



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019014165-4 A2



(22) Data do Depósito: 09/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 19/01/2021

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELA ESPÉCIE CURVULARIA LUNATA URM6861

(51) Int. Cl.: C12P 1/02; C12R 1/645.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ALINE GLEYCE JULIAO BOMFIM; JOYCE BARROS DOS SANTOS; JOAO TIAGO CORREIA OLIVEIRA; CRISTINA MARIA DE SOUZA MOTTA; KEILA APARECIDA MOREIRA.

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELA ESPÉCIE CURVULARIA LUNATA URM6861. Esta invenção estabelece uma composição de substrato nutricional sem a utilização de indutores quitinilóticos comerciais e descreve uma metodologia para a produção e obtenção da enzima quitinase produzida pelo fungo Curvularia lunata URM6861 em fermentação submersa semiestática. Tendo essa metodologia apresentando eficiência em relação à capacidade de produção elevada da enzima quitinase, resultando em um metabólito com características termoestáveis e metal-compatível, tendo assim, potencial para a aplicação em diversos campos industriais.

“MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA PELA ESPÉCIE *CURVULARIA LUNATA* URM6861”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] Esta invenção está inserida na área de biotecnologia e produção enzimática, onde estabelece uma composição de substrato nutricional de crescimento sem a utilização de substratos provenientes de quitina e estabelece uma metodologia de fermentação submersa semiestática para produção e obtenção da enzima quitinase fúngica produzida pelo fungo filamentoso *Curvularia lunata* URM6861 isolado de *Cereus jamacaru*, uma cactácea. A produção desta enzima visa a aplicação em diversos campos industriais, com enfoque na indústria agrônômica para o desenvolvimento de controladores biológicos.

Antecedentes da Invenção

[002] As quitinases representam uma classe de enzimas que catalisam a quebra de quitina à açúcares simples. São encontradas em microrganismos como fungos e bactérias (Di Rosa et al. Immunobiology. 221. 3. 399-411. 2016). Possuem grande interesse industrial como a obtenção oligossacarídeos provenientes da quitina e que são de importância farmacêutica na composição de substâncias anti-hipertensivas, antitumorais, controle de fungos patogênicos, tratamentos de resíduos marítimos, entre outros (Nunes & Philipps-Wiemann. Chitinases: Review. Chapter 18. 361-378. Elsevier, 2018; Rathore & Gupta. Enzyme Res. 2015. 8p. 2015).

[003] Para o setor agrícola, o enfoque da obtenção de quitinase produzida por microrganismo está no seu potencial de controle de doenças provocadas por fungos e biocontrole de insetos, com o uso de biofungicidas e bioinseticidas à base de quitinase (Bezirganoglu et al. Plant Cell Tissue Organ Cult. 112.227–237. 2013). Doenças em plantas causadas por fungos são responsáveis por uma parcela de 30% de perda na produção agrícola, o que causa um grande impacto na economia (Brzezinska et al. Curr Microbiol. 168.71–81. 2014).

[004] O controle de doenças em plantas causadas por fungos é feito principalmente por meio da utilização de defensivos agrícolas, portanto, ocorre desvantagens com os altos níveis de contaminação com produtos tóxicos e o elevado custo destes produtos químicos, o que leva a busca de novas substâncias de fonte biológica que possam substituí-los (MMA, Ministério do Meio Ambiente. 2015.; Marini et al. Arq. Inst. Biol. 79. n.2. 305-308. 2012). Moléculas biológicas produzidas por fungos isolados de plantas é uma alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor (Magalhães et al. Cerne Lavras. 14. n.3. 267-273. 2008).

[005] Para a saúde humana existe a recomendação do uso de quitinase para aplicação no tratamento de doenças de origem fúngica, atuando como indicadores de infecção fúngica em pacientes com doenças degenerativas (Lupetti et al. Med. Mycol. 49. 1. S62–S69. 2011). Também podem ser usadas como biorremediadoras, no tratamento de rejeitos de indústrias de produtos marítimos onde podem ser utilizadas para converter esses resíduos quitinolíticos em componentes mais simples, o que reduz a poluição da água (Sakai et al. Appl Environm Microbiol, 64. 9. 3397–3402. 1998).

