

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - *CAMPUS* DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS - CCMF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS - PCF

**QUITINASE DE *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T: PURIFICAÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

PAULA DANIELA HELFENSTEIN ROTHER

CASCAVEL-PR  
2022

PAULA DANIELA HELFENSTEIN ROTHER

**QUITINASE DE *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T: PURIFICAÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki

CASCADEL-PR  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Rother, Paula Daniela Helfenstein  
Quitinase de *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T:  
Purificação, caracterização bioquímica e aplicação biotecnológica  
/ Paula Daniela Helfenstein Rother; orientadora Marina  
Kimiko Kadowaki. -- Cascavel, 2022.  
75 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências  
Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, 2022.

1. Beta-N-acetilglicosaminidase. 2. Endoquitinase. 3.  
Quitina. 4. Quitooolígrossacarídeos. I. Kadowaki, Marina Kimiko  
, orient. II. Título.

PAULA DANIELA HELFENSTEIN ROTHER

QUITINASE DE *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T: PURIFICAÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Kimiko Kadowaki

**BANCA EXAMINADORA:**

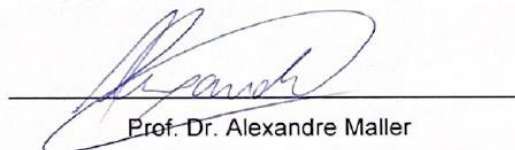


Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Kimiko Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

UNIOESTE

Orientadora



Prof. Dr. Alexandre Maller

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

UNIOESTE



Dr<sup>a</sup>. Juliana Cristhina Friedrich

Prati-Donaduzzi

CASCADEL – PR

2022

## BIOGRAFIA RESUMIDA

Paula Daniela Helfenstein Rother, natural de Santa Helena, Paraná, Brasil, nascida em 6 de julho de 1995, graduou-se em Farmácia, pela Universidade Paranaense – Unipar, em 2017. Trabalhou como Farmacêutica em Farmácia Comunitária, em 2018, na cidade de Marechal Cândido Rondon e, de 2018 a 2020, em Santa Helena. Possui especialização em Farmacologia e Interações Medicamentosas, pelo Centro Universitário Internacional – Uninter, em 2019. No período de 2020 a 2022, fez mestrado no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel e desenvolveu projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa de Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pela Profa. Dra. Marina Kimiko Kadowaki.

“A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ver com novos olhos.”

Marcel Proust

À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre me amparar, iluminar e guiar meus passos em todas as etapas da minha vida.

Aos meus pais, Oneide e Leonildo, por me mostrarem a importância do conhecimento e por sempre acreditarem em mim, fazendo tudo e mais um pouco para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos. Obrigada por se fazerem presentes, me amparando quando eu vacilei e celebrando comigo minhas conquistas.

Ao meu irmão e minha cunhada, Leandro e Adriane, por sempre estarem dispostos a me ouvir falar sobre minha pesquisa, mesmo não entendendo a maior parte das expressões usadas. Obrigada pelos tererés e por toda ajuda que vocês me deram durante toda essa jornada.

Ao meu marido, Luiz Miguel, por estar sempre ao meu lado, por acreditar em mim e no meu potencial. Obrigada por tornar essa caminhada mais leve, por ser apoio e aconchego. Obrigada por segurar minha mão, me mostrando quando eu precisava parar e comemorando cada vitória, por menor que fosse.

À minha orientadora, Dra. Marina Kimiko Kadowaki, por ser calma em momentos que tive dúvidas. Serei eternamente grata pela oportunidade de aprender com a senhora e levarei para sempre comigo o grande exemplo de profissional, pesquisadora e pessoa que é. Agradeço por todos os ensinamentos transmitidos e por não medir esforços para me ajudar a alcançar os meus objetivos.

À minha parceira de laboratório, Victória Pommer, por dividir comigo o seu conhecimento. Obrigada por ter sido porto seguro em um lugar totalmente novo, por ser amiga, irmã, professora e por todos os cafezinhos que dividimos nos intervalos entre os experimentos. Obrigada por toda ajuda durante os experimentos e por compartilhar esse amor pelos fungos, enzimas e pela pesquisa.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, Juliane, Vitória, Érica, Tatiane, Simone, Paula, Lucas e todos aqueles que sempre estiveram comigo, por toda ajuda que vocês me deram durante essa etapa. Obrigada por todo o auxílio nos experimentos e por todas as nossas conversas, que foram essenciais para deixar essa jornada mais fácil e divertida.

Aos professores da Bioquímica e Biologia Molecular, por todas as orientações e dicas durante a execução dos experimentos. Obrigada por serem exemplos de



profissionais, por compartilharem o amor pela pesquisa e pelas tardes de conversas e cafezinhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela bolsa concedida e pelo apoio para a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Unioeste, por todo conhecimento compartilhado e pela dedicação e comprometimento com uma pesquisa e ensino de qualidade.

# QUITINASE DE *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

## RESUMO

As quitinases são enzimas responsáveis por degradarem a quitina, um polímero insolúvel presente no exoesqueleto de insetos, em fungos, leveduras, algas e crustáceos. São inúmeros os organismos que produzem essas enzimas, sendo os fungos as principais fontes de obtenção. Elas são utilizadas em diversas áreas pela indústria, como na composição de defensivos agrícolas, em produtos farmacêuticos, como conservante e como adjuvante na terapia com medicamentos antifúngicos. Além disso, os quitooligossacarídeos (QOS), produtos gerados após a hidrólise da quitina, possuem diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana e prebiótica. Assim, este estudo teve por objetivo purificar e caracterizar bioquimicamente a quitinase extracelular do fungo *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T, bem como avaliar sua aplicação em diferentes metodologias biotecnológicas. A quitinase extracelular purificada parcialmente apresentou massa molecular de 120 kDa e, após análise do zimograma e características bioquímicas, constatou-se uma  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidase (GlcNAcase). A GlcNAcase apresentou maior atividade em temperatura de 65 °C e pH 6,0, sendo estável em temperaturas entre 40 e 55 °C e na faixa de pH 6,0 a 6,5. Os álcoois etílico, isobutílico, isopropílico e o glicerol aumentaram a atividade enzimática, enquanto o HgCl<sub>2</sub> e FeCl<sub>2</sub> a 5 mmol/L inibiram totalmente. A GlcNAcase apresentou atividade catalítica elevada com os substratos *p*-nitrofenil *N*-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo e *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo e nenhuma atividade na presença de quitina coloidal. Os valores de  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$  e  $E_a$  foram 971,81  $\mu$ mol/mL/min, 0,14 mg/mL, 1962,4 s<sup>-1</sup>, 4867,06 mM/s e 43,92 kJ/mol, respectivamente. A análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicaram que a bioconversão da casca de camarão *in natura* foi efetiva e não é necessário o emprego de pré-tratamento para que a degradação seja exitosa. Após análise dos produtos obtidos, verificou-se a produção de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) e de QOS com maiores graus de polimerização (GP), possivelmente diacetilquitobiose e quitotriose, indicando que o extrato bruto de *T. heterothallicus* PA2S4T pode conter dois tipos de quitinases: uma endoquitinase ou quitobiase e uma GlcNAcase. Além disso, os QOS obtidos apresentaram um efeito prebiótico sobre o crescimento de *Lactobacillus paracasei* superior ao da glicose. As características apresentadas pelas quitinases deste estudo e pelos produtos da sua

hidrólise evidenciam o grande potencial para a utilização destes pela indústria biotecnológica.

**PALAVRAS-CHAVE:**  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidase, endoquitinase, quitina, enzima fúngica, quitooligossacarídeos, prebiótico.

# ***Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T CHITINASE: PURIFICATION, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION**

## **ABSTRACT**

Chitinases are enzymes responsible for degrading chitin, an insoluble polymer present in the exoskeleton of insects, fungi, yeasts, algae, and crustaceans. There are countless organisms that produce these enzymes, and fungi are the main sources of obtaining them. They are used in several areas by the industry such as in the composition of agricultural pesticides, in pharmaceutical products as a preservative and as an adjuvant in therapy with antifungal drugs. In addition, chitooligosaccharides (COS), products generated after the hydrolysis of chitin, have different biological activities, such as antimicrobial and prebiotic. Thus, this study aimed to purify and biochemically characterize the extracellular chitinase of the fungus *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T, as well as to evaluate its application in different biotechnological methodologies. The partially purified extracellular chitinase exhibited a molecular mass of 120 kDa and, after analysis of the zymogram and biochemical characteristics, it was found to have a  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase (GlcNAcase). GlcNAcase exhibited higher activity at 65 °C and pH 6.0, remaining stable at temperatures between 40 and 55 °C and in the range of pH 6.0 to 6.5. Ethyl, isobutyl, isopropyl alcohols, and glycerol increased enzymatic activity, while HgCl<sub>2</sub> and FeCl<sub>2</sub> at 5 mmol/L completely inhibited it. GlcNAcase showed high catalytic activity with the substrates *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide and *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside and no activity in the presence of colloidal chitin. The values of  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$ , and  $E_a$  were 971.81  $\mu$ mol/mL/min, 0.14 mg/mL, 1962.4 s<sup>-1</sup>, 4867.06 mM/s, and 43.92 kJ/mol, respectively. The analysis of images obtained by scanning electron microscopy (SEM) indicated that the bioconversion of *in natura* shrimp shell was effective, and that no pre-treatment is necessary for the degradation to be successful. After analyzing the products obtained, the production of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and COS with higher degrees of polymerization (DP) was verified, possibly diacetylchitobiose and chitotriose, indicating that the crude extract of *T. heterothallicus* may contain two types of chitinases: an endochitinase or chitobiase and a GlcNAcase. Furthermore, the COS obtained showed a prebiotic effect on the growth of *Lactobacillus paracasei* superior to that of glucose. The characteristics

presented by the chitinase in this study and by the products of their hydrolysis show the great potential for their use by the biotechnology industry.

**KEYWORDS:**  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase, endochitinase, chitin, fungal enzyme, chitooligosaccharides, prebiotic.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 Quitina .....	18
1.2 Quitinases .....	21
1.3 Microrganismos produtores de quitinase.....	26
1.4 <i>Thermothelomyces heterothallicus</i> .....	27
1.5 Aplicabilidade industrial da quitinase.....	27
1.6 Quitooligossacarídeos .....	28
1.7 Propriedades biológicas dos QOS.....	30
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
2.1 Objetivo Geral .....	31
2.2 Objetivos Específicos .....	31
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>32</b>
<b>Bioconversão da casca de camarão <i>in natura</i> e produção de prebióticos por quitinases do fungo <i>Thermothelomyces heterothallicus</i> PA2S4T – Artigo redigido segundo normas da revista International Journal of Biological Macromolecules .....</b>	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO I A novel <i>Thermothelomyces heterothallicus</i> PA2S4T fungus isolated from the soil induces chitinase production using orange peel flour – Publicado na revista Scientia Plena Qualis A4.....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características bioquímicas de algumas quitinases fúngicas.....	25
Tabela 2 Resumo da purificação da quitinase extracelular de <i>T. heterothallicus</i> PA2S4T.....	39
Tabela 3. Efeito de íons metálicos, reagentes químicos e solventes orgânicos sobre a atividade da quitinase.....	42
Tabela 4. Especificidade ao substrato da quitinase parcialmente purificada.....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química da quitina.....	18
Figura 2 Conformação da $\alpha$ -quitina, com cadeias alinhadas de forma antiparalela. .	19
Figura 3 Conformação da $\beta$ -quitina, com cadeias alinhadas de forma paralela.....	20
Figura 4 Conformação da $\gamma$ -quitina, com duas fitas paralelas e uma antiparalela ....	21
Figura 5 Modo de ação de diferentes tipos de quitinases e os produtos gerados após a clivagem. ....	23
Figura 6 Estrutura química da quitina, quitosana, homo e heteroquitooligossacarídeos.....	28
Figura 7 Análise por SDS-PAGE e zimograma da GlcNAcase de <i>T. heterothallicus</i> PA2S4T. (1) Marcador de peso molecular; (2) GlcNAcase parcialmente purificada; (3) Zimograma. ....	40
Figura 8 Efeito da temperatura sobre a GlcNAcase parcialmente purificada de <i>T. heterothallicus</i> PA2S4T (A) e estabilidade térmica (C). Efeito do pH sobre a atividade da GlcNAcase (B) e estabilidade (D) após incubar a enzima sem substrato por 24 h; (■) 40°C, (●) 50°C, (▲) 55°C, (▼) 60°C e (◆) 65°C. ....	41
Figura 9 Cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos da hidrólise da quitina da casca de camarão pela GlcNAcase parcialmente purificada após reação de 0, 5, 10 e 20 min; (S) padrão <i>N</i> -acetilglicosamina 1 mg/mL. ....	45
Figura 10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de casca de camarão <i>in natura</i> tratada com as quitinases presentes no extrato bruto. (A), (B) e (C) Controle: casca de camarão incubadas apenas no tampão por 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente. (D), (E) e (F) casca de camarão tratadas com o extrato bruto enzimático por 24 h, 48 h e 72 h de reação, respectivamente. ....	46
Figura 11 Cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos da hidrólise da casca de camarão <i>in natura</i> após 0, 24, 48 e 72 h; (P) Padrão <i>N</i> -acetilglicosamina 1 mg/mL ....	47
Figura 12 Efeito (A) e consumo (B) dos QOS obtidos após bioconversão da casca de camarão <i>in natura</i> sobre o crescimento <i>L. paracasei</i> . O caldo MRS foi suplementado	



com QOS a 1 mg/mL. (■) meio suplementado com QOS produzidos após 24 hr de hidrólise; (●) meio suplementado com QOS produzidos após 48 hr de hidrólise; (▲) meio suplementado com QOS produzidos após 72 hr de hidrólise e (▼) meio suplementado com glicose 1 mg/mL (controle positivo).....48

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Quitina

A quitina foi descrita pela primeira vez em 1811 como “*fungine*” pelo professor Henri Braconnot após sua identificação em cogumelos e somente em 1823 foi renomeada de quitina pelo pesquisador Auguste Odier (ODIER, 1823), após encontrar essa mesma substância na cutícula de besouros (SHAALA et al., 2019).

Presente de forma abundante no planeta, a quitina é um homopolissacarídeo insolúvel, não ramificado, formado por ligações  $\beta$ -1,4 de resíduos de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) (Figura 1), possui uma estrutura altamente ordenada, cristalina, contendo de 6 a 7% de nitrogênio em sua estrutura e que se apresenta de três formas:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; NAGPURE; CHOUDHARY; GUPTA, 2014; LANGNER; GÖHRE, 2016; KAYA et al., 2017; LV et al., 2021).

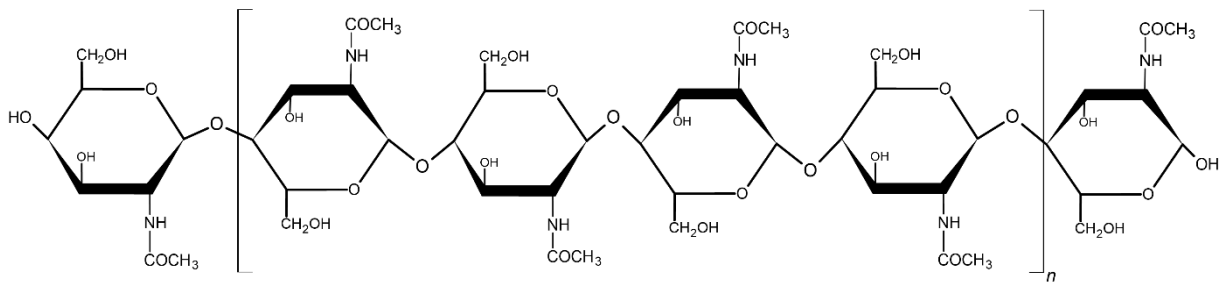


Figura 1 Estrutura química da quitina (Fonte: adaptado de SOUZA et al., 2011).

A  $\alpha$ -quitina (Figura 2) está presente em uma maior quantidade de estruturas, podendo ser encontrada nos organismos dos filos Porifera e Bryozoa, no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular fúngica, onde suas cadeias estão alinhadas de forma antiparalela, fortalecendo as ligações de hidrogênio e deixando-a mais estável e resistente (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; SOUZA et al., 2011; KAYA et al., 2017).

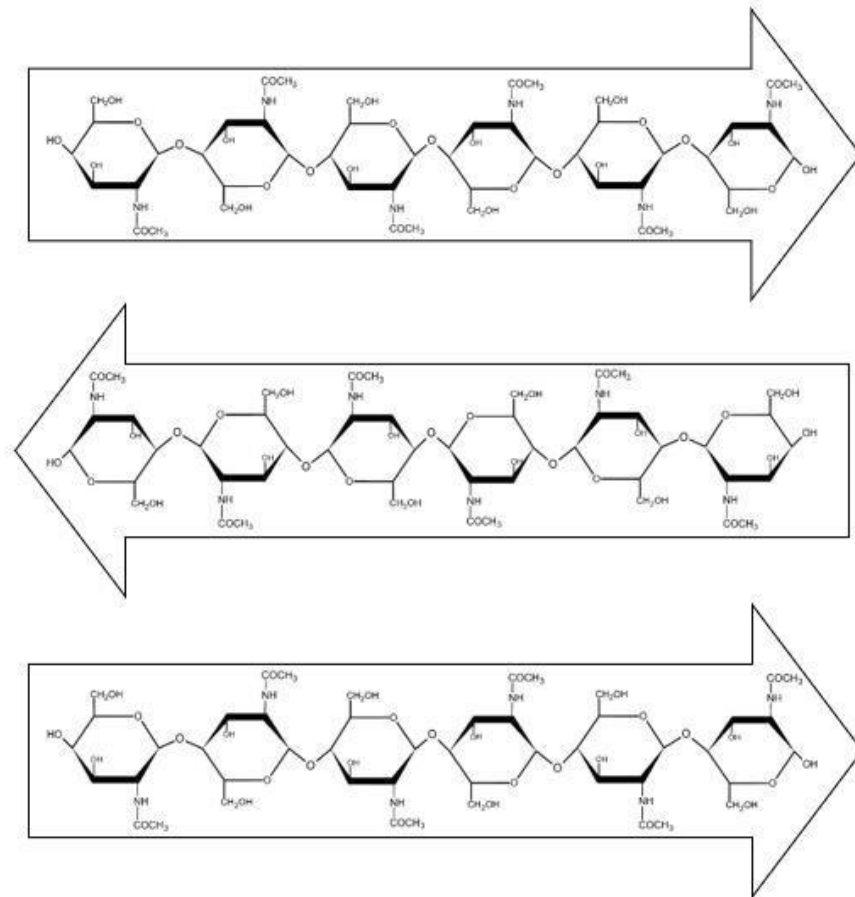


Figura 2 Conformação da  $\alpha$ -quitina, com cadeias alinhadas de forma antiparalela (Fonte: adaptado de ANITHA et al., 2014).

