

RESÍDUO DE CAMARÃO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Shrimp residue for production of biotechnological interest proteases

Amália Roberta de Moraes BARBOSA¹, Aline Marques MONTE^{2*}, Ana Karoline Matos da SILVA¹ & Maria Christina Sanches MURATORI³

¹Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Piauí

²Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí

³Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Universidade Federal do Piauí

*email: montealine@yahoo.com.br

Resumo

Objetivou-se utilizar o resíduo de camarão como fonte de proteínas para produção de proteases, como uma alternativa para a utilização desse resíduo. O resíduo foi de camarão de água doce de espécie não identificada. O teor de proteína foi obtido pela metodologia de Kjeldahl, um método indireto que determina o nitrogênio orgânico total da amostra e converte em proteína pelo fator de conversão 6,25. Para produção enzimática foi utilizado a levedura *Candida parapsilosis* pertencente a coleção de culturas de micro-organismos do Laboratório de Controle Microbiológico do NUEPPA, esta cepa foi isolada em ambiente de piscicultura teresinense. A atividade proteolítica foi determinada segundo a metodologia de Charney e Tomareli (1947). A análise foi realizada a cada 24 horas de fermentação até a obtenção do pico da atividade enzimática. A análise de proteína bruta desse material teve uma média de teor proteico de 42,92%. Constatou-se um aumento considerável na produção enzimática de *C. parapsilosis* a partir das 96 horas de incubação (39,6 U/mL) no meio com resíduo de camarão como fonte de proteína, com um alcance máximo de atividade proteásica após 168 horas de incubação (78,3 U/mL). O resíduo de camarão de água doce mostrou-se uma boa fonte de proteínas para a produção de proteases com a *Candida parapsilosis*.

Palavras-chaves: Enzima, fermentação, Biotecnologia.

Abstract

The objective was to use shrimp residue as a protein source for protease production, as an alternative for the use of this residue. The residue was freshwater shrimp of unidentified species. The protein content was obtained by the Kjeldahl methodology, an indirect method that determines the total organic nitrogen of the sample and converts it to protein by the conversion factor 6,25. For enzymatic production was used *Candida parapsilosis* yeast belonging to the collection of microorganisms cultures of the Laboratory of Microbiological Control of NUEPPA, this strain was isolated in Teresinean fish culture environment. Proteolytic activity was determined according to the methodology of Charney and Tomareli (1947). The analysis was performed every 24 hours of fermentation until the enzyme activity peak was obtained. The crude protein analysis of this material had an average protein content of 42.92%. There was a considerable increase in *C. parapsilosis* enzymatic production from 96 hours of incubation (39.6 U / mL) in shrimp residue medium as a protein source, with a maximum range of protein activity after 168 hours of incubation (78.3 U / mL). Freshwater shrimp residue proved to be a good protein source for protease production with *Candida parapsilosis*.

Keywords: Enzyme, Fermentation, Biotechnology

Introdução

A industrialização do pescado no Brasil tem crescido com o surgimento de grandes indústrias de beneficiamento, atingindo um recorde histórico no ano de 2010, com produção de 60 milhões de toneladas, estimadas em US\$ 119 bilhões. Deste total, 5,7 milhões de toneladas correspondem a crustáceos distribuídos

entre os de água doce, água salobra e água marinha. No entanto, 65% dessa matéria prima se perde durante a captura, comercialização e processos industriais (Costa, 2009; Bessa-Junior & Gonçalves, 2013).

O processamento industrial do camarão gera resíduos como cefalotórax e exoesqueleto. O cefalotórax corresponde entre 30% a 40% da matéria-prima e o exoesqueleto representa 37%. Juntos chegam a integrar em torno de 70% do peso da matéria-prima. Esses resíduos colaboram com a elevação da poluição ambiental se descartados incorretamente (Mezzomo, 2012).

A composição nutricional do resíduo gerado pela produção de camarões (exoesqueleto e cefalotórax) corresponde de 15 a 20% de quitina, 25 a 40% de proteínas e 40 a 55% de carbonato de cálcio (Assis, 2008). Por ser de fácil degradação bacteriana, este resíduo é capaz de fermentar com ácido lático, que forma uma silagem rica em proteínas, lipídeos e quitina insolúvel (Azevedo, 2014). O elevado teor de proteína pode permitir a sua utilização como substrato para a produção de proteases microbianas. Estas enzimas são amplamente utilizadas para elaboração de alimentos, bebidas e detergentes; atuam também na preparação de couro, no amaciamento de carne e na formulação de medicamentos (Neves, 2006).

