ISSN: 2594-6153

Utilização de resíduos da indústria pesqueira e têxtil na produção de quitinases por *Aspergillus niveus* em fermentação submersa e em estado sólido

Pedro Henrique de Oliveira Ornela[1], Luís Henrique Souza Guimarães[1,2]

[1]Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" – UNESP – Araraquara, SP
[2]Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP-USP – Ribeirão Preto, SP

E-mail: phornela@gmail.com

Resumo: O uso de resíduos industriais para produção de produtos de valor agregado é de grande interesse, pois estes são descartados no meio ambiente, poluindo-o. Dentre esses produtos, as quitinases, que têm a capacidade de clivar quitina, têm destaque quanto sua aplicação biotecnológica. Neste contexto, o fungo *A. niveus* foi capaz de produzir quitinases utilizando resíduos da indústria pesqueira e têxtil em fermentação submersa (FSbm) e em estado sólido (FES). Os resíduos de camarão cinza e crisálida de bicho-da-seda propiciaram as maiores produções de quitinases em FSbm (0,14 U mL^{-1}) e FES (6,51 U g^{-1} de substrato), respectivamente, após 96 h de cultivo. Assim, demonstrou-se o potencial do uso de resíduos industriais na produção de quitinases, reduzindo o impacto ambiental que estes causariam.

Palavras-chave: *Aspergillus*; Fermentação em estado sólido; Fermentação submersa; Quitinase; Resíduos industriais.

Use of fishing and textile industry residues in the production of chitinases by *Aspergillus niveus* in submerged and solid-state fermentation

Abstract: The use of industrial waste for production of value-added products is of great interest, as these are discarded in the environment, polluting it. Among these products, chitinases, which have ability to cleave chitin, stand out in terms of their biotechnological application. In this context, the fungus *A. niveus* was able to produce chitinases using residues from the fishing and textile industry in submerged (SbmF) and in solid-state fermentation (SSF). The residues of gray shrimp and silkworm chrysalis provided the highest chitinases production in SbmF (0.14 U mL^{-1}) and SSF (6.51 U g^{-1} of substrate), respectively, after 96 h of cultivation. Thus, the potential of using industrial residues in the production of chitinases was demonstrated, reducing the environmental impact they would cause.

Keywords: *Aspergillus*; Chitinase; Industrial waste; Solid-state fermentation; Submerged fermentation.

Introdução

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante no planeta. No entanto, apesar de sua grande disponibilidade, a quitina permanece relativamente subaproveitada. Esse polissacarídeo, que constitui pelo menos 70% do peso seco de mariscos e pupa de insetos, é incinerado e descartado em aterros, poluindo a atmosfera e os lençóis d'água subterrâneos [1].

Assim, os resíduos industrias constituídos de quitina, como os gerados pela indústria

pesqueira e têxtil, necessitam de alternativas para seu uso, por exemplo, como substratos em processos fermentativos para a produção de enzimas por microrganismos, destacando-se os fungos filamentosos. Dentre as enzimas microbianas, as quitinases merecem destaque devido seu potencial biotecnológico, podendo ser aplicadas em diferentes áreas, como na medicina, na agricultura, nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Ainda podem ser utilizadas como bioinseticidas. As quitinases (EC 3.2.1.29) são glicosilhidrolases capazes de clivar as ligações β-1,4 entre as unidades de N-acetilglicosaminas da quitina [2]. A produção destas enzimas por fungos filamentosos pode ser obtida utilizando a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FSbm). A FES é realizada em substratos sólidos como madeira, palha e outros resíduos florestais ou subprodutos agrícolas, e a FSbm, mais comumente utilizada no âmbito industrial, é conduzida em meio líquido suplementado com uma fonte de carbono, como os resíduos industriais.

Objetivos

Utilizar os resíduos da indústria pesqueira e têxtil na produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em FSbm e em FES..

Material e Métodos

Produção de quitinases em fermentação submersa (FSbm)

As FSbm foram realizadas com 25 mL de meio Mínimo - MM [3], com pH inicial 6,0, acrescidos de 1% (m/v) de resíduos da indústria pesqueira, como cascas e cabeças de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) e de camarão cinza (*Litopenaeus vannamei*), secas e não trituradas, ou de resíduos da indústria têxtil, como crisálidas de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) secas, trituradas ou em pó. Os meios foram autoclavados e inoculados com 10^6 esporos mL^{-1} do fungo *A. niveus*. Depois, os cultivos foram conduzidos a 30 ºC sob agitação de 100 rpm por diferentes períodos de tempo (24-144 horas). Após o período de incubação, os cultivos foram filtrados a vácuo com papel filtro, obtendo-se o filtrado livre de células, que foi utilizado para determinação da atividade quitinásica extracelular.