A  $\beta$ -quitina (Figura 3) está geralmente presente em estruturas flexíveis, podendo ser encontrada na parede celular de diatomáceas e nos animais da classe Cephalopoda, como polvos e lulas. Ainda, apresenta cadeias dispostas de forma paralela (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; ANITHA et al., 2014; KAYA et al., 2017).

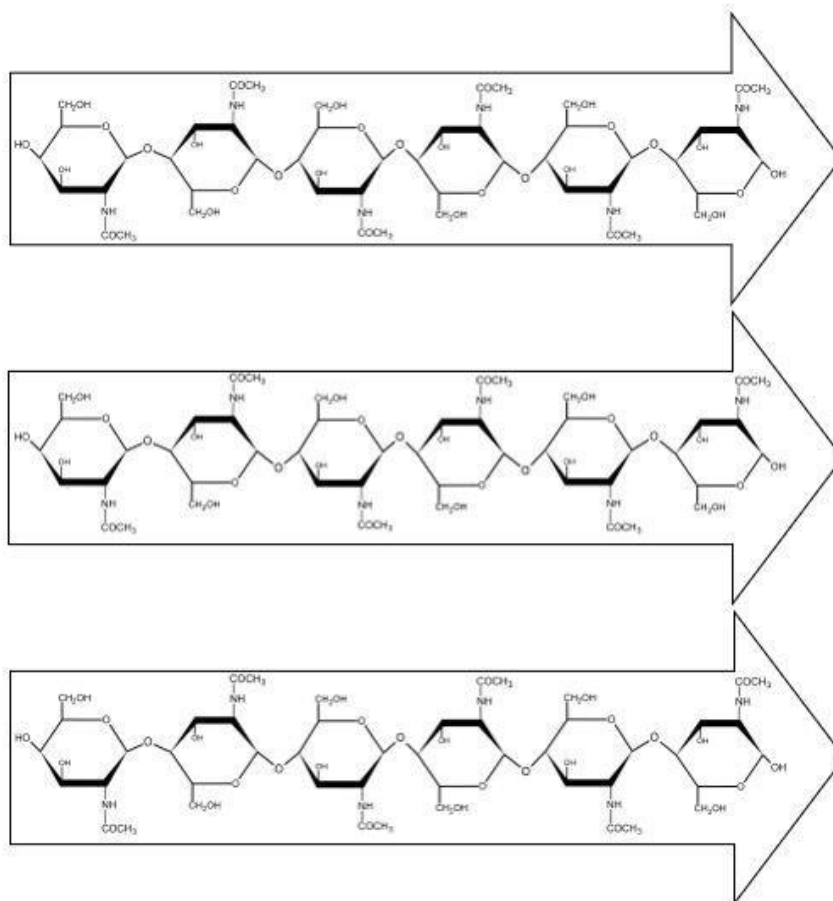


Figura 3 Conformação da  $\beta$ -quitina, com cadeias alinhadas de forma paralela (Fonte: adaptado de ANITHA et al., 2014).

A forma mais incomum é a  $\gamma$ -quitina (Figura 4), composta por duas fitas paralelas e uma antiparalela do polissacarídeo, confere flexibilidade às estruturas que compõe, sendo encontrada em lulas e muitas vezes é considerada uma junção entre a estrutura  $\alpha$  e  $\beta$  da quitina, ao invés de uma conformação distinta (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; ANITHA et al., 2014; KAYA et al., 2017).

Apesar de ser insolúvel em água, a quitina pode ser transformada em produtos solúveis, como a quitosana, o que lhe garante a disponibilidade de ser utilizada em diferentes preparações, como hidrogéis, esferas e membranas, e apenas as formas  $\alpha$  e  $\beta$  estão disponíveis comercialmente (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

Nos fungos, a quitina está presente na parede celular, correspondendo de 10 a 20% de toda essa estrutura. Embora seja o componente minoritário, desempenha um papel importante na divisão celular desses microrganismos (RONCERO; VÁZQUEZ DE ALDANA, 2020). Em crustáceos, como camarões e caranguejos, a quitina está

presente na carapaça, correspondendo de 15 a 20% da sua composição (SILVA, 2018).

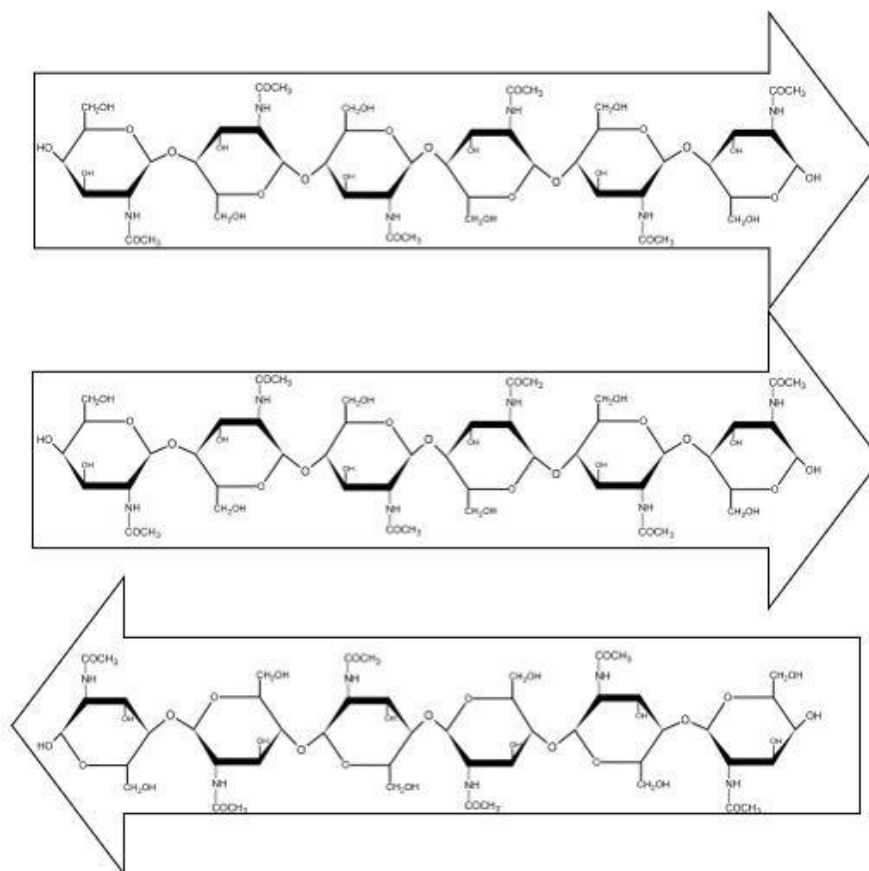


Figura 4 Conformação da  $\gamma$ -quitina, com duas fitas paralelas e uma antiparalela (Fonte: adaptado de ANITHA et al., 2014).

Devido ao descarte incorreto gerado pela grande quantidade anualmente produzida, foi proposto em 2015 um conceito de “refinaria de quitina”, que tem como objetivo converter tais moléculas em produtos químicos de valor agregado (YAN; FONG, 2018). Assim, estudos sobre a degradação da quitina são importantes não somente no âmbito de reciclagem de nutrientes na natureza, mas também contribuem para a obtenção de moléculas de interesse industrial (AKEED; ATRASH; NAFFAA, 2020).

## 1.2 Quitinases

Com a característica de produzirem moléculas com atividades atrativas, as enzimas têm recebido cada vez mais atenção das indústrias biotecnológicas, onde estão sendo utilizadas como biocatalisadores, devido ao baixo custo, à capacidade de

agirem em diferentes temperaturas e faixas de pH, e por serem ecologicamente mais viáveis, quando comparadas aos catalisadores químicos geralmente empregados nesses processos (MONTEIRO; SILVA, 2009; DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; JEMLI et al., 2016).

São diversas as fontes utilizadas na obtenção de enzimas para uso comercial, que podem ser derivadas de plantas, animais e microrganismos. Obtidas de plantas, têm-se as enzimas papaína, bromelina e ficina, e de animais, a renina e pepsina. Entretanto, a maior parte desses compostos são gerados a partir de microrganismos como fungos e bactérias, em que proteases, amilases, lipases e celulases são as responsáveis pelo principal movimento desse mercado (PRAKASH et al., 2013; JEMLI et al., 2016).

Descobertas por Folpmers em 1921, as quitinases (EC 3.2.1.14) têm recebido maior atenção da indústria biotecnológica, devido à sua capacidade de degradar a quitina, gerando quitoooligômeros com menor peso molecular. Elas podem ser encontradas em bactérias, plantas, insetos e até mesmo em alguns vírus (BUCOLO et al., 2011; KARTHIK et al., 2014; KHAN et al., 2015; DU et al., 2021).

Com base no modo de ação, as quitinases podem ser classificadas em endoquitinases (EC 3.2.1.14), que clivam a quitina, formando polímeros de menores pesos moleculares, e em exoquitinases (EC 3.2.1.200 e EC 3.2.1.201), que liberam diacetilquitobiose, iniciando pela extremidade não redutora e redutora da quitina, respectivamente; e  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidases (GlcNAcases) (EC 3.2.1.52), que geram monômeros de GlcNAc, clivando os produtos das exoquitinases e endoquitinases (Figura 5) (HAMID et al., 2013; KARTHIK et al., 2014; LANGNER; GÖHRE, 2016; ZHANG et al., 2018).

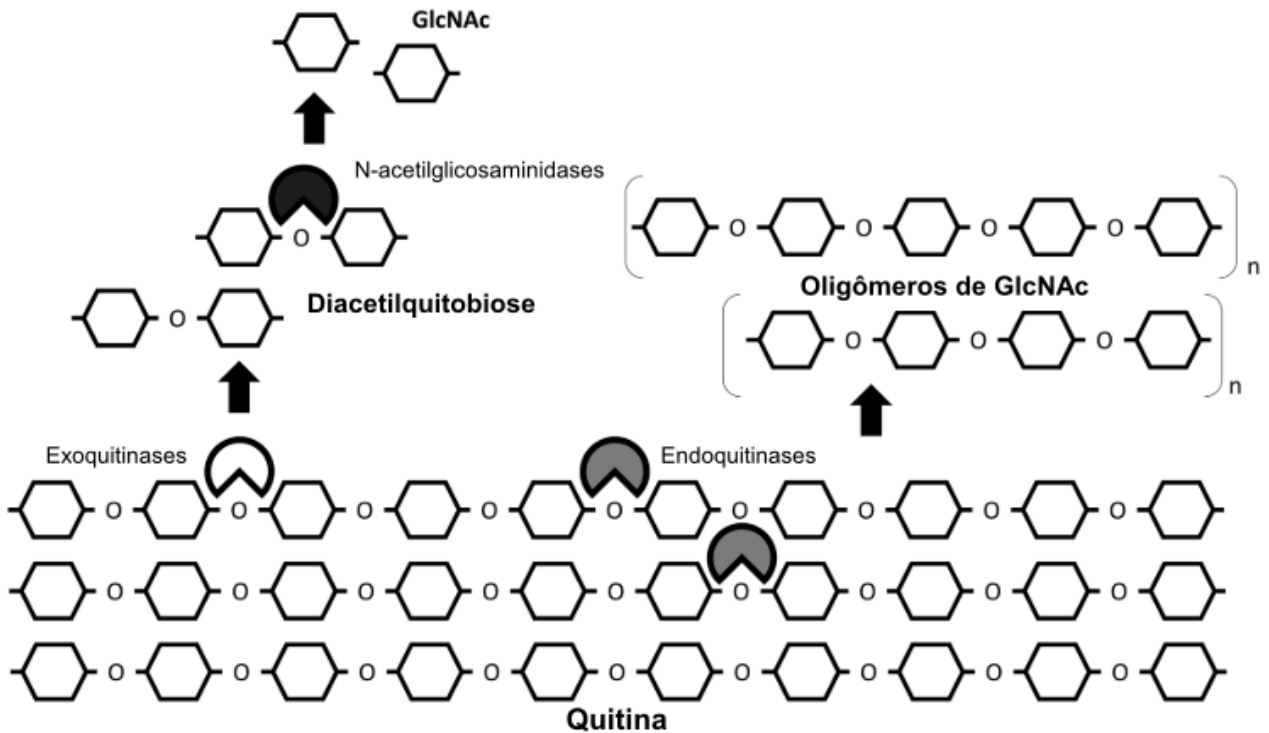


Figura 5 Modo de ação de diferentes tipos de quitinases e os produtos gerados após a clivagem (Fonte: adaptado de LE & YANG, 2019).

A partir da sequência de aminoácidos dessas enzimas, pode-se classificar as quitinases em três famílias de glicosil hidrolases (GH). A GH 18 inclui as enzimas fúngicas e bacterianas; em GH 19, a maior parte das enzimas dessa família são de plantas; e GH 20 são compostas por algumas quitinases bacterianas e humanas, mas não existem estudos detalhados sobre sua estrutura (HAMID et al., 2013; KARTHIK et al., 2014; LANGNER; GÖHRE, 2016).

Apesar de degradarem compostos semelhantes, as quitinases apresentam diferenças na sua estrutura molecular, na especificidade pelo substrato e no produto gerado após a reação, em que aquelas pertencentes à família GH 18 geram, após a hidrólise,  $\beta$ -anômeros, e as que pertencem à família GH 19 geram  $\alpha$ -anômeros (HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012; LOBO et al., 2013).

Pertencendo à família GH 18, as quitinases fúngicas apresentam basicamente cinco domínios em sua estrutura: domínio catalítico, região peptídica do sinal N-terminal, domínio de ligação à quitina, região rica em serina/treonina e região da extensão C-terminal. Em algumas enzimas, entretanto, a região rica em serina/treonina, o domínio de ligação à quitina e a região da extensão C-terminal estão

ausentes, indicando que não são necessárias para a atividade catalítica da quitinase (HAMID et al., 2013; KHAN et al., 2015).

Além disso, a massa molecular das quitinases pode variar de 30 a 200 kDa, o pH ótimo para a sua atividade varia de 4.0 a 8.0 e a temperatura ótima de atividade catalítica dessa enzima gira em torno de 40 a 50 °C, em que algumas quitinases termoestáveis atuam em temperaturas superiores a 55 °C (Tabela 1), podendo manter sua estabilidade a 70 °C (KARTHIK et al., 2014; KHAN et al., 2015).



Tabela 1 Características bioquímicas de algumas quitinases fúngicas

Fungo	Massa molecular (kDa)	pH		Temperatura (°C)		Atividade Específica (U/mg)	Referência
		Ótimo	Estabilidade	Ótima	Estabilidade		
<i>Aspergillus terreus</i>	60	5,6	5,0 - 7,0	50	40 - 60	182,08	(FARAG et al., 2016)
<i>Aspergillus terrus</i>	NR	5,2	NR	40	NR	4,82	(FARAG; AL-NUSARIE, 2014)
<i>Chaetomium thermophilum</i>	47,3	5,5	NR	50	50 - 60	6,09	(LI et al., 2010)
<i>Coprinellus congregatus</i>	68	4,0	NR	35	NR	NR	(KANG; KIM; CHOI, 2013)
<i>Gliocladium catenulatum</i> HL-1-1	51	6,0	3,0 - 6,0	60	20 - 40	12,17	(MA et al., 2012)
<i>Humicola grisea</i>	50	3,0	3,0 - 11,0	70	70 - 85	9,09	(KUMAR et al., 2018)
<i>Myceliophthora thermophila</i> C1	71	4,5	NR	50	55 - 70	432	(KROLICKA et al., 2018)
<i>Paecilomyces thermophila</i>	43,7	4,5	4,0 - 10,5	50	30 - 40	NR	(KOPPARAPU et al., 2012)
<i>Penicillium ochrochloron</i> MTCC 517	64	7,0	6,0 - 8,0	40	30 - 50	2360,1	(PATIL; WAGHMARE; JADHAV, 2013)
<i>Rhizomucor miehei</i>	96	6,5	6,0 - 8,0	50	25 - 45	21,2	(YANG et al., 2014)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> var. <i>levisporus</i>	48,4	8,0	NR	50	50	26,19	(LI et al., 2010)
<i>Thermothelomyces heterothallicus</i> PA2S4T	120	6,0	6,0 - 6,5	65	40 - 55	127,86	Este estudo
<i>Trichoderma harzianum</i> GIM 3.442	45	6,0	5,0 - 9,0	45	30 - 35	34,5	(DENG et al., 2019)

NR: informações não relatadas nos artigos.

### 1.3 Microrganismos produtores de quitinase

Vários são os microrganismos estudados e descritos como produtores de quitinase pela literatura, em que bactérias, leveduras e fungos filamentosos dominam esse papel. Além disso, essa enzima pode ser encontrada nas sementes, flores e caules de plantas, tubérculos e em insetos, como o bicho-da-seda (HAMID et al., 2013; LE; YANG, 2019).

*Serratia marcescens*, *Bacillus* sp., *Streptomyces* spp., *Paenibacillus* sp., *Vibrio* spp. e *Salinivibrio* sp. são exemplos de bactérias comumente utilizadas na produção de quitinases, que são produzidas por esses microrganismos devido à necessidade de degradar a quitina e utilizá-la como fonte de carbono (HAMID et al., 2013; LE; YANG, 2019).

Apesar de fungos filamentosos possuírem mais genes da família das quitinases do que as leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* é bastante utilizada na obtenção desses compostos (LE; YANG, 2019), juntamente com os fungos pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Agaricus*, *Oenicillium*, *Lecanicillium*, *Mucor*, *Beauveria*, *Neurospora*, *Lycoperdon*, *Myrothecium*, *Conidiobolus*, *Metharhizium* e *Stachybotrys* (KARTHIK et al., 2014; STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015).