[006] A enzima quitinase produzida por fungos são menos investigadas do que as produzidas por bactérias, onde a maior parte dos estudos de quitinases fúngicas estão concentrados nos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (Farag et al. Egyptian J. Aqua. Res. 42. 2. 185-192. 2016.; Kowsari et al. Curr. Microbiol. 68. 4. 495-502. 2014). Isto se dá devido às condições de produção da mesma, porque bactérias possuem mecanismos de crescimento celular rápido, o que facilita a produção e obtenção do produto desejado.

[007] A busca por moléculas biologicamente ativas produzidas por fungos foi intensificada nos últimos anos. Quitinases de origem fúngica possuem diferenciais notáveis quando comparadas às quitinases produzidas por bactérias, como a versatilidade nos campos de aplicação, maior resistência aos processos industriais (temperaturas e pH) e, devido à baixa toxicidade, podem ser utilizadas em diversos seguimentos industriais (Kim et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75. 6. 1275–1283. 2007).

[008] A escolha dos componentes nutritivos de um meio de cultura, ou seja, um meio nutritivo que irão induzir a produção da molécula pelo microrganismo é de

extrema importância, uma vez que o foco é uma produção elevada. Para a produção de quitinases por fungos (filamentosos e leveduras), o principal componente é o substrato indutor da enzima. Substâncias que servem como substratos comerciais utilizados nesse tipo de processo são de alto custo, onde precisa ser levado em consideração que, para se obter produção de quitinases, um substrato rico em quitina precisa ser adicionado ao meio de fermentação para induzir a produção pelo microrganismo, também levando em consideração que fatores como a temperatura e o tipo de agitação rotacional utilizado no processo fermentativo, fatores que influenciam diretamente na quantidade de produto final obtido.

[009] Os documentos do estado da técnica no âmbito patentário fazem referência ao alcance de um meio de cultura de composição simplificada, sem a necessidade do uso de indutores contendo quitina para a obtenção de quitinase produzida por fungos, apresentando diferenças quanto aos materiais e métodos descritos na presente invenção.

[010] O documento CN102994483A descreve o meio de cultura e processo de fermentação fúngica para produção de quitinase por *Lecanicillium* sp. A fórmula do meio de cultura compreende os seguintes componentes: frutose ou maltose, extrato de levedura, uma fonte de potássio ou cálcio, em equilíbrio de água, e o pH entre 5,5-7,0. A solução de conídios é fermentada a 26 °C à velocidade rotacional de 160 rotações por minuto. Divergindo da presente invenção, que utiliza sacarose como principal componente de fermentação para o fungo filamentoso *Curvularia lunata* URM6861, sem a presença de substrato indutor.

[011] No documento CN102994484B está descrito o meio de cultura e método para fermentação de produção de quitinase por *Aschersonia placenta*. Na fórmula do meio de cultura, é utilizado amido solúvel ou glicose, peptona ou extrato de levedura, íons de bário ou cálcio em pH de 5,5-7,0. Neste método a solução de conídios é fermentada a 26 °C, velocidade rotativa 160 rotações por minuto. Diferentemente, do método utilizado no presente invento, o fungo *Curvularia lunata* URM6861 obteve uma produção notável de quitinase quando fermentado em meio de cultura contendo sacarose, nitrato de amônia, sulfato de magnésio e fostato de potássio, pH neutro à 30 °C em condições semiestáticas (48h em condições estáticas, 18h em agitação a 70 rotações por minutos e 6h estático).