No processamento industrial ocorre a transformação da matéria prima em produto aceitável para comercialização. Em consequência são gerados resíduos que, na maioria das vezes, são clandestinamente enterrados em aterros sanitários ou jogados no mar ou em rios, com alto grau de contaminação ambiental (Costa, 2009; Bessa-Junior & Gonçalves, 2013). O desenvolvimento sustentável tem recebido destaque nos últimos anos principalmente quando se analisa o uso de recursos ambientais e os resíduos produzidos pelas indústrias que têm promovido ações visando diminuir a contaminação do ambiente (Wissmann, 2012). A indústria pesqueira vem se preocupando em dar um destino adequado para seus resíduos, de modo que as agressões ao meio ambiente sejam cada vez mais reduzidas (Moura, 2006).

Quando esse material residual é descartado no ambiente, parte da degradação das proteínas constituintes é realizada pelas proteases microbianas. Na indústria, a utilização de micro-organismos tem se expandido devido à alta eficiência desses seres na produção de metabólitos secundários, como as enzimas microbianas que apresentam como principal função a ação catalítica, ou seja, enzimas que aceleram as reações bioquímicas. Muitas espécies tem sido alvo de investigação para emprego na indústria, sobretudo como fonte de amilases, celulasas e proteases, que são usadas no processamento de alimentos e detergentes (Amaral, 2017).

Proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e têm aplicação em diferentes indústrias, como de alimentos, têxtil, farmacêutica e de detergentes. A venda dessas enzimas caracterizou aproximadamente 65% do total de enzimas comercializadas no mundo (Ladeira, 2012).

O elevado custo de obtenção industrial das enzimas de origem microbiana é o principal obstáculo para sua aplicação industrial, pois, a produção enzimática está diretamente relacionada ao tipo de substrato utilizado. Devido à promissora aplicabilidade dessas enzimas, sua produção deveria ser intensificada empregando meios de cultivos com baixos custos (Silva, 2006).

Considerando-se que o substrato para o desenvolvimento desses micro-organismos produtores de enzima

corresponda até 40% do custo em escala industrial, é importante pesquisar substratos alternativos com baixo custo para a indústria. Dentre as enzimas que podem ser obtidas, as proteases hidrolisam proteínas e as degradam em pequenos peptídeos e aminoácidos (Ladeira, 2012).

Tendo em vista a ampla utilização das proteases na indústria, a grande quantidade de resíduo gerado na produção de camarão e seu valor nutricional, neste trabalho objetivou-se utilizar o resíduo de camarão como fonte de proteínas para produção de proteases e, dessa maneira, gerar uma alternativa para a utilização desse resíduo.

Material e Métodos

Processamento do resíduo de camarão

Foi utilizado resíduo de camarão de água doce de espécie não identificada, provavelmente pertencente ao gênero *Macrobrachium sp*, oriundo do Rio Parnaíba. Pesou-se aproximadamente 300 gramas dos camarões e acondicionados em sacos plásticos para alimentos de primeiro uso. As amostras foram transportadas em depósito isotérmico com gelo reciclável, até o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

No laboratório retirou-se os resíduos não comestíveis do camarão: cefalotórax, o urópode e o restante do exoesqueleto. Com o auxílio de uma tesoura de metal, este resíduo foi fragmentado em pequenos pedaços, que foram distribuídos em placas de Petri. As placas foram colocadas sem tampa em uma estufa de secagem e esterilização modelo 315 SE numa temperatura de 85°C por três horas. Posteriormente, o resíduo seco foi transferido para um almofariz onde foi triturado com o auxílio de um pistilo até a obtenção de um pó. Este pó foi armazenado em um frasco de vidro hermeticamente fechado e higienizado.

Determinação da proteína bruta do resíduo de camarão

O teor de proteína foi obtido pelo método de Kjeldahl, 1883, um método indireto que determina o nitrogênio orgânico total da amostra e converte em proteína pelo fator de conversão 6,25. Foram pesados em duplicata 0,2 gramas da amostra (balaça analítica Edutec EEQ9003F-B) que foi transferida para um tubo de digestão juntamente com 0,8 gramas de sulfato de cobre, usado como catalisador e 5,0 mL de ácido sulfúrico (Adolfo Lutz, 2008). Nesta primeira etapa o conteúdo do tubo de digestão foi aquecido a uma temperatura de 380°C em Bloco Digestor Tecnal TE-040/25 até obter-se uma solução homogênea e azulada, indicando que toda a amostra foi digerida pelo ácido sulfúrico.

