

Utilização de resíduos da indústria pesqueira do camarão na produção de quitinases pelo fungo *Aspergillus niveus* em fermentação em substrato sólido

Utilization of shrimp fishing industry waste in the production of chitinases by the fungus *Aspergillus niveus* in solid-state fermentation

DOI:10.34117/bjdv8n5-081

Recebimento dos originais: 21/03/2022

Aceitação para publicação: 29/04/2022

Pedro Henrique de Oliveira Ornela

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituição: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Araraquara/SP, Brasil
E-mail: phornela@gmail.com

Luis Henrique Souza Guimarães

Doutor em Biologia Comparada pela Universidade de São Paulo (USP)
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto/SP, Brasil
E-mail: lhguimaraes@ffclrp.usp.br

RESUMO

A quitina é um biopolímero presente nos exoesqueletos dos artrópodes e nas paredes celulares fúngicas, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante no planeta. Contudo, sua utilização com a finalidade de obtenção de produtos com maior valor agregado ainda é reduzida. Resíduos ricos em quitina produzidos pela indústria pesqueira de camarão podem ser aproveitados ao invés de serem descartados no meio ambiente. A hidrólise enzimática da quitina utilizando quitinase permite a obtenção de produtos de maior valor agregado. Com base nisso, o objetivo foi encontrar as melhores condições de cultivo para a produção de quitinase por *Aspergillus niveus* utilizando resíduos de camarão-de-sete-barbas em fermentação em substrato sólido (FSS). O uso de 2 g de cascas de camarão com dimensões de 2-5 mm² como substrato proporcionou a maior produção quitinásica (4,8 U g de substrato⁻¹) em 144 h de cultivo. A água de torneira na proporção de 1:2 (m/v) foi o melhor agente umectante para a produção enzimática. A maior atividade da quitinase foi obtida em pH 5,0 a 65°C. Concluindo, o uso de cascas de camarão é uma boa alternativa para a produção de quitinases por *A. niveus* em FSS, indicando um possível uso deste biomaterial, minimizando, assim, o impacto ambiental decorrente do seu descarte.

Palavras-chave: quitinase, fungo filamentososo, fermentação em substrato sólido, casca de camarão.

ABSTRACT

Chitin is a biopolymer present in arthropod exoskeletons and fungal cell walls, being it the second most abundant polysaccharide on the planet. However, its use for the purpose of obtaining products with greater added value is still limited. Chitin-rich waste produced by the shrimp fishing industry can be better disposed of than discarded into the

environment. The enzymatic hydrolysis of chitin using chitinase allows obtaining products with greater added value. Based on this, the objective was to find the best growing conditions for the production of chitinase by *Aspergillus niveus* using residues of seven-bearded shrimp in solid-substrate fermentation (SSF). The use of 2 g of shrimp shells with dimensions of 2-5 mm² as substrate provided the highest chitinase production (4.8 U g of substrate⁻¹) in 144 h of cultivation. Tap water at a ratio of 1:2 (w/v) was the best moistening agent for enzyme production. The highest chitinase activity (4.8 U g of substrate⁻¹) was obtained at pH 5.0 at 65°C. In conclusion, the use of shrimp shells, waste from the fishing industry, is a good alternative for the production of chitinases by *A. niveus* in SSF, indicating an alternative path to the use of this biomaterial, thus minimizing the environmental impact resulting from its disposal.

Keywords: chitinase, filamentous fungus, solid-state fermentation, shrimp shell.

1 INTRODUÇÃO

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante no planeta, estando presente, principalmente, nos exoesqueletos de artrópodes e nas paredes celulares fúngicas (GUERRERO-RODRÍGUEZ et al., 2021). No entanto, apesar de sua grande biodisponibilidade e seu potencial biotecnológico, a quitina permanece subaproveitada (ZHANG et al., 2021). A hidrólise enzimática com o uso de quitinases é uma das alternativas para obtenção de produtos de maior valor agregado a partir deste substrato.

As quitinases (EC 3.2.1.29) são glicosilhidrolases capazes de clivar especificamente as ligações β -1,4 entre as unidades de N-acetilglicosaminas da quitina (STOYKOV; PAVLOV; KRASTANOV, 2015). Os principais produtores dessa enzima são os organismos que possuem quitina no seu exoesqueleto, como insetos e crustáceos, ou na parede celular, como fungos e algas, entre outros (GUERRERO-RODRIGUEZ et al., 2021; QUEIROZ; DE SOUSA, 2020).

De forma geral, as quitinases podem ser aplicadas na agricultura, por exemplo, no controle de fitopatógenos e pragas herbívoras, uma vez que os insetos e fungos possuem quitina em sua estrutura (OYELEYE; NORMI, 2018). Podem ser utilizadas ainda no tratamento de resíduos industriais ricos em quitina, como cascas de camarão, caranguejo e lagosta, obtendo um produto de maior valor agregado e minimizando o impacto ambiental que esses resíduos causariam (OYELEYE; NORMI, 2018), e na produção de quito-oligossacarídeos, açúcares que podem ser utilizados como aditivo alimentar para diabéticos, já que não são metabolizados pelo sistema digestório humano. Além disso, possuem ação antitumoral, antioxidante e podem ser empregados como adjuvantes no tratamento de doenças de pele (DE ÁVILA FILHO et al., 2020).

