzimática de N-acetil-glicosamina por Aeromonas sp. isolada do ecossistema marinho*" sob a responsabilidade de **Flávio Augusto Cardozo,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 21 de maio de 2013.

p/ Fernando R. M. Abaulkada
PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sérgio e Betinha e meu irmão Caio pelo enorme apoio durante o doutorado. Mesmo distantes, eles estavam sempre presentes orando por mim e proporcionando momentos de reflexão, carinho e felicidade para que eu nunca desistisse e desanimasse.

À professora Irma Rivera (in memoriam) pela confiança, orientação, incentivo e amizade nesses anos. A oportunidade de ser um integrante de sua equipe mudou minha vida, abrindo portas para o mundo. Sua ajuda em momentos importantes e seus ensinamentos possibilitaram que eu realizasse uma conquista pessoal muito importante em minha vida.

Ao professor Adalberto Pessoa pela oportunidade de colaboração, orientação e confiança no meu trabalho. Sua clareza, objetividade e agililidade no debate de assuntos da tese e de burocracias fizeram com que a pressão fosse menor em vários momentos de preocupação.

Ao professor Juan Gonzalez pela oportunidade de doutorado sanduíche no Instituto de Recursos Naturalez y Agrobiología do Consejo Superior de Investigaciones Científicas em Sevilla, na Espanha. Sua maneira prática, didática e alegre de trabalhar me proporcionou muitos ensinamentos pessoais e profissionais.

Á professora Kelly Ishida por nos fornercer o apoio e estrutura para que o doutorado fosse concluído.

Á minha amiga e companheira de laboratório Nadia Catalina pelas horas de conversas, trabalhos e pela tranquilidade que transmitia em muitos momentos difíceis.

Á nossa técnica Zita pela sua amizade, preocupação, praticidade, caráter e dicas valiosas que sempre foram de muita ajuda.

Ao Valker Feitosa, pela colaboração, disposição e ensinamentos práticos e teóricos para que a etapa de produção de quitinases fosse realizada nesse estudo.

Ao técnico Aelson pela enorme ajuda com as analises das amostras em HPLC.

Ao Henrique Oliveira, pela ajuda no planejamento dos experimentos de hidrólise enzimática.

Aos Drs Geni Silva e Rob Edwards da San Diego State University, em San Diego, California, pela colaboração e analises genômicas.

Ao Dr. Pedro Ismael da Silva Junior e a doutoranda Elisa Cortazar do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, pela colaboração para as analises de HPLC.

Aos alunos e ex-alunos de nossa equipe que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse estudo.

Ao meu amigo Elias por esses anos de amizade, convivência, festas, momentos alegres e inúmeras conversas tanto no Brasil como na Espanha.

Ao meu amigo Rodolfo, por toda parceria, festas, viagens, histórias únicas e incontáveis momentos compartilhados desde quando cheguei em São Paulo.

Ao Pinotti, pela amizade desses anos, quarta-feiras de futebol e momentos de muita alegria.

Ao meu amigo Glaucus, pela amizade, conversas e anos de convivência.

À Alice, Arthur, Ceará, Claudinha, Débora, John, Pororoca, Tiago e Tonhão, amizades que tive prazer de ter durante os anos de moradia no Conjunto Residencial da USP - CRUSP e pelos vários churrascos e momentos alegres que compartilhamos.

À Alicia, Isabel Enn, Severine, Alri, Ania, Cesary Ale, Nico, Fernando, Maurício, Cristian, Carlitos, Alba, Miguel, Otávio e Marco, amizades que fiz durante o doutorado sanduíche e que me proporcionaram momentos únicos.

À família do JaganoPagode Biologia, time de futebol de campo da Biologia da USP que proporcionou várias amizades, sambas e momentos alegres.

Às funcionárias Fábia e Eliane da secretaria de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pela enorme atenção e suporte fornecido em todos os momentos que precisei.

Á minha namorada Débora Aoki, pessoa que tive o prazer de conhecer no último ano de doutorado e de fundamental apoiou nessa reta final.

A Cris, Rafa, Marcelo, Ian, Lucas, Camila e Jane, amizades que fiz no último ano de doutorado e que me proporcionaram vários momentos felizes e engraçados.

Aos alunos do grupo de pesquisa da professora Kelly Ishida, com os quais compartilhei o laboratório no ultimo ano do doutorado.

Aos alunos do grupo de pesquisa do professor Adalberto Pessoa, com os quais compartilhei o laboratório no último ano do doutorado, principalmente durante a etapa de produção de quitinases realizada nesse estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo N° 2012/16824-0, pelo apoio a pesquisa e concessão da bolsa de Doutorado.

RESUMO

CARDOZO, F. A. **Produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina por *Aeromonas* sp. isolada do ecossistema marinho.** 2017. 170 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

N-acetil-glicosamina (GlcNAc) é um composto de importância biotecnológica com grande potencial de aplicação nas áreas de farmácia, medicina e dermatologia. É atualmente produzido por hidrólise química da quitina, o polissacarídeo mais abundante no ambiente marinho e o principal constituinte do exoesqueleto dos artrópodes. No entanto, os processos geralmente utilizados são prejudiciais ao meio ambiente, têm baixo rendimento e alto custo. Este estudo demonstra o potencial de produção de GlcNAc a partir de α-quitina coloidal utilizando um coquetel de proteínas (contendo quitinases) produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306, como uma alternativa sustentável aos processos atuais. Dez estirpes (CH125, CH129, CH147, CH149, CH150, CH151, CH286, CHZ52, CHZ113 e CHZ306) pertencentes ao gênero *Aeromonas* foram avaliadas neste estudo. As estirpes foram caracterizadas por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA) utilizando seis *housekeeping genes* (*gltA, groL, gyrB, metG, ppsA* e *recA*) e quanto a presença de nove potenciais genes (*alt, act, ast, ahh1, aer, aerA, hlyA, ascV* e *ascFG*) associados à virulência. A capacidade das estirpes produzirem hemólise em Agar sangue também foi verificada. A estirpe com melhor perfil de produção de GlcNAc em função do tempo foi selecionada para os estudos de produção de quitinases e GlcNAc. Adicionalmente, a estirpe selecionada teve seu genoma sequenciado. Como resultado, as estirpes foram caracterizadas como pertencentes à espécie *Aeromonas caviae* e nenhum gene de virulência foi detectado por PCR. No entanto, todas apresentaram hemólise em placas de Agar sangue. *A. caviae* CHZ306 foi a estirpe selecionada para os estudos de produção de quitinases e GlcNAc e o sequenciamento do gemoma revelou a presença de múltiplos genes envolvidos na codificação de fatores associados à virulência e enzimas envolvidas na hidrólise de quitina. Um meio de cultivo contendo *corn-steep liquor* e peptona A como fontes adicionais de carbono e nitrogênio foi selecionado, aumentando a biossíntese de quitinases por *A. caviae* CHZ306. As condições de temperatura (34 °C), pH (8,0), concentração de α-quitina coloidal (5%) e k_La 55 h^{-1} (250 rpm de agitação e 1,75 vvm de aeração) determinadas em biorreator possibilitaram a produção de um coquetel de proteínas com 12 h de cultivo, produzindo 56 $U.L^{-1}$ de endoquitinases, 64 $U.L^{-1}$ de quitobiosidases e 170 $U.L^{-1}$ de *N*-acetil-glicosaminidases. As condições de temperatura (46 °C), pH (6,0), concentração de proteínas (1,5 $g.L^{-1}$) e α-quitina coloidal (5%) determinadas para a produção de GlcNAc possibilitaram a conversão máxima de 67% de α-quitina e produtividade máxima de 0,31 $g.L^{-1}.h^{-1}$ de GlcNAc. Este estudo demonstra um dos mais eficientes processos de hidrólise enzimática de quitina e isolados de *A. caviae* com grande potencial para produção de quitinases, GlcNAc e outros derivados de quitina.

Palavras-chave: *Aeromonas*. Quitina. Quitinase. *N*-acetil-glicosamina. Bactérias Quitinolíticas.

ABSTRACT

CARDOZO, F. A. **Enzymatic production of *N*-acetyl-glucosamine by *Aeromonas* sp. isolated from the marine ecosystem.** 2017. 170 f. Ph. D thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) is a compound of biotechnological importance with great potential of application in the areas of pharmacy, medicine and dermatology. It is currently produced by chemical hydrolysis of chitin, the most abundant polysaccharide in the marine environment and the main constituent of the exoskeleton of arthropods. However, the used processes are harmful to the environment, have low yield and high cost. This study demonstrates the potential for production of GlcNAc from colloidal α-chitin using a protein cocktail (containing chitinases) produced by *Aeromonas caviae* CHZ306, as a sustainable alternative to current processes. Ten strains (CH125, CH129, CH147, CH149, CH150, CH151, CH286, CHZ52, CHZ113 and CHZ306) belonging to the *Aeromonas* genus were evaluated in this study. The strains were characterized by Multilocus Sequence Analysis (MLSA) using six housekeeping genes (*gltA*, *groL*, *gyrB*, *metG*, *ppsA* and *recA*) and the presence of nine potential genes (*alt*, *act*, *ast*, *ahh1*, *aer*, *aerA*, *hlyA* , *AscV* and *ascFG*) associated with virulence. The ability of the strains to produce hemolysis in blood agar was also verified. The strain with the best GlcNAc production profile as a function of time was selected for the studies of chitinases and GlcNAc production. In addition, the selected strain had its genome sequenced. According the results, the strains were characterized as belonging to the *Aeromonas caviae* species and no virulence genes were detected by PCR. However, all strains showed hemolysis on blood agar plates. *A. caviae* CHZ306 was the selected strain for the studies of chitinases and GlcNAc production and, the genome sequencing revealed the presence of multiple genes encoding virulence associated factors and enzymes involved on chitin hydrolysis in this strain. A culture medium containing corn-steep liquor and peptone A as additional carbon and nitrogen sources was selected, increasing the chitinase biosynthesis by *A. caviae* CHZ306. The determined conditions of temperature (34 °C), pH (8.0), colloidal α-chitin concentration (5%) and k_La 55 h^{-1} (250 rpm of agitation and 1.75 vvm of aeration) in bioreactor produced a protein cocktail in 12 h of culture, with 56 $U.L^{-1}$ of endochitinases, 64 $U.L^{-1}$ of chitobiosidases and 170 $U.L^{-1}$ of *N*-acetyl-glucosaminidases. The determined conditions of temperature (46 °C), pH (6.0), protein cocktail concentration (1.5 $g.L^{-1}$) and colloidal α-chitin concentration (5%) for GlcNAc production presented maximum conversion of 67% of α-chitin and maximum productivity of 0.31 $gL^{-1}.h^{-1}$ of GlcNAc. This study demonstrates one of the most efficient processes of chitin enzymatic hydrolysis and strains of *A. caviae* with great potential for chitinases, GlcNAc and other chitin derivatives production.

Keywords: *Aeromonas*. Chitin. Chitinase. *N*-acetyl-glucosamine. Chitinolytic Bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da produção de *N*-acetil-glicosamina a partir de resíduos do processamento de frutos do mar. 21
Figura 2 - Representação da estrutura química da quitina. 22
Figura 3 - Representação gráfica da organização das cadeias poliméricas das três formas de quitina. 23
Figura 4 - Aplicações biotecnológicas de enzimas quitinolíticas. 26
Figura 5 - Representação das necessidades nutricionais dos microrganimos, de acordo com a tabela periódica de elementos. 34
Figura 6 - Representação gráfica das diferentes estruturas geralmente associadas no processo de patogênese por estirpes de *Aeromonas*. 38
Figura 7 - Produtos das reações de PCR obtidos pela amplificação dos housekeeping genes e genes de virulência em *Aeromonas Hydrophila* 93C, utilizada como controle nos estudos. 54
Figura 8 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *gltA* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho. 56
Figura 9 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *groL* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho. 57
Figura 10 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *gyrB* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho. 58
Figura 11 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *metG* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho. 59
Figura 12 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *ppsA* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho. 60
Figura 13 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *recA* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho. 61
Figura 14 - Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas dos genes *gltA*, *groL*, *gyrB*, *metG*, *ppsA* e *recA* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho. 62
Figura 15 - Demonstração experimental da atividade hemolítica em placas de Agar sangue de carneiro por *Aeromonas caviae* CH125, isolada do ambiente marinho. 63
Figura 16 - Conversão de α-quitina coloidal em *N*-acetil-glicosamina utilizando coquetéis de quitinases obtidos nas etapas iniciais (24 h) (A) e finais (96 h) (B) do cultivo de *Aeromonas caviae* CH125, CH129 e CHZ306, isoladas do ambiente marinho. 64

Figura 17 - Rendimentos de *N*-acetil-glicosamina obtidos a partir da hidrólise de α-quitina coloidal utilizando coquetéis de proteínas de *Aeromonas caviae* isoladas do ambiente marinho. 66
Figura 18 - Produtividades de *N*-acetil-glicosamina obtidas a partir da hidrólise de α-quitina coloidal utilizando coquetéis de proteínas de *Aeromonas caviae* isoladas do ambiente marinho. 67
Figura 19 - Características genéticas identificadas com o sequenciamento do genoma de *Aeromonas caviae* CHZ306. 68
Figura 20 - Representação das enzimas envolvidas na conversão de quitina em frutose 6-fosfato, identificadas com o sequenciamento do genoma de *Aeromonas caviae* CHZ306. 72
Figura 21 - Resumo dos experimentos realizados para determinação do perfil do coquetel de quitinases para produção de *N*-acetil-glicosamina. 82
Figura 22 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e N-acetil-glicosaminidases (D) entre as etapas de avaliação das condições de cultivo para produção do coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306. 93
Figura 23 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D) durante a seleção de um meio de cultivo para produção de quitinases por *A. caviae* CHZ306. 94
Figura 24 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 utilizando meios de cultivos preparados com diferentes fontes de nitrogênio. 96
Figura 25 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D) por *Aeromonas caviae* CHZ306 em meios de cultivo com diferentes proporções de *Corn-Steep Liquor* e Peptona A. 97
Figura 26 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D), em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de quitina, aplicadas no primeiro planejamento experimental para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 100
Figura 27 - Diagramas de Pareto para os efeitos das variáveis temperatura, pH e concentração de quitina na produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e N-acetil-glicosaminidases (C), de acordo com o primeiro planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 104
Figura 28 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D), em diferentes condições de temperatura,

pH e concentração de quitina, aplicadas no segundo planejamento experimental para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 106
Figura 29 - Diagramas de Pareto para os efeito das variáveis temperatura, pH e concentração de quitina na produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e *N*-acetil-glicosaminidases (C), de acordo com o segundo planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 110
Figura 30 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D), em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de quitina, aplicadas no terceiro planejamento experimental para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 112
Figura 31 - Diagramas de Pareto para os efeitos das variáveis temperatura e concentração de quitina na produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e *N*-acetil-glicosaminidases (C), de acordo com o terceiro planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 115
Figura 32 - Interpolação de dados pontuais obtidos durante a avaliação da produção de endoquitinases (A), quitobiosidades (B) e *N*-acetil-glicosaminidases (C) por *Aeromonas caviae* CHZ306 no segundo e terceiro planejamento experimental. 116
Figura 33 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D), oxigênio dissolvido (E) e pH (F) em diferentes condições de agitação e aeração aplicadas no quarto planejamento experimental para avaliação da produção de quitinases por *A. caviae* CHZ306, em biorreator. 120
Figura 34 - Superfícies de resposta do planejamento experimental, do tipo fatorial completo 32, para produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e N-acetil-glicosaminidases por *A. caviae* CHZ306, em biorreator. 121
Figura 35 - Diagramas de Pareto para os efeitos das variáveis agitação e aeração na produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e *N*-acetil-glicosaminidases (C), de acordo com o quarto planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator. 123
Figura 36 - Efeito da temperatura e pH na produção de *N*-acetil-glicosamina utilizando quitinases de *Aeromonas caviae* CHZ306. 141
Figura 37 - Efeito das concentrações de proteínas na produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina, em função do tempo de incubação, utilizando quitinases de *Aeromonas caviae* CHZ306. 142

Figura 38 - Efeito da concentração de quitina na produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina utilizando quitinases de *Aeromonas caviae* CHZ306. 143
Figura 39 - Produção de *N*-acetil-glicosamina a partir de diferentes formas de quitina utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306. 145
Figura 40 – Produtividade e taxa de conversão de α-quitina coloidal em *N*-acetil-glicosamina utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306. 145
Figura 41 - Representação ilustrativa da suposta estrutura da α-quitina após submissão ao tratamento químico para formação da α-quitina coloidal. 150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição elementar de células microbianas. 34

Tabela 2 - Relação de estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho, de acordo com a origem, parâmetros físico-quimicos das amostras durante as coletas e, atividade quitinolítica em placas de Agar com α-quitina coloidal. 45

Tabela 3 - Iniciadores, tamanho dos amplicons e temperaturas de anelamento utilizadas para amplificação dos housekeeping genes e genes de virulência em estirpes do gênero Aeromonas isoladas do ambiente marinho. 49

Tabela 4 - Similaridade nucleotídica das sequências dos genes *gltA, groL, gyrB, metG, ppsA* e *recA* de dez estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho 55

Tabela 5 - Concentração de proteínas e atividade de quitinases dos coquetéis de proteínas avaliados durante a seleção da estirpe de *Aeromonas caviae* com maior capacidade de converter α-quitina cloidal em *N*-acetil-glicosamina. 65

Tabela 6 - Análise comparativa de genes que codificam fatores associados à virulência em espécies do gênero *Aeromonas*. (Continua) 70

Tabela 7 - Comparativo de estudos de produção de *N*-acetil-glicosamina por enzimas microbianas..... 77

Tabela 8 - Características dos substratos utilizados como fonte de nitrogênio na preparação dos meios de cultivo para produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306..... 85

Tabela 9 - Análise da composição elementar para carbono (C) e nitrogênio (N) e relação C:N dos substratos utilizados como fonte de nitrogênio na preparação dos meios de cultivo. 86

Tabela 10 - Variáveis e níveis (valores codificados e reais) utilizados nos planejamentos experimentais para otimização da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*..... 88

Tabela 11 - Variáveis e níveis (valores codificados e reais) utilizados no planejamento experimental para avaliação da influência do k_La na produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator de bancada BioFlo 110 (New Brunswick, Edison, NJ, Estados). 89

Tabela 12 - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) determinado no biorreator de bancada Bioflo 110 durante o estudo de produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306..... 90

Tabela 13 - Comparação entre as condições iniciais e as determinadas após avaliação das condições de cultivo para produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator. 91
Tabela 14 - Comparação da produtividade de endoquitinases, quitobiosidases e N-acetil-glicosaminidases entre as etapas de avaliação das condições de cultivo para produção do coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306. 92
Tabela 15 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 quando cultivadas em meios de cultivo compostos por diferentes fontes de nitrogênio. 98
Tabela 16 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 durante avaliação do primeiro planejamento experimental em *shaker*. 101
Tabela 17 - Análises de variância (ANOVA) para produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases, de acordo com o primeiro planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 103
Tabela 18 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 durante avaliação do segundo planejamento experimental em *shaker*. 107
Tabela 19 - Analises de variância (ANOVA) para produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases, de acordo com o segundo planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 109
Tabela 20 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 durante avaliação do terceiro planejamento experimental em *shaker*. 113
Tabela 21 - Análises de variância (ANOVA) para produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases, de acordo com o terceiro planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 114
Tabela 22 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 durante avaliação de um planejamento experimental em biorreator. 118
Tabela 23 - Análises de variância (ANOVA) para produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases, de acordo com o quarto planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator. 122

Tabela 24 - Comparação da composição e relação C:N dos meios de cultivo M1 e M15 avaliados durante a seleção do meio de cultivo para produção de um coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. 125
Tabela 25 - Comparação de alguns estudos realizados para avaliação da influência das fontes de nitrogênio na produção de quitinases. 126
Tabela 26 - Comparação de alguns estudos realizados para avaliação dos efeitos das condições de temperatura, pH e concentração de quitina na produção de quitinases. 128
Tabela 27 - Atividade de endoquitinases, quitobiosidades e *N*-acetil-glicosaminidases dos coquetéis de proteínas utilizados para o estudo de produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina. 138
Tabela 28 - Comparativo da produtividade de alguns estudos de conversão de α-quitina em *N*-acetil-glicosamina utilizando extrato bruto de quitinases. 147

SUMÁRIO

CAPITULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA.....20

1.1 INTRODUÇÃO 20

1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....22

1.2.1 Definição da estrutura química da quitina e método de extração 22

1.2.2 Classificação, ecologia e aplicações biotecnológicas das quitinases 24

1.2.3 Aplicações biotecnológicas e produção de *N*-acetil-glicosamina 27

1.2.4 Taxonomia e caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas* 31

1.2.5 Nutrição, crescimento e produção de quitinases por estirpes do gênero *Aeromonas* 33

1.2.6 Fatores associados à virulência em *Aeromonas* 37

CAPÍTULO 2 - SELEÇÃO DE UMA ESTIRPE DO GÊNERO *Aeromonas* PARA ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE QUITINASES E *N*-ACETIL-GLICOSAMINA.....42

2.1 INTRODUÇÃO 42

2.2 OBJETIVOS 44

2.2.1 Objetivo geral.....44

2.2.2 Objetivos específicos.....44

2.3 MATERIAL E MÉTODOS 45

2.3.1 Reisolamento dos isolados.....45

2.3.2 Caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas* por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA). 46

2.3.3 Verificação de fatores associados à virulência em estirpes do gênero *Aeromonas* ..47

2.3.3.1 Verificação de genes associados à virulência 47

2.3.3.2 Verificação de atividade hemolítica 48

2.3.4 Determinação do tempo de cultivo para obtenção de coquetéis de proteínas, contendo quitinases, por estirpes do gênero *Aeromonas*.....49

2.3.4.1 Preparação do inóculo 50

2.3.4.2 Recuperação de proteínas do sobrenadante 50

2.3.4.3 Quantificação de quitinases e proteínas totais.....50

2.3.4.4 Reação de hidrólise enzimática de α-quitina e quantificação de N-acetil-glicosamina.....51

2.3.5 Seleção de uma estirpe do gênero *Aeromonas* para estudos de produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina 52
2.3.6 Sequenciamento do genoma da estirpe selecionada para produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina 53
2.4 RESULTADOS 54
2.4.1 Caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas* por *Multilocus Sequence Analysis* e verificação de fatores associados à virulência 54
2.4.2 Determinação do tempo de cultivo para obtenção de coquetéis de proteínas, contendo quitinases, por estirpes do gênero Aeromonas 63
2.4.3 Seleção de uma estirpe do gênero *Aeromonas* para estudos de produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina 65
2.4.4 Sequenciamento do genoma de *Aeromonas caviae* CHZ306 68
2.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 73
2.5.1 Caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas* por *Multilocus Sequence Analysis* e verificação de fatores associados à virulência 73
2.5.2 Seleção de uma estirpe do gênero *Aeromonas* para estudos de produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina 76
CONCLUSÕES 79

CAPÍTULO 3 - CONDIÇÕES DE CULTIVO EM BIORREATOR PARA PRODUÇÃO DE QUITINASES POR *Aeromonas caviae* CHZ306 81

3.1 INTRODUÇÃO 81
3.2 OBJETIVOS 83
3.2.1 Objetivo geral 83
3.2.2 Objetivos específicos 83
3.3 MATERIAL E MÉTODOS 84
3.3.1 Preparação do banco de trabalho 84
3.3.2 Meio de cultivo para produção de um coquetel de quitinases em *shaker* por *Aeromonas caviae* CHZ306 84
3.3.3 Determinação das condições de temperatura, pH e concentração de quitina para produção de um coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 87
3.3.4 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator. 88

3.4 RESULTADOS **91**
3.4.1 Seleção do meio de cultivo para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. **93**
3.4.2 Condições de temperatura, pH e concentração de quitina para produção de um coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 ..... **99**
3.4.2.1 Avaliação do primeiro planejamento experimental aplicado para produção de um coquetel de quitinases em shaker **99**
3.4.2.2 Avaliação do segundo planejamento experimental aplicado para produção de um coquetel de quitinases em shaker *105*
3.4.2.3 Avaliação do terceiro planejamento experimental aplicado à produção de um coquetel de quitinases em shaker *111*
3.4.3 Determinação do melhor coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator **117**
3.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS **124**
3.5.1 Seleção do meio de cultivo para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. **124**
3.5.2 Determinação das condições de temperatura, pH e concentração de quitina para produção de um coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*. **127**
3.5.3 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator **130**
CONCLUSÕES **133**

CAPÍTULO 4 - PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE *N*-ACETIL-GLICOSAMINA UTILIZANDO COQUETEL DE PROTEÍNAS PRODUZIDO POR *Aeromonas caviae* CHZ306 134

4.1 INTRODUÇÃO **134**
4.2 OBJETIVOS **136**
4.2.1 Objetivo geral **136**
4.2.2 Objetivos específicos **136**
4.3 MATERIAL E MÉTODOS **137**

4.3.1 Avaliação das condições de hidrólise de α-quitina coloidal para produção de *N*-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306 137
4.3.1.1 Preparação do coquetel de proteínas por Aeromonas caviae CHZ306 137
4.3.1.2 Determinação das condições de temperatura e pH para produção de N-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por Aeromonas caviae CHZ306 .. 138
4.3.1.3 Determinação da concentração do coquetel de proteínas produzido por Aeromonas caviae CHZ306, para produção de N-acetil-glicosamina 138
4.3.1.4 Determinação da concentração de α-quitina coloidal para produção de N-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por Aeromonas caviae CHZ306 .. 139
4.3.1.5 Avaliação da produção de N-acetil-glicosamina por hidrólise enzimática de α-quitina coloidal, utilizando coquetel de proteínas produzido por Aeromonas caviae CHZ306 140
4.4 RESULTADOS 141
4.4.1 Determinação das condições de temperatura e pH para produção de *N*-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306 141
4.4.2 Determinação da concentração do coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306, para produção de *N*-acetil-glicosamina. 142
4.4.3 Determinação da concentração de α-quitina coloidal para produção de N-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306 143
4.4.4 Avaliação da produção de *N*-acetil-glicosamina durante a hidrólise de α-quitina coloidal, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306 .. 144
4.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 146
CONCLUSÕES 151

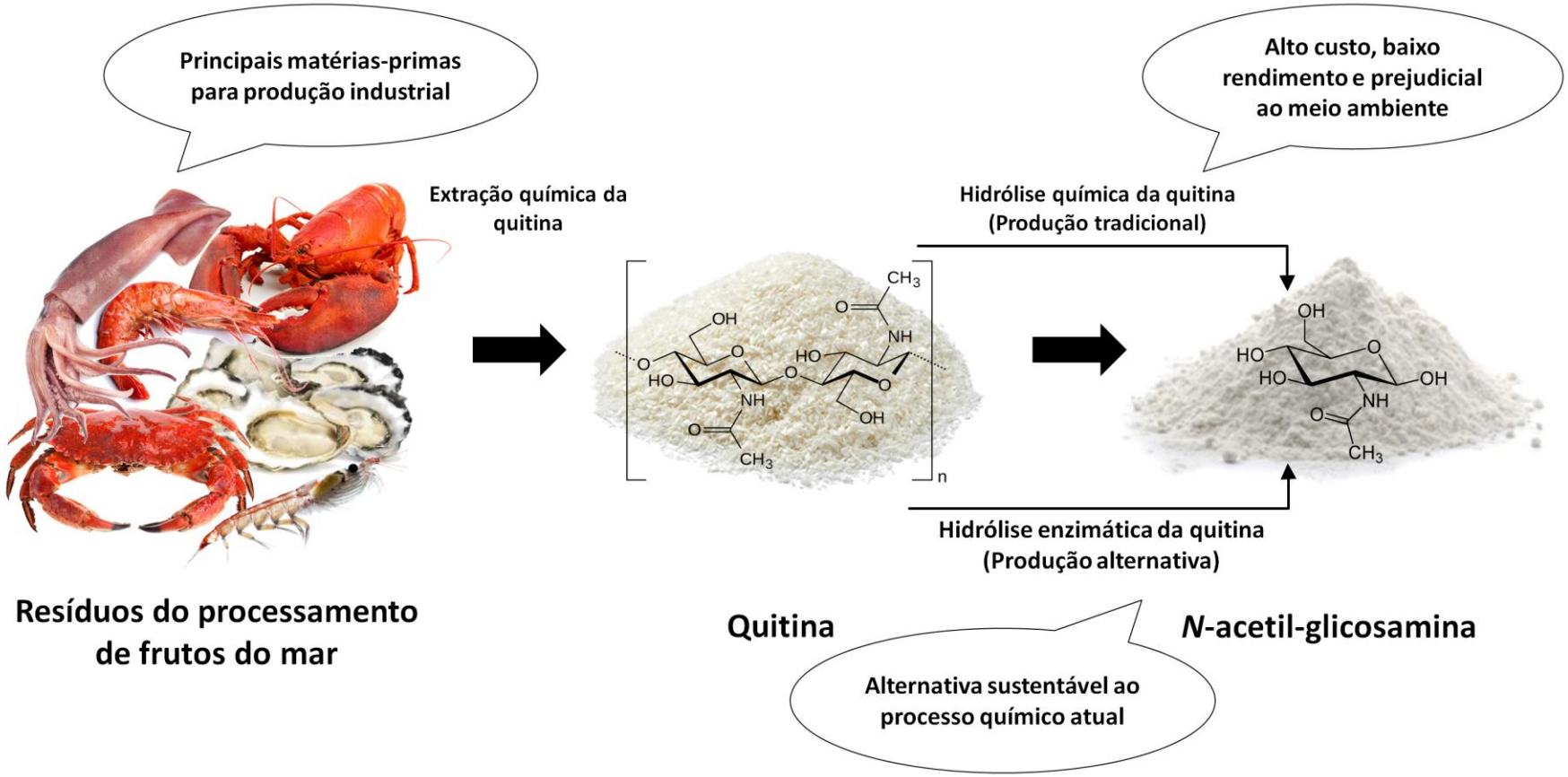
CAPITULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

Bactérias quitinolíticas estão amplamente distribuídas no ambiente marinho e desempenham um papel extremamente importante e eficiente na degradação de quitina nos oceanos. A degradação de quitina é realizada por enzimas denominadas quitinases, as quais possuem diversas funções na natureza e podem ser aplicadas em diversas áreas, principalmente na produção de derivados de quitina. A produção de *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc), derivado da quitina, tem despertado interesse nos últimos anos devido as suas funcionalidades. GlcNAc é um valioso agente farmacológico para o tratamento da osteoartrite e doenças inflamatórias intestinais, incluindo colite ulcerativa e a doença de Crohn. Além disso, mostra grande potencial para ser utilizado como componente de cosméticos e produção de bioetanol. GlcNAc tem sido tradicionalmente produzida pela hidrólise ácida da quitina, extraída das carapaças de crustáceos originadas do processamento industrial de frutos do mar, mas os procedimentos geralmente utilizados apresentam custos elevados, baixos rendimentos e geram grandes quantidades de resíduos químicos que podem afetar o meio ambiente. A aplicação de quitinases bacterianas como uma alternativa sustentável à hidrólise química da quitina é muito atrativa (Figura 1), pois bactérias são fáceis de manipular, possuem menores custos de produção e são susceptíveis à engenharia genética. Além disso, a utilização dessas enzimas no processo produtivo evitaria a utilização de produtos químicos que podem vir a causar danos ambientais.

Diante disso e dos conhecimentos adquiridos com bactérias quitinolíticas desde 2005, em nosso grupo de pesquisa, tornou-se imprescindível explorar a capacidade de bactérias quitinolíticas, do gênero *Aeromonas*, para a produção enzimática de GlcNAc. Dessa maneira, este estudo teve como objetivo avaliar a produção de quitinases e GlcNAc por uma estirpe selecionada do gênero *Aeromonas*, derivada do ecossistema marinho. A estirpe foi caracterizada por *Multilocus Sequence Analysis* e quanto à presença de fatores associados à virulência. Adicionalmente, a estirpe teve seu genoma sequenciado.

Figura 1 - Fluxograma da produção de *N*-acetil-glicosamina a partir de resíduos do processamento de frutos do mar.



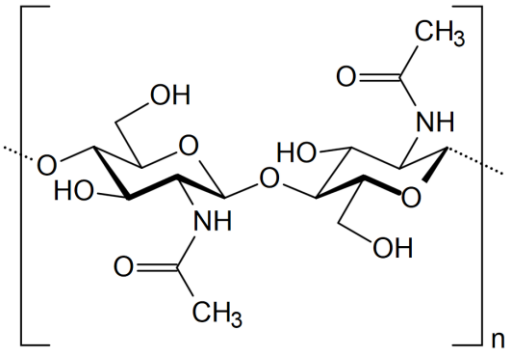
FONTE: Cardozo, 2017.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Definição da estrutura química da quitina e método de extração

A quitina é um biopolímero insolúvel de estrutura cristalina formado por cadeias não ramificadas de *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), unidos por ligações glicosídicas do tipo β-1,4 (Figura 2) (HACKMAN; GOLDBERG, 1965). Após a celulose, é a segunda substância orgânica encontrada em maior quantidade na natureza e a mais abundante no ambiente marinho. É o principal constituinte do exoesqueleto dos artrópodes e da parede celular dos fungos e algas e pode ser encontrada associada a lipídeos, proteínas, pigmentos e açúcares (GOODAY, 1990).

Figura 2 - Representação da estrutura química da quitina.

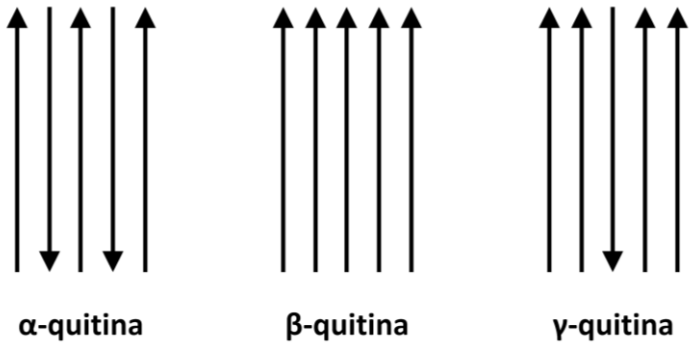


FONTE: Cardozo, 2017.

A quitina pode ser encontrada na natureza em três estruturas polimórficas distintas denominadas: alfa-quitina (α-quitina), beta-quitina (β-quitina) e gama-quitina (γ-quitina) (Figura 3) (HACKMAN; GOLDBERG, 1965; RUDALL; KENCHING, 1973). A forma mais comum é a α-quitina, a qual é constituída por cadeias organizadas de forma antiparalela (CARLSTROM, 1957). Esse tipo de quitina é encontrada fortemente associada a proteínas, materiais inorgânicos e está presente em estruturas rígidas e resistentes como a cutícula de artrópodes (RUDALL; KENCHING, 1973). A β-quitina pode ser encontrada em espinhos e cerdas de alguns anelídeos, em tubos de poliquetos, na concha interna de lulas, na carapaça de algumas diatomáceas (BLACKWELL et al., 1967; BLACKWELL; WEIH, 1984; HERTH et al., 1986) e, é constituída por cadeias organizadas de forma paralela, o que possibilita a formação de ligações intermoleculares mais fracas e uma menor estabilidade dessa molécula

em comparação a α-quitina (KURITA, 2001). Já a γ-quitina, é a forma mais rara presente na natureza e é constituída por uma mistura de α e β-quitina, ou seja, duas de três cadeias são organizadas de forma paralela e a terceira aparece na direção oposta. (RUDALL; KENCHING, 1973). Essa forma de quitina pode ser encontrada em casulos de dois gêneros de besouros e no revestimento do estômago de lulas (MUZZARELLI, 1977).

Figura 3 - Representação gráfica da organização das cadeias poliméricas das três formas de quitina.



FONTE: Adaptada de Einbu (2007).

A quitina pode ser obtida a partir de uma variedade de organismos marinhos, insetos e fungos, mas as principais matérias-primas para produção industrial de quitina são as carapaças de crustáceos originadas do processamento industrial de frutos do mar (ABRAM; HIGUERA, 2004; ROBERTS, 1992). O Japão, os EUA e a China são os responsáveis pela maior produção de quitina em nível mundial, mas esse polímero também é produzido em menores escalas na Índia, Noruega, Canadá, Itália, Polônia, Chile e Brasil (ABRAM; HIGUERA, 2004).

A extração de quitina a partir da biomassa envolve a execução de tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar as substâncias que a acompanham. Nos crustáceos, a quitina encontra-se firmemente associada aos demais constituintes do exoesqueleto. Portanto, três etapas são requeridas para isolar esse polissacarídeo: desproteinização, desmineralização e despigmentação (ABRAM; HIGUERA, 2004; ROBERTS, 1992).

A eliminação das proteínas pode ser realizada utilizando um grande número de solventes, sendo o NaOH o mais utilizado. A desmineralização pode ser obtida realizando um tratamento com diferentes tipos de ácidos, como HCl, HNO_3 e H_2SO_3, sendo o HCl, geralmente, o ácido mais utilizado para essa etapa (ANTONINO, 2007). Os exoesqueletos de crustáceos contêm pigmentos que não parecem estar complexados com materiais inorgânicos

ou proteínas, pois não são eliminados durante a desproteinização e desmineralização. Esses pigmentos podem ser eliminados pela extração com etanol ou acetona, depois do tratamento de desmineralização ou por branqueamento com uso de $KMnO_4$, NaClO, SO_2, $NaHSO_3$, $Na_2S_2O_3$ ou H_2O_2 (ANTONINO, 2007).

1.2.2 Classificação, ecologia e aplicações biotecnológicas das quitinases

As quitinases são enzimas responsáveis pela despolimerização da quitina. Elas hidrolisam as ligações glicosídicas entre as unidades de açúcares e estão classificadas no grupo das glicosil-hidrolases (GHs). As glicosil-hidrolases são classificadas através do banco de dados enzimático CAZy (*Carbohydrate-Active EnZYymes*) (CANTAREL et al., 2009; DAVIES; HENRISSAT, 1995; HENRISSAT; BAIROCH, 1996), o qual fornece uma lista continuamente atualizada das famílias de glicosil-hidrolases e, que há alguns anos, também fornece uma lista de outras famílias de enzimas que atuam sobre carboidratos, tais como polissacarídeo-liases (PLs), glicosil-transferases (GTs) e carboidrato-esterases (CEs) (CANTAREL et al., 2009).

De acordo com o sistema de classificação das glicosil-hidrolases, as quitinases estão agrupadas dentro das famílias GH18 e GH19 e podem ser encontradas em bactérias, fungos, leveduras, vírus, plantas e animais (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; BAIROCH, 1993; OHNO et al., 1996; SUZUKI et al., 1999). Essas enzimas têm a exclusiva capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas β-1,4 entre as unidades de *N*-acetil-D-glicosamina (FUKAMIZO et al., 1994; MASSON et al., 1994) e podem ser classificadas em duas grandes categorias baseando-se na forma com que atuam na despolimerização da quitina: as exoquitinases e endoquitinases. As exoquitinases podem ser divididas em duas subcategorias, as quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998; DEANE et al., 1998). As endoquitinases clivam aleatoriamente a molécula de quitina liberando oligossacarídeos como quitotetrose, quitotriose e quitobiose. As quitobiosidases liberam somente diacetilquitobioses (dímeros de *N*-acetil-glicosamina), já as *N*-acetil-glicosaminidases clivam os oligossacarídeos produzidos pelas endoquitinases e quitobiosidades, gerando monômeros de *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998; HARMAN et al., 1993; SAHAI; MANOCHA, 1993).

Outra classe de quitinases denominada quitina deacetilase (CE 3.5.1.41) foi descoberta a partir de extratos do fungo *Mucor rouxii* (ARAKI; ITO, 1975), a qual hidrolisa o grupo

acetil nas unidades de *N*-acetil-glicosamina da quitina gerando unidades de glicosamina e ácido acético. Ela é um dos membros da família 4 das carboidrato-esterases (CE-4s), tal como definido no banco de dados CAZy (COUTINHO; HENRISSAT, 1999) e, após o crescente interesse nas suas funções, vários estudos detectaram sua presença em fungos (ARAKI; ITO, 1975), insetos (DIXIT et al., 2008) e bactérias (LI et al., 2007; ROSEMAN, 1957; ZHOU et al., 2010).

Um grande número de enzimas com capacidade de hidrolisar a quitina tem sido descrito na literatura (BASSLER et al., 1991a; HOWARD et al., 2003; KEYHANI; ROSEMAN, 1996; KEYHANI; ROSEMAN, 1999; LAN et al., 2004; MEHMOOD et al., 2010). No entanto, endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases são aquelas nas quais as formas de atuação, na hidrólise da quitina, estão mais bem caracterizadas (DAHIYA et al., 2006; SAHAI; MANOCHA, 1993).

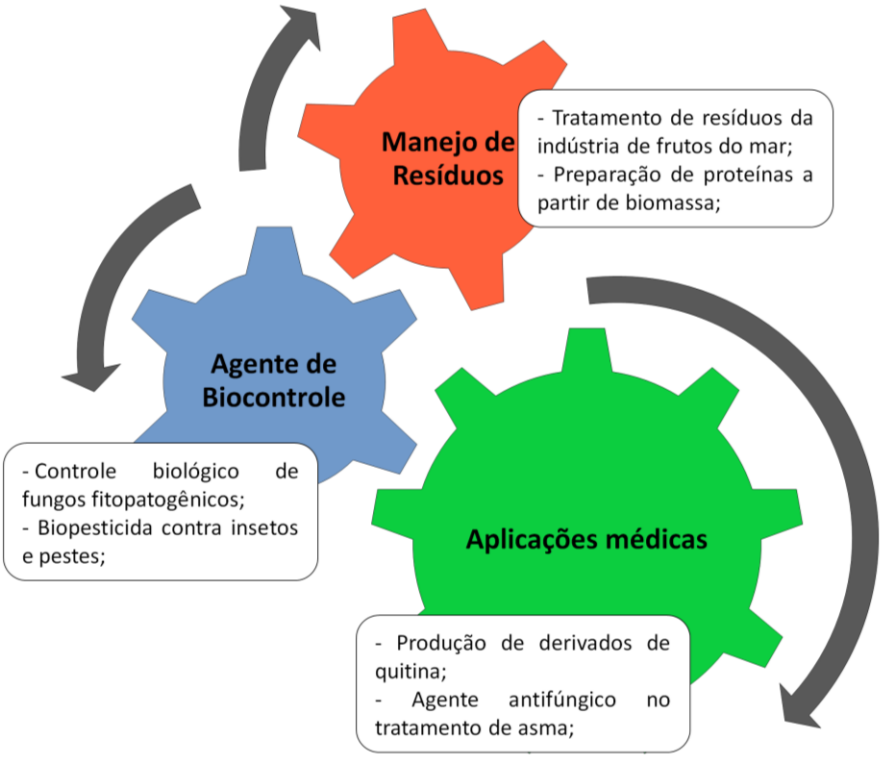
Quitinases são enzimas de grande importância ecológica e possuem diversas funções na natureza, tais como a associação aos mecanismos de defesa, nutrição e morfogênese numa ampla diversidade de organismos (KEYHANI; ROSEMAN, 1999; SUGINTA et al., 2009). As bactérias quitinolíticas empregam as quitinases no processo de hidrólise de quitina, permitindo sua reciclagem na natureza (SVITIL et al., 1997; WANG et al., 1997; ZOBELL; RITTENBERG, 1938). Nos artrópodes, elas estão envolvidas nas etapas de crescimento denominado ecdise, atuando na quebra das moléculas de quitina que unem o exoesqueleto aos músculos possibilitando que estes organismos liberem essa carapaça “apertada” e forme uma nova (MERZENDORFER; ZIMOCH, 2003). Nas plantas, estão envolvidas nos mecanismos de resistência a fungos, insetos e outros fitopatógenos, evitando assim o surgimento de doenças (AJIT et al., 2006; TANAKA et al., 1970; ZHANG et al., 2001). Nos fungos, as quitinases são utilizadas nos processos nutricionais, autolíticos e morfogenéticos (ADAMS, 2004) e, no caso de alguns tipos de vírus, como por exemplo, os baculovírus, as quitinases ajudam na penetração da membrana peritrófica dos insetos e na liberação dos vírus após a morte do inseto hospedeiro (GOODAY, 1995). Já em mamíferos, incluindo seres humanos, quitinases têm sido encontradas em macrófagos, acreditando-se que estejam envolvidas nos mecanismos de defesa contra agentes patogênicos (BOOT et al., 2001; TJOELKER et al., 2000), uma vez que níveis elevados de quitinases foram encontrados tanto no sangue como em tecidos de cobaias infectadas por *Aspergillus fumigatus* (OVERDIJK et al., 1996, 1999).

Com o passar dos anos, as quitinases foram ganhando uma ampla variedade de aplicações biotecnológicas (Figura 4), as quais foram impulsionadas por dois principais motivos: 1) Reduzir o uso de pesticidas químicos por alternativas mais seguras e ecológicas e;

2) Reduzir a quantidade de resíduos gerados no processamento de frutos do mar.

Essas possibilidades, junto com o potencial biotecnológico da quitina e seus derivados nas áreas biomédica, farmacêutica e de biomateriais, tiveram grande influência no aumento do interesse das aplicações de enzimas quitinolíticas.

Figura 4 - Aplicações biotecnológicas de enzimas quitinolíticas.



FONTE: Adaptada de Rathore e Gupta (2015).

A preocupação com os efeitos nocivos dos pesticidas químicos ao meio ambiente e ao ser humano, por exemplo, aumentou o interesse na busca de alternativas mais seguras e ecológicas para o controle de pragas. Como a parede celular de alguns fungos e a cutícula de insetos fitopatogênicos são ricas em quitina, o potencial de utilização de quitinases como agente de biocontrole de pragas e, para o desenvolvimento de plantas trangênicas tem sido promissor. O antagonismo de quitinases de fungos e bactérias exibido contra fungos e insetos fitopatogenicos, bem como a inibição do crescimento de fungos pela expressão de quitinases de plantas (HOWELL, 2003; SABA et al., 2012) também tem sido características de extrema importancia nos estudos. Outro ponto a ser destacado é o potencial de utilização de fungos patógenos de insetos para produção de quitinases e controle biológico. Esses fungos apresentam grande potencial de aplicação, pois são capazes de superar as barreiras físicas do

hospedeiro produzindo múltiplas enzimas extracelulares, incluindo enzimas quitinolíticas, que ajudam a penetrar a cutícula e facilitar a infecção (RATHORE; GUPTA, 2015).

O comércio global de frutos do mar tem vivenciado um período importante de desenvolvimento nos últimos tempos, com produções médias de aproximadamente 100 milhoes de toneladas anuais (FAO, 2016). No entanto, na medida em que se processam maiores quantidades de pescados, existem também maiores quantidades de rejeitos, tais como cabeças de camarão, carapaças de crustáceos, conchas de ostras e mariscos. Anualmente, entre 6-8 milhões de toneladas de rejeitos de carapaças de caranguejo, camarão e lagosta são produzidas globalmente (FAO, 2014). Esses rejeitos são potencialmente valiosos caso sejam transformados em produtos para o consumo humano, mas não recebem o tratamento adequado na maioria das vezes, sendo frequentemente despejados no mar nos países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos como, por exemplo, na Austrália, o tratamento é oneroso, sendo de aproximadamente US$ 150 por tonelada (YAN; CHEN, 2015). O uso de quitinases visando o manejo desses rejeitos é uma das principais aplicações dessas enzimas, que podem ser aplicadas para converter a biomassa quitinolítica, ou seja, os resíduos de organismos marinhos em compostos de elevado valor biotecnológico, tais como derivados de quitina (quitosana, quitooligossacarídeos e *N*-acetil-glicosamina), proteínas (*single cell protein*) e pigmentos (astaxantina), reduzindo assim, a poluição ambiental.

Outras aplicações das quitinases incluem o isolamento de protoplastos de fungos e leveduras (YANO et al., 2004) e tratamento da asma (SHUHUI et al., 2009; ZHU et al., 2004). No isolamento de protoplastos de fungos, tais como basidiomicetos, devido à complexa estrutura da parede celular desses fungos, enzimas líticas comerciais usadas individualmente mostram baixa atividade na formação de protoplastos. Preparações enzimáticas contendo quitinases aumentaram significativamente a formação de protoplastos (YANO et al., 2004). Já com relação à utilização dessas enzimas no tratamento de asma, elevados níveis de quitinases foram observados nas células epiteliais e macrófagos de pacientes com asma (ZHU et al., 2004), sugerindo que quitinases podem ser utilizadas para monitorar a eficácia do tratamento inflamatário dessa doença (SHUHUI et al., 2009).

1.2.3 Aplicações biotecnológicas e produção de *N*-acetil-glicosamina

A quitina foi descoberta em 1811, pelo cientista francês Henri Braconnot, mas a falta de conhecimento básico sobre suas propriedades, incluindo a reatividade química, limitou

severamente suas aplicações industriais até o início dos anos 1970 (ROBERTS, 1992). A partir de então, o interesse progressivo na química da quitina resultou no desenvolvimento de muitos estudos que visaram aumentar o conhecimento sobre as estruturas e propriedades deste polímero e seus derivados. Os derivados da quitina como, por exemplo, a *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) possuem características adequadas a sua aplicação em diversas áreas em função de sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, capacidade de adsorção e atividade antitumoral (AAM et al., 2010; CHEN et al., 2010a; JUNG; PARK, 2014.

A GlcNAc é a unidade monomérica da quitina e que também está presente no corpo humano. É um componente do ácido hialurônico, de glicoproteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e outras estruturas do tecido conjuntivo (LEVIN et al., 1961) e, pode ser encontrada até mesmo no leite materno humano (KOBATA; GINSBURG, 1969; MILLER et al., 1994). Estudos têm indicado que GlcNAc é um componente importante da síntese biomacromolecular no corpo humano (HEIM et al., 1989; SHOJI et al., 1999), é atóxico e não altera os níveis glicêmicos no sangue (LEVIN et al., 1961; LIU et al., 2008). Dessa maneira, GlcNAc mostra ser um valioso agente farmacológico com inúmeras aplicações biotecnologicas (CHEN et al., 2010a).

GlcNAc tem mostrado grande potencial para o tratamento de lesões articulares e doenças como a osteoartrite, um tipo de doença que causa a degeneração da cartilagem e dos ossos subjacentes. Preparações contendo GlcNAc foram administradas por administração parenteral, oral, transmucosa e tópica em pacientes com desordens articulares, incluindo osteoartrite, artrite reumatóide, danos na cartilagem, lesões articulares e doença degenerativas articulares. Os resultados desses testes indicaram que GlcNAc aumentou significativamente o reparo de lesões articulares, promovendo a proliferação do tecido cartilaginoso e de condroblastos, células precursoras dos condrócitos (CHRISOPE; ROSE, 1999; MARCUM; SEANOR, 2007; ROVATI et al., 1972; TALENT; GRACY, 1996;; TAMAI et al., 2003; WILKIE, 2005).

A aplicação de GlcNAc para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn também tem recebido muita atenção. Essas doenças podem atacar o revestimento interno do intestino grosso causando inflamação, ulceração e hemorragia (colite ulcerativa) ou causar uma inflamação que atravessa toda a espessura da parede intestinal e que pode ocorrer em qualquer parte do tubo digestivo, desde a boca até o ânus (doença de Crohn). Durante o tratamento dessas doenças, GlcNAc foi capaz de estimular o aumento da produção de glicosaminoglicanos pelos fibroblastos e restaurar a

formação da estrutura protetora do trato gastrointestinal. Além disso, influenciar no aumento da elasticidade do tecido perivascular e aumento do fluxo sanguíneo no arteriocapilar (BURTAN, 1998; BURTAN; FREEMAN, 1993; KARZED; DOMENJOZ, 1971). Em um ensaio clinico piloto, por exemplo, para identificar o efeito terapêutico da GlcNAc no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, crianças com doença sintomática de Crohn mostraram clara melhora após administração oral ou retal de GlcNAc (SALVATORE et al., 2000). Assim, GlcNAc mostra ser um promissor e barato agente para tratamento de doenças inflamatórias intestinais.

Devido às funções versáteis da GlcNAc, considera-se que este composto seja um ingrediente essencial na formulação de cosméticos para o tratamento de rugas e redução da hiperpigmentação da pele. Sayo e colaboradores (2004), por exemplo, avaliaram o efeito de GlcNAc na produção de ácido hialurônico por queratinócitos em humanos. O ácido hialurônico é um importante ingrediente em cosméticos e são importantes para a manutenção da umidade da pele. No entanto, o ácido hialurônico não é eficientemente absorvido através do uso tópico ou oral devido ao seu elevado peso molecular. Nesse estudo, os pesquisadores observaram que GlcNAc aumentou a produção de ácido hialurônico nos queratinócitos e que não mostrou nenhum efeito na produção de ácido hialurônico nos fibroblastos, mas que provoca a proliferação e expressão de colágeno dos fibroblastos (CHEN et al., 2008), o qual é responsável pela resiliência, resistência, elasticidade, suavidade e aparência saudável da pele. Já os efeitos da GlcNAc na redução da hiperpigmentação da pele foram observados por Bissett e colaboradores (2007), mostraram que GlcNAc atua na regulação de vários genes, tais como os genes envolvidos na antioxidação, rotatividade epidérmica e no transporte do melanossoma no citoesqueleto, acreditando assim que a regulação desses genes promovam a redução dos pigmentos na pele.