A segunda etapa consistiu em um processo de destilação. Após o resfriamento do tubo, adicionou-se 10 mL de água, seguido de 10 mL de hidróxido de sódio a 40% e conectou-o ao Destilador de Nitrogênio Marconi MA036 plus. Com o aquecimento, a solução apresentou uma coloração escura. Coletou-se 100 mL do produto obtido na destilação em um frasco tipo Erlenmeyer contendo 20 mL de ácido bórico a 2% e cinco gotas de

indicador de Kjeldahl, obtendo-se, assim, uma solução azulada. A titulação foi a última etapa do processo. O produto obtido pelo processo de destilação foi titulado com solução de ácido clorídrico 0,1 N, usando cinco gotas de vermelho de metila como indicador. O resultado final foi determinado pela seguinte equação:

$$PT = \frac{Va \times N \times FC \times 100 \times 0,014 \times FE}{Pa}$$

Onde:

PT = teor de proteína bruta total na amostra, em percentagem;

Va = volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra, em mililitros; N = normalidade da solução de ácido clorídrico usada na titulação;

FC = fator de correção para o ácido clorídrico 0,01 mol/L;

FE = fator empírico de conversão de nitrogênio para carne (6,25);

Pa = massa da amostra em gramas.

Preparação do inóculo

O micro-organismo utilizado para a produção enzimática foi a levedura *Candida parapsilosis* pertencente a coleção de culturas de micro-organismos do Laboratório de Controle Microbiológico do NUEPPA, esta cepa foi isolada em ambiente de piscicultura teresinense. Três alçadas da levedura foram inoculadas em tubos de plástico tipo Falcon contendo caldo YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) e incubada sob agitação constante a 150 rpm em mesa agitadora SL-180/DT Solab em temperatura ambiente (média de 25°C) por 24 horas.

Preparação do meio com resíduo de camarão e processo fermentativo

Adicionaram-se 2,0 g de resíduo de camarão desidratado em pó em 100 mL de tampão fosfato pH 7,2, obtendo-se uma concentração de 2,0% de resíduo. Com o auxílio de uma chapa aquecedora Q310B-22B Quimis, o conteúdo foi pasteurizado em um frasco de vidro tipo Béquer por 30 minutos a 65°C. O material foi transferido para um frasco de vidro tipo Erlenmeyer previamente esterilizado. A fermentação ocorreu após o resfriamento do frasco, com a inoculação de 1,0 mL da suspensão do micro-organismo, que foi incubado sob agitação constante por 168 horas em mesa agitadora SL-180/DT Solab com 150 rpm em temperatura ambiente do laboratório (média de 25°C).

Avaliação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada segundo a metodologia de (Charney & Tomareli, 1947). A análise foi realizada a cada 24 horas de fermentação até a obtenção do pico da atividade enzimática. Inicialmente, transferiu-se com micropipeta uma alíquota de 1,0 mL do cultivo de *C. parapsilosis* para frasco tipo Ependorff e

centrifugou-se a 10.000 rpm por cinco minutos em microcentrífuga de bancada Nova Instruments BK14080837. Desprezou-se o substrato e utilizou-se o sobrenadante. Em um frasco tipo Ependorff vazio, adicionaram-se 200 µL do sobrenadante, 200 µL de tampão fosfato pH 7,2 e 200 µl de solução de azocaseína a 1,0%, respectivamente. O material foi, então, levado para banho-maria numa temperatura de 37°C por 30 minutos. Após este período, adicionaram-se 1000 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e centrifugou-se novamente a 10.000 rpm por cinco minutos em microcentrífuga de bancada Nova Instruments BK14080837.

Em uma cubeta de plástico transferiu-se todo o sobrenadante presente no frasco tipo Ependorff e adicionou-se 400 µL de hidróxido de sódio. Em seguida, realizou-se a leitura da intensidade de cor da amostra a 420 nm em Espectrofotômetro UV Biospectro SP-220. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 de absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio.

Resultados e discussão

Determinação da proteína bruta do resíduo de camarão

Os valores encontrados na análise do teor de proteína bruta total do resíduo de camarão estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Proteína bruta total de resíduo de camarão de água doce após secagem em estufa e pulverização em almofariz

Amostra	Volume gasto de HCl(mL)	Proteína bruta total (%)
1	10,5	42,72
2	10,6	43,12
Média	10,55	42,92

Fonte: autoria própria, 2019.

A farinha de resíduo de camarão é definida como partes de camarões não decompostas, desidratadas e moídas secas (Bellaver & Zanotto, 2004) cuja umidade não deve exceder a 10% (situando-se entre 4,0 e 6,0%) com teor de gordura entre 8 e 16% e acidez de 5 mg de NaOH/g de amostra. Neste trabalho, foi obtido o resíduo de camarão desidratado em pó. A análise de proteína bruta desse material teve uma média de teor proteico de 42,92%. Esse valor concorda com o encontrado por (Holanda, 2009), que analisou o resíduo industrial do camarão