Dentre os diferentes fatores que influenciam a atividade fúngica, aqueles microrganismos adaptados genética e fisiologicamente para suportar temperaturas elevadas estão sendo utilizados na obtenção de enzimas. Sendo denominados fungos termófilos, eles apresentam um ótimo crescimento em temperaturas que variam de 40 °C a 50 °C (SINGH et al., 2016; DE OLIVEIRA; RODRIGUES, 2019).

A característica termofílica proporciona a produção de enzimas de maior estabilidade térmica e, conseqüentemente, a sua aplicação em diversas áreas que necessitam da utilização de temperaturas elevadas, como na produção de biocombustíveis, degradação de biomassa vegetal e sacarificação de polissacarídeos (VAN DEN BRINK et al., 2013; HAN et al., 2019).

A maioria dos fungos termófilos já descritos estão agrupados nas ordens Eurotiales, Mucorales e Sordariales. Embora se trate de um grupo taxonomicamente diverso, com 14 famílias, a termofilia está restrita à família Chaetomiaceae, à qual pertence o fungo *T. heterothallicus* (MORGENSTERN et al., 2012; HUTCHINSON et al., 2016).

#### 1.4 *Thermothelomyces heterothallicus*

*Thermothelomyces* é um gênero de fungos termófilos e mesófilos, em que as primeiras espécies isoladas foram todas classificadas como *Myceliophthora thermophila*. Posteriormente, esse grupo foi dividido em dois, e criou-se a espécie *T. heterothallicus* (VAN DEN BRINK et al., 2013).

Pertencendo ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes e família Chaetomiaceae, o fungo filamentoso *T. heterothallicus* vem se apresentando como um microrganismo promissor na prospecção de enzimas, pois a expressão destas pode ocorrer inclusive por indução com diferentes fontes de carbono (AGUILAR-PONTES et al., 2016; DE AMO et al., 2019).

Industrialmente, *T. heterothallicus* tem sido utilizado na obtenção de enzimas que degradam materiais compostos por lignina e celulose, além de endoglucanases,  $\beta$ -glucosidase e xilanase (DE OLIVEIRA SIMÕES et al., 2019).

#### 1.5 Aplicabilidade industrial da quitinase

A utilização de enzimas provenientes de microrganismos tem surgido como uma opção para a substituição de compostos sintéticos, pois o processo para sua obtenção é rápido, gera maiores quantidades e é mais barato. As principais áreas em que a quitinase é aplicada atualmente são a farmacêutica, a médica, a alimentícia e a agrícola (MONTEIRO; SILVA, 2009; ANBU et al., 2017; BEYGMORADI et al., 2018; LE; YANG, 2019).

Biologicamente, a quitinase tem sido usada como componente de defensivos agrícolas, devido à sua capacidade de degradar o principal componente do exoesqueleto de insetos e da parede celular de fungos, diminuindo a dependência do uso de pesticidas químicos que causam a poluição do meio ambiente e podem gerar cepas de microrganismos resistentes. Ainda na área agrícola, a mensuração da atividade da quitinase tem sido usada como um indicador da presença de fungos no solo e a clivagem de rejeitos de quitina realizada pela quitinase gera fertilizantes naturais (HAMID et al., 2013; KHAN et al., 2015; BEYGMORADI et al., 2018).

Na indústria farmacêutica e alimentícia, a quitinase vem sendo empregada como antimicrobiano, antioxidante e conservante de preparações cosméticas e de alimentos, além de ser usada como coadjuvante na terapia com medicamentos antifúngicos, por aumentar a atividade dessas drogas (HAMID et al., 2013; LOBO et

al., 2013; KARTHIK et al., 2014; KHAN et al., 2017; LE; YANG, 2019). Ainda, essas enzimas têm sido aplicadas no tratamento de rejeitos produzidos por diferentes indústrias, principalmente pela indústria pesqueira (KHAN et al., 2015).

## 1.6 Quitoilgossacarídeos

Quitoilgossacarídeos (QOS) (Figura 6) são os produtos gerados após a despolimerização hidrolítica da quitina e quitosana, que apresentam ligações  $\beta$ -1,4 e são formados por GlcNAc ou glicosamina (GlcN) (LI et al., 2016).

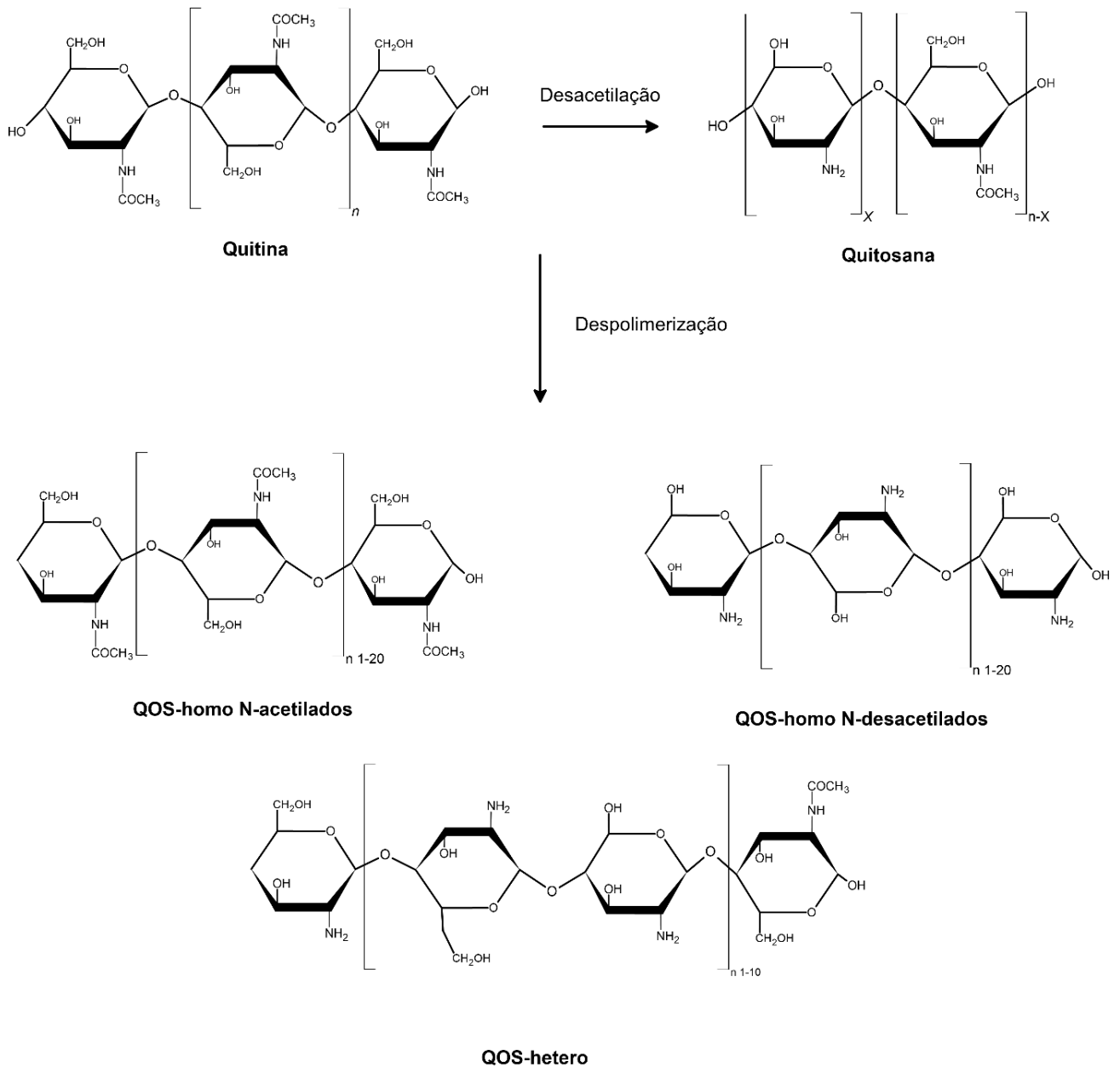


Figura 6 Estrutura química da quitina, quitosana, homo e heteroquitoilgossacarídeos (Fonte: adaptado de JAFARI et al., 2020).

Essas estruturas podem ser classificadas como homoquitooligossacarídeos, quando compostos por GlcNAc ou GlcN, e heteroquitooligossacarídeos, formados por GlcNAc e GlcN, com oligômeros que variam em grau de polimerização (GP), grau de N-acetilação (GA), grau de desacetilação (GD) e posição dos resíduos *N*-acetil na cadeia oligomérica, características que podem influenciar na solubilidade e aplicação biotecnológica, sendo esses compostos mais empregados em processos biotecnológicos e industriais (LIAQAT; ELTEM, 2018).

O grau de polimerização (GP) dos QOS varia de 2 a 20, podendo apresentar diferentes graus de N-acetilação e posição dos resíduos N-acetil. Ainda, de acordo com essa característica, QOS são denominados de acordo com sua estrutura, por exemplo, quitopentaoses (GP 5), quitotetraoses (GP 4) e quitotrioses (GP 3) (LI et al., 2016; JAFARI et al., 2020).

Apresentam também características diferentes, com base nessa condição, em que QOS com GP menor que 4 são solúveis em metanol e QOS com GP maior que 5 dificilmente se solubilizam neste composto químico. Além disso, os QOS não são solúveis em acetona, butanol, etanol e propanol, mas se dissolvem totalmente em água (LIAQAT; ELTEM, 2018; JAFARI et al., 2020).

QOS podem ser obtidos por meio de diferentes métodos, como hidrólise ácida, alcalina, degradação oxidativa e hidrólise enzimática, além de ser possível a utilização de métodos físicos, que incluem micro-ondas, ultrasonicação, luz ultravioleta e irradiação  $\gamma$ , visando a otimizar a degradação e produção desses compostos (LI et al., 2016).

A obtenção de QOS a partir de metodologias químicas foram aperfeiçoadas ao longo do tempo. Porém, ainda são processos que contam com vários passos, que possuem um alto custo, baixo rendimento, são reações difíceis de controlar, que podem produzir moléculas tóxicas, e geram uma grande quantidade de resíduos (JE; KIM, 2012; LI et al., 2016; LIAQAT; ELTEM, 2018).

A hidrólise enzimática da quitina e quitosana vem sendo empregada como um método alternativo, em que a síntese ocorre de uma forma mais controlada, em melhores condições, como temperaturas mais amenas, e com uma maior taxa de produção do que as metodologias mais usadas, como hidrólise ácida e alcalina (LIAQAT; ELTEM, 2018).

Uma grande variedade enzimática pode ser empregada na obtenção de QOS, sendo elas consideradas específicas, como quitinases e quitosanases, e inespecíficas, como lisozimas, celulasas e pectinases. A utilização de enzimas inespecíficas é possível devido à semelhança entre as ligações glicosídicas que estas clivam (JUNG; PARK, 2014; HAMED; ÖZOGUL; REGENSTEIN, 2016).

### **1.7 Propriedades biológicas dos QOS**

Diversas propriedades biológicas já foram atribuídas aos QOS, estando essas características intimamente ligadas ao grau de polimerização e grau de N-acetilação das moléculas (LI et al., 2016).

Estudos anteriores têm demonstrado a ação antitumoral dos QOS, em que quitohexaoses apresentaram os melhores resultados. O mecanismo por meio do qual essa ação ocorre ainda não está totalmente elucidado (LI et al., 2016). Uma das hipóteses sugeridas é a de que os QOS, que possuem carga positiva, podem ser adsorvidos nas células tumorais, com carga negativa, modificando assim a permeabilidade destas. Isso não acontece nas células saudáveis, que também possuem carga positiva e repelem as moléculas de QOS. Além disso, esses compostos podem provocar uma estimulação do sistema imune e inibir a proliferação de células cancerosas (LIAQAT; ELTEM, 2018).

Os QOS podem possuir propriedades capazes de inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA), molécula que desempenha um papel importante no controle da pressão arterial. Pesquisas indicam que quitotetraoses são mais eficientes que as outras moléculas, e essa característica pode estar relacionada ao peso molecular e grau de desacetilação dessas estruturas (PARK et al., 2008; WIJESEKARA; KIM, 2010).

Apesar de a quitosana ser mais efetiva na inibição do crescimento bacteriano, sua solubilidade em pH ácido limita sua aplicação pela indústria biotecnológica (JE; KIM, 2012). Grau de polimerização e grau de N-acetilação influenciam diretamente a ação antibacteriana dessas moléculas, e já se sabe que quitohexaoses possuem atividade contra *Staphylococcus aureus*, sendo esse o GP mínimo para um efeito eficiente (LI et al., 2014). Acredita-se que os QOS, ao interagirem com a parede celular bacteriana, causem a sua ruptura, além de poderem gerar uma agregação bacteriana e interromper a nutrição, levando à apoptose (LI et al., 2016).

Por não serem digeridos naturalmente e pela capacidade de inibir patógenos, QOS têm se mostrado uma opção interessante na aplicação como prebióticos, em que moléculas com um GP de 2 a 8 têm induzido o crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (LIAQAT; ELTEM, 2018), como de *L. paracasei* BCRC12193 e *L.kefir* BCRC14011 (LIANG et al., 2013).

Diante da grande possibilidade de aplicação da quitinase como um dos QOS em diferentes setores biotecnológicos, como farmacêutico, agrícola, médico e alimentício, estudos se fazem necessários para maior compreensão dessas estruturas e seus modos de ação, buscando aprimorar e solidificar conhecimentos e práticas já existentes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Purificar e caracterizar a quitinase extracelular do fungo *T. heterothallicus* PA2S4T, além de testar diferentes aplicações para a enzima.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Purificar a quitinase extracelular por colunas cromatográficas;
- Caracterizar bioquimicamente a quitinase purificada (pH e temperatura ótima, estabilidade ao pH e temperatura, efeito de íons, massa molecular,  $K_m$ ,  $V_{máx}$ ,  $K_{cat}$ ,  $K_{cat}/K_m$  e  $E_a$ );
- Analisar quais produtos são gerados após a hidrólise da quitina pela quitinase por cromatografia de camada delgada;
- Verificar a capacidade da enzima em degradar casca de camarão *in natura*;
- Identificar a atividade prebiótica dos QOS obtidos pela bioconversão da casca de camarão *in natura* com *Lactobacillus paracasei*.

## CAPÍTULO 1



## **Bioconversão da casca de camarão *in natura* e produção de prebióticos por quitinases do fungo *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T**

Paula Daniela Helfenstein Rother *et al.*

### **Resumo**

Este estudo investigou as aplicações de quitinases produzidas pelo fungo *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T na bioconversão da casca de camarão *in natura* e avaliação da atividade prebiótica dos quitooligossacarídeos (QOS) para lactobacilos. A GlcNAcase parcialmente purificada apresentou uma massa molecular de 120 kDa, temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática de 65 °C e 6,0, respectivamente. Os álcoois isobutílico e isopropílico a 1% aumentaram a atividade da GlcNAcase, enquanto os íons  $Hg^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  inibiram totalmente a atividade enzimática. A enzima apresentou maior atividade com o substrato *p*NP-NAG (165,3 U/mg) e o  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$  e  $E_a$  foram 0,40 mM, 981,2  $\mu$ mol/min/mg, 1962,4  $s^{-1}$ , 4867,06 mM/s e 43,92 kJ/mol, respectivamente. A estrutura morfológica da casca de camarão *in natura* tratada com as quitinases analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou que a bioconversão do resíduo não requer tratamento prévio da casca de camarão, e os produtos da hidrólise gerados após ação combinada das quitinases eram *N*-acetilglicosamina, diacetilquitobiose e quitotriose. Além disso, os QOS gerados na bioconversão da casca de camarão *in natura* induziram o crescimento de *Lactobacillus paracasei*, apresentando um efeito prebiótico superior em comparação à glicose. Portanto, as quitinases de *T. heterothallicus* PA2S4T apresentam um grande potencial para aplicação na bioconversão de resíduos à base de quitina, como casca de camarão, bem como na produção de QOS com função prebiótica.

**Palavras-chave:** quitina, fungo, *N*-acetilglicosaminidase, endoquitinase, probiótico.

### **1. Introdução**

A criação de crustáceos é um dos principais setores da indústria de frutos do mar e gera aproximadamente 6 a 8 milhões de toneladas de resíduos por ano [1, 2].

Em 2018, a produção de camarões alcançou a marca de 9,4 milhões de toneladas, tendo movimentado 69,3 bilhões de dólares [3]. Cerca de 45 a 60% dos componentes estruturais do camarão não é consumido, como a casca e a cabeça, resíduo que, apesar de ser utilizado como alimento na aquicultura ou para animais, tem sua maior parte descartada em aterros, no oceano ou é incinerada [4].

O resíduo de casca de camarão é uma fonte em potencial de quitina, um biopolímero insolúvel em água, formada por resíduos de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) que se unem através de ligações  $\beta$ -(1,4) [5–7]. A quitina é um composto biocompatível e biodegradável, com inúmeras propriedades biológicas, como sua ação antibacteriana e cicatrizante, e é utilizada por áreas como a farmacêutica, alimentícia e agrícola [8].

Entretanto, os processos químicos convencionais utilizados na obtenção da quitina e degradação dos resíduos de casca de camarão possuem um alto custo e geram uma grande quantidade de poluição, pois se faz necessária a utilização de ácidos, como o ácido clorídrico (HCl), para retirar os minerais, e de bases, como o hidróxido de sódio (NaOH), visando à remoção das proteínas presentes na amostra [1, 9]. Para se obter 1 tonelada de quitina, cerca de 400 m<sup>3</sup> de água residuais contendo uma concentração elevada de amônia e sal são descartadas, dificultando o tratamento desse recurso natural [10]. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos que sejam viáveis economicamente e não agredam o meio ambiente [11].

Uma alternativa aos processos que utilizam reagentes químicos é a bioextração da quitina, em que as enzimas recebem um papel de destaque [12, 13]. Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações  $\beta$ -(1,4) da quitina e são classificadas de acordo com seu modo de ação em endoquitinases e exoquitinases [14]. Endoquitinases (EC 3.2.1.14) clivam a quitina na sua porção interna de forma aleatória, liberando quito oligossacarídeos (QOS), polímeros solúveis e com menor peso molecular, como diacetilquitobiose, quitotriose e quitotetraoses [15]. Em contrapartida, as exoquitinases (EC 3.2.1.200 e EC 3.2.1.201) e  $\beta$ -N-acetilglicosaminidases (EC 3.2.1.52) são responsáveis por liberarem dímeros e monômeros de GlcNAc, respectivamente [16, 17].