Produção de quitinases em Fermentação em Estado Sólido (FES)

As FES foram preparadas com 2,5 gramas de crisálidas de bicho-da-seda trituradas, cascas e cabeças de camarão-rosa e de camarão cinza. A fermentação foi conduzida utilizando-se água destilada na proporção de 1:1 (m/v) como agente umectante. Prontamente,

os meios foram autoclavados e inoculados com suspensão de esporos contendo 10^6 esporos mL^{-1} de *A. niveus*. Em seguida, os cultivos foram incubados em estufa a 30 ºC por diferentes períodos (24-144 h). Após os tempos de fermentação, foi adicionado 50 mL de água destilada e agitados para extração de quitinases. Posteriormente, os conteúdos foram filtrados a vácuo com papel de filtro. O filtrado foi utilizado para determinação da atividade quitinásica.

Determinação da atividade quitinásica

A determinação da atividade quitinásica foi realizada utilizando-se 1 mmol L^{-1} do substrato sintético 4-nitrofenil-β-D-N-acetilglucosamina (ρNP-GlcNAc) (Sigma®) em tampão McIlvaine, pH 5,6. A mistura de reação foi mantida a 65 ºC. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de substrato por minuto, nas condições de ensaio.

Resultados e discussão

Analisando a Figura 1A, pode-se observar que a maior produção quitinásica em FSbm (0,14 U mL^{-1}) foi obtida no tempo de cultivo de 96 h, utilizando cascas e cabeças de camarão cinza como substrato, seguida pela produção obtida com a utilização de cascas e cabeças de camarão rosa (0,12 U mL^{-1}) no mesmo período. Com relação a produção de quitinase em FES, é possível observar na Figura 1B, que a maior produção enzimática foi obtida na presença de crisálidas trituradas com 96 h de cultivo (6,51 U g^{-1} de substrato), seguida pela obtida com o uso do camarão cinza, no mesmo período (4,03 U g^{-1} de substrato).

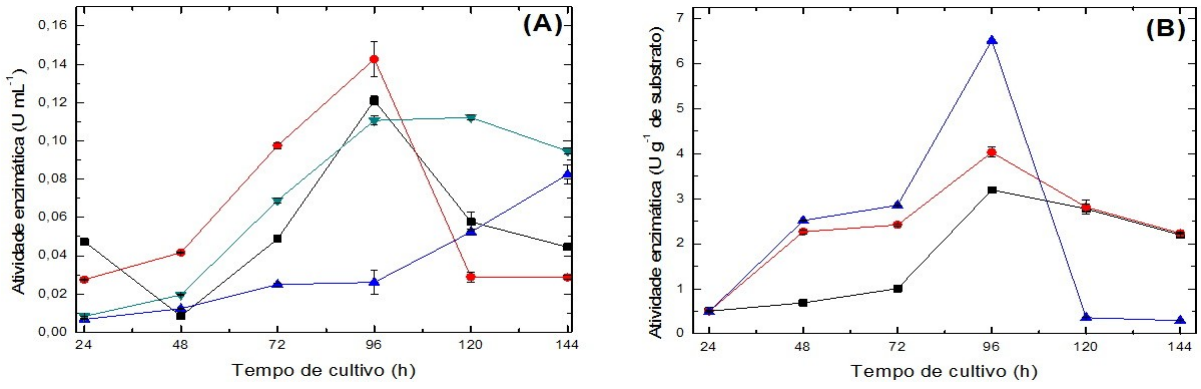


Figura 1. Influência de diferentes substratos e tempos de cultivo na produção de quitinases por *A. niveus* em FSbm (A) e em FES (B). Símbolos: (■) Camarão rosa; (●) Camarão cinza; (▲) Crisálida triturada; (▼) Crisálida em pó.