A produção e aplicação de enzimas microbianas, em especial as produzidas por fungos filamentosos, é vantajosa, uma vez que sua produção independe de fatores sazonais. Além disso, podem ser produzidas utilizando substratos de baixo custo como, por exemplo, resíduos agrícolas gerados na plantação de cana-de-açúcar, trigo, arroz, entre outros, e resíduos da indústria pesqueira, como aqueles provindos do camarão, da lagosta e do caranguejo (QUEIROZ; DE SOUSA, 2020; HAJJI et al., 2014), principalmente utilizando a tecnologia de fermentação em substrato sólido (FSS).

A FSS tem como vantagem a ausência de formação de espuma, menor demanda de energia, simplicidade do meio e facilidade no controle de contaminação, proporcionada pela ausência de água livre no cultivo. A produção de enzimas por fungos filamentosos utilizando FSS tem sido reportada por diferentes autores. Por exemplo, estudos mostram que fungos como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamari*, *Aspergillus ficuum* e *Trichoderma harzianum* são potenciais produtores de protease, xilanase, pectinase, fitase e celulase em FSS (ARORA et al., 2018; ŠELO et al., 2021). A produção de quitinases por fungos também tem sido avaliada utilizando a FSS como, por exemplo, para *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 (BALDONI et al., 2020), *Metarhizium anisopliae* IBCB 348 (AITA et al., 2019) e *Trichoderma virens* (RACHMAWATY et al., 2018), entre outros.

De acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de quitinases pelo fungo filamentoso *Aspergillus niveus* utilizando resíduos da indústria pesqueira, especificamente as cascas de camarão-de-sete-barbas, como substratos na FSS, tendo em vista que este fungo já teve seu potencial de produção de quitinases observado em fermentação submersa (ALVES et al., 2018).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO

O fungo filamentoso *A. niveus*, armazenado na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP - USP foi mantido em meio BDA (batata-dextrose-ágar), previamente autoclavado a 120 °C por 30 min. As culturas foram mantidas a 30 °C por até 7 dias e, em seguida, armazenadas em geladeira a 4 °C até o uso.

2.2 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS CASCAS E CABEÇAS DE CAMARÃO

As cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) foram cedidas por microempreendedores na venda de crustáceos localizados no “Mercadão Central” na cidade de Ribeirão Preto/SP. Após recepção destes substratos, estes foram lavados com água de torneira corrente. Posteriormente, as cascas e cabeças de camarão-de-sete-barbas foram colocadas em estufa de circulação de ar a 50 °C por 48 h para secar. Após esse tempo, foram trituradas com o auxílio de graal e pistilo e/ou manualmente até as partículas terem tamanho menor que 1 mm², entre 1 e 2 mm², e entre 2 e 10 mm², mensuradas com auxílio de peneiras com os poros nos respectivos tamanhos, sendo armazenadas a temperatura ambiente, em recipientes de vidro hermeticamente fechados, até o uso.

A desproteíntização das cascas de camarão-de-sete-barbas foi realizada por fervura em água destilada ou imersão em hidróxido de sódio (1 mol L⁻¹) por até 2 h, ambos adicionados na proporção de 15 mL g⁻¹ de substrato. Após diferentes tempos de tratamento, os substratos foram filtrados com o auxílio de uma bomba a vácuo e lavados com água destilada. Em seguida, foram colocados em estufa de circulação de ar a 50 °C para secagem por 48 h.

2.3 CULTIVO EM FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO

Inicialmente, as FSS foram realizadas utilizando de 1 a 5 g de cascas e/ou cabeças de camarão-de-sete-barbas trituradas em diferentes granulometrias (menor que 1 mm², entre 1 e 2 mm², e entre 2 mm² e 10 mm²), e umidificadas, separadamente, com soluções de sais de Khanna (KHANNA; SUNDARI; KUMAR, 1995), de SR (RIZZATTI et al., 2001), de Meio Mínimo (HILL; KAFFER, 2001), de elementos traços (HILL; KAFFER, 2001), água de torneira e água destilada, em diferentes proporções em relação ao substrato (1:0,5 a 1:3 m/v). Prontamente, os meios foram autoclavados a 120 °C por 30 min e, posteriormente, inoculados com uma suspensão de esporos contendo 10⁶ esporos mL⁻¹. Após inoculados, os cultivos foram mantidos a 30 °C por diferentes períodos (24-240 h) em estufa com umidade relativa mantida aproximadamente a 60%, monitorada com o auxílio do termohigrômetro digital.

As culturas provindas da FSS foram fragmentadas manualmente com auxílio de um bastão de vidro, adicionadas de 50 mL de água destilada estéril gelada e agitadas utilizando uma barra magnética a 150 rpm em câmara fria (4 °C) por 30 min para extração de quitinases extracelulares. Posteriormente, os conteúdos foram filtrados a vácuo com

papel de filtro Whatman™ n°1 em funil Büchner e os resíduos retidos foram descartados. O filtrado foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINÁSICA E DO TEOR DE PROTEÍNAS

A determinação da atividade quitinásica foi realizada utilizando-se 1 mmol L⁻¹ do substrato sintético 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina (Sigma-Aldrich®) em tampão McIlvaine, pH 5,6. A mistura de reação foi mantida a 65 °C, e foi interrompida pela adição da solução saturada de tetraborato de sódio em diferentes intervalos de tempo (5 e 10 min). O *p*-nitrofenolato formado foi então submetido à leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 405 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. 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.