As quitinases fúngicas têm recebido maior atenção devido à possibilidade de aplicação em diferentes setores da indústria biotecnológica [18], gerando produtos

com maior valor agregado, além de diminuir a contaminação ambiental, pois seu uso não necessita de uma grande quantidade de energia ou reagentes químicos [17, 19]. Essas enzimas podem ser utilizadas como biocontroles contra fungos e insetos, como agente antifúngico na composição de diferentes produtos médicos e alimentícios e na degradação de resíduos provenientes da indústria de frutos do mar [20–22].

Além disso, os quitooligossacarídeos (QOS), produtos compostos por unidades de GlcNAc ou glicosamina (GlcN), são gerados pela ação das quitinases e também apresentam diferentes funções biológicas, como atividade antifúngica, antitumoral, antibacteriana e prebiótica [23, 24].

Contudo, ainda são escassos os trabalhos acerca de novas enzimas fúngicas capazes de degradarem resíduos de casca de camarão e produzirem compostos com potencial prebiótico. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar bioquimicamente a quitinase do fungo *T. heterothallicus* PA2S4T, além de avaliar sua aplicação na bioconversão da casca de camarão, bem como verificar a atividade prebiótica dos produtos de hidrólise como suplemento para cultivo dos probióticos *L. paracasei*.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Materiais**

A quitina em pó de camarão (grau prático), quitina de casca de camarão, quitosana, *p*-nitrofenil *N*-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo (*p*NP-GlcNAc), *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*p*NP-Glc) e 4-metilumbeliferil-*N*-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo (4-MUF-NAG) foram adquiridos da Sigma-Aldrich-Merck (Brasil). A casca de camarão (*Farfantepenaeus* sp.) *in natura* foi obtida no mercado local, lavada com água corrente, secagem em estufa a 50 °C e triturada. Todos os outros reagentes químicos eram de grau analítico e comercialmente disponíveis.

### **2.2 Microrganismo e manutenção**

O fungo *T. heterothallicus* PA2S4T foi isolado de amostras de solo coletado em Nova Aurora, Paraná, Brasil (24°30'9" S 53°15'18" W) e identificado taxonomicamente em nível de espécie anteriormente [15]. O fungo *T. heterothallicus* PA2S4T foi cultivado em meio ágar batata dextrose, incubado a 40 °C por 7 dias e conservado em geladeira.

### **2.3 Produção enzimática**

O fungo foi cultivado no meio líquido Czapek suplementado com 1% de farinha de casca de laranja. Um mL da suspensão de esporos ( $2 \times 10^5$  esporos/mL) preparada

em água destilada estéril foi inoculado em frascos Erlenmeyer (125 mL), contendo 25 mL de meio líquido. As culturas foram incubadas a 40 °C em condições estacionárias por 7 dias. As culturas foram filtradas, dialisadas overnight em água deionizada e utilizadas para a determinação da atividade enzimática e purificação.

#### **2.4 Determinação da atividade enzimática e quantificação de proteína**

A atividade da  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidase foi determinada a partir de uma mistura de 50  $\mu$ L do substrato *p*NP-GlcNAc (0,73 mM) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e 50  $\mu$ L de extrato enzimático incubados a 60 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida, adicionando 200  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 400 mM e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm, conforme a metodologia descrita por Yan e Fong [25]. A unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto de reação em condições experimentais.

A atividade da endoquitinase foi verificada a partir da mistura de 50  $\mu$ L de quitina coloidal 0,5% em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,5) e 50  $\mu$ L do extrato enzimático incubados a 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida, adicionando 100  $\mu$ L de 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e os QOS (açúcar redutor) foram mensurados de acordo com a metodologia de Miller [26]. A quitina coloidal foi preparada conforme metodologia descrita por Fu et al. [27]. A unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de *N*-acetilglicosamina por minuto de reação.

A dosagem de proteínas foi realizada conforme o método de Bradford [28], utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A unidade foi definida como mg de proteína por mL.

#### **2.5 Purificação parcial da quitinase**

O extrato bruto extracelular dialisado (100 mL) de *T. heterothallicus* PA2S4T foi aplicado em coluna de troca iônica DEAE-Sepharose (2 x 6 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,2. As proteínas foram eluídas em um fluxo de 2,0 mL/min e frações de 5 mL foram coletadas em tubos. A quitinase foi eluída com gradiente de NaCl de 0 a 1M dissolvido em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,2. Os tubos coletados foram monitorados quanto à presença de proteínas e atividade enzimática. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas, dialisadas contra água deionizada por 18 horas a 4 °C e liofilizadas. A amostra concentrada

(500  $\mu$ L) foi aplicada em coluna de exclusão molecular Sephadex G-75 (2 x 60 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 6,0. Frações de 1 mL foram coletadas e aquelas com atividade enzimática foram reunidas, dialisadas e utilizadas para caracterização enzimática.

## 2.6 SDS-PAGE e análise de zimograma

A análise da pureza da enzima foi realizada por eletroforese SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970) [29], utilizando gel de acrilamida a 10% e marcador de massa molecular pré-corado (Thermo Scientific) como referência. As proteínas foram visualizadas após coloração por Coomassie Brilliant Blue R-250. O zimograma foi realizado, seguindo a metodologia de Tronsmo e Harman (1993) [30], utilizando 4-MUF-NAG como substrato.

## 2.7 Caracterização bioquímica da quitinase

O pH ótimo da quitinase foi determinado utilizando os tampões citrato de sódio (pH 3,0 e 3,5), acetato de sódio (pH 4,0 a 5,5) e fosfato de sódio (pH 6,0 a 8,0) a 50 mM a 50 °C por 10 minutos. A estabilidade ao pH foi determinada dosando a atividade residual da enzima após incubação nos mesmos tampões (pH 3,0 a 7,0) a 4 °C por 24 horas.

A temperatura ótima da enzima foi mensurada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 e incubada em diferentes temperaturas (40 a 75 °C). A estabilidade térmica foi determinada por meio da dosagem da atividade residual após incubar a enzima sem substrato a 40, 50, 55, 60 e 65 °C, por um período de até 240 minutos.

A influência de diferentes compostos químicos sobre a atividade enzimática foi realizada a partir da dosagem na presença de HgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, KCl, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, FeCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol e EDTA a 1 e 5 mM e triton X-100, tween 20, tween 80, SDS, acetona, álcool butílico, álcool etílico, álcool metílico, álcool isobutílico, álcool isopropílico, benzeno, formaldeído e glicerol a 0,5 e 1%. A atividade enzimática sem a adição de compostos químicos foi definida como 100%.

## 2.8 Especificidade ao substrato e parâmetros cinéticos

A especificidade ao substrato da quitinase foi verificado após dosagem enzimática em condições ótimas (pH 6,0 a 60 °C por 10 minutos) utilizando *p*NP-GlcNAc e *p*NP-Glc a 0,73 mM e quitina da casca de camarão, quitina coloidal e quitosana a 1% como substratos.

Os parâmetros cinéticos da quitinase foram determinados utilizando pNP-GlcNAc em diferentes concentrações (0,15 a 0,73 mM) como substrato. O  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$ , e  $K_{cat}/K_m$  foram obtidos com base na equação de Michaelis-Menten, utilizando o software EnzyPlot, versão 3,1. A energia de ativação ( $E_a$ ) foi calculada de acordo com a equação de Arrhenius [31], baseada na inclinação da reta do gráfico semi-log de  $\ln K$  versus  $1/T$ .

## 2.9 Análise dos produtos de hidrólise da quitina da casca de camarão

Foi incubado 10 U da GlcNAc purificada parcialmente com quitina da casca de camarão 1% em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,0) a 55 °C. Alíquotas foram retiradas após 0, 5, 10 e 20 min e fervidas a 100 °C por 5 minutos. Os produtos da hidrólise foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), a fase móvel foi composta por n-butanol:etanol:água (5:3:2, v/v/v) e revelada com solução de difenilamina-anilina-ácido fosfórico (DPA) [32].

## 2.10 Análise da bioconversão da casca de camarão *in natura* pelas quitinases

A endoquitinase (10 U) presente no extrato enzimático bruto foi misturada com 1% de casca de camarão *in natura* (sem tratamento prévio) em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,5) e incubado a 50 °C de 24 a 72 horas sob agitação de 200 rpm. A quantidade de açúcar redutor (QOS) liberado foi quantificada pelo método de Miller [26]. O efeito da ação enzimática sobre a casca de camarão *in natura* foi verificado utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). As amostras submetidas à análise foram preparadas sobre uma plataforma de alumínio, utilizando fita de carbono dupla face, cobertas com 20 nm de ouro em evaporador (DENTON VACUUM DESK V) e analisadas em aparelho TESCAN VEGA3 40XVP operado a 25kV. O controle consistiu na casca de camarão *in natura* sem tratamento enzimático.

Os produtos liberados após a degradação da casca de camarão *in natura* foram analisados por CCD.

## 2.11 Efeito dos quitooligossacarídeos no crescimento do *Lactobacillus paracasei*

O *Lactobacillus* foi cultivado em caldo mínimo MRS (de Man Rogosa & Sharpe) (peptona de caseína, extrato de carne, extrato de levedura, fosfato de potássio dibásico, tween 80, acetato de sódio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês e citrato de amônia) suplementado com 5 g/L de QOS ou glicose como fonte de carbono, conforme a metodologia de Le e Yang (2019) [33]. Culturas com meio mínimo (C-

MRS) suplementado com glicose e sem fonte de carbono foram os controles positivo e negativo, respectivamente. O cultivo foi realizado em microplaca para cultura celular com adição de 200  $\mu$ L do meio C-MRS enriquecido com QOS ou glicose, o inóculo de *L. paracasei* (DO<sub>600</sub> inicial de 0,130 a 0,200) e 50  $\mu$ L de óleo mineral. A microplaca foi incubada em jarra de anaerobiose a 37 °C por até 48 horas. O crescimento bacteriano foi monitorado pela leitura da DO<sub>600</sub> em espectrofotômetro nos intervalos de 0, 4, 8, 12, 24, 36 e 48 horas. O consumo da fonte de carbono por *L. paracasei* foi determinado por meio da dosagem de açúcares redutores [26], e os resultados expressos como consumo residual (%).

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Purificação parcial da quitinase

A  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidase (GlcNAcase) extracelular foi purificada 5,5 vezes, após aplicação em duas colunas cromatográficas (DEAE-Sepharose e Sepharose G-75) com atividade específica de 127,86 U/mg e recuperação de 4,24% (Tabela 2).

Tabela 2 Resumo da purificação da quitinase extracelular de *T. heterothallicus* PA2S4T

Etapa de purificação	Atividade total (U)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de purificação (fold)	Recuperação (%)
Extrato Bruto	4562	195,5	23,34	1,0	100
DEAE-Sepharose	1788	59,4	30,10	1,3	39,19
Sephadex G75	193,5	1,51	127,86	5,5	4,24

A massa molecular da quitinase parcialmente purificada foi estimada em 120 kDa (Fig. 7). GlcNAcases fúngicas apresentam massas moleculares maiores do que aquelas provenientes de bactérias, sendo a maioria superior a 70 kDa [34], como as enzimas de *Trichoderma reesei* (80 kDa) [35], *Rhizomucor miehei* (96 kDa) [34], *Penicillium oxalicum* (160 kDa) [36] e *T. heterothallicus* PA2S4T (120 kDa) obtida neste estudo.

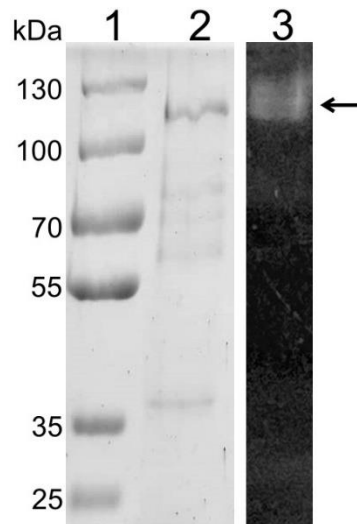


Fig. 7. Análise por SDS-PAGE 10% e zimograma da GlcNAcase de *T. heterothallicus* PA2S4T. (1) Marcador de peso molecular; (2) GlcNAcase parcialmente purificada; (3) Zimograma.

### 3.2 Caracterização bioquímica da quitinase

A temperatura ótima para a atividade da GlcNAcase extracelular purificada parcialmente de *T. heterothallicus* PA2S4T foi de 65 °C (Fig. 8A) e exibiu estabilidade nas temperaturas 40 °C, 50 °C e 55 °C, mantendo praticamente 100% da sua atividade. Entretanto, em 60 °C e 65 °C, a enzima teve sua atividade reduzida após 30 minutos em aproximadamente 25% e 80%, respectivamente (Fig. 8C).

A temperatura ótima da maioria das GlcNAcases é entre 37 e 60 °C e não possuem uma estabilidade térmica elevada, como em temperaturas superiores a 60 °C [37], a exemplo das quitinases de *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 e *Shinella* sp. que são estáveis de 30 a 40 e 30 a 37 °C, respectivamente [38, 39].

O pH ótimo exibido pela GlcNAcase foi 6,0 (Fig. 8B), mas apresentou atividade elevada na faixa ácida entre os pH 3,5 a 6,0 e se manteve estável na faixa de pH 5,0 a 6,0, com 90 a 100% de atividade residual, respectivamente (Fig. 8D).



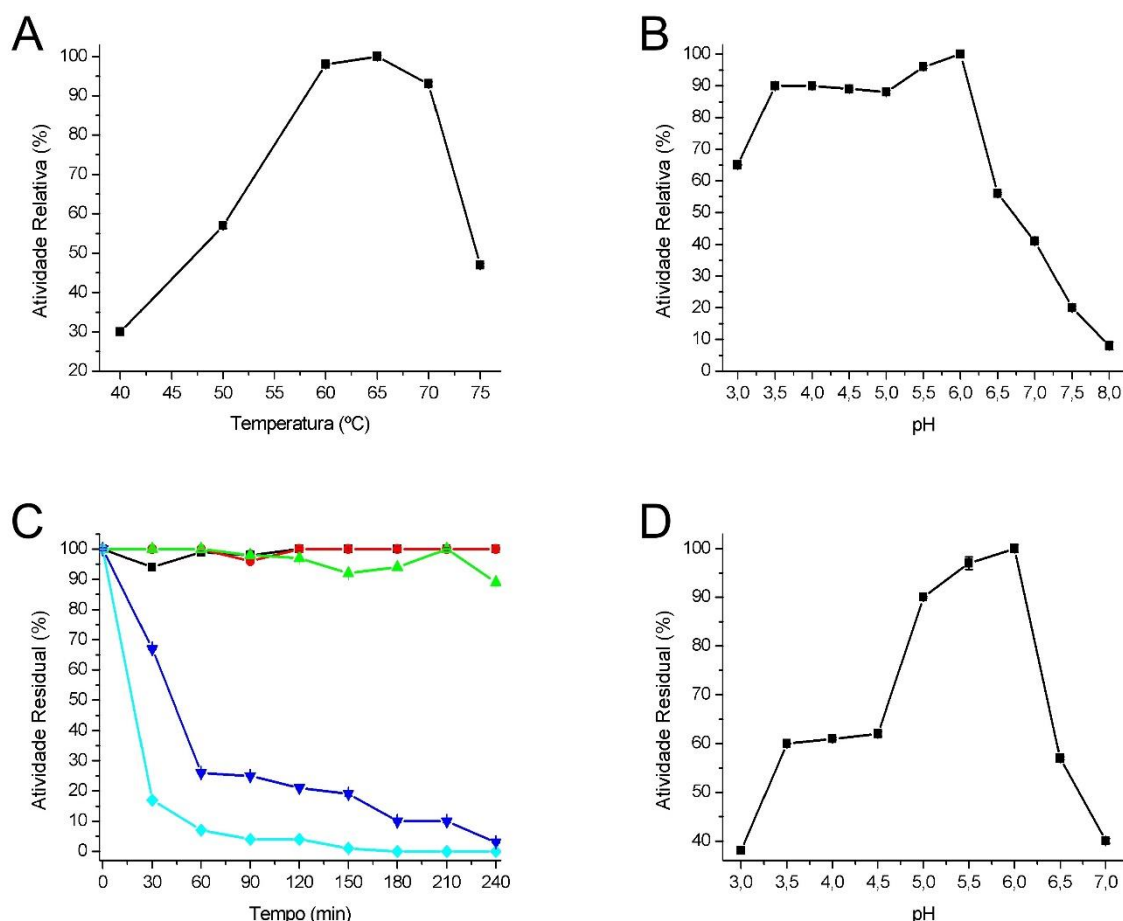


Fig. 8. Efeito da temperatura sobre a GlcNAcase parcialmente purificada de *T. heterothallicus* PA2S4T (A) e estabilidade térmica (C). Efeito do pH sobre a atividade da GlcNAcase (B) e estabilidade (D) após incubar a enzima sem substrato por 24 h; (■) 40 °C, (●) 50 °C, (▲) 55 °C, (▼) 60 °C e (◆) 65 °C.

Grande parte das GlcNAcases possuem uma faixa de pH ótimo que varia de 5,0 a 8,0, em que a maioria desempenha sua atividade máxima entre os pH 6,0 e 7,0 [37]. A ação dessa enzima em pH ácido (3,5-6,0) é uma característica comum às GlcNAcases fúngicas [37].

Existem GlcNAcases fúngicas já descritas que são estáveis a pH neutros, como é o caso das enzimas de *Aspergillus oryzae*, que manteve sua atividade entre pH 5,0 a 7,5 [40] e de *Rhizomucor miehei* na faixa de pH 6,0 a 8,0 [34].

Os íons metálicos exibiram efeitos inibitórios sobre a atividade enzimática da quitinase, indicando que a enzima não depende de cofatores ou íons metálicos para catálise enzimática. Além disso, os íons  $Hg^{+2}$  e  $Fe^{+2}$  inibiram totalmente a atividade enzimática na concentração de 5 mM (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito de íons metálicos, reagentes químicos e solventes orgânicos sobre a atividade da quitinase.