As quitinases fúngicas são proteínas produzidas na presença de um indutor. Quando há quitina no meio ocorre a produção de quitinases pelo fungo, uma vez que, o microrganismo utiliza esse biopolímero como fonte de carbono [4]. Com base nisso, foram testadas as cascas de camarão e crisálidas de bicho-da-seda como fontes de carbono, pois pelo menos 70% do peso seco destes materiais é constituído de quitina [5, 6]. O tempo de cultivo de um microrganismo influencia diretamente em sua produção enzimática. Em um período de cultivo muito curto, o microrganismo encontra-se na fase de crescimento vegetativo; já em um período muito longo, pode ocorrer um declínio da produção enzimática devido, por exemplo, a escassez de nutrientes [7].

Outros autores relataram a produção de quitinase em FSbm utilizando resíduos agroindustriais como fontes de carbono. Brzezinska e Jankiewicz 2012 [8] cultivaram o fungo *A. niger* LOCK 62 por 144h em meio contendo cascas de camarão, enquanto Alves et al. 2018 [9] descreveram a produção dessa enzima por *A. niveus* com cultivo de 192 h utilizando quitina de casca de caranguejo.

O substrato crisálida em pó não foi utilizado na FES, uma vez que sua granulometria bastante reduzida proporcionaria sua compactação, impedindo que o fungo utilizasse a fonte de carbono eficientemente, resultando em seu baixo crescimento [10]. O uso de diferentes substratos tem sido reportado para produção de quitinase em FES. Thadathil et al. 2014 [11] utilizaram o farelo de trigo suplementado com caldo de camarão feito a partir do processamento das cascas, da cabeça e do corpo deste crustáceo, para indução da produção de quitinases pelos fungos *A. flavus* CFR 10 e *Fusarium oxysporum* CFR 8 com tempo de cultivo de 190 h. Rustiguel et al. 2012 [12] utilizaram crisálida seca de bicho-da-seda para produção de quitinase pelo fungo *Metarhizium anisopliae* em FES com tempo de cultivo de 9 dias. É possível observar que os tempos de cultivo em FSbm e FES foram relativamente superiores aos identificados neste trabalho, destacando a importância da pesquisa em questão, pois as indústrias buscam microrganismos que possam produzir enzimas em alta concentração em menor tempo possível, otimizando, assim, o processo de obtenção das enzimas.

Conclusões

O uso de resíduos da indústria pesqueira e têxtil foi eficiente para a produção de quitinases por *A. niveus* em tempos relativamente curtos de fermentação, menores do que os relatados na literatura. Adicionalmente, o uso desses resíduos poderia reduzir o custo da

produção desta enzima e, eventualmente, diminuir o impacto ambiental decorrente do descarte destes resíduos no ambiente.

Agradecimentos: Os autores Pedro Henrique de Oliveira Ornela e Luís Henrique Souza Guimarães agradecem o apoio das agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) durante o desenvolvimento deste estudo.

Referências

1. Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. Afric. J. Biotechnol. 2006; 5:54-72.
2. Barretto IKSP, Assis SA, Junior GLY. Caracterização da enzima quitinase produzida pela levedura *Pseudozyma* sp. CCMB 300. In: Seminário de Iniciação Científica XV - SEMIC. Sessão V: Ciências da Saúde 2011.
3. Hill TW, Kafer E. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. Fungal Genet. Newslet. 2001; 48:20-21.
4. Haran S, Schickler H, Oppenheim A, Chet I. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. Mycol. Res. 1995; 99:441-446.
5. Paulino AT, Simionato JI, Garcia JC, Nozaki J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. Carbohydr. Polym. 2006; 64(1):98-103.
6. Al Sagheer FA, Al-Sughayer MA, Muslim S, Elsabee MZ. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. Carbohydr. Polym. 2009; 77(2):410-419.
7. Pelczar MJJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Markron Books, 1996.
8. Brzezinska MS, Jankiewicz U. Production of chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its potential role in the biological control. Curr. Microbiol. 2012; 65:666-672.
9. Alves TB, De Oliveira Ornela PH, De Oliveira AHC, Jorge JA, Guimarães LHS. Production and characterization of a thermostable antifungal chitinase secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niveus* under submerged fermentation. 3 Biotech 2018; 8(8):369.
10. Mitchell DA, Berovic M, Krieger N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. Adv. Biochem. Eng. Biotech. 2000; 68:61-138.
11. Thadathil N, Kuttappan AKP, Vallabaipatel E, Kandasamy M, Velappan SP. Statistical optimization of solid state fermentation conditions for the enhanced production of thermoactive chitinases by mesophilic soil fungi using response surface methodology and their application in the reclamation of shrimp processing by-products. Ann. Microbiol. 2014; 64(2):671–681.
12. 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; 2:268–276.