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) e expressas em mg de proteína por mL de amostra, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A atividade específica (U mg de proteína⁻¹) foi calculada pela razão entre a atividade enzimática e o teor de proteínas.

2.5 INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE QUITINÁSICA

Para a análise da influência do pH utilizando o tampão McIlvaine (pH 2,0 a 8,0) na atividade quitinásica presente no filtrado bruto fixou-se a temperatura de 65 °C. Para analisar a influência da temperatura na atividade quitinásica as reações enzimáticas foram conduzidas no intervalo de 5 °C a 100 °C em banho-maria, e fixou-se o pH 5,0 utilizando tampão McIlvaine.

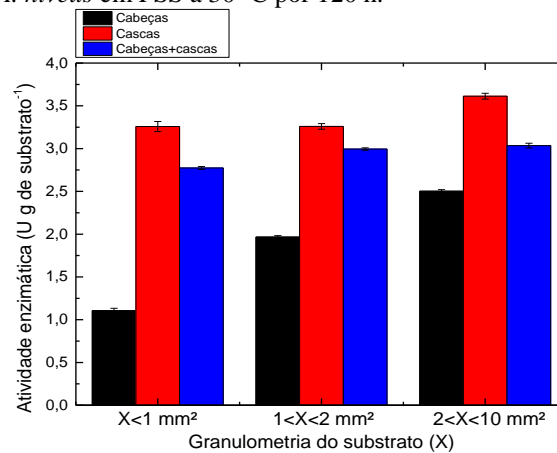
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUBSTRATOS E GRANULOMETRIAS NA PRODUÇÃO QUITINÁSICA EM FSS

A produção de enzimas por microrganismos pode ser afetada por diferentes parâmetros como, por exemplo, o tipo e a granulometria dos substratos usados na FSS. Como pode ser verificado na Figura 1, o maior nível enzimático (3,6 U g de substrato⁻¹) foi obtido com cascas de camarão-de-sete-barbas com granulometria entre 2 mm² e 10 mm². Por outro lado, o uso de cabeças trituradas de camarão como substrato, levou a

menor produção quitinásica, especialmente quando utilizadas partículas menores que 1 mm² (1,1 U g de substrato⁻¹). Os cultivos contendo a mistura de cabeças e cascas de camarão-de-sete-barbas na proporção (1:1; m/m), proporcionaram valores intermediários de produção enzimática.

Figura 11. Influência da granulometria e do tipo de substrato proveniente do camarão-de-sete-barbas na produção quitinásica por *A. niveus* em FSS a 30 °C por 120 h.



O tamanho e a morfologia da partícula do substrato sólido são importantes para que o processo fermentativo ocorra de maneira eficiente, pois afetam diretamente a área superficial disponível para o ataque enzimático, assim como o volume do frasco ocupado pelas partículas e o tamanho dos espaços entre elas (ARORA et al., 2018). Partículas muito pequenas, por mais que ofereçam maior área superficial, podem resultar na compactação do meio, interferindo na respiração microbiana (ARORA et al., 2018). Com a compactação do meio, o fungo não consegue adentrar em níveis inferiores do substrato, utilizando apenas os nutrientes/substrato presentes na superfície do meio fermentativo (SUGAI-GUÉRIOS et al., 2015). Por outro lado, quando utilizadas partículas maiores, há maior espaço entre elas, facilitando a aeração. Além disso, o fungo tem maior acesso às camadas inferiores do substrato (ARORA et al., 2008). Estes fatos, possivelmente, explicam a menor produção enzimática nos meios com partículas menores.

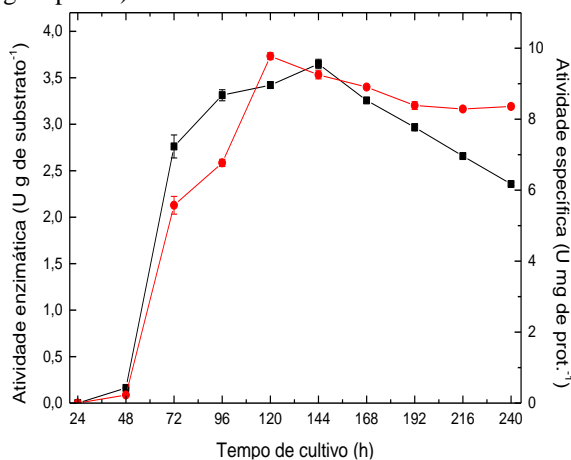
É possível observar também que nos meios contendo cabeças de camarão, a produção enzimática foi reduzida, o que pode ser explicado pelas altas concentrações de proteína encontradas na parte interna das cabeças deste animal, o que pode ter induzido a produção de proteases pelo fungo *A. niveus*, que então atuaram hidrolisando as quitinases. Além disso, as proteínas são de mais fácil utilização pelo microrganismo do que as

quitinas. Assim, padronizou-se o uso das cascas de camarão-de-sete-barbas com fragmentos entre 2 e 10 mm².