Compostos	Atividade Relativa (%)	
	1 mM	5 mM
Controle	100 ± 1,38	100 ± 1,38
HgCl <sub>2</sub>	3 ± 0,53	0 ± 0
MgCl <sub>2</sub>	77 ± 1,48	69 ± 0,95
CoCl <sub>2</sub>	64 ± 0,85	55 ± 0,53
BaCl <sub>2</sub>	93 ± 0,64	80 ± 0,21
KCl	78 ± 0,11	31 ± 0,53
MnCl <sub>2</sub>	70 ± 0,32	68 ± 0,21
CaCl <sub>2</sub>	88 ± 0,11	55 ± 0,11
NaCl	88 ± 1,06	77 ± 0,95
FeCl <sub>2</sub>	60 ± 0	0 ± 0
CuCl <sub>2</sub>	64 ± 1,59	45 ± 0,32
DTT	90 ± 0,53	77 ± 0,74
B-Mercaptoetanol	66 ± 0,01	64 ± 0,53
EDTA	82 ± 0,01	77 ± 0,01
	0,5%	1%
Triton X-100	94 ± 1,27	75 ± 1,06
Tween 20	94 ± 0,42	87 ± 1,17
Tween 80	89 ± 7	68 ± 0,11
SDS	27 ± 0	19 ± 0,42
Acetona	88 ± 2,44	87 ± 1,27
Álcool Butílico	88 ± 0,21	88 ± 0,64
Álcool Etilico	108 ± 0,42	112 ± 1,80
Álcool Metílico	99 ± 1,27	96 ± 4,03
Álcool Isobutílico	123 ± 0,64	123 ± 4,03
Álcool Isopropílico	109 ± 2,23	120 ± 2,97
Benzeno	99 ± 1,38	60 ± 0,95
Formaldeído	90 ± 0,32	72 ± 0,95
Glicerol	109 ± 2,23	110 ± 3,08

Os dados são as médias ± desvio padrão de três experimentos.

A maioria das enzimas quitinolíticas são sensíveis e sofrem interferência na sua atividade quando expostas aos íons Hg<sup>+2</sup> e Fe<sup>+2</sup> [41]. O SDS a 0,5 e 1% também inibiu a atividade da quitinase em 73% e 91%, respectivamente (Tabela 3). Hg<sup>2+</sup> e SDS são

descritos como os principais compostos que inibem a atividade das GlcNAcases [37]. GlcNAcases de *Shinella* sp. e *Microbulbifer thermotolerans* DAU221 apresentaram resultados semelhantes, e suas atividades enzimáticas foram totalmente inibidas na presença de  $\text{HgCl}_2$  [39, 42].

Essa inibição enzimática pode ocorrer devido à interação desse íon metálico com os resíduos de cisteína e pontes dissulfeto presentes na enzima, alterando sua estrutura terciária [42, 43]. O SDS pode interferir nas pontes de hidrogênio presentes na enzima, desnaturando e modificando a estrutura secundária e terciária [44].

A GlcNAcase teve sua atividade aumentada em 23% na presença de álcool isobutílico a 0,5% e 1%. Além disso, o álcool etílico, o álcool isopropílico e o glicerol aumentaram a atividade enzimática em 12%, 20% e 10%, respectivamente. Enzimas com essas características possuem maior importância tecnológica, visto que é possível sua aplicação tanto em reações com apenas soluções aquosas quanto em reações em que se faz necessário o acréscimo de solventes [45].

### 3.3 Especificidade ao substrato e parâmetros cinéticos

A GlcNAcase de *T. heterothallicus* PA2S4T foi capaz de hidrolisar ligações  $\beta$ -1,4 presentes em diferentes substratos, em que a maior atividade se deu com o *p*NP-GlcNAc (165,3 U/mg). Além disso, a enzima foi capaz de atuar sobre o *p*NP-Glc, porém, a atividade foi três vezes menor em relação ao *p*NP-GlcNAc (Tabela 4). Já é conhecido que GlcNAcases podem apresentar atividade catalítica dupla, conseguindo, assim, clivar substratos que diferem apenas na configuração do grupamento hidroxila, como GlcNAc e *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) [46].

Tabela 4. Especificidade ao substrato da quitinase parcialmente purificada

Substrato	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Relativa (%)
<i>p</i> NP-NAG	165,3 ± 1,25	100
<i>p</i> NPG	54,26 ± 0,62	33
Quitina da Casca de Camarão	2,94 ± 0,46	1,8
Quitosana	0,92 ± 0,18	0,6
Quitina Coloidal	ND	ND

ND: valores não detectados. Os dados são as médias ± desvio padrão de três experimentos.

No entanto, a capacidade de clivar os substratos *p*NP-GlcNAc e *p*NP-Glc pode sugerir que a GlcNAcase desse estudo possua uma atividade bifuncional de  $\beta$ -*N*-acetilglicosamidase/ $\beta$ -D-glicosidase, semelhante a Nag3 de *Cellulomonas fimi* [47], embora ainda existam poucos relatos sobre essa característica na literatura.

Além disso, a enzima deste estudo exibiu uma atividade específica sobre o *p*NP-GlcNAc superior quando comparada a outras GlcNacases, como a de *Paenibacillus barengoltzii* (1,02 U/mg), *Rhizomucor miehei* (21,2 U/mg) e *Aspergillus oryzae* (32,07 U/mg) [48, 34, 40].

A habilidade em degradar a quitina e seus derivados com cadeias maiores possibilita o emprego da GlcNAcase deste estudo em processos de biorremediação, como a degradação de resíduos provenientes da indústria pesqueira.

O  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  obtidos para o substrato *p*NP-GlcNAc foi de 0,40 mM e 981,2  $\mu$ mol/min/mg, respectivamente. Os valores calculados de  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$  e  $E_a$  foram 1962,4  $s^{-1}$ , 4867,06 mM/s e 43,92 kJ/mol, respectivamente. A maioria das GlcNacases já caracterizadas apresentam valores de  $V_{m\acute{a}x}$  menores de 200  $\mu$ mol/min/mg. A enzima deste estudo apresentou uma  $V_{m\acute{a}x}$  maior quando comparada a RmNag de *Rhizomucor miehei* (49,3  $\mu$ mol  $min^{-1}$   $mg^{-1}$ ) [34], NagA de *Thermotoga maritima* (0,28  $\mu$ mol  $min^{-1}$   $mg^{-1}$ ) e CbsA de *Thermotoga neopolitana* (0,31  $\mu$ mol  $min^{-1}$   $mg^{-1}$ ) [49].

### 3.4 Análise dos produtos da hidrólise da quitina da casca de camarão

Os produtos de hidrólise da quitina da casca de camarão pela enzima parcialmente purificada (Fig. 9) analisados por CCD confirmaram a ação de uma  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidase (GlcNAcase), com atividade de exoquitinase sobre o substrato devido ao fato de o produto liberado ser apenas GlcNAc.



Fig. 9. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos da hidrólise da quitina da casca de camarão pela GlcNAcase parcialmente purificada após reação de 0, 5, 10 e 20 min; (S) padrão N-acetilglicosamina 1 mg/mL.

GlcNAcases podem atuar sinergicamente com outras enzimas quitinolíticas para a completa degradação da quitina [37]. Entretanto, são poucas as GlcNAcases descritas como capazes de degradarem esse polissacarídeo, como a VhNag2 de *Vibrio harveyi* 650 [50] e a LeHex20A de *Lentinula edodes* [51].

As GlcNAcases fúngicas são conhecidas por degradarem quitooligossacarídeos e a clivagem da quitina polimérica não é uma ação característica dessas enzimas [52]. Assim, a quitinase deste estudo se diferencia das demais, devido à sua ação exoquitinolítica, possibilitando a sua aplicação em setores como a produção de GlcNAc a partir de resíduos como aqueles descartados pela indústria de frutos do mar.

### 3.5 Análise da bioconversão da casca de camarão *in natura* pelas quitinases de *T. heterothallicus* PA2S4T

A análise das imagens obtidas por MEV da casca de camarão tratada com as quitinases de *T. heterothallicus* PA2S4T mostrou que a casca de camarão foi degradada em 24, 48 e 72 h (Fig. 10D, E e F), exceto pelo controle (casca de camarão sem a enzima), que apresentou uma superfície lisa sem degradação (Fig. 10A, B e C).

Pequenos fragmentos foram gerados pela hidrólise enzimática, principalmente após 24 e 48 horas de tratamento com as quitinases (Fig. 10D e E). Observa-se que a degradação da casca de camarão foi maior em 24 horas, período em que provavelmente a enzima se manteve mais ativa. Além disso, é notável que a atividade quitinolítica foi eficaz, mesmo após 72 horas de tratamento (Fig. 10F).

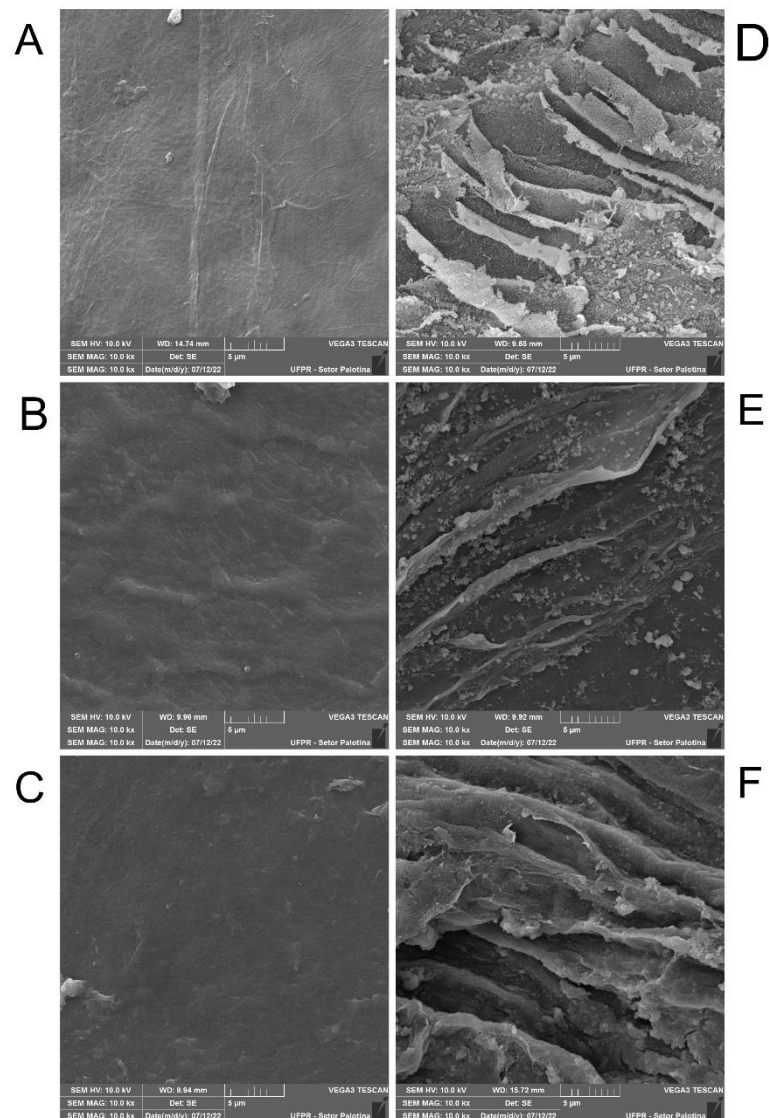


Fig. 10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de casca de camarão in natura tratada com as quitinases presentes no extrato bruto. (A), (B) e (C) Controle: casca de camarão incubada apenas no tampão por 24 h, 48 h e 72 h, respectivamente. (D), (E) e (F) casca de camarão tratada com o extrato bruto enzimático por 24 h, 48 h e 72 h de reação, respectivamente.

A capacidade das quitinases em degradar a casca de camarão que não tenha passado por nenhum pré-tratamento é uma vantagem, tendo em vista que geralmente

é necessária a utilização prévia de ácidos ou bases para facilitar a bioconversão desses resíduos. As quitinases Tk-ChiA [53] e Chi24 também se mostraram eficazes na decomposição de pó e materiais de quitina obtidos a partir de biorresíduos de camarão [54].

Portanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem a possibilidade da incorporação de quitinases em protocolos utilizados por indústrias biotecnológicas e de frutos do mar para a bioconversão de resíduos quitinolíticos gerados no mundo todo, tornando o processo mais barato e sustentável.

A análise dos produtos gerados após a bioconversão da casca de camarão *in natura* mostrou que ocorreu a liberação de GlcNAc, quitobiose (GlcNAc)<sub>2</sub> e quitotriose (GlcNAc)<sub>3</sub> como os principais produtos (Fig. 11). Dessa forma, esse perfil hidrolítico indica também a presença de uma endoquitinase no extrato bruto de *T. heterothallicus* PA2S4T, além da GlcNAcase. Esses resultados salientam a atuação em sinergia das enzimas quitinolíticas para que ocorra a degradação eficiente da quitina.

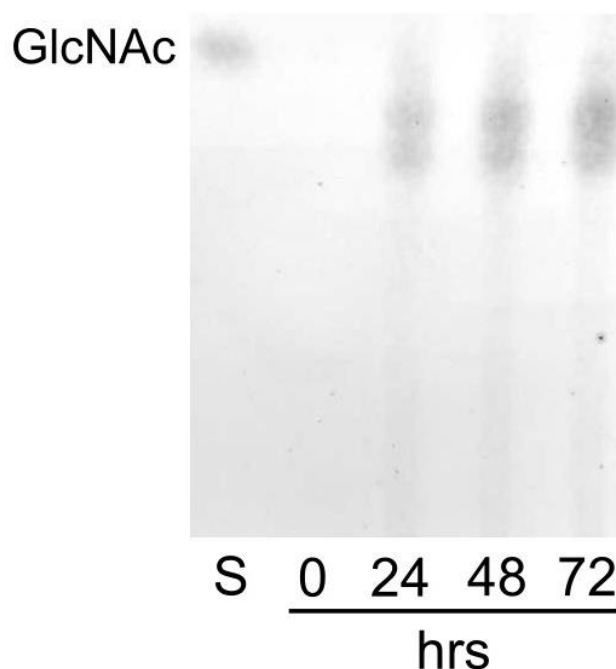


Fig. 11. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos da hidrólise da casca de camarão *in natura* após 0, 24, 48 e 72 h; (P) Padrão N-acetilglicosamina 1 mg/mL

Esses dados mostram que a endoquitinase de *T. heterothallicus* PA2S4T apresenta um potencial biotecnológico, sugerindo sua aplicação industrial na

produção de QOS a partir de fontes quitinolíticas que geralmente não são aproveitadas.

### 3.6 Efeito dos quitoooligossacarídeos sobre o crescimento de *L. paracasei*

Os QOS produzidos por meio da hidrólise da casca de camarão *in natura* pelas quitinases presentes no extrato bruto apresentaram um efeito prebiótico melhor quando comparada à glicose no crescimento de *L. paracasei*, em que o probiótico cresceu de forma gradativa até 24 horas após sua inoculação (Fig. 12A). Após esse período, o crescimento estabilizou, possivelmente devido à falta da fonte de carbono, observada pela diminuição da concentração de QOS disponíveis no meio (Fig. 12B).

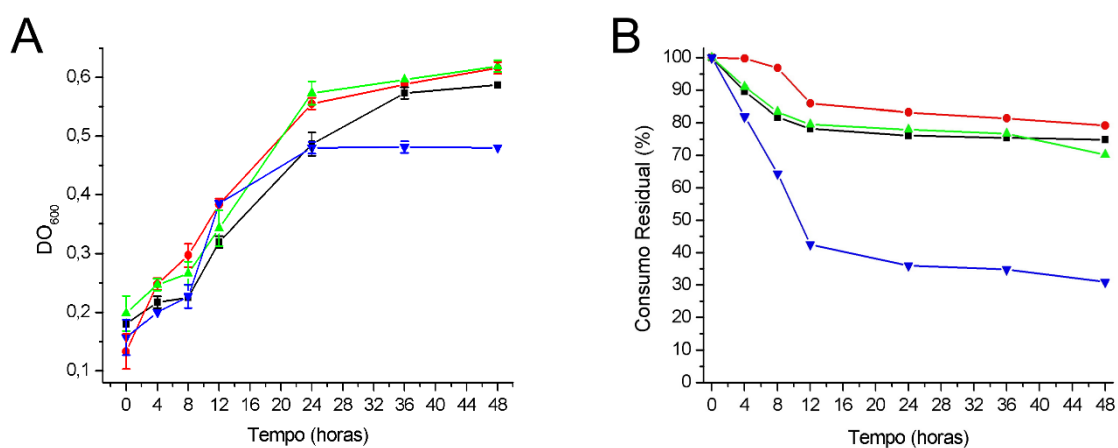


Fig. 12. Efeito (A) e consumo (B) dos QOS obtidos após bioconversão da casca de camarão *in natura* sobre o crescimento *L. paracasei*. O caldo MRS foi suplementado com QOS a 1 mg/mL. (■) meio suplementado com QOS produzidos após 24 hr de hidrólise; (●) meio suplementado com QOS produzidos após 48 hr de hidrólise; (▲) meio suplementado com QOS produzidos após 72 hr de hidrólise e (▼) meio suplementado com glicose 1 mg/mL (controle positivo).

Sabe-se que a eficiência da ação dos QOS como prebióticos está ligada diretamente ao grau de polimerização (GP) da molécula e a dose utilizada, em que estruturas menores (GP 2-8) apresentam as maiores taxas de indução de crescimento de probióticos [25, 55]. Dessa forma, os resultados indicam que os QOS utilizados como prebióticos possuem essa característica, tendo em vista a indução do crescimento de *L. paracasei*, da mesma forma que os oligossacarídeos de quitosana com baixo GP que induziram o crescimento de *L. paracasei* BCRC14023 [55] e *L. paracasei* BCRC12193 [56].

Ainda, o tempo de hidrólise da casca de camarão *in natura* não apresentou relevância significativa sobre o efeito prebiótico desempenhado pelos QOS, cujo



tempo de 24 horas poderia ser o período de bioconversão empregado em processos industriais, tornando a produção de prebióticos mais rápida e vantajosa.

#### **4. Conclusão**

A  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidase parcialmente purificada neste estudo apresentou características bioquímicas que a tornam ótima candidata para aplicação em processos biotecnológicos, como a produção de GlcNAc a partir de biorresíduos descartados pela indústria de frutos do mar. Além disso, a ação combinada da endoquitinase e  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidase de *T. heterothallicus* PA2S4T se mostrou eficiente na bioconversão da casca de camarão *in natura* e os quitooligossacarídeos gerados após esse processo exibiram um efeito prebiótico superior ao da glicose sobre o crescimento de *L. paracasei*.

