

FERMENTACIÓN DE RESIDUOS DE CANGREJO Y CAMARÓN PARA LA OBTENCIÓN DE QUITINASES EN MEDIO SÓLIDO

ÁLVARO ALBERTO DE ARAÚJO* (alvaro@ufs.br); Lilian M. Costa;
Emerson. C. Muniz; Allisson J. Nascimento; Lucia F. H. Lourenço; Rosangela Bergamasco
NEAL – Núcleo de Engenharia de Alimento, UFS, Campus Universitário de São Cristóvão,
CEP 49100-000 – São Cristóvão – SE – Brasil

ABSTRACT

The consumption in natura of seafood, in Northeast of Brazil, such as prawns, crab and lobster has increased the agro industrial wastes, such as crab and prawns shells. These shells are discarded in the nature and no value is done for these shells. This work has its principal source os studies these disposal shells. These shells were used, via solid state fermentation, as substrate for production of chitinase, using this substrate which is composed of chitin.

Key-words: chitin, chitinase, *Trichoderma harzianum*.

1 – INTRODUCCION

El cultivo de microorganismos en medio sólido ha sido exhaustivamente estudiado en las últimas décadas para la producción de los más variados bioproductos, entre ellos: proteínas, bioplaguicidas, enzimas, ácidos orgánicos, entre otros. El medio sólido permite la utilización de residuos agroindustriales como substrato, material este existente en gran cantidad en la región nordeste.

Debido a la inadecuada disposición de estos residuos surgió el interés de aprovecharlos como medio de cultura para hongos filamentosos que debidamente manipulados producen proteínas y enzimas a través de procesos fermentativos. En este sentido, el presente trabajo tuvo como objetivo investigar el potencial de producción de enzimas a partir de los residuos de cangrejo (conchas de cangrejo), que es largamente producido en nuestra región. Se pretende estudiar también las condiciones máximas de producción de quitinazas y de esa forma resolver el problema de la inadecuada disposición de los residuos y obtener una alternativa para la producción de bioproductos.

* - A quién la correspondencia deberá ser enviada

2 – MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron estudiados los residuos de conchas de cangrejo y de camarón como sustrato e obtenidos en industrias del estado de Sergipe e Pará. Las cepas de *Trichoderma harzianum*, denominadas CBMAI 10, CBMAI 84, CBMAI 99, CBMAI 179 e CBMAI 180 de la Colección Brasileña de Microorganismos de Ambiente y de Industria (UNICAMP/SP) fueron mantenidas en placas de Petri conteniendo el medio PDA (Potato-Dextrose-Agar) bajo refrigeración en el Laboratorio de Bioquímica de Alimentos (Departamento de Ingeniería Química UFS-SE).

Fue utilizada suspensión de esporos con $(8.0 \pm 1.2) \times 10^7$ esporos mL⁻¹ para inoculación de las muestras. Estas fueron incubadas en estufa bacteriológica a 36°C y realizados estudios cinéticos a lo largo de 4 y 11 días de fermentación.

Posteriormente los microorganismos fueron inoculados en los residuos y después de la incubación fueron realizados los análisis de la concentración de azúcares, de proteínas, de actividad de la enzima quitinasa, del pH y de la humedad en diferentes tiempos de cultivo. Las metodologías utilizadas fueron:

1. Humedad: fue determinada pesando la muestra del residuo y seca hasta obtener peso constante y calculada por la fórmula: $100 * (\text{masa del residuo húmedo} - \text{masa del residuo seco}) / \text{masa del residuo húmedo}$.
2. pH: fue utilizado un pHmetro y su electrodo, después de su calibración con las soluciones patrones.
3. Cantidad de azúcares reductores presentes en estos residuos: fue determinada por el método DNS (método de Miller - 1959).
4. Cantidad de proteína presente en estos residuos: fue determinada por el método de biuret (Cooper, 1977)
5. Para la determinación de la actividad de la quitinasa, todos los quitin-oligómeros, quitobiose e NAcGlic que fueran liberados durante la degradación de la quitina utilizando quitina coloidal como sustrato y esta actividad fue detectada colorimetricamente.

En relación a la cinética de la fermentación en medio sólido para la selección de la cepa, las cinco cepas fueron testadas cuanto a la producción de quitinasa a lo largo del tiempo. Las conchas de cangrejo – CCG (fueron sometidas a un tratamiento químico para reducir el elevado contenido de minerales presentes) y las conchas de camarón – CCM fueron los sustratos sólidos del proceso fermentativo.

3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tests iniciales utilizando las CCG tratadas, las CCM y el medio base como sustrato para FMS (Fermentación en Medio Sólido) indicaron que el microorganismo no consiguió desarrollarse en el medio de crecimiento, no asimilando la quitina disponible en ese residuo. De esta forma, un co-sustrato fue adicionado al medio sólido para favorecer el crecimiento del hongo. El co-sustrato seleccionado fue la glucosa.

La adición de la glucosa favoreció el crecimiento del microorganismo el cual se desarrolló uniformemente a través del medio sólido. El microorganismo también se adaptó en condiciones de pH alcalino (pH natural del sustrato), estando apto para producir quitinasa aún en valores elevados de pH.