GlcNAc é também um importante substrato na produção de ácido siálico e, mais recentemente, tem sido descrita como uma potencial via para produção de bioetanol, como alternativa a utilização de glicose como fonte de carbono. Estudos têm mostrado a produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* mutante (ROSEMAN et al., 2010), estirpes do gênero *Mucor* (INOKUMA et al., 2013) e estirpes de *Scheffersomyces stipitis* (INOKUMA et al., 2016).

A produção de GlcNAc tem sido históricamente realizada por métodos baseados na hidrólise química da quitina. Os métodos geralmente aplicados fazem uso de ácidos fortes, tal como HCl (15 a 36%), e temperaturas (40 a 80 °C) cuidadosamente selecionadas, para que os parâmetros utilizados sejam suficientes para hidrolisar a quitina, mas não para causar a

destruição do produto. No entanto, parece haver vários problemas durante o processo produtivo, não somente devido às razões técnicas como o custo elevado e o baixo rendimento (abaixo de 65%), mas também com relação às grandes quantidades de resíduos químicos resultantes da produção (CHEN et al., 2010a).

De acordo com o problemas da produção química de GlcNAc e da busca por alternativas sustentáveis aos processos atuais, iniciou-se um crescente interesse na utilização de quitinases para produção de derivados de quitina. Dentre os organismos produtores de quitinases, bactérias quitinolíticas marinhas apresentam grande potencial para produção dessas enzimas devido ao eficiente papel que desempenham na degradação de quitina nos oceanos. Essas bactérias estão amplamente distribuídas no ambiente marinho e atuam degradando as formas insolúveis de quitina na coluna d'água através da expressão de diferentes quitinases (KIRCHNER, 1995; ZOBELL; RITTENBERG, 1938). O processo de degradação de quitina por essas bactérias é tão eficiente que apesar das toneladas de quitina produzidas anualmente nas formas de carapaças de zooplâncton, caranguejos, camarões, lagostas e outras espécies marinhas (JEUNIAUX; VOSS-FOUCART, 1991; JOHNSTONE, 1908), apenas vestígios desse polissacarídeo são encontrados nos sedimentos oceânicos.

Aeromonas é um gênero representante de bactérias quitinolíticas marinhas e, um dos grupos de bactérias mais eficientes na degradação da quitina. São fenotípicamente diversas (HSU et al., 1981; JANDA, 1985, HÃNNINEN, 1994; WALTMAN et al., 1982) e mostram habilidade para expressar diferentes quitinases. Para a produção de GlcNAc, diferentes quitinases, purificadas ou presentes em extratos brutos de proteínas, podem ser utilizadas. No entanto, para que ocorra a despolimeriação completa da quitina, com formação final de GlcNAc, três quitinases são fundamentais: endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases. Um exemplo da possibilidade de se utilizar quitinases para produção de GlcNAc e da necessidade de quitinases específicas na reação de hidrólise pode ser observado no estudo realizado por Sashiwa e colaboradores (2002). Nesse estudo, os autores descrevem a produção eficaz de GlcNAc a partir de α-quitina utilizando extrato bruto de proteínas produzido por *Aeromonas hydrophila* H2330. O extrato bruto de proteínas continha endo e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) e possibilitou a obtenção de um rendimento de aproximadamente 77% de GlcNAc, com produção insignificante de oligômeros de GlcNAc. Como maiores atividades de exoquitinases foram observadas nesse estudo, os autores sugerem que a ação conjunta de endoquitinases e exoquitinases presentes no extrato bruto de proteínas é essencial para a produção seletiva de GlcNAc e, que maiores níveis de *N*-acetil-glicosaminidases geram maiores quantidades de GlcNAc. Assim, para

obtenção de maiores rendimentos de GlcNAc durante a hidrólise enzimática da quitina, deve-se levar em consideração as concentrações dos diferentes tipos de quitinases presentes nas preparações proteícas.

1.2.4 Taxonomia e caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas*

Por mais que bactérias do gênero *Aeromonas* possam ser encontradas praticamente em todos os ambientes, hoje esse gênero é considerado quase sinônimo de ambientes aquáticos e podem ser isoladas de rios, lagos, oceanos, águas subterrâneas e esgotos (JANDA; ABBOTT, 2010).

O gênero foi criado em 1943 (STANIER, 1943) e compreende bacilos gram-negativos móveis e não móveis capazes de fermentar glicose e outros carboidratos (JANDA; ABBOTT, 2010). Sofreu diversas modificações taxonômicas devido à sua complexidade genética, sendo primeiramente agrupado à família *Pseudomonadaceae* e, posteriormente à família *Vibrionaceae*, até ser agrupado em uma família a parte (COLWELL, MACDONELL; LEY, 1986).

A identificação de *Aeromonas* ao nível de espécie sempre foi uma tarefa desafiadora (JANDA; ABBOTT, 2010), pois apresenta dificuldades que incluem uma taxonomia complicada, grupos de espécies com alta similaridade e ausência de marcadores fenotípicos (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003; JANDA, 1991). Até meados de 1970, *Aeromonas* era dividido basicamente em dois grandes grupos com base em suas características de crescimento e outras características bioquímicas (JANDA; DUFFEY, 1988). O primeiro grupo (mesófilos), descrito como *Aeromonas hydrophila*, era constituído por cepas móveis que cresciam entre 35 e 37 °C e foram associadas a uma variedade de infecções em humanos. O segundo grupo (psicrófilos), descrito como *Aeromonas salmonicida*, era constituído por cepas não móveis com crescimento ótimo entre 22 e 25 °C e associadas com doenças em peixes.

A classificação de *Aeromonas* com base em métodos microbiológicos tradicionais (morfológicos, fisiológicos e bioquímicos) não fornecia uma designação de confiança de seu status taxonômico. Assim, entre 1970 a 1980, iniciou-se um grande esforço de vários grupos de pesquisa para redefinir o grupo dos mesófilos, revelando ao final, a existência de múltiplos grupos de hibridização (HGs) com mais de 70% de homologia dentro de cada uma das

espécies conhecidas (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas caviae*) (JANDA, 1991).

Vários métodos moleculares para distinguir espécies de *Aeromonas* foram aplicados nas últimas décadas, tais como, hibridização DNA-DNA, ribotipagem, RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Lenght Polymorphism*), (RFLP) (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis)* e multiplex PCR. No entanto, a maioria destes métodos são trabalhosos, não são reproduzíveis, e na maioria dos casos não fornecem resultados satisfatórios (JANDA; ABBOTT, 2010).

A caracterização bacteriana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA ainda tem sido muito utilizada. No entanto, o gene 16S rRNA possui uma heterogeneidade intragenômica limitada entre as espécies de *Aeromonas*, sugerindo que identificações baseadas em um único gene podem não ser apropriadas para a caracterização deste gênero (MORANDI et al., 2005). Além disso, analises do gene 16S rRNA de *Aeromonas* revelam a existencia de três complexos que dificultam a distinção de espécies: o Complexo *Aeromonas hydrophila*, que contém as espécies *A. hydrophila*, *A. bestiarum* e *A. salmonicida*, o Complexo *A. caviae*, constituído por *A. caviae*, *A. media* e *A. eucrenophila*, e Complexo *Aeromonas sóbria*, constituído por *A. Veronii* HG8, *A. jandaei*, *A. schubertii* e *A. trota* (ABBOTT; CHEUNG; JANDA, 2003; HORNEMAN, ALI; ABBOTT, 2007, JANDA; ABBOTT, 2010).

Devido às dificuldades de identificação de espécies como as do gênero *Aeromonas*, *Multilocus sequence analysis* (MLSA) de *housekeeping genes* tornou-se uma ferramenta amplamente aplicada na investigação das relações taxonômicas (NASER et al., 2005; THOMPSON et al., 2005; STACKEBRANDT et al., 2002). Essa metodologia pode predizer as relações taxonômicas entre genomas estreitamente relacionados sem a necessidade de comparar os genomas completos (GEVERS et al., 2005). Para poder caracterizar uma estirpe bacteriana por MLSA, o comitê de reavaliação de definição de espécies considera necessário o sequenciamento de no mínimo cinco *housekeeping genes* bem selecionados, universalmente distribuídos, presentes como cópias únicas e localizados em diferentes cromossomos (STACKEBRANDT et al., 2002). Com isso, a principal dificuldade do MLSA está relacionada à dependencia da escolha dos *housekeeping genes* ideais para comparação de espécies diferentes (CHAN et al., 2012). Um exemplo dessa dificuldade pode ser observado no estudo realizado por Lerat et al., (2003). Nesse estudo, durante analises *in silico* de genomas completos realizadas para identificar Gammaproteobacterias, identificou-se um conjunto de 203 potenciais genes que poderiam ser utilizados para inferir a filogenia bacteriana. De acordo com Gevers et al., (2004), 135 destes genes não eram conservados fora

das Gammaproteobactérias, não sendo assim, apropriados para estudos filogenéticos numa escala taxonómica mais ampla.

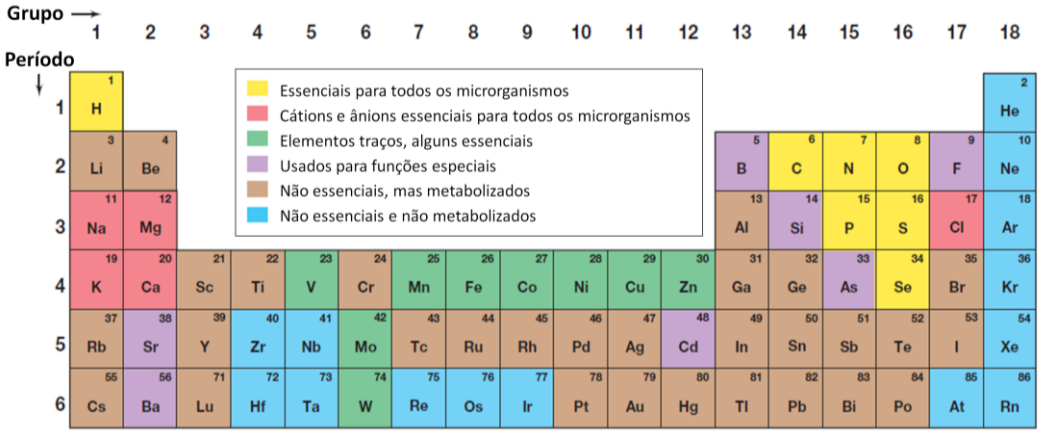
Como pode ser observada, a caracterização de estirpes bacterianas pela metodologia de MLSA é dependente do levantamento prévio de grandes números de sequências gênicas, análises comparativas exaustivas entre diferentes espécies, para posterior aplicação. No entanto, com o avanço das técnicas de sequenciamento, de bioinformática e publicações relacionadas, esse trabalho tem sido minimizado, pois é possível encontrar hoje bancos de dados online contendo um grande numero de sequências que podem ser utilizadas como referências e, que facilitam a escolha dos genes. Além disso, é possível encontrar bancos de dados especialmemte criados para analises de MLSA ou MLST (*Multilocus sequence typing*) de alguns gêneros e espécies específicas, com diferentes *housekeeping genes* estudados e validados. Assim, a aplicação da metodogia de MLSA reprensenta uma ótima ferramenta para caracterização de espécies do gênero *Aeromonas*.

1.2.5 Nutrição, crescimento e produção de quitinases por estirpes do gênero *Aeromonas*

Durante o cultivo de microrganismos em laboratório, é preciso fornecer a eles todos os nutrientes necessários ao crescimento e manutenção celular. Assim, o conhecimento dos princípios da nutrição microbiana é de extrema importância e auxilia na obtenção de bons resultados no cultivo e produção de compostos biológicos.

As necessidades nutricionais variam amplamente entre os microrganismos e nem todos os nutrientes são necessários nas mesmas quantidades. Na Figura 5, é possivel observar os principais elementos requeridos pelos microrganismos e, basicamente, existem duas classes de nutrientes que são indispensáveis às bactérias: os macronutrientes e os micronutrientes. Os macronutrientes (hidrogênio, oxigênio, carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e selênio) são requeridos em maiores quantidades. Enquanto que os micronutrientes (ferro, zinco, manganês, cálcio, potássio, sódio, cobre, cloro, cobalto, molibdênio, magnésio, entre tantos outros) são requeridos em menores quantidades. Além disso, devido à incapacidade de sintetizar alguns compostos, muitos microrganismos podem requerer fatores de crescimento, tais como vitaminas, aminoácidos e outros elementos (MADIGAN et al., 2015).

Figura 5 - Representação das necessidades nutricionais dos microrganimos, de acordo com a tabela periódica de elementos.



FONTE: Adaptada de Madigan et al., (2015).

Os meios de cultivo para produção de compostos biológicos devem conter os nutrientes essenciais em concentrações tais que resultem na atividade máxima do microrganismo. A escolha dos nutrientes adequados à geração do produto de interesse está relacionada à atividade metabólica desenvolvida pelo microrganismo. Nesse ponto, destaca-se a importância das informações obtidas sobre as exigências nutricionais do microrganismo estudado. Com relação ao suprimento de nutrientes, conhecendo-se a composição elementar das células microbianas (Tabela 1), pode-se determinar a sua fórmula mínina e estimar estequiometricamente suas necessidades nutricionais (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008).

Tabela 1- Composição elementar de células microbianas.

Elementos	Bactérias	Leveduras	Bolores
Carbono	46-52	46-52	45-55
Hidrogênio	8-12	8-12	8-12
Oxigênio	18-24	18-24	18-24
Nitrogênio	10-14	5-9	3-7
Magnésio	0,1-0,5	0,1-0,5	0,1-0,3
Fósforo	2-3	0,8-2,5	0,4-4,5
Enxofre	0,1-1,0	0,01-0,25	0,1-0,5
Cálcio	0,01-1,0	0,1-0,3	0,1-1,4
Potássio	1,0-4,5	1-4	0,2,2,5
Ferro	0,02-0,2	0,01-0,5	0,1-0,2
Outros	<0,01	<0,01	<0,01
Compostos			
Proteínas	50-60	35-45	25-40
Carboidratos	6-15	30-45	40-55
Lipídios	5-10	5-10	5-10
Acidos Nucléicos	15-25	5-15	2-10
Cinzas	4-10	4-10	4-10

FONTE: Pereira; Bon; Ferrara, 2008.

Atender as necessidades nutricionais das células ou compor adequadamente um meio de cultivo em laboratório pode ser fácil, empregando-se nutrientes puros e caros. No entanto, para compor um meio de cultivo industrial do bioprocesso, visando à obtenção de bioprodutos, alguns nutrientes deverão ser selecionados de acordo com suas características não só nutricionais, mas também econômicas (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008). A escolha das fontes orgânicas ou inorgânicas de carbono e nitrogênio é muito importante, pois estas podem influenciar significativamente na produtividade do produto de interesse. As fontes de carbono geralmente aplicadas são carboidratos, mas aminoácidos, ácidos graxos, ácidos organicos e compostos aromáticos também podem ser utilizados. Entre as fontes de nitrogênio, o sulfato de amônio é o sal mais utilizado devido ao seu baixo custo, sendo também empregado o nitrato de sódio. Existe também uma grande disponibilidade de fontes orgânicas de nitrogênio de grande aplicação em bioprocessos, tais como extrato de leveduras, *Corn steep licor* e farinha de soja (EUROPEAN COMISSION, 2002).

É evidente que quanto maior o atendimento das necessidades nutricionais, mais apta a célula estará a responder aos estímulos externos. Consequentemente, mais eficiente será a conversão do produto de interesse e maior a produtividade. No entanto, não basta suprirmos apenas as necessidades nutricionais do microrganimo. É necessário também, fornecer todas as condições físicas, tais como temperatura, pH e oxigênio, necessárias para que eles possam atingir a atividade máxima.

Com isso, é possível notar que a otimização da composição de um meio de cultivo, bem como das condições físicas para produção de produtos biológicos, não é uma tarefa fácil, pois envolve a avaliação de um grande número de variáveis e condições que, por sua vez, resultam num grande número de experimentos e demanda de tempo. Para resolver esse problema, procedimentos baseados em metodologias estatísticas, tais como as de superfície de resposta, podem ser utilizadas para otimizar a produção do composto de interesse. Esse tipo de metodologia é muito útil para o desenvolvimento, melhora e otimização de processos e, utiliza um conjunto de técnicas avançadas de planejamento de experimentos que ajudam a entender e otimizar melhor a resposta (BEZERRA et al., 2008; PEREIRA; BON; FERRARA, 2008). Para aplicação dessa metodologia, primeiramente é realizada a escolha dos fatores (ou variáveis independentes) e níveis (valores das variáveis) que afetam os rendimentos e produtividade do determinado produto (variável resposta). Posteriomente efetua-se a combinação dos mesmos de acordo com uma metodologia estatística para criar um planejamento fatorial, o qual permitirá avaliar simultaneamente os efeitos de vários componentes e identificar uma direção promissora para melhorar os parâmetros de interesse

(BOX et al., 1978).

Uma vez que os fundamentos e ferramentas de otimização de cultivo e produção de compostos microbianos são conhecidos, torna-se extremamente importante realizar o levantamento das informações do microrganismo e produto de interesse. No caso de *Aeromonas*, sabe-se que bactérias desse gênero são anaeróbias facultativas que apresentam crescimento ótimo numa ampla faixa de temperatura (22-37 °C), pH (4,5-9,0) e NaCl (0-4%) (HÃNNINEN, 1994; PALUMBO et al., 1985). São bactérias fenotípicamente diversas com capacidade de produzir diferentes enzimas hidrolíticas, tais como quitinases (HSU et al., 1981, WALTMAN et al., 1982, JANDA, 1985, HÃNNINEN, 1994). A biossintese de quitinases por *Aeromonas* (e demais bactérias quitinolícas) é dependente de indutores. A quitina, nos seus diferentes tipos (α, β ou γ) e formas (pó, flocos ou coloidal) e seus produtos de hidrólise (quitooligassacarídeos e *N*-acetil-glicosamina) são os indutores da biossíntese de quitinases. A α-quitina é o tipo mais comum utilizado no cultivo e produção de quitinases por bactérias quitinolíticas e, dentre as formas α-quitina mais utilizadas, a quitina coloidal é aquela considerada como o indutor mais forte da biossíntese de quitinases (ANDRONOPOULOU; VORGIAS, 2004; STOYKOV et al., 2015).

A escolha do tipo de cultivo para produção de quitinases é uma etapa que determina muitas características subsequentes. Quitinases são em grande maioria enzimas extracelulares secretadas em baixas concentrações no meio de cultivo. O cultivo em meios líquidos pode complicar as etapas de purificação, pois é necessário trabalhar com grandes volumes de líquidos para obter altas concentrações de enzimas. No entanto, o cultivo em meio líquido permite um alto controle dos processos e aumento da transferência de massa e oxigênio, facilitando assim, a otimização das condições de produção de quitinases.

Vários tipos de biorreatores têm sido utilizados no cultivo de bactérias quitinolíticas em meio líquido, tais como biorreatores agitados mecanicamente e pneumaticamente (CHEN et al., 2010b; FENICE et al., 1998; GREEN et al., 2005; KAO et al., 2007). No cultivo em biorreatores agitados mecanicamente, além das condições de pH e temperatura, pode-se controlar outras duas variáveis extremamente importantes no processo: a agitação e a aeração. Essas duas variáveis, expressas em função do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La), têm como objetivo central transferir o oxigênio da fase gasosa para o líquido, fazendo com que esse oxigênio dissolvido chegue às células suspensas, penetre nestas células e, finalmente, seja consumido na reação (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008; SCHMIDELL, 2001). Essas variáveis têm mostrado grande influência no aumento dos rendimentos e produtividade de quitinases. No entanto, elevadas velocidades de agitação e taxas de aeração

podem causar danos às células bacterianas e reprimir a biossintese de quitinases (KAO et al., 2007). Assim, a determiminação das condições ótimas de agitação e aeração é importante para o aumento da produtividade de quitinases.

1.2.6 Fatores associados à virulência em *Aeromonas*

O papel de *Aeromonas* como um agente causador de infecções em peixes e humanos tem sido conhecido há décadas (AUSTIN; ADAMS, 1996; VON GRAEVENIT; MENSCH, 1968) e vários estudos buscam estabelecer uma relação inequívoca entre as espécies desse gênero, pois apenas um pequeno subconjunto de cepas contendo genes de virulência parece causar infecção em humanos (JANDA; ABBOTT, 2010). Além disso, apesar do potencial enterotóxico de algumas estirpes, existe ainda um debate sobre sua consideração como um agente etiológico, pois não ocorreram grandes surtos epidêmicos de gastroenterite causados por *Aeromonas* (TOMÁS, 2012). Assim, o esclarecimento das relações entre as espécies desse gênero é de extrema importância para saúde publica e pode auxiliar em pesquisas que tem como objetivo a aplicação de estirpes de *Aeromonas* em processos biotecnológicos.

Estirpes do gênero *Aeromonas* são predominantemente patogênicas de animais poiquilotérmicos, incluindo amfibios, peixes e répteis, podendo promover desde inapetência, melanose, letargia e exoftalmia a uma septicemia com hemorragias nos músculos e órgãos (AUSTIN; ADAMS, 1996). Em peixes, *Aeromonas* têm sido relacionadas a casos de septicemia hemorrágica que frequentemente levam a uma elevada taxa de mortalidade, sendo a principal causa de perdas econômicas na aquicultura. *A. salmonicida*, uma espécie psicrófila, é considerada um importante patógeno entre uma variedade de peixes, provocando furunculose em *Salmonidae* (JANDA, 1991). Espécies mesófilas, tais como *A. hydrophila* e *A. veronii* também podem causar doenças similares em peixes como carpas, tilapia, bagre e salmão (JOSEPH; CARNAHAN, 1994) e, infecções por *A. hydrophila* têm sido relacionadas às principais causas de mortalidade de peixes na última década (TOMÁS, 2012).

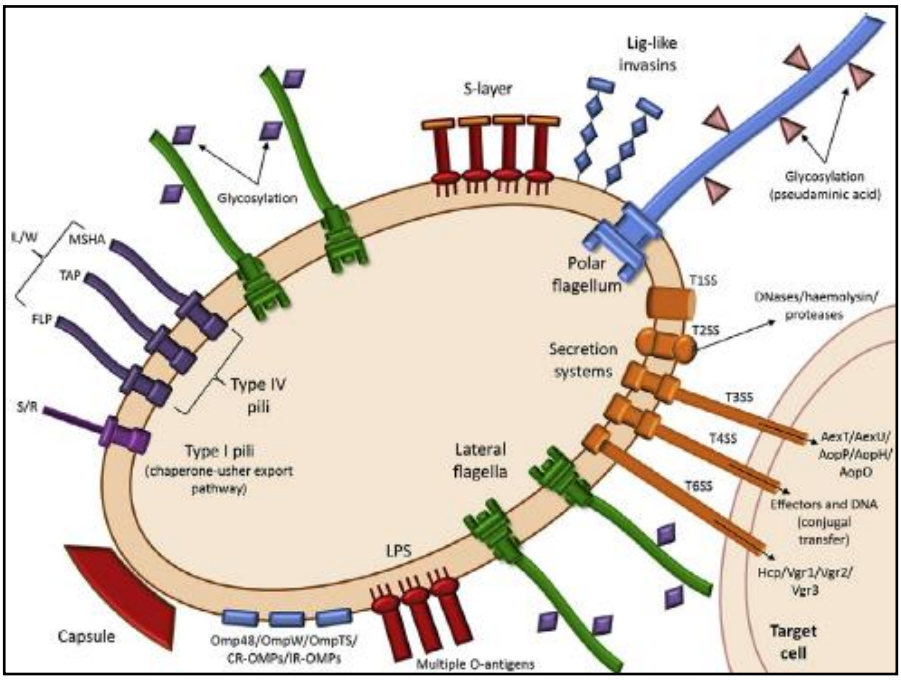
Embora pensava-se que estirpes de *Aeromonas* eram patógenos oportunistas em seres humanos imunocomprometidos, sabe-se hoje que estipes desse gênero podem causar infecções, independentemente das condições do sistema imune do individuo (FIGUERAS, 2005). As infecções por *Aeromonas* podem levar desde uma gastroenterite aguda não complicada a uma septicemia (JANDA; ABBOTT, 1996) e lesões de pele que podem

apresentar necrose de extensão variada, ou até progredir para úlceras que acometem geralmente o tecido muscular (ADAMSKI et al., 2006; MONAGHAN et al., 2008).

As infecções causadas por *Aeromonas* em humanos estão geralmente associadas a meios de veiculação hídrica, tais como a ingestão de águas contaminadas e traumas ocasionados durante atividades recreativas (mergulho, pesca, etc.). Embora casos de contaminação de *Aeromonas* por consumo de peixes e frutos do mar sejam mais frequentes, bactérias desse gênero foram isoladas de diferentes alimentos como, por exemplo, aves, ovos, carnes bovinas e suínas, saladas, sorvetes e leites (ARAÚJO et al., 2002; CARNEIRO; ROSSI JUNIOR, 2006; EVANGELISTA-BARRETO et al., 2006; MARTINS, MARQUEZ; YANO, 2002).

As patogenias causadas por *Aeromonas* envolvem mecanismos complexos e podem conter vários fatores de virulência (Figura 6), tais como polissacarídeos de superfície, sistemas de aquisição de ferro, exotoxinas, enzimas extracelulares, sistemas de secreção, adesinas, flagelos, entre outras toxinas (TOMÁS, 2012).

Figura 6 - Representação gráfica das diferentes estruturas geralmente associadas no processo de patogênese por estirpes de *Aeromonas*.



FONTE: Lowry et al., (2014).

Polissacarídeos de superfície, tais como cápsula e lipopolissacarídeos, são componentes estruturais da membrana externa de bactérias Gram-negativas que conferem

proteção e auxiliam na fixação de superfícies. No entanto, essas estruturas também podem causar efeitos tóxicos ao hospedeiro. A cápsula, por exemplo, é uma estrutura composta por polissacarídeos que usualmente cobrem a membrana externa. É altamente hidratada (aprox. 95% de água) e considerada como um dos principais fatores de virulência em *Aeromonas*, tendo como função proteger a célula contra a fagocitose, favorecer a permanência e interação com outras bactérias e tecidos do hospedeiro e atuar como barreira contra toxinas hidrofóbicas. Os lipopolissacarideos são estruturas que auxiliam na ligação das células às supeficies, tais como os tecidos do hospedeiro. São endotoxinas constituídas por três subunidades ligadas covalentemente a célula (lipídio A, polissacarídeo O e polissacárido interno). A interação da célula bacteriana com a do hospedeiro pode desencadear vários efeitos no organismo, causando febre, diarreia, diminuição do número de linfócitos e plaquetas até uma infecção generalizada (TOMÁS, 2012; MADIGAN et al., 2015).

Sistemas de aquisição de ferro em *Aeromonas* podem estar envolvidos na patogenicidade de uma estirpe. O ferro é um elemento muito importante para o crescimento e metabolismo bacteriano, mas algumas bactérias utilizam esse elemento como ativador de outros fatores de virulência, tais como toxinas, adesinas e invasinas. Dois mecanismos de aquisição de ferro são conhecidos em *Aeromonas*: sidererófilo dependente e independente. Os sideróforos são proteínas com grande afinidade pelo íon ferro e capazes de remover esse elemento de glicoproteínas, hemoglobinas, transferrinas, lactoferrinas ou ferritinas (TOMÁS, 2012).

Aeromonas tem sido descrito como um gênero de bactérias contendo estirpes capazes de produzir uma variedade de exotoxinas. Dentre as exotoxinas produzidas por *Aeromonas*, as enterotoxinas citotóxica e citotônica são consideradas como os dois principais tipos envolvidos na patogenicidade (ABBOTT et al., 2010).

A enterotoxina citotóxica (*act*), também conhecida como enterotoxina citolítica, é uma toxina que provoca a degeneração das criptas e vilosidades do intestino delgado e apresenta atividade hemolítica, citotóxica e enterotóxica. É um dos fatores de virulência mais potentes de *Aeromonas*, é letal para camundongos quando injetada via intravenosa e, estirpes com capacidade de expressá-las são geralmente isoladas de pacientes com diarreia (CHOPRA; HOUSTON, 1999; FERGUSON et al., 1997; GALINDO et al., 2006; SHA et al., 2005). É denominada beta-hemolisina e/ou aerolisina por alguns autores (CHOPRA; HOUSTON 1999; CHOPRA et al., 2000) causando considerável confusão na literatura e, embora o gene *act* apresente similaridade (79-93%) com dois genes de aerolisina (CHOPRA; HOUSTON, 1999), existem diferenças significativas entre seus produtos, como na composição de

aminoácidos, diferenças funcionais e em relação à neutralização por anticorpos e incapacidade de Act em ligar-se ao receptor da aerolisina (FERGUSON et al., 1997).

Com relação às enterotoxinas citotônicas, estas não provocam a degeneração das criptas e vilosidades do intestino e, possuem mecanismos de ação similares àqueles da toxina colérica, uma vez que aumentam os níveis de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e prostaglandinas nas células do epitélio intestinal. Espécies de *Aeromonas* produzem enterotoxinas citotônicas com diferentes pesos moleculares e reações variáveis a antitoxina colérica. Estas enterotoxinas são divididas em dois grupos: a enterotoxina citotônica termolábil (*alt*) e enterotoxina citotônica termoestável (*ast*). A enterotoxina citotônica termolábil (*alt*) causa secreção de fluidos no intestino, não reage com a antitoxina da cólera e é inativada pela exposição a 56 °C por 20 minutos. Já enterotoxina citotônica termoestável (*ast*), causa acúmulo de fluidos no intestino, reage com a antitoxina da cólera e é inativada pela exposição 100 °C por 30 minutos (CHAKRABORTY et al., 1984; POTOMSKI et al., 1987).

Adicionalmente, estirpes de *Aeromonas* podem produzir pelo menos duas classes de hemolosinas: α-hemolisinas e β-hemolisinas. A α-hemolisina é produzida durante a fase estacionária do crescimento bacteriano, causando um efeito citotóxico reversível e provocando a lise incompleta dos eritrócitos. Já a β-hemolisina, é produzida na fase do crescimento bacteriano, causando a lise completa e consequentemente a destruição completa dos eritrócitos (KIROV et al., 1993; THELESTAM; LJUNGH, 1981).

Nas infecções por *Aeromonas*, sistemas de secreção são fundamentais para a virulência, sendo responsáveis pela translocação de moléculas para o meio extracelular e/ou interior de células-alvo. Diferentes sistemas de secreção (TSS), tais como tipo I, II, III, IV e VI podem ser encontrados em estirpes de *Aeromonas*, cada um com suas funções específicas (TOMÁS, 2012). Sistemas de secreção de tipo I (T1SS) podem ser encontrados num grande número de bactérias Gram-negativas e, estão relacionados ao transporte de substratos, enzimas digestivas, tais como proteases e lipases, bem como adesinas e toxinas RTX (*repeat-in-toxins*). T2SS são responsáveis pela secreção de vários fatores de virulência, tais como aerolisinas, proteases, hemolisinas e DNases. T4SS são responsáveis pelo processo de conjugação de DNA bacteriano, podem secretar uma variedade de substratos e/ou exercer papel essencial na virulência em várias espécies de bactéria. Já os T3SS e T6SS têm sido frequentemente envolvidos na patogenicidade de estirpes de *Aeromonas*, atuando na secreção de fatores de virulência no meio externo ou diretamente no citoplasma de células eucarióticas (GREEN: MECSAS, 2016).

Varios outros fatores de virulência, tais como enzimas extracelulares (ex. proteases, lípases, enolases), adesinas (fimbrias e pili) e flagelos (polares e laterais) podem estar presentes em *Aeromonas*. Além disso, profagos e outras toxinas, tais como RTX (*Repeats-in-toxin*) e Zot (*Zonula occludens toxin*), pouco verificadas na caracterização de estirpes de *Aeromonas*, podem contribuir para patogenicidade. Por essa razão, a caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas*, bem como a identificação de fatores associados a virulência é de extrema importância para a saúde publica e estudos que visam à utilização dessas bactérias em aplicações biotecnológicas.

CAPÍTULO 2 - SELEÇÃO DE UMA ESTIRPE DO GÊNERO *Aeromonas* PARA ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE QUITINASES E *N*-ACETIL-GLICOSAMINA

2.1 INTRODUÇÃO

Quitinases são enzimas que catalisam a hidrólise de quitina, um biopolímero de relevante interesse científico e comercial, encontrado na natureza como principal constituinte do exoesqueleto dos artrópodes e paredes celulares de fungos e algas (GOODAY, 1990). Essas enzimas podem ser encontradas numa ampla variedade de organismos (KEYHANI; ROSEMAN, 1999; SUGINTA et al., 2009) e possuem uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, tais como a preparação de derivados de quitina (CHEN et al., 2010a; RATHORE; GUPTA, 2015; STOYKOV et al., 2015).

O interesse na produção de *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc), derivado da quitina, tem crecido nos últimos anos, especialmente para aplicação nas áreas de medicina e farmácia. Este derivado é um valioso agente farmacológico para o tratamento de osteoartrite e doenças inflamatórias intestinais, incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn (CHEN et al., 2010a). Tem sido tradicionalmente produzido por processos que envolvem a hidrólise ácida da quitina, no entanto, os processos geralmente aplicados são prejudiciais ao ambiente, apresentam baixos rendimentos (abaixo de 65%) e custos elevados (SHASHIWA et al., 2001; CHEN et al., 2010a). Dessa maneira, a produção enzimática de GlcNAc representa uma alternativa sustentável aos processos atuais (JUNG e PARK, 2014).

A produção de GlcNAc utilizando quitinases microbianas tem atraído uma crescente atenção devido à busca por alternativas sustentáveis aos processos químicos atuais (LIU et al., 2013; JUNG e PARK, 2014). Para produção enzimática de GlcNAc, são necessários coquetéis de proteínas contendo quantidades adequadas de endo e exoquitinases e, entre os microrganismos, bactérias quitinolíticas derivadas do ambiente marinho apresentam grande potencial para a produção desses coquetéis, uma vez que essas desempenham um papel de extrema importância na degradação da quitina nos oceanos (ZOBELL e RITTENBERG, 1938).

Aeromonas é um gênero representante de bactérias quitinolíticas marinhas e, um dos grupos de bactérias mais eficientes na degradação da quitina. São fenotípicamente diversas (HSU et al., 1981, WALTMAN et al., 1982, JANDA, 1985, HÃNNINEN, 1994) e mostram habilidade para expressar diferentes quitinases ao longo do cultivo em laboratório (CARDOZO, 2012). No entanto, membros desse gênero são conhecidos por causar infecções

em invertebrados e vertebrados, como rãs, aves e animais domésticos (GOSLING, 1996; GRAY, 1984). Além disso, embora pensava-se que *Aeromonas* spp. eram patógenos oportunistas em seres humanos imunocomprometidos, sabe-se hoje que estipes desse gênero podem causar infecções, independentemente das condições do sistema imune (FIGUERAS, 2005). Assim, a caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas*, bem como a identificação de fatores associados a virulência é de extrema importância para a saúde publica e estudos que visam à utilização dessas bactérias em aplicações biotecnológicas. Além disso, como essas bactérias possuem a capacidade de expressar diferentes quitinases, torna-se necessário avaliar a composição de coquetéis de proteínas contendo quitinases para produção de GlcNAc.

Dessa maneira, essa etapa do estudo teve como objetivo selecionar uma estirpe do gênero *Aeromonas* para estudos de produção de quitinases e GlcNAc. Para isso, dez estirpes do gênero *Aeromonas* foram caracterizadas por *Multilocus Sequence Analysis* e quanto à presença de fatores associados à virulência. A quantidade apropriada de endoquitinases e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) em coquetéis de proteínas, para produção de GlcNAc, foi determinada e, os coquetéis das dez estirpes de *Aeromonas* foram avaliados quanto à capacidade de converter α-quitina coloidal em GlcNAc. Adicionalmente, a estirpe selecionada teve seu genoma sequenciado.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Selecionar uma estirpe do gênero *Aeromonas* para estudos de produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina.

2.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar dez estirpes do gênero *Aeromonas* por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA);
- Verificar a presença de fatores associados à virulência em dez estirpes do gênero *Aeromonas*;
- Determinar o tempo necessário para cultivo de dez estirpes do gênero *Aeromonas* para obtenção de coquetéis de proteínas, contendo quitinases, com capacidade de conversão de α-quitina coloidal em *N*-acetil-glicosamina;
- Selecionar uma estirpe do gênero *Aeromonas* capaz de produzir um coquetel de proteínas, contendo quitinases, com maior capacidade de conversão de α-quitina coloidal em *N*-acetil-glicosamina;
- Sequenciar o genoma da estirpe selecionada do gênero *Aeromonas* para a identificação de genes que codificam fatores associados à virulência e enzimas quitinolíticas;

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Dez isolados (CH125, CH129, CH147, CH149, CH150, CH151, CH286, CHZ52, CHZ113 and CHZ306) caracterizados como *Aeromonas* sp. pelo sequenciamento do gene 16S rRNA foram avaliados neste estudo. Os mesmos foram isolados de amostras de água do mar e plâncton da região costeira do estado de São Paulo, selecionados por serem aqueles que apresentaram maior atividade quitinolítica (SOUZA, 2009) e material de estudo de uma Dissertação de Mestrado (CARDOZO, 2012).

A relação dos isolados, de acordo com a origem, os parâmetros físico-quimicos das amostras durante as coletas e, a atividade quitinolítica em placas de Agar com quitina coloidal pode ser observada na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Relação de estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho, de acordo com a origem, parâmetros físico-quimicos das amostras durante as coletas e, atividade quitinolítica em placas de Agar com α-quitina coloidal.

Isolado	Origem	Parametros Físico-Químicos da Amostra				Halo de Hidrólise de Quitina (mm)
		Tempetarura (°C)	pH	Condutividade (ms)	Salinidade (%)	
CH125	Santos	25	8,0	43	2,8	5,1
CH129	Santos	25	8,0	43	2,8	4,8
CH147	Santos	24	7,5	42	2,7	3,5
CH149	Santos	24	7,5	42	2,7	3,4
CH150	Santos	24	7,5	42	2,7	3,2
CH151	Santos	24	7,5	42	2,7	3,8
CH286	Santos	24	7,0	37	2,3	4,9
CHZ113	São Sebastião	23	7,0	48	3,1	3,1
CHZ306	Santos	24	7,5	34	2,1	6,3
CHZ52	Santos	23	8,0	49	3,1	6,2

FONTE: Cardozo, 2017.

2.3.1 Reisolamento dos isolados

Os isolados foram semeados em placas de Petri contendo Agar mineral com quitina coloidal preparado com a seguinte composição por litro: $(NH4)_2SO_4$, 1,0 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4, 0,2 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4, 1,6 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 $g.L^{-1}$; NaCl, 0,1 $g.L^{-1}$; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$; $CaCl_2.2H_2O$, 0,02 $g.L^{-1}$; Ágar, 15,0 $g.L^{-1}$; quitina coloidal, 10,0 $g.L^{-1}$, pH 7,0. As placas foram incubadas a 28 °C durante 96 horas para verificar a pureza e viabilidade dos isolados.

A quitina coloidal foi preparada de acordo com o método descrito por Souza et al. (2009). Cinco gramas de α-quitina extraída a partir da carapaça de carangueijos (C7170 - Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) foram adicionadas em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 60 mL de ácido clorídrico fumegante 37% (100307 - Merck Millipore, Hayward, CA, EUA) e mantido sob agitação (170 rpm) durante 1 h à temperatura ambiente. A mistura foi adicionada em frasco Schott de 500 mL contendo 200 mL de etanol absoluto a 50% (107017 - Merck Millipore) e agitada vigorosamente para formar o colóide. A quitina coloidal foi transferida para um funil de vidro contendo papel de filtro de 80 g (50 cm x 50 cm) e lavada com 5 L de água Milli-Q estéril para atingir o pH próximo a 7,0. A quitina coloidal retida no papel de filtro foi removida e armazenada na ausência da luz a 4 °C.

2.3.2 Caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas* por *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA).

Multilocus Sequence Analysis (MLSA) foi utilizado para caracterização molecular de *Aeromonas* sp., utilizando seis *housekeeping genes* (*gltA, groL, gyrB, metG, ppsA* e *recA*).

Os isolados foram primeiramente semeados em placas de Petri contendo Agar mineral com quitina coloidal, como descrito no **item 2.3.1**. Cinco colônias bacterianas foram crescidas *overnight* em tubos de 15 mL contendo 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) a 28 °C e separadas por centrifugação a 3.000 *g* por 5 minutos. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o Kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas em um volume final de 50 µL utilizando os seguintes reagentes: solução tampão a 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), $MgCl_2$ a 50 mM (Invitrogen), solução mix de dNTPs a 2,5 mM (Invitrogen), iniciadores a 0,3 µM (Invitrogen) **(Tabela 3)**, 1 U da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen) e DNA a 50 ng/µL.

Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf, Nova York, NY, Estados Unidos) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, e uma extensão final a 72 °C por 3 minutos. As temperaturas de anelamento empregadas nas amplificações dos diferentes genes podem ser observadas na **Tabela 3**.

Os fragmentos amplificados de DNA foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

Os produtos das reações de PCR foram purificados utilizando o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante e submetidos ao sequenciamento utilizando os iniciadores "Reverse" descritos na **Tabela 3**. O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador *ABI 3730 DNA Analyser* (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), de acordo com o protocolo utilizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

As sequências nucleotídicas dos seis *housekeeping genes* foram analisadas, editadas, concatenadas e comparadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.9.0 com as sequências de 18 espécies caracterizadas de *Aeromonas*, disponibilizadas no *Aeromonas MLST Databases*. As árvores filogenéticas com as sequências de cada *housekeeping gene* e concatenadas foram construídas com auxílio do programa *MEGA* 7.0, utilizando o método estatístico de *Neighbour-joining* e o modelo de *Jukes-Cantor*. O método de *bootstrap* com 1000 repetições foi utilizado como teste de filogenia.

Aeromonas hydrophila 93C, cedida pelo grupo de pesquisa do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná foi incluída como controle positivo em todos os ensaios.

2.3.3 Verificação de fatores associados à virulência em estirpes do gênero *Aeromonas*

2.3.3.1 Verificação de genes associados à virulência

A presença de nove potenciais genes (*alt, act, ast, ahh1, aer, aerA, hlyA, ascV* e *ascFG*) associados à virulência em estirpes do gênero *Aeromonas* foi avaliada por PCR, utilizando o DNA genômico obtido como descrito no item 2.3.2.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL utilizando os seguintes reagentes: solução tampão a 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), $MgCl_2$ a 50 mM (Invitrogen), solução mix de dNTPs a 2,5 mM (Invitrogen), iniciadores a 0,3 µM (Invitrogen) (Tabela 3), 1 U da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen) e DNA a 50 ng/µL.

Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador *Mastercycler ep Gradient S* (Eppendorf, Nova York, NY, Estados Unidos) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, e uma extensão final a 72 °C por 3 minutos. As temperaturas de anelamento empregadas nas amplificações dos diferentes genes podem ser observadas na Tabela 3.

Os fragmentos amplificados de DNA foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 μg/mL) e fotografados no sistema de fotodocumentação *Gel Doc XR* (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

Aeromonas hydrophila 93C, cedida pelo grupo de pesquisa do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná foi incluída como controle positivo nos ensaios de PCR.

2.3.3.2 Verificação de atividade hemolítica

Para verificação da atividade hemolítica de *Aeromonas* sp., os isolados foram primeiramente semeados em placas de Petri contendo Agar mineral com quitina coloidal, como descrito no item 2.3.1. Cinco colônias foram semeadas em tubos de 15 mL contendo 3 mL de caldo LB e cultivadas *overnight* a 28 °C. Cinco microlitros de cada cultura foram inoculados em placas de Agar Triptona de Soja (TSA) contendo 5 % de sangue de carneiro desfibrinado. Os ensaios foram realizados a 37 °C e incubados por 48 horas.

Aeromonas hydrophila 93C, cedida pelo grupo de pesquisa do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná foi incluída como controle positivo nos atividade hemolítica.

Tabela 3 - Iniciadores, tamanho dos amplicons e temperaturas de anelamento utilizadas para amplificação dos housekeeping genes e genes de virulência em estirpes do gênero Aeromonas isoladas do ambiente marinho.

Primer	Sequencia (5'–3')	Produto Gênico	Amplicon (pb)	Temp. de Anelamento (°C)	Referências
gltA_F gltA_R	TTCCGTCTGCTCTCCAAGAT TTCATGATGATGCCGGAGTA	Citrato sintase I	626	58	Martino et al., 2011
groL_F groL_R	CAAGGAAGTTGCTTCCAAGG CATCGATGATGGTGGTGTTC	Chaperonina GroEL	782	56	Martino et al., 2011
gyrB_F gyrB_R	GGGGTCTACTGCTTCACCAA CTTGTCCGGGTTGTACTCGT	DNA girase, subunidade β	699	59	Martino et al., 2011
metG_F metG_R	TGGCAACTGATCCTCGTACA TCTTGTTGGCCATCTCTTCC	Metionil-tRNA sintetase	657	57	Martino et al., 2011
ppsA_F ppsA_R	AGTCCAACGAGTACGCCAAC TCGGCCAGATAGAGCCAGGT	Fosfoenolpiruvato sintetase	619	60	Martino et al., 2011
recA_F recA_R	AGAACAAACAGAAGGCACTGG AACTTGAGCGCGTTACCAC	Recombinase A	700	57	Martino et al., 2011
alt_F alt_R	AAAGCGTCTGACAGCGAAGT AGCGCATAGGCGTTCTCYT	Enterotoxina Citotônica Termolábil	320	61	Aguilera-Arreola et al., 2005
act_ F act_ R	AGAAGGTGACCACCAAGAACA AACTGACATCGGCCTTGAACTC	Enterotoxina Citotóxica	232	56	Kingombe et al., 1999
ast_F ast_R	TCTCCATGCTTCCCTTCCACT GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG	Enterotoxina Citotóxica temoestável	331	56	Sen e Rodgers, 2004
ahh1_F ahh1_R	GCCGAGCGCCCAGAAGGTGAGTT GAGCGGCTGGATGCGGTTGT	Hemolisina Extracelular	130	60	Wang et al., 2003
aer_F aer_R	CCGGAAGATGAACCAGAATAAGAG CTTGTCGCCACATACCTCCTGGCCC	Enterotoxina Citolítica	451	57	Chopra et al., 1993; Granum et al., 1998
aerA_F aerA_R	GCCTGAGCGAGAAGGT CAGTCCCACCCACTTC	Aerolisina	418	53,5	Heuzenroeder et al., 1999
hlyA_F hlyA_R	GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG GGCGGCGCCGGACGAGACGGG	β-hemolisina	595	57	Heuzenroeder et al., 1999
ascV_F ascV_R	CTCGAACTGGAAGAGCAGAATG GAACATCTGGCTCTCCTTCTCGATG	Sistema de secreção Tipo III	577	55	Yamamoto et al., 2000
ascFG_F ascFG_R	ATGAGGTCATCTGCTCGCGC GGAGCACAACCATGGCTGAT	Sistema de secreção Tipo III	620	55	Chacon et al., 2004

FONTE: Cardozo, 2017.

2.3.4 Determinação do tempo de cultivo para obtenção de coquetéis de proteínas, contendo quitinases, por estirpes do gênero *Aeromonas*

Aeromonas sp. CH125, CH129 e CHZ306 foram utilizadas para determinar o tempo necessário de cultivo das estirpes para obtenção dos coquetéis de proteínas (contendo quitinases) com capacidade de produzir GlcNAc. Coquetéis de proteínas obtidos nas etapas iniciais (24 h) e finais (96 h) do cultivo dessas estirpes foram utilizados para avaliação.

As atividades de endoquitinases e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) e teor de proteínas totais dos coquetéis foram determinadas e utilizadas para comparação.

2.3.4.1 Preparação do inóculo

Os isolados foram semeados em placas de Petri contendo Agar mineral com quitina coloidal, como descrito no item 2.3.1. Cinco colônias bacterianas foram inoculadas em tubos de 50 mL contendo 20 mL de caldo mineral com 1% de quitina coloidal e incubados a 28 °C por 96 horas sob agitação constante a 180 rpm. Dois mL da suspensão bacteriana foram inoculados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de caldo mineral com 2% de quitina coloidal, pH 7,0 e incubados à 28 °C sob agitação constante a 180 rpm durante 96 horas.

2.3.4.2 Recuperação de proteínas do sobrenadante

Após 24 e 96 horas de cultivo (Item 2.3.4.1), as culturas de *Aeromonas* sp. CH125, CH129 e CHZ306 foram centrifugadas a 3.000 *g* por 5 minutos a 4 °C para separação das células. O sobrenadante foi precipitado com 80% de sulfato de amônio em agitação por 30 minutos a 4 °C e centrifugado a 10.000 *g* por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi eluído em 02 mL de solução tampão de KH_2PO_4 50 mM (pH 5,0) e dialisado *overnight* com membrana de celulose regenerada de 10 kDa MWCO (Spectrum, Rancho Rodriguez, CA, Estados Unidos) em solução tampão de KH_2PO_4 50 mM (pH 5,0). Posteriormente, a solução tampão foi trocada três vezes a cada duas horas para remoção completa dos sais.

Os coquetéis de proteínas foram armazenados em freezer a -20 °C e utilizados nos experimentos.

2.3.4.3 Quantificação de quitinases e proteínas totais

As atividades de endoquitinases e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) foram determinadas utilizando o Kit *Chitinase Assay* (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. Os substratos *p*-nitrofenol-triacetilquitotriose [pNP-$(GlcNAc)_3$], *p*-nitrofenol-diacetilquitobiose [pNP-$(GlcNAc)_2$] e *p*-nitrofenol-*N*-acetil-glicosamina (pNP-(GlcNAc) (Sigma-Aldrich) foram utilizados como substratos para

quitinases. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de *p*-nitrofenol do substrato apropriado por minuto.

O teor de proteínas totais foi quantificado utilizando o kit *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad). A curva padrão foi obtida com albumina sérica bovina (Bio-Rad).

2.3.4.4 Reação de hidrólise enzimática de α-quitina e quantificação de N-acetil-glicosamina

As reações de hidrólise enzimática de α-quitina foram realizadas em um volume final de 1 mL, contendo 2% de α-quitina coloidal (m/v) em solução tampão de KH_2PO_4 50 mM (pH 5,0) e coquetel de proteínas. Os coquetéis obtidos nas etapas iniciais de cultivo (24 h) foram adicionados na proporção 1:10 e, foram constituídos de aprox. 155 $U.L^{-1}$ de endoquitinases, 145 $U.L^{-1}$ de quitobiosidases e 65 $U.L^{-1}$ de *N*-acetil-glicosaminidases. Coquetéis de proteínas obtidos nas etapas finais de cultivo (96 h) foram constituídos de aprox. 90 $U.L^{-1}$ de endoquitinases, 65 $U.L^{-1}$ de quitobiosidases e 140 $U.L^{-1}$ de *N*-acetil-glicosaminidases.

As reações foram realizadas em triplicata e incubadas em termomixer a 37 °C com agitação constante a 1.000 rpm por 12 h. Após esse período, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos para desnaturação das enzimas e, transferidas para vials com capacidade de 2,0 mL (Allcrom, São Paulo, SP, Brasil) através de unidades filtrantes de 13 mm de diâmetro. As unidades filtrantes foram constituídas de membranas de Nylon com poro de 0,22 µM (Allcrom).

A quantificação de GlcNAc das amostras foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o sistema de HPLC Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com espectrofotômetro UV Ultimate 3000 Diode Array Detector (Dionex) a 190 nm. A coluna utilizada foi a Aminex HPX-87H de 300 x 7,8 mm (Bio-Rad), a fase móvel constituída de H_2SO_4 5 mM com fluxo de 0,8 mL/min e o volume de injeção de amostra foi de 10 µL. Soluções padrões de GlcNAc (Sigma-Aldrich) foram utilizadas para identificação do tempo de retenção e construção das curvas padrões.

2.3.5 Seleção de uma estirpe do gênero *Aeromonas* para estudos de produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina

Após definição do tempo necessário para obtenção dos coquetéis de proteínas contendo quitinases, as estirpes do gênero *Aeromonas* foram cultivadas em caldo mineral com quitina coloidal, como descrito no item 2.3.1 por 96 horas e, os sobrenadantes foram utilizados para recuperação das proteínas (item 2.3.4.2). As atividades de endo e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) e teor de proteínas totais foram determinados (item 2.3.4.3**)** e, os coquetéis foram utilizados para os experimentos de hidrólise enzimática de α-quitina.

As reações de hidrólise enzimática de α-quitina foram realizadas em um volume final de 1 mL, contendo 2% de α-quitina coloidal (m/v) em solução tampão de KH_2PO_4 50 mM (pH 5,0) e coquetel de proteínas. Os coquetéis foram adicionados na proporção de 1:10 e foram constituídos de aprox. 90 $U.L^{-1}$ de endoquitinases, 65 $U.L^{-1}$ de quitobiosidases e 140 $U.L^{-1}$ de *N*-acetil-glicosaminidases.

As reações de hidrólise foram realizadas em triplicata como descrito no item 2.3.4.4 e, avaliadas nos tempos 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h. A quantificação de GlcNAc das amostras foi realizada como descrito no item 2.3.4.4.