#### **Agradecimentos**

Victória Pommer e Érica S. Zuppa são bolsistas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária, respectivamente. Paula Daniela Helfenstein Rother é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

#### **Declaração de conflito de interesses**

Os autores declaram que não possuem conflito de interesses.

#### **Referências**

- [1] X. Mao, N. Guo, J. Sun, C. Xue, Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review, *J. Clean. Prod.* 143 (2017) 814–823. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.042>.
- [2] N.P. Nirmal, C. Santivarangkna, M.S. Rajput, S. Benjakul, Trends in shrimp processing waste utilization: An industrial prospective, *Trends Food Sci. Technol.* 103 (2020) 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.001>.
- [3] FAO, The state of world fisheries and aquaculture, 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- [4] G.M. Mathew, D.C. Mathew, R.K. Sukumaran, R. Sindhu, C.C. Huang, P. Binod, R. Sirohi, S.H. Kim, A. Pandey, Sustainable and eco-friendly strategies for shrimp shell

- valorization, Environ. Pollut. 267 (2020) 115656.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115656>.
- [5] T. Hirano, M. Okubo, H. Tsuda, M. Yokoyama, W. Hakamata, T. Nishio, Chitin heterodisaccharide, released from chitin by chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase, enhances the chitin-metabolizing ability of *Vibrio parahaemolyticus*, J. Bacteriol. 201 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1128/JB.00270-19>.
- [6] M. Khajavian, V. Vatanpour, R. Castro-Muñoz, G. Boczkaj, Chitin and derivative chitosan-based structures — Preparation strategies aided by deep eutectic solvents: A review, Carbohydr. Polym. 275 (2022) 118702.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118702>.
- [7] W. Widyastuti, F. Setiawan, C. Al Afandy, A. Irawan, A. Laila, N.L.G.R. Juliasih, W.A. Setiawan, M. Arai, J. Hendri, A. Setiawan, Antifungal agent chitooligosaccharides derived from solid-state fermentation of shrimp shell waste by *Pseudonocardia antitumoralis* 18D36-A1, Fermentation. 8 (2022) 1-11.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation8080353>.
- [8] P. Kandra, M.M. Challa, H.K.P. Jyothi, Efficient use of shrimp waste: present and future trends, Appl. Microbiol. Biotechnol. 93 (2012) 17–29.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3651-2>.
- [9] C. Schmitz, L.G. Auza, D. Koberidze, S. Rasche, R. Fischer, L. Bortesi, Conversion of chitin to defined chitosan oligomers: Current status and future prospects, Mar. Drugs. 17 (2019) 1–22. <https://doi.org/10.3390/md17080452>.
- [10] X. Hu, Z. Tian, X. Li, S. Wang, H. Pei, H. Sun, Z. Zhang, Green, simple, and effective process for the comprehensive utilization of shrimp shell waste, ACS Omega. 5 (2020) 19227–19235. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02705>.

- [11] V.P. Santos, N.S.S. Marques, P.C.S.V. Maia, M.A.B. de Lima, L. de O. Franco, G.M. de Campos-Takaki, Seafood waste as attractive source of chitin and chitosan production and their applications, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21124290>.
- [12] C. Casadidio, D.V. Peregrina, M.R. Gigliobianco, S. Deng, R. Censi, P. Di Martino, Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science, *Mar. Drugs.* 17 (2019) 1-30. <https://doi.org/10.3390/md17060369>.
- [13] M.N. Marzieh, F. Zahra, E. Tahereh, K.N. Sara, Comparison of the physicochemical and structural characteristics of enzymatic produced chitin and commercial chitin, *Int. J. Biol. Macromol.* 139 (2019) 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.217>.
- [14] S. Sharma, S. Kumar, A. Khajuria, P. Ohri, R. Kaur, R. Kaur, Biocontrol potential of chitinases produced by newly isolated *Chitinophaga* sp. S167, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02864-9>.
- [15] V. Pommer, P.D. Helfenstein Rother, L.M. Rasbold, J.L. Da Conceição Silva, A. Maller, R. de C.G. Simão, M.K. Kadowaki, A novel *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T fungus isolated from the soil induces chitinase production using orange peel flour, *Sci. Plena.* 17 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2021.091501>.
- [16] F. Berini, C. Katz, N. Gruzdev, M. Casartelli, G. Tettamanti, F. Marinelli, Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 818–838. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.002>.
- [17] K. Dwyer, I.S. Bentley, E. Tighe, E. McGleenan, D. Gaffney, G. Walsh, Recombinant production and characterisation of two chitinases from *Rasamsonia*

*emersonii*, and assessment of their potential industrial applicability, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105 (2021) 7769–7783. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11578-3>.

[18] A. Nagpure, B. Choudhary, R.K. Gupta, Chitinases: In agriculture and human healthcare, *Crit. Rev. Biotechnol.* 34 (2014) 215–232. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.790874>.

[19] R. Singh, S.K. Upadhyay, M. Singh, I. Sharma, P. Sharma, P. Kamboj, A. Saini, R. Voraha, A.K. Sharma, T.K. Upadhyay, F. Khan, Chitin, chitinases and chitin derivatives in biopharmaceutical, agricultural and environmental perspective, *Biointerface Res. Appl. Chem.* 11 (2021) 9985–10005. <https://doi.org/10.33263/BRIAC113.998510005>.

[20] P. Bhagwat, A. Amobonye, S. Singh, S. Pillai, A comparative analysis of GH18 chitinases and their isoforms from *Beauveria bassiana*: An in-silico approach, *Process Biochem.* 100 (2021) 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.10.012>.

[21] T.M. Pasin, T.B. De Oliveira, A.S. de A. Scarcella, M. de L.T. de M. Polizeli, M.E. Guazzaroni, Perspectives on expanding the repertoire of novel microbial chitinases for biological control, *J. Agric. Food Chem.* 69 (2021) 3284–3288. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00219>.

[22] S.K. Nayak, S. Nayak, S. Mohanty, J.K. Sundaray, B.B. Mishra, Microbial chitinases and their applications: An overview, in: B.B. Mishra, S.K. Nayak, S. Mohapatra, D. Samantaray (Eds.), *Environmental and Agricultural Microbiology: Applications of Sustainability*, Scrivener Publishing LLC, Beverly, 2021, 313–340. <https://doi.org/10.1002/9781119525899.ch15>.

[23] M. Zhao, L. Gu, Y. Li, S. Chen, J. You, L. Fan, Y. Wang, L. Zhao, Chitooligosaccharides display anti-tumor effects against human cervical cancer cells

via the apoptotic and autophagic pathways, *Carbohydr. Polym.* 224 (2019) 115171. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115171>.

[24] H. Jafari, K. V. Bernaerts, G. Dodi, A. Shavandi, Chitooligosaccharides for wound healing biomaterials engineering, *Mater. Sci. Eng. C.* 117 (2020) 111266. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111266>.

[25] Q. Yan, S. S. Fong, Cloning and characterization of a chitinase from *Thermobifida fusca* reveals Tfu\_0580 as a thermostable and acidic endochitinase. *Biotechnol. Rep.* 19 (2018) e00274. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00274>.

[26] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

[27] D. Fu, H. Xiang, C. Yu, X. Zheng, T. Yu, Colloidal chitin reduces disease incidence of wounded pear fruit inoculated by *Penicillium expansum*, *Postharvest Biol. Technol.* 111 (2016) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.025>.

[28] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

[29] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

[30] A. Tronsmo, G.E. Harman, Detection and quantification of *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels, *Anal. Biochem.* 208 (1993) 74–79. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1010>.

[31] R.L. de Oliveira, M.F. da Silva, S.P. da Silva, J.V.F.L. Cavalcanti, A. Converti, T.S. Porto, Immobilization of a commercial *Aspergillus aculeatus* enzyme preparation with fructosyltransferase activity in chitosan beads: A kinetic/thermodynamic study and

fructo-oligosaccharides continuous production in enzymatic reactor, Food Bioprod. Process. 122 (2020) 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.05.001>.

[32] K. Anderson, S.C. Li, Y.T. Li, Diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent, a versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin-layer chromatography plates, Anal. Biochem. 287 (2000) 337–339. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4829>.

[33] B. Le, S.H. Yang, Production of prebiotic xylooligosaccharide from aqueous ammonia-pretreated rice straw by  $\beta$ -xylosidase of *Weissella cibaria*, J. Appl. Microbiol. 126 (2019) 1861–1868. <https://doi.org/10.1111/jam.14255>.

[34] S. Yang, S. Song, Q. Yan, X. Fu, Z. Jiang, X. Yang, Biochemical characterization of the first fungal glycoside hydrolyase family 3  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase from *Rhizomucor miehei*, J. Agric. Food Chem. 62 (2014) 5181–5190. <https://doi.org/10.1021/jf500912b>.

[35] F. Chen, X.Z. Chen, L.N. Qin, Y. Tao, Z.Y. Dong, Characterization and homologous overexpression of an *N*-acetylglucosaminidase Nag1 from *Trichoderma reesei*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 459 (2015) 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.066>.

[36] H. Ryšlavá, A. Kalendová, V. Doubnerová, P. Skočdopol, V. Kumar, Z. Kukačka, P. Pompach, O. Vaněk, K. Slámová, P. Bojarová, N. Kulik, R. Ettrich, V. Křen, K. Bezouška, Enzymatic characterization and molecular modeling of an evolutionarily interesting fungal  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase, FEBS J. 278 (2011) 2469–2484. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08173.x>.

[37] R. Zhang, J. Zhou, Z. Song, Z. Huang, Enzymatic properties of  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases, Appl. Microbiol. Biotechnol. 102 (2018) 93–103. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8624-7>.

- [38] E.B. Florido, P.B. Camilo, L. Mayorga-Reyes, R.G. Cervantes, P.M. Cruz, A. Azaola,  $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* atcc 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell, *Interciencia*. 34 (2009) 356–360.
- [39] J. Zhou, Z. Song, R. Zhang, C. Chen, Q. Wu, J. Li, X. Tang, B. Xu, J. Ding, N. Han, Z. Huang, A *Shinella*  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase of glycoside hydrolase family 20 displays novel biochemical and molecular characteristics, *Extremophiles*. 21 (2017) 699–709. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0935-1>.
- [40] T. Qu, C. Zhang, Z. Qin, L. Fan, L. Jiang, L. Zhao, A novel GH family 20  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase with both chitosanase and chitinase activity from *Aspergillus oryzae*, *Front. Mol. Biosci.* 8 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.684086>.
- [41] P. Barghini, D. Moscatelli, A.M.V. Garzillo, S. Crognale, M. Fenice, High production of cold-tolerant chitinases on shrimp wastes in bench-top bioreactor by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003: Bioprocess optimization and characterization of two main enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 53 (2013) 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.07.005>.
- [42] H.J. Lee, Y.S. Lee, Y.L. Choi, Cloning, purification, and characterization of an organic solvent-tolerant chitinase, MtCh509, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221, *Biotechnol. Biofuels*. 11 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1299-1>.
- [43] J. yong Zheng, X. Lan, X. jun Li, L. juan Huang, Y. jun Zhang, Z. Wang, High-level expression and characterization of a stereoselective lipase from *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.* 155 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.10.012>.

- [44] X. Guo, P. Xu, M. Zong, W. Lou, Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* CS0611, Chinese J. Catal. 38 (2017) 665–672. <https://doi.org/10.1016/S1872>.
- [45] M. Yahiaoui, H. Laribi-Habchi, K. Bouacem, K.L. Asmani, S. Mechri, M. Harir, H. Bendif, R. Aïssani-El Fertas, B. Jaouadi, Purification and biochemical characterization of a new organic solvent-tolerant chitinase from *Paenibacillus timonensis* strain LK-DZ15 isolated from the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria, Carbohydr. Res. 483 (2019) 107747. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107747>.
- [46] P. Bojarová, J. Bruthans, V. Kren,  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidases - the wizards of glycosylation, Appl. Microbiol. Biotechnol. 103 (2019) 7869–7881. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10065-0>.
- [47] C. Mayer, D.J. Vocadlo, M. Mah, K. Rupitz, D. Stoll, R.A.J. Warren, S.G. Withers, Characterization of a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase and a  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase/ $\beta$ -glucosidase from *Cellulomonas fimi*, FEBS J. 273 (2006) 2929-2941. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05308.x>.
- [48] Y. Liu, Z. Jiang, J. Ma, S. Ma, Q. Yan, S. Yang, Biochemical characterization and structural analysis of a  $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminidase from *Paenibacillus barengoltzii* for efficient production of *N*-Acetyl-D-glucosamine, J. Agric. Food Chem. 68 (2020) 5648-5657. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08085>.
- [49] K.H. Choi, J.Y. Seo, K.M. Park, C.S. Park, J. Cha, Characterization of glycosyl hydrolase family 3  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases from *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana*, J. Biosci. Bioeng. 108 (2009) 455–459. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.06.003>.
- [50] W. Suginta, D. Chuenark, M. Mizuhara, T. Fukamizo, Novel  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression, enzymatic



properties, and subsite identification, *BMC Biochem.* 11 (2010) 1-12.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-11-40>.

[51] N. Konno, H. Takahashi, M. Nakajima, T. Takeda, Y. Sakamoto, Characterization of  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (LeHex20A), a member of glycoside hydrolase family 20, from *Lentinula edodes* (shiitake mushroom), *AMB Express.* 2 (2012) 1–7. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-29>.

[52] M. Krolicka, S.W.A. Hinz, M.J. Koetsier, G. Eggink, L.A.M. van den Broek, C.G. Boeriu,  $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminidase MthNAG from *Myceliophthora thermophila* C1, a thermostable enzyme for production of *N*-acetylglucosamine from chitin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 7441–7454. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9166-3>.

[53] L. Chen, Y. Wei, M. Shi, Z. Li, S.H. Zhang, An archaeal chitinase with a secondary capacity for catalyzing cellulose and its biotechnological applications in shell and straw degradation, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1-12.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01253>.

[54] P. Mander, S.S. Cho, Y.H. Choi, S. Panthi, Y.S. Choi, H.M. Kim, J.C. Yoo, Purification and characterization of chitinase showing antifungal and biodegradation properties obtained from *Streptomyces anulatus* CS242, *Arch. Pharm. Res.* 39 (2016) 878–886. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0747-3>.

[55] C.T. Doan, T.N. Tran, V.B. Nguyen, A.D. Nguyen, S.L. Wang, Reclamation of marine chitinous materials for chitosanase production via microbial conversion by *Paenibacillus macerans*, *Mar. Drugs.* 16 (2018) 1-13.  
<https://doi.org/10.3390/md16110429>.

[56] T.W. Liang, C.P. Liu, C. Wu, S.L. Wang, Applied development of crude enzyme from *Bacillus cereus* in prebiotics and microbial community changes in soil, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 2141–2148. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.097>.

## 5. CONCLUSÃO

A  $\beta$ -*N*-acetilglicosaminidase purificada parcialmente apresenta características bioquímicas que favorecem sua utilização em protocolos biotecnológicos. Além disso, a ação das quitinases presentes no extrato bruto de *T. heterothallicus* PA2S4T foi efetiva na bioconversão da casca de camarão *in natura*, em que os quitooligossacarídeos gerados por essa hidrólise exibiram efeito prebiótico superior ao da glicose sobre o crescimento de *L. paracasei*. Esses resultados evidenciam o potencial biotecnológico das quitinases e de seus quitooligossacarídeos, o que possibilita a incorporação destes em protocolos industriais.

## 6. REFERÊNCIAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

AGUILAR-PONTES, M. V. et al. Sexual crossing of thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* improved enzymatic degradation of sugar beet pulp. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

AKEED, Y.; ATRASH, F.; NAFFAA, W. Partial purification and characterization of chitinase produced by *Bacillus licheniformis* B307. **Heliyon**, v. 6, n. 5, 2020.

ANBU, P. et al. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–3, 2017.

ANITHA, A. et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 9, p. 1644–1667, 2014.

BEYGMORADI, A. et al. Marine chitinolytic enzymes, a biotechnological treasure hidden in the ocean? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 23, p. 9937–9948, 2018.

BUCOLO, C. et al. Acidic mammalian chitinase and the eye: implications for ocular inflammatory diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, p. 1–4, 2011.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

DE AMO, G. S. et al. Heterologous expression, purification and biochemical characterization of a new xylanase from *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 798–805, 2019.

DE OLIVEIRA SIMÕES, L. C. et al. Purification and physicochemical characterization of a novel thermostable xylanase secreted by the fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 4, p. 991–1008, 2019.

DE OLIVEIRA, T. B.; RODRIGUES, A. Ecology of thermophilic fungi. In: Tiquia-Arashiro S., Grube M. (eds) *Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance*. **Springer, Cham**, p. 39–57, 2019.

DENG, J. J. et al. Heterologous expression and characterization of an antifungal chitinase (Chit46) from *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 and its application in colloidal chitin conversion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 113–121, 2019.

- DU, J. et al. Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus* sp. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 30–40, 2021.
- FARAG, A. M. et al. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 2, p. 185–192, 2016.
- FARAG, M. A.; AL-NUSARIE, S. T. Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terrus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 14, p. 1567–1578, 2014.
- HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; REGENSTEIN, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 48, p. 40–50, 2016.
- HAMID, R. et al. Chitinases: an update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 21–29, 2013.
- HAN, H. et al. Improvements of thermophilic enzymes: from genetic modifications to applications. **Bioresource Technology**, v. 279, n. November 2018, p. 350–361, 2019.
- HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 533–543, 2012.
- HUTCHINSON, M. I. et al. Genetics of mating in members of the Chaetomiaceae as revealed by experimental and genomic characterization of reproduction in *Myceliophthora heterothallica*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 86, p. 9–19, 2016.
- JAFARI, H. et al. Chitooligosaccharides for wound healing biomaterials engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 117, p. 1–17, 2020.
- JE, J. Y.; KIM, S. K. Chitooligosaccharides as potential nutraceuticals: production and bioactivities. In: Kim S. (eds) Marine medicinal foods: implications and applications - animals and microbes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 65, p. 321–336, 2012.
- JEMLI, S. et al. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 246–258, 2016.
- JUNG, W. J.; PARK, R. D. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. **Marine Drugs**, v. 12, n. 11, p. 5328–5356, 2014.