3.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO QUITINÁSICA

O tempo de cultivo de 144h (Figura 2) proporcionou a maior produção enzimática utilizando a casca de camarão-de-sete-barbas com granulometria entre 2 e 10 mm² (3,6 U g de substrato⁻¹), seguido pelo cultivo de 120 h (3,4 U g de substrato⁻¹). Em períodos iniciais de cultivo, 24-48 h, a produção quitinásica foi reduzida, aumentando consideravelmente a partir de 72 h. Contudo, após 144 h, a produção quitinásica foi constantemente reduzida, chegando a 2,3 U g⁻¹ de substrato em 240 h de cultivo. A maior atividade específica foi quantificada com 120 h de cultivo (9,8 U mg de prot.⁻¹). A partir de 120 h, a atividade específica da quitinase entrou em declínio, atingindo 8,4 U mg de prot.⁻¹ para cultivos de 240 h.

Figura 2. Influência do tempo de cultivo na produção quitinásica por *A. niveus* em FSS utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas com tamanho de 2 a 10 mm². (■) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (●) Atividade específica (U mg de prot.⁻¹).



Observa-se que atividade enzimática da quitinase foi reduzida nas primeiras horas de cultivo (48 h), o que pode ser justificado, possivelmente, pela necessidade do fungo para produzir todo seu material metabólico (enzimas, aminoácidos, compostos orgânicos, entre outros) frente à condição de cultivo. Neste período de adaptação, provavelmente, o fungo *A. niveus* optou por utilizar fontes de carbono e nitrogênio mais assimiláveis do que a quitina como, por exemplo, as proteínas aderidas na casca de camarão.

Baldoni et al. (2020) obtiveram a máxima produção de quitinases (10,76 U g de substrato⁻¹) por *T. koningiopsis* UFSMQ40 em 72 h de cultivo usando farinha de trigo, quitina coloidal e água de maceração de milho. Aita e colaboradores (2019) identificaram

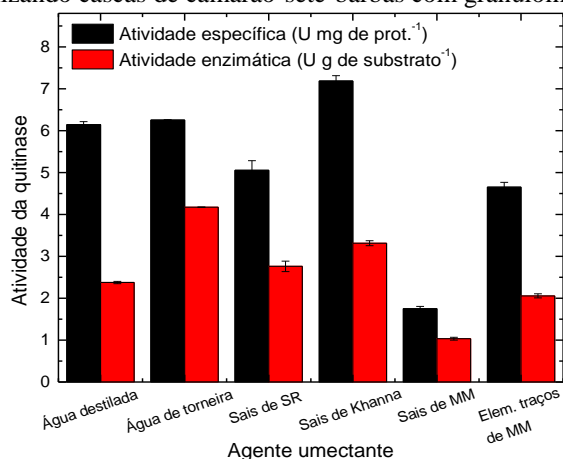
que o melhor tempo de cultivo para produção de quitinases ($9,73 \text{ U g de substrato}^{-1}$) pelo fungo *M. anisopliae* IBCB 348 foi de 192 h com meio adicionado de bagaço de cana-de-açúcar. O tempo de cultivo de 144 h foi determinado como o melhor para máxima produção quitinásica ($0,487 \text{ U g de substrato}^{-1}$) pelo fungo *T. virens* em meio composto por casca de camarão (RACHMAWATY et al., 2018), sendo 7,5 vezes menor do que a obtida neste estudo com o fungo *A. niveus* utilizando o mesmo substrato.

O microrganismo está em fase vegetativa em um cultivo com tempo curto de incubação. Por outro lado, um tempo longo pode prejudicá-lo pela escassez de nutrientes, o que demonstra a importância do tempo de cultivo na FSS (AMORIM et al., 2020). Assim, padronizou-se o tempo de cultivo em 144 h.

3.3 INFLUÊNCIA DO TIPO DE AGENTE UMECTANTE NA PRODUÇÃO QUITINÁSICA

Na Figura 3, é possível observar que a água de torneira propiciou a maior produção enzimática ($4,2 \text{ U g de substrato}^{-1}$), seguida pelos sais de Khanna ($3,3 \text{ U g de substrato}^{-1}$). Por outro lado, a maior atividade específica da quitinase foi obtida no meio umidificado com sais de Khanna ($7,2 \text{ U mg de prot.}^{-1}$) e água de torneira ($6,2 \text{ U mg de prot.}^{-1}$).

Figura 3. Influência de diferentes agentes umectantes na produção de quitinases pelo fungo *A. niveus* em FSS por 144 h a 30°C utilizando cascas de camarão-sete-barbas com granulometria entre 2 e 10 mm^2 .