A massa seca da α-quitina coloidal foi verificada e utilizada para os cálculos de conversão de quitina em GlcNAc, de acordo com Nguyen-Thi e Doucet (2016). Os cálculos consideraram que 1 mg de quitina é capaz de produzir um rendimento teórico máximo de 1,08 mg de GlcNAc (Equação 1).

$$\text{Rendimento de GlcNAc (\%)} = \frac{\text{GlcNAc liberada (mg) x 100}}{\text{Conc. inicial de α-quitina (mg) x 1.08}} \quad (1)$$

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância de um fator (ANOVA) seguida pelo Pós-Teste de Tukey para determinar as diferenças significativas entre os rendimentos e produtividades. Diferenças significativas foram definidas como $p < 0{,}05$.

2.3.6 Sequenciamento do genoma da estirpe selecionada para produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina

O genoma da estirpe selecionada para os estudos de produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina foi sequenciado para a identificação dos genes que codificam fatores associados à virulência e enzimas quitinolíticas.

A estirpe selecionada foi semeada em placas de Petri contendo Agar mineral com quitina coloidal para verificar sua pureza e viabilidade, como descrito no item 2.3.1. Cinco colônias bacterianas foram crescidas *overnight* em tubos de 50 mL, contendo 20 mL de caldo Luria Bertani (LB) a 28 °C e, separadas por centrifugação a 3.000 *g* por 5 minutos. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o Kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico foi quantificado usando o Qubit fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e enviado para sequenciamento no Centro de Instrumentação em Genômica Funcional Aplicado a Agropecuária e Agroenergia da Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz" (ESALQ-USP).

Para o sequenciamento, bibliotecas paired-end and mate-pair foram preparadas utilizando os kits *Nextera XT DNA library preparation* (Illumina, San Diego, CA, USA) e *Nextera mate-pair library preparation* (Illumina), respectivamente, e sequenciados com a plataforma MiSeq (Illumina), usando o kit *600-cycle MiSeq reagent version 3* (Illumina), segundo as instruções do fabricante.

O processamento e analise dos dados do sequenciamento foram realizados em parceria com os Drs. Genivaldo Gueiros e Rob Edwards do Rob Edwards' bioinformatics lab da San Diego State University, California.

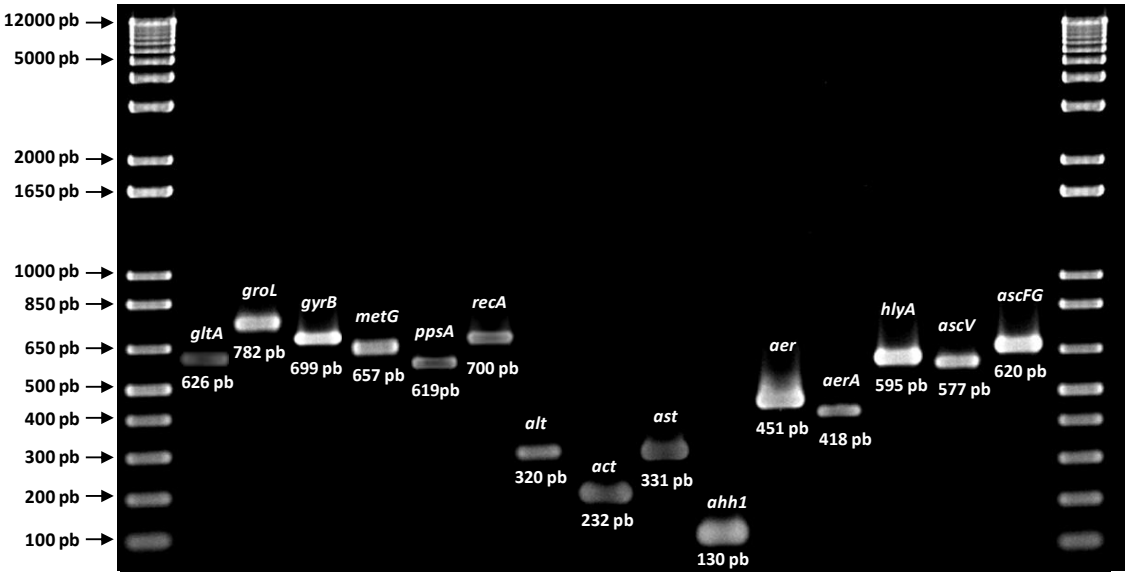
A montagem do genoma (*De novo genome assembly*) foi realizada usando o pipeline A5-MiSeq version 20150522 (COIL; JOSPIN; DARLIN, 2015) e, os contigs foram anotados no RAST (*Rapid Annotations using Subsystems Technology*) (AZIZ et al., 2008; OVERBEEK et al., 2014) e PGAP (*NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*) (TATUSOVA et al., 2013). A presença de genes de profagos no genoma da estirpe selecionada foi verificada utilizando o banco de dados PhAnToMe (*Phage Annotation Tools and Methods*) (http://www.phantome.org/). Adicionalmente, os genomas de 28 espécies do gênero *Aeromonas* também foram anotados no RAST e utilizados para uma analise comparativa de fatores associados à virulência em *Aeromonas*.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas* por *Multilocus Sequence Analysis* e verificação de fatores associados à virulência

Todas as reações de PCR realizadas para caracterização de *Aeromonas* sp. por MLSA e verificação de genes associados à virulência foram padronizadas, obtendo resultados satisfatórios na amplificação dos genes estudados (Figura 7).

Figura 7 - Produtos das reações de PCR obtidos pela amplificação dos housekeeping genes e genes de virulência em *Aeromonas Hydrophila* 93C, utilizada como controle nos estudos.



FONTE: Cardozo, 2017.

As sequências obtidas pelo sequenciamento dos seis *housekeeping* genes (*gltA, groL, gyrB, metG, ppsA* e *recA*) foram comparadas com as sequências de 18 espécies caracterizadas do gênero *Aeromonas*, disponibilizadas no *Aeromonas MLST Databases*. As sequências variaram entre 372 e 486 pb e foram utilizadas para construção de árvores filogenéticas baseadas em cada gene e concatenadas.

De acordo com a matriz de similaridade, observou-se que todos os isolados estão mais relacionados com a espécie *Aeromonas caviae*. Os valores de similaridade das estirpes com *A. caviae* CET5241 foram maiores que 97,6% (*gltA*), 98,7% (*groeL*), 97,7% (*gyrB*), 97,7% (*metG*), 97,6% (*ppsA*), 97,9% (*recA*) e 97,9% (concatenados). Os valores de substituição

intraespécies (diferentes estirpes da mesma espécie) e interespécies (estirpes pertencentes a espécies diferentes) foram menores que 2,4% e maiores que 3,1%, respectivamente (Tabela 4).

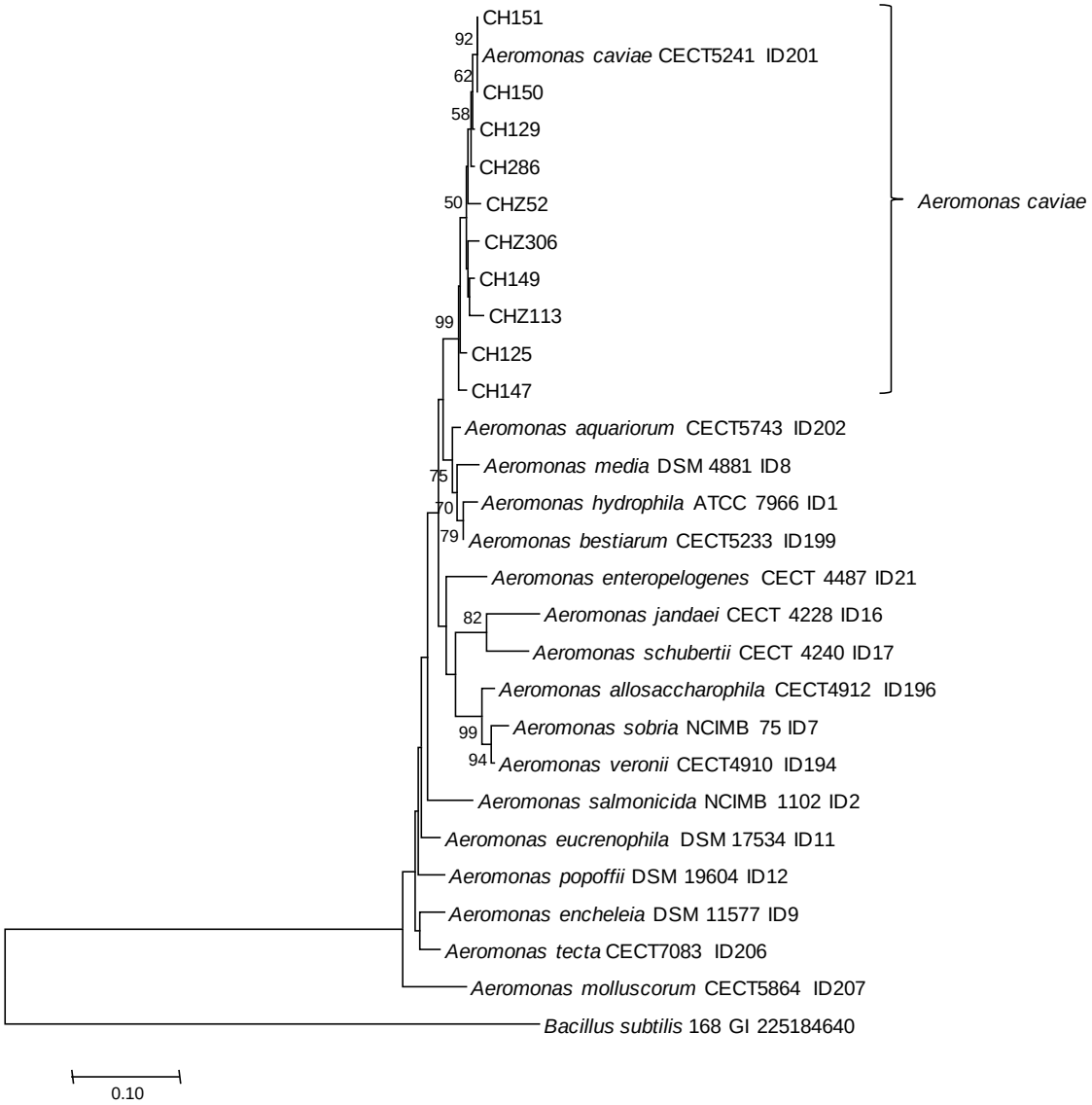
As árvores filogenéticas construídas com base nas sequências de cada *housekeeping gene* e concatenadas podem ser observadas nas Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

Tabela 4 - Similaridade nucleotídica das sequências dos genes *gltA*, *groL*, *gyrB*, *metG*, *ppsA* e *recA* de dez estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho

Gene	Fragmento (pb)	N° de estirpes	G+C (%)	Similaridade com *A. caviae* (%)	Taxa de Substituição Intraespécies (%)	Taxa de Substituição Interespécies (%)
gltA	456	10	61	>97,6	<2,4	>3,3
groEL	399	10	61	>98,7	<2,3	>3,2
gyrB	372	10	63	>97,7	<2,3	>3,1
metG	410	10	59	>97,7	<2,3	>3,3
ppsA	477	10	64	>97,6	<2,4	>3,4
recA	486	10	59	>97,9	<2,1	>3,3
Concatenados	2600	10	61	>97,9	<2,1	>3,3

FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 8 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *gltA* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho.

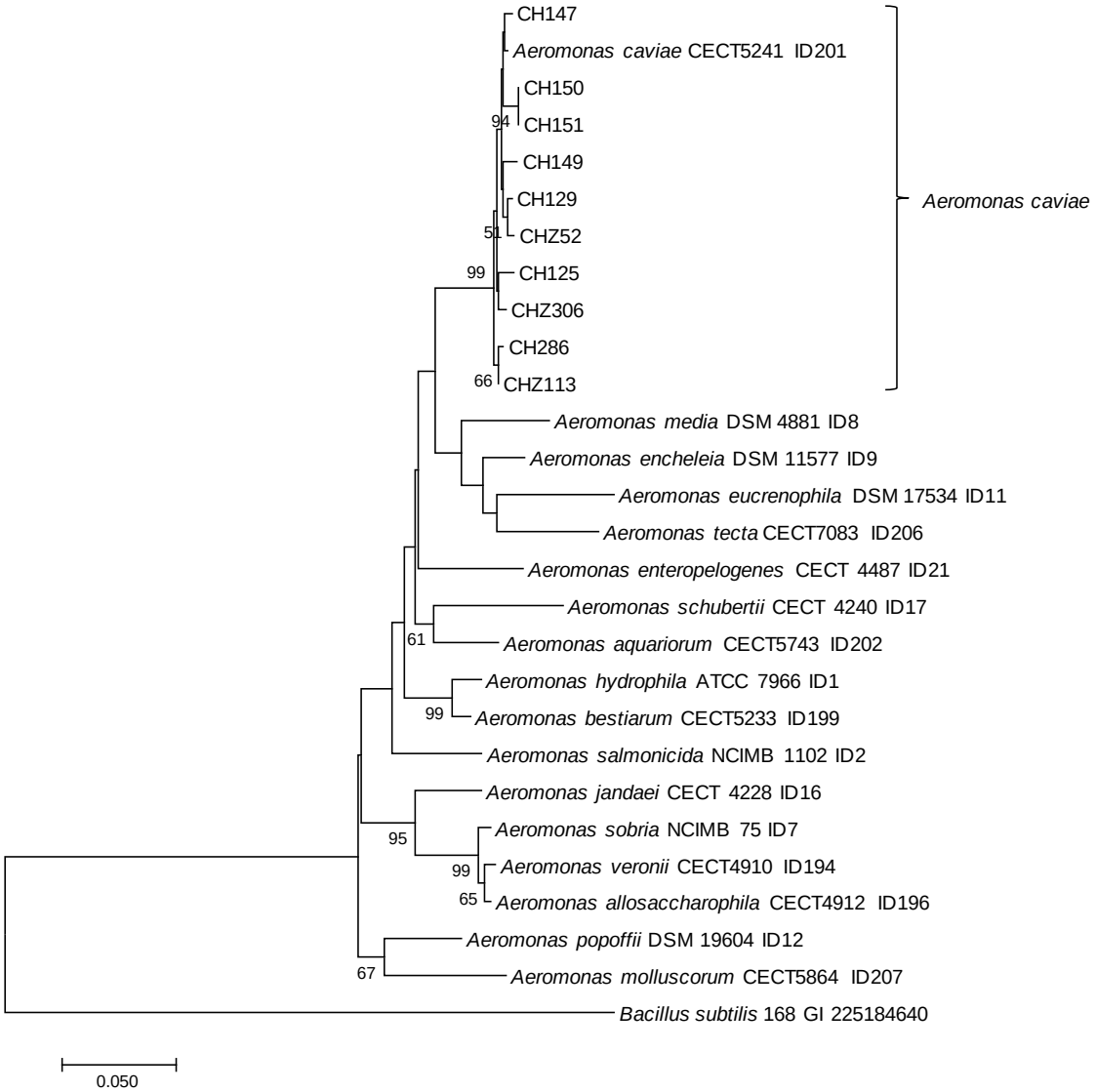


Nota: Os números dos nós indicam os valores de *bootstrap* em porcentagens de 1000 repetições. Valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

Legenda: A filogenia foi realizada utilizando sequências de nucleotídeos de estirpes Tipo de três coleções de culturas: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB). ID numbers correspond to accession numbers in *Aeromonas* MLST Database.

FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 9 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *groL* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho.

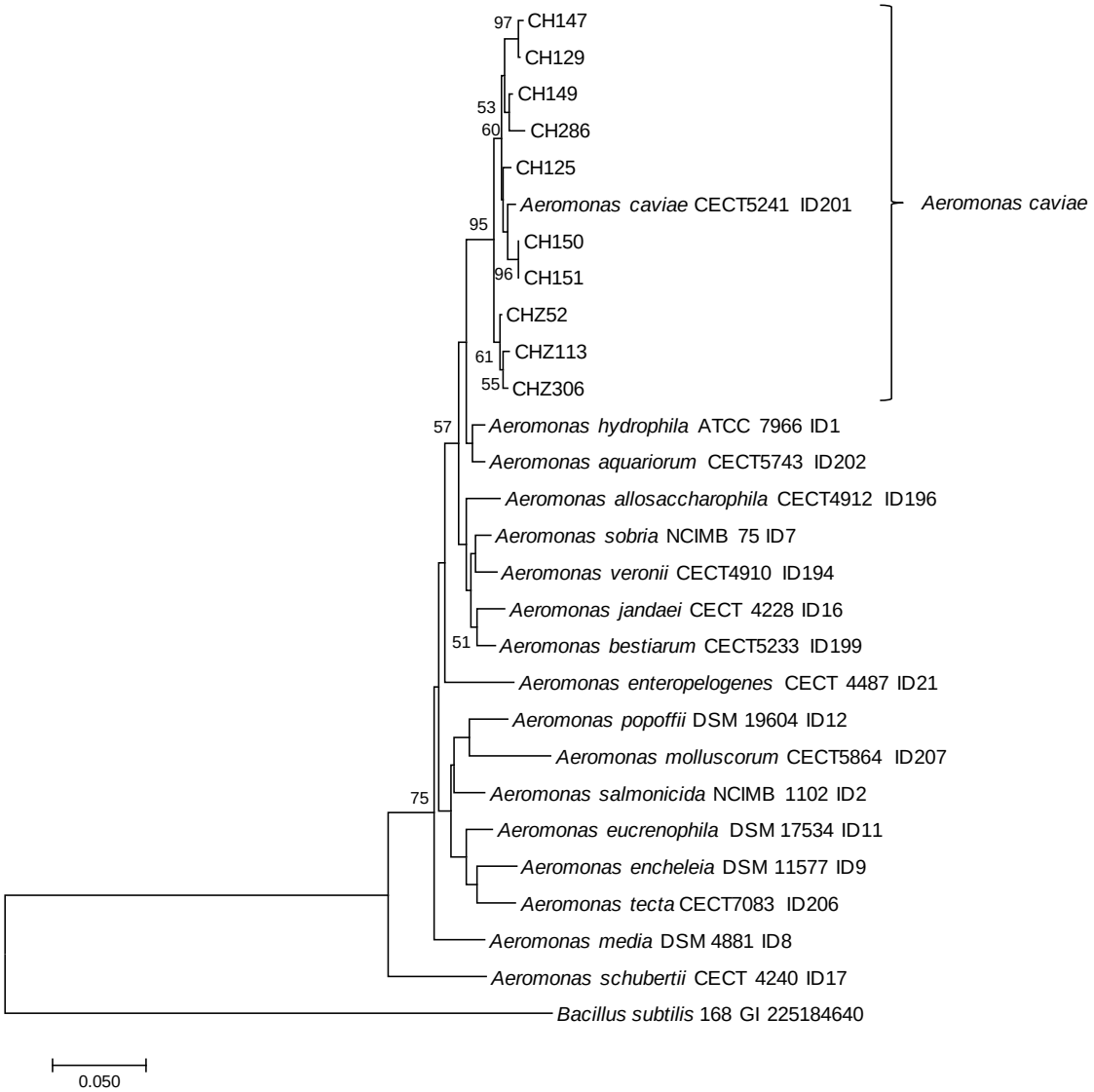


Nota: Os números dos nós indicam os valores de *bootstrap* em porcentagens de 1000 repetições. Valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

Legenda: A filogenia foi realizada utilizando sequências de nucleotídeos de estirpes Tipo de três coleções de culturas: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB). ID numbers correspond to accession numbers in *Aeromonas* MLST Database.

FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 10 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *gyrB* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho.

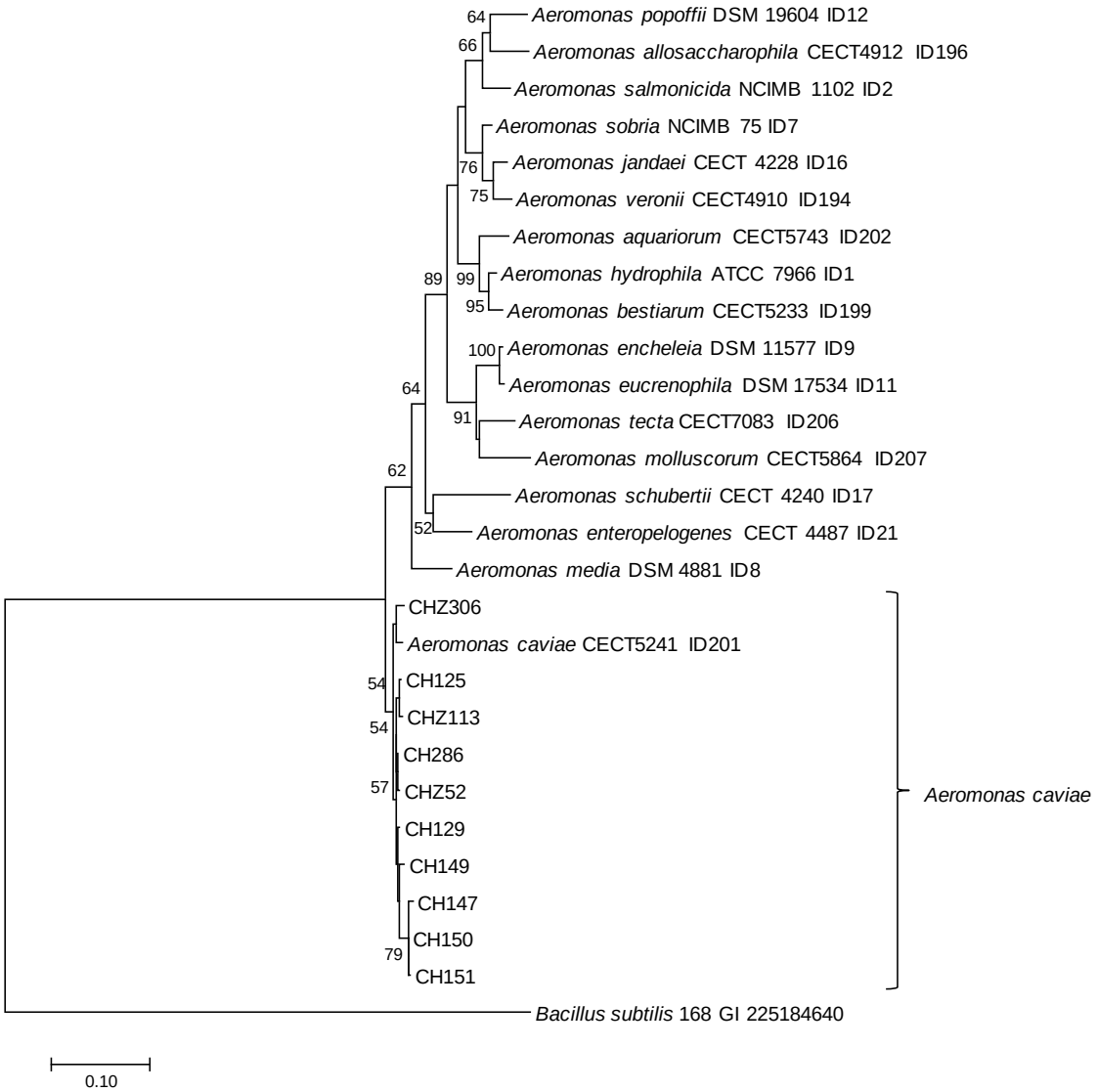


Nota: Os números dos nós indicam os valores de *bootstrap* em porcentagens de 1000 repetições. Valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

Legenda: A filogenia foi realizada utilizando sequências de nucleotídeos de estirpes Tipo de três coleções de culturas: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB). ID numbers correspond to accession numbers in *Aeromonas* MLST Database.

FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 11 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *metG* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho.

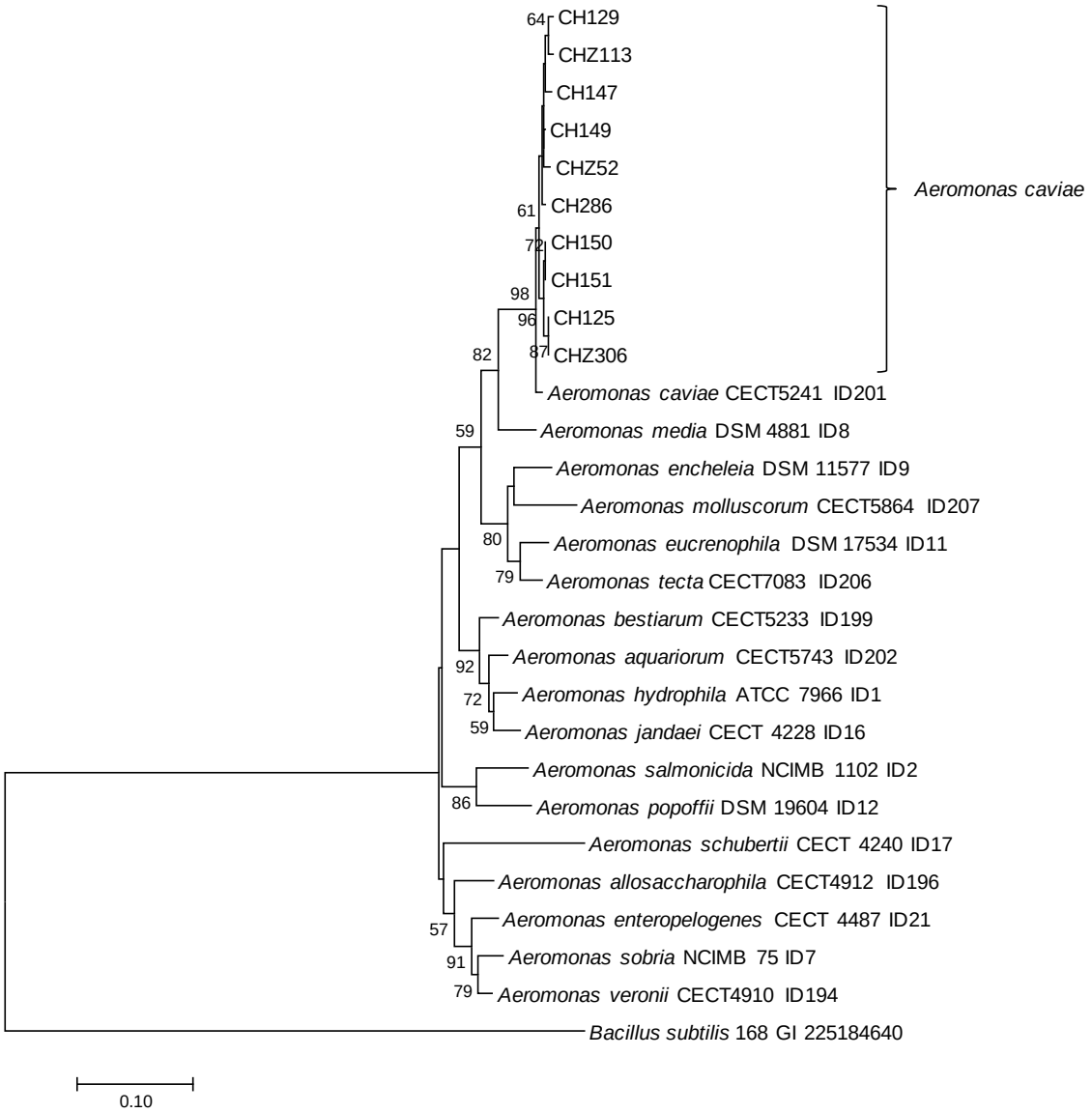


Nota: Os números dos nós indicam os valores de *bootstrap* em porcentagens de 1000 repetições. Valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

Legenda: A filogenia foi realizada utilizando sequências de nucleotídeos de estirpes Tipo de três coleções de culturas: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB). ID numbers correspond to accession numbers in *Aeromonas* MLST Database.

FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 12 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *ppsA* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho.

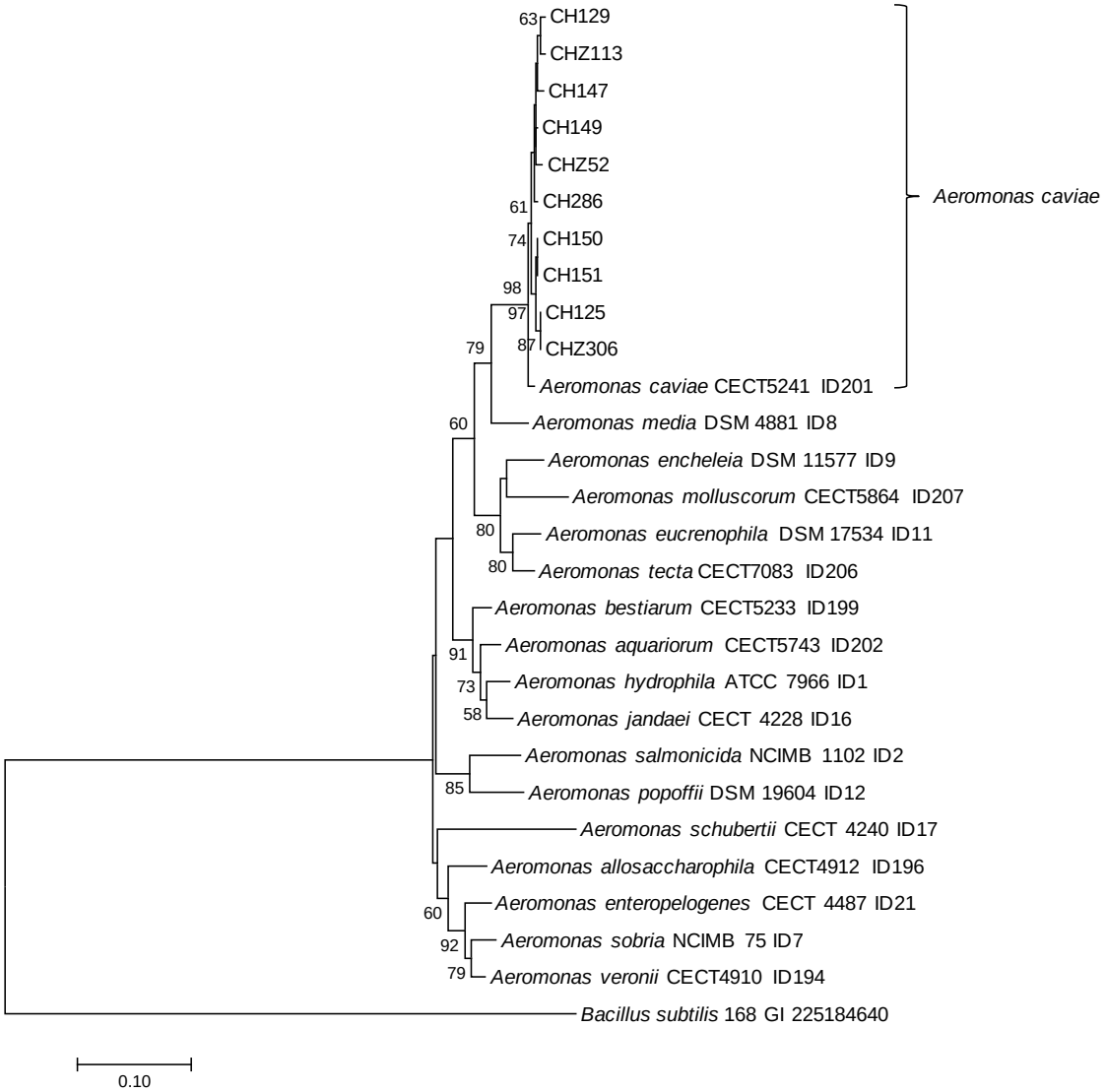


Nota: Os números dos nós indicam os valores de *bootstrap* em porcentagens de 1000 repetições. Valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

Legenda: A filogenia foi realizada utilizando sequências de nucleotídeos de estirpes Tipo de três coleções de culturas: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB). ID numbers correspond to accession numbers in *Aeromonas* MLST Database.

FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 13 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene *recA* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho.

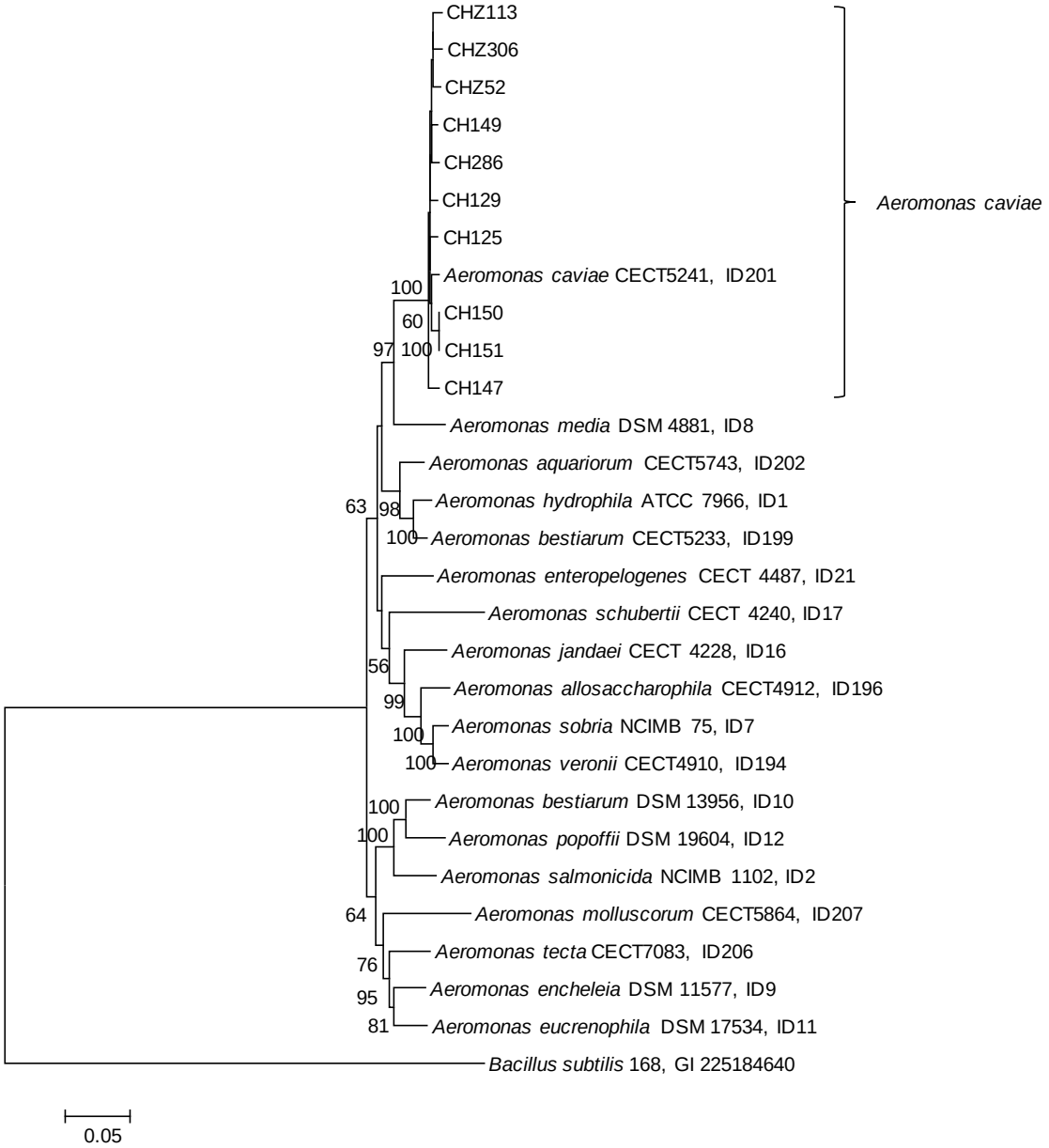


Nota: Os números dos nós indicam os valores de *bootstrap* em porcentagens de 1000 repetições. Valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

Legenda: A filogenia foi realizada utilizando sequências de nucleotídeos de estirpes Tipo de três coleções de culturas: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB). ID numbers correspond to accession numbers in *Aeromonas* MLST Database.

FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 14 - Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas dos genes *gltA, groL, gyrB, metG, ppsA* e *recA* de dez em estirpes do gênero *Aeromonas* isoladas do ambiente marinho.



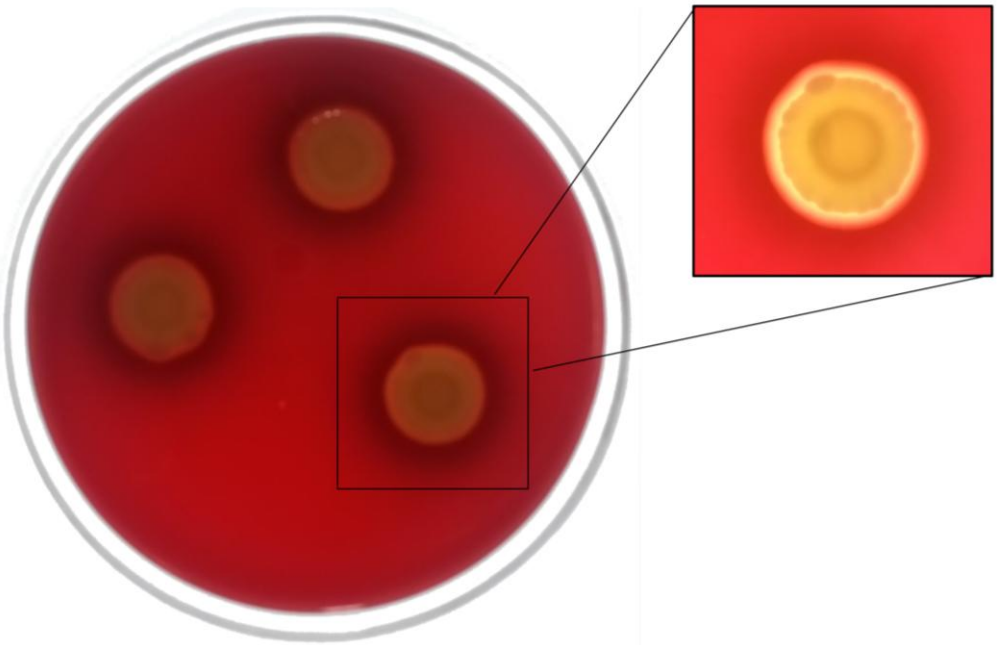
Nota: Os números dos nós indicam os valores de *bootstrap* em porcentagens de 1000 repetições. Valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima. *Bacillus subtilis* foi utilizado como raiz da árvore.

Legenda: A filogenia foi realizada utilizando sequências de nucleotídeos de estirpes Tipo de três coleções de culturas: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) e National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB). ID numbers correspond to accession numbers in *Aeromonas* MLST Database.

FONTE: Cardozo, 2017.

Observou-se que todas as estirpes foram negativas para os nove genes de virulência verificados (*alt*, *act*, *ast*, *ahh1*, *aer*, *aerA*, *hlyA*, *ascV* e *ascFG*). No entanto, todas apresentaram atividade hemolítica em placas de Agar sangue de carneiro. Na Figura 15, pode-se observar um dos experimentos de atividade hemolítica realizados neste estudo.

Figura 15 - Demonstração experimental da atividade hemolítica em placas de Agar sangue de carneiro por Aeromonas caviae CH125, isolada do ambiente marinho.



FONTE: Cardozo, 2017.

2.4.2 Determinação do tempo de cultivo para obtenção de coquetéis de proteínas, contendo quitinases, por estirpes do gênero Aeromonas

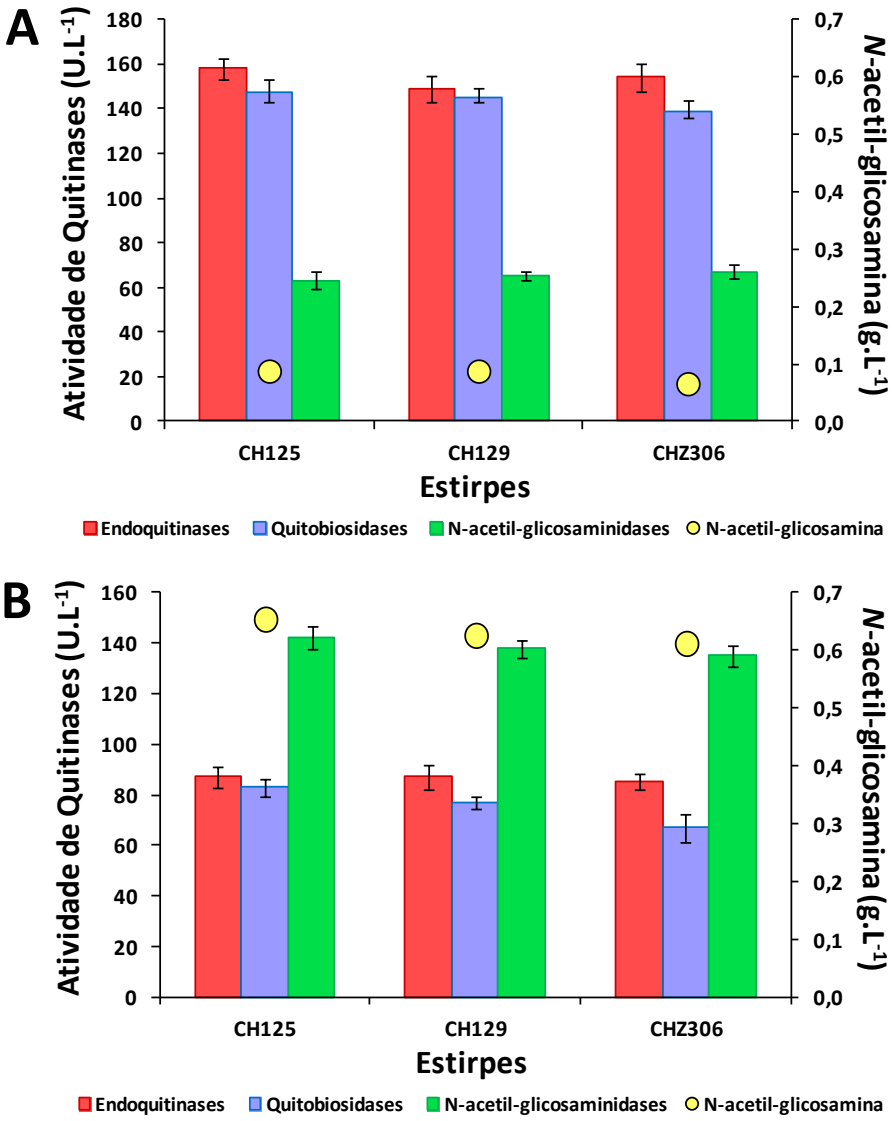
Aeromonas caviae CH125, CH129 e CHZ306 foram utilizadas para determinar o tempo necessário de cultivo para obtenção dos coquetéis de proteínas (contendo quitinases) por estirpes do gênero *Aeromonas*.

De acordo com os resultados observados na Figura 16, os coquetéis de proteínas obtidos nas etapas iniciais (24 h) de cultivo das estirpes foram compostos por maiores concentrações de endoquitinases e quitobiosidases que *N*-acetil-glicosaminidases e, os coquetéis de proteínas obtidos nas etapas finais (96 h) do cultivo, foram compostos por menores concentrações de endoquitinases e quitobiosidases que *N*-acetil-glicosaminidases.

Essas diferenças fizeram com que os coquetéis de proteínas obtidos nas etapas finais do cultivo proporcionassem maior taxa de conversão de α-quitina em GlcNAc (aprox. 0,65

g.L^{-1}), em comparação aos coquetéis obtidos nas etapas iniciais do cultivo (aprox. 0,08 g.L^{-1}). Dessa maneira, coquetéis de proteínas obtidos nas etapas finais de cultivo apresentaram o perfil mais adequado para conversão de α-quitina em GlcNAc e, foram selecionados para nossos estudos de produção de quitinases e GlcNAc.

Figura 16 - Conversão de α-quitina coloidal em *N*-acetil-glicosamina utilizando coquetéis de quitinases obtidos nas etapas iniciais (24 h) (A) e finais (96 h) (B) do cultivo de *Aeromonas caviae* CH125, CH129 e CHZ306, isoladas do ambiente marinho.



FONTE: Cardozo, 2017

2.4.3 Seleção de uma estirpe do gênero *Aeromonas* para estudos de produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina

Um procedimento de hidrólise enzimática da α-quitina foi padronizado neste estudo. O método de HPLC utilizado foi eficaz e detectou GlcNAc com 8,9 min de retenção. O peso seco da quitina coloidal (0,74 $g.L^{-1}$) foi obtido e utilizado para os cálculos de conversão de α-quitina em GlcNAc.

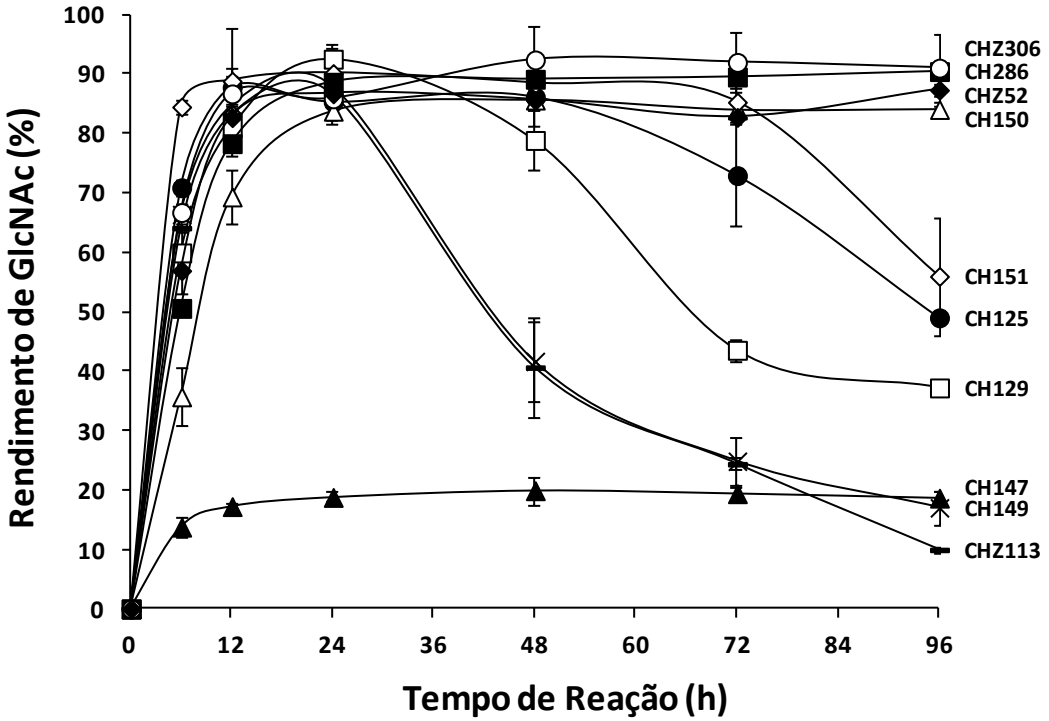
A produção seletiva de GlcNAc a partir de α-quitina foi obtida utilizando o coquetel de proteínas (contendo quitinases) de todas as estirpes de *A. caviae* (Tabela 5) e, dois comportamentos foram observados durante as 96 h de reação enzimática (Figura 17): 1) Aumento progressivo da concentração de GlcNAc nas primeiras 24 h, estabilizando-se até 96 h (CH147, CH150, CH286, CHZ306 e CHZ52) e; 2) Aumento progressivo da concentração de GlcNAc nas primeiras 24 h com um declínio após 24, 48 ou 72 h (CH151, CH125, CH129, CH149 e CHZ113).

Tabela 5 - Concentração de proteínas e atividade de quitinases dos coquetéis de proteínas avaliados durante a seleção da estirpe de *Aeromonas caviae* com maior capacidade de converter α-quitina cloidal em *N*-acetil-glicosamina.

Estirpe	Proteínas Totais ($mg.L^{-1}$)	Atividade de Quitinases ($U.L^{-1}$)			Atividade Específica de Quitinases ($U.mg^{-1}$ de proteínas)		
		Endoquitinase	Quitobiosidase	*N*-acetil-glicosaminidase	Endoquitinase	Quitobiosidase	*N*-acetil-glicosaminidase
CH125	2433	87	69	142	0,0358	0,0285	0,0582
CH129	785	91	66	138	0,1159	0,0841	0,1758
CH147	912	92	63	141	0,1009	0,0691	0,1546
CH149	2199	89	69	141	0,0405	0,0314	0,0641
CH150	561	96	65	139	0,1711	0,1150	0,2484
CH151	2158	87	68	141	0,0403	0,0316	0,0654
CH286	1133	94	71	141	0,0830	0,0627	0,1246
CHZ113	1793	93	67	139	0,0519	0,0374	0,0775
CHZ306	633	85	61	136	0,1343	0,0965	0,2145
CHZ52	354	88	61	137	0,2486	0,1727	0,3857

FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 17 - Rendimentos de *N*-acetil-glicosamina obtidos a partir da hidrólise de α-quitina coloidal utilizando coquetéis de proteínas de *Aeromonas caviae* isoladas do ambiente marinho.

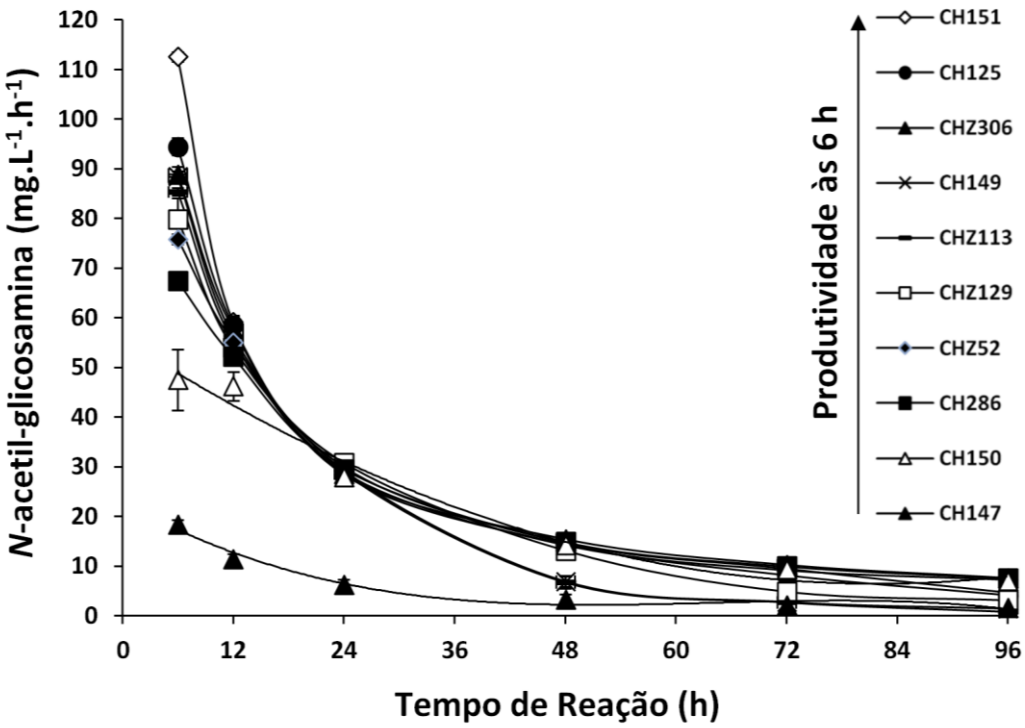


FONTE: Cardozo, 2017.

Com relação aos rendimentos observados nessa etapa, os rendimentos mínimo e máximo de GlcNAc foram de 10 a 93% durante 96 h de reação enzimática e, diferentes isolados mostraram altos rendimentos nas primeiras 24 h. Às 6 h de reação, por exemplo, os rendimentos foram de 14 a 85% e seis isolados (CH125, CH129, CH149, CH151, CHZ113 e CHZ306) mostraram rendimentos de 60-85% de GlcNAc (Figura 17). Após 12 h, os rendimentos foram de 17 a 89% e, sete isolados (CH125, CH129, CH149, CH151, CHZ113, CHZ306 e CHZ52) mostraram rendimentos de 81-89% (Figura 17). Excepto para *A. caviae* CH147 (19% de rendimento), todos os isolados apresentaram rendimentos entre 84-93% de GlcNAc após 24 h de reação (Figura 17). Os maiores rendimentos de GlcNAc foram observados por *A. caviae* CH129 (93% a 24 h) e *A. caviae* CHZ306 (92% a 48 h). *A. caviae* CH147 apresentou os menores rendimentos (<20%) ao longo do tempo de reação.

Em relação à produtividade, todos os isolados apresentaram maior produtividade às 6 h de reação, com diminuição progressiva ao longo de 96 h (Figura 18). O CH151 isolado atingiu a produtividade máxima de 112,5 $mg.L^{-1}.h^{-1}$.

Figura 18 - Produtividades de *N*-acetil-glicosamina obtidas a partir da hidrólise de α-quitina coloidal utilizando coquetéis de proteínas de *Aeromonas caviae* isoladas do ambiente marinho.



FONTE: Cardozo, 2017.

De acordo com nossos resultados e informações da literatura, utilizamos como critério de seleção da estirpe a ser avaliada nos estudos de produção de quitinases e GlcNAc, o perfil de produção de GlcNAc em função do tempo de reação. Embora, *A. caviae* CH151 tenha sido a estirpe que produziu um coquetel de proteínas capaz de atingir maior produtividade de GlcNAc, as concentrações de GlcNAc diminuíram ao longo do tempo de hidrólise, não sendo assim, adequada para nossos estudos. Como a segunda estirpe com maior produtividade também apresentou o mesmo perfil de diminuição das concentrações de GlcNAc ao longo do tempo, *A. caviae* CHZ306, terceira estirpe com maior produtividade, foi selecionada para os estudos de produção de quitinases e GlcNAc.