KANG, Y.; KIM, H.; CHOI, H. T. Biochemical characterization of chitinase 2 expressed during the autolytic phase of the inky cap, *Coprinellus congregatus*. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 189–193, 2013.

KARTHIK, N. et al. Production, purification and properties of fungal chitinases—a review. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, n. 11, p. 1025–1035, 2014.

KAYA, M. et al. On chemistry of  $\gamma$ -chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 177–186, 2017.

KHAN, F. I. et al. Chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. **Extremophiles**, v. 19, n. 6, p. 1055–1066, 2015.

KHAN, F. I. et al. Implications of molecular diversity of chitin and its derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 9, p. 3513–3536, 2017.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin research revisited. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p. 1988–2012, 2010.

KOPPARAPU, N. K. et al. Purification and characterization of a novel chitinase gene from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Escherichia coli*. **Carbohydrate Research**, v. 347, n. 1, p. 155–160, 2012.

KROLICKA, M. et al.  $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminidase MthNAG from *Myceliophthora thermophila* C1, a thermostable enzyme for production of *N*-acetylglucosamine from chitin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 17, p. 7441–7454, 2018.

KUMAR, M. et al. Process optimization, purification and characterization of a novel acidic, thermostable chitinase from *Humicola grisea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 931–938, 2018.

LANGNER, T.; GÖHRE, V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. **Current Genetics**, v. 62, n. 2, p. 243–254, 2016.

LE, B.; YANG, S. H. Microbial chitinases: properties, current state and biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 1–12, 2019.

LI, A. N. et al. Two novel thermostable chitinase genes from thermophilic fungi: cloning, expression and characterization. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5546–5551, 2010.

LI, K. et al. Size and pH effects of chitooligomers on antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 302–305, 2014.

LI, K. et al. Advances in preparation, analysis and biological activities of single chitooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 139, p. 178–190, 2016.

LIANG, T. W. et al. Applied development of crude enzyme from *Bacillus cereus* in prebiotics and microbial community changes in soil. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2141–2148, 2013.

LIAQAT, F.; ELTEM, R. Chitooligosaccharides and their biological activities: a comprehensive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, p. 243–259, 2018.

LOBO, M. D. P. et al. Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, v. 13, 2013.

LV, C. et al. Biochemical characterization of a GH19 chitinase from *Streptomyces alfalfae* and its applications in crystalline chitin conversion and biocontrol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 193–201, 2021.

MA, G. et al. Purification and characterization of chitinase from *Gliocladium catenulatum* strain HL-1-1. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 20, p. 4377–4383, 2012.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. DO N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.

MORGENSTERN, I. et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**, v. 116, n. 4, p. 489–502, 2012.

NAGPURE, A.; CHOUDHARY, B.; GUPTA, R. K. Chitinases: in agriculture and human healthcare. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 215–232, 2014.

ODIER, A. La composition chimique des parties cornées des insectes. **Mémoires de la Société d'Histoire Naturelle de Paris**, v. 1, p. 29–42, 1823.

PARK, P. J. et al. Renin inhibition activity by chitooligosaccharides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 7, p. 2471–2474, 2008.

PATIL, N. S.; WAGHMARE, S. R.; JADHAV, J. P. Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its

application in protoplast formation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 176–183, 2013.

PRAKASH, D. et al. Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

RONCERO, C.; VÁZQUEZ DE ALDANA, C. R. Glucanases and chitinases. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 425, p. 131–166, 2020.

SHAALA, L. A. et al. New source of 3D chitin scaffolds: the red sea demosponge *Pseudoceratina arabica* (Pseudoceratinidae, Verongiida). **Marine Drugs**, v. 17, n. 2, 2019.

SILVA, F. K. L. DA. **Produção de quitinase por *Paenibacillus illinoisensis* imobilizados em matriz de alginato**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p. 59. 2018.

SINGH, B. et al. Thermophilic molds: biology and applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 985–1006, 2016.

SOUZA, C. P. et al. The Importance of chitin in the marine environment. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 823–830, 2011.

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

VAN DEN BRINK, J. et al. Efficient plant biomass degradation by thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1316–1324, 2013.

WIJESEKARA, I.; KIM, S. K. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1080–1093, 2010.

YAN, Q.; FONG, S. Cloning and characterization of a chitinase from *Thermobifida fusca* reveals Tfu\_0580 as a thermostable and acidic endochitinase. **Biotechnology Reports**, v. 19, p. e00274, 2018.

YANG, S. et al. Biochemical characterization of the first fungal glycoside hydrolyase family 3  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Agricultural**



**and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5181–5190, 2014.

ZHANG, R. et al. Enzymatic properties of  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 93-103, 2018.

**ANEXO I**

**A novel *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T fungus isolated from the soil induces chitinase production using orange peel flour**

Artigo publicado na revista Scientia Plena – Qualis/Capes A4



## A novel *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T fungus isolated from the soil induces chitinase production using orange peel flour

Um novo fungo *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T isolado do solo induz produção de quitinase utilizando farinha da casca de laranja

V. Pommer<sup>1</sup>; P. D. H. Rother<sup>2</sup>; L. M. Rasbold<sup>2</sup>; J. L. da C. Silva<sup>2</sup>; A. Maller<sup>2</sup>; R. de C. G. Simão<sup>2</sup>; M. K. Kadowaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 85819-110, Cascavel-PR, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas/Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 85819-110, Cascavel-PR, Brasil

\*vipommer@hotmail.com

(Received on March 25, 2021; accepted on September 20, 2021)

Chitinases are enzymes capable of hydrolysing the  $\beta$ -1,4 bonds of chitin releasing chitooligosaccharides and N-acetylglucosamine and are widely used in food, pharmaceutical, and agricultural industries. Microorganisms are potential producers of this enzyme; however, there are no reports in the literature on the production of chitinase by fungi of the genus *Thermothelomyces*. Thus, this work aimed to investigate the production of extracellular chitinase using alternative carbon sources by the fungus isolated from soil, *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T. The fungus was cultivated in a liquid medium supplemented with carbon sources and incubated at 40°C under stationary conditions for seven days. Orange peel flour was the best inducer for extracellular chitinase, with 82.3 U/mL of enzymatic activity. The highest production of chitinase was obtained on the tenth day, and the optimum pH and temperature for enzyme activity were 4.5 and 50°C, respectively. Therefore, the fungus *T. heterothallicus* PA2S4T proved to be promising in the production of extracellular chitinase, which presents pH and temperature characteristics favourable to biotechnological application.

Keywords: thermophilic fungi, agro-industrial waste, enzyme.

Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações  $\beta$ -1,4 de quitina liberando quitooligossacarídeos e N-acetilglicosamina, e muito utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica e agrícola. Os microrganismos são potenciais produtores dessa enzima, entretanto não há relatos na literatura sobre a produção de quitinase por fungos do gênero *Thermothelomyces*. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar a produção da quitinase extracelular utilizando fontes alternativas de carbono pelo fungo isolado do solo *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T. O fungo foi cultivado em meio líquido suplementado com fontes de carbono e incubado a 40°C em condições estacionárias por 7 dias. A farinha da casca de laranja foi o melhor indutor para quitinase extracelular com 82,3 U/mL de atividade enzimática. A maior produção da quitinase foi obtida no décimo dia, sendo o pH e temperatura ótimos de atividade da enzima foram 4,5 e 50 °C, respectivamente. Além disso, sua atividade se manteve estável entre 40-50 °C e na faixa de pH de 4.0-5.0. Portanto, o fungo *T. heterothallicus* PA2S4T demonstrou ser promissor na produção de quitinase extracelular, a qual apresenta características de pH e temperatura favoráveis à aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: fungo termófilo, resíduo agroindustrial, enzima.

### 1. INTRODUCTION

Industrial biotechnology uses a variety of microbial enzymes composed mainly of amylases, proteases, pectinases, xylanases, lipases, and cellulases. In recent years, chitinases (EC 3.2.1.14) have gained prominence in this scenario because these enzymes are responsible for hydrolysing chitin, a linear polysaccharide composed of  $\beta$ -1,4 N-Acetylglucosamine (GlcNAc) found abundantly in nature, especially in arthropod exoskeletons and fungal cell walls [1-3].

Chitinases are classified based on their mode of action into endochitinases (EC 3.2.1.14) and exochitinases. Endochitinases are responsible for randomly hydrolysing the  $\beta$ -1, 4 internal bonds

of the chitin polymer, releasing chito oligosaccharides of lower molecular weights, such as chitobioses, chitotrioses, chitotetraoses, while exochitinase or  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases (EC 3.2.1.52) cleave the products generated by the action of endochitinases and chitobioses releasing the monomers N-Acetylglucosamine (GlcNAc) [1, 4]. Fungal chitinases are grouped into the GH18 family based on the amino acid sequence of the enzyme, where its basic structure is composed of five domains: catalytic domain, chitin-binding domain, serine/threonine rich region, N-terminal region, and C-terminal region [5]. In addition, the molecular mass of these enzymes range from 30 to 200 kDa, and the isoelectric point in the range from 3 to 8 [4, 6].

Despite advances in studies on the structure and mechanism of action of chitinases, there is little availability of these enzymes on the market for use in various biotechnological processes [7]. In agriculture, chitinases are used in biological control against fungi and insects, as an indicator of fungal activity in the soil [1]. In the pharmaceutical industry, the enzyme is added to antifungal creams or combined with drugs for the treatment of fungal diseases [1, 3]. Chitin or chitosan hydrolysates, chito oligosaccharides, are also widely used in the medical sector, such as chitohexaosis and chitohptaosis, which exhibit antitumor activities, and glucosamine, which is commonly used in the treatment of arthritis [1, 3]. Chito oligosaccharides are still classified as prebiotics and these are added to foods such as yogurt, milk, juice, and tofu [3].

Fungi usually produce chitinases to infect other microorganisms, defend against other pathogens, and also in the process of cell differentiation [3, 4, 6]. Among the microorganisms, filamentous fungi can secrete a wide variety of enzymes, and consequently facilitate their growth in the environment [8]. Among the chitinase-producing mesophilic fungi are *Trichoderma*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, and *Metharhizium* [4]. Thermophilic fungi, which grow in temperatures ranging between 40°C and 80°C, comprise the fungi belonging to the order Sordariales, Eurotiales and Mucorales [9]. In the order Sordariales only thermophilic fungi of the family Chaetomiaceae are members, including *Myceliophthora heterothallica*, whose taxonomy was reclassified in a new genus called *Thermothelomyces heterothallicus*, reported as a producer of xylanase and cellulase enzymes [10-12]. However, there are no reports in the literature on chitinase production by this microorganism.

In addition, the use of agricultural by-products/agro-industrial residues as a supplement in bioprocesses for the production of fungal enzymes contributes to the use of low-cost carbon sources and avoids environmental problems due to inadequate disposal. Thus, this study aimed to investigate the production of extracellular chitinase using alternative carbon sources by the fungus isolated from soil, *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Isolation and strain identification

The fungus was isolated from soil samples collected in the region of Nova Aurora, Parana state, Brazil, which is located at 24°30'9" S 53°15'18" W. Taxonomic identification was performed by analysing products amplified with primers for ribosomal genes using the methodology described by White et al. (1990) [13]. The isolation of the genomic DNA of this fungus occurred from the mycelial mass obtained from a two-day liquid culture supplemented with 1% glucose. The fungus mycelium was collected by centrifugation (5.000 x g, 10 min), and the pellet was used for DNA extraction using the hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) method [14]. Primers ITS1 and ITS4 were used to amplify the regions of ITS1, ITS2 and 5.8S. The polymerase chain reaction (PCR) mixture included 0.6  $\mu$ M of each primer, 0.2 mM deoxynucleotides, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5x green GoTaq® Flexi buffer (Promega), and 2.5 U of GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega). The conditions of the PCR cycles consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 2 minutes, 35 cycles at 94 °C for 45 seconds, 50 °C for 45 seconds and 72°C for 45 seconds, followed by a final phase extension at 72 °C for 5 minutes. The PCR products were analysed on 1.0% Tris-acetate-EDTA agarose gels (1.0% agarose, 0.04 M Tris-acetate, and 1 mM Na-EDTA), developed with ethidium bromide, and viewed under UV lighting. The determined sequences (ITS1, ITS2, and 5.8S) were then compared with other

sequences deposited in the database of the National Biotechnology Information Center (NCBI) using the basic local alignment tool.

## 2.2 Maintenance of the fungus

The routine maintenance of the fungal strain in the laboratory was carried out in test tubes containing 5 ml of potato dextrose agar (PDA), incubated at 40°C for seven days, and then kept in the refrigerator for a maximum period of 30 days.

## 2.3 Cultivation conditions

The fungus *T. heterothallicus* PA2S4T was grown in a Czapek liquid medium supplemented with 1% alternative carbon sources (sugarcane bagasse, sorghum bagasse, lemon peel, pear peel, tilapia fish scale, cicada exuvia, orange peel flour, apple flour, passion fruit fibre, and corn straw). Then 1.0 mL of the spore suspension ( $2 \times 10^5$  spores/mL) was inoculated in sterile distilled water in Erlenmeyer flasks (125 mL), containing 25 mL of liquid medium. The cultures were incubated at 40°C under stationary conditions for seven days. After growth, the cultures were filtered and the cell-free filtrates after dialysis were used to determine enzyme activity.

## 2.4 Enzymatic determination

Chitinase activity was determined through a mixture of 90 µl of chitin substrate (Sigma-Aldrich), 0.2 mg/ml in a 50 mM sodium acetate buffer, a pH of 6.0, and 10 µl of diluted enzyme extract when necessary and incubated at 40°C for 30 minutes. The reaction was stopped with the addition of 200 µl of 0.4 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution and, the products were measured in a spectrophotometer at 410 nm. The chitinase unit was defined as the amount of enzyme required to produce 1 µmol of p-nitrophenol per minute of reaction.

## 2.5 Determination of proteins

Extracellular proteins were measured using the Bradford method (1976) [15] and using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The unit was defined as mg of protein per ml.

## 2.6 Influence of time on the production of extracellular chitinase

Cultures containing the Czapek liquid medium were supplemented with 1% orange peel flour carbon source, inoculated with fungal spores, and incubated at 40°C for 12 days. Each day the cultures were filtered to obtain the crude extract to carry out enzymatic assays and protein determination.

## 2.7 Optimum pH and temperature and chitinase stability

The optimal chitinase temperature was determined by incubating the enzyme with the substrate 0.2 mg/mL (w/v) dissolved in a McIlvaine buffer (0.1M, pH 4.5) at temperatures ranging from 35 to 70°C for 30 minutes. Thermal stability was carried out by incubating the enzyme at temperatures of 40, 50, 60, and 70°C and then aliquots were withdrawn at 0, 10, 30, 60, 90, and 120 minutes. The optimal pH of chitinase was determined using the McIlvaine 0.1M buffer in the pH range of 3.0 to 8.0. The pH stability was determined by incubating the enzyme in the McIlvaine buffer (pH 3.0 to 6.0) in an ice bath for 24 hours and the residual chitinase activity was measured.

## 2.8 Statistical analysis

All the experiments were performed in triplicate, and the results were presented as mean  $\pm$  standard error. Significant differences between the means of enzymatic activities were determined by an analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test at the 5% level of significance ( $p < 0.05$ ).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Strain identification

The identification of fungal isolate PA2S4T was performed by sequencing the products amplified with the primers ITS1 and ITS4. The 523bp sequence of the ITS regions of the ribosomal DNA showed 99% similarity with the species *Thermothelomyces heterothallicus* (Klopotek) (van den Brink & Samson, 2012). The sequence of the region from ITS1 to ITS4 of this fungus is deposited and available in the NCBI database by accession number MW204601.1 (Figure 1). The fungi belonging to the Chaetomiaceae family are of great interest due to their thermostable enzymes, and are commonly addressed in the literature in studies of biomass degradation and biofuel production [16].

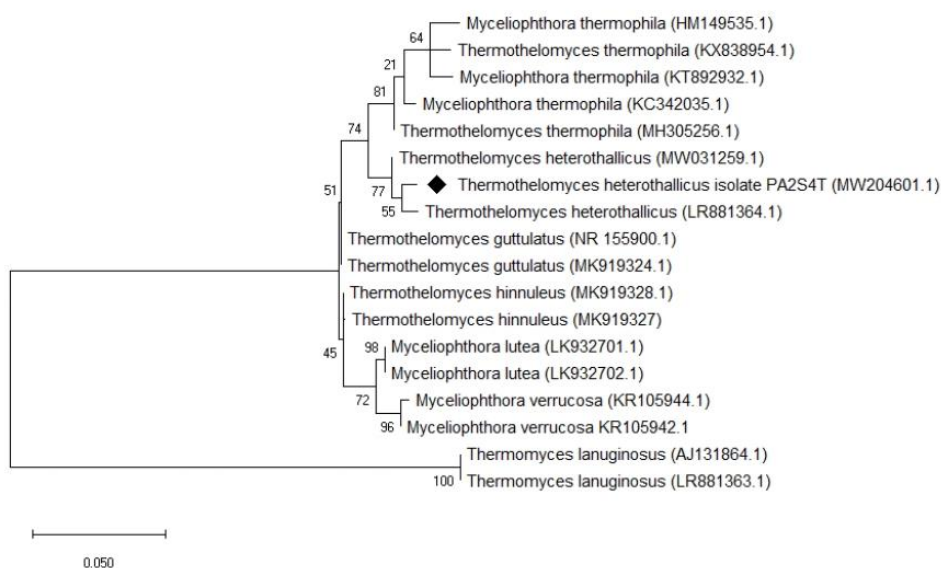


Figure 1 - A phylogenetic tree constructed from sequences of the ITS regions of the ribosomal DNA from *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T and compared to sequences of other strains obtained from the NCBI GenBank database. The *Thermomyces lanuginosus* strain was used as an out-group. Fungus species are in bold symbols, followed by the Genbank accession number.

