

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITOSANASE PELO *Paenibacillus ehimensis* UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

N.K. ARAÚJO<sup>1</sup>, C.F. ASSIS<sup>2</sup>, L.F. FARIAS<sup>3</sup>, M.F.F.  
PEDROSA<sup>4</sup>, G.R. MACEDO<sup>5</sup>, M.G.B.  
PAGNONCELLI<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade  
Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

e-mail: nakar\_rn@hotmail.com

<sup>2,5</sup> Núcleo Tecnológico, Universidade Federal do  
Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

<sup>3,4,6</sup> Departamento de Farmácia, Universidade  
Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

A quitosana é um polímero linear desacetilado de quitina, formado por unidades de D-glucosamina, unidas por ligação  $\beta$ -1,4. A partir da hidrólise da quitosana são gerados quitooligossacarídeos os quais possuem diversas atividades funcionais, incluindo antimicrobial, antitumoral, antioxidante, e melhora da resposta imune [1].

Quitooligossacarídeos podem ser produzidos tanto por métodos químicos como por enzimáticos. A hidrólise enzimática da quitosana é geralmente conduzida usando quitosanases, as quais catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 entre resíduos de D-glucosamina em quitosanas parcialmente desacetiladas [2].

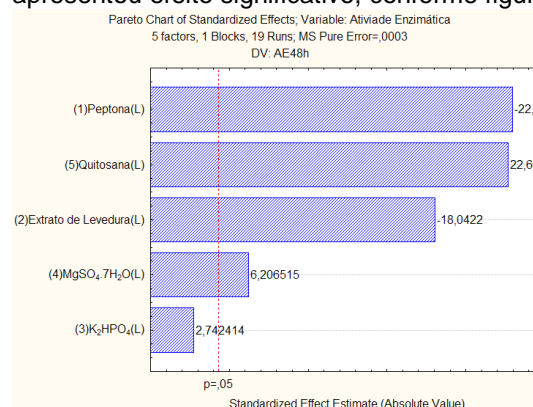
Um amplo número de organismos incluindo fungos, plantas e bactérias são capazes de produzir quitosanases [2]. Assim, o presente estudo objetivou otimizar a produção de quitosanase pelo *Paenibacillus ehimensis*, avaliando as variáveis de maior influência na produção da enzima.

O cultivo do *Paenibacillus ehimensis* NRRL B-23118 [3], obtido do banco de microrganismos Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, Illinois – USA), foi conduzido em shaker com temperatura, agitação e pH inicial fixados em 36°C, 120 rpm, e 7,0 respectivamente. Planejamento experimental fatorial fracionado ( $2^{5-1}$ ), com 16 corridas e 03 repetições do ponto central, foi empregado para avaliar a influência dos componentes do meio de cultivo (peptona, extrato de levedura,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$  e quitosana) na produção de quitosanases. A atividade enzimática foi avaliada após 48 horas de cultivo.

A análise da atividade enzimática foi feita utilizando 500 $\mu$ l de caldo fermentado em adição a 500 $\mu$ l de solução de quitosana 1%, a mistura foi aquecida em banho-maria por 30 minutos, com temperatura ajustada para 55°C. A reação foi

parada por fervura durante 10 minutos. A formação de açúcares redutores foi analisada pelo método do ácido dinitro salicílico, usando D-glucosamina como padrão. Uma unidade de atividade quitonolítica foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 $\mu$ mol.min<sup>-1</sup> de glucosamina nas condições descritas acima. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software Statistica 7.0.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Com base nas análises estatísticas, foi verificado que apenas a variável  $K_2HPO_4$  ( $p = 0,111$ ) não apresentou efeito significativo, conforme figura 1.



**Fig.1** Gráfico de Pareto.

Após análise desses dados, foi definido o seguinte meio otimizado: Peptona 3,0g.L<sup>-1</sup>; Extrato de levedura 3,0g.L<sup>-1</sup>;  $K_2HPO_4$  0,5g.L<sup>-1</sup>;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,75g.L<sup>-1</sup>; Quitosana 3,0g.L<sup>-1</sup>.

Com o estabelecimento dos fatores que mais influenciam a produção de quitosanases, pelo microrganismo em questão, foi possível o estabelecimento de um meio de cultivo com alto rendimento que será útil no aumento da escala de produção.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a coordenação do laboratório de Engenharia Bioquímica/UFRN onde os experimentos foram realizados, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq– Brasil) pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

1. Wang, S.L.; Peng, J.H.; Liang, T.W.; Liu, K.C. Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011. *Carbohydrate Research*, 343, 1316-1323, 2008.
2. Wee, Y. J., Reddy, L.V.A., Chung, K.C., Ryu, H.W. Optimization of chitosanase production from *Bacillus* sp. RKY3 using statistical experimental designs. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 8, 1356-1363, 2009.
3. Kuroshima, K. I.; Sakane, T.; Takata, R.; Yokota, A. *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., new chitinolytic members of the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 76-80, 1996.