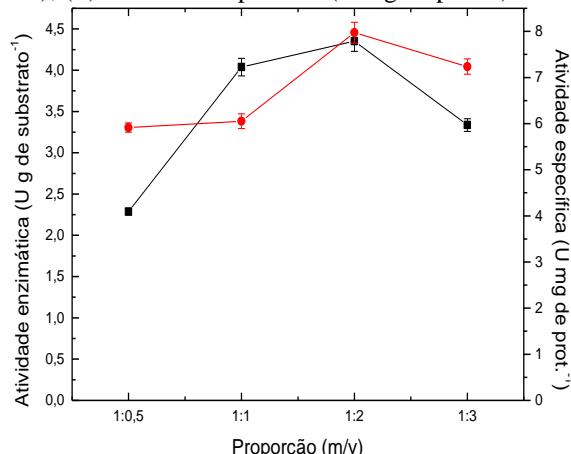
De acordo com a literatura, a presença de fosfato de potássio monobásico e de sulfato de magnésio tem efeito positivo na produção de quitinases, mas, por outro lado, extrato de levedura e peptona causam efeito negativo (YANG; ABDELNABBY; XIAO, 2015). Contudo, a presença de fosfato de potássio monobásico e de sulfato de magnésio

na constituição das soluções de sais SR e do Meio Mínimo, não foi suficiente para obter a maior produção enzimática. Possivelmente, algum outro composto destas soluções causou efeito negativo na produção de quitinases pelo fungo *A. niveus*. Nos sais de Khanna, esses compostos estão presentes em concentrações superiores aos demais meios de cultivo testados, o que pode ter favorecido a maior atividade específica entre os meios estudados.

A água de torneira é uma solução de diferentes compostos em pequenas concentrações, apresentando íons e sais benéficos para o microrganismo e, conseqüentemente, para a produção da enzima. Dentre eles, podemos citar o flúor e cloro (0,6 e 1,3 mg L⁻¹, respectivamente), além de ferro e manganês (ambos na concentração até 15 mg L⁻¹) (DAERP, 2020). O pH da água de torneira também é um fator importante e, normalmente, ele permanece próximo ao neutro (pH 7,0), porém é permitido valores entre 6,0 e 9,5 (DAERP, 2020), sendo o pH 6,4 presente na água utilizada no cultivo. Tais características influenciaram positivamente a produção enzimática pelo fungo, conferindo condições de cultivo favoráveis para o microrganismo e, conseqüentemente, para a produção de quitinases. Assim, a influência de diferentes proporções de água de torneira, usadas para umidificar o substrato, na produção enzimática foi avaliada.

Como é possível observar na Figura 4, a adição de água de torneira na proporção de 1:2 (m/v; umidade do substrato: 65,9%) propiciou a maior produção enzimática (4,3 U g de substrato⁻¹) e a maior atividade específica (7,81 U mg de prot. ⁻¹). Com o uso da proporção de 1:3 (m/v; umidade do substrato: 74,5%) de substrato e agente umectante, houve uma redução na produção enzimática, possivelmente devido ao aumento da umidade do substrato e presença de água livre, descaracterizando o cultivo como uma FSS.

Figura 4. Influência da proporção entre água de torneira e cascas de camarão-de-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm² na produção quitinásica em FSS pelo fungo *A. niveus* por 144 h a 30 °C. (■) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (●) Atividade específica (U mg de prot.⁻¹).

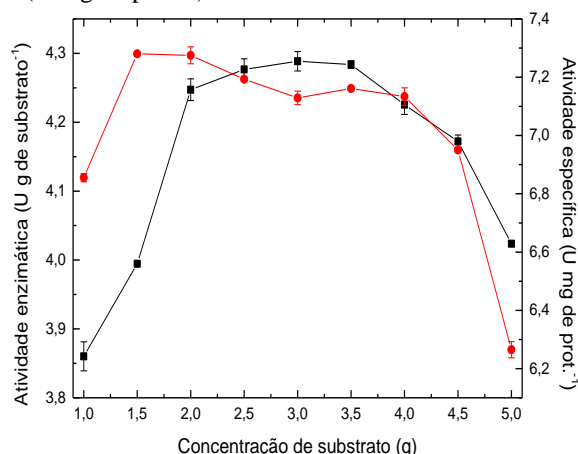


A diminuição da proporção de água de torneira no meio de cultivo da FSS, resultou na menor produção de quitinases. Rachmawaty e colaboradores (2019), relataram a umidade de 54% (m/v) como a melhor para a máxima produção de quitinases por *T. virens*. De acordo com o apresentado, as demais análises seguiram com a utilização de água de torneira na proporção de 1:2 (m/v; substrato: água de torneira).

3.4 INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE SUBSTRATO NO MEIO DE CULTIVO

Analisando a Figura 5 é possível observar que variando a quantidade de substrato no meio de cultivo entre 2 e 4 g, não houve diferença na produção quitinásica, sendo estas as quantidades que propiciaram os maiores valores (4,3 U g de substrato⁻¹). O cultivo com 1 g de substrato proporcionou a menor produção enzimática (3,86 U g de substrato⁻¹). Nos meios com quantidade igual ou superior a 4,0 g, houve redução na produção enzimática.

Figura 5. Influência da quantidade de cascas de camarão-de-sete-barbas com tamanho entre 2 e 10 mm² na FSS por 144 h a 30 °C para produção de quitinase por *A. niveus*. (■) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (●) Atividade específica (U mg de prot.⁻¹).



A explicação para a redução da atividade específica com o aumento da quantidade de cascas de camarão-de-sete-barbas pode ser, possivelmente, em decorrência do aumento de proteínas no meio de cultivo, o que influencia diretamente o seu cálculo. Além disso, a presença de proteínas pode ter favorecido a produção de proteases e, ao mesmo tempo, estas enzimas terem hidrolisado as quitinasas.