### 3.2 Influence of carbon sources on chitinase production

The production of extracellular chitinase by the fungus *T. heterothallicus* PA2S4T obtained from liquid cultivation showed that orange peel flour was the source of carbon that statistically showed the highest production of extracellular chitinase (82.3 U/mL), followed by lemon peel (27.9 U/mL). The chitinolytic activities considered statistically similar were obtained with corn straw, pear peel, and sugarcane bagasse, while lower chitinase induction values were observed with the carbon sources: apple flour, cicada exuvia, tilapia fish scale, sorghum bagasse, and

passion fruit fibre (Figure 2). In general, the carbon sources used to induce chitinase production are compounds that contain chitin, such as waste from the fishing industry [16-18]. However, studies have shown the use of residues from orange to induce enzyme production, whether the bagasse or the peel of the fruit, such as in the production of pectinase and polygalacturonase by the saprophytic fungus *Aspergillus fumigatus* [19], the production of laccases by the fungus *Peyronellaea pinodella* [18], and pectinase production by the fungus *Aspergillus niger* [19]. This increase in the production of these enzymes may be related to the great presence of pectin (42.5%) and soluble sugars, such as glucose, fructose, and sucrose (16.9%), which together with cellulose (9.21%) and hemicellulose (10.5%) make up the orange peel, one of the main by-products generated by the citrus industry [20, 21].

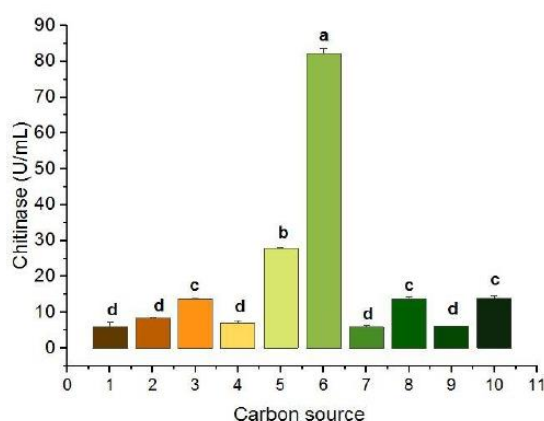


Figure 2 - Influences of carbon sources on chitinase production by the fungus *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T. The liquid culture was supplemented with 1% (w/v) of different carbon sources and incubated under static conditions at 40°C for 7 days. The carbon sources are: apple flour (1), cicada exuvia (2), corn straw (3), tilapia fish scale (4), lemon peel (5), orange peel flour (6), passion fruit fibre (7), pear peel (8), sorghum bagasse (9) and sugarcane bagasse (10).

Table 1 shows the chitinases produced by different species of fungi and their sources of inducing carbons. Chitinases from thermophilic microorganisms are still lacking; there are only reports of *Humicola grisea* [22], *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* [23], *Chaetomium thermophilum* [23], *Myceliophthora thermophila* C1 [24], and *Thermomyces lanuginosus* SSBP [6]. This study reports for the first time on the production of thermostable chitinases from the fungus *Thermothelomyces heterothallicus*.

Table 1 - Chitinase production by fungi using different carbon sources.

Fungus	Carbon source	Chitinase	Reference
<i>Alternaria alternata</i>	Shrimp shells	15.6 <sup>(c)</sup>	[25]
<i>Aspergillus niger</i> LOCK 62	Yeast Extract + Colloidal Chitin	82 <sup>(c)*</sup>	[26]
<i>Aspergillus terreus</i>	Shrimp shell powder	4.82 <sup>(a)</sup>	[27]
<i>Aspergillus terreus</i> CBNRKR KF529976	Fish scale	3.7 <sup>(d)</sup>	[28]
<i>Beauveria bassiana</i>	Colloidal chitin	0.585 <sup>(d)</sup>	[29]
<i>Chaetomium thermophilum</i>	Colloidal chitin	2.32 <sup>(d)</sup>	[23]
<i>Humicola grisea</i>	Chitin + colloidal chitin	213.57 <sup>(d)</sup>	[22]
<i>Isaria fumosorosea</i>	N-acetylglucosamine + colloidal chitin	284.09 <sup>(d)</sup>	[30]
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB 348	Sugarcane bagasse	12.44 <sup>(b)</sup>	[31]
<i>Metarhizium anisopliae</i> IBCB 360	Silkworm	7.14 <sup>(b)</sup>	[32]
<i>Myceliophthora thermophila</i> C1	Glucose	3.5 <sup>(a)</sup>	[24]
<i>Paecilomyces</i> sp.	Colloidal chitin	90 <sup>(c)</sup>	[33]
<i>Thermoascus aurantiacus</i> var. <i>levisporus</i>	Colloidal chitin	1.37 <sup>(c)</sup>	[23]
<i>Thermothelomyces heterothallicus</i> PA2S4T	Orange peel flour	82.3 <sup>(c)</sup>	[This study]
<i>Trichoderma asperellum</i> UTP-16	Starch	2.05 <sup>(b)</sup>	[34]
<i>Trichoderma harzianum</i> TUBF 966	Colloidal chitin	14.7 <sup>(c)</sup>	[35]
<i>Trichoderma viride</i>	Colloidal chitin	23.8 <sup>(c)</sup>	[36]
<i>Trichoderma viride</i> AUMC 13021	Colloidal chitin	38.3 <sup>(a)</sup>	[37]

U/mg: (a); Ug<sup>-1</sup>: (b); U/mL: (c); \*nmol/h.

### 3.3 Influence of time on chitinase production

The maximum chitinase production was obtained on the 10th day and supplemented with orange peel flour as a carbon source in cultivation under stationary conditions (Figure 3). Rustiguel et al. (2012) (32) also reported that the maximum chitinase production of *Metarhizium anisopliae* using silkworm chrysalises occurred between the 8th and 12th days of culture.

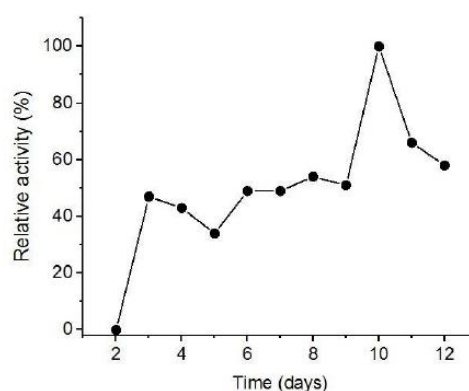


Figure 3 - Influence of time on chitinase production by the fungus *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T in cultivation supplemented with orange peel flour, incubated at 40°C for 12 days under stationary conditions.

### 3.4 Influence of temperature and pH on enzymatic activity and stability

The temperature and optimal pH of chitinase activity of *T. heterothallicus* PA2S4T were 50°C (Figure 4A) and pH 4.5 (Figure 4B), respectively. Similarly, the optimum temperature (50°C) and the optimum pH in the range from 4.0 to 5.5 were observed for chitinase from *M. anisopliae* [32]. However, the pH values of *B. bassiana* chitinases were 5.5, 6.0, and 8.0 for the different isoforms



of the enzyme produced by the fungus [38]. Chitinase from *T. heterothallicus* PA2S4T exhibited thermal stability at temperatures of 40 and 50°C during 120 min; however, at temperatures of 60 and 70 °C, there was a decrease in enzyme activity after 10 min of incubation (Figure 4C). The enzyme showed pH stability for 24 h at pH 4.0 to 5.0, with 100% stable activity at pH 4.5, as shown in Figure 4D. Rustiguel et al. (2012) [32] reported that chitinase from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* exhibited thermostability at 50°C and 100% activity at pH 7.

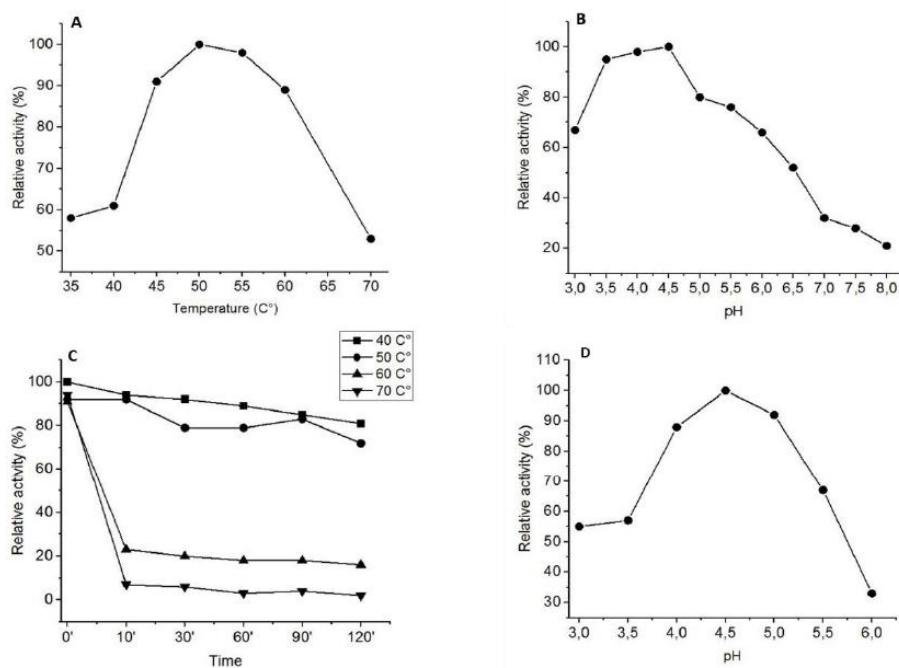


Figure 4 - Influence of temperature (A); Influence of pH (B); Thermal stability of chitinase (C); on the chitinase activity incubated at different temperatures 40°C (■), 50°C (●), 60°C (▲), 70°C (▼) for up to 120 min; Stability at pH of chitinase of the fungus *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T (D).

#### 4. CONCLUSION

The thermophilic fungus *Thermothelomyces heterothallicus* PA2S4T isolated from the soil of western Parana state has great potential as a producer of extracellular chitinase using alternative carbon sources, mainly orange peel flour, which is a waste product of the orange juice industry. In addition, this is the first report on chitinase production by this fungal species using carbon sources with a chitin-free composition or its derivatives. The enzyme also exhibited optimal pH and temperature characteristics that provide biotechnological application and could be promising for the degradation of residues that contain chitins.

#### 5. ACKNOWLEDGEMENTS

Paula D. H. Rother and Victoria Pommer are recipients of a fellowship from the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) - Brazil and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), respectively.

## 6. REFERENCES

1. Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, et al. Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013;5(1):21-9. doi: 10.4103/0975-7406.106559
2. Jemli S, Ayadi-Zouari D, Hlima H Ben, Bejar S. Biocatalysts: Application and engineering for industrial purposes. *Crit Rev Biotechnol.* 2016;36(2):246-58. doi: 10.3109/07388551.2014.950550
3. Le B, Yang SH. Microbial chitinases: properties, current state and biotechnological applications. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019;35(9):1-12. doi: 10.1007/s11274-019-2721-y
4. Karthik N, Akanksha K, Binod P, Pandey A. Production, purification and properties of fungal chitinases—A review. *Indian J Exp Biol.* 2014;52(11):1025-35
5. Khan FI, Bisetty K, Singh S, Permaul K, Hassan MI. Chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. *Extremophiles.* 2015;19(6):1055-66. doi: 10.1007/s00792-015-0792-8
6. Khan FI, Govender A, Permaul K, Singh S, Bisetty K. Thermostable chitinase II from *Thermomyces lanuginosus* SSBP: Cloning, structure prediction and molecular dynamics simulations. *J Theor Biol.* 2015;374:107-14. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.03.035
7. Stoykov YM, Pavlov AI, Krastanov AI. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. *Eng Life Sci.* 2015;15(1):30-8. doi: 10.1002/elsc.201400173
8. Sun X, Su X. Harnessing the knowledge of protein secretion for enhanced protein production in filamentous fungi. *World J Microbiol Biotechnol.* 2019;35(4):1-10. doi: 10.1007/s11274-019-2630-0
9. Morgenstern I, Powlowski J, Ishmael N, Darmond C, Marqueteau S, Moisan MC, et al. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biol.* 2012;116(4):489-502. doi: 10.1016/j.funbio.2012.01.010
10. Marin-Felix Y, Stchigel AM, Miller AN, Guarro J, Cano-Lira JF. A re-evaluation of the genus *Myceliophthora* (Sordariales, Ascomycota): Its segregation into four genera and description of *Corynascus fumimontanus* sp. nov. *Mycologia.* 2015;107(3):619-32. doi: 10.3852/14-228
11. Simões LCO, da Silva RR, Nascimento CEO, Boscolo M, Gomes E, da Silva R. Purification and Physicochemical Characterization of a Novel Thermostable Xylanase Secreted by the Fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. *Appl Biochem Biotechnol.* 2019;188(4):991-1008. doi: 10.1007/s12010-019-02973-8
12. de Oliveira TB, Rodrigues A. Ecology of Thermophilic Fungi. In: Tiquia-Arashiro S, Grube M, editors. *Fungi in extreme environments: Ecological role and biotechnological significance* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2019. p. 39-57. doi: 10.1007/978-3-030-19030-9\_3
13. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: Innis MS, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* San Diego (CA): Academic Press; 1990. p. 315-22. doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.
14. Góes-Neto A, Loguercio-Leite C, Guerrero RT. DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas.* 2005;18(2):19-32.
15. Bradford MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-54. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
16. Berka RM, Grigoriev IV, Otillar R, Salamov A, Grimwood J, Reid I, et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat Biotechnol.* 2011;29(10):922-9. doi: 10.1038/nbt.1976
17. Phutela U, Dhuna V, Sandhu S, Chadha BS. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Brazilian J Microbiol.* 2005;36(1):63-9. doi: 10.1590/S1517-83822005000100013
18. Patel RJ. Orange peel as an inducer for Laccase production in a novel fungal strain *peyronellaea pinodella* BL-3/4 and optimization of its cultural parameters by single parameter approach. *Indian J Sci Technol.* 2020;13(16):1656-67. doi: 10.17485/IJST/v13i16.296
19. Mrudula S, Anitharaj R. Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. *Glob J Biotechnol Biochem.* 2011;6(2):64-71
20. Rezzadori K, Benedetti S, Amante ER. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food Bioprod Process.* 2012;90(4):606-14. doi: 10.1016/j.fbp.2012.06.002
21. Ahmadi F, Zamiri MJ, Khorvash M, Banihashemi Z, Bayat AR. Chemical composition and protein enrichment of orange peels and sugar beet pulp after fermentation by two *Trichoderma* species. *Iran J Vet Res.* 2015;16(1):25-30. doi: 10.22099/ijvr.2015.2919

22. Kumar M, Brar A, Vivekanand V, Pareek N. Process optimization, purification and characterization of a novel acidic, thermostable chitinase from *Humicola grisea*. Int J Biol Macromol. 2018; 116:931-8. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.125
23. Li AN, Yu K, Liu HQ, Zhang J, Li H, Li DC. Two novel thermostable chitinase genes from thermophilic fungi: Cloning, expression and characterization. Bioresour Technol. 2010;101(14):5546-51. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.058
24. Krolicka M, Hinz SWA, Koetsier MJ, Joosten R, Eggink G, Van Den Broek LAM, et al. Chitinase Chi1 from *Myceliophthora thermophila* C1, a thermostable enzyme for chitin and chitosan depolymerization. J Agric Food Chem. 2018;66(7):1658-69. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04032
25. Ghanem KM, Al-Fassi FA, Farsi RM. Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from shrimp shellfish waste by *Alternaria alternata*. African J Microbiol Res. 2011;5(13):1649-59. doi: 10.5897/AJB09.1937
26. Brzezinska MS, Jankiewicz U. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. Curr Microbiol. 2012;65(6):666-72. doi: 10.1007/s00284-012-0208-2
27. Farag MA, Al-Nusarie ST. Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*. African J Biotechnol. 2014;13(14):1567-78. doi: 10.5897/ajb2014.13628
28. Krishnaveni B, Raganathan R. Chitinase production from marine wastes by *Aspergillus terreus* and its application in degradation studies. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2014;3(1):76-82
29. Elawati NE, Pujiyanto S, Kusdiyantini E. Production of extracellular chitinase *Beauveria bassiana* under submerged fermentation conditions. J Phys Conf Ser. 2018;1025(1). doi: 10.1088/1742-6596/1025/1/012074
30. Ali S, Wu J, Huang Z, Ren SX. Production and regulation of extracellular chitinase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. Biocontrol Sci Technol. 2010;20(7):723-38. doi: 10.1080/09583151003714091
31. Aita BC, Spannemberg SS, Schmaltz S, Zabot GL, Tres M V., Kuhn RC, et al. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. J Environ Chem Eng. 2019;7(3):103193. doi: 10.1016/j.jece.2019.103193
32. Rustiguel CB, Jorge JA, Guimarães LHS. Optimization of the chitinase production by different *Metarhizium anisopliae* strains under solid-state fermentation with silkworm chrysalis as substrate using CCRD. Adv Microbiol. 2012;2(3):268-76. doi: 10.4236/aim.2012.23032
33. Homthong M, Kubera A, Srihuttagum M, Hongtrakul V. Isolation and characterization of chitinase from soil fungi, *Paecilomyces* sp. Agric Nat Resour. 2016;50(4):232-42. doi: 10.1016/j.anres.2015.09.005
34. Kumar DP, Singh RK, Anupama PD, Solanki MK, Kumar S, Srivastava AK, et al. Studies on exo-chitinase production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and its characterization. Indian J Microbiol. 2012;52(3):388-95. doi: 10.1007/s12088-011-0237-8
35. Sandhya C, Adapa LK, Nampoothiri KM, Binod P, Szakacs G, Pandey A. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. J Basic Microbiol. 2004;44(1):49-58. doi: 10.1002/jobm.200310284
36. Sharaf EF, El-Sarrany AE-AQ, El-Deeb M. Biorecycling of shrimp shell by *Trichoderma viride* for production of antifungal chitinase. African J Microbiol Res. 2012;6(21):4538-45. doi: 10.5897/ajmr12.148
37. Abu-Tahon MA, Isaac GS. Anticancer and antifungal efficiencies of purified chitinase produced from *Trichoderma viride* under submerged fermentation. J Gen Appl Microbiol. 2020;66(1):32-40. doi: 10.2323/jgam.2019.04.006
38. Sassá DC, Varéa-Pereira G, Miyagui DT, Neves PMOJ, Wu JI, Sugahara VH, et al. Evaluation of kinetic parameters of chitinases produced by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Semin Agrar. 2008;29(4):807-14. doi: 10.5433/1679-0359.2008v29n4p807