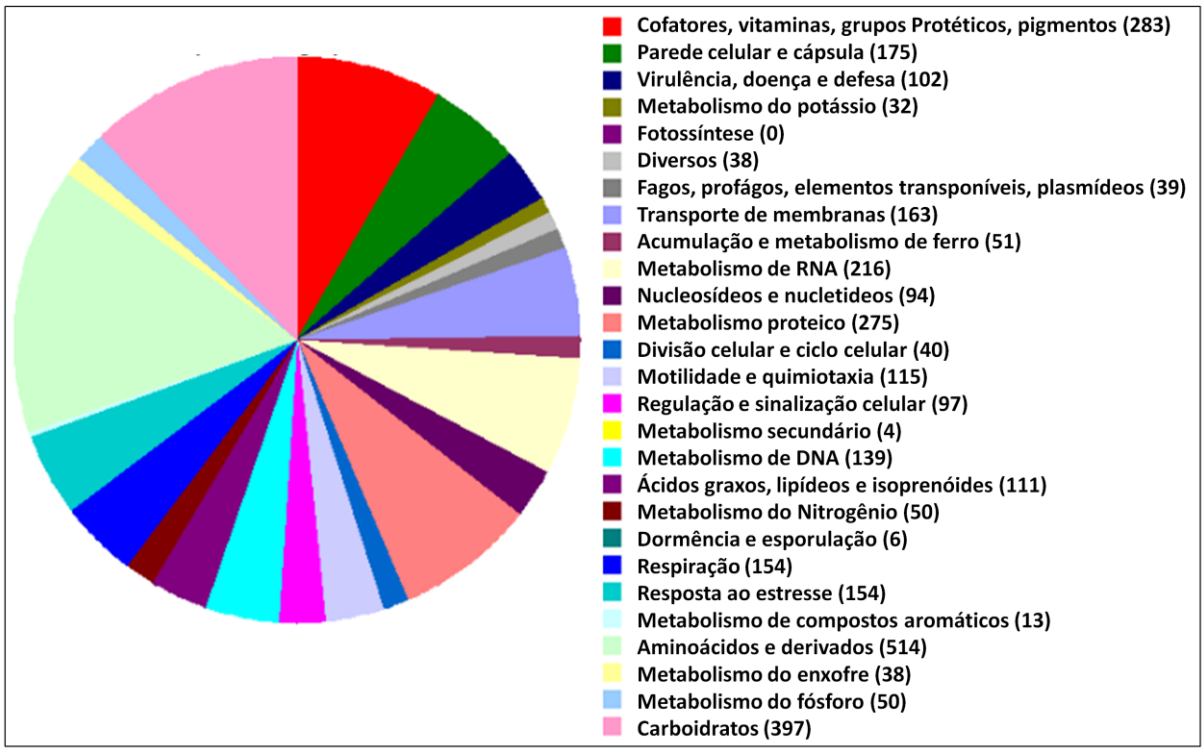
2.4.4 Sequenciamento do genoma de *Aeromonas caviae* CHZ306

O genoma de *Aeromonas caviae* CHZ306, estirpe selecionada para os estudos de produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina, foi sequenciado para a identificação de genes que condificam fatores associados à virulência e enzimas quitinolíticas.

Um total de 22.918.174 reads obtidos com o sequenciamento foram montados em 65 scaffolds, resultando num genoma com tamanho de aproximadamente 4,78 Mb e com 60,8% de G+C. A anotação resultou num total de 4.329 coding sequences (CDSs) e 150 RNAs (32 rRNAs, 113 tRNAs, e 5 noncoding RNAs [ncRNAs]). Na Figura 19, pode-se observar todas as características identificadas com o sequenciamento do genoma de *A. caviae* CHZ306.

O genoma (*draft*) de *A. caviae* CHZ306 foi depositado no DDBJ/ENA/GenBank com número de acesso MDSC01000000 (CARDOZO et al., 2016).

Figura 19 - Características genéticas identificadas com o sequenciamento do genoma de *Aeromonas caviae* CHZ306.



Legenda: Os números entre parênteses representam a quantidade de genes identificados em cada função.
FONTE: Cardozo, 2017.

A anotação realizada no RAST (*Rapid Annotations using Subsystems Technology*) revelou que o genoma de *A. caviae* CHZ306 contém genes envolvidos na codificação de diferentes fatores associados à virulência (Tabela 6), tais como polissacarídeos de superfície,

proteínas de membrana, enzimas extracelulares, sistemas de secreção, sistemas de aquisição de ferro, fimbrias/pili, fragelos, exotoxinas com atividade hemolítica e a toxina RTX. Observou-se também que o genoma não contém genes envolvidos na formação da cápsula e dos sistemas de secreção Tipo III e VI, os quais têm sido frequentemente envolvidos na patogenicidade de estirpes de *Aeromonas*. No entanto, observou-se a presença de genes envolvidos no sistema de secreção Tipo IV, o qual é associado aos eventos de conjugação bacteriana. As anotações também mostraram que o genoma de *A. caviae* CHZ306 é integrado por cinco profagos.

A análise comparativa dos fatores associados à virulência entre *A. caviae* CHZ306 e 28 espécies do gênero (Tabela 6) revelou que nem todas as espécies de *Aeromonas* contêm genes envolvidos na formação da cápsula, bem como os sistemas de secreção Tipo III, IV e VI. A toxina RTX (*Repeats-in-toxin*) esteve presente em todos os genomas, enquanto a toxina zot (*Zonula occludens toxin*) foi observada em apenas sete espécies. *A. caviae* CHZ306 mostrou o mesmo perfil de fatores associados à virulência que *A. caviae* 4221.

A anotação também nos revelou que o genoma de *A. caviae* CHZ306 contém os genes necessários para conversão completa da quitina a frutose-6-fostato (Figura 20), a qual pode ser posteriormente utilizada na via glicolítica. As enzimas detectadas incluem a endoquitinase (3.2.1.14), quitodextrinase (3.2.1.14), quitobiosidase (3.2.1.52), *N*-acetil-glicosaminidase (3.2.1.52), *N*-acetil-glicosamina quinase (2.7.1.59), glicosamina 6-fosfato desaminase (3.5.99.6), glicosamina quinase (2.7.1.8), glicosamina frutose-6-fosfato aminotransferase (2.6.1.16) e *N*-acetil-glicosamina fosfotransferase (2.7.1.193). Com relação às enzimas envolvidas na conversão de quitina em *N*-acetil-glicosamina, extremamente importantes para nosso estudo, observou-se que *A. caviae* CHZ306 contém genes que condificam sete diferentes enzimas quitinolíticas, sendo quatro endoquitinases, uma quitobiosidase, duas *N*-acetil-glicosaminidases e uma quitodextrinase. A enzima quitodextrinase não é considerada uma quitinase, mas apresenta atividade com oligossacarídeos de quitina.

Tabela 6 - Análise comparativa de genes que codificam fatores associados à virulência em espécies do gênero *Aeromonas*. (Continua)

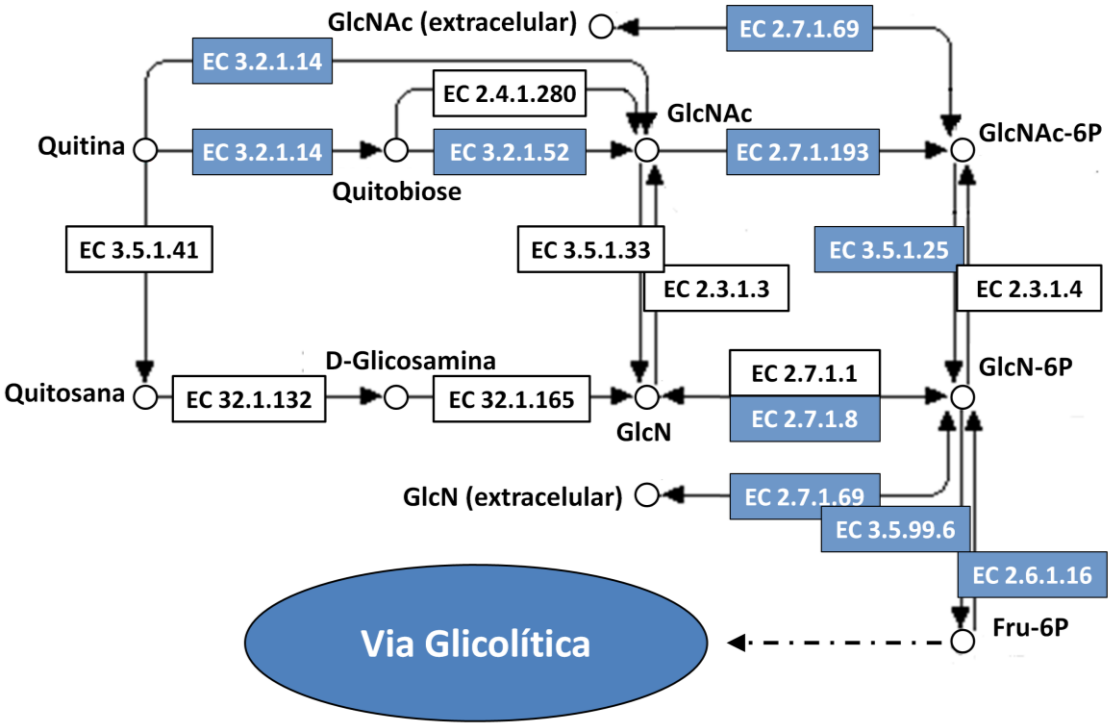
Genomas	Polissacarídeos de Superfície		Glicosilação	Proteínas da membrana externa (Omps)	Sistemas de aquisição de ferro	Exotoxinas com atividade hemolítica	Enzimas Extracelulares		
	Cápsula	Lipopolissacarídeos					Proteases	Lipases	Enolases
A. caviae CHZ306	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. allosaccharophila 4199	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. aquatica AE235	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. australiensis 8023	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. bestiarum 4227	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. bivalvium 7113.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. caviae 4221	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. dhakensis 7289	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. diversa 2478-85	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. encheleia 4342	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. enteropelogenes 4487	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. eucrenophila	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. finlandiensis 4287D	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. fluvialis 24681	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. hydrophila 7966	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. jandaei 4228	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. lacus AE122	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. media WS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. molluscorum 848	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. popoffii 105493	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. rivuli 22539	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. salmonicida A449	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. sanarellii 24682	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. schubertii WL1483	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. simiae 107798	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. sobria 4245	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. taiwanensis 24683	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A. tecta 7082	-	+	+	+	+	+	+	+	+
A. veronii B565	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 6 - Análise comparativa de genes que codificam fatores associados à virulência em espécies do gênero *Aeromonas*. (Conclusão)

Genomas	Sistemas de Secreção					Fimbria/Pili	Flagelo Polar	Outras Toxinas		Profagos
	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo VI			*Repeats-in-toxin* (RTX)	*Zonula occludens toxin* (Zot)	
A. caviae CHZ306	+	+	a	+	-	+	+	+	-	5
A. allosaccharophila 4199	+	+	a	+	-	+	+	+	-	0
A. aquatica AE235	+	+	a	+	+	+	+	+	-	5
A. australiensis 8023	+	+	a	-	-	+	+	+	-	1
A. bestiarum 4227	+	+	a	-	+	+	+	+	-	0
A. bivalvium 7113.	+	+	a	-	+	+	+	+	-	0
A. caviae 4221	+	+	a	+	-	+	+	+	-	0
A. dhakensis 7289	+	+	a	b	+	+	+	+	-	2
A. diversa 2478-85	+	+	+	-	-	+	+	+	-	0
A. encheleia 4342	+	+	+	b	+	+	+	+	+	2
A. enteropelogenes 4487	+	+	a	b	+	+	+	+	-	3
A. eucrenophila	+	+	a	+	+	+	+	+	-	3
A. finlandiensis 4287D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	5
A. fluvialis 24681	+	+	a	-	-	+	+	+	-	0
A. hydrophila 7966	+	+	a	+	+	+	+	+	-	1
A. jandaei 4228	+	+	+	b	+	+	+	+	+	2
A. lacus AE122	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0
A. media WS	+	+	a	-	-	+	+	+	-	1
A. molluscorum 848	+	+	a	b	-	+	+	+	-	16
A. popoffii 105493	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4
A. rivuli 22539	+	+	a	+	+	+	+	+	+	8
A. salmonicida A449	+	+	a	+	+	+	+	+	-	2
A. sanarellii 24682	+	+	a	b	-	+	+	+	+	1
A. schubertii WL1483	+	+	+	+	-	+	+	+	-	4
A. simiae 107798	+	+	a	-	+	+	+	+	-	1
A. sobria 4245	+	+	a	b	+	+	+	+	+	2
A. taiwanensis 24683	+	+	a	-	-	+	+	+	-	0
A. tecta 7082	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5
A. veronii B565	+	+	a	+	-	+	+	+	-	3

Legenda: (+) Contém genes envolvidos na codificação do fator de virulência; (-) Ausência de genes envolvidos na codificação do fator de virulência; (a) Apenas "um" gene envolvido na codificação do fator de virulência; (b) Proteínas hipotéticas.
FONTE: Cardozo, 2017

Figura 20 - Representação das enzimas envolvidas na conversão de quitina em frutose 6-fosfato, identificadas com o sequenciamento do genoma de *Aeromonas caviae* CHZ306.



Nota: O número EC representa a classificação numérica das enzimas, segundo a *Enzyme Comission Numbers*.
Legenda: Os números EC destacados em azul são referentes às enzimas detectadas com o sequenciamento do genoma de *Aeromonas caviae* CHZ306. As enzimas detectadas foram: endoquitinase (3.2.1.14), quitodextrinase (3.2.1.14), quitobiosidase (3.2.1.52), *N*-acetil-glicosaminidase (3.2.1.52), *N*-acetil-glicosamina quinase (2.7.1.59), glicosamina 6-fosfato desaminase (3.5.99.6), glicosamina quinase (2.7.1.8), glicosamina frutose-6-fosfato aminotransferase (2.6.1.16) e *N*-acetil-glicosamina fosfotransferase (2.7.1.193).
FONTE: Cardozo, 2017.

2.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

2.5.1 Caracterização de estirpes do gênero *Aeromonas* por *Multilocus Sequence Analysis* e verificação de fatores associados à virulência

Diferentes marcadores moleculares foram utilizados ao longo da história de avaliação das relações filogenéticas entre espécies de *Aeromonas*. Estes marcadores evolutivos incluíram principalmente os genes 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*, *rpoB* e *DnaJ*, cujos os comprimentos de DNA sequenciado variaram de 934 a 1100 pb (KÜPFER et al., 2006; NHUNG et al., 2007; SAAVEDRA et al., 2006; SOLER et al., 2004; YÁÑEZ et al., 2003).

Os resultados desses estudos indicaram que existem menos diferenças nas sequências do gene 16S rRNA (97,8-100%) (MARTIN CARNAHAN; JOSEPH, 2005) que nas sequências dos *housekeeping genes* descritos acima (89-92%) (NHUNG et al., 2007), mostrando que o poder discriminatório do uso de *housekeeping genes* é relativamente maior em relação ao gene 16S rRNA. Como um exemplo, observamos *Aeromonas trota* e *A. caviae*, que são distinguíveis por apenas um nucleotídeo para o gene 16S rRNA, enquanto que para o gene *gyrB* as diferenças estão entre 57-69 pares de bases, dependendo da estirpe avaliada (YÁÑEZ et al., 2003).

Estudos filogenéticos usando diferentes *housekeeping genes* têm mostrado resultados importantes para caracterização de espécies de *Aeromonas*. Em um estudo usando quatro genes (16S rRNA, *recA*, *chiA* e *gyrB*) em *MLSA* para verificar as diferenças nucleotídicas de uma larga coleção de 94 *Aeromonas* bem caracterizadas (CARNAHAN, 2001), observou-se que as sequências do gene 16S rRNA apresentavam menos de 1% de variabilidade entre as espécies, mostrando que o uso desse gene pode definir claramente um isolado de *Aeromonas* somente até o nível de gênero (MARTIN CARNAHAN; JOSEPH, 2005). No entanto, ocorreram vários casos em que uma única estirpe que se relacionava com a sua mesma designação de espécie para 2 ou 3 dos genes verificados, distinguia-se em uma espécie totalmente diferente para outro gene, sugerindo que eventos de recombinação genética ou transferência lateral ocorreram entre espécies de *Aeromonas*.

Estas observações e o uso de MLSA são importantes para definição de espécies e sugerem fortemente que a análise de diferentes genes, sem dúvida, deve ser realizada

para caracterização de espécies de *Aeromonas*. Com base nisso, selecionamos genes que pudessem ser comparados em um banco de dados *(Aeromonas MLST Databases)* com o maior número de sequências possível de *Aeromonas* e conhecer a identidade dos isolados em estudo. Os genes selecionados apresentaram resultados satisfatórios e possibilitaram caracterizar os isolados como pertencentes à espécie *Aeromonas caviae*. Em uma análise comparativa entre as sequências de diferentes espécies de *Aeromonas* utilizadas como referência, observou-se que as sequências apresentaram médias entre 89 e 94% de similaridade entre elas, demonstrando um poder de discriminação superior ao gene 16S rRNA. Esses resultados estão de acordo com aqueles descritos por Nhung et al., (2007), o qual mencionou que *housekeeping genes* apresentavam diferenças entre 89 e 92% e com Janda e Abbott (2010) que através de um levantamento de vários estudos filogenéticos (KÜPFER et al., 2006; NHUNG et al., 2007; SOLER et al., 2004; YÁÑEZ et al., 2003) observou que a maioria dos *housekeeping genes* apresentam taxas de substituição intraespécies (diferentes estirpes da mesma espécie) de aproximadamente 2% enquanto que os valores interespécies (estirpes pertencentes a espécies diferentes) são tipicamente maiores que 3%. Esses valores estão de acordo com os resultados observados neste estudo, onde taxas maiores que 3% foram observadas na maior parte das comparações entre espécies e de aproximadamente 2% foram observadas em nossas estirpes, caracterizadas como *A. caviae*.

A caracterização de *Aeromonas* é de extrema importância para a saúde publica e para estudos que visam à utilização dessas bactérias em aplicações biotecnológicas, pois apenas três das mais de 15 espécies reconhecidas de *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii* bv. *Sobria*) parece produzir a grande maioria das infecções sistêmicas em humanos (JANDA et al., 1994; JANDA; ABBOTT, 1998). Essas bactérias têm sido relacionadas a uma série de casos de septicemia, infecções de feridas, pneumonia e gastroenterites (AL-BENWAN et al., 2007; AVOLIO et al., 2009; BRAVO et al., 2003; CHOI et al., 2008; DWIVEDI et al., 2008; JANDA e ABBOTT 2010; NAGATA et al., 2011) e a maneira mais comum de verificar seu potencial de patogenicidade tem sido através da identificação dos genes associados a virulência.

O processo de infecção por *Aeromonas* é multifatorial e de complexa interação entre a bactéria e o hospedeiro (JANDA, 1991; JANDA; ABBOTT, 2010, PABLOS et al., 2010). A severidade das infecções está relacionada aos fatores de virulência e ao estado imunológico do paciente (ALBERT et al., 2000; DWIVEDI et al., 2008; MOYER 1987; SOHN et al., 2007). Assim, a verificação da presença de vários fatores

de virulência é uma ferramenta de extrema importância na identificação do risco e compreensão da patogênese de *Aeromonas* (AGUILERA-ARREOLA et al. 2005; CHACÓN et al. 2003; SEN; RODGERS 2004).

No presente estudo, dez estirpes caracterizadas como *A. caviae* foram verificadas quanto à presença de nove genes associados à virulência (*alt, act, ast, ahh1, aer, aer*A, *hlyA, ascV* e *ascFG*) que incluíram as principais enterotoxinas, hemolisinas e sistemas de secreção descritos na literatura. Apesar de *A. caviae* estar incluída entre as espécies mais relacionadas com infecções em peixes e humanos, as estirpes em estudo foram negativas para os genes verificados. Esses resultados são de grande importância para nossos estudos futuros, que tem como objetivo a aplicação biotecnológica dessas cepas. No entanto, *A. caviae* é uma espécie altamente diversificada (AGUILERA-ARREOLA et al., 2007) e não se podem considerar apenas os resultados obtidos por PCR, excluindo a possibilidade de que outros genes de virulência estejam presentes nessas estirpes. Assim, os isolados foram submetidos a ensaios adicionais para verificar a capacidade de expressarem hemolisinas em placas de Agar sangue de carneiro. Nossos resultados mostraram que todas as estirpes possuem a capacidade de causar hemólise em placas de Agar sangue, contrariando nossos resultados obtidos por PCR. Resultados similares têm sido observados em vários casos durante os estudos de virulência com *Aeromonas*. Em um estudo realizado por Wolf (2012), por exemplo, *A. caviae* apresentou baixa frequência de genes hemolíticos (10%). No entanto, a atividade hemolítica foi detectada em aproximadamente 80% das estirpes quando ensaios *in vitro* foram realizados. Em outro estudo, o gene responsável pela enterotoxina citolítica (*aer*), encontrado em 38% das *Aeromonas* analisadas em um estudo realizado Castilho et al., (2009), esteve presente em apenas uma estirpe de *A. caviae*. No entanto, foi observado um fragmento não esperado de 400 pb em 78% das *A. caviae* durante as amplificações. Este fragmento foi sequenciado e verificou-se que apresentava homologia com vários genes de hemolisinas de *Aeromonas*.

Com base nessas informações, o genoma de uma estirpe selecionada (*A. caviae CHZ306*) foi sequenciado para a identificação dos genes que condificam fatores associados à virulência. As análises mostraram que *A. caviae* CHZ306 não continha os genes verificados anteriormente por PCR, mas apresentou vários outros genes envolvidos na codificação de diferentes fatores associados à virulência, tais como polissacarídeos de superfície, proteínas de membrana, enzimas extracelulares, sistemas

de secreção, sistemas de aquisição de ferro, fimbrias/pili, fragelos, exotoxinas com atividade hemolítica, toxina RTX e profagos.

Esses resultados demonstram a importância da realização de testes adicionais (ex. hemolíticos, fenotípicos, sequenciamento de genoma) para identificar o potencial de patogenicidade de uma estirpe do gênero *Aeromonas*. Além disso, como poucos estudos têm relatado a caracterização molecular específica para os genes de virulência em *A. caviae*, *primers* desenhados para detectar genes em *A. hydrophila* têm sido frequentemente utilizados nos estudos de virulência. Assim, o sequenciamento do genoma é uma alternativa poderosa a verificação de genes por PCR e, forrnece maior número de informações que podem ser estudadas.

2.5.2 Seleção de uma estirpe do gênero *Aeromonas* para estudos de produção de quitinases e *N*-acetil-glicosamina

O gênero *Aeromonas* é fenotípicamente diverso (HSU et al., 1981, WALTMAN et al., 1982, JANDA, 1985, HÃNNINEN, 1994) e um dos grupos de bactérias mais eficientes para a degradação da quitina. No entanto, de acordo com a Tabela 7, existem apenas alguns estudos sobre a produção de GlcNAc por quitinases de *Aeromonas* sp. Por exemplo, Sashiwa et al. (2002), produziram GlcNAc a partir de diferentes α-quitinas (flocos e pó) com rendimentos de 64-77% em 10 dias utilizando extratos de enzima bruta de *A. hydrophila* H-2330. Kuk et al., (2005) produziram GlcNAc a partir de α-quitina coloidal utilizando *Aeromonas* sp. GJ-18 com 83 e 95% de rendimento dentro de 5 e 9 dias, respectivamente. Jamialahmadi et al., (2011) produziram GlcNAc a partir de α-quitina coloidal com um rendimento de 79% utilizando *Aeromonas* sp. PTCC 1691 com extrato bruto de enzimas após 24 h. Neste estudo, GlcNAc foi produzida a partir de α-quitina coloidal utilizando coquetéis de proteínas de estirpes *A. caviae* isoladas do ambiente marinho. As diferentes quitinases presentes nos coquetéis de proteínas, tais como endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases resultaram na produção eficiente de GlcNAc, com 85% de rendimento e produtividade de 112,5 $mg.L^{-}1.h^{-1}$ dentro de 6 h. O maior rendimento de GlcNAc foi obtido após 24 h (93%) e a produção variou de 10 a 93% de rendimento durante 96 h de reação.

Tabela 7 - Comparativo de estudos de produção de *N*-acetil-glicosamina por enzimas microbianas.

Organismo	Quitina		Preparação Enzimática	GlcNAc (%)	Tempo de Produção	Referência
	Tipo	Forma				
A. hydrophyla H2330	α-quitina	Flocos e pó	Extrato Bruto de Quitinases	64-77	10 dias	Sashiwa et al. 2002
Aeromonas sp. GJ-18	α-quitina	Coloidal	Extrato Bruto de Quitinases	83	5 dias	Kuk et al. 2005
				94.9	9 dias	
Aeromonas sp. PTCC1691	α-quitina	Coloidal	Extrato Bruto de Quitinases	79	24 h	Jamialahmadi et al. 2011
Burkholderia cepacia TU09	α-quitina	Pó	Extrato Bruto de Quitinases	85	7 dias	Pichyangkura et al. 2002
	β-quitina			90	1 dia	
Bacillus licheniformis SK-1	α-quitina	Pó	Extrato Bruto de Quitinases	41	6 dias	Pichyangkura et al. 2002
	β-quitina			75		
Paenibacillus illinoisensis KJA-424	α-quitina	Coloidal	Extrato Bruto de Quitinases	62.2	24 h	Jung et al. 2007
Trichoderma reesei	α-quitina	Regenerada	Celulases and β-glucanases	86	10 dias	Il'ina et al. 2004
T. viride	α-quitina	Pó	Extrato Bruto de Quitinases	74	19 dias	Sashiwa et al. 2003
Streptomyces coelicolor A3(2)	α-quitina	Pó	*N*-acetylhexosaminidase e Quitinase C	90	8 h	Nguyen-Thi and Doucet 2016
***A. caviae* isolates**	**α-quitina**	**Coloidal**	**Extrato Bruto de Quitinases**	**14-85**	**6 h**	**Este estudo**
				17-89	**12 h**	
				19-93	**24 h**	

FONTE: Cardozo, 2017.

Os resultados apresentados aqui mostram que é possível produzir GlcNAc a partir de α-quitina utilizando coquetéis de proteínas (contendo quitinases) de estirpes de *A. caviae* isoladas do ambiente marinho. Além disso, a capacidade de hidrolisar α-quitina é uma característica particularmente notável para o desenvolvimento futuro de processos biocatalíticos para produção de quitinases e derivados de quitina, uma vez que esta forma de quitina é altamente resistente à degradação devido à sua estrutura cristalina e à insolubilidade em água (CHEN et al., 2010; JUNG; PARK, 2014). É importante mencionar que o uso de α-quitina coloidal (forma de quitina parcialmente descristalinizada) bem como os tipos de quitinases presentes no coquetél de proteínas também tem grande influência na produção de GlcNAc. Assim, um procedimento de preparação de α-quitina coloidal que permite a obtenção de maiores porcentagens de partículas descristalinizadas e a utilização de coquetéis de proteínas com quantidades adequadas de endo e exoquitinases, como as determinadas nesse estudo, facilitam a hidrólise enzimática e a produção de GlcNAc.

As mesmas observações foram realizadas por Chen et al., (2010a), avaliando estudos com *A. hydrophila* H2330 (SASHIWA et al., 2002) e *Bacillus licheniformis* SK-1 (PICHYANGKURA et al., 2002). Nesses estudos, quase 100% de GlcNAc foi produzida usando extrato bruto de quitinases de *A. hydrophila* H2330, enquanto que

20% de quitobiose foi produzida juntamente com 75% de GlcNAc utilizando um extrato bruto com altas concentrações de endoquitinases e baixas concentrações de *N*-acetil-glicosaminidases. Esses estudos reforçam nossos resultados e indicam que endo e exoquitinases são necessárias para completar a digestão da quitina e, que maiores concentrações de *N*-acetil-glicosaminidases resultam em maiores rendimentos de GlcNAc. Assim, a estrutura cristalina da α-quitina e a composição enzimática da reação são dois fatores cruciais na produção de GlcNAc por métodos enzimáticos (CHEN et al., 2010a).

O declínio das concentrações de GlcNAc em alguns ensaios foi uma desvantagem dos coquetéis de proteínas e um ponto importante no controle da produção de GlcNAc. Os dados mostraram que diferentes quitinases dentre aquelas que foram mais bem caracterizadas pela hidrólise da quitina (endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) (SAHAI e MANOCHA, 1993, DAHIYA et al., 2006) podem estar presentes em uma proporção relativamente alta em coquetéis de proteínas de bactérias quitinolíticas e contribuir para redução da concentração final de GlcNAc durante um longo período incubação. A enzima quitina deacetilase (ZHAO et al., 2010), por exemplo, hidrolisa o grupo acetil das unidades de GlcNAc em glicosamina e ácido acético e, pode diminuir a eficiência da produção de GlcNAc. Assim, o tempo de incubação dos coquetéis de proteínas contendo quitinases é um parâmetro que requer otimização para maximizar os rendimentos de GlcNAc.

Com base em nossos resultados e informações obtidas de estudos da literatura, *A. caviae* CHZ306 foi a estirpe selecionada para os estudos de produção de quitinases e GlcNAc. Essa estirpe foi selecionada por ser capaz de produzir um coquetel de proteínas contendo quitinases que não afetaram as concentrações de GlcNAc durante a reação de hidrólise enzimática. Além disso, foi aquela que apresentou a terceira maior produtividade do estudo.

O sequenciamento do genoma de *A. caviae* CHZ306 nos mostrou também que essa estirpe não contém genes que codificam a enzima quitina deacetilase, a qual poderia influenciar negativamente na produção de GlcNAc. Além disso, a anotação do genoma mostrou que essa estirpe contém genes que condificam sete diferentes enzimas quitinolíticas, sendo quatro endoquitinases, uma quitobiosidase, duas *N*-acetil-glicosaminidases e uma quitodextrinase. Esses resultados são promissores, nos dando a possibilidade de selecionar quitinases especificas para produção de GlcNAc, bem como outros derivados de quitina.

CONCLUSÕES

- Os *housekeeping* genes selecionados para *Multilocus Sequence Analysis* possibilitaram caracterizar as dez estirpes como pertencentes à espécie *Aeromonas caviae* e, mostraram características apropriadas para identificação de espécies do gênero *Aeromonas.*

- As dez estirpes de *A. caviae* foram negativas para os genes de virulência verificados por PCR. No entanto, todas apresentaram atividade hemolítica em placas contendo Agar sangue de carneiro, demonstrando assim, junto com analise do genoma de *A. caviae* CHZ306, a importância do uso de testes adicionais para identificar o potencial de patogenicidade de estirpes do gênero *Aeromonas*.

- O tempo necessário de cultivo das estirpes para obtenção de coquetéis de proteínas capazes de converter α-quitina coloidal em GlcNAc foi determinado. Coquetéis de proteínas obtidos nas etapas finais de cultivo (96 h) das estirpes de *A. caviae* apresentaram maiores concentrações de *N*-acetil-glicosaminidases, em comparação a endoquitinases e quitobiosidases e, possibilitaram a obtenção de maiores rendimentos de GlcNAc.

- GlcNAc foi produzida a partir de α-quitina coloidal utilizando coquetéis de proteínas das dez estirpes de *A. caviae.* No entanto, diferentes quitinases dentre aquelas mais bem caracterizadas na hidrólise de quitina podem estar presentes em coquetéis brutos de proteínas e, contribuir para a redução da concentração final de GlcNAc durante longos períodos de incubação.

- *A. caviae* CHZ306 não foi a estirpe que apresentou a maior capacidade de conversão de α-quitina coloidal em GlcNAc. Entretanto, produziu um coquetel de proteínas que não afetou as concentrações de GlcNAc durante a reação de hidrólise enzimática, sendo assim, a estirpe selecionada para os estudos de produção de quitinases e GlcNAc.

- *A. caviae* CHZ306 contém genes que codificam quitinases fundamentais para o processo de conversão de α-quitina em GlcNAc e, não contém genes que codificam a enzima quitina deacetilase, uma enzima que pode influenciar negativamente na

produção de GlcNAc. Esses resultados são promissores, nos dando a possibilidade de selecionar quitinases especificas para produção de GlcNAc, bem como outros derivados de quitina.

CAPÍTULO 3 - CONDIÇÕES DE CULTIVO EM BIORREATOR PARA PRODUÇÃO DE QUITINASES POR *Aeromonas caviae* CHZ306

3.1 INTRODUÇÃO

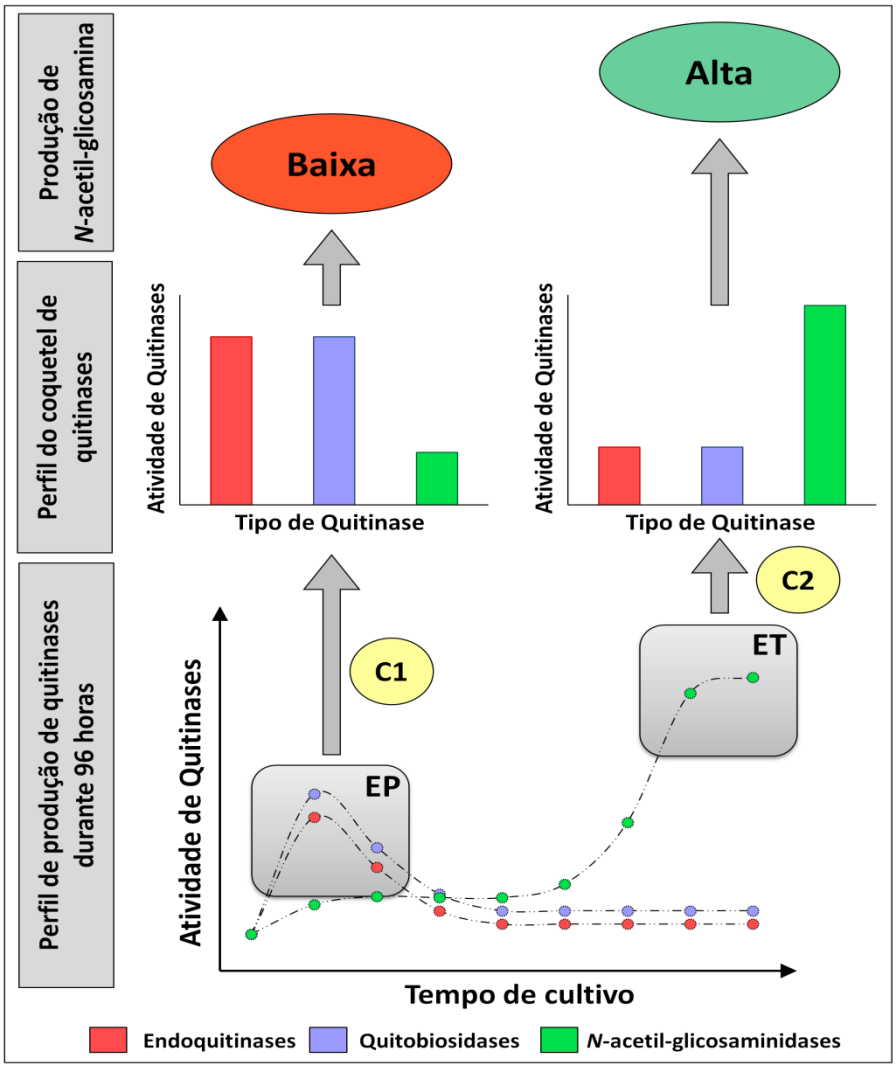
A quitina é o biopolímero mais abundante no ambiente marinho e o principal componente do exoesqueleto dos artrópodes, paredes celulares de fungos e algas (ZOBELL; RITTENBERG, 1938). *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc), unidade monomérica da quitina, é biocompatível, biodegradável e apresenta grande potencial de aplicação nas áreas de cosméticos, farmacêutica e biomateriais (CHEN et al., 2010a). Este composto tem sido tradicionalmente produzido pela hidrólise ácida da quitina, mas os procedimentos utilizados são ambientalmente prejudiciais, têm baixo rendimento e alto custo (CHEN et al., 2010a; LIU et al., 2013; JUNG; PARK, 2014). Uma alternativa sustentável a esse processo é a hidrólise enzimática da quitina, a qual evitaria a utilização de produtos químicos e não geraria quantidades excessivas de resíduos.

Para realizar a conversão completa de quitina em GlcNAc por via enzimática, são necessários coquetéis de enzimas quitinolíticas contendo concentrações adequadas de endoquitinases e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) (CHEN et al., 2010a). Experimentos realizados nos capítulo 2 mostraram a influência das concentrações de cada quitinase em um coquetel de enzimas para produção de GlcNAc (Figura 21). Nesses experimentos, dois coquetéis de quitinases, obtidos nas etapas iniciais (24 h) e finais (96 h) do cultivo de *A. caviae* CH125, CH129 e CHZ306 foram utilizados para os ensaios de produção de GlcNAc e, de acordo com os resultados, extratos de quitinases contendo altas concentrações de endoquitinases, quitobiosidases e baixas concentrações de *N*-acetil-glicosaminidases produzem baixos rendimentos de GlcNAc (aprox. 0,08 $g.L^{-1}$), enquanto que extratos de quitinases contendo altas concentrações de *N*-acetil-glicosaminidases produzem altos rendimentos de GlcNAc (aprox. 0,65 $g.L^{-1}$).

Com base nessas observações, o objetivo desse estudo foi produzir um coquetel de quitinases em biorreator por *A. caviae* CHZ306 contendo quantidades adequadas de endoquitinases (25%), quitobiosidases (25%) e *N*-acetil-glicosaminidases (50%) para produção de GlcNAc. Esse estudo foi realizado em três etapas que incluíram a: (1) seleção do meio de cultivo, (2) determinação das condições de temperatura, pH e

concentração de quitina em *shaker* e (3) determinação das velocidades de agitação e aeração em biorreator.

Figura 21 - Resumo dos experimentos realizados para determinação do perfil do coquetel de quitinases para produção de *N*-acetil-glicosamina.



Legenda: EP, enzimas com expressão precoce; ET, enzimas com expressão tardia; C1, Coquetel de quitinases obtido nas etapas iniciais do cultivo (24 h); C2, Coquetel de quitinases obtido nas etapas finais do cultivo (96 h).
FONTE: Cardozo, 2017

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Estudar e definir as condições de cultivo para produção de um coquetel de quitinases em biorreator por *A. caviae* CHZ306.

3.2.2 Objetivos específicos

- Selecionar um meio de cultivo para produção de um coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306, em *shaker*;
- Otimizar as condições de temperatura, pH e concentração de quitina para produção de um coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306, em *shaker*;
- Estudar a influência do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) sobre a produção de um coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306, em biorreator.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica e no Setor de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF-USP. Os experimentos e análises estatísticas foram realizados em colaboração com o doutorando Valker Feitosa.

3.3.1 Preparação do banco de trabalho

A. caviae CHZ306 foi semeada em placa de Petri contendo ágar mineral com quitina, como descrito no item 2.3.1. Cinco colônias bacterianas foram inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo mineral com 1% de quitina coloidal e incubados a 28 °C por 24 horas sob agitação constante a 180 rpm. Tubos Eppendorf de 1,7 mL contendo 1,0 mL da suspensão bacteriana com 20% de glicerol foram preparados e armazenados a -80 °C. A suspensão bacteriana foi utilizada como pré-inóculo nos ensaios de produção de quitinases em *shaker* e biorreator.

3.3.2 Meio de cultivo para produção de um coquetel de quitinases em *shaker* por *Aeromonas caviae* CHZ306

Doze meios de cultivo contendo diferentes fontes de nitrogênio (Tabela 8) foram avaliados. Os meios de cultivo tiveram como base o caldo mineral com quitina, preparado com a seguinte composição por litro: KH_2PO_4, 0,2 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4, 1,6 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 $g.L^{-1}$; NaCl, 0,1 $g.L^{-1}$; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$; $CaCl_2.2H_2O$, 0,02 $g.L^{-1}$; quitina coloidal, 10,0 $g.L^{-1}$, a concentração de nitrogênio foi fixada em 0,2 $g.L^{-1}$, e o pH inicial ajustado para 7,0.

As análises da composição elementar de carbono e nitrogênio foram realizadas pela a Central Analítica do IQ-USP. A técnica está relacionada à combustão da amostra a 925 ºC na presença de oxigênio puro e medição dos produtos a partir de mudanças na condutividade térmica. No caso dos compostos orgânicos, o carbono é convertido a dióxido de carbono e o nitrogênio a gás nitrogênio. Já para os substratos quimicamente definidos, as concentrações de C e N foram determinadas com base nas respectivas estruturas químicas e massas moleculares.

Tabela 8 - Características dos substratos utilizados como fonte de nitrogênio na preparação dos meios de cultivo para produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306.

Meio de Cultivo	Substrato	Marca	Informações Gerais	Principais Constituintes
M1	Sulfato de Amônio	Carlos Erba	Composto inorgânico raro na natureza e preparado por reação da amônia com o ácido sulfúrico.	Nitrogênio e enxofre
M2	Acetato de Amônio	Synth	Composto inorgânico geralmente produzido pela neutralização de ácido acético com carbonato de amônio.	Nitrogênio
M3	Nitrato de Amônio	Synth	Composto inorgânico geralmente produzido pela neutralização de ácido nítrico com hidróxido de amônio.	Nitrogênio
M4	Uréia	Synth	Composto orgânico nitrogenado sintetizado industrialmente por desidratação do carbamato de amônia.	Nitrogênio
M5	Casaminoácidos	BD	Produto da hidrólise ácida da caseína. O método de produção provoca a hidrólise quase completa da caseína, obtendo-se um produto com alto teor de aminoácidos e baixos teores de cloreto de sódio e ferro.	Aminoácidos
M6	Extrato de Carne	Acumedia	Extrato desidratado de carnes bovina. O método de produção não utiliza um processo enzimático ou químico, obtendo-se um produto com uma fonte indefinida de nutrientes.	Proteínas, aminoácidos, frações de nucleotídeos, ácidos orgânicos, vitaminas e minerais
M7	Extrato de Levedura	BD	Concentrado da porção solúvel das células autolisadas de *Saccharomyces cerevisiae*. O método de produção é cuidadosamente controlado para preservação das vitaminas do complexo B.	Peptídeos, aminoácidos, carboidratos e vitaminas
M8	Bacto Peptona	BD	Produto da hidrólise enzimática de proteína animal. O método de produção possibilita a obtenção de um produto com altos teores de peptona e aminoácidos e baixos teores de proteoses e fontes mais complexas de nitrogênio.	Peptona e aminoácidos
M9	Peptona A	Acumedia	Produto da hidrólise enzimática de proteína animal. O método de produção possibilita a obtenção de um produto com altos teores de peptona e aminoácidos e baixos teores de proteoses e fontes mais complexas de nitrogênio.	Peptona e aminoácidos
M10	Peptona G	Acumedia	Produto da hidrólise enzimática de gelatina. O método aplicado extrai a gelatina por ebulição do colágeno e obtem um produto com altos teores de prolina e baixos teores de carboidratos, cistina, metionina e triptofano após a hidrólise.	Peptídeos e aminoácidos
M11	*Corn Steep Liquor*	Sigma-Aldrich	Sub-produto do processamento industrial do milho obtido durante a etapa de moagem.	Proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas e minerais
M12	Tripitona	BD	Produto da hidrólise enzimática da caseína. O método de produção provoca a hidrólise incompleta da caseína, obtendo-se um produto com alguns oligopeptídeos e rico em triptofano.	Peptídeos e aminoácidos

FONTE: Cardozo, 2017.

As concentrações de carbono (C) e nitrogênio (N) assim como a relação C:N de cada meio de cultivo podem ser observadas na Tabela 9. Adicionalmente, a quitina coloidal também foi enviada para análise elementar e apresentou 44 % de carbono e 6% de nitrogênio.

Tabela 9 - Análise da composição elementar para carbono (C) e nitrogênio (N) e relação C:N dos substratos utilizados como fonte de nitrogênio na preparação dos meios de cultivo.

Meio de Cultivo	Fonte de Nitrogênio	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	Quantidade no Meio de Cultivo ($g.L^{-1}$)	Relação C:N (Meio de Cultivo)
M1	Sulfato de Amônio	0	21	1,00	0,7
M2	Acetato de Amônio	16	18	1,17	1,5
M3	Nitrato de Amônio	0	35	0,61	0,7
M4	Ureia	20	47	0,45	1,1
M5	Casaminoácidos	33	11	1,97	3,5
M6	Extrato de Carne	42	13	1,70	3,7
M7	Extrato de Levedura	39	11	1,94	3,9
M8	Bacto Peptona	43	15	1,42	3,3
M9	Peptona A	42	13	1,61	3,6
M10	Peptona G	44	16	1,32	3,2
M11	*Corn Steep Liquor*	38	8	2,81	5,2
M12	Tripitona	44	13	1,67	3,8
M13	*Corn Steep Liquor* e Peptona A (1:1)	40	10	1,40; 0,80	4,2
M14	*Corn Steep Liquor* e Peptona A (1:2)	40	11	0,94; 1,07	3,9
M15	*Corn Steep Liquor* e Peptona A (2:1)	40	9	1,87; 0,54	4,4

Nota: *Os valores de relação C:N final no meio de cultivo foram calculados de acordo com as fontes de carbono e nitrogênio (substratos + quitina coloidal) utilizadas para preparação dos meios de cultivo.
FONTE: Cardozo, 2017.

Para a realização dos ensaios, 1,0 mL da suspensão bacteriana (Item 3.3.1) foi inoculada em Erlenmeyer de 100 mL contendo 50 mL de caldo mineral com 1% de quitina coloidal e incubado a 28 °C sob agitação constante a 180 rpm. Após 24 horas, 1,0 mL deste pré-inóculo bacteriano (aprox. 5,0 x 10^5 UFC/mL) foi inoculado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo e incubado a 28 °C por 96 horas sob agitação constante a 180 rpm. Os cultivos foram realizados em duplicata e alíquotas de 500 µL foram coletadas nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas para avaliação do crescimento celular e atividade de endoquitinases e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases).

O crescimento celular foi quantificado no citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini* (Merck Millipore) após tratamento das amostras com o kit Guava® ViaCount® Assay (Merck Millipore), de acordo com as recomendações do fabricante. As atividades de endoquitinases e exoquitinases foram determinadas como descrito no item 2.3.4.3.

3.3.3 Determinação das condições de temperatura, pH e concentração de quitina para produção de um coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306

As variáveis temperatura, pH inicial e concentração de quitina foram avaliadas para otimização das condições de cultivo em *shaker* para produção de coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306.

Foram realizados dois planejamentos fatoriais completos do tipo 2^3 (BOX *et al.*, 1978), constituídos por três variáveis independentes, em três níveis e cinco repetições no ponto central; cada planejamento totalizou 13 experimentos. Foram utilizadas análises de variância (ANOVA) e gráficos de Pareto para identificar os fatores (ou variáveis independentes) que influenciaram significativamente a produção de quitinases. Adicionalmente, para confirmação das condições otimizadas, foi realizado um terceiro planejamento fatorial completo do tipo 3^2 (BOX; BEHNKEN, 1960), constituído por duas variáveis independentes, em três níveis e três repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos. Os três planejamentos experimentais contendo as variáveis com seus níveis tanto em valores reais como codificados podem ser observados na Tabela 10.

No primeiro planejamento, concentração de quitina coloidal (1, 2 e 3%), pH inicial (6,0, 7,0 e 8,0) e temperatura (22, 28 e 34 °C) foram as variáveis independentes avaliadas. No segundo planejamento, as variáveis independentes foram, concentração de quitina coloidal (3, 4 e 5%), pH inicial (8,0, 9,0 e 10,0) e temperatura (34, 38 e 42 °C). No terceiro planejamento, o pH inicial foi fixado em 8,0, e avaliaram-se a concentração de quitina coloidal (5, 6 e 7%) e a temperatura (32, 34 e 36 °C).

Para realização dos ensaios, 1,0 mL da suspensão bacteriana (Item 3.3.1) foi inoculado em Erlenmeyer de 100 mL contendo 50 mL do meio de cultivo definido segundo o item 3.3.2, e incubado a 28 °C por 24 horas sob agitação constante a 180 rpm. Após 24 horas, 1,0 mL deste pré-inóculo bacteriano (aprox. 5,0 x 10^5 UFC/mL) foi inoculado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do mesmo meio de cultivo, determinado segundo o item 3.3.2 e incubado por 96 horas sob agitação constante a 180 rpm. Os cultivos foram realizados em duplicata e alíquotas de 500 µL foram coletadas nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas para quantificação do crescimento celular e atividade de endoquitinases e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases).

A atividade de endoquitinases e exoquitinases foram as variáveis dependentes dos planejamentos fatoriais e foram determinadas de acordo como descrito no item 2.3.4.3. O crescimento celular foi monitorado e quantificado de acordo como descrito no item 3.3.2.

Tabela 10 - Variáveis e níveis (valores codificados e reais) utilizados nos planejamentos experimentais para otimização da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

	Fatores	Níveis em valores reais e codificados		
		Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
1° Planejamento Experimental (2^3)	Quitina (%)	1	2	3
	pH	6	7	8
	Temp. (°C)	22	28	34
2° Planejamento Experimental (2^3)	Quitina (%)	3	4	5
	pH	8	9	10
	Temp. (°C)	34	38	42
3° Planejamento Experimental (3^2)	Quitina (%)	5	6	7
	Temp. (°C)	32	34	36

FONTE: Cardozo, 2017.

3.3.4 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator.

Para obtenção da influência de diferentes coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio (k_La) na produção de quitinases em biorreator, foi realizado um quarto planejamento experimental, do tipo fatorial completo 3^2 (BOX-BEHNKEN, 1960). As velocidades de agitação (150, 250 e 350 rpm) e aeração (0,25, 1,00 e 1,75 vvm) foram as variáveis independentes estudadas para determinação das melhores condições de k_La para produção do coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306. O planejamento experimental contendo as variáveis com seus níveis tanto em valores codificados como reais podem ser observados na Tabela 11.

Para realização dos ensaios, 1,0 mL da suspensão bacteriana (Item 3.3.1) foi inoculado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 200 mL do meio de cultivo preparado com a seguinte composição por litro: Peptona A, 0,54 $g.L^{-1}$; *Corn-Steep Liquor*, 1,87 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4, 0,2 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4, 1,6 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 $g.L^{-1}$; NaCl, 0,1 $g.L^{-1}$; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$; $CaCl_2.2H_2O$, 0,02 $g.L^{-1}$; quitina coloidal, 50,0 $g.L^{-1}$, com pH inicial ajustado para 8,0, e incubado a 34 °C sob agitação constante a 180 rpm. Após 16 horas, os 200 mL deste pré-inóculo bacteriano (aprox. 5,0 x 10^5 $UFC.mL^{-1}$) foram vertidos assepticamente na dorna de 3 L do biorreator de bancada BioFlo 110 (New Brunswick, Edison, NJ, Estados Unidos), contendo 1,8 L do mesmo meio de cultivo. A dorna, contendo meio de cultivo, juntamente com os eletrodos de pH e oxigênio dissolvido (dO_2) foram previamente autoclavados à 121 ºC durante 20 minutos.

Alíquotas de 3,0 mL foram coletadas nos tempos 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 30 e 36 h para quantificação do crescimento celular e atividade de endoquitinases e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases).

A atividade de endoquitinases e exoquitinases foram as variáveis dependentes do estudo comparativo e foram determinadas de acordo como descrito no item 2.3.4.3. O crescimento celular foi monitorado e quantificado de acordo como descrito no item 3.3.2. O Oxigênio dissolvido (DO_2) e pH também foram parâmetros monitorados.

Tabela 11 - Variáveis e níveis (valores codificados e reais) utilizados no planejamento experimental para avaliação da influência do k_La na produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator de bancada BioFlo 110 (New Brunswick, Edison, NJ, Estados).

	Fatores	Variáveis com níveis em valores reais e codificados		
		Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
4° Planejamento Experimental	Velocidade de agitação (rpm)	150	250	350
	Velocidade de aeração (vvm)	0,25	1,00	1,75

FONTE: Cardozo, 2017.

O k_La foi calculado com base na velocidade de dissolução do oxigênio em meio aquoso em função das condições de agitação e aeração (OZBEK; GAVIK, 2001; YOUNG; COONEY, 1985). Para estas determinações utilizou-se uma sonda de oxigênio dissolvido (Mettler Toledo) tipo célula polarográfica. As medidas foram realizadas no biorreator Bioflo 110 contendo 1 L de água destilada, à 25 °C, em

determinadas condições de agitação (150, 250 e 350 rpm) e aeração (0,25, 1,0, 1,75 e 2,5 vvm). Inicialmente a concentração de oxigênio dissolvido no interior da dorna foi reduzida a 0% através de injeção de nitrogênio comprimido. Logo após, o biorreator foi rapidamente regulado para condições definidas de agitação e aeração, e então foi monitorada o aumento da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo. Nestas condições, o balanço de massa na fase líquida pode ser representado pela seguinte expressão:

$dC/dt = k_La.(C_S-C)$, com C S igual a concentração de oxigênio dissolvido na saturação (100%).

Em que:

C = Concentração de oxigênio dissolvido na água (%);

t = Tempo (h);

k_La = Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1});

Cs = Concentração de saturação do oxigênio dissolvido (%).

Integrando-se a equação acima e traçando-se a curva $\ln(C_S-C)$ em função do tempo têm-se que o módulo do coeficiente angular da reta (inclinação) k_La, para cada condição experimental. Os valores dos k_La estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) determinado no biorreator de bancada Bioflo 110 durante o estudo de produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306.

Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	K_La (h^{-1})
150	0,25	8
	1,00	17
	1,75	35
250	0,25	17
	1,00	45
	1,75	55
	2,50	71
350	0,25	28
	1,00	70
	1,75	96

FONTE: Cardozo, 2017.

3.4 RESULTADOS

A determinação das condições de cultivo para produção de um coquetel de quitinases em biorreator por *A. caviae* CHZ306 foi realizada em três etapas: (1) seleção do meio de cultivo, (2) otimização das condições de temperatura, pH e concentração de quitina em *shaker* e (3) determinação das velocidades de agitação e aeração em biorreator.

Os resultados de cada etapa estão apresentados individualmente nos próximos itens e, de um modo geral, pode-se observar que as condições determinadas após avaliação dessas três etapas (Tabela 13) possibilitaram a diminuição do tempo de obtenção do coquetel de quitinases de 96 para 12 horas e proporcionaram produtividades de 4,8, 5,5 e 14,5 $U.L^{-1}.h^{-1}$ de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases, respectivamente (Tabela 14). O perfil das melhores condições de produção de quitinases determinadas em cada etapa, bem como o crescimento celular de *A. caviae* CHZ306 ao longo do tempo podem ser observados na Figura 22.

Tabela 13 - Comparação entre as condições iniciais e as determinadas após avaliação das condições de cultivo para produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator.

	Condições Iniciais	**Condições Determinadas**
Composição do Meio de Cultivo	$(NH_4)_2SO_4$, 1,0 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4, 0,2 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4, 1,6 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 $g.L^{-1}$; NaCl, 0,1 $g.L^{-1}$; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$; $CaCl_2.2H_2O$, 0,02 $g.L^{-1}$; Quitina Colidal, 10,0 $g.L^{-1}$	Peptona A, 0,54 $g.L^{-1}$; *Corn-Steep Liquor*, 1,87 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4, 0,2 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4, 1,6 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 $g.L^{-1}$; NaCl, 0,1 $g.L^{-1}$; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$; $CaCl_2.2H_2O$, 0,02 $g.L^{-1}$; Quitina Colidal, 50,0 $g.L^{-1}$
Fonte Primária de Carbono	Quitina Coloidal	Quitina Coloidal
Fonte Secundária de Carbono	-	*Corn-Steep Liquor* e Peptona A
Fonte de Nitrogênio	$(NH_4)_2SO_4$	*Corn-Steep Liquor* e Peptona A
Quitina Coloidal (%)	1,0	5,0
Relação C:N	0,7	5,2
pH	7,0	8,0
Temperatura (°C)	28,0	34,0
k_La (h^{-1})	-	55,2
Agitação (rpm)	180	250
Aeração (vvm)	-	1,75
Tempo de Cultivo (h)	96	12
Tipo de Cultivo	*Shaker*	Biorreator

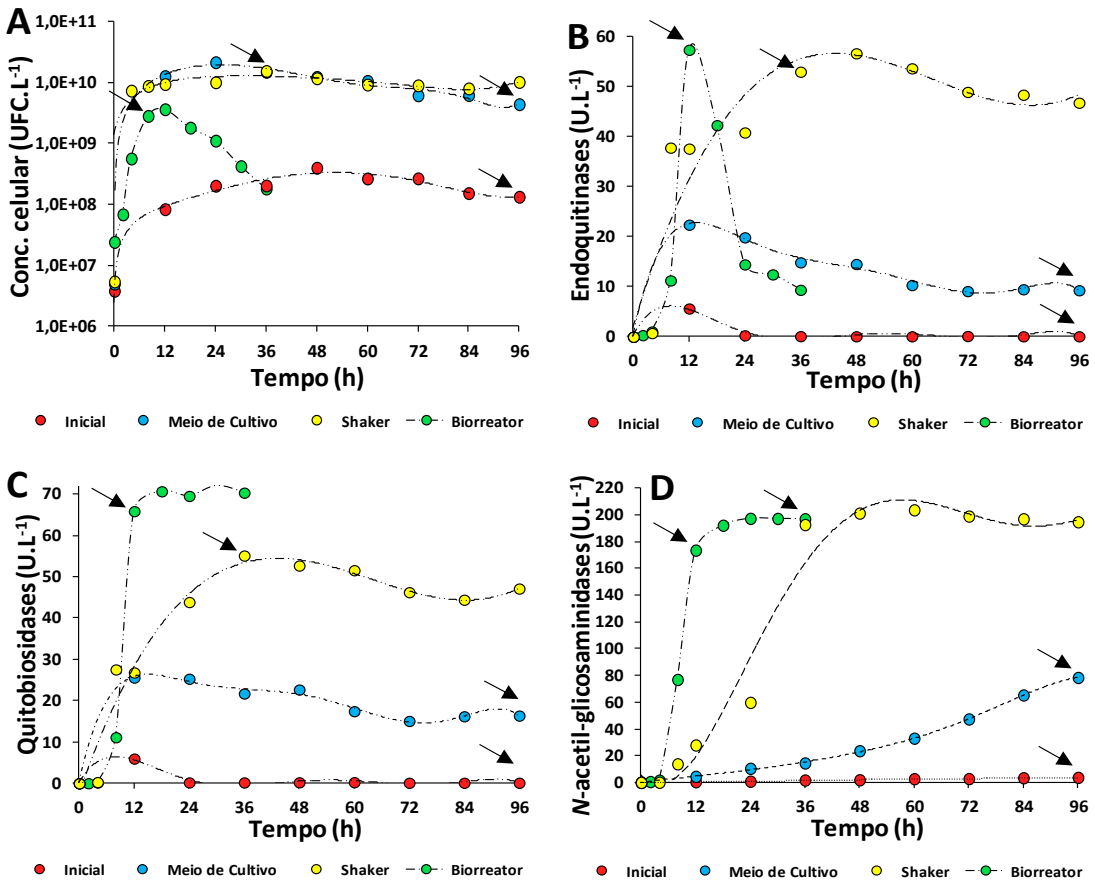
FONTE: Cardozo, 2017

Tabela 14 - Comparação da produtividade de endoquitinases, quitobiosidases e N-acetil-glicosaminidases entre as etapas de avaliação das condições de cultivo para produção do coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306.

Etapa de Avaliação	Condições de Cultivo							Produção de Quitinases ($U.L^{-1}$)			Produtividade ($U.L^{-1}.h^{-1}$)		
	Quitina (%)	pH	Temp. (°C)	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	K_La	Coquetel (h)	Q1	Q2	Q3	Q1	Q2	Q3
Inicial	1	7	28	180	-	-	96	0,1	0,1	3,7	0,001	0,001	0,039
Meio de Cultivo	1	7	28	180	-	-	96	9,3	16,4	78,3	0,097	0,171	0,816
Shaker	5	8	34	180	-	-	36	53,1	55,1	192,5	1,475	1,531	5,347
Biorreator	5	8	34	250	1,75	55	12	57,5	65,9	173,4	4,792	5,492	14,450

Legenda: Inicial, condições iniciais de cultivo para produção de quitinases; Meio de Cultivo, condições determinadas na etapa de padronização do meio de cultivo; Shaker, condições determinadas na etapa de avaliação das condições de temperatura pH e concentração de quitina em *shaker*; Biorreator, condições determinadas na etapa de determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa) em biorreator.Q1, endoquitinases; Q2, quitobiosidases e; Q3, *N*-acetil-glicosaminidases.
FONTE: Cardozo, 2017

Figura 22 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e N-acetil-glicosaminidases (D) entre as etapas de avaliação das condições de cultivo para produção do coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306.



Legenda: Inicial, condições iniciais de cultivo para produção de quitinases; Meio de Cultivo, condições determinadas na etapa de padronização do meio de cultivo; Shaker, condições determinadas na etapa de avaliação das condições de temperatura pH e concentração de quitina em *shaker*; Biorreator, condições determinadas na etapa de determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa) em biorreator. As flechas indicam o tempo considerado para obtenção do coquetel de quitinases, segundo as etapas avaliadas.
FONTE: Cardozo, 2017.

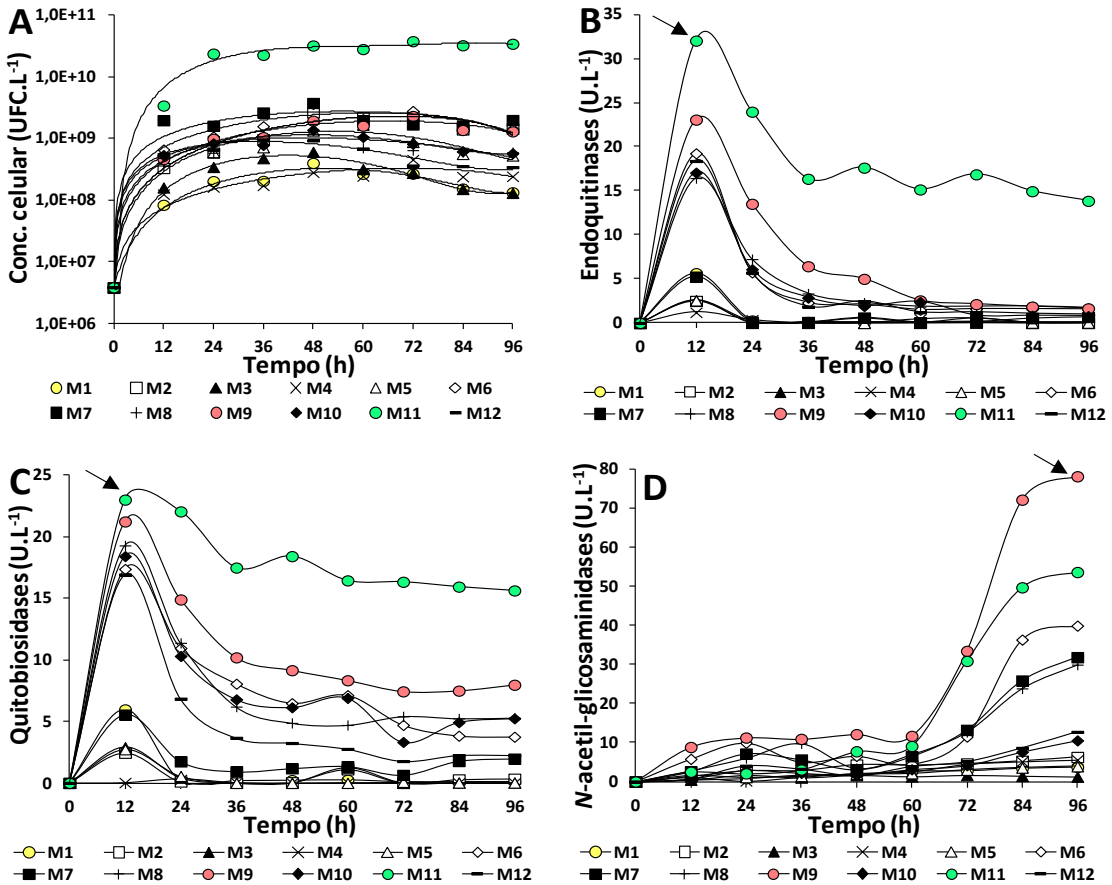
3.4.1 Seleção do meio de cultivo para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

A primeira etapa do estudo de produção de quitinases foi a seleção de um meio de cultivo que possibilitasse a obtenção de altas concentrações dos três tipos de quitinases (endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) por *A. caviae* CHZ306. O meio previamente utilizado (M1), contendo 1,0 $g.L^{-1}$ de sulfato de amônio,

que fornece 0,2 g.L^{-1} de nitrogênio, foi comparado com outros 11 meios de cultivo preparados com fontes de nitrogênio como substrato.

De maneira geral, observou-se que todos os meios de cultivo proporcionaram o crescimento celular e a produção dos três tipos de quitinases ao longo do tempo (Figura 23). A maior produção de endoquitinases e quitobiosidases ocorreu nas primeiras 12 h de cultivo, diminuindo ao longo do tempo. Por outro lado, foi observado maior produção de *N*-acetil-glicosaminidases após 96 h de cultivo. O crescimento celular variou de 10^8 UFC.mL^{-1} e 10^{10} UFC.mL^{-1} entre os meios de cultivo.

Figura 23 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e N-acetil-glicosaminidases (D) durante a seleção de um meio de cultivo para produção de quitinases por *A. caviae* CHZ306.



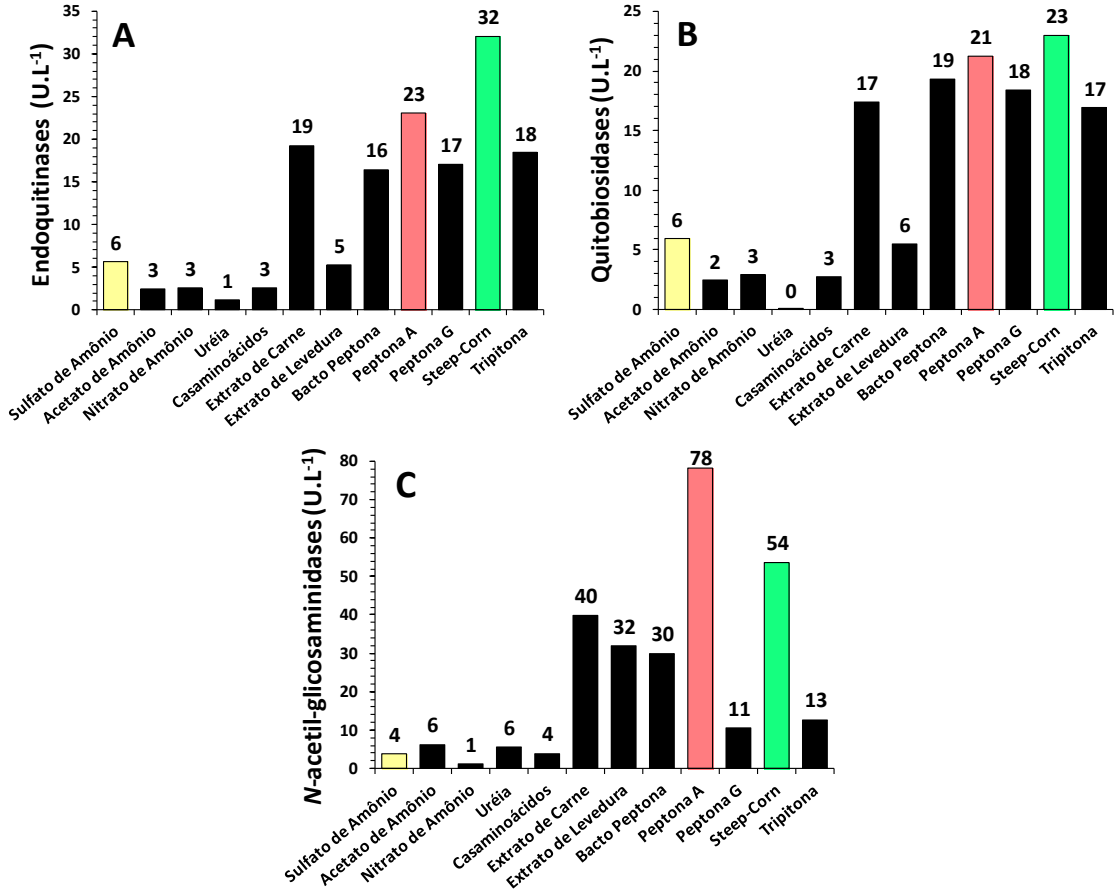
Legenda: As séries de dados destacadas em amarelo representam a produção de quitinases obtidas com o meio de cultivo previamente utilizado no estudo (M1). As destacadas em verde (M11) e vermelho (M9) representam as melhores condições para produção de quitinases.
FONTE: Cardozo, 2017.

Observou-se que a produção de quitinases com o meio previamente utilizado no estudo (M1) esteve entre as mais baixas. A produção de endoquitinases e quitobiosidases foi de apenas 6 $U.L^{-1}$ (12 h de cultivo) e 4 $U.L^{-1}$ de *N*-acetil-glicosaminidases (96 h). Para obtenção de um coquetel com quantidades adequadas de quitinases para produção de *N*-acetil-glicosamina, seriam necessárias 96 h utilizando esse meio de cultivo e, com uma baixa produção de 0,1 $U.L^{-1}$ (endoquitinases e quitobiosidases) e 3,7 $U.L^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases) (Tabela 8). Assim, a avaliação de outros meios de cultivo, compostos por diferentes fontes de nitrogênio, foi importante para o aumento da produção dos três tipos de quitinases.

Maior produção de quitinases foi obtida com os meios de cultivo M11 (*Corn-Steep Liquor*) e M9 (Peptona A). No tempo de produção máxima de cada tipo de quitinase (Figura 24) e em comparação com o meio M1, o meio M11 possibilitou ao maior aumento da produção de endoquitinases (6 para 32 $U.L^{-1}$) e quitobiosidases (6 para 23 $U.L^{-1}$) e ao segundo maior aumento da produção de *N*-acetil-glicosaminidases (4 para 54 $U.L^{-1}$). Já o meio M9, possibilitou ao segundo maior aumento da produção de endoquitinases (6 para 23 $U.L^{-1}$) e quitobiosidases (6 para 21 $U.L^{-1}$) e ao maior aumento da produção de *N*-acetil-glicosaminidases (4 para 78 $U.L^{-1}$).

Com relação ao crescimento bacteriano, o meio M11 foi aquele que proporcionou maior concentração celular, com médias de aproximadamente 10^{10} $UFC.mL^{-1}$ ao longo das 96 h de cultivo, seguido de 10^{9} $UFC.mL^{-1}$ no meio de cultivo M9.

Figura 24 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 utilizando meios de cultivos preparados com diferentes fontes de nitrogênio.



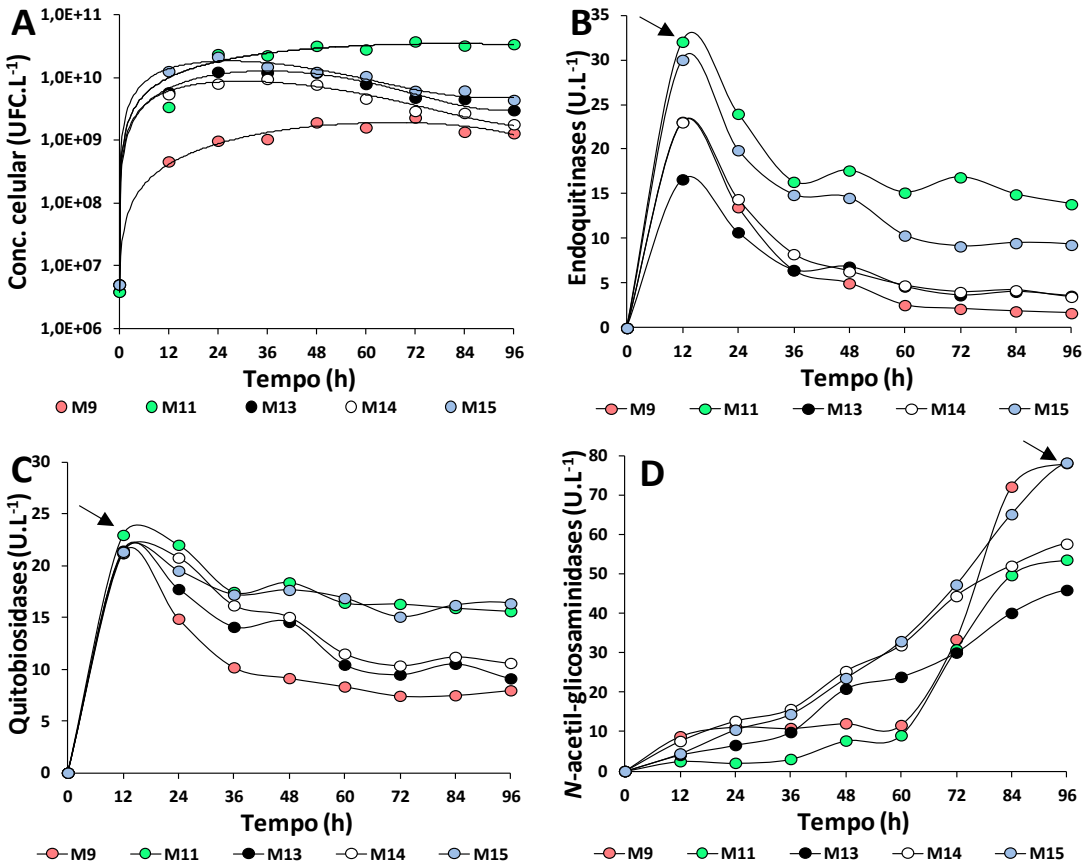
Legenda: As séries de dados destacadas em amarelo representam a produção de quitinases obtidas com o meio de cultivo previamente utilizado no estudo (M1). As destacadas em verde (M11) e vermelho (M9) representam as melhores condições para produção de quitinases. (A) Atividade de endoquitinases no tempo de produção máxima (12 h); (B) Atividade de quitobiosidases no tempo de produção máxima (12 h) e; (C) Atividade de *N*-acetil-glicosaminidases no tempo de produção máxima (96 h)
FONTE: Cardozo, 2017.

Uma vez que os meios de cultivo M11 (*Corn Steep Liquor*) e M9 (Peptona A) proporcionaram maior produção de quitinases por *A. caviae* CHZ306, avaliou-se também a combinação dessas duas fontes de nitrogênio na produção de quitinases. Para isso, três meios de cultivo (M13, M14 e M15) com diferentes proporções de *Corn-Steep Liquor* e Peptona A (1:1, 1:2 e 2:1) foram preparados e avaliados durante 96 h de cultivo.

De acordo com os resultados observados (Figura 25 e Tabela 8), não foi observado incremento na produção de endoquitinases e quitobiosidases às 12 h e de *N*-acetil-glicosaminidases após 96 h de cultivo. Por outro lado, observou-se que a interação dessas duas fontes de nitrogênio fez com que a produção de *N*-acetil-

glicosaminidases aumentasse a partir das 36 h de cultivo, enquanto que para os meios de cultivo M11 e M9, a produção era observada somente a partir das 60 h de cultivo. Enquanto a produção de *N*-acetil-glicosaminidases nos meios M11 e M9 foi aproximadamente 10 $U.L^{-1}$, a produção nos meios M13, M14 e M15 aumentou para 24, 32 e 33 $U.L^{-1}$, respectivamente, às 60 h de cultivo.

Figura 25 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D) por *Aeromonas caviae* CHZ306 em meios de cultivo com diferentes proporções de *Corn-Steep Liquor* e Peptona A.



Legenda: As séries de dados destacadas em verde (M11) e vermelho (M9) representam a maior produção de quitinases da etapa anterior. As destacadas em azul (M15) representam a produção obtida com o meio de cultivo selecionado para os estudos de produção de quitinases em *shaker* e biorreator. As flechas indicam o tempo de produção máxima de cada tipo de quitinase.
FONTE: Cardozo, 2017.

Com esses resultados, selecionamos o meio M15 [*Corn-Steep Liquor* + Peptona A (2:1)] para os estudos de produção de quitinases em *shaker* e biorreator. Esse meio de cultivo foi selecionado por ser aquele que apresentou maior produção dos três tipos de quitinases e que proporcionou o aumento da produção de *N*-acetil-glicosaminidases a

partir das 36 h de cultivo. Por mais que para obtenção do coquetel de quitinases utilizando esse meio de cultivo também seriam necessárias 96 h, a produção nesse tempo foi superior àquelas observada no meio M1, atingindo 9,3 $U.L^{-1}$ (endoquitinases), 16,4 $U.L^{-1}$ (quitobiosidases) e 78,3 $U.L^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases) (Tabela 15).

A composição por litro do meio M15 foi a seguinte: Peptona A, 0,54 $g.L^{-1}$; *Corn Steep Liquor*, 1,87 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4, 0,2 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4, 1,6 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 $g.L^{-1}$; NaCl, 0,1 $g.L^{-1}$; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$; $CaCl_2.2H_2O$, 0,02 $g.L^{-1}$; quitina coloidal, 10,0 $g.L^{-1}$, pH 7,0.

Tabela 15 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 quando cultivadas em meios de cultivo compostos por diferentes fontes de nitrogênio.

	Experimento	Meio de Cultivo	Atividade de Quitinases ($U.L^{-1}$)								
			Tempo de Cultivo (h)								
			0	12	24	36	48	60	72	84	96
Endoquitinases	M1	Sulfato de Amônio	0,0	5,7	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	M2	Acetato de Amônio	0,0	2,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0
	M3	Nitrato de Amônio	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	M4	Uréia	0,0	1,2	0,4	0,0	0,0	0,5	0,5	0,1	0,0
	M5	Casaminoácidos	0,0	2,6	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0
	M6	Extrato de Carne	0,0	19,3	5,7	2,3	2,1	1,5	1,6	1,6	1,5
	M7	Extrato de Levedura	0,0	5,3	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1	0,5	0,7
	M8	Bacto Peptona	0,0	16,5	7,3	3,3	2,3	1,9	1,9	1,9	1,7
	M9	Peptona A	0,0	23,1	13,5	6,4	5,0	2,6	2,1	1,9	1,7
	M10	Peptona G	0,0	17,1	6,1	2,9	1,9	2,4	0,8	0,8	0,8
	M11	Steep-corn	0,0	32,1	24,0	16,4	17,6	15,2	16,9	15,0	13,9
	M12	Tripitona	0,0	18,4	5,7	1,9	2,4	1,2	1,2	1,0	1,0
	M13	*Corn Steep Liquor* + Peptona A (1:1)	0,0	16,7	10,7	6,5	6,9	4,6	3,7	4,1	3,6
	M14	*Corn Steep Liquor* + Peptona A (1:2)	0,0	23,0	14,4	8,3	6,3	4,8	4,0	4,2	3,5
	M15	*Corn Steep Liquor* + Peptona A (2:1)	0,0	30,1	19,9	14,9	14,6	10,4	9,1	9,5	9,3
Quitobiosidase	M1	Sulfato de Amônio	0,0	6,0	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1
	M2	Acetato de Amônio	0,0	2,4	0,1	0,0	0,1	1,1	0,0	0,3	0,3
	M3	Nitrato de Amônio	0,0	2,9	0,4	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0
	M4	Uréia	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	M5	Casaminoácidos	0,0	2,7	0,6	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
	M6	Extrato de Carne	0,0	21,0	10,9	8,0	6,5	7,1	4,7	7,7	8,0
	M7	Extrato de Levedura	0,0	5,5	1,7	0,9	1,2	1,4	0,6	1,8	2,0
	M8	Bacto Peptona	0,0	19,3	11,4	6,2	4,9	4,7	5,4	5,2	5,3
	M9	Peptona A	0,0	21,2	14,9	10,2	9,1	8,3	7,4	7,5	8,0
	M10	Peptona G	0,0	18,4	10,3	6,8	6,1	6,9	3,3	4,9	5,2
	M11	Steep-corn	0,0	23,0	22,0	17,5	18,4	16,4	16,3	15,9	15,6
	M12	Tripitona	0,0	16,9	6,8	3,7	3,2	2,8	1,8	2,3	2,3
	M13	*Corn Steep Liquor* + Peptona A (1:1)	0,0	21,5	17,8	14,1	14,6	10,4	9,5	10,5	9,1
	M14	*Corn Steep Liquor* + Peptona A (1:2)	0,0	21,2	20,8	16,2	15,1	11,5	10,4	11,2	10,6
	M15	*Corn Steep Liquor* + Peptona A (2:1)	0,0	21,4	19,5	17,2	17,7	16,9	15,1	16,2	16,4
N-Acetil-Glicosaminidase	M1	Sulfato de Amônio	0,0	0,5	0,8	1,7	1,9	2,7	2,8	3,4	3,7
	M2	Acetato de Amônio	0,0	1,4	2,8	2,9	4,3	4,2	4,6	5,3	6,3
	M3	Nitrato de Amônio	0,0	0,5	1,6	1,0	1,6	1,3	1,6	1,4	1,2
	M4	Uréia	0,0	1,1	0,2	1,2	2,1	2,6	4,5	5,1	5,6
	M5	Casaminoácidos	0,0	1,6	1,1	1,4	2,0	2,1	3,0	3,6	3,9
	M6	Extrato de Carne	0,0	5,8	9,9	5,0	6,6	4,5	11,5	36,4	39,9
	M7	Extrato de Levedura	0,0	2,6	7,1	5,6	3,1	6,5	13,2	25,9	31,9
	M8	Bacto Peptona	0,0	2,8	6,0	9,8	3,4	7,0	12,7	23,9	29,9
	M9	Peptona A	0,0	8,8	11,3	10,9	12,1	11,7	33,5	72,2	78,2
	M10	Peptona G	0,0	0,7	2,9	2,2	1,7	3,1	4,2	7,6	10,5
	M11	Steep-corn	0,0	2,5	2,1	3,1	7,7	9,1	30,9	49,7	53,7
	M12	Tripitona	0,0	0,7	4,1	3,2	1,6	3,9	5,1	8,6	12,7
	M13	*Corn Steep Liquor* + Peptona A (1:1)	0,0	4,1	6,6	9,9	20,9	23,9	30,1	40,2	46,0
	M14	*Corn Steep Liquor* + Peptona A (1:2)	0,0	7,6	12,7	15,7	25,4	31,9	44,4	52,1	57,7
	M15	*Corn Steep Liquor* + Peptona A (2:1)	0,0	4,5	10,5	14,5	23,6	33,0	47,3	65,2	78,3

FONTE: Cardozo, 2017.

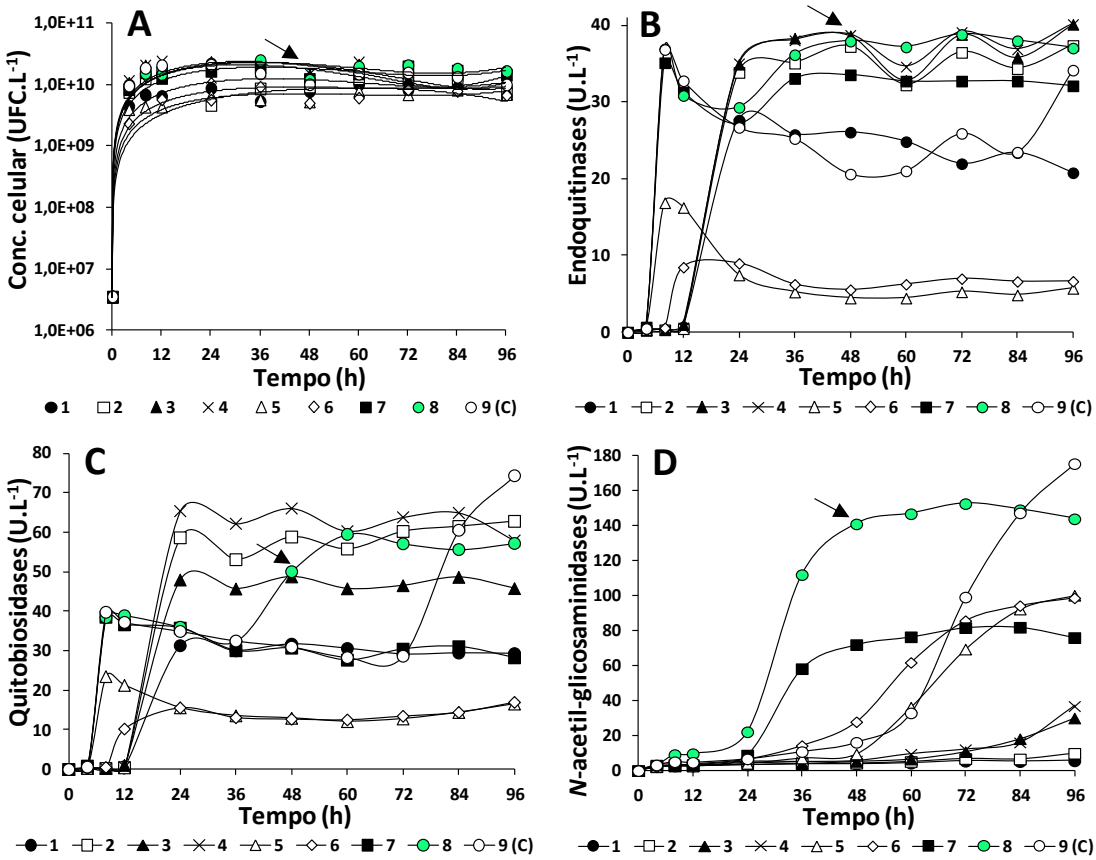
3.4.2 Condições de temperatura, pH e concentração de quitina para produção de um coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306

Três planejamentos experimentais, avaliando três variáveis (concentração de quitina coloidal, pH inicial e temperatura), foram realizados para determinar as melhores condições de cultivo para produção de um coquetel de quitinases em *shaker* por *A. caviae* CHZ306.

3.4.2.1 Avaliação do primeiro planejamento experimental aplicado para produção de um coquetel de quitinases em shaker

De acordo com os resultados obtidos com o primeiro planejamento experimental, do tipo fatorial completo 2^3 (Figura 26 e Tabela 16), *A. caviae* CHZ306 foi capaz de produzir os três tipos de quitinases em todas as condições de temperatura (22, 28 e 34 °C), concentração de quitina (1, 2 e 3%) e pH (6, 7 e 8) avaliadas. O crescimento celular não foi afetado por nenhuma dessas condições e, o experimento n° 8, foi aquele que mostrou o melhor perfil de produção para o coquetel de quitinases de interesse. Em comparação com as condições utilizadas na etapa de seleção do meio de cultivo (concentração de quitina, 1%; pH inical, 7,0; e temperatura 28 °C), as condições desse experimento (concentração de quitina, 3%; pH inicial, 8,0; e temperatura 34 °C) reduziram o tempo de produção de 96 para 48 horas e, atingiram atividades de 38,0 $U.L^{-1}$ (endoquitinases), 50,1 $U.L^{-1}$ (quitobiosidases) e 141,1 $U.L^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases) (Tabela 16). As produtividades obtidas nessas condições foram 0,8 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (endoquitinases), 1,0 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (quitobiosidases) e 2,9 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases).

Figura 26 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D), em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de quitina, aplicadas no primeiro planejamento experimental para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.



Legenda: As séries de dados destacadas em verde representam o experimento que apresentou o perfil de produção de quitinases mais próximo do esperado para o coquetel de quitinases. As flechas indicam o tempo considerado para obtenção do coquetel de quitinases, segundo a condição selecionada.
FONTE: Cardozo, 2017.

Tabela 16 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 durante avaliação do primeiro planejamento experimental em *shaker*.

		Experimento	Variáveis com níveis em valores reais e codificados			Atividade de Quitinases ($U.L^{-1}$)										
			Quitina (%)	pH	Temp. (°C)	Tempo de cultivo (h)										
						0	4	8	12	24	36	48	60	72	84	96
1° Planejamento Experimental	Endoquitinases	1	1 (-1)	6 (-1)	22 (-1)	0,0	0,4	0,4	0,7	27,7	25,8	26,1	24,8	22,0	23,4	20,8
		2	3 (+1)	6 (-1)	22 (-1)	0,0	0,3	0,3	0,5	33,9	35,1	37,3	32,2	36,5	34,4	37,4
		3	1 (-1)	8 (+1)	22 (-1)	0,0	0,3	0,4	1,0	34,9	38,4	38,7	32,9	38,8	35,8	40,2
		4	3 (+1)	8 (+1)	22 (-1)	0,0	0,3	0,3	0,6	35,1	38,1	38,8	34,6	39,1	36,9	40,2
		5	1 (-1)	6 (-1)	34 (+1)	0,0	0,3	16,9	16,3	7,5	5,2	4,4	4,4	5,3	4,9	5,7
		6	3 (+1)	6 (-1)	34 (+1)	0,0	0,3	0,6	8,5	9,0	6,2	5,5	6,2	7,0	6,6	6,6
		7	1 (-1)	8 (+1)	34 (+1)	0,0	0,7	35,1	31,3	27,2	33,1	33,6	32,8	32,8	32,8	32,1
		8	**3 (+1)**	**8 (+1)**	**34 (+1)**	**0,0**	**0,5**	**29,9**	**30,9**	**29,3**	**36,2**	**38,0**	**37,2**	**38,8**	**38,0**	**37,1**
		9 (C)	2 (0)	7 (0)	28 (0)	0,0	0,5	36,9	32,8	26,7	25,3	20,6	21,0	25,9	23,5	34,2
	Quitobiosidases	1	1 (-1)	6 (-1)	22 (-1)	0,0	0,4	0,3	0,7	31,3	30,1	31,7	30,6	29,2	29,5	29,3
		2	3 (+1)	6 (-1)	22 (-1)	0,0	0,3	0,3	0,4	58,7	53,1	58,9	55,8	60,3	61,5	62,8
		3	1 (-1)	8 (+1)	22 (-1)	0,0	0,3	0,3	1,0	48,0	45,7	48,8	45,8	46,5	48,6	45,8
		4	3 (+1)	8 (+1)	22 (-1)	0,0	0,3	0,2	0,6	65,4	62,2	66,1	60,3	63,8	65,0	58,0
		5	1 (-1)	6 (-1)	34 (+1)	0,0	0,3	23,5	21,3	15,6	13,6	13,0	12,1	12,8	14,4	16,6
		6	3 (+1)	6 (-1)	34 (+1)	0,0	0,3	0,5	10,2	15,6	13,1	12,7	12,5	13,5	14,4	17,0
		7	1 (-1)	8 (+1)	34 (+1)	0,0	0,9	38,5	36,6	35,8	30,1	30,7	27,7	30,5	31,1	28,3
		8	**3 (+1)**	**8 (+1)**	**34 (+1)**	**0,0**	**0,5**	**38,5**	**38,9**	**36,0**	**32,4**	**50,1**	**59,5**	**57,1**	**55,7**	**57,2**
		9 (C)	2 (0)	7 (0)	28 (0)	0,0	0,6	39,8	37,2	35,0	32,5	31,0	28,3	28,7	60,6	74,4
	N-Acetil-Glicosaminidases	1	1 (-1)	6 (-1)	22 (-1)	0,0	2,3	2,6	2,6	3,2	3,7	3,7	4,2	5,3	5,1	5,6
		2	3 (+1)	6 (-1)	22 (-1)	0,0	2,4	2,6	2,7	4,6	4,1	4,2	5,2	6,9	6,7	9,9
		3	1 (-1)	8 (+1)	22 (-1)	0,0	2,4	2,8	3,0	3,4	4,0	5,3	6,6	10,8	18,2	30,1
		4	3 (+1)	8 (+1)	22 (-1)	0,0	2,4	2,6	3,2	5,3	5,1	5,7	9,6	12,2	16,1	36,9
		5	1 (-1)	6 (-1)	34 (+1)	0,0	2,2	3,2	2,7	4,1	7,2	9,5	36,3	69,5	92,4	100,3
		6	3 (+1)	6 (-1)	34 (+1)	0,0	2,1	3,0	3,8	6,6	14,4	27,9	61,9	85,8	94,3	98,8
		7	1 (-1)	8 (+1)	34 (+1)	0,0	3,2	3,5	3,4	8,9	58,3	72,1	76,5	81,8	82,0	76,1
		8	**3 (+1)**	**8 (+1)**	**34 (+1)**	**0,0**	**3,1**	**9,2**	**9,7**	**22,2**	**112,1**	**141,1**	**146,9**	**152,7**	**149,2**	**144,0**
		9 (C)	2 (0)	7 (0)	28 (0)	0,0	3,2	5,1	4,8	6,7	10,9	16,2	33,0	99,3	147,4	175,6

Nota: Os valores destacados em vermelho representam as condições que apresentaram os melhores resultados.
FONTE: Cardozo, 2017

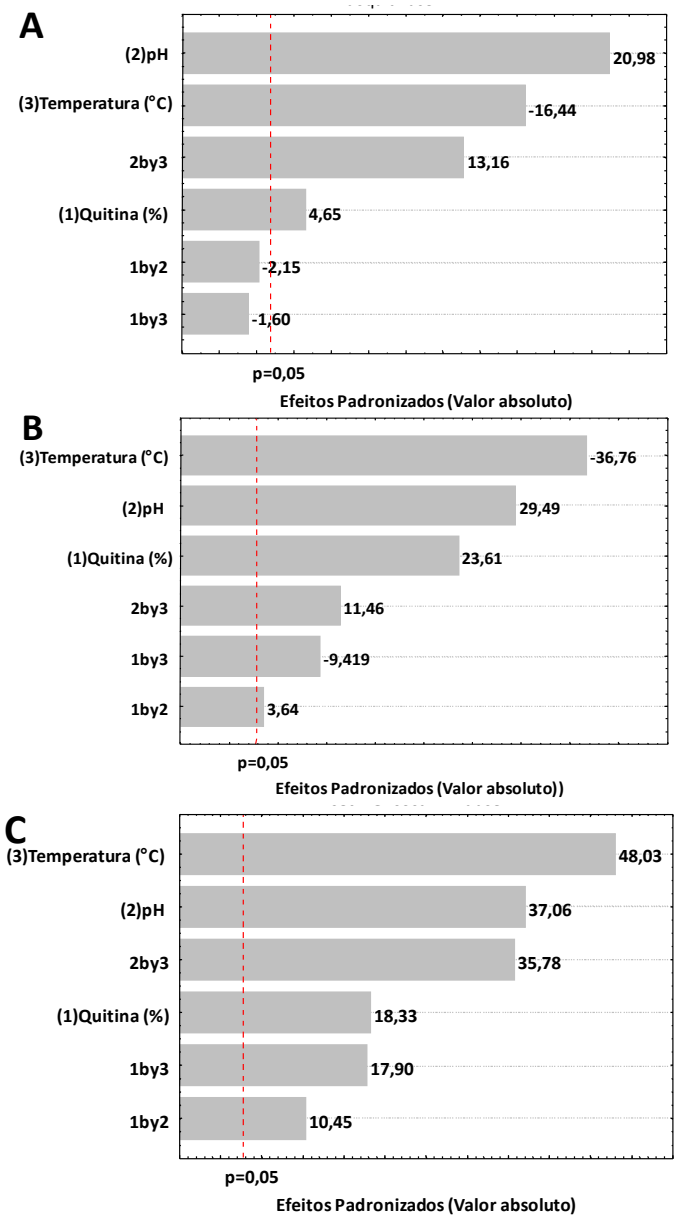
Análises de variância (*ANOVA*) (Tabela 17) e diagramas de Pareto (Figura 27) foram utilizados para identificar as variáveis mais significativas nesse experimento e, de modo geral, todas as variáveis foram significativas para as respostas produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases. As variáveis pH inicial e concentração de quitina foram aquelas que produziram efeitos significativos positivos para todas as respostas, o que significa que o aumento destes parâmetros poderia melhorar os resultados. Assim, um segundo planejamento experimental, utilizando valores maiores de pH inical (8, 9 10) e concentração de quitina (3, 4 e 5%) foi realizado. A variável temperatura produziu efeitos significativos negativos para as respostas endoquitinases e quitobiosidases, sugerindo diminuição da temperatura. No entanto, como o estudo teve como objetivo produzir um coquetel de quitinases com altas concentrações de *N*-acetil-glicosaminidases, optou-se por avaliar valores maiores de temperatura (34, 38 e 42 °C) no segundo planejamento experimental, pois essa variável produziu efeitos positivos (Figura 27) para a resposta *N*-acetil-glicosaminidases.

Tabela 17 - Análises de variância (ANOVA) para produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases, de acordo com o primeiro planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

	Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	P-valor	Efeito Produzido
Endoquitinases	Quitina (%) (1)	35,153	1	35,1534	21,6595	0,009633	+
	pH (2)	715,046	1	715,0455	440,5698	0,000030	+
	Temperatura (°C) (3)	438,927	1	438,9266	270,4412	0,000080	-
	Interação (1) e (2)	7,539	1	7,5386	4,6449	0,097412	NS
	Interação (1) e (3)	4,200	1	4,1996	2,5876	0,182989	NS
	Interação (2) e (3)	281,313	1	281,3133	173,3290	0,000192	+
	Falta de Ajuste	183,522	2	91,7612	56,5379	0,001167	
	Erro Puro	6,492	4	1,6230			
	Total	1672,192	12				
Quitobiosidases	Quitina (%) (1)	505,019	1	505,019	557,738	0,000019	+
	pH (2)	787,556	1	787,556	869,769	0,000008	+
	Temperatura (°C) (3)	1224,108	1	1224,108	1351,894	0,000003	-
	Interação (1) e (2)	12,054	1	12,054	13,312	0,021799	+
	Interação (1) e (3)	80,339	1	80,339	88,725	0,000708	-
	Interação (2) e (3)	119,094	1	119,094	131,526	0,000330	+
	Falta de Ajuste	305,486	2	152,743	168,688	0,000137	
	Erro Puro	3,622	4	0,905			
	Total	3037,277	12				
N-acetil-glicosaminidases	Quitina (%) (1)	978,23	1	978,228	336,280	0,000052	+
	pH (2)	3995,49	1	3995,486	1373,504	0,000003	+
	Temperatura (°C) (3)	6712,86	1	6712,864	2307,640	0,000001	+
	Interação (1) e (2)	317,80	1	317,798	109,247	0,000473	+
	Interação (1) e (3)	932,72	1	932,721	320,636	0,000057	+
	Interação (2) e (3)	3726,03	1	3726,026	1280,873	0,000004	+
	Falta de Ajuste	1262,75	2	631,377	217,045	0,000083	
	Erro Puro	11,64	4	2,909			
	Total	17937,51	12				

Legenda: As análises de variância foram realizadas no tempo considerado como o melhor para obtenção do coquetel de quitinases (48 h). As variáveis com valores destacados em vermelho foram aquelas que apresentaram diferenças significativas. Os valores da falta de ajuste destacados em vermelho mostram que o modelo não está adequado. NS, não significante.
FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 27 - Diagramas de Pareto para os efeitos das variáveis temperatura, pH e concentração de quitina na produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e N-acetil-glicosaminidases (C), de acordo com o primeiro planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.



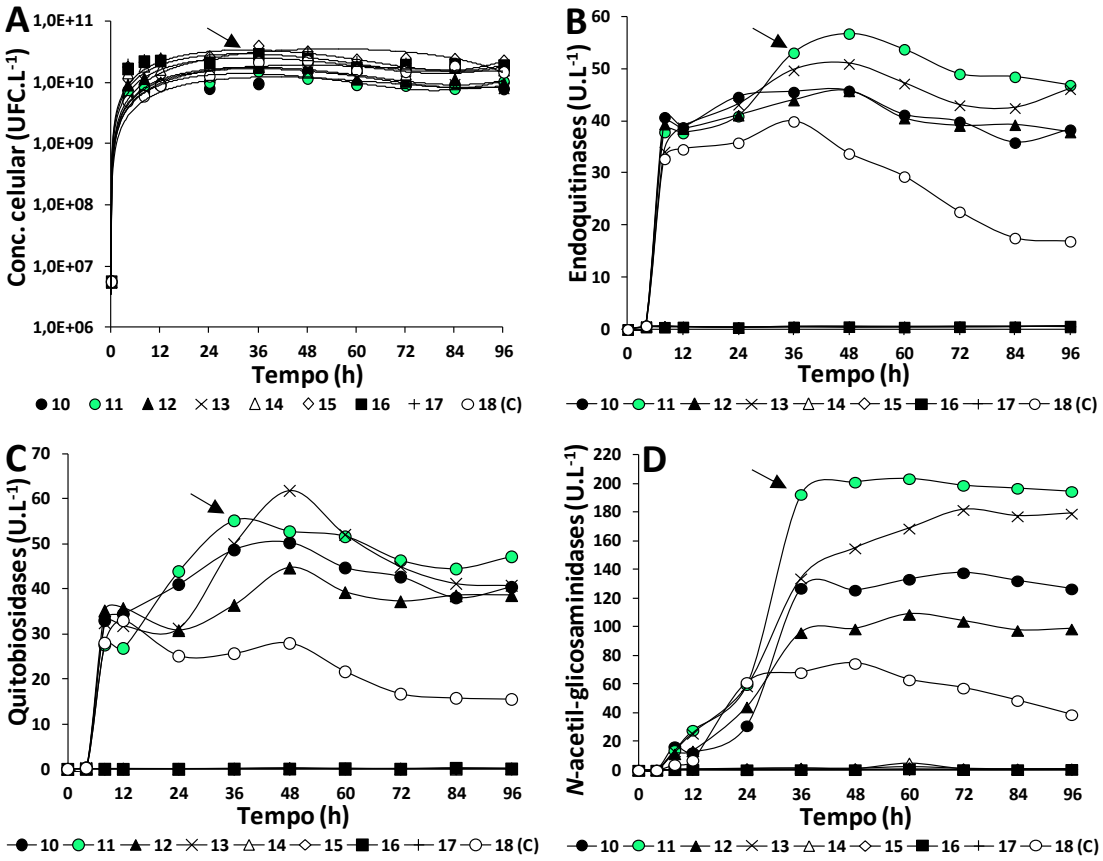
Nota: Os efeitos demonstrados nos diagramas de Pareto estão relacionados ao tempo considerado como o melhor para obtenção do coquetel de quitinases (48 h).
FONTE: Cardozo, 2017.

3.4.2.2 Avaliação do segundo planejamento experimental aplicado para produção de um coquetel de quitinases em shaker

De acordo com os resultados obtidos com o segundo planejamento experimental, do tipo fatorial completo 2^3 (Figura 28 e Tabela 18), *A. caviae* CHZ306 foi capaz de produzir os três tipos de quitinases em todas as condições de temperatura (34, 38 e 42 °C), concentração de quitina (3, 4 e 5%) e pH (8, 9 e 10) avaliadas. O crescimento celular não foi afetado por nenhuma dessas condições. No entanto, as condições que envolveram a temperatura de 42 °C afetaram a produção de quitinases, atingindo concentrações menores que 2,0 $U.L^{-1}$ ao longo do cultivo.

O experimento n° 11 foi aquele que mostrou o perfil de produção para o coquetel de quitinases. Em comparação com as condições utilizadas na etapa de seleção do meio de cultivo (concentração de quitina, 1%; pH inicial, 7,0; e temperatura 28 °C), as condições desse experimento (concentração de quitina, 5%; pH inical, 8,0; e temperatura 34 °C) reduziram o tempo inicial de produção do coquetel de quitinases de 96 para 36 horas e, atingiram atividades de 53,1 $U.L^{-1}$ (endoquitinases), 55,1 $U.L^{-1}$ (quitobiosidases) e 192,5 $U.L^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases) (Tabela 18). As produtividades obtidas nessas condições foram 1,5 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (endoquitinases), 1,5 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (quitobiosidases) e 5,3 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases).

Figura 28 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D), em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de quitina, aplicadas no segundo planejamento experimental para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.



Legenda: As séries de dados destacadas em verde representam o experimento que apresentou o perfil de produção de quitinases mais próximo do esperado para o coquetel de quitinases. As flechas indicam o tempo considerado para obtenção do coquetel de quitinases, segundo a condição selecionada.
FONTE: Cardozo, 2017.

Tabela 18 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 durante avaliação do segundo planejamento experimental em *shaker*.

		N° do Experimento	Variáveis com níveis em valores reais e codificados			Atividade de Quitinases ($U.L^{-1}$)										
						Tempo de cultivo (h)										
			Quitina (%)	pH	Temp. (°C)	0	4	8	12	24	36	48	60	72	84	96
2° Planejamento Experimental	Endoquitinases	10	3 (-1)	8 (-1)	34 (-1)	0,0	0,7	40,7	38,8	44,6	45,6	45,8	41,2	39,9	35,9	38,4
		11	**5 (+1)**	**8 (-1)**	**34 (-1)**	**0,0**	**0,7**	**37,9**	**37,7**	**40,9**	**53,1**	**56,8**	**53,8**	**49,1**	**48,5**	**46,9**
		12	3 (-1)	10 (+1)	34 (-1)	0,0	0,7	39,4	38,5	41,1	44,0	45,8	40,6	39,1	39,3	37,9
		13	5 (+1)	10 (+1)	34 (-1)	0,0	0,6	34,2	38,8	43,2	49,7	51,0	47,2	43,1	42,5	46,1
		14	3 (-1)	8 (-1)	42 (+1)	0,0	0,5	0,6	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		15	5 (+1)	8 (-1)	42 (+1)	0,0	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
		16	3 (-1)	10 (+1)	42 (+1)	0,0	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
		17	5 (+1)	10 (+1)	42 (+1)	0,0	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,7
		18 (C)	4 (0)	9 (0)	38 (0)	0,0	0,7	32,7	34,6	35,8	39,9	33,8	29,3	22,6	17,5	16,9
	Quitobiosidases	10	3 (-1)	8 (-1)	34 (-1)	0,0	0,3	33,0	34,4	41,0	48,6	50,2	44,7	42,6	38,0	40,4
		11	**5 (+1)**	**8 (-1)**	**34 (-1)**	**0,0**	**0,3**	**27,5**	**26,8**	**43,9**	**55,1**	**52,7**	**51,6**	**46,3**	**44,4**	**47,1**
		12	3 (-1)	10 (+1)	34 (-1)	0,0	0,2	35,1	35,7	30,8	36,4	44,6	39,2	37,2	38,5	38,5
		13	5 (+1)	10 (+1)	34 (-1)	0,0	0,3	32,4	31,8	31,2	49,9	61,8	52,0	44,9	41,1	40,7
		14	3 (-1)	8 (-1)	42 (+1)	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1
		15	5 (+1)	8 (-1)	42 (+1)	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
		16	3 (-1)	10 (+1)	42 (+1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1
		17	5 (+1)	10 (+1)	42 (+1)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
		18 (C)	4 (0)	9 (0)	38 (0)	0,0	0,3	28,0	33,0	25,1	25,6	27,9	21,6	16,7	15,8	15,5
	N-Acetil-Glicosaminidases	10	3 (-1)	8 (-1)	34 (-1)	0,0	0,0	16,4	12,2	31,0	126,9	125,7	133,3	137,8	132,2	126,5
		11	**5 (+1)**	**8 (-1)**	**34 (-1)**	**0,0**	**0,1**	**13,8**	**27,9**	**59,7**	**192,5**	**201,0**	**203,5**	**198,8**	**196,8**	**194,5**
		12	3 (-1)	10 (+1)	34 (-1)	0,0	0,0	11,4	13,4	44,1	96,0	98,6	108,7	103,9	97,5	98,5
		13	5 (+1)	10 (+1)	34 (-1)	0,0	0,0	13,1	25,5	58,5	133,8	154,8	168,7	181,6	177,2	179,0
		14	3 (-1)	8 (-1)	42 (+1)	0,0	0,1	0,4	0,6	1,1	1,5	1,2	5,1	1,0	1,0	1,0
		15	5 (+1)	8 (-1)	42 (+1)	0,0	0,1	0,4	0,6	1,0	1,1	1,0	1,9	1,0	0,7	0,8
		16	3 (-1)	10 (+1)	42 (+1)	0,0	0,0	0,3	0,5	0,3	0,4	0,4	0,9	0,4	0,4	0,5
		17	5 (+1)	10 (+1)	42 (+1)	0,0	0,1	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6
		18 (C)	4 (0)	9 (0)	38 (0)	0,0	0,0	3,9	6,9	61,3	68,1	74,5	63,0	57,3	48,6	38,7

Nota: Os valores destacados em vermelho representam as condições que apresentaram os melhores resultados.
FONTE: Cardozo, 2017.