[012] No documento WO2003038081A1, é descrito o método para produção de quitinase utilizando microrganismos do gênero *Metarhizium*. Inicialmente ocorrendo a preparação da quitina coloidal para ser utilizado como substrato indutor na composição do meio de cultura com adição de ágar, resultando na preparação de meio sólido de quitina coloidal. O que difere do método utilizado no presente invento, é que a metodologia empregada na produção de quitinase por fungos foi conduzida em condições de fermentação submersa, ou seja, meio de cultivo com presença de água livre e com substratos solúveis uma vez que a recuperação do produto produzido nestas condições é recuperada com facilidade.

[013] O documento CN1269405A descreve um método de obtenção e caracterização de quitinase produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* YJ-407. Na caracterização, apresentou estabilidade entre pH 5,0 a 7,0. Os resultados mostraram também, que a enzima foi estável por 30 minutos em temperaturas abaixo de 45 °C e inativada completamente acima de 65 °C. Os íons de ferro, zinco, manganês, chumbo e mercúrio inibiram fortemente a atividade enzimática. No presente invento, a quitinase produzida por *Curvularia lunata* URM6861, a atividade da enzima apresentou melhor rendimento em pH ligeiramente alcalino e mostrou-se estável na faixa de pH 5,0 a 8,0. A atividade enzimática foi estável a 80 °C por cerca de 96 h. Os íons de zinco diminuíram a atividade em cerca de 30% e o íon férrico influenciou o aumento de 85% na atividade enzimática.

[014] Diante do apresentado no estado da técnica, não foram encontrados documentos que revelam elementos da presente invenção e, portanto, a mesma apresenta novidade.

Descrição da Invenção

[015] Para a produção e obtenção de quitinase em fermentação submersa, foi utilizado o fungo filamentoso *Curvularia lunata* URM6861, cepa esta adquirida da coleção de cultura da Micoteca URM, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. O fungo foi cultivado em meio de cultura sólido contendo meio nutritivo para crescimento, em temperatura ambiente por até sete dias. Em seguida, a suspensão dos esporos e micélios foi realizada em água (destilada/osmose reversa/ ultrapura)

esterilizada adicionada de um tensoativo hidrofílico. É recomendado o cultivo e uso do fungo para a realização da fermentação entre 5-7 dias, pois os resultados iniciais obtidos no quantitativo de produção de quitinase indicam um maior rendimento na produção nesse intervalo de tempo. Foi utilizado um volume de 4% (por litro de meio fermentativo) da suspensão de esporos e micélios como padrão para a fermentação.

[016] Inicialmente, a fermentação ocorreu sob agitação de 120 rpm à temperatura de 30 °C em pH neutro por um período de 96 horas utilizando composições de meios fermentativos convencionais que utilizam substrato de quitina como indutores. A cada 24 horas foi realizada a verificação da produção de quitinase pelo microrganismo, no entanto, a quantidade produzida não apresentava valores expressivos. A Tabela 1 apresenta a composição de quatro meios fermentativos convencionais indicados para a produção de quitinase.

[017] Para avaliar a efetividade do meio fermentativo, em todos os ensaios realizados a seguir, a atividade enzimática foi realizada de acordo com a metodologia de Waghmare e Ghosh (Waghmare, S.R., Ghosh, J.S. Carbohydr. Res. 345. 18. 2630–2635. 2010) e para a detecção dos açúcares redutores, utilizou-se o método descrito por Miller (Miller, G.L. Anal. Chem. 31: 426-429, 1959) Unidade de atividade quitinolítica é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de N-acetilglicosamina por minuto, tendo o resultado expresso em U mL^{-1} .

[018] Tabela 1. Composição de meios fermentativos para produção de quitinase por fungos destacando o uso de indutores de produção.