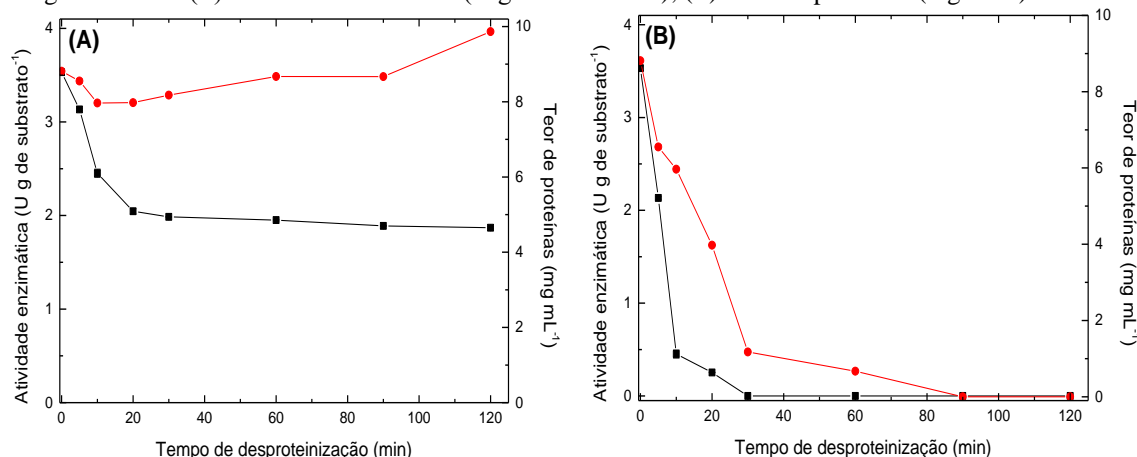
O volume ocupado pelo substrato também é importante na FSS, pois um maior volume ocupado faz com que o fungo não tenha acesso às cascas de camarão mais profundas, pois suas hifas não conseguem penetrar no substrato, havendo desperdício (ARORA et al., 2018). Na natureza, os fungos tendem a crescer sobre a superfície dos substratos nos quais estão aderidos, não só pelo fato de propiciar nutrientes de mais fácil acesso e facilitar o crescimento, mas também para facilitar que suas hifas aéreas realizem trocas gasosas (SUGAI-GUÉRIOS et al., 2015). Com base nos dados apresentados, escolheu-se utilizar meios contendo 2 g de substrato para dar continuidade na pesquisa, por proporcionar maior produção enzimática com menor quantidade de substrato, além de propiciar maior atividade específica.

3.5 INFLUÊNCIA DA DESPROTEINIZAÇÃO DO SUBSTRATO

Na Figura 6 pode ser observada a influência do uso de cascas de camarão de sete barbas desproteinizadas na produção de quitinasas por *A. niveus*. Quando a desproteínização foi realizada por fervura em diferentes tempos (Figura 6A), a produção enzimática foi influenciada negativamente, com o uso de cascas tratadas por até 20 min, mantendo-se constante em tempos superiores, resultando em apenas 53% de atividade residual (1,9 U g de substrato⁻¹) após 120 h de tratamento. Quando o tratamento prévio

das cascas foi conduzido com NaOH (Figura 6B), a produção enzimática foi reduzida drasticamente ao longo do tempo, chegando a zero com o uso de cascas tratadas por 30 min.

Figura 6. Influência da desproteíntização por fervura (A) e imersão em NaOH (B) das cascas de camarão-de-sete-barbas, de tamanho entre 2 e 10 mm², na produção de quitinase em FSS por 144 h a 30 °C pelo fungo *A. niveus*. (■) Atividade enzimática (U g de substrato⁻¹); (●) Teor de proteínas (mg mL⁻¹).



As proteínas aderidas nas cascas de camarão-de-sete-barbas trituradas são fonte de carbono conjuntamente com a quitina, fazendo com que haja a produção tanto de proteases quanto de quitinases no meio. Possivelmente, o fungo utilizou inicialmente as proteínas como fonte de carbono, sendo de mais fácil acesso do que o carbono presente na estrutura da quitina. Quando houve o processo de desproteíntização, o microrganismo teve que utilizar majoritariamente a quitina como fonte de carbono, o que proporcionou um menor crescimento fúngico e, conseqüentemente, menor produção de enzimas. A importância da proteína no cultivo é observada quando, com a redução no teor de proteínas, a produção de quitinases também é reduzida, demonstrando que o fungo necessita deste composto presente nas cascas de camarão para produzir a enzima.