De acordo com as análises de variância (*ANOVA*) (Tabela 19) e diagramas de Pareto (Figura 29), a variável temperatura foi aquela que produziu maior efeito significativo na produção dos três tipos de quitinases. Os efeitos produzidos por essa variável foram negativos, indicando que a diminuição desse parâmetro poderia melhorar os resultados. Assim, um terceiro planejamento experimental, com valores menores de temperatura (32, 34 e 36 °C), foi realizado. A variável concentração de quitina também apresentou efeito significativo na produção dos três tipos de quitinases. Os efeitos significativos produzidos por essa variável foram menores que aqueles produzidos pela variável temperatura. No entanto, os efeitos produzidos por essa variável foram no nível positivo para todas as respostas, indicando que o aumento deste parâmetro poderia melhorar os resultados. Assim, no terceiro planejamento experimental, avaliamos valores maiores de concentração de quitina (5, 6 e 7%). Já a variável pH, não apresentou efeito significativo na produção de endoquitinases (Figura 9A), mas apresentou efeito significativo na produção de quitobiosidases (Figura 9B) e *N*-acetil-glicosaminidases (Figura 9C). Os efeitos significativos produzidos por essa variável foram negativos indicando que a diminuição desse parâmetro poderia melhorar os resultados. No entanto, como observamos que o pH 8,0 mostrou-se mais adequado durante o primeiro e segundo planejamento experimental, optou-se por utilizar somente esse pH no terceiro planejamento experimental.

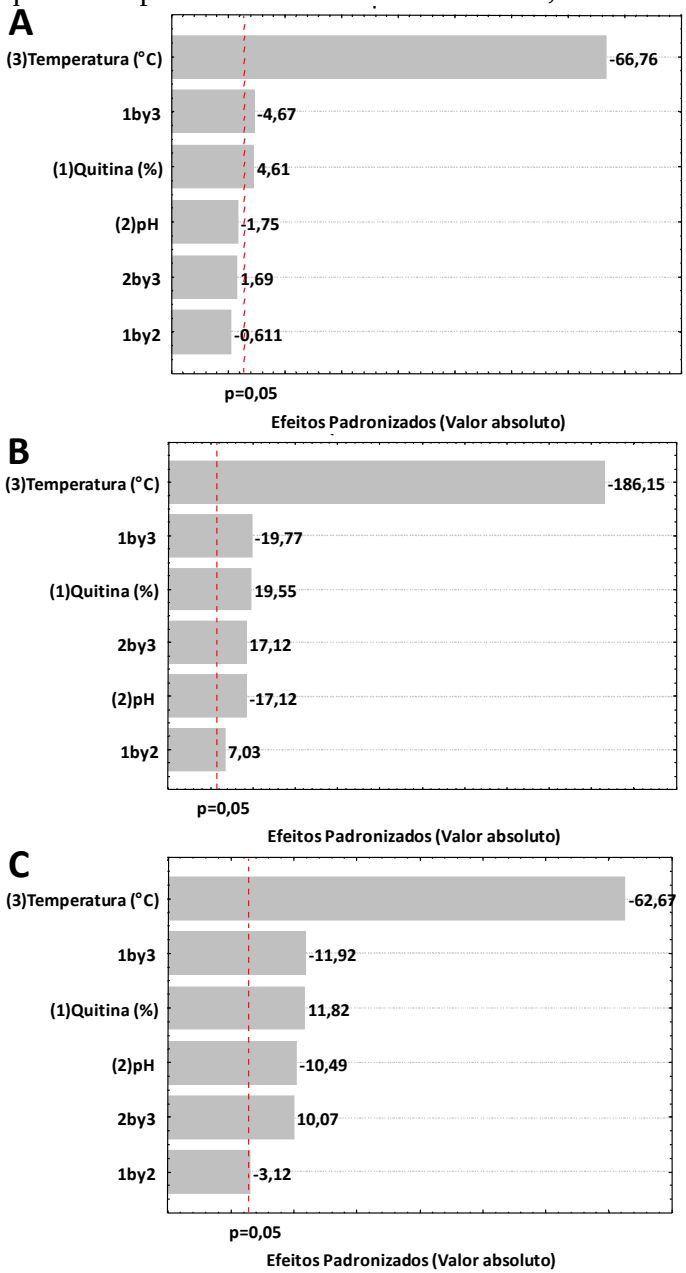
.

Tabela 19 - Analises de variância (ANOVA) para produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases, de acordo com o segundo planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

	Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	P-valor	Nível do Efeito Produzido
Endoquitinases	Quitina (%) (1)	21,675	1	21,675	21,301	0,009916	+
	pH (2)	3,136	1	3,136	3,081	0,154044	NS
	Temperatura (°C) (3)	4535,785	1	4535,785	4457,413	0,000000	-
	Interação (1) e (2)	0,380	1	0,380	0,374	0,573959	NS
	Interação (1) e (3)	22,235	1	22,235	21,851	0,009487	-
	Interação (2) e (3)	2,928	1	2,928	2,877	0,165085	NS
	Falta de Ajuste	752,438	2	376,219	369,718	0,000029	
	Erro Puro	4,070	4	1,018			
	Total	5342,647	12				
Quitobiosidases	Quitina (%) (1)	49,747	1	49,747	382,44	0,000040	+
	pH (2)	38,164	1	38,164	293,40	0,000068	-
	Temperatura (°C) (3)	4507,690	1	4507,690	34653,84	0,000000	-
	Interação (1) e (2)	6,435	1	6,435	49,47	0,002153	+
	Interação (1) e (3)	50,876	1	50,876	391,12	0,000039	-
	Interação (2) e (3)	38,164	1	38,164	293,40	0,000068	+
	Falta de Ajuste	16,999	2	8,500	65,34	0,000882	
	Erro Puro	0,520	4	0,130			
	Total	4708,597	12				
N-acetil-glicosaminidases	Quitina (%) (1)	1325,68	1	1325,68	139,873	0,000293	+
	pH (2)	1044,02	1	1044,02	110,155	0,000466	-
	Temperatura (°C) (3)	37230,56	1	37230,56	3928,228	0,000000	-
	Interação (1) e (2)	92,35	1	92,35	9,744	0,035475	-
	Interação (1) e (3)	1347,50	1	1347,50	142,176	0,000283	-
	Interação (2) e (3)	962,12	1	962,12	101,514	0,000546	+
	Falta de Ajuste	102,13	2	51,06	5,388	0,073286	
	Erro Puro	37,91	4	9,48			
	Total	42142,25	12				

Legenda: As análises de variância foram realizadas no tempo considerado como o melhor para obtenção do coquetel de quitinases (36 h). As variáveis com valores destacados em vermelho foram aquelas que apresentaram diferenças significativas. Os valores da falta de ajuste destacados em vermelho mostram que o modelo não está adequado. NS, não significante.
FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 29 - Diagramas de Pareto para os efeito das variáveis temperatura, pH e concentração de quitina na produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e *N*-acetil-glicosaminidases (C), de acordo com o segundo planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

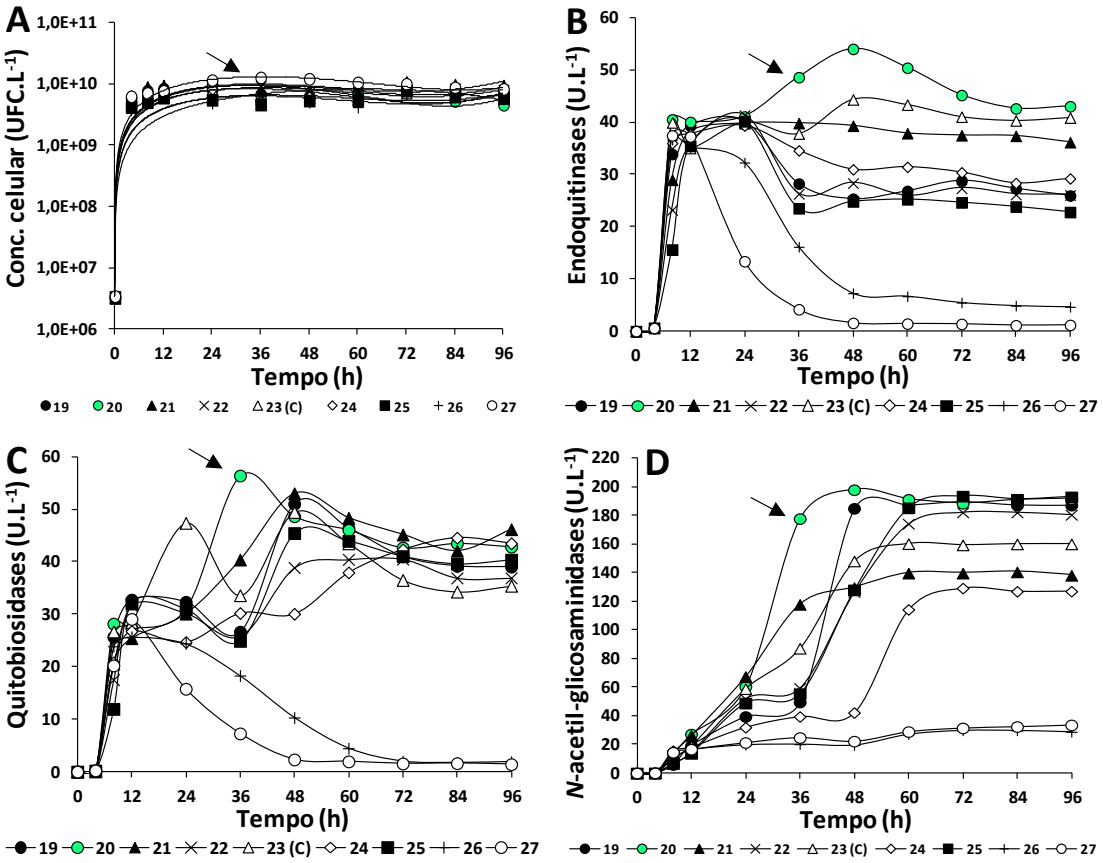


Nota: Os efeitos demonstrados nos diagramas de Pareto estão relacionados ao tempo considerado como o melhor para obtenção do coquetel de quitinases (36 h).
FONTE: Cardozo, 2017.

3.4.2.3 Avaliação do terceiro planejamento experimental aplicado à produção de um coquetel de quitinases em shaker

De acordo com os resultados obtidos com o terceiro planejamento experimental, do tipo fatorial completo 3^2 (Figura 30 e Tabela 20), *A. caviae* CHZ306 foi capaz de produzir os três tipos de quitinases em todas as condições de temperatura (32, 34 e 36 °C) e concentração de quitina (5, 6 e 7%) avaliadas. O crescimento celular não foi afetado por nenhuma dessas condições e, o experimento n° 20 foi aquele que mostrou um perfil de produção para o coquetel de quitinases. As condições desse experimento foram as mesmas selecionadas no segundo planejamento experimental (concentração de quitina, 5%; pH inicial, 8,0; e temperatura 34 °C), reduzindo o tempo de produção do extrato bruto de quitinases de 96 para 36 horas e, atingindo atividades de 48,7 $U.L^{-1}$ (endoquitinases), 56,3 $U.L^{-1}$ (quitobiosidases) e 177,8 $U.L^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases) (Tabela 20). As produtividades obtidas nessas condições foram 1,4 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (endoquitinases), 1,6 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (quitobiosidases) e 4,9 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases).

Figura 30 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D), em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de quitina, aplicadas no terceiro planejamento experimental para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.



Legenda: As séries de dados destacadas em verde representam o experimento que apresentou o perfil de produção de quitinases mais próximo do esperado para o coquetel de quitinases. As flechas indicam o tempo considerado para obtenção do coquetel de quitinases, segundo a condição selecionada.
FONTE: Cardozo, 2017.

Tabela 20 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 durante avaliação do terceiro planejamento experimental em *shaker*.

		N° do Experimento	Variáveis com níveis em valores reais e codificados		Atividade de Quitinases ($U.L^{-1}$)										
			Quitina (%)	Temp. (°C)	Tempo (h)										
					0	4	8	12	24	36	48	60	72	84	96
3° Planejamento Experimental	Endoquitinases	19	5 (-1)	32 (-1)	0,0	0,6	33,9	39,4	40,3	28,3	25,4	26,9	28,9	27,3	26,0
		20	5 (-1)	34 (0)	0,0	0,6	40,6	40,1	41,1	48,7	54,1	50,5	45,2	42,7	43,1
		21	5 (-1)	36 (+1)	0,0	0,6	29,0	38,2	39,8	39,9	39,4	37,9	37,5	37,4	36,2
		22	6 (0)	32 (-1)	0,0	0,6	23,2	35,5	41,4	26,3	28,4	25,9	27,4	26,2	26,1
		23 (C)	6 (0)	34 (0)	0,0	0,6	40,0	35,1	40,1	37,9	44,4	43,4	41,1	40,4	40,9
		24	6 (0)	36 (+1)	0,0	0,6	36,0	37,8	39,4	34,6	31,0	31,5	30,4	28,4	29,3
		25	7 (+1)	32 (-1)	0,0	0,6	15,6	35,5	40,2	23,5	24,9	25,3	24,7	23,9	22,8
		26	7 (+1)	34 (0)	0,0	0,7	36,7	35,2	32,3	16,2	7,3	6,7	5,5	4,9	4,7
		27	7 (+1)	36 (+1)	0,0	0,6	37,5	37,3	13,4	4,2	1,6	1,4	1,4	1,1	1,2
	Quitobiosidases	19	5 (-1)	32 (-1)	0,0	0,2	25,7	32,7	32,3	26,6	51,0	46,3	40,9	39,1	39,0
		20	5 (-1)	34 (0)	0,0	0,1	28,2	27,3	31,0	56,3	48,6	46,0	42,6	43,5	42,8
		21	5 (-1)	36 (+1)	0,0	0,0	20,6	25,4	30,1	40,3	53,0	48,3	45,1	42,0	46,1
		22	6 (0)	32 (-1)	0,0	0,2	17,5	31,6	30,2	25,8	38,8	40,4	40,4	36,9	36,9
		23 (C)	6 (0)	34 (0)	0,0	0,2	26,7	28,4	47,3	33,6	49,4	43,4	36,5	34,2	35,4
		24	6 (0)	36 (+1)	0,0	0,2	20,8	26,7	24,6	30,2	30,0	37,9	42,3	44,5	43,4
		25	7 (+1)	32 (-1)	0,0	0,2	11,9	32,0	31,0	24,9	45,4	43,9	41,0	39,6	40,3
		26	7 (+1)	34 (0)	0,0	0,3	23,9	25,7	24,4	18,3	10,3	4,4	2,0	1,7	1,9
		27	7 (+1)	36 (+1)	0,0	0,2	20,2	29,0	15,8	7,3	2,3	1,9	1,5	1,6	1,4
	N-Acetil-Glicosaminidases	19	5 (-1)	32 (-1)	0,0	0,1	5,9	19,2	39,5	49,6	185,0	187,3	189,6	187,4	187,2
		20	5 (-1)	34 (0)	0,0	0,0	13,9	27,2	60,6	177,8	198,0	191,3	188,5	190,8	191,6
		21	5 (-1)	36 (+1)	0,0	0,0	14,5	26,4	67,5	117,9	129,6	139,7	139,7	140,6	138,2
		22	6 (0)	32 (-1)	0,0	0,1	6,2	14,5	51,9	59,4	126,6	174,3	182,2	182,2	180,5
		23 (C)	6 (0)	34 (0)	0,0	0,0	10,7	19,0	58,9	87,2	148,2	160,3	159,4	160,1	160,1
		24	6 (0)	36 (+1)	0,0	0,1	15,6	18,2	31,9	39,5	42,2	114,3	129,2	127,0	127,1
		25	7 (+1)	32 (-1)	0,0	0,1	6,7	13,7	48,8	55,5	128,0	185,3	193,5	191,3	193,0
		26	7 (+1)	34 (0)	0,0	0,1	10,2	16,3	19,7	20,2	19,6	27,2	29,8	29,8	28,8
		27	7 (+1)	36 (+1)	0,0	0,1	14,5	16,6	21,3	24,8	22,3	29,0	31,5	32,5	33,6

Nota: Os valores destacados em vermelho representam as condições que apresentaram os melhores resultados.
FONTE: Cardozo, 2017.

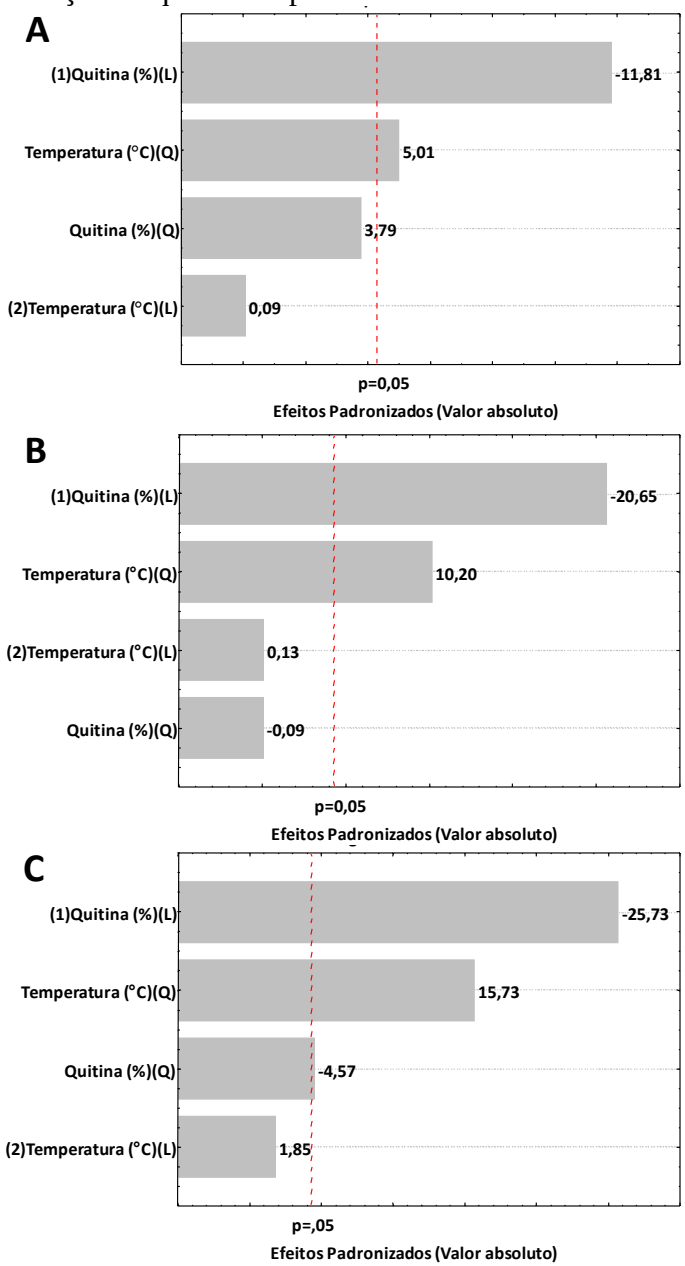
As análises de variância (*ANOVA*) (Tabela 21) e diagramas de Pareto (Figura 31) mostraram que as duas variáveis avaliadas produziram efeitos significativos na produção dos três tipos de quitinases. A variável concentração de quitina produziu efeitos negativos, indicando que a diminuição desse parâmetro poderia melhorar os resultados. Já a variável temperatura produziu efeitos positivos, indicando o aumento dos valores desse parâmetro.

Tabela 21 - Análises de variância (ANOVA) para produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases, de acordo com o terceiro planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

	Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	P-valor	Nível do Efeito Produzido
Endoquitinases	Quitina (%) (1) (L)	886,004	1	886,0044	139,6031	0,007087	-
	Quitina (%) (1) (Q)	91,290	1	91,2896	14,3840	0,063021	NS
	Temperatura (°C) (2) (L)	0,051	1	0,0514	0,0081	0,936483	NS
	Temperatura (°C) (2) (Q)	159,873	1	159,8733	25,1904	0,037480	+
	Falta de Ajuste	340,070	4	85,0176	13,3958	0,070670	
	Erro Puro	12,693	2	6,3466			
	Total	1578,574	10				
Quitobiosidases	Quitina (%) (1) (L)	885,371	1	885,3708	426,4540	0,002337	-
	Quitina (%) (1) (Q)	0,019	1	0,0190	0,0092	0,932485	NS
	Temperatura (°C) (2) (L)	0,038	1	0,0381	0,0184	0,904604	NS
	Temperatura (°C) (2) (Q)	216,112	1	216,1118	104,0940	0,009470	+
	Falta de Ajuste	431,337	4	107,8341	51,9402	0,018978	
	Erro Puro	4,152	2	2,0761			
	Total	1552,411	10				
N-acetil-glicosaminidases	Quitina (%) (1) (L)	9991,23	1	9991,226	662,2383	0,001507	-
	Quitina (%) (1) (Q)	315,57	1	315,566	20,9163	0,044633	-
	Temperatura (°C) (2) (L)	51,71	1	51,709	3,4273	0,205333	NS
	Temperatura (°C) (2) (Q)	3736,13	1	3736,133	247,6383	0,004014	+
	Falta de Ajuste	7288,63	4	1822,156	120,7761	0,008229	
	Erro Puro	30,17	2	15,087			
	Total	21100,18	10				

Legenda: As análises de variância foram realizadas no tempo considerado como o melhor para obtenção do coquetel de quitinases (36 h). As variáveis com valores destacados em vermelho foram aquelas que apresentaram diferenças significativas. Os valores da falta de ajuste destacados em vermelho mostram que o modelo não está adequado. NS, não significante; L, modelo linear; Q, modelo quadrático.
FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 31 - Diagramas de Pareto para os efeitos das variáveis temperatura e concentração de quitina na produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e *N*-acetil-glicosaminidases (C), de acordo com o terceiro planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

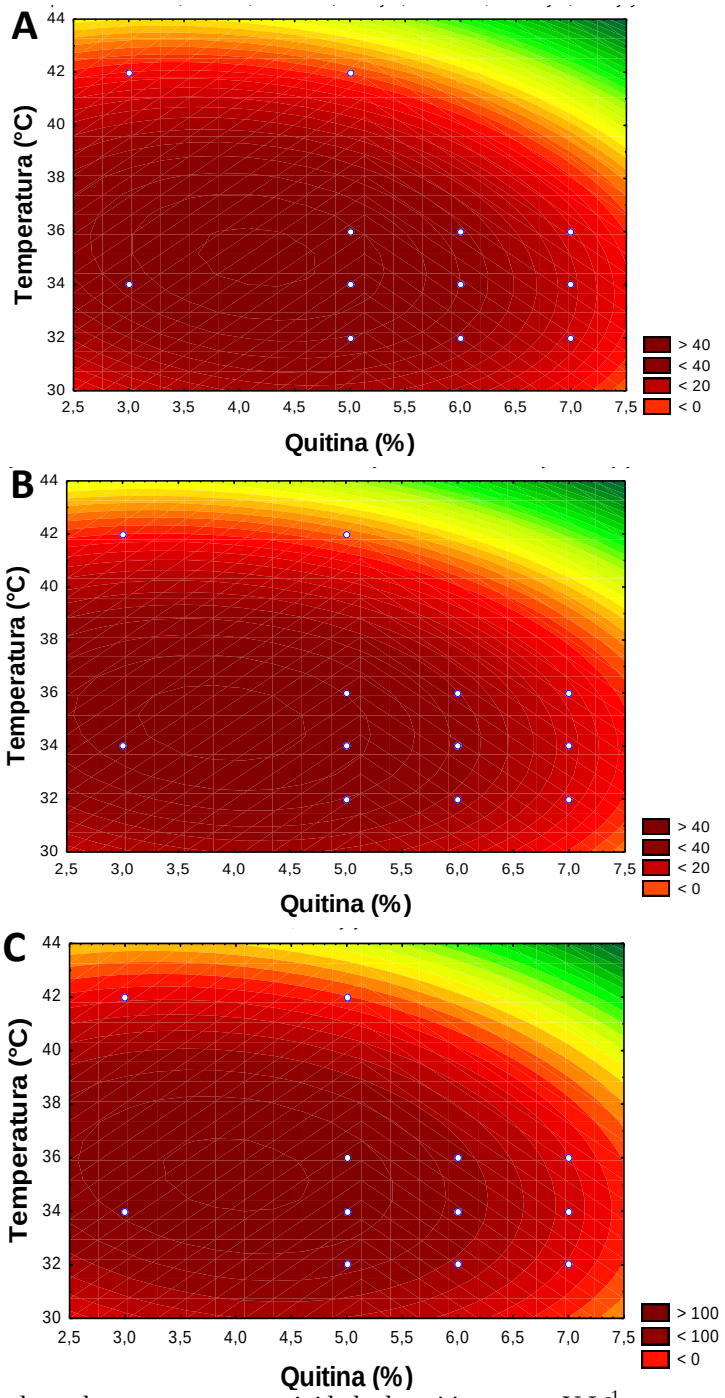


Nota: Os efeitos demonstrados nos diagramas de Pareto estão relacionados ao tempo considerado como o melhor para obtenção do coquetel de quitinases (36 h).
FONTE: Cardozo, 2017.

No entanto, como concentrações menores de quitina e temperaturas maiores já tinham sido testadas nos planejamentos anteriores, foi realizada uma análise conjunta do segundo e terceiro planejamentos, e por interpolação das superfícies de contorno para produção de endoquitinases e quitobiosidades e *N*-acetil-glicosaminidases (em 36 h) (Figura 32), pode-se visualizar que as condições otimizadas são: concentração de

quitina (5%) e temperatura (34 °C). Com isso, definiram-se assim as condições a serem utilizadas nos estudos de produção de quitinases em biorreator: concentração de quitina (5%), pH inical (8,0) e temperatura (34 °C).

Figura 32 - Interpolação de dados pontuais obtidos durante a avaliação da produção de endoquitinases (A), quitobiosidades (B) e *N*-acetil-glicosaminidases (C) por *Aeromonas caviae* CHZ306 no segundo e terceiro planejamento experimental.



Nota: Os valores das legendas representam a atividade de quitinases em $U.L^{-1}$.
FONTE: Cardozo, 2017.

3.4.3 Determinação do melhor coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator

Um planejamento experimental, do tipo fatorial completo 3^2, foi utilizado para avaliar os efeitos das velocidades de agitação (rpm) e aeração (vvm), expressos em função do k_La, sobre a produção de quitinases por *A. caviae* CHZ306, em biorreator.

O experimento n° 33 (Tabela 22) foi aquele que mostrou um perfil de produção para o coquetel de quitinases de interesse. Em comparação com as condições iniciais utilizadas neste estudo (concentração de quitina, 1%; pH, 7,0; e temperatura, 28 °C), as condições desse experimento (concentração de quitina, 5%; pH, 8,0; temperatura, 34 °C; e k_La, 55) reduziram o tempo de produção do coquetel de quitinases de 96 para 12 horas e, produzindo 57,5 $U.L^{-1}$ (endoquitinases), 65,9 $U.L^{-1}$ (quitobiosidases) e 173,4 $U.L^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases) (Tabela 22). As produtividades obtidas nessas condições foram 4,8 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (endoquitinases), 5,5 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (quitobiosidases) e 14,5 $U.L^{-1}.h^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases).

Tabela 22 - Produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306 durante avaliação de um planejamento experimental em biorreator.

	N° do Experimento	Variáveis com níveis em valores reais e codificados			Atividade de Quitinases ($U.L^{-1}$)								
		Veloc. de agitação (rpm)	Taxa de aeração (vvm)	k_La	Tempo de Cultivo (h)								
					0	2	4	8	12	18	24	30	36
Endoquitinases	28	150 (-1)	0,25 (-1)	8	0,0	0,4	0,5	1,2	1,4	6,6	11,3	10,7	9,6
	29	150 (-1)	1,00 (0)	17	0,0	0,6	0,7	1,0	5,7	10,2	19,8	23,4	20,7
	30	150 (-1)	1,75 (+1)	35	0,0	0,9	0,8	5,4	49,6	47,7	23,4	21,6	18,3
	31	250 (0)	0,25 (-1)	17	0,0	0,6	0,7	2,0	16,1	23,8	24,1	27,3	26,2
	32 C	250 (0)	1,00 (0)	45	0,0	0,6	0,7	38,1	44,5	49,3	37,4	21,2	16,9
	33	250 (0)	1,75 (+1)	55	0,0	0,3	1,0	11,3	57,5	42,4	14,5	12,5	9,4
	34	350 (+1)	0,25 (-1)	28	0,0	0,6	0,6	3,3	39,9	17,0	14,4	11,2	7,3
	35	350 (+1)	1,00 (0)	70	0,0	0,7	0,7	1,2	43,6	32,7	13,4	10,0	7,3
	36	350 (+1)	1,75 (+1)	96	0,0	0,5	0,6	8,7	14,4	11,6	4,2	3,3	3,2
Quitobiosidases	28	150 (-1)	0,25 (-1)	8	0,0	0,1	0,2	0,6	0,7	6,5	8,2	7,9	7,3
	29	150 (-1)	1,00 (0)	17	0,0	0,1	0,2	0,7	4,6	18,7	37,6	50,6	45,5
	30	150 (-1)	1,75 (+1)	35	0,0	0,4	0,4	3,2	27,7	37,8	53,1	64,2	60,7
	31	250 (0)	0,25 (-1)	17	0,0	0,3	0,3	0,8	7,2	11,9	49,9	66,5	65,4
	32 C	250 (0)	1,00 (0)	45	0,0	0,2	0,2	22,4	25,8	45,8	50,0	51,3	49,2
	33	250 (0)	1,75 (+1)	55	0,0	0,0	0,2	11,1	65,9	70,7	69,6	72,0	70,3
	34	350 (+1)	0,25 (-1)	28	0,0	0,2	0,2	2,5	32,1	12,8	10,9	9,6	8,8
	35	350 (+1)	1,00 (0)	70	0,0	0,2	0,3	0,9	37,8	20,3	10,0	7,3	5,1
	36	350 (+1)	1,75 (+1)	96	0,0	0,3	0,3	6,0	16,5	7,4	3,3	3,2	2,7
N-Acetil-Glicosaminidases	28	150 (-1)	0,25 (-1)	8	0,0	0,5	0,9	9,1	12,8	12,8	15,6	15,8	15,6
	29	150 (-1)	1,00 (0)	17	0,0	0,5	0,7	12,9	19,9	58,8	115,8	136,3	134,4
	30	150 (-1)	1,75 (+1)	35	0,0	1,0	1,7	40,9	83,8	163,1	184,9	193,2	188,5
	31	250 (0)	0,25 (-1)	17	0,0	1,5	1,7	16,8	23,5	58,5	134,7	170,2	171,8
	32 C	250 (0)	1,00 (0)	45	0,0	1,0	1,4	32,4	76,5	160,6	183,8	186,2	185,4
	33	250 (0)	1,75 (+1)	55	0,0	0,6	1,6	76,8	173,4	192,0	197,1	197,0	196,8
	34	350 (+1)	0,25 (-1)	28	0,0	0,7	0,9	4,1	25,3	33,9	38,4	39,7	39,0
	35	350 (+1)	1,00 (0)	70	0,0	0,5	0,8	2,8	25,7	39,7	43,0	42,9	42,2
	36	350 (+1)	1,75 (+1)	96	0,0	1,0	1,4	14,6	27,0	26,4	27,0	26,3	26,0

4° Planejamento Experimental

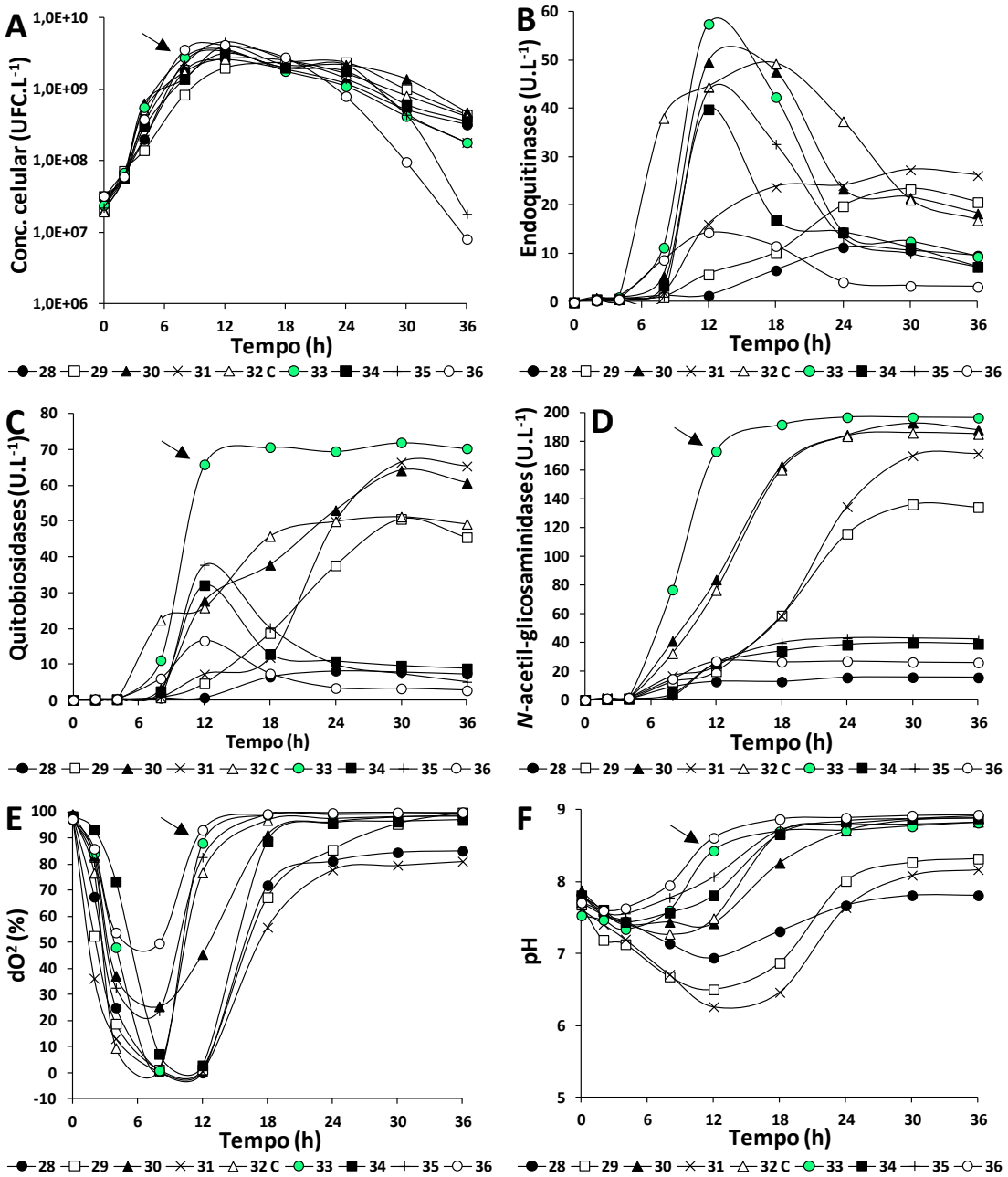
Nota: Os valores destacados em vermelho representam as condições que apresentaram os melhores resultados.
FONTE: Cardozo, 2017.

A Figura 33 mostra os perfis de produção de quitinases, as concentrações celulares e as variações de pH e oxigênio dissolvido (dO_2) em função do tempo. As velocidades de agitação avaliadas nesse planejamento experimental pareceram não afetar o crescimento celular (Figuras 33A), mas os experimentos com velocidade de 350 rpm reduziram a produção de endoquitinases, quitobiosidades e *N*-acetil-glicosaminidases (experimentos n° 34, 35 e 36) ao longo do tempo. O experimento n° 33 (250 rpm, 1,75 vvm, k_La 55 h^{-1}) foi aquele que apresentou a maior produção dos três tipos de quitinases. Já o experimento n° 28 (150 rpm, 0,25 vvm, k_La 8,3 h^{-1}) foi aquele que apresentou menor produção de quitinases.

Observaram-se também os mesmos perfis de concentração de dO_2 (Figuras 33E) e variação de pH (Figuras 33F) em todos os experimentos. Os menores valores de dO_2 e maiores alterações de pH ocorreram durante a fase exponencial do crescimento bacteriano, fase na qual também foram observadas as maiores produtividades de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases (experimento n° 33). Após essa fase, ocorreu diminuição do consumo de dO_2 e aumento do pH, estabilizando ao longo do tempo.

As Figuras 33 e Tabela 22 mostram também que com 12 horas de cultivo, a produção de endoquitinases (Figuras 33B) e quitobiosidases (Figuras 33C) foi mais eficiente (experimentos n° 30, 32C, 33, 34 e 35) nas condições de k_La que variaram de 28 a 70 h^{-1}, produzindo atividades entre 43,5 e 49,6 $U.L^{-1}$ para endoquitinases e entre 25,8 e 65,8 $U.L^{-1}$ para quitobiosidases. Já a produção de *N*-acetil-glicosaminidases (Figuras 33D) foi mais eficiente (experimentos n° 30, 32C e 33) nas condições de k_La que variaram de 35 a 55 h^{-1}, produzindo atividades entre 76,5 e 173,4 $U.L^{-1}$

Figura 33 - Perfil de crescimento celular (A), produção de endoquitinases (B), quitobiosidases (C) e *N*-acetil-glicosaminidases (D), oxigênio dissolvido (E) e pH (F) em diferentes condições de agitação e aeração aplicadas no quarto planejamento experimental para avaliação da produção de quitinases por *A. caviae* CHZ306, em biorreator.

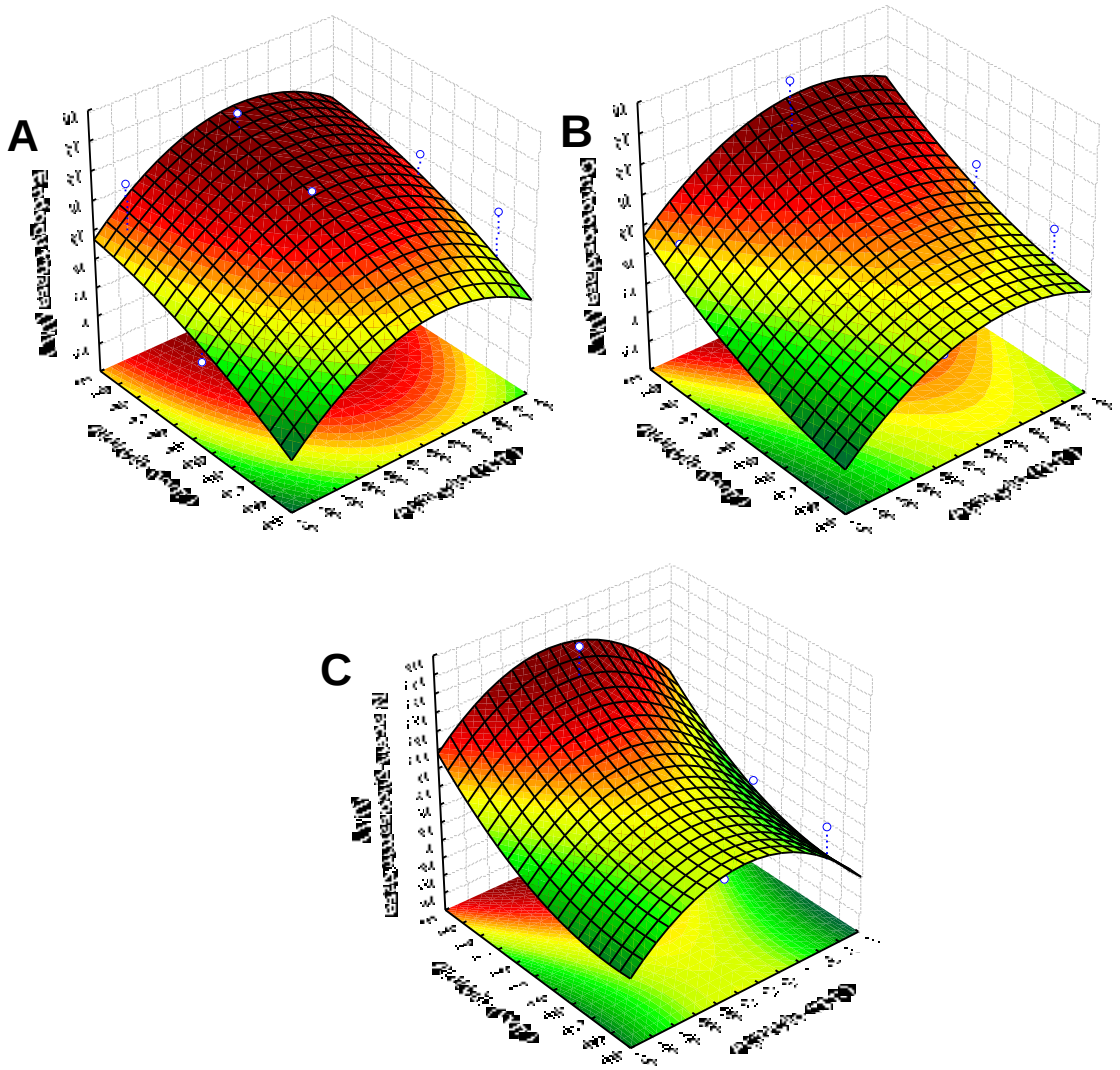


Legenda: As séries de dados destacadas em verde representam o experimento que apresentou o perfil de produção de quitinases mais próximo do esperado para o coquetel de quitinases. As flechas indicam o tempo considerado para obtenção do coquetel de quitinases, segundo a condição selecionada.
FONTE: Cardozo, 2017.

Os resultados obtidos às 12 horas de cultivo foram utilizados para construir gráficos de superfície de resposta e, avaliar os efeitos agitação e aeração na produção de quitinases. De modo geral, a produção de endoquitinases (Figura 34A) e quitobiosidases (Figura 34B) foi

maior conforme o aumento da velocidade de agitação e aeração. Em relação a *N*-acetil-glicosaminidases (Figura 34C), observou-se que a produção foi menor com velocidades baixas (150 rpm) e altas (350 rpm) de agitação e, que a produção foi maior de acordo com o aumento da aeração, independente da velocidade de agitação utilizada.

Figura 34 - Superfícies de resposta do planejamento experimental, do tipo fatorial completo 32, para produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e N-acetil-glicosaminidases por A. caviae CHZ306, em biorreator.



Legenda: O gráfico ilustra a influência das velocidades de agitação (rpm) e taxas de aeração (vvm) no melhor tempo de produção de quitinases (12 horas).
FONTE: Cardozo, 2017.

A partir da análise de variância (Tabela 23) e dos diagramas de Pareto (Figura 35), observou-se que a agitação e aeração produziram efeitos significativos para produção de quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases. Os efeitos significativos produzidos por essas duas variáveis foram positivos, indicando que o aumento desses parâmetros poderiam

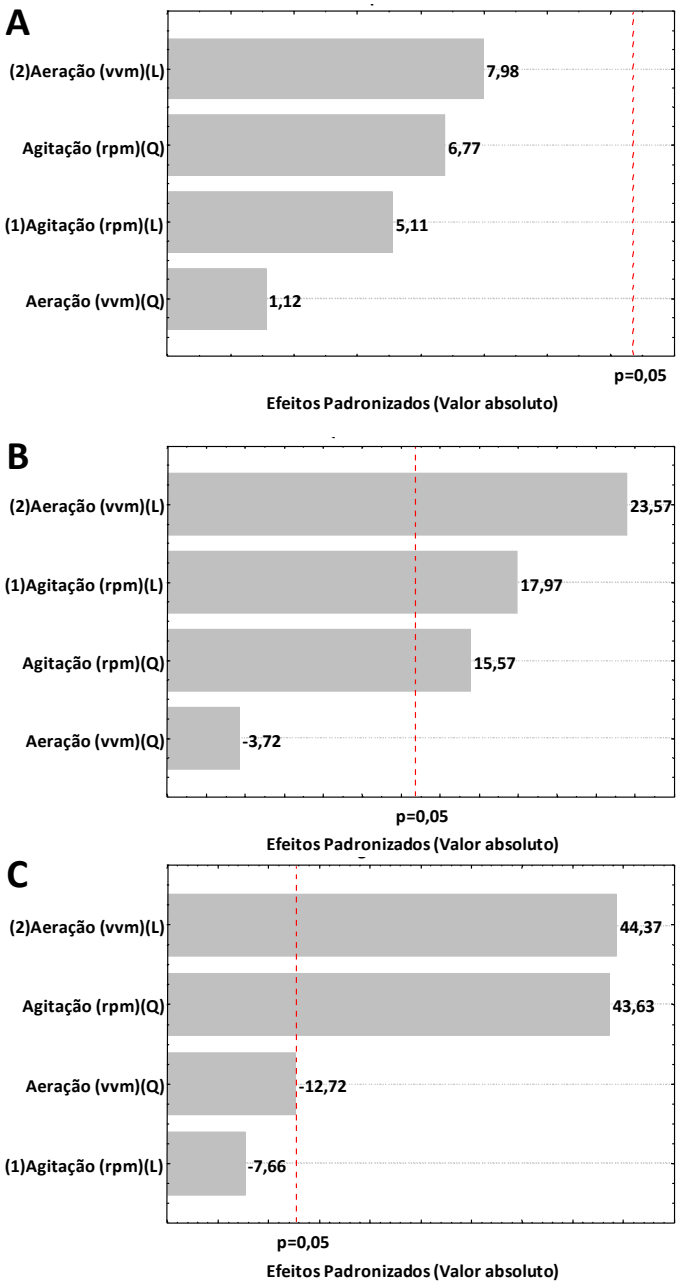
melhorar os resultados. De acordo com as superfícies de respostas (Figura 14), observa-se maior produção das três quitinases na região do ponto central para agitação com tendência para aumento em maiores aerações. Desta forma, a agitação foi fixada em 250 rpm e testou-se o aumento da aeração para 2,5 vvm, obtendo um k_La de 71 h^{-1}, entretanto não apresentou melhores resultados em comparação com a condição definida no experimento n° 33 (250 rpm, 1,75 vvm, k_La 55). Como 2,5 vvm de aeração é a capacidade máxima do biorreator de bancada BioFlo 110, por razões técnicas, definiram-se assim as condições de cultivo em biorreator para produção de um coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306 a ser utilizado na produção de *N*-acetil-glicosamina: concentração de quitina, 5%; pH inicial 8,0; temperatura, 34 °C; e k_La, 55 h^{-1} (250 rpm e 1,75 vvm).

Tabela 23 - Análises de variância (ANOVA) para produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases, de acordo com o quarto planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator.

	Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	P-valor	Efeito Produzido
Endoquitinases	Agitação (rpm) (1) (L)	282,425	1	282,4246	26,20593	0,122813	NS
	Agitação (rpm) (1) (Q)	494,724	1	494,7236	45,90496	0,093288	NS
	Aeração (vvm) (2) (L)	687,140	1	687,1399	63,75909	0,079315	NS
	Aeração (vvm) (2) (Q)	13,663	1	13,6628	1,26776	0,462329	NS
	Falta de Ajuste	2150,052	4	537,5129	49,87534	0,105757	
	Erro Puro	10,777	1	10,7771			
	Total	3681,493	9				
Quitobiosidases	Agitação (rpm) (1) (L)	475,843	1	475,8432	323,0494	0,035383	+
	Agitação (rpm) (1) (Q)	357,293	1	357,2927	242,5657	0,040820	+
	Aeração (vvm) (2) (L)	818,769	1	818,7689	555,8614	0,026986	+
	Aeração (vvm) (2) (Q)	20,450	1	20,4499	13,8834	0,166923	NS
	Falta de Ajuste	1638,092	4	409,5229	278,0247	0,044946	
	Erro Puro	1,473	1	1,4730			
	Total	3293,405	9				
N-acetil-glicosaminidases	Agitação (rpm) (1) (L)	246,94	1	246,937	58,800	0,082556	NS
	Agitação (rpm) (1) (Q)	7995,54	1	7995,536	1903,873	0,014588	+
	Aeração (vvm) (2) (L)	8268,48	1	8268,476	1968,865	0,014345	+
	Aeração (vvm) (2) (Q)	679,68	1	679,682	161,844	0,049939	NS
	Falta de Ajuste	5775,19	4	1443,797	343,793	0,040425	
	Erro Puro	4,20	1	4,200			
	Total	22418,62	9				

Legenda: As análises de variância foram realizadas no tempo considerado como o melhor para obtenção do coquetel de quitinases (12 h). As variáveis com valores destacados em vermelho foram aquelas que apresentaram diferenças significativas. Os valores da falta de ajuste destacados em vermelho mostram que o modelo não está adequado. NS, não significante; L, modelo linear; Q, modelo quadrático.
FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 35 - Diagramas de Pareto para os efeitos das variáveis agitação e aeração na produção de endoquitinases (A), quitobiosidases (B) e *N*-acetil-glicosaminidases (C), de acordo com o quarto planejamento experimental aplicado para avaliação da produção de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator.



Nota: Os efeitos demonstrados nos diagramas de Pareto estão relacionados ao tempo considerado como o melhor para obtenção do coquetel de quitinases (12 h).
FONTE: Cardozo, 2017.

3.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3.5.1 Seleção do meio de cultivo para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

É conhecido que quitinases são em grande parte enzimas extracelulares secretadas em baixas concentrações para o meio de cultivo. Sua biossíntese em bactérias é influenciada por indutores (ex., quitina e produtos da sua hidrólise), pela composição do meio de cultivo (ex., fontes de carbono e nitrogênio) e vários outros fatores físicos (ex., temperatura, pH, velocidade de agitação e de aeração). No entanto, alguns desses fatores, bem como produtos da própria hidrólise de quitina podem também reprimir a biossíntese de quitinases (STOYKOV et al., 2015). Dessa maneira, a escolha do tipo de indutor, do meio de cultura e tipo de cultivo são características determinantes na produção de quitinases.

Os meios de cultivos para produção de quitinases devem conter fontes de carbono, nitrogênio, co-fatores, precursores e elementos traços em concentrações tais que resultem na atividade máxima do microrganismo. Dentre as formas de α-quitina (pó, flocos e coloidal) mais utilizadas como fontes de carbono no cultivo de bactérias quitinolíticas, a quitina coloidal é aquela considerada como o indutor mais forte da biossíntese de quitinases (ANDRONOPOULOU; VORGIAS, 2004; STOYKOV et al., 2015). Já em relação à fonte de nitrogênio, o sulfato de amônio é tradicionalmente o sal mais utilizado nos estudos de produção de quitinases em função de seu baixo custo. No entanto, vários autores têm mencionado que o uso de fontes adicionais de carbono e nitrogênio pode influenciar positivamente a biossíntese de quitinases (STOYKOV et al., 2015).

Assim, a primeira etapa desse estudo, teve como objetivo selecionar um meio de cultivo que possibilitasse a obtenção de um coquetel de enzimas contendo altas concentrações de três tipos de quitinases (endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) por *A. caviae* CHZ306. Para isso, o meio previamente utilizado em nossos estudos (M1), contendo sulfato de amônio, foi comparado com outros 11 meios de cultivo, preparados com diferentes fontes de nitrogênio como substrato. Fontes de nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio, acetato de amônio e nitrato de amônio), orgânico (casaminoácidos, extrato de carnes, bacto peptona, peptona A, peptona G e triptona) e de grande aplicação em processos industriais (ureia, extrato de levedura, *corn-steep liquor*) foram avaliadas. O indutor selecionado para nossos estudos foi a α-quitina coloidal, um substrato com procedimento de preparação

desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, de baixo custo e que permite o melhor crescimento de bactérias quitinolíticas e produção de quitinases (SOUZA et al., 2009).