Meio Fermentativo	Composição em g L^{-1}
Composição 1	KH_2PO_4 : 0,6; K_2HPO_4 : 0,9; KCL: 2; $\text{NH}_4(\text{SO})_2$: 1; CaCl_2 : 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2; ZnSO_4 : 0,2; MnSO_4 : 0,2; sacarose: 5; Quitina em pó da carapaça de camarão (produto comercial): 42.
Composição 2	$\text{NH}_4(\text{SO})_2$: 0,5; KCL: 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2; CaCl_2 : 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1; K_2HPO_4 : 1; Quitina em pó da carapaça de caranguejo (produto comercial): 20.
Composição 3	NaNO_3 : 3; K_2HPO_4 : 1; KCL: 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5; FeSO_4 : 0,01; quitina coloidal : 20; sacarose: 5.
Composição 4	K_2HPO_4 : 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5; KCL: 15; extrato de levedura : 5.

[019] Após experimentos realizados com os meios de cultura mencionados acima, a maior atividade obtida foi de $2,44 \text{ U mL}^{-1}$ em 72 horas com a Composição 3 e $1,55 \text{ U mL}^{-1}$ com a Composição 4 no tempo de 48 horas.

[020] Os valores de produção obtidos nos ensaios iniciais não apresentavam valores expressivos de produção quando o objetivo é escala industrial. Visando a produção de volumes maiores, foi testada a Composição 3 em condições estáticas e semiestáticas. *C. lunata* URM6861 em condições de fermentação semiestáticas, apresentou um crescimento na produção de 388% em relação a fermentação rotacionada e 164% em relação a fermentação estática, como pode ser observado na Tabela 2.

[021] Tabela 2. Produção de quitinase por *C. lunata* URM 6861 em diferentes condições de fermentação submersa.

Meio Fermentativo	Tempo de fermentação (U mL^{-1})			
	24h ^c	48h ^b	72h ^a	96h ^d
	Rotacionada (120 rpm)^C			
Composição 3A	1,21±1,0a	1,22±1b	2,44±1,5a	0,92±1,0a
Composição 4B	0,67±0,8b	1,55±1a	1,14±1,6b	0,89±0,8b
	Estática (0 rpm)^B			
Composição 3	1,52±1c	2,41±1,5b	4,55±2,1a	5,76±2,3a
	Semiestática (48h: 0 rpm/ 18h: leve agitação/6h: 0 rpm)^A			
Composição 3	3,16±1,7c	7,95±2,8b	9,48±3a	7,88±2,8b

[022] Teste de Scott-Knott e Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados seguidos das letras minúsculas representam a análise do meio de cultura; as letras sobrescritas minúsculas representam a análise do tempo; as letras sobrescritas maiúsculas em negrito representam a análise do tipo de fermentação realizada.

[023] Para alcançar o resultado da composição do meio de cultura nutritivo proposto, uma série de otimização do meio foi realizada. A literatura indica realizar a

fermentação em meio de cultura com substratos que irão induzir o microrganismo a produzir a enzima, isto nos leva a composições complexas e exige o uso de indutores comerciais que sejam usados como fonte de quitina, elevando consideravelmente o custo de produção, além do microrganismo não apresentar produção enzimática notável.

[024] Diante disso, foi iniciado o processo de otimização de produção, com testes de diferentes componentes nutricionais na composição do meio. Para isto, foram realizados delineamentos utilizando modelos estatísticos de design experimental, com 27 ensaios em diferentes formulações e concentrações dos compostos. Todos realizados em condições semiestáticas durante 72 horas, em pH neutro a 30° C. A Tabela 3 expõe a matriz das nove composições utilizadas nos primeiros 16 ensaios.

[025] Tabela 3. Matriz de composição de meio nutritivo para otimização da produção de quitinase pelo fungo *Curvularia lunata* URM6861.