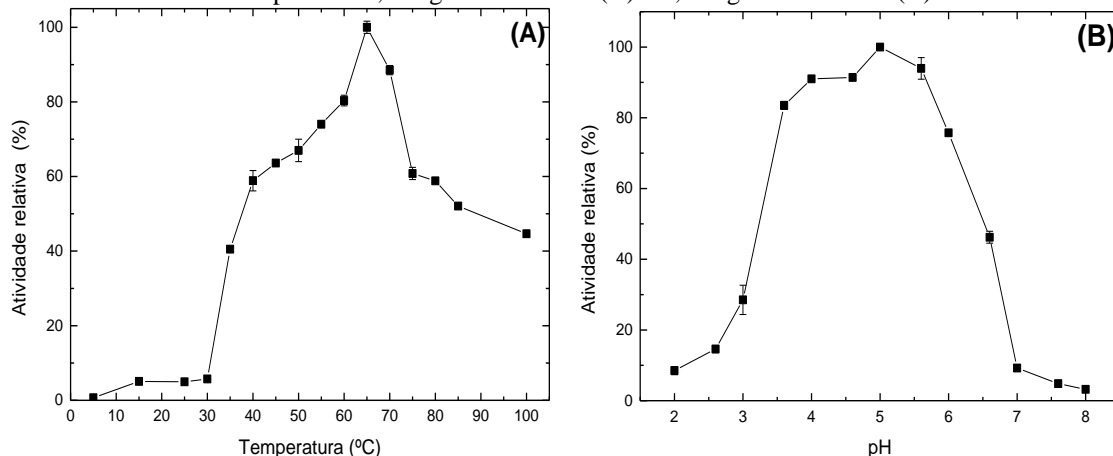
Na literatura, é citada a utilização destes métodos para desproteíntização das cascas de camarão, porém são acompanhados por processos de pré-tratamento, como a desmineralização e descolorização, o que aumenta significativamente o custo de produção (ALDILA et al., 2020). Outro método utilizado é a remoção de proteínas através de ultrassom e do uso de proteases microbianas (VALLEJO-DOMÍNGUEZ et al., 2021; YOUNES et al., 2012), porém também encarece o processo. A utilização das cascas de camarão com as proteínas aderidas pode ser vantajosa, uma vez que pode evitar aumento de custos do processo e favorecer o crescimento do microrganismo.

3.6 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE DA QUITINASE

De acordo com o apresentado na Figura 7A, a maior atividade quitinásica foi obtida na temperatura de 65 °C. A quitinase manteve cerca de 60-80% de sua maior atividade nas temperaturas de 40 a 60°C, e mesmo a 100°C a enzima não perdeu totalmente sua atividade, o que evidencia que a enzima é ativa em ampla faixa de temperatura. Thadathil et al. (2014) relataram a temperatura de 62 °C como sendo a melhor para a atividade da quitinase produzida por *A. flavus* CFR 10, e Shehata et al. (2018) citaram a temperatura de 40 °C como sendo a melhor para a quitinase de *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. Entretanto, Aita et al. (2019) reportaram que a quitinase produzida pelo fungo *Metarhizium anisopliae* IBCB 348 possui maior atividade a 37 °C. As temperaturas mencionadas estão abaixo da encontrada para a quitinase do fungo *A. niveus* aqui descrita.

De acordo com a Figura 7B, a maior atividade enzimática foi observada no pH 5,0 utilizando o tampão McIlvaine, sendo mantida acima de 80% nos valores de pH de 3,5-4,5 e 5,5. Em pH ácidos (2,0 e 3,0), neutro (7,0) e básico (8,0), a atividade catalítica da quitinase permaneceu abaixo de 20% se comparada a observada em pH 5,0. Alves et al. (2018) reportaram a maior atividade enzimática para a quitinase produzida por *A. niveus* em fermentação submersa em pH 5,0 utilizando o tampão acetato de sódio, valor semelhante ao obtido para a enzima obtida em FSS. Este mesmo valor de pH foi mencionado como o melhor para a atividade da quitinase produzida por *M. anisopliae* IBCB 348 (Aita et al., 2019). Shehata et al. (2018) identificaram o pH 4,5 como o que mais favoreceu a quitinase produzida por *A. griseoaurantiacus* KX010988 utilizando o tampão acetato de sódio, bem próximo ao observado para a enzima produzida por *A. flavus* CRF 10 em FSS (pH 4,6) (THADATHIL et al., 2014).

Figura 7. Influência da temperatura (A) e pH (B) na atividade enzimática da quitinase produzida por *A. niveus* em FSS por 144 h a 30 °C utilizando cascas de camarão-de-sete-barbas no tamanho de 2 a 10 mm². 100% de atividade corresponde a 4,1 U g de substrato⁻¹ (A) e 4,8 U g de substrato⁻¹ (B).



4 CONCLUSÃO

O fungo *A. niveus* foi capaz de produzir quitinases na presença de cascas de camarão sete barbas como substrato na FSS, um resíduo da indústria pesqueira, dando uma melhor destinação para obenção de quitinases, enzima de interesse biotecnológico, e contribuindo para redução do impacto ambiental decorrente do descarte deste material. Os parâmetros para a maior produção enzimática em FSS em escala de bancada foram definidos, possibilitando avanços para futura investigação das potenciais aplicações da enzima de interesse, já sinalizadas pelas faixas de temperatura e pH em que pode atuar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro. Também agradecemos ao Maurício de Oliveira pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