Como pode ser observado em nossos resultados, o meio M15, contendo *corn-steep liquor* e peptona A (2:1) como fontes de carbono e nitrogênio, foi aquele que proporcionou os melhores resultados. Em comparação ao M1, o meio M15 aumentou de 0,1 para 9,3 $U.L^{-1}$ a produção de endoquitinases, de 0,1 para 16,4 $U.L^{-1}$ a produção de quitobiosidases e de 4,0 para 78,3 $U.L^{-1}$ a produção de *N*-acetil-glicosaminidases às 96 h de cultivo. O aumento dessas produções pode ser destacado por dois fatores: 1) composição do meio de cultivo e; 2) Relação C:N do meio de cultivo.

Os meios de cultivo M1 e M15 foram diferentes em suas composições e relações de C:N (Tabela 24). O meio M1 teve uma relação C:N de 0,7 e foi composto por sais minerais, quitina coloidal como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. O meio M15, por outro lado, teve uma relação C:N de 4,4 e foi composto por quitina coloidal como fonte primária de carbono, fontes adicionais de carbono e nitrogênio, sais minerais, vitaminas e aminoácidos.

Tabela 24 - Comparação da composição e relação C:N dos meios de cultivo M1 e M15 avaliados durante a seleção do meio de cultivo para produção de um coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

	M1	**M15**
Macronutrientes	Carbono	Carbono
	Hidrogênio	Hidrogênio
	Oxigênio	Oxigênio
	Nitrogênio	Nitrogênio
	Fósforo	Fósforo
	Enxofre	Enxofre
Micronutrientes	Magnésio	Magnésio
	Cálcio	Cálcio
	Potássio	Potássio
	Sódio	Sódio
	Cloro	Cloro
	Ferro	Ferro
Fontes Adicionais	-	Carbono
	-	Nitrogênio
	-	Enxofre
	-	Sais minerais
	-	Vitaminas
	-	Aminoácidos
Relação C:N	0,7	4,4

Nota: *Corn-Steep liquor* é uma fonte adicional bem balanceada em carbono, nitrogênio, enxofre e sais minerais, contendo ainda vitaminas, como riboflavina, niacina, ácido pantotênico, biotina e piridoxina. Peptona A possui também fontes de carbono, nitrogênio, aminoácidos e vitaminas.
FONTE: Cardozo, 2017.

Vários estudos têm avaliado a influência das fontes de nitrogênio na produção de quitinases (Tabela 25) e têm oferecido ótimas vantagens. No entanto, poucos estudos têm levado em consideração o balanço estequiométrico entre a disponibilidade e consumo de carbono e nitrogênio no meio de cultivo.

Tabela 25 - Comparação de alguns estudos realizados para avaliação da influência das fontes de nitrogênio na produção de quitinases.

Espécies	Fonte Primária de Carbono	Fonte Secundária de Carbono	Fonte Primária de Nitrogênio	Fonte Secundária de Nitrogênio	Referência
Aeromonas hydrophila HS4	Quitina Coloidal	Amido	Extrato de Malte	-	SAIMA e ROOHI, 2013
Aeromonas punctata HS6	Quitina Coloidal	Amido	Extrato de Leveduras	-	SAIMA e ROOHI, 2013
Aeromonas sp. ZD_05	Quitina Coloidal	-	Peptona	-	GHASEMI et al., 2012
B. thuringiensis C27/5	Quitina Coloidal	Amido	Extrato de Leveduras	-	STOYKOV et al., 2014
Bacillus licheniformis NM120–17	Quitina Coloidal	Lactose	Caseína	-	GOMAA, 2012
Bacillus thuringiensis NM101–19	Quitina Coloidal	Galactose	Caseína	-	GOMAA, 2012
Enterobacter sp. NRG4	Quitina (Flocos)	Farelo de Trigo	Quitina (Flocos)	-	DAHIYA et al., 2005
P. janthinellum P9	Quitina Coloidal	-	Quitina Coloidal	-	FENICE et al., 1998
Paenibacillus sp. Hul	Quitina (Pó)	-	Extrato de Leveduras	-	DE-HUI et al., 2011
S. marcescens QMB1466	Quitina Bioprocessada	-	Sulfato de Amônio	Extrato de Leveduras	GREEN et al., 2005
Streptomyces viridificans	Quitina Coloidal	Arabinose	Sulfato de Amônio	Extrato de Leveduras	GUPTA et al., 1995
T. harzianum NCIM 1185	Quitina (Flocos)	-	Sulfato de Amônio	-	FELSE; PANDA, 2000
T. harzianum TUBF 781	Quitina Coloidal	Farelo de Trigo	Extrato de Leveduras	Nitrato de Amônio	NAMPOOTHIRI et al., 2004

FONTE: Cardozo, 2017.

Os tipos de fontes de carbono e nitrogênio, tão bem como as relações C:N do meio de cultivo, têm influência no crescimento celular, na biossíntese de metabólitos e, como consequência, no custo do processo (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1996). Para obter melhores resultados na produção, pode-se conhecer a composição elementar da célula a ser utilizada no processo (bactérias, leveduras, bolores) e, assim, estimar a concentração dos nutrientes que irão compor o meio de cultivo (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008).

Uma célula bacteriana, por exemplo, é composta por cerca de 50% de carbono e 12% de nitrogênio. Além disso, sabe-se que em aerobiose, cerca de 50-60% do carbono e nitrogênio contido no meio de cultivo incorporam-se à plasticidade celular e, em anaerobiose apenas 10-20% (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008). Com essas informações, precisaríamos preparar um meio de cultivo contendo uma relação C:N de aproximadamente 4,2 e que 2,3 de C:N seriam necessários apenas para plasticidade celular em aerobiose e 0,6 de C:N em

anaerobiose. Em nossas avaliações, os meios de cultivo contendo menores relações C:N (M1, M2, M3 e M4) (Tabela 9) foram aqueles que mostraram as menores produções de quitinases. As relações desses meios de cultivo foram menores que 1,5, ou seja, bem abaixo das necessidades nutricionais de uma célula bacteriana (aprox. 4,2). Enquanto que o meio M15, apresentou uma relação C:N de 4,4, ou seja, dentro das necessidades nutricionais de uma célula bacteriana. Como base nessas diferenças, pode-se concluir que o meio M15 foi capaz de atender muito mais às exigências nutricionais de *A. caviae* CHZ306 que o meio M1 e permitir aumento da produção de quitinases. Além disso, esses resultados mostram a importância de se avaliar os componentes de um meio de cultivo para produção de quitinases, bem como fornecer concentrações adequadas dos nutrientes.

3.5.2 Determinação das condições de temperatura, pH e concentração de quitina para produção de um coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em *shaker*.

Definido o meio de cultivo, a segunda etapa do estudo teve como objetivo determinar as condições de temperatura, pH e concentração de quitina para produção de um coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306, em *shaker*. Para isso, aplicou-se a metodologia de superfície de resposta com três planejamentos fatoriais completos para identificar os fatores (ou variáveis independentes) que poderiam influenciar significativamente na produção de quitinases. As condições iniciais de temperatura e pH foram selecionadas de acordo com as faixas ótimas para o crescimento de *Aeromonas*, sendo de 22 a 37°C de temperatura (POPOFF, 1984) e de 4,5 a 9,0 de pH (PALUMBO et al., 1985). As concentrações de quitina coloidal utilizadas foram àquelas mais citadas na literatura.

As condições de cultivo, tais como temperatura, pH e concentração de quitina têm grande influência no cultivo de bactérias quitinolíticas. Essas condições podem afetar a estabilidade e disponibilidade de moléculas, a permeabilidade da membrana celular e, afetar o crescimento celular e produção de quitinases. Além disso, sabe-se que a concentração de quitina coloidal no meio de cultivo é um fator muito importante, pois ela atua como indutor da produção de quitinases em vários microrganismos (STOYKOV et al., 2015). Assim, vários estudos têm avaliado o efeito dessas variáveis na produção de quitinases (Tabela 26).

Tabela 26 - Comparação de alguns estudos realizados para avaliação dos efeitos das condições de temperatura, pH e concentração de quitina na produção de quitinases.

Espécies	Condições Avaliadas			Condições Determinadas			Quitinases ($U.mL^{-1}$)	Referência
	pH	Temp. (°C)	Quitina (%)	pH	Temp. (°C)	Quitina (%)		
Aeromonas hydrophila HS4	4-12	18-55	0,1-1,2	8,0	37	0,3	93,27	SAIMA e ROOHI, 2013
Aeromonas punctata HS6	4-12	18-55	0,1-1,2	7,0	37	0,3	73,43	SAIMA e ROOHI, 2013
Aeromonas sp. JK1	3-10	25-37	0,1-3	8,0	30	0,75	-	AHMADI et al., 2008
Aeromonas sp. ZD_05	5-9	25-37	0,5-2,5	7,0	30	1,0	-	GHASEMI et al., 2013
Bacillus laterosporous MML2270	4-10	20-40	0,1-0,5	8,0	35	0,3	59,05	SHANMUGAIAH et al., 2008
Bacillus licheniformis NM120–17	5-9	20-40	0,5-3,0	8,0	30	1,5	1,20	GOMAA, 2012
Bacillus pabuli K1	3-9	10-45	0,15	8,0	30	0,15	-	FRANDBERG e SCHNÜRER, 1994
Bacillus thuringiensis NM101–19	5-9	20-40	0,5-3,0	7,0	30	1,5	1,28	GOMAA, 2012
Bacillus thuringiensis R 176	3-9	25-60	0,5	7,0	37	0,5	-	CHAIHARN et al., 2013
Serratia Marcescens ATCC 27117	3-10	20-27	1,5	7,5	30	1,5	35,2	CHA et al., 2004
Serratia Marcescens KY	3-10	20-27	1,5	6,0 - 7,0	30	1,5	37,9	CHA et al., 2004

Nota: Os valores dos estudos, relacionados à produção quitinases, representam a atividade total de quitinases ($U.mL^{-1}$) e, foram quantificadas por diferentes métodos.
FONTE: Cardozo, 2017.

De maneira geral, *A. caviae* CHZ306 foi capaz de produzir endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases numa ampla faixa de temperatura (22 a 38 °C), pH (6 a 10) e concentração de quitina (1 a 7%) e mostrou que a produção de quitinases foi afetada pelas condições que envolveram a temperatura de 42 °C. Além disso, observou-se que a produção dos três tipos de quitinases por *A. caviae* CHZ306 aumentou juntamente com o aumento das variáveis avaliadas até atingir as melhores condições de cultivo, diminuindo logo após. Um exemplo desse comportamento pode ser observado no estudo realizado por Saima e Roohi (2013) durante a otimização da produção de quitinases por *A. hydrophila* HS4 e *A. punctata* HS6. Os autores observaram que a produção de quitinases diminuiu após as condições ótimas de temperatura (37 °C), pH (7 e 8) e concentração de quitina coloidal (0,3%) determinadas no estudo. Outros estudos envolvendo *Aeromonas* sp. JK1, *B. laterosporous* MML2270, *B. licheniformis* NM120-17, *B. pabuli* K1, *B. thuringiensis* NM101–19, *B. thuringiensis* R 176, *S. Marcescens* ATCC 27117 e *S. Marcescens* KY também apresentaram os mesmos comportamentos (Tabela 26).

As melhores condições para produção do coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306 em *shaker* foram: temperatura, 34 °C; pH inicial, 8,0 e; quitina coloidal, 5%. Essas condições, em comparação com as produções obtidas na padronização do meio de cultivo, reduziram o tempo inicial de produção do coquetel de proteínas de 96 para 36 h e aumentaram de 9,3 para 53,1 $U.L^{-1}$ (endoquitinases), de 16,4 para 55,1 $U.L^{-1}$ (quitobiosidases) e de 78,3

para 192,5 $U.L^{-1}$ (*N*-acetil-glicosaminidases) a produção de quitinases. Na tentativa de comparar esses resultados de produção de quitinases com os estudos da literatura, encontramos algumas dificuldades que estavam relacionadas às metodologias utilizadas para quantificação da atividade de quitinases e aos planejamentos experimentais utilizados para otimização das condições de cultivo.

A maioria dos estudos de produção de quitinases descritos na literatura utilizaram a atividade “total” de quitinases para avaliar o potencial quitinolítico das estirpes. Essa atividade é mensurada por metodologias que quantificam os açúcares redutores na amostra e, que apresentam algumas desvantagens, tais como: (1) não especificam quais quitinases atuaram no processo de hidrólise da quitina; (2) extremidades redutoras são afetadas pelo comprimento da cadeia lateral da quitina e; (3) a presença de açúcares redutores distintos da hidrólise da quitina podem "mascarar" a atividade de quitinases (STOYKOV et al., 2015). Com isso, torna-se difícil realizar uma comparação com nossos resultados de produção de quitinases, pois fizemos o uso de uma metodologia baseada na utilização de substratos cromôgenicos para quantificação da atividade das três principais enzimas envolvidas na hidrolise de quitina (endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases).

Outro ponto observado esteve relacionado à ausência de planejamentos experimentais para avaliar a influência das diferentes condições de cultivo na produção de quitinases. Em nosso estudo, por exemplo, aplicou-se um experimento de superfície de resposta, um tipo de experimento muito útil para o desenvolvimento, melhora e otimização de processos e que utiliza um conjunto de técnicas avançadas de planejamento de experimentos que ajudam a entender e otimizar melhor a resposta (BEZERRA et al., 2008; PEREIRA; BON; FERRARA, 2008). Já na maioria dos estudos de produção de quitinases encontrados na literatura (Tabela 26), as variáveis foram avaliadas individualmente até determinarem as “condições ótimas” para produção. Um exemplo clássico desse tipo de avaliação pode ser visualizado também no estudo realizado por Saima e Roohi (2013) com *A. hydrophila* HS4 e *A. punctata* HS6. Esses pesquisadores avaliaram as condições de cultivo para produção de quitinases basicamente em 4 etapas: Avaliação do efeito do tempo de incubação na produção de quitinases; Avaliação do efeito da temperatura na produção de quitinases, no tempo determinado; Avaliação do efeito do pH na produção de quitinases, na temperatura e tempo determinado; Avaliação do efeito de diferentes concentrações de quitina coloidal na produção de quitinases, no de pH, temperatura e tempo de incubação determinado. Como pode ser observado, as variáveis desse estudo foram avaliadas individualmente, não sendo possível estudar a interação entre elas, o que por muitas vezes pode influenciar significativamente no aumento da produção. Além disso,

intervalos largos de temperatura foram utilizados, excluindo condições que poderiam proporcionar uma maior produção de quitinases. O mesmo tipo de avaliação por ser observado em estudos com *Aeromonas* sp. JK1, *B. laterosporous* MML2270, *B. licheniformis* NM120-17, *B. thuringiensis* NM101–19 e *B. thuringiensis* R 176 (Tabela 26).

Como base nessas informações, podemos concluir que nosso estudo foi realizado de uma maneira distinta dos trabalhos relatados na literatura, mas o tipo de avaliação utilizada nos permitiu avaliar a influência das condições de temperatura, pH e concentração de quitina na produção de endoquitinases, quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases por *A. caviae* CHZ306, bem como, conhecer o comportamento e produção de quitinases ao longo do tempo de cultivo. Além disso, mostram a importância e a necessidade da utilização de desenhos experimentais para alcançar maiores rendimentos de produção de enzimas, utilizando menor número de experimentos.

3.5.3 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para produção de coquetel de quitinases por *Aeromonas caviae* CHZ306, em biorreator

Sabe-se que, nas células de metabolismo aeróbio, o oxigênio é especialmente utilizado como aceptor final de elétrons, participando, ao término da cadeia respiratória, na reoxidação de co-enzimas e resultando na produção de ATP (MADIGAN et al., 2015). Por outro lado, este elemento é pouco solúvel em água, sendo o valor da sua concentração de saturação na ordem de 7 $mgO_2.L^{-1}$ (7 ppm), ao se borbulhar ar atmosférico a pressão de 1 atm e a 35 °C (SCHMIDELL, 2001). Em virtude disto, torna-se impossível fornecer de uma só vez todo o oxigênio necessário a uma cultura microbiana, devendo o mesmo ser continuamente suprido ao biorreator ao longo do processo fermentativo (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008).

A extensão de um processo descontínuo aeróbio e, por conseguinte, a obtenção de elevadas concentrações do produto desejado, depende enormemente da capacidade de se transferir O_2 para a fase líquida, especialmente nos instantes mais avançados do processo, em que a concentração celular pode ser elevada (SCHMIDELL, 2001; PEREIRA; BON; FERRARA, 2008). O objetivo central do sistema de agitação e aeração é exatamente esse, transferir o oxigênio da fase gasosa para o líquido, fazendo com que esse oxigênio dissolvido chegue às células suspensas, penetre nestas células e, finalmente, seja consumido na reação (SCHMIDELL, 2001; PEREIRA; BON; FERRARA, 2008). Dessa maneira, avaliou-se nessa

etapa do estudo os efeitos das velocidades de agitação e de aeração (expressos em função do k_La) na produção de um coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306, em biorreator. Para isso, diferentes velocidades de agitação (150, 250 e 350 rpm) e taxas de aeração (0,25, 1,00 e 1,75 vvm) foram avaliadas.

De acordo com nossos resultados, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) não influenciou significativamente no aumento da produção de quitinases por *A. caviae* CHZ306, mas reduziu o tempo de produção do coquetel de quitinases de 36 para 12 horas, nas condições definidas nessa etapa (concentração de quitina, 5%; pH, 8,0; temperatura, 34 °C; e k_La, 55 h^{-1}). Resultados similares foram descritos por Fleuri et al., (2009), os quais observaram que o aumento da taxa de aeração de 1,5 vvm para 3,0 vvm em fermentador não aumentou significativamente a produção de quitinases por *C. celulans* 191, mas diminui o tempo necessário para obtenção do rendimento máximo de quitinases (de 168 para 144 h de cultivo).

Observou-se também em nosso estudo que a produção de quitinases por *A. caviae* CHZ306 foi afetada pelas condições extremas de agitação (150 e 350 rpm) e aeração (0,25 e 1,75 vvm) avaliadas. As baixas velocidades de agitação e aeração aqui aplicadas (150 rpm e 0,25 vvm) podem ter feito com que as células ficassem aderidas na parede do reator e, juntamente com a insolubilidade da quitina coloidal, podem ter sido insuficientes para a homogeneização completa do cultivo, obtendo com isso, baixas produções de quitinases. Outro motivo pode estar relacionado ao baixo valor de k_La desse experimento (8,3 h^{-1}), sendo suficiente para o crescimento celular, mas não para aumentar a biossíntese de quitinases. Já com relação às altas velocidades de agitação e aeração (350 rpm e 1,75 vvm), à baixa produção de quitinases pode ter ocorrido devido ao fato que, aumentando demasiadamente a velocidade de agitação, pode ocorrer o dano físico nas células e diminuição da produtividade (ROSA et al., 2005). Além disso, embora tenha sido relatado que o oxigênio dissolvido tenha influência no aumento da produção de quitinases (FLEURI et al., 2009; KAO et al., 2007; STOYKOV et al., 2015), este elemento, em elevadas concentrações, pode também inibir a biossíntese de enzimas (BAEZ; SHILOACH, 2014).

Resultados similares aos encontrados em nosso estudo foram descritos por Kao et al., (2007), os quais avaliaram diferentes velocidades de agitação (100, 200 e 300 rpm) e aeração (1, 2 e 3 vvm) na produção de quitinases por *Paenibacillus* sp. CHE-N1. Nesse estudo, os autores obtiveram os menores rendimentos de quitinases nas velocidades de 100 e 300 rpm, supostamente devido a incompleta homogeneização e limitada transferência de oxigênio no cultivo na menor taxa de agitação e ao estresse de cisalhamento na alta agitação.

De acordo com nossos resultados, é possível concluir que o oxigênio dissolvido tem influência na biossíntese de quitinases por *A. caviae* CHZ306, o que por sua vez também pode afetar a produtividade dessas enzimas. Além disso, embora o aumento das velocidades de agitação e taxas de aeração possam proporcionar melhores efeitos de homogeneização e transferência de massa em meios de cultivo contendo quitina coloidal, o excesso pode resultar no dano físico das células e diminuir a produtividade de quitinases. Assim, torna-se essencial avaliar o efeito das velocidades de agitação e taxas de aeração em biorreator em estudos para otimização das condições de cultivo de bactérias quitinolíticas e produção de quitinases, bem como correlacionar essas variáveis com o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La).

CONCLUSÕES

- Um meio de cultivo contendo *corn-steep liquor* e peptona A (2:1) como fontes adicionais de carbono e nitrogênio foi selecionado para a produção de um coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306. A avaliação mostrou que fontes adicionais de carbono e nitrogênio, bem como a realização do balanço estequiométrico entre a disponibilidade e consumo de carbono e nitrogênio no meio de cultivo podem aumentar significativamente a produtividade de quitinases.

- As condições de temperatura (34 °C), pH (8,0) e concentração de α-quitina coloidal (5%) para produção de um coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306 foram determinadas, permitindo o aumento da produção de quitinases e redução do tempo inicial de produção do coquetel de proteínas de 96 para 36 h.

- A influência do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) na produção de um coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306 em biorreator foi estudada, mostrando que o k_La não influenciou significativamente no aumento da produção de quitinases, mas reduziu o tempo inicial de produção do coquetel de 36 para 12 horas. O k_La para produção do coquetel de proteínas em biorreator foi de 55 h^{-1}, com 250 rpm de agitação e 1,75 vvm de aeração.

CAPÍTULO 4 - PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE *N*-ACETIL-GLICOSAMINA UTILIZANDO COQUETEL DE PROTEÍNAS PRODUZIDO POR *Aeromonas caviae* CHZ306

4.1 INTRODUÇÃO

N-acetil-glicosamina (GlcNAc) é um valioso agente farmacológico para o tratamento de osteoartrite e doenças inflamatórias intestinais, incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn (CHEN et al., 2010a). Tem sido tradicionalmente produzida por processos que envolvem a hidrólise ácida da quitina, no entanto, os processos geralmente aplicados são prejudiciais ao ambiente, apresentam baixos rendimentos e custos elevados (SHASHIWA et al., 2001; CHEN et al., 2010a). Dessa maneira, a produção enzimática de GlcNAc representa uma alternativa sustentável aos processos atuais (JUNG e PARK, 2014).

Apenas algumas preparações enzimáticas para a produção industrial de GlcNAc estão atualmente disponíveis (CHEN et al., 2010a). Os principais impedimentos para que esse processo de hidrólise enzimática seja aplicado têm sido a composição das preparações enzimáticas, a produção de compostos secundários e a susceptibilidade hidrolítica da quitina (CHEN et al., 2010a; JUNG e PARK, 2014; PICHYANGKURA et al., 2002).

As preparações enzimáticas devem ser constituídas por quantidades adequadas de determinadas enzimas, tais como endoquitinases, quitobiosidaseses e *N*-acetil-glicosaminidases para que ocorra a despolimerização completa da quitina (CHEN et al., 2010a; PICHYANGKURA et al., 2002; SASHIWA et al., 2002). Quando essas enzimas estão ausentes ou em quantidades inadequadas nas preparações enzimáticas, estas podem reduzir os rendimentos de GlcNAc e/ou gerar produtos secundários da hidrolise, tais como quitooligossacarídeos (CHEN et al., 2010a). Além disso, as diferentes proteínas que constituem as preparações enzimáticas podem apresentar diferentes condições ótimas para a produção de GlcNAc. Dessa maneira, a composição e a determinação das condições da preparação enzimática, para a hidrólise de quitina, são de extrema importância para a obtenção de maiores rendimentos do produto.

A susceptibilidade hidrolítica da quitina, a qual é extremamente baixa devido à sua elevada cristalinidade, é o principal impedimento na produção de GlcNAc (CHEN et al., 2010a; JUNG e PARK, 2014; PICHYANGKURA et al., 2002). Essa susceptibilidade limita a acessibilidade das quitinases as ligações β-glicosidicas na molécula de quitina, produzindo baixos rendimentos e longos períodos de hidrólise. Assim, a busca por diferentes formas de

quitina e preparações enzimáticas que possibilitem a produção direta de GlcNAc têm sido os principais motivos dos estudos de produção de GlcNAc .

Dessa maneira, essa etapa do estudo teve como objetivo determinar as condições de produção de GlcNAc a partir de α-quitina coloidal, utilizando um coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306. Condições de temperatura, pH, concentração do coquetel de proteínas e α-quitina coloidal foram verificadas. Além disso, avaliou-se a produção de GlcNAc, em função do tempo e condições determinadas, com três formas de quitina (α e β-quitina e α-quitina coloidal).

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo geral

Determinar as condições de produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina a partir de α-quitina coloidal, utilizando um coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306.

4.2.2 Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições de temperatura e pH para produção de *N*-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por *A. caviae* CHZ306;
- Avaliar a concentração do coquetel de proteínas produzido por *A. caviae* CHZ306 para produção de *N*-acetil-glicosamina;
- Determinar a melhor concentração de α-quitina coloidal para produção de *N*-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por *A. caviae* CHZ306;
- Avaliar a produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina, em função do tempo, utilizando coquetel de proteínas produzido por *A. caviae* CHZ306;

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Avaliação das condições de hidrólise de α-quitina coloidal para produção de *N*-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306

4.3.1.1 Preparação do coquetel de proteínas por Aeromonas caviae CHZ306

O coquetel de proteínas, contendo quitinases, foi preparado de acordo com as condições definidas no capitulo 3. Para isso, 1,0 mL da suspensão bacteriana, armazenada em 20% de glicerol (Item 3.3.1), foi inoculado em frasco *Schott* de 250 mL contendo 200 mL do meio de cultivo preparado com a seguinte composição por litro: Peptona A, 0,54 $g.L^{-1}$; *Corn-Steep Liquor*, 1,87 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4, 0,2 $g.L^{-1}$; K_2HPO_4, 1,6 $g.L^{-1}$; $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 $g.L^{-1}$; NaCl, 0,1 $g.L^{-1}$; $FeSO_4.7H_2O$, 0,01 $g.L^{-1}$; $CaCl_2.2H_2O$, 0,02 $g.L^{-1}$; quitina coloidal, 50,0 $g.L^{-1}$, com pH inicial ajustado para 8,0, e incubado a 34 °C sob agitação constante a 180 rpm por 16 horas. Após esse período, os 200 mL deste pré-inóculo bacteriano (aprox. 5,0 x 10^5 $UFC.mL^{-1}$) foram vertidos assepticamente na dorna de 3 L do biorreator de bancada BioFlo 110 (New Brunswick, Edison, NJ, Estados Unidos), contendo 1,8 L do mesmo meio de cultivo e incubado a 34 °C por 12 h com 250 rpm de agitação e 1,75 vvm de aeração (k_La 55 h^{-1}).

Após o periodo de 12 h, o sobrenadante foi utilizado para recuperação das proteínas (item 2.3.4.2). As atividades de endo e exoquitinases (quitobiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases) e teor de proteínas totais foram determinados segundo o item 2.3.4.3. Cinco coquetéis proteínas contendo diferentes concentrações (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 $g.L^{-1}$) foram preaparados, armazenados em freezer a -20 °C e, utilizados para os experimentos de avaliação das condições para produção de *N*-acetil-glicosamina.

As concentrações de endoquitinases, quitibiosidases e *N*-acetil-glicosaminidases de cada um dos cinco coquetéis de proteínas podem ser observadas na Tabela 27.

Tabela 27 - Atividade de endoquitinases, quitobiosidades e *N*-acetil-glicosaminidases dos coquetéis de proteínas utilizados para o estudo de produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina.

Coquetel de Proteínas	Proteínas Totais ($g.L^{-1}$)	Atividade de Quitinases ($U.L^{-1}$)			Atividade Específica de Quitinases ($U.g^{-1}$ de proteínas)		
		Endoquitinase	Quitobiosidase	*N*-acetil-glicosaminidase	Endoquitinase	Quitobiosidase	*N*-acetil-glicosaminidase
1	0,5	67	113	343	134	226	686
2	1,0	126	217	661	126	217	661
3	1,5	208	331	1079	139	221	719
4	2,0	279	455	1401	140	228	701
5	2,5	332	561	1668	133	224	667

FONTE: Cardozo, 2017.

*4.3.1.2 Determinação das c*ondições de temperatura e pH para produção de *N*-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae CHZ306*

Diferentes condições de temperatura (28, 31, 34, 37, 40, 46 e 49 °C) e pH (4, 5, 6, 7 e 8) foram utilizadas para avaliar o efeito dessas variáveis na produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina, utilizando um coquetel de proteínas produzido por *A. caviae* CHZ306.

As reações de hidrólise enzimática de α-quitina foram realizadas em um volume final de 1 mL, contendo 3% de α-quitina coloidal (m/v) em solução tampão de KH_2PO_4 50 mM e coquetel de proteínas (0,5 $g.L^{-1}$ de proteínas totais). Os coquetéis foram adicionados na proporção 1:10.

As reações foram realizadas em triplicata e incubadas em termomixer com agitação constante a 1.000 rpm por 6 h. Após esse período, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos para desnaturação das enzimas e, transferidas para vials com capacidade de 2,0 mL (Allcrom, São Paulo, SP, Brasil) através de unidades filtrantes de 13 mm de diâmetro. As unidades filtrantes foram constituídas de membranas de Nylon com poro de 0,22 μM (Allcrom).

N-acetil-glicosamina foi quantificada por HPLC, como descrito no item 2.3.4.4.

4.3.1.3 Determinação da concentração do coquetel de proteínas produzido por Aeromonas caviae CHZ306, para produção de N-acetil-glicosamina.

Coquetéis com diferentes concentrações de proteínas (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 $g.L^{-1}$), produzido por *A. caviae* CHZ306, foram utilizados para avaliar o efeito dessa variável na produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina.

As reações de hidrólise enzimática de α-quitina foram realizadas em um volume final de 1 mL, contendo 10% de α-quitina coloidal (m/v) em solução tampão de KH_2PO_4 50 mM (pH 6,0) e diferentes concentrações de coquetel de proteínas (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 $g.L^{-1}$ de proteínas totais). Os coquetéis foram adicionados na proporção de 1:10.

As reações foram realizadas em triplicata, incubadas a 46 °C em termomixer com agitação constante a 1.000 rpm por 6 h e, analisadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h. Após término das reações, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos para desnaturação das enzimas e, transferidas para vials com capacidade de 2,0 mL (Allcrom, São Paulo, SP, Brasil) através de unidades filtrantes de 13 mm de diâmetro. As unidades filtrantes foram constituídas de membranas de Nylon com poro de 0,22 μM (Allcrom).

N-acetil-glicosamina foi quantificada por HPLC, como descrito no item 2.3.4.4.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância de um fator (ANOVA) seguida pelo Pós-Teste de Tukey para determinar as diferenças significativas entre os rendimentos e produtividades. Diferenças significativas foram definidas como $p < 0,05$.

4.3.1.4 Determinação da concentração de α-quitina coloidal para produção de N-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por Aeromonas caviae CHZ306

Diferentes concentrações de α-quitina coloidal foram utilizadas para avaliar o efeito dessa variável na produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina, utilizando um coquetel de proteínas produzido por *A. caviae* CHZ306.

As reações de hidrólise enzimática de α-quitina foram realizadas em um volume final de 1 mL, contendo diferentes concentrações de α-quitina coloidal (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10%) (m/v) em solução tampão de KH_2PO_4 50 mM (pH 6,0) e coquetel de proteínas (1,5 $g.L^{-1}$ de proteínas totais). Os coquetéis foram adicionados na proporção de 1:10.

As reações foram realizadas em triplicata e incubadas a 46 °C em termomixer com agitação constante a 1.000 rpm por 6 h. Após esse período, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos para desnaturação das enzimas e, transferidas para vials com capacidade de 2,0 mL (Allcrom, São Paulo, SP, Brasil) através de unidades filtrantes de 13 mm de diâmetro.

As unidades filtrantes foram constituídas de membranas de Nylon com poro de 0,22 μM (Allcrom).

N-acetil-glicosamina foi quantificada por HPLC, como descrito no item 2.3.4.4 e o peso seco da α-quitina coloidal foi verificado e utilizado para os cálculos de conversão de quitina em GlcNAc, de acordo com o item 2.3.5.

4.3.1.5 Avaliação da produção de N-acetil-glicosamina por hidrólise enzimática de α-quitina coloidal, utilizando coquetel de proteínas produzido por Aeromonas caviae CHZ306

A produção de *N*-acetil-glicosamina em função do tempo de reação enzimática de α-quitina coloidal foi avaliada utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306.

As reações de hidrólise enzimática de α-quitina foram realizadas em um volume final de 1 mL, contendo 5% de α-quitina coloidal (m/v) em solução tampão de KH_2PO_4 50 mM (pH 6,0) e coquetel de proteínas (1,5 $g.L^{-1}$ de proteínas totais). Adicionalmente, reações contendo α e β-quitina em pó como substrato foram preparadas. Os coquetéis de proteínas foram adicionados na proporção 1:10 e a β-quitina, extraída de gládios de lula, foi cedida pelo grupo de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Dr. Sérgio Paulo Campana Filho.

As reações foram realizadas em triplicata, incubadas a 46 °C em termomixer com agitação constante a 1.000 rpm por 48 h e, e, analisadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h. Após término das reações, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos para desnaturação das enzimas e, transferidas para vials com capacidade de 2,0 mL (Allcrom, São Paulo, SP, Brasil) através de unidades filtrantes de 13 mm de diâmetro. As unidades filtrantes foram constituídas de membranas de Nylon com poro de 0,22 μM (Allcrom).

N-acetil-glicosamina foi quantificada por HPLC, como descrito no item 2.3.4.4 e o peso seco da α-quitina coloidal foi verificado e utilizado para os cálculos de conversão de quitina em GlcNAc, de acordo com o item 2.3.5.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância de um fator (ANOVA) seguida pelo Pós-Teste de Tukey para determinar as diferenças significativas entre os rendimentos e produtividades. Diferenças significativas foram definidas como $p < 0,05$.

4.4 RESULTADOS

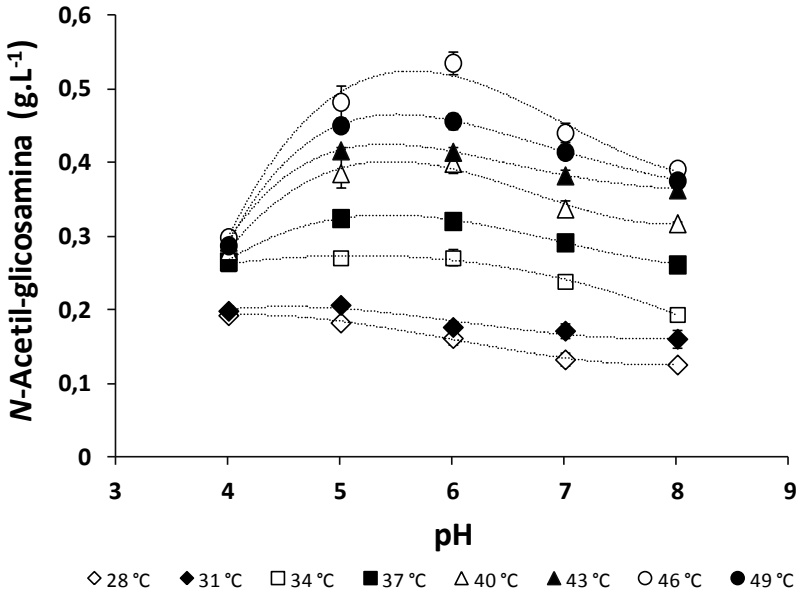
4.4.1 Determinação das condições de temperatura e pH para produção de *N*-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306

O efeito de diferentes condições de temperatura e pH na produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina foi avaliado utilizando coquetel de proteínas (contendo quitinases) produzido por *A. caviae* CHZ306. Para avaliar esse efeito, reações contendo 3% de α-quitina coloidal foram incubadas em diferentes condições de temperatura (28-49 °C) e pH (4-8) por 6 h.

De acordo com os resultados (Figura 36), GlcNAc foi produzida numa ampla faixa de temperatura (28-49 °C) e pH (4-8), atingindo maior produção na temperatura de 46 °C em pH 6. Nessas condições, a produção de GlcNAc foi de 0,536 $g.L^{-1}$.

De maneira geral, observou-se que a produção de GlcNAc aumentou em função do aumento da temperatura, até atingir a produção máxima a 46 °C e, dimunuindo a 49 °C. Temperaturas de 47 e 48 °C também foram avaliadas para verificar a possibilidade de aumento da produção, entretanto, não apresentaram melhores resultados. Já em relação ao pH, observaram as menores produções nos pH 4 e 8.

Figura 36 - Efeito da temperatura e pH na produção de *N*-acetil-glicosamina utilizando quitinases de *Aeromonas caviae* CHZ306.



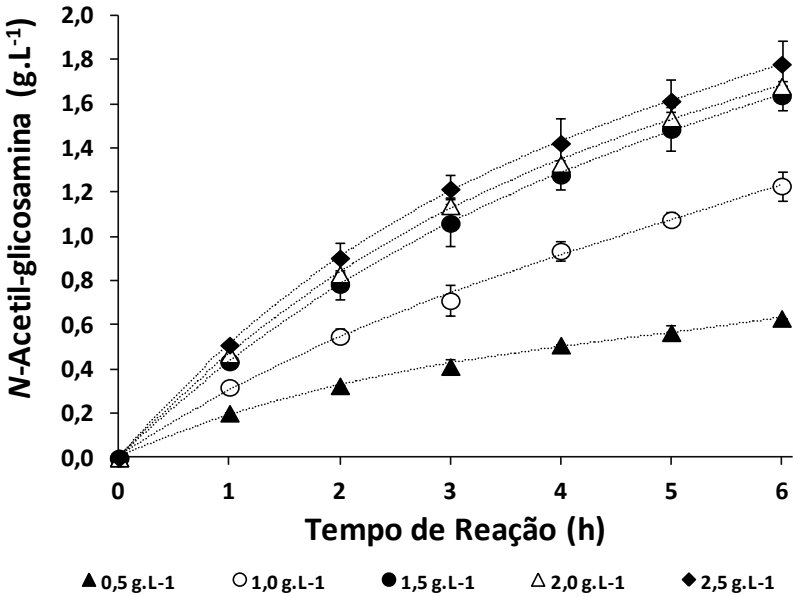
FONTE: Cardozo, 2017.

4.4.2 Determinação da concentração do coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306, para produção de *N*-acetil-glicosamina.

O efeito das diferentes concentrações do coquetel de proteínas (contendo quitinases), produzido por *A. caviae* CHZ306 foi avaliado na produção enzimática de GlcNAc. Para avaliar esse efeito, reações contendo 10% de α-quitina coloidal e diferentes concentrações de coquetel de proteínas (0,5-2,5 $g.L^{-1}$), em pH 6,0, foram incubadas a 46°C durante 6 h.

Como pode ser observado na Figura 37, a produção de GlcNAc aumentou de acordo com o aumento das concentrações do coquetel de proteínas. Os resultados mostraram que quanto maior a concentração do coquetel de proteínas, maior a produção de GlcNAc. Os três maiores rendimentos de GlcNAc após 6 h de reação (1,64, 1,68 e 1,78 $g.L^{-1}$) foram obtidos com os coquetéis com 1,5 2,0 e 2,5 $g.L^{-1}$ de proteínas. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticamente significativas ($p > 0,05$) entre os rendimentos produzidos por esses coquetéis. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) foram observadas entre os coquetéis com 0,5, 1,0 e 1,5 $g.L^{-1}$, entretanto, os coquetéis com 0,5 e 1,0 $g.L^{-1}$ de proteínas mostraram os menores rendimentos (0,63 e 1,23 $g.L^{-1}$) de GlcNAc após 6 h de reação. Assim, selecionamos para a próxima etapa do estudo, o coquetel com 1,5 $g.L^{-1}$ de proteínas, por ser aquele com menor concentração de proteínas dentre os coquetéis que proporcionaram melhores rendimentos de GlcNAc.

Figura 37 - Efeito das concentrações de proteínas na produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina, em função do tempo de incubação, utilizando quitinases de *Aeromonas caviae* CHZ306.



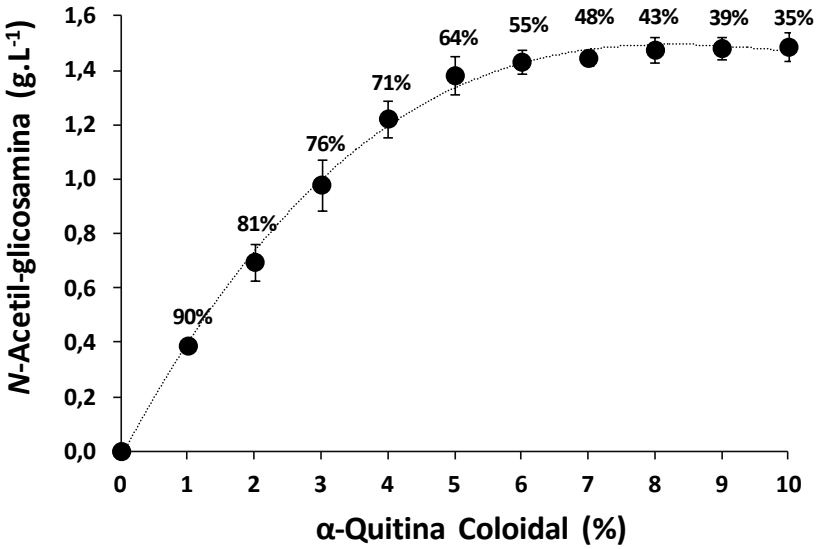
FONTE: Cardozo, 2017.

4.4.3 Determinação da concentração de α-quitina coloidal para produção de N-acetil-glicosamina, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306

O efeito das diferentes concentrações de α-quitina coloidal na produção enzimática de GlcNAc foi avaliado utilizando coquetel de proteínas (contendo quitinases) produzido por *A. caviae* CHZ306. Para avaliar esse efeito, reações contendo diferentes concentrações de α-quitina coloidal (1-10%) e coquetel com 1,5 $g.L^{-1}$ de proteínas, em pH 6,0, foram incubadas a 46°C por 6 h.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 38), observou-se que a produção de GlcNAc aumentou em função do aumento da concentração de α-quitina coloidal até atingir 5%, estabilizando nas concentrações de 6-10%. Os rendimentos de GlcNAc na faixa estável de produção (5-10% de α-quitina coloidal) foram de 1,38-1,48 $g.L^{-1}$ e, não mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre eles. Dessa maneira, por apresentar menor concentração e rendimento de GlcNAc equivalente às demais concentrações (6-10%), 5% de α-quitina coloidal foi a concentração identificada como a mais adequada para produção enzimática de GlcNAc, utilizando coquetel de quitinases por *A. caviae* CHZ306.

Figura 38 - Efeito da concentração de quitina na produção enzimática de *N*-acetil-glicosamina utilizando quitinases de *Aeromonas caviae* CHZ306.



Nota: Os valores de porcentagens representam as taxas de conversão de α-quitina coloidal em GlcNAc. Um % de α-quitina coloidal correspondeu a 0,4 $g.L^{-1}$ de α-quitina (massa seca).
FONTE: Cardozo, 2017.

4.4.4 Avaliação da produção de *N*-acetil-glicosamina durante a hidrólise de α-quitina coloidal, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306

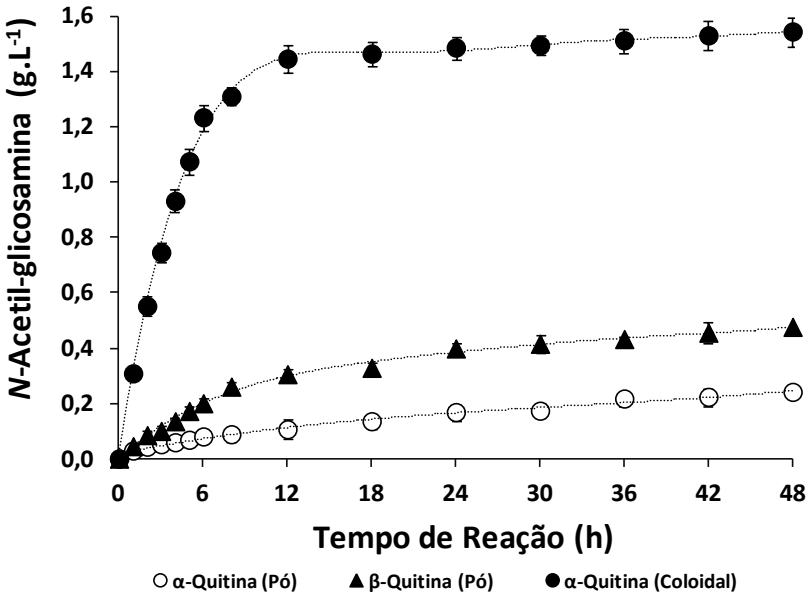
A produção de GlcNAc foi avaliada em função do tempo de reação enzimática de α-quitina coloidal, utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306. Para isso, reações contendo 5% de α-quitina coloidal e coquetel com 1,5 $g.L^{-1}$ de proteínas, em pH 6,0, foram incubadas a 46°C por 48 h. A massa seca da α-quitina coloidal (2,0 $g.L^{-1}$) foi obtida e utilizada para os cálculos de conversão de α-quitina em GlcNAc. Adicionalmente, reações contendo α e β-quitina em pó como substrato foram preparadas a fim de avaliar as diferenças de produção entre essas três formas de substrato.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 39), a maior produção de GlcNAc foi obtida com α-quitina coloidal, atingindo rendimentos de aproximadamente 1,5 $g.L^{-1}$ após 12 h de reação enzimática. Os rendimentos de GlcNAc a partir de α e β-quitina em pó foram bem menores que aqueles obtidos com α-quitina coloidal, atingindo rendimentos máximos de apenas 0,24 $g.L^{-1}$ (α-quitina) e 0,48 $g.L^{-1}$ (β-quitina) após 48 h de reação enzimática. As diferenças entre os rendimentos de GlcNAc obtidos com α-quitina coloidal e essas duas formas de quitina atingiram o valor máximo de 93% (α-quitina) e 79% (β-quitina) com 12 h de reação.

De modo geral, a produção de GlcNAc a partir de α-quitina coloidal aumentou nas primeiras 12 h, mantendo-se estável após esse período até 48 h de reação. A taxa de conversão de α-quitina coloidal em GlcNAc (Figura 40) foi de 67% às 12 h de reação, com produção de 1,45 $g.L^{-1}$ de GlcNAc. Após esse período (12-48 h), as taxas de conversão de α-quitina coloidal estiveram entre 67-71%, com concentrações entre 1,45-1,55 $g.L^{-1}$ de GlcNAc. As taxas de conversão de α-quitina coloidal e os rendimentos de GlcNAc no período de 12-48 h não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre elas.

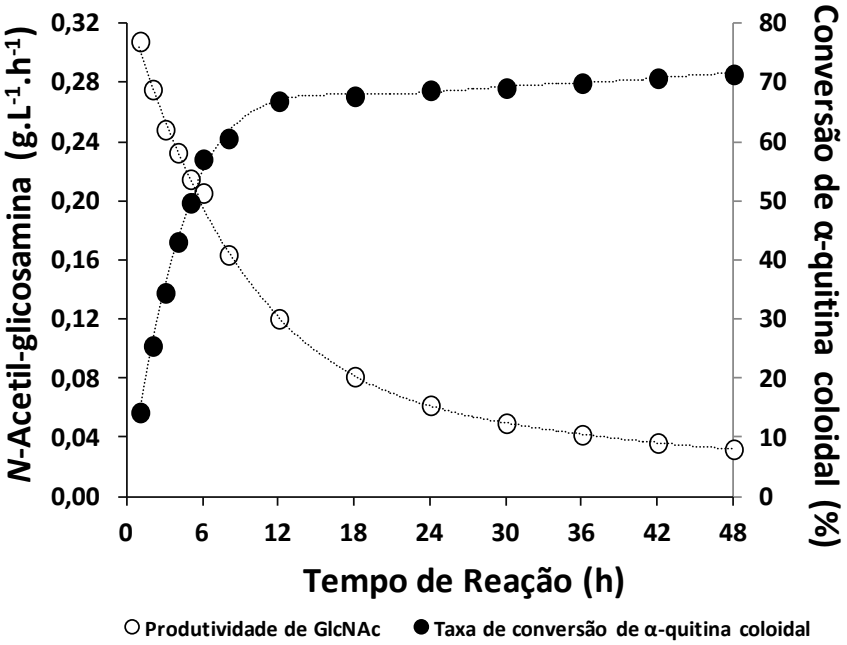
Com relação à produtividade (Figura 40), observou-se o maior valor na primeira hora de reação (0,31 $g.L^{-1}.h^{-1}$), com diminuição progressiva ao longo de 48 h. Nas primeiras 6 h, a produtividade esteve entre 0,31 e 0,21 $g.L^{-1}.h^{-1}$, atingindo o menor valor após 48 h de reação (0,03 $g.L^{-1}.h^{-1}$).

Figura 39 - Produção de *N*-acetil-glicosamina a partir de diferentes formas de quitina utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306.



FONTE: Cardozo, 2017.

Figura 40 – Produtividade e taxa de conversão de α-quitina coloidal em *N*-acetil-glicosamina utilizando coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306.



Legenda: [○] Produtividade, em $g.L^{-1}.h^{-1}$, de *N*-acetil-glicosamina; [●] Taxa de conversão, em porcentagem, de α-quitina coloidal em *N*-acetil-glicosamina.
FONTE: Cardozo, 2017.

4.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

GlcNAc é um valioso agente farmacológico para o tratamento de osteoartrite e doenças inflamatórias intestinais, incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn (CHEN et al., 2010a). Tem sido tradicionalmente produzido por processos que envolvem a hidrólise ácida da quitina, no entanto, os processos geralmente aplicados mostram-se prejudiciais ao ambiente, apresentam baixos rendimentos e custos elevados (SHASHIWA et al., 2001; CHEN et al., 2010a). Dessa maneira, a produção enzimática de GlcNAc representa uma alternativa sustentável aos processos atuais (JUNG e PARK, 2014).

Neste estudo, GlcNAc foi produzida a partir de α-quitina coloidal utilizando coquetel de proteínas produzido por *A. caviae* CHZ306. Procedimentos padrões para a determinação das condições ótimas de atividade enzimática foram utilizados para identificar as melhores condições de produção de GlcNAc. Primeiramente as condições de temperatura e pH foram determinadas, mostrando que o coquetel de proteínas foi capaz de produzir GlcNAc numa ampla faixa de temperatura (28-49°C) e pH (4-8). Posteriormente, avaliou-se o efeito das concentrações do coquetel de proteínas, mostrando que a produção de GlcNAc aumentou de acordo com o aumento das concentrações, mas que altas concentrações de proteínas não influenciaram nos rendimentos de GlcNAc, possivelmente por serem inibidas por produdos da hidrólise de quitina (ANDERSEN et al., 2005; JAMIALAHMADI et al., 2001; MACDONALD et al., 2010). Em seguida, avaliou-se o efeito das concentrações de α-quitina coloidal na produção de GlcNAc e, observou-se a tradicional resposta com formação de uma hipérbole, indicando que a produção aumentou conforme o aumento das concentrações de α-quitina coloidal até atingir um patamar onde todas as enzimas estavam ligadas aos substratos (JOHNSON; GOODY, 2011). Para finalizar, a produção de GlcNAc foi avaliada em função do tempo nas condições de temperatura (46 °C), pH (6,0), concentração de proteínas (1,5 $g.L^{-1}$) e α-quitina coloidal (5%) determinadas. Essas condições possibilitaram a conversão máxima de 67% de α-quitina e produtividade máxima de 0,31 $g.L^{-1}.h^{-1}$ de GlcNAc.

Estudos similares de conversão de α-quitina em GlcNAc, utilizando extrato bruto de quitinases têm sido observados na literatura. Como pode ser observado na Tabela 28, os rendimentos máximos de GlcNAc descritos nos estudos da literatura foram obtidos em períodos que variaram de 1 a 10 dias, enquanto que em nosso estudo, obteve-se o rendimento máximo após 12 h de reação. A taxa de conversão máxima de α-quitina coloidal (67%) obtida em nosso estudo não foi uma das maiores entre os estudos realizados. No entanto, nossos resultados mostraram que é possível obter rendimentos de aproximadamente 90% quando 1%

de α-quitina coloidal é utilizado nas reações (Figura 38). A produtividade máxima de GlcNAc (0,31 $g.L^{-1}.h^{-1}$) foi obtida na primeira hora de reação, sendo superior aos estudos realizados com *A. hydrophyla* H2330, *Aeromonas* sp. GJ-18 (com nove dias de reação), *Burkholderia cepacia* TU09, *Bacillus licheniformis* SK-1 e *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424. Produtividades obtidas com *Aeromonas* sp. GJ-18 (com cinco dias de reação) (0,35 $g.L^{-1}.h^{-1}$) e *Aeromonas* sp. PTCC1691 (0,35 $g.L^{-1}.h^{-1}$) foram maiores que a obtida em nosso estudo, mas bem próximas dos nossos resultados.

Tabela 28 - Comparativo da produtividade de alguns estudos de conversão de α-quitina em *N*-acetil-glicosamina utilizando extrato bruto de quitinases.