Meio Fermentativo	Composição
Composição 1	Quitina coloidal, Quitina em pó, ácido linoleico, Sacarose e nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃), fosfato de potássio monobásico (K ₂ HPO ₄).
Composição 2	Quitina coloidal, quitina em pó, ácido linoleico, sacarose e sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7 H ₂ O).
Composição 3	Quitina em pó, ácido linoleico, sacarose, nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃), fosfato de potássio monobásico (K ₂ HPO ₄)
Composição 4	Quitina coloidal, quitina em pó, ácido linoleico, sacarose e nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃).
Composição 5	Quitina coloidal, quitina em pó, ácido linoleico, sacarose, sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7 H ₂ O), nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃), fosfato de potássio monobásico (K ₂ HPO ₄).
Composição 6	Quitina coloidal, quitina em pó, ácido linoleico, sacarose, sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7 H ₂ O), nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃).
Composição 7	Quitina em pó, ácido linoleico, sacarose, sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7 H ₂ O), nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃), fosfato de potássio monobásico (K ₂ HPO ₄).
Composição 8	Quitina em pó, ácido linoleico, sacarose, nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃), fosfato de potássio monobásico (K ₂ HPO ₄).
Composição 9	Quitina em pó, ácido linoleico, sacarose e nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃).

[026] Nos resultados obtidos, de acordo com análises estatísticas, sacarose, nitrato de amônio, sulfato de magnésio e fosfato de potássio monobásico, foram os

compostos do meio fermentativo que apresentaram os melhores rendimentos na produção enzimática, ou seja, quanto maior a concentração desses compostos no meio e menor a quantidade de indutor à base de quitina, melhor a produção enzimática.

[027] Para chegar à formulação do meio nutritivo proposto, um novo design experimental utilizando 11 ensaios, com ausência de indutores de fonte de quitina foi realizado em condições semiestáticas durante 72 horas. A Tabela 4 expõe as formulações e os resultados obtidos.

[028] Tabela 4. Matriz dos parâmetros utilizados para a otimização da produção de quitinase.

Ensaio	Composição em g L ⁻¹				(U mL) ⁻¹
	Sacarose	NH ₄ NO ₃	MgSO ₄	K ₂ HPO ₄	
1e	8,0	0,242	0,5	0,5	14,45
2Aa	16,0	0,242	0,5	0,5	31,66
3e	16,0	0,5	0,5	0,5	14,40
4Aa	16,0	0,5	0,5	0,5	32,17
5f	6,20	0,374	0,5	0,5	9,37
6a	17,6	0,374	0,5	0,5	32,56
7d	12,0	0,198	0,5	0,5	22,26
8c	12,0	0,55	0,5	0,5	24,18
9b	12,0	0,374	0,5	0,5	24,89
10c	12,0	0,374	0,5	0,5	22,26
11b	12,0	0,374	0,5	0,5	28,03

[029] ¹ – Atividade de quitinase. Teste de Tukey a 5%. As letras em minúsculo indicam o melhor resultado; a letra em maiúscula indica o melhor meio de produção para quitinase. Os resultados seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

[030] Para a validação dos parâmetros a serem estabelecidos como a concentração ideal dos compostos do meio nutritivo, um ensaio adicional foi realizado utilizando os mesmos compostos apresentados na Tabela 4, em concentrações de 19% por L⁻¹ de sacarose e 0,290% por L⁻¹ de nitrato de amônio, 0,5% por L⁻¹ de fostato de potássio monobásico e 0,5% por L⁻¹ sulfato de magnésio, onde o resultado obtido na produção enzimática foi de 41,48 U mL⁻¹, um aumento de 437% na produção de quitinase em um meio de cultura nutritivo sem o uso de substrato de quitina como indutores.

[031] Diante do descrito, propõe-se o estabelecimento do seguinte processo de fermentação submersa para a produção de quitinase: Um volume preferencial de 4% (por litro de meio fermentativo) da suspensão de esporos e micélios utilizado como padrão para a fermentação em meio nomeado como AHM, composto por 19% por L⁻¹ de sacarose, 0,290% por L⁻¹ de nitrato de amônio, 0,5% por L⁻¹ de fostato de potássio monobásico e 0,5% por L⁻¹ sulfato de magnésio, em pH neutro à 30 °C, durante 72 horas em condições semiestáticas, 48 horas em condições estáticas, 18 horas sob leve agitação e 6 h em condições estáticas. Para obtenção do extrato bruto, o líquido fermentado deverá ser centrifugado em rotação rigorosa de 12,000 xg por 10 minutos, em temperatura de resfriamento e o sobrenadante considerado como extrato enzimático bruto.