Los azúcares reductores iniciales fueron consumidos totalmente durante las primeras doce horas de fermentación y la actividad enzimática máxima fue detectada después de 24 horas de fermentación, conforme muestra la Figura 1.

Las variables estudiadas mostraron tendencias de comportamiento semejantes para todas las cepas estudiadas. La actividad quitinolítica fue máxima en el primer día de fermentación disminuyendo después de ese período. A las 48 horas de fermentación ocurrió una disminución con promedio de 55% de la actividad quitinolítica, comparado al valor óptimo obtenido.

El tenor de proteínas presentó crecimiento estacionario constante durante los primeros días alcanzando el valor máximo a los cinco días de fermentación, presentando posterior disminución hasta el 11° día de fermentación. Cuanto al pH hubo reducción en su máximo durante los 5 primeros días de fermentación y posterior aumento hasta el final del proceso.

Este comportamiento puede haber ocurrido por la acción de las proteasas secretadas por el microorganismo durante la fermentación. La disminución de la actividad de quitinaza fue debida a la desnaturalización catalizada por la proteasa y la reversión en el comportamiento el pH fue debida a la proteólisis que causó el aumento del valor del pH.

Suresh e Chandrasekaran (1999) encontraron resultados semejantes em sus estudios con FMS utilizando residuos de trigo. La actividad quitinolítica presentada por el hongo *Beauveria bassiana* fué máxima en las primeras 44 horas de fermentación. Después de 72 horas el decrecimiento en la actividad enzimática era de 60% comparado al valor óptimo obtenido.

A respecto de las conchas de camarón CCM, el microorganismo asimiló la quitina disponible en los residuos, sin necesidad de la adición de carbohidratos simples y se adaptó al pH alcalino del residuo (pH 7,70) durante la fermentación y la formación de esporos fue visualizada después de 5 días.

Para todas las cepas los valores de pH subieron lentamente alcanzando valores próximos de 8,9 después de 13 días de fermentación. La actividad enzimática y el tenor de proteínas total tuvieron la misma tendencia de comportamiento aumentando a lo largo del tiempo y alcanzando sus valores máximos en el mismo día, excepto para una de las cepas analizadas.

RATTANAKIT et al. (2002) observó un aumento de la activade enzimática hasta el séptimo día en su FMS utilizando conchas de camarón (*Penaeus monodon*). Después de ese período la actividad quitinolítica tuvo una pequeña disminución o no cambió significativamente.

La Figura 1 muestra la cinética de FMS utilizando como substrato la CGC.

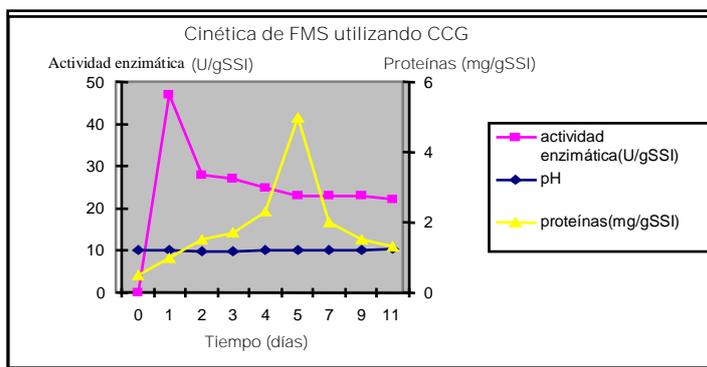


Figura 1 - Cinética de FMS utilizando CCG de la cepa CBMAI 99

4 – CONCLUSIÓN

Al ser inoculado en el substrato concha de camarón el hongo asimiló la quitina, única fuente de carbono presente en ese substrato. Sin embargo, en la fermentación sólida utilizando conchas de cangrejo fue necesaria la adición de una fuente de carbono más simples, en ese caso, la glucosa, para inducir el crecimiento inicial del microorganismo; todos los valores de actividad enzimática máxima fueron obtenidos después de 24 horas de fermentación cuando el substrato concha de cangrejo fue fermentado. La CBMAI 99 fue la que más produjo la enzima quitinasa y el valor obtenido fue de 47,04 U/gSSI; cuando se utilizó las conchas de camarón como substrato de la fermentación sólida la actividad quitinolítica máxima observada varió de 42,17 a 46,48 U/gSSI. La actividad máxima detectable generó valores muy próximos entre las cepas estudiadas, no ocurriendo diferencia significativa entre los valores obtenidos.

5 – REFERÊNCIAS

- BORZANI, W Biotecnologia Industrial. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.
- MILLER, G.L. 1959. Anal. Chem. 31.
- NIEHAUS, F. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999)
- RATTANAKIT, N.; PLIKOMOL, A.; YANO, S.; WAKAYAMA, M.; TACHIKI, T. Utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for solid-state cultivation of *Aspergillus* sp. S1-13: evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 93, p. 550-556, 2002.
- RUEGGER, M. J.S. ; TAU-K-TORNISIELO. Revista Brasil. Bot. (2004) n 2.
- SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; LEMA, J. M. Enzyme and Microbial Technology. (1995).
- STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59 (2002).
- SURESH, P.V.; CHANDRASEKARAN, M. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. Process Biochemistry, v. 34, p. 257-267, 1999.