Organismo	Tipo de α-quitina	Tempo de Produção máxima	Conversão máxima de quitina (%)	Produtividade máxima ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Referência
A. hydrophyla H2330	Flocos e pó	10 dias	64-77	0,013-0,016	Sashiwa et al. 2002
Aeromonas sp. GJ-18	Coloidal	5 dias	83	0,35	Kuk et al. 2005
		9 dias	94.9	0,22	
Aeromonas sp. PTCC1691	Coloidal	24 h	79	0,33	Jamialahmadi et al. 2011
Burkholderia cepacia TU09	Pó	7 dias	85	0,17	Pichyangkura et al. 2002
Bacillus licheniformis SK-1	Pó	6 dias	41	0,03	Pichyangkura et al. 2002
Paenibacillus illinoisensis KJA-424	Coloidal	24 h	62.2	0,07	Jung et al. 2007
***A. caviae* CHZ306**	Coloidal	**12 h**	**67**	**0,31**	**Este estudo**

FONTE: Cardozo, 2017.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos destacar alguns pontos que devem receber atenção durante o desenvolvimento dos processos de produção de GlcNAc. Esses pontos incluem o tipo de quitina utilizado como substrato e a possível inibição da produção por produtos da hidrólise de quitina.

Com relação ao tipo de quitina utilizado como substrato, sabe-se que a quitina é um biopolímero de estrutura cristalina que em função do organismo e do papel desempenhado, pode assumir principalmente duas estruturas polimórficas distintas, denominadas α e β-quitina. A forma mais comum existente na natureza é a α-quitina, uma forma de quitina com cadeias organizadas de forma antiparalela que favorecem a existência de numerosas ligações de hidrogênio inter e intramoleculares na mesma cadeia e, entre as cadeias poliméricas vizinhas. Já a β-quitina é constituída por cadeias organizadas de forma paralela, o que

possibilita a formação de ligações intermoleculares mais fracas que a α-quitina (KURITA, 2001). Os índices de cristalinidade também diferem entre essas duas formas de quitina, sendo de aproximadamente 90% para α-quitina e 70% para β-quitina (CAMPANA et al., 2007). Assim, de acordo com as estruturas e cristalinidades da quitina aqui descritas, é possível notar que a α-quitina apresenta uma estrutura cristalina termodinamicamente mais estável e rígida que a β-quitina (RINAUDO, 2006), o que acaba dificultando a hidrólise enzimática desse polímero.

Em nossos estudos, comparando a produção de GlcNAc a partir de α-quitina e β-quitina em pó (quitinas sem pré-tratamento), observou-se que os maiores rendimentos de GlcNAc foram obtidos a partir de β-quitina. Esses resultados demonstram que a hidrólise enzimática de α-quitina pode ter sido limitada devido à dificuldade das quitinases acessarem as ligações β-glicosidicas no interior da estrutura cristalina da α-quitina. Dessa maneira, β-quitina foi hidrolisada mais rapidamente que α-quitina por causa da presença de ligações intermoleculares mais fracas (KURITA et al., 2003). Resultados similares foram observados em estudos com *Burkholderia cepacia* TU09, *Bacillus licheniformis SK-1*, *Trichoderma viride*, *Acremonium cellulolyticus* e *Chitinibacter tainanensis* (CHERN et al., 2004; PICHYANGKURA et al. 2002; SASHIWA et al., 2001; SASHIWA et al., 2003)

Também em nossos estudos, comparando a produção de GlcNAc a partir de α-quitina coloidal (pré-tratada) e α-quitina em pó (sem pré-tratamento), observou-se que somente o fato de realizar o pré-tratamento da α-quitina em pó e, consequentemente a redução da cristalinidade, fez com que a produção de GlcNAc aumentasse de 0,24 pra 1,45 $g.L^{-1}$ após 12 horas de reação. Sugestões similares têm sido realizadas por vários autores (CHEN et al., 2010a; JAMIALAHMADI et al., 2001; KLAIKHERD et al., 2004; JUNG; PARK, 2014) e demonstram a necessidade da escolha do tipo de quitina a ser utilizada como substrato na produção de GlcNAc, bem como o tipo de pré-tratamento utilizado na preparação do material. Outro ponto a ser analisado, são os custos dos substratos e pré-tratamentos utilizados no processo. Após um levantamento de preços com algumas empresas, por exemplo, observou-se que por mais que a β-quitina não apresente a necessidade de pré-tratamento e possa apresentar bons rendimentos de GlcNAc, o custo por grama desse substrato é relativamente alto (R$ 15 a 60). Além disso, é uma forma de quitina que não pode ser encontrada abundantemente na natureza. Já a α-quitina, forma mais abundante na natureza, pode ser obtida a partir de matérias-primas relativamente baratas, consideradas como refugos da atividade pesqueira voltadas à exploração industrial de frutos do mar. O custo por grama desse substrato sem pré-tratamento é de aproximadamente R$ 2,5 a 7,5, enquanto que usando o pré-tratamento é de

aproximadamente R$ 6,5 a 11,5. Assim, o uso de α-quitina é mais vantajoso, mesmo existindo a necessidade de realizar o pré-tratamento para obtenção da quitina coloidal.

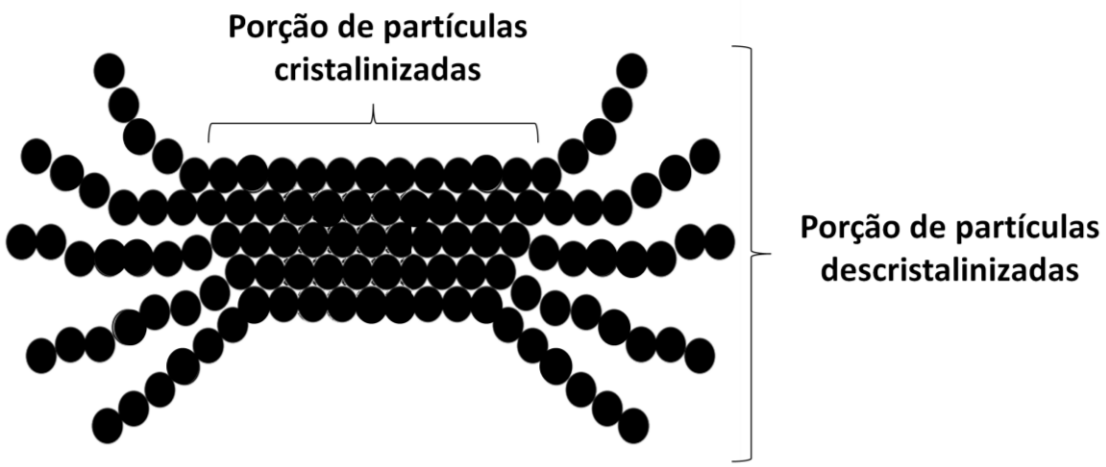
É conhecido que preparações enzimáticas perdem atividade ao longo do tempo, na medida em que as moléculas proteicas sofrem alterações. A estabilidade das preparações enzimáticas depende das condições de incubação, tais como temperatura, pH, diluição, inibidores, cofatores, entre outros. A exposição de tais preparações por longos períodos de incubação, mesmo em condições ótimas, pode levar a perda da estabilidade enzimática, consequentemente a perda de rendimentos do produto. Dessa maneira, buscando verificar a estabilidade do coquetel de proteínas produzido por *Aeromonas caviae* CHZ306 nas condições determinadas, avaliou-se a produção de GlcNAc em função do tempo de reação enzimática de α-quitina coloidal.

Sabe-se que quitinases são relativamente estáveis à temperatura ambiente e valores de pH levemente acidos e/ou básicos. As condições ótimas de temperatura e pH de quitinases purificadas de diferentes espécies de *Aeromonas* variam, mas encontram-se geralmente na faixa de 37-50 °C de temperarura e 5-8 de pH (HALDER et al., 2016; HIRAGA et al., 1997; JAMIALAHMADI et al., 2001; LAN et al., 2004; YABUKI et al., 1986; ZHANG et al., 2014). As condições de temperatura (46 °C) e pH (6,0) determinadas neste estudo estão de acordo com os valores descritos na literatura. No entanto, após o aumento progressivo da produção de GlcNAc nas primeiras 12 h, observou-se que a produção manteve-se estável ao longo das 48 horas.

A diminuição da taxa de hidrólise após 12 h pode ter ocorrido por causa da desnaturação das enzimas durante a reação ou inibição pela formação/concentração do produto (GlcNAc). Estudos de estabilidade mostraram que quitinases produzidas por *Aeromonas* PTCC1691 têm estabilidade a 37 °C por mais de 48 h, mas a investigação de GlcNAc revelou que altas concentrações desse produto inibiram levemente a reação de hidrólise. Estes resultados sugerem que ocorre inibição por *feedback*, em que o acúmulo do produto final (GlcNAc) causa diminuição da taxa de produção (JAMIALAHMADI et al., 2001). Outro motivo para a redução da produção de GlcNAc pode estar relacionado à estrutura cristalina da α-quitina coloidal (Figura 41), ou seja, esta forma de quitina é obtida pelo tratamento químico da α-quitina em pó. Esse tratamento reduz a estrutura cristalina da quitina, aumenta a acessibilidade das enzimas ao substrato e, como pode ser observado em nossos resultados, possibilitou o aumento da produção em 93% nas primeiras 12 h, em comparação a α-quitina em pó. Esses resultados indicam que a produção de GlcNAc pode ter aumentado rapidamente por causa da acessibilidade das enzimas aos sítios descristalinizados

das partículas de quitina. No entanto, de acordo com a redução de partículas descristalinizadas ao longo da reação de hidrólise e, predominância de partículas cristalinizadas, a produção diminuiu com a limitada acessibilidade das quitinases às ligações β-glicosidicas na molécula de quitina. As mesmas sugestões têm sido dadas por diferentes pesquisadores buscando explicar a diminuição da produção de GlcNAc após determinados períodos de reação (CHEN et al., 2010a; JAMIALAHMADI et al., 2001; KLAIKHERD et al., 2004).

Figura 41 - Representação ilustrativa da suposta estrutura da α-quitina após submissão ao tratamento químico para formação da α-quitina coloidal.



FONTE: Adaptada de Klaikherd et al., (2004).

Como base nesse estudo, podemos concluir que é possível converter α-quitina coloidal em GlcNAc utilizando um coquetel de proteínas produzido por *A. caviae* CHZ306 e, obter altas taxas de conversão de α-quitina coloidal e produtividades de GlcNAc. A utilização de α-quitina é vantajosa, uma vez que pode ser obtida a partir de matérias-primas relativamente baratas, consideradas como refugos da atividade pesqueira. No entanto, para obtenção de altas taxas de conversão e produtividade, torna-se importante realizar o pré-tratamento da α-quitina, para reduzir a cristalinidade desse polissacarídeo. Procedimentos de pré-tratamento que possibilitam a obtenção de uma α-quitina coloidal com maiores porcentagens de partículas cristalinizadas, permitirão a obtenção de maiores produtividades.

CONCLUSÕES

- As condições de temperatura (46 °C) e pH (6,0) para produção de GlcNAc foram determinadas. A avaliação mostrou que o coquetel de proteínas foi capaz de produzir GlcNAc numa ampla faixa de temperatura (28-49 °C) e pH (4-8).

- A concentração do coquetel de proteínas (1,5 $g.L^{-1}$) para produção de GlcNAc foi determinada, mostrando que a produção de GlcNAc aumentou de acordo com o aumento das concentrações dos coquetéis, mas que altas concentrações de proteínas não influenciaram nos rendimentos de GlcNAc, possivelmente por serem inibidas por produtos da hidrólise de quitina.

- A concentração de α-quitina coloidal (5%) para produção de GlcNAc foi determinada. A produção aumentou conforme o aumento da concentração de α-quitina coloidal até atingir um patamar onde todas as enzimas estavam ligadas aos substratos.

- A produção de GlcNAc a partir de α-quitina coloidal nas condições determinadas aumentou nas primeiras 12 h, mantendo-se estável após esse período até 48 h de reação. A redução da produção possivelmente ocorreu devido à estrutura cristalina da α-quitina coloidal e/ou inibição por produtos da hidrólise.

- É vantajoso utilizar α-quitina como substrato na produção de GlcNAc, uma vez que esta pode ser obtida a partir de matérias-primas relativamente baratas, consideradas como refugos da atividade pesqueira. No entanto, para obtenção de altas taxas de conversão e produtividade, torna-se importante realizar o pré-tratamento da α-quitina para reduzir a cristalinidade desse polissacarídeo.

- Procedimentos de pré-tratamento que possibilitam a obtenção de uma α-quitina coloidal com maiores porcentagens de partículas descristalinizadas permitirão a obtenção de maiores produtividades de GlcNAc.

REFERÊNCIAS*

AAM, B. B.; HEGGSET, E. B.; NORBERG, A. L.; SORLIE, M.; VARUM, K. M.; EIJSINK, V. G. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. **Mar. Drugs,** v. 8, p. 1482–1517, 2010.

ABBOTT, S. L.; CHEUNG, W.K.W.; JANDA, J. M. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2348-2357, 2003.

ABRAM, A. P.; HIGUERA, I. Generalidades. In: Abram, A. P. **Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**. 1. ed. Lima, PE: Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial, 2004. Cap. 1, p. 25-65.

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035, 2004.

ADAMSKI, J.; KOIVURANTA, M.; LEPPANEN, E. Fatal case of myonecrosis and septicaemia caused by *Aeromonas hydrophila* in Finland. Scand. **J. Infect. Dis**, v. 38, p. 117–199, 2006.

AGUILERA-ARREOLA, M. A.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.; ZÚÑIGA, G.; FIGUERAS, M. J.; CASTRO-ESCARPULLI, G. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 242, p.231-240, 2005.

AGUILERA-ARREOLA, M. G.; RODRÍGUEZ, C. H.; ZÚÑIGA, G.; FIGUERAS, M. J.; GARDUÑO, R. A.; CASTRO-ESCARPULL, G. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *A. veronii* and *A. hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: A comparative study. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 877-887, 2007.

AHMADI, K. J. A.; YAZDI, M. T.; NAJAFI, M. F.; SHAHVERDI, A. R.; FARAMAZI, M. A.; ZARRINI, G.; BEHRAVAN, J. Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Chitinase Production by the Newly Isolated: *Aeromonas* sp. **Biotechnology**, v. 7, p. 266-272, 2008.

AJIT, N. S.; VERMA, R.; SHANMUGAM, V. Extracellular chitinases of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing carnation wilt. **Current Microbiology**, v. 52, n. 4, 310-316, 2006.

AL-BENWAN, K.; ABBOTT, S.; JANDA, M.; HUYS, G.; ALBERT, M. J. Cystitis Caused by *Aeromonas caviae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.7, p. 2348-2350, 2007.

ALBERT, M. J.; ANSARUZZAMAN, M.; TALUKDER, K. A.; CHOPRA, A. K.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; FARUQUE, A. S. G.; ISLAM, M. S.; SACK, R. B.; MOLLBY, R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3785-3790, 2000.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANDERSEN, O. A.; DIXON, M. J.; EGGLESTON, I. M.; VAN AALTEN, D. M. F. Natural product family 18 chitinase inhibitors. **Nat. Prod. Rep**, v. 22, p. 563–579, 2005.

ANDRONOPOULOU, E.; VORGIAS, C. E. Multiple components and induction mechanism of the chitinolytic system of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, p. 694-702, 2004.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueleto de camarões oriundos da indústria pesqueira Paraibana**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

ARAKI, Y.; ITO, E. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. **European Journal of Biochemistry**. v. 55, p. 71-78, 1975.

ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus* and *enteropathogens* in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.1172-1177, 2002.

AUSTIN, B.; ADAMS, C. Fish pathogens, p. 197–243. In: AUSTIN, B.; ALTWEGG, M.; GOSLING, P.J.; JOSEPH, S. (ed.), **The genus *Aeromonas***. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England. 1996.

AVOLIO, M.; SPISA, C.L.; MOSCARIELLO, F.; ROSA, R.; CAMPORESE, L. *Aeromonas hydrophila* ecthyma gangrenosum without bacteraemia in a diabetic man: the first case report in Italy. **Le Infezioni in Medicina**, n.3, p.184-187, 2009.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 75, p. 1-15, 2008.

BAEZ, A.; SHILOACH, J. Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 81, 2014.

BASSLER, B. L.; YU, C.; LEE, Y. C.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria. Degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 36, p. 24276-24286, 1991a.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; PADUA, O. E.; SILVEIRA, V. L.; SCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta. v. 76, p. 965–977, 2008.

BISSETT, D.; ROBINSON, L. R.; RALEIGH, P. S.; MIYAMOTO, K.; HAKOZAKI, T.; LI, J.; KLEM, G. R. Reduction in the Appearance of Facial Hyperpigmentation by Topical *N*-Acetyl Glucosamine. **J. Cosmet. Dermatol**, v. 6, p. 20–26, 2007.

BLACKWELL, J.; PARKER, K. D.; RUDALL, K. M. Chitin fibers of the diatoms *Thalassiosira fluviatilis* and *Cyclotella cryptica*. **Journal of Molecular Biology**, v. 28, 383-385, 1967.

BLACKWELL, J.; WEIH, M. A. The structure of chitin-protein complexes. In: ZIKAKIS, J.P. **Chitin, chitosan and related enzymes**. Orlando: Academic Press, 1984. p. 257-272.

BOOT, R. G.; BLOMMAART, E. F. C.; SWART, E.; VAN DER VLUGT; K. G., BIJL; N., MOE, C.; PLACE, A.; AERTS, J. M. F. G. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 9, p. 6770-6778, 2001.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Simplex-Sum Designs: A Class of Second Order Rotatable Designs Derivable From Those of First Order. **Ann. Math. Statist**, v. 31, p. 838-864, 1960.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. New York, John Wiley and Sons Inc., ISBN-13: 9780471093152, 1978. p. 653.

BRAVO, L.; MORIER, L.; CASTAÑEDA, N.;RAMÍREZ, M.; SILVA, M.; CASTRO-ESCARPULLI, G. *Aeromonas*: an emerging pathogen associated with extraintestinal infection in Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.55, n.3, p.208-9, 2003.

BURTAN, A. F. *N*-Acetyl Glucosamine as a Cytoprotective Agent. *KR Patent NO. 0145715 B*, 1998.

BURTAN, A.F.; FREEMAN, H. J. *N*-Acetyl Glucosamine as a Gastroprotective Agent. *WO Patent NO. 9323055*, 1993.

CAMPANA-FILHO, S. P.; DE BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, Estruturas e propriedades de α- e β-quitina. **Quim. Nova**, v. 30, p. 644-650, 2007.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNANRD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active enZYmes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**. v. 37, p. 233-238, 2009.

CARDOZO, F. A. **Avaliação da atividade quitinolítica por bactérias do gênero *Aeromonas* isoladas do ecossistema marinho**. 111f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CARDOZO, F. A.; KRAEMER, Z. C.; SA, G. A. M.; PESSOA, A.; GUTIERREZ, R. I. N.; Draft Genome Sequence of Marine-Derived *Aeromonas caviae* CHZ306, a Potential Chitinase Producer Strain. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, 2016.

CARLSTROM, D. The crystal structure of alpha-chitin (poly-*N*-Acetyl-D-glucosamine). **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 3, n. 5, p. 669-683, 1957.

CARNAHAN, A. **Genetic relatedness of *Aeromonas* species based on the DNA sequences of four distinct genomic loci**, University of Maryland, College Park, Maryland, USA, 2001, p. 132

CARNEIRO, M. S.; ROSSI JUNIOR, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo a e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 271-276, 2006.

CASTILHO, M. C. B.; CASTRO, T. L. A.; ARAU´JO, V. S.; TRAJANO, R. S.; SANTOS, P. A.; PIMENTA, P. M. C.; LUCHEZE, K.; MELO, J. T. B.; GONÇALVES, A. M.; NOGUEIRA, R. T.; LUNA, M. G.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. Isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 53–61, 2009.

CHA, J. M.; CHEONG, K. H.; CHA, W. S.; CHOI, D.; ROH, S. H.; KIM, S. L. Optimal conditions for chitinase production by *Serratia marcescens*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering,** v. 9, p. 297-302, 2004.

CHACÓN, M. R.; FIGUERAS, M. J.; , CASTRO-ESCARPULLI, G.; SOLER, L,; GUARRO, J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 84, p 269–278, 2003.

CHACÓN, M. R; SOLER, L.; GROISMAN, E. A.; GUARRO, J.; FIGUERAS, J. M. Type III Secretion System Genes in Clinical *Aeromonas* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1285-1287, 2004.

CHAIHARN, M.; LUMYONG, S.; HASAN, N.; PLIKOMOL, A. Solid-state cultivation of *Bacillus thuringiensis* R 176 with shrimp shells and rice straw as a substrate for chitinase production. **Ann Microbiol**, v. 63, p. 443–450, 2013.

CHAKRABORTY, T.; MONTENEGRO, M. A.; SANYAL S. C. loning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotonic enterotoxin. **Infection and Immunity**, v. 46, p. 435-441, 1984.

CHAN, J. Z.; HALACHEV, M. R.; LOMAN, N. J.; CONSTANTINIDOU, C.; PALLEN, M. J. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 302, 2012.

CHEN, H. B.; KAO, P. M.; HUANG, H. C.; SHIEH, C. J. Effects of using various bioreactors on chitinolytic enzymes production by *Paenibacillus taichungensis*. **Biochem. Eng. J**, v. 49, p. 337– 342, 2010b.

CHEN, J. K.; SHEN, C. R.; LIU, C. L. *N*-acetylglucosamine: production and applications. **Marine drugs**, v. 8, p. 2493-2516, 2010a.

CHEN, R .H.; HSU, C. N.; CHUNG, M. Y.; TSAI, W. L.; LIU, C. H. Effect of Different Concentrations of Collagen, Ceramides, *N*-Acetyl Glucosamine, or Their Mixture on Enhancing the Proliferation of Keratinocytes, Fibroblasts and the Secretion of Collagen and/or the Expression of mRNA of Type I Collagen. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 16, p. 66-74, 2008.

CHERN, L. L.; STACKEBRANDT, E.; LEE, S. F.; LEE, F. L.; CHEN, J. K.; FU, H. M. *Chitinibacter tainanensis* Gen. nov. sp. nov., a Chitin-degrading Aerobe from Soil in Taiwan. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, v. 54, p. 1387–1391, 2004.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. **Microbes and Infections**, v. 1, p. 1129-1137, 1999.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W.; PETERSON, J. W.; JIN, G. F. Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. **Can. J. Microbiol**, v. 39, p. 513–523, 1993.

CHOPRA, A. K.; XU, X. J.; RIBARDO, D. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2808–2818, 2000.

CHRISOPE, G. L.; ROSE, R. Product and Method for Treating Joint Disorders in Vertebrates. *US Patent NO. 6344220*, 1999.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 270-277, 1998.

COIL, D.; JOSPIN, G.; DARLING, A. E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data., **Bioinformatics**, v. 31, p. 587-589, 2015.

COLWELL, R. R.; MACDONELL M. T.; LEY, J. Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 3, p. 473-477, 1986.

COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Carbohydrate-active enzymes: An integrated database approach. In: GILBERT, H. J.; DAVIES, G.; HENRISSAT, B.; SVENSSON, B. Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering. Cambridge, UK: **The Royal Society of Chemistry**, 1999, p. 3-12.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; GURINDER SINGH HOONDAL. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773-782, 2006.

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

DEANE, E. E.; WHIPPS, J. M.; LYNCH, J. M.; PEBERDY, J. F. The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, v. 1, p. 101-110, 1998.

DE-HUI, D.; WEI, L.; WEI-LIAN, H.; XIAO-YING, S. Effect of medium composition on the synthesis of chitinase and chitin deacetylase from thermophilic *Paenibacillus sp. Hul*. *Procedia Environ. Sci.* v. 8, p. 620–628, 2011.

DIXIT, R.; ARAKANE, Y.; SPECHT, C. A.; RICHARD, C.; KRAMER, K. J.; BEEMAN, R. W.; MUTHUKRISNAN, S. Domain organization and phylogenetic analysis of proteins from the chitin deacetylase gene family of *Tribolium castaneum* and three other species of insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 440-451, 2008.

DWIVEDI, M.; MISHRA, A.; PRASAD, A.; AZIM, A.; SINGH, R.K.; BARONIA, A.K.; PRASAD, K.N.; DWIVEDI, U.N. *Aeromonas caviae* Septicemia in Immunocompetent Gastrointestinal Carriers. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 547-548, 2008.

EINBU, A. **Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis**. 2007. 75 p.Thesis (Ph. D in Biotechnology) - Department of Biotechnology. Norwegian University of Science and Technology, Noruega, 2007.

EUROPEAN COMISSION. Collection of information on enzymes, 2002. Disponível em: < http://ec.europa.eu/environment/archives/dansub/pdfs/enzymerepcomplete.pdf>. Acesso em: 2 maio. 2017.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; VIEIRA, R. H. S. F.; CARVALHO, F. C. T.; TORRES, R. C. O.; SANTÁNNA, E. S.; RODRIGUES, D. P.; REIS, C. M. F. *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea Rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 129-133, 2006.

FELSE, P. A.; PANDA, T. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors – the influence of agitator speed. **Biochem. Eng. J**, v. 4, p. 115– 120, 2000.

FENICE, M.; GIAMBATTISTA, R.; RAETZ, E.; LEUBA, J. L. Repeated-batch and continuous production of chitinolytic enzymes by *Penicillium janthinellum* immobilised on chemically-modified macroporous cellulose. **J. Biotechnol**, v. 62, p. 119-131, 1998.

FENICE, M.; GIAMBATTISTA, R.; RAETZ, E.; LEUBA, J. L. Repeated-batch and continuous production of chitinolytic enzymes by *Penicillium janthinellum* immobilised on chemically-modified macroporous cellulose. **J. Biotechnol**, v. 62, p. 119-131, 1998.

FERGUSON, M. R.; XU, X. J.; HOUSTON, C. W.; PETERSON, W.; COPPENHAVER, D. W.; POPOV, V. L; CHOPRA, A. K. Hyperproduction, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4299-4308, 1997.

FIGUERAS, M. J. Clinical relevance of *Aeromonas* sM503. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 16, p. 145–153, 2005.

FLEURI, L. F.; KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Production, purification and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 623-630, ISSN 1517-8382, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Brief the state of world fisheries and aquaculture, 2016. Disponível em: < http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 2 maio. 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture, 2014. Disponível em: < http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>. Acesso em: 2 maio. 2017.

FRÄNDBERG, E.; SCHNÜRER, J. Chitinolytic properties of *Bacillus pabuli* K1. J **Appl Bacteriol**, v. 76, p. 361-367, 1994.

FUKAMIZO, T.; OHKAWA, T.;IKEDA, Y.; GOTO, S. Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1205, n. 2, p.183-188, 1994.

GALINDO, C .L.; SHA, J.; FADL, A. A.; PILLAI, L. L. CHOPRA, A. K. Host immune responses to *Aeromonas* virulence factors. **Current Immunology Reviews**, v. 2, n. 1, p. 13-26, 2006.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E. J. Opinion: re-evaluating prokaryotic species. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p. 733–739, 2005.

GEVERS, D.; VANDEPOELE, K.; SIMILLION, C.; VAN DE PEER, Y. Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. **Trends Microbiol**, v. 12, p. 148–154, 2004.

GHASEMI-YOUNES, G.; DEHDARI, Z.; MOHKAM, M.; KARGAR, M. Isolation and Optimization of Cultivation Conditions for Production of Chitinase by *Aeromonas* sp. ZD_05 from the Persian Gulf. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 7, p. 913-918, 2013.

GOMAA, E. Z. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. **J. Microbiol**, v. 50, p. 103–111, 2012.

GOODAY, G. W. Diversity of roles of chitinases in nature. In: ZAKARIA, M. B.; WAN MUDA, W. M.; ABDULLAH, M. P. **Chitin and Chitosan**. Malaysia: Penerbit Universiti Kebangsaan, 1995, p. 191-202.

GOODAY, G. W. The ecology of chitin degradation. **Advances in Microbial Ecology**, v. 11, p. 387-430. 1990.

GOSLING, P. J. Pathogenic mechanisms. In: AUSTIN, B. (eds.) The genus *Aeromonas*. London, Wiley, 1996. p. 245–265.

GRANUM, P. E.; O'SULLIVAN, K.; TOMÁS, J. M,; ORMEN, O. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p. 131-137, 1998.

GREEN, A. T.; HEALY, M. G.; HEALY, A. Production of chitinolytic enzymes by *Serratia marcescens QMB1466* using various chitinous substrates. **J. Chem. Technol**. ***Biotechnol,*** v. 80, p. 28– 34, 2005.

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems – An overview. **Microbiol Spectr,** v. 4, 2016.

GUPTA, R.; SAXENA, R. K.; CHATURVEDI, P.; VIRDI, J. S. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. **J Appl Bacteriol**, v. 78, p. 378-83, 1995.

HACKMAN, R. H.; GOLDBERG, M. Studies on chitin. VI. The nature of alpha- and beta-chitins. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 935-946, 1965.

HALDER, S. K.; JANA, A.; PAUL,T.; DAS, A.; GHOSH, K.; RANJAN PATI, B.; MONDAL, K. C. Purification and biochemical characterization of chitinase of *Aeromonas hydrophila* SBK1 biosynthesized using crustacean shell. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 211–218, 2016.

HÃNNINEN, M.L. Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources. **J. Appl. Bacteriol**, v. 76, p. 355-463, 1994.

HARMAN, G. E; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M; DI PIETRO, A; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum:* purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, n. 3, p. 313-318, 1993.

HEIM, H. K.; OESTMANN, A.; THIELE, H.; SEWING, K. H. Incorporation of *N*-Acetyl-[14C]D-glucosamine and [3H]L-Leucine by isolated pig gastric mucosal cells. **Digestion**, v. 44, p. 26-35, 1989.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequences similarities. **The Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316, p. 695-696, 1996.

HERTH, W.; MULISH, M.; ZUGENMAIER, P. Comparison of chitin fibril structure and assembly in three unicellular organisms. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. **Chitin in Nature and Technology**. New York: Plenum Press, 1986, p. 107-120.

HEUZENROEDER, M. W.; WONG, C. Y. F.; FLOWER, R. L. P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. **FEMS Microbiology Letters**, v. 174, n. 1, p. 131-136, 1999.

HIRAGA, K.; SHOU, L.; KITAZAWA, M.; TAKAHASHI, S.; SHIMADA, M.; SATO, R.; ODA, K. Isolation and characterization of chitinase from a flake-chitin degrading marine bacterium, *Aeromonas hydrophila* H-2330. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 61, p. 174-6, 1997.

HORNEMAN, A. J.; ALI, A.; ABBOTT, S. L. *Aeromonas*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology Press: Washington D.C., 9ed., v. 1, p.716-721, 2007.

HOWARD, M. B.; EKBORG, N. A.; WEINER, R. M.; HUTCHESON, S. W. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 627-635, 2003.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Dis**, v. 87, p. 4–10, 2003.

HSU, T.C.; WALTMAN, W. D. I.; SCHOTTS, E. B. Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Int. Symp. Fish. Biol**, v. 49, p. 101-111, 1981.

IL'INA, A. V.; ZUEVA, O. Y.; LOPATIN, S. A.; VARLAMOV, V. P. Enzymatic Hydrolysis of α-Chitin **Appl. Biochem. Microbiol,** v. 40, p. 35–38, 2004.

JAMIALAHMADI, K.; BEHRAVAN, J.; NAFAJI, M. F.; YAZDI, M. T.; SHAHVERDI, A. R.; FARAMAZI, M. A. Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine from Chitin Using Crude Enzyme Preparation of *Aeromonas* sp. PTCC1691. **Biotechnology**, v. 10, p. 292-297, 2011.

JANDA, J. M. Biochemical and exoenzymatic properties of *Aeromonas* species. **Diag. Microbiol. Infect. Dis**, v. 3, p. 223-232, 1985.

JANDA, J. M. Recent Advances in the Study of the Taxonomy, Pathogenicity, and Infectious Syndromes Associated with the Genus *Aeromonas*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 397-410, 1991.

JANDA, J. M.; ABBOTT S.L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S.L. Human pathogens, p. 151–173. In: AUSTIN, B.; ALTWEGG, M.; GOSLING, P.J.; JOSEPH, S. (ed.), **The genus *Aeromonas***. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, 1996.

JANDA, J. M.; DUFFEY, P. D. Mesophilic aeromonads in human disease; current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 10, p. 980–997, 1988.

JANDA, J. M.; GUTHERTZ, L. S.; KOKKA, R. P.; SHIMADA, T. *Aeromonas* species in septicemia: laboratory characteristics and clinical observations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, p. 77-83, 1994.

JANDA, J.M.; ABBOTT, A.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentation, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 332-344, 1998.

JEUNIAUX, C.; VOSS-FOUCART, M. F. Chitin biomass and production in the marine environment. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 5, p. 347-356, 1991.

JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis−Menten Paper. **Biochemistry**, v. 50, p. 8264−8269, 2011.

JOHNSTONE, J. **Conditions of life in the sea**. Cambridge: University Press, p. 332, 1908.

JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas species*. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 315–343, 1994.

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. **Carbohydr Polym,** v. 67, p. 256–259. 2007.

KAO, P. C. C.; HUANG, S. C.; CHANG,YUNG-CHI. PO-JEN TSAI, YUNG-CHUAN LIU. Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by Paenibacillus sp. CHE-N1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 172–178, 2007.

KARZED, K.; DOMENJOZ, R. Effects of Hexosamine Derivatives and Uronic Acid Derivatives on Glycosaminoglycan Metabolism of Fibroblast Cultures. **Pharmocology**, v. 5, p. 337–345, 1971.

KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1473, p. 108-122, 1999.

KEYHANI, N. O.; ROSEMAN, S. The chitin catabolic in the marine bacterium *Vibrio furnissii*. molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic chitodextrinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33414-33424, 1996.

KINGOMBE, C. I.; HUYS, G.; TONOLLA, M.; ALBERT, M. J.; SWINGS, J.; PEDUZZI, R.; JEMMI, T. Kingombe, C. E., et al. 1999. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5293-5302, 1999.

KIRCHNER, M. Microbial colonization of copepod body surfaces and chitin degradation in the sea. Helgoland. **Marine Research**, v. 49, p. 201-212, 1995.

KIROV, S. M. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 20, p. 179-198, 1993.

KLAIKHERD, A.; SIRIPASTR, J. M. L.; BOONJAWAT, J.; AIBA, S.; SUKWATTANASINITT, M. Depolymerization of beta-chitin to mono- and disaccharides by the serum fraction from the para rubber tree, *Hevea brasiliensis*. **Carbohydr Res**, v. 6, v. 339, p. 2799-2804, 2004.

KOBATA, A.; GINSBURG, V. Oligosaccharides of human milk: I. Isolation and characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 130, p. 509-513, 1969.

KUK, J. H.; JUNG, W. J.; JO, G. H.; KIM, Y. C.; KIM, K. Y.; PARK, R. D. Production of N-acetyl-beta-D-glucosamine from chitin by *Aeromonas* sp. GJ-18 crude enzyme. **Appl Microbiol Biot**, v. 68, p. 384-389, 2005.

KÜPFER, M.; KUHNERT, P.; KORCZAK, B.M.; PEDUZZI, R. DEMARTA, A. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 56, p. 2743-2751, 2006

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1921-1971, 2001.

KURITA, K.; KAJI, Y.; MORI, T.; NISHIYAMA, Y. Enzymatic Degradation of β-Chitin: Susceptibility and the Influence of Deacetylation. **Carbohydr. Polym**, v. 42, p. 19–21, 2003.

LAN, X.; OZAWA, N.; NISHIWAKI, N.; KODAIRA, R.; OKAZAKI, M.; SHIMOSAKA, M. Purification, cloning, and sequence analysis of beta-*N*-acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, p. 1082-1090, 2004.

LERAT, E., DAUBIN,V.; MORAN, N. A. From gene trees to organismal phylogeny in prokaryotes: the case of the gamma-proteobacteria. **PLOS Biol**, v. 1, p. 19, 2003.

LEVIN, R. M.; KRIEGER, N. N.; WINZLER, R. J. Glucosamine and acetylglucosamine tolerance in man. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 58, p. 927-932, 1961.
LI, X.; WANG, L. X.; WANG, X.; ROSEMAN, S. The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio cholerae*: Characterization of a unique chitin oligosaccharide deacetylase. **Glycobiology**, v. 17, p. 1377-1387, 2007.

LIU, L.; LIU, Y.; SHIN, H.D.; CHEN, R.; LI, J.; DU, G.; CHEN J. Microbial production of glucosamine and N-acetylglucosamine: advances and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 14, p. 6149-6158, 2013.

LIU, Y.; LI, Z.; LIU, G.; JIA, J.; LI, S.; YU, C. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of *N*-Acetylglucosamine concentration in human plasma. **Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 862, p. 150-154, 2008.

LOWRY, R.; BALBOA, S.; PARKER, J. L.; SHAW, J. G. *Aeromonas* flagella and colonisation mechanisms. **Adv Microb Physiol**, v. 65, p. 203-256, doi: 10.1016/bs.ampbs.2014.08.007 Epub, 2014.

MACDONALD, J. M.; TARLING, C. A.; TAYLOR, E. J.; DENNIS, R. J.; MYERS, D. S.; KNAPP, S.; DAVIES, G. J.; WITHERS, S. G. Chitinase Inhibition by Chitobiose and Chitotriose Thiazolines. **Angew. Chem. Int. Ed**., v. 49, p. 2599 –2602, 2010.

MADIGAN, M, T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; Brock Biology of Microrganisms. 14. ed. Pearson Education ArtMed, 2016. p. 961.

MARCUM, F. D.; SEANOR, J. W. Composition and Method for Treating Rheumatoid Arthritis. US Patent NO. 2008003258, 2007.

MARTIN-CARNAHAN, A.; JOSEPH, S. W. Genus I. Aeromonas Stanier 1943, 213[AL]. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, pp. 557–578. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M. New York: Springer, 2005.

MARTINO, M. E.; FASOLATO, L.; MONTEMURRO, F.; ROSTEGHIN, M.; MANFRIN, A.; PATAMELLO, T.; NOVELLI, E.; CARDAZZO, B. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 14, p. 4986-5000, 2011.

MARTINS, L.M.; MARQUEZ, R.M.; YANO, T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, p. 237-242, 2002.

MASSON, J. Y.; DENIS, F.; BRZEZINSKI, R. Primary sequence of the chitosanase from Streptomyces sp. strain N174 and comparison with other endoglycosidases. **Gene**, v. 140, p. 103-107, 1994.

MEHMOOD, M. A.; GAY, Y.; ZHUANG, Q.; WANG, F.; XIAO, X.; WANG, F. *Aeromonas caviae* CB101 contains four chitinases encoded by a single gene *chi*1. **Molecular Biotechnology**, v. 44, p. 213-220, 2010.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. The Journal of Experimental Biology, v. 206, p. 4393-4412, 2003.

MILLER, J. B.; BULL, S.; MILLER, J.; MCVEAGH, P. The oligosaccharide composition of human milk: Temporal and individual variations in monosaccharide components. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 19, p. 371-376, 1994.

MONAGHAN, S. F.; ANJARIA, D.; MOHR, A.; LIVINGSTON. D. H. Nectrotizing fasciitis and sepsis caused by *Aeromonas hydrophila* after crush injury of the lower extremity. **Surg. Infect**, v. 9, p. 459–467, 2008.

MOYER, P.N. Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n.11, p.2044-2048, 1987.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin**. Oxford, U. K.: Pergamon Press. 1977. p. 309.

NAGATA, K., TAKESHIMA, Y., TOMII, K., IMAI, Y. Fulminant Fatal Bacteremic Pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* in a Non-Immunocompromised Woman. **Internal Medicine**, n. 50, p. 63-65, 2011.

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

NASER, S.M.; THOMPSON, F.L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpo*A and *phe*S genes. **Microbiology**, v. 151, p. 2141–2150, 2005.

NGUYEN-THI, N.; DOUCET, N. Combining chitinase C and N-acetylhexosaminidase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) provides an efficient way to synthesize N-acetylglucosamine from crystalline chitin. **J Biotechnol**, v. 220, p. 25-32, 2016.

NHUNG, P. H.; HATA, H.; OHKUSU, K.; NODA, M.; SHAH, M. M.; GOTO, K.; EZAKI, T. Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1232-1237, 2007.

OHNO, T.; ARMAND, S.; HATA, T.; NIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; MITSUTOMI, M.; WATANABE, T. A Modular family 19 Chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5065-5070, 1996.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G.J.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 2014.

OVERDIJK, B.; VAN STEIJN, G. J.; ODDS, F. C. Chitinase levels in guinea pig blood are increased after systemic infection with *Aspergillus fumigates*. **Glycobiology**, v. 6, n. 6, p. 627-634, 1996.

OVERDIJK, B.; VAN STEIJN, G. J.; ODDS, F. C. Distribution of chitinase in guinea pig tissues and increases in levels of this enzyme after systemic infection with *Aspergillus fumigates*. **Microbiology**, v. 145, p. 259-269, 1999.

OZBEK, S.; GAYIK, S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. **Process Biochem**, v. 36, p. 729–741, 2001.

PABLOS, M.; REMACHA, M. A.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J. M.; SANTOS, J. A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of Aeromonas isolates from patients with diarrhea and drinking water. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 29, n. 9, p. 1163-1172, 2010.

PALUMBO, S. A.; MORGAN, D. R.; BUCHANAN, R. L. Influence of temperature, sodium chloride and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **J. Food. Sci**, v. 50, p. 1417-1421, 1985.

PEREIRA, J. R. N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de Bioprocessos. Em: PEREIRA, J. R. N.; PINTO DA SILVA, B. E.; FERRARA, M. A. (Org.). Séries em Biotecnologia: Tecnologia de Bioprocessos. 1ed. Rio de Janeiro. Copiadora Amiga dos Estudantes Ltda. 2008. v. 1, p. 1-62.

PICHYANGKURA, R.; KUDAN, S.; KUTTIYAWANG, K.; SUKWATTANASINITT, M.; AIBA, S. Quantitative production of 2-acetoamodo-2-d-glucose from crystalline chitin by bacterial chitinase. **Carbohydr Res**, v. 337, p. 557-559, 2002.

POPOFF, M. GENUS III AEROMONAS KLUYVER AND VAN NIEL 1936 398[AL]. In: KRIEG, N. R.; HOLT. J. G. (eds.) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Baltimore, M. D. Williams & Wilkins, 1984. p. 545–548.

POTOMSKI, J.; BURKE, V.; ROBINSON, J.; FUMAROLA, D.; MIRAGLIOTTA, G. *Aeromonas* cytotonic enterotoxin cross reactive with cholera toxin. **J Med Microbiol**., v. 23, n. 2, p. 179-86, 1987.

RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. **Enzyme Research**, v. 2015, p. 8, 2015.

RINAUDO, M. A. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. **Prog. Polym. Sci**., v. 31, p. 603–632, 2006.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. London: Mc Millan Press, 1992. 350 p.
ROSA, J.C.; NETO, B. A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, p. 99–104, 2005.

ROSEMAN, S. Glucosamina metabolism. I. *N*-acetylglucosamine deacetylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 115, 124, 1957.

ROSEMAN, S.; LI, XIBING.; COMB, D. Conversion of chitin into *N*-acetylglucosamine, glucosamine and bioethanol. Patent, n. WO 2010/123784 A2, 2010.

ROVATI, L.; CASULA, P.; MASCHERPA, S. *N*-Acetylglucosamine for Treating Degenerative Afflictions of the Joints. US Patent NO. 3697652, 1972.

RUDALL, K. M.; KENCHING, W. Chitin System. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 48, n. 4, p. 597-605, 1973.

SAAVEDRA, M. J.; FIGUERAS, M. J.; MARTINEZ-MURCIA, A. J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2481-2487, 2006.

SABA, H.; VIBHASH, D.; MANISHA, M.; PRASHANT, K. S. et al., Trichoderma – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. **Mycosphere**, v. 3, p. 524–531, 2012.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 317-338, 1993.

SAIMA, M.; KUDDUS, R. I. Z. Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, p. 39-46, 2013.

SALVATORE, S.; HEUSCHKEL, R.; TOMLIN, S.; DAVIES, S.E.; EDWARDS, S.; WALKER-SMITH, J.A.; FRENCH, I.; MURCH, S. H. A Pilot Study of *N*-Acetyl Glucosamine, a Nutritional Substrate for Glycosaminoglycan Synthesis, in Paediatric Chronic Inflammatory Bowel Disease. **Aliment. Pharmacol. Ther**. v. 14, p. 1567–1579, 2000.

SASHIWA, H.; FUJISHIMA, S.; YAMANO, N.; KAWASAKI, N.; NAKAYAMA, A.; MURAKI, E.; HIRAGA, K.; ODA, K.; AIBA, S. Production of *N*-acetyl-D-glucosamine from α-chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H2330. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 761-763, 2002.

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-Acetylchitooligosaccharide and the Effect of Mixing of Crude Enzymes. **Carbohydr. Polym.** v. 51, p. 391–395, 2003.

SASHIWA, H.; FUJISHIMA, S.; YAMANO, N.; KAWASAKI, N.; NAKAYAMA, A.; MURAKI, E.; AIBA, S. Production of N-Acetyl-D-glucosamine from β-Chitin by Enzymatic Hydrolysis. **Chem. Lett**, v. 31, p. 308–309, 2001.

SAYO, T.; SAKAI, S.; INOUE, S. Synergestic Effect of *N*-Acetylglucosamine and Retinoids on Hyaluronan Production in Human Keratinocytes. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 17, p. 77-83, 2004.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL , W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial, v. 2, Blucher, 2001, p. 541.

SEN, K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1077-1086, 2004.

SHA, J.; PILLAI, L.; FADL, A. A.; GALINDO, C. L.; EROVA, T. E.; CHOPRA, A. K. The Type III Secretion System and Cytotoxic Enterotoxin Alter the Virulence of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6446-6457, 2005.

SHANMUGAIAH, V.; MATHIVANAN, N.; BALASUBRAMANIAN, N.; MANOHARAN, P. T. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 2562-2568, 2008.

SHOJI, A.; IGA, T.; INAGAKI, S.; KOBAYASHI, K.; MATAHIRA, Y.; SAKAI, K. Metabolic disposition of [14C] *N*-acetylglucosamine in rats. **Chitin Chitosan Research**, v. 5, p. 34-42, 1999.

SHUHUI, L.; MOK, Y. W. S.; WONG, F. Role of Mammalian Chitinases in Asthma**. Int Arch Allergy Immunol**, v. 149, p. 369–377, DOI: 10.1159/000205583, 2009.

SOHN, H. J.; NAM, D. H.; KIM, Y. S.; PAIK, H. J.; Endogenous *Aeromonas hydrophila* endophthalmitis in an immunocompromised patient. **Korean Journal of Ophthalmololy**, v. 21, p. 45-47, 2007.

SOLER, L.; YÁÑEZ, M. A.; CHACON, M. R.; AGUILERA-ARREOLA, M. G.; CATALÁN, V.; FIGUERAS, M. J.; MATÍNEZ-MURCIA, A. J. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, p. 1511-1519, 2004.

SOUZA, C. P. **Diversidade de bactérias quitinolíticas isoladas em amostras de água do mar e plâncton coletadas na região costeira do estado de São Paulo**. 204f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOUZA, C. P.; ROSERO, E. M. B.; ALMEIDA, B. C.; MARTINS, G.; ALBERTINI, L. S.; RIVERA, I. N. G. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2079-2082, 2009.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.A.; KAMPFER, P.; MAIDEN M. C. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, p. 1043–7, 2002.

STANIER, R. Y. A note on the taxonomy of *Proteus hydrophilus*. **Journal of Bacteriology**. v. 46, p. 213-214, 1943.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. **Eng. Life Sci**, v. 15, p. 30-38, 2015.

STOYKOV, Y.; KRASTANOV, A.; PAVLOV, A. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by bacterial soil isolate. In: Mendez-Vilas, A. (eds.) Industrial,Medical and Environmental Applications of Microorganisms*:* Current Status and Trends, Wageningen Academic Publishers, Spain, 2014, p. 618–624.

SUGINTA, W.; PANTOOM, S.; PRINZ, H. Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. **Chemistry & Biology**, v. 2, p. 191-202, 2009.

SUZUKI, K.; TAIYOJI, M.; SUGAWARA, N.; NIKAIDOU, N.; HENRISSAT, B.; WATANABE, T. The third chitinase gene (*chiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. **The Biochemical Journal**, v. 343, p. 587-596, 1999.

SVITIL, A. L.; NÍ CHADHAIN, S. M.; MOORE, J. A.; KIRCHMAN, D. L. Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* on different forms of chitin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 408-413, 1997.

TALENT, J. M.; GRACY, R. W. Pilot Study of Oral Polymeric *N*-Acetyl-D-glucosamine as a Potential Treatment for Patients with Osteoarthritis. **Clin. Ther**, p. 1184–1190, 1996.

TAMAI, Y.; MIYATAKE, K.; OKAMOTO, Y.; TAKAMORI, Y.; SAKAMOTO, K.; MINAMI, S. Enhanced Healing of Cartilaginous Injuries by *N*-Acetyl-D-glucosamine and Glucuronic Acid. **Carbohydr. Polym,** v. 54, p. 251–262, 2003.

TANAKA, H.; OGASAWARA, N.; NAKAJIMA, T.; TAMARI, K. Cell walls of *Piricularia oryzae*. I. Selective enzymolysis of *Piricularia oryzae* walls by wall-lytic enzymes of *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 16, p. 39-60, 1970.

TATUSOVA, T.; DICUCCIO, M.; BADRETDIN, A.; CHETVERNIN, V.; CIUFO, S.; Li, W. Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174280/. Acesso em: 2 maio. 2017.

THELESTAM, M.; LJUNGH, A. Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of alpha-and beta-hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. **Infection and Immunity**. v. 34, n. 3, p. 949-956, 1981.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry,** v. 31, p. 321-331, 1996.

THOMPSON, F.; GEVERS, D.; THOMPSON, C.; DAWYNDT, P.; NASER, S.; HOSTE, B. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of Multilocus Sequence Analysis. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, p. 5107-15, 2005.

TJOELKER, L. W.; GOSTING, L.; FREY, S., HUNTER, C. L.; TRONG, H. L.; STEINER, B.; BRAMMER, H.; GRAY, P. W. Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 514-520, 2000.

TOMÁS, J. M. The Main Aeromonas Pathogenic Factors. **International Scholarly Research Network,** v. 2012, p, 22, 2012.

VON GRAEVENIT, A.;MENSCH, A.H. The genus *Aeromonas* in human bacteriology: report of 30 cases and review of the literature. **New England Journal of Medicine**. v. 278, p. 245-249, 1968.

WALTMAN, W. D.; SHOTTS, II, E. B.; HSU, T. C. Enzymatic characterization of *Aeromonas hydrophila* complex by the API-ZYM system. **J. Clin. Microbiol**, v. 16, p. 692-696, 1982.

WANG, G.; CLARCK, C. G.; LIU, C. PUCKNELL, C.; MUNRO, C.; KRUK, T. M. A. C.; CALDEIRA, R.; WOODWARD, D.L.; RODGERS, F.; Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1048-1054, 2003

WANG, S. L.; CHANG, W. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes Extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa K-187* in a shrimp and crab shell powder medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 380-386, 1997.

WILKIE, D. Topical Composition for the Treatment of Joint Damage or Pain. GB Patent NO. 2403405, 2005.

WOLF, S. **Características de virulência em estirpes de *Aeromonas* spp**. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

YABUKI, M.; MIZUSHINA, K.; AMATATSU, T.; ANDO, A.; FUJII, T.; SHIMADA, M.; YAMASHITA, M. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila subsp. anaerogenes* A52. **J. Gen. Appl. Microbiol**, v. 32, p. 25–38, 1986.

YAMAMOTO, S.; KASAI, H.; ARNOLD, D. L.; JACKSON, R. W.; VIVIAN, A, HARAYAMA, S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from nucleotide sequences of *gyr*B and *rpo*D genes. **Microbiology**, v. 146, p. 2385-2394, 2000.

YAN, N.; CHEN, X. Sustainability: Don't waste seafood waste. **Nature**, v. 524, p. 155–157, 2015.

YÁÑEZ, M. A.; CATALÁN, V.; APRÁIZ, D.; FIGUERAS, M. J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 875-883, 2003.

YANO, S.; RATTANAKIT, N.; WAKAYAMA, M.; TACHIKI, T. A chitinase indispensable for formation of protoplast of Schizophyllum commune in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, p. 1299-305, 2004.

YOUNG, M. CH. L.; COONEY, A. E. Humphrey, Comprehensive Biotechnology, vol. 2, Pergamon Press, Oxford, 1985, p. 16.

ZHANG, Y.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; CAO, Y.; HE, S.; HUO, F., QIN, C.; YAO, B.; RINGØ, E. High-yield production of a chitinase from *Aeromonas veronii* B565 as a potential feed supplement for warm-water aquaculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 1651–1662.

ZHANG, Z.; YUEN, G. Y.; SARATH, G.; PENHEITER, A. R. Chitinases from plant disease biocontrol agent *Stenotrophomonas maltophilia* C3. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 204-211, 2001.

ZHAO, Y.; PARK, R. D.; MUZZARELLI, R. A. Chitin deacetylases: properties and applications. **Mar Drugs**, v. 14, p. 24-46, 2010.

ZHOU, G.; ZHANG, H.; HE, Y.; HE, L. Identification of a chitin deacetylase producing bacteria isolated from soil and its fermentation optimization. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 23, p. 2597-2603, 2010.

ZHU, Z.; ZHENG, T.; HOMER, R. J.; KIM, Y. K.; CHEN, N. Y.; COHN, L.; HAMID, Q.; ELIAS J. A. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. **Science**, v. 304, p. 1678–1682, 2004.

ZOBELL, C. E.; RITTENBERG, S. C. The occurrence and characteristics of chitinoclastics bacteria in the sea. **Journal of Bacteriology**, v. 35, n. 3, p. 275-287, 1938.