[032] Preferencialmente é possível a utilização industrial do extrato enzimático bruto. Entretanto é possível também a sua purificação por metodologias que utilizam precipitação em acetona 70%, cromatografia em coluna DEAE-celulose e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Exemplo 1: Avaliação do tempo de crescimento e viabilidade do fungo *Curvularia lunata* URM686 para uso em fermentação submersa

[033] Foi realizada uma avaliação da viabilidade da cultura fúngica em três intervalos de tempo. O cultivo do fungo após sete dias indicou declínio na produção, como pode ser observado na Tabela 5.

[034] Tabela 5. Resultados da produção de quitinase pelo fungo *Curvularia lunata* URM686 obtida no tempo de cultivo de 5, 7 e 10 dias em 72 horas de fermentação.

Tempo de Crescimento	Atividade Enzimática U mL ⁻¹
5 dias	34,869a
7 dias	37,109Aa
10 dias	18,828b

Exemplo 2: Produção e determinação da enzima quitinase em fermentação submersa por *Curvularia lunata* URM6861

[035] A composição do meio elaborado em laboratório proporcionou a obtenção de 41,48 U mL⁻¹ de atividade enzimática, um aumento de 437% na produção em relação aos ensaios realizados utilizando métodos descritos em literatura, que empregam substratos de quitina como indutores, a produção máxima obtida com esses métodos foi de 9,48 U mL⁻¹. Os métodos preconizados na literatura geralmente utilizam substratos indutores comerciais como, quitina em pó proveniente da carapaça de camarão ou caranguejo, quitina coloidal preparada a partir da quitina comercial, numerosas substâncias químicas como nitrato de sódio, fostato de potássio monobásico, sulfato de magnésio, sulfato ferroso, sacarose. O meio elaborado, denominado AHM, foi composto apenas por sacarose, nitrato de amônio, fostato de potássio monobásico e sulfato de magnésio, sem a necessidade do uso de indutores como a quitina.

Exemplo 3: Caracterização do extrato enzimático bruto da quitinase produzida por *Curvularia lunata* URM6861

[036] O metabólito produzido pelo microrganismo utilizado *Curvularia lunata* URM6861 apresentou parâmetros bastante atraentes. Para avaliar a influência da temperatura sobre a atividade enzimática, foi realizada a determinação da mesma em diferentes temperaturas (10-100 °C), por 30min, e o pH ótimo foi determinado utilizando-se diferentes tampões a 0,2M: fosfato de sódio, Tris-HCl e carbonato-bicarbonato no intervalo de pH entre 3,0 a 11,0.

[037] Para determinar estabilidade da enzima em relação à temperatura, o extrato enzimático, foi incubado em temperaturas de 20 a 90 °C, durante 2 horas, onde a atividade não foi influenciada. Diante disto, para verificar o nível de estabilidade às temperaturas elevadas, um ensaio adicional à 80 °C foi realizado durante 96 horas. Para verificar a estabilidade ao pH, o extrato foi incubado em meio ácido a alcalino (pH 3,0-11,0), a temperatura de 26 °C por 2 horas e logo em seguida, avaliada a atividade enzimática.

[038] Os efeitos de íons metálicos e inibidores da atividade da quitinase, foram testados por incubação do extrato enzimático contendo diferentes duas concentrações (1% e 5%) de Triton X-100, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), dimetilsulfóxido (DMSO), β -mercaptoetanol e incubados a 26 °C por 30 min. Para determinar o efeito de íons metálicos na atividade da quitinase, o extrato enzimático foi incubado na presença de cada metal (zinco, magnésio, manganês, ferro, potássio, cobre, cobalto, níquel, mercúrio, bário e chumbo) em duas concentrações (5,0 e 10 mM), a temperatura de 26 °C durante 1 hora. Em seguida, a atividade enzimática foi avaliada.