- Aita BC, Spanemberg SS, Schmaltz S, Zabet GL, Tres MV, Kuhn RC, Mazutti MA. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. *J Environ Chem Eng.* 2019; 7(3):103193. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103193>
- Aldila H, Fabiani VA, Dalimunthe DY, Irwanto R. The effect of deproteinization temperature and NaOH concentration on deacetylation step in optimizing extraction of chitosan from shrimp shells waste. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 2020; 599(1):012003. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/599/1/012003>
- 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):1-10. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1397-6>
- Amorim I, Marinho G, de Oliveira T, Roa J, dos Reis A, Nelson D, Pasin T, Benassi V. Isolation of Filamentous Fungi from the Caatinga Region and Production of Amylolytic Enzymes of Great Industrial Interest. *J. Biosciences Med.* 2020; 8:152-164. <https://doi.org/10.4236/jbm.2020.811014>
- Arora S, Rani R, Ghosh S. Bioreactors in solid state fermentation technology: design, applications and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 2018; 269:16-34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010>
- Baldoni DB, Antonioli ZI, Mazutti MA, Jacques RJS, Dotto AC, de Oliveira Silveira A, Ferraz RC, Soares AC, de Souza ARC. Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* 2020; 51(4):1897-1908. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00334-w>
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2):248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- DAERP – Departamento de Água e Esgoto de Ribeirão Preto-SP. Resumos das análises da qualidade da água: Relatório técnico. Ribeirão Preto, São Paulo, 2020. Disponível em: <https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/files/daerp/pdf/relatorioanual-2020.pdf>
- de Ávila Filho, S. H., de Cantuário Ferreira, P. G., Fares, N. B., & da Silva, L. A. F. (2020). Propriedades físico-químicas, atividades biológicas e resultados obtidos após utilização médica da quitosana e seus derivados. *Braz. J. Development*, 6(12), 95250-95270. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-130>
- Guerrero-Rodríguez B, Jamett A, Layana L, Berrezuela-Palacios C, Cortez-Gómez S, Briceño S, Lobos J. Graphene functionalized with partially deacetylated chitin extracted from shrimp shell waste. *Acta Microsc.* 2021; 30(2):1-12. <https://100.ip-144-217-4.net/acta/article/view/568>
- Hajji S, Younes I, Ghorbel-Bellaaj O, Hajji R, Rinaudo M, Nasri M, Jellouli K. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014; 65:298-306. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045>

Hill TW, Kafer E. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. Fungal Gen. Rep. 2001; 48:20-21. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1173>

Khanna P, Sundari SS, Kumar NJ. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. World J. Microbiol. Biotechnol. 1995; 11:242-243. <https://doi.org/10.1007/BF00704661>

Oyeleye A, Normi YM. (2018). Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. Bioscience Rep. 2018; 38(4):BSR2018032300. <https://doi.org/10.1042/BSR20180323>

Queiroz C. De Sousa ACB. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. Braz. J. Development 2020; 6(7):51849-51860. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-725>

Rachmawaty, Halifah P, Hartati, Maulana Z, Salleh MMD. Optimization of Chitinase Production by *Trichoderma virens* in Solid State Fermentation Using Response Surface Methodology. Mater Sci. Forum. 2019; 967:132-42. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.967.132>

Rizzatti ACS, Jorge JA, Terenzi HF, Rechia CGV, Polizeli MLTM. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2001; 26(3):156-160. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000107>

Šelo G, Planinić M, Tišma M, Tomas S, Koceva Komlenić D, Bucić-Kojić A. (2021). A Comprehensive Review on Valorization of Agro-Food Industrial Residues by Solid-State Fermentation. Foods. 2021; 10(5):927. <https://doi.org/10.3390/foods10050927>

Shehata AN, Abd El Aty AA, Darwish DA, Wahab WAA, Mostafa FA. Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. Int. J. Biol. Macromol. 2018; 107:990-999. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.071>

Stoykov YM, Pavlov AI, Krastanov AI. Chitinase biotechnology: production, purification, and application. Eng. Life Sci. 2015; 15(1):30-38. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400173>

Sugai-Guérios MH, Balmant W, Furigo A, Krieger N, Mitchell DA. Modeling the Growth of Filamentous Fungi at the Particle Scale in Solid-State Fermentation Systems. In: Krull R., Bley T. (eds) Filaments in Bioprocesses. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2015; 149. https://doi.org/10.1007/10_2014_29

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. Annals Microbiol. 2014; 64(2):671-681. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0702-1>

Vallejo-Domínguez D, Rubio-Rosas E, Aguila-Almanza E, Hernández-Cocoletzi H, Ramos-Cassellis ME, Luna-Guevara ML, Rambabu K, Manickam S, Munawaroh HSH,

Show PL. Ultrasound in the deproteinization process for chitin and chitosan production. *Ultrason Sonochem.* 2021; 72:105417. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105417>

Yang F, Abdelnabby H, Xiao Y. The Zn (II) 2Cys6 putative transcription factor is involved in the regulation of leucinostatin production and pathogenicity of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Can. J. Plant Pathol.* 2015; 37(3):342-352. <https://doi.org/10.1080/07060661.2015.1065437>

Younes I, Ghorbel-Bellaaj O, Nasri R, Chaabouni M, Rinaudo M, Nasri M. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochem.* 2012; 47(12):2032-2039. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.017>

Zhang X, Ismail BB, Cheng H, Jin TZ, Qian M, Arabi SA, Liu D, Guo M. Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation-A review of advances and applications. *Carbohydr. Polym.* 2021; 118616. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118616>