[039] Todos os ensaios foram realizados em triplicata e submetidos ao teste estatístico de variância ANOVA.

[040] A atividade enzimática mais elevada (100%) foi obtida nos ensaios de efeito de temperatura a 80 °C. A quitinase produzida por *Curvularia lunata* URM6861 também possui uma ótima atividade entre as temperaturas de 30 e 70 °C, onde a atividade manteve-se constante (83-85%). O pH ligeiramente ácido (5,0) foi observado como ótimo para a atividade enzimática. No entanto, os resultados analisados identificaram uma ampla faixa de pH (5,0-8,0) onde a atividade enzimática permanece constante, o que viabiliza seu uso em processos industriais diversos.

[041] O extrato enzimático foi estável entre um bom intervalo de temperatura (40 a 80 °C). Em análises realizadas por um período de 96 horas a temperatura de 80 °C, observou-se uma ótima estabilidade até 72 horas. A diminuição da atividade enzimática foi iniciada a partir de 96 horas, com perda de cerca de 20% da atividade enzimática inicial. Enzimas termoestáveis são importantes potenciais para usos industriais. A estabilidade ao pH durante 2 horas de incubação, o extrato enzimático perdeu apenas

10% de atividade em pH 3,0, 40% em pH 11,0, sendo estável em pH ligeiramente ácido e apresentou aumento da atividade em pH ligeiramente alcalino.

[042] A atividade enzimática foi diminuída em 30% na presença de zinco na concentração de 5 mM e um aumento de 85% da atividade enzimática na presença de ferro. Para o efeito dos inibidores de atividade enzimática, Triton X-100 a 5% diminuiu a atividade enzimática em cerca de 20% e EDTA em 10%.

[043] O método descrito na presente invenção possibilita a produção e obtenção da enzima quitinase com diminuição de custos a partir do fungo *Curvularia lunata* URM6861. Os resultados e características indicam uma quitinase de interesse industrial devido as vantagens e aplicabilidade de uma enzima resistentes à altas temperaturas de baixo custo de produção.

REIVINDICAÇÕES

1. “MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELA ESPÉCIE *CURVULARIA LUNATA* URM6861” **caracterizado pelo fato** que estabelece uma composição de substrato nutricional composto por sacarose, nitrato de amônio, fostato de potássio monobásico e sulfato de magnésio em pH neutro e metodologia de fermentação submersa conduzida em temperatura controlada com etapas estática, sob leve agitação e estática para produção e obtenção de quitinase fúngica utilizando o fungo *Curvularia lunata* URM6861.
2. “MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELA ESPÉCIE *CURVULARIA LUNATA* URM6861”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** processo metodológico de fermentação submersa semiestática conduzida em temperatura preferencialmente de 30 °C por 72 horas, onde estas estão divididas em 48 horas em condições estáticas, 18 horas sob leve agitação e 6 h em condições estáticas.
3. “MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELA ESPÉCIE *CURVULARIA LUNATA* URM6861”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** da obtenção de um produto bioativo termoestável produzido e obtido a partir do fungo *Curvularia lunata* URM6861 com a utilização da metodologia reivindicada.

RESUMO

“MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE QUITINASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELA ESPÉCIE *CURVULARIA LUNATA* URM6861”.

Esta invenção estabelece uma composição de substrato nutricional sem a utilização de indutores quitinilóticos comerciais e descreve uma metodologia para a produção e obtenção da enzima quitinase produzida pelo fungo *Curvularia lunata* URM6861 em fermentação submersa semiestática. Tendo essa metodologia apresentando eficiência em relação à capacidade de produção elevada da enzima quitinase, resultando em um metabólito com características termoestáveis e metal-compatível, tendo assim, potencial para a aplicação em diversos campos industriais.