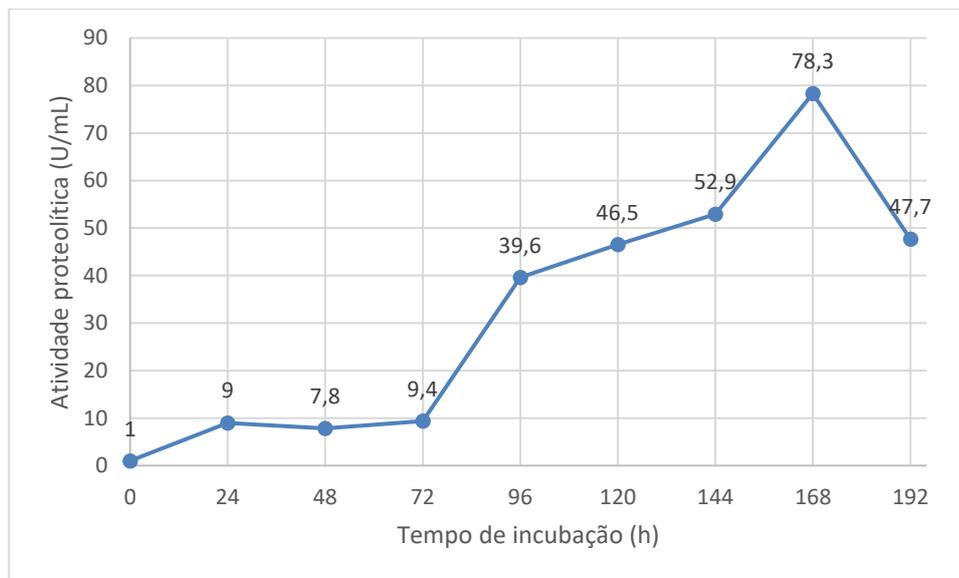
sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) liofilizado e determinou uma média de 37,77% de proteína bruta. Em seus estudos, (Lima, 2007) encontraram um teor de proteína de 66,01% para farinha de cefalotórax do camarão *Litopenaeus vannamei*, enquanto (Fernandes, 2013) relataram um valor de proteína bruta de 50,05% para o resíduo da mesma espécie.

Apesar de o material residual em estudo ser oriundo de camarão de água doce, o teor de proteína manteve-se próximo aos valores encontrados para o resíduo de espécies de camarão marinhos.

Devido ao grande volume de camarões cultivado e capturado, a farinha de resíduos tem sido identificada como uma fonte de proteína animal de grande potencial, podendo contribuir ainda para a redução de problemas ambientais pela inadequada destinação destes resíduos no processamento, trazendo, dessa forma um grande apelo ambiental e social (Soares, 2016). Uma das alternativas é transformar esse produto em um meio de cultura rico em proteínas para a produção de protease por micro-organismos.

Avaliação da atividade proteolítica

Figura 1. Atividade proteolítica (U/mL) do resíduo de camarão em função do tempo de incubação.



As análises para verificação da atividade proteolítica foram realizadas em um intervalo de 24 horas entre cada teste, totalizando nove leituras no espectrofotômetro. Conforme o Gráfico 1, a atividade proteolítica aumentou em função do tempo de forma sutil nas primeiras 72 horas. Singh, (Vohra & Sahoo, 2003) afirmam que há a necessidade de uma massa mínima de células para que se possa iniciar de fato a síntese de proteases.

Constatou-se um aumento considerável na produção enzimática de *C. parapsilosis* a partir das 96 horas de incubação (39,6 U/mL) no meio com resíduo de camarão como fonte de proteína, com um alcance máximo de atividade proteolítica após 168 horas de incubação (78,3 U/mL). Essas condições acabam por ser desinteressantes para a indústria do ponto de vista tempo, que se prolongou. No entanto, a atividade enzimática encontrada nos testes é promissora.

Após alcançar o valor máximo, a protease sofreu um processo de desativação nas 24 horas seguintes, com diminuição dos níveis de atividade enzimática para 47,7 U/mL. Essa redução pode indicar uma associação entre a produção da enzima e o crescimento das células no meio. Possivelmente, no período de 72 a 168 horas houve o crescimento exponencial dos micro-organismos, e conseqüentemente, com o meio propício, rico em proteínas, houve também o aumento na síntese de protease por *C. parapsilosis* nesse ponto em que a cultura estava metabolicamente ativa.

Após 168 horas pode ter-se iniciado a fase estacionária de crescimento em que o metabolismo das células diminuiu e, por conseguinte, reduziu-se também a produção enzimática. Segundo (Nascimento, 2007) em um ensaio onde relacionaram o crescimento da cultura no meio e a produção de protease, foi constatado o aumento da produção enzimática no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento. O pico máximo de atividade deu-se após oito horas de incubação de *Bacillus sp.* quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária. Logo após, houve uma rápida diminuição da atividade, que prejudica a produção em larga escala, devido à dificuldade de isolar a enzima em sua atividade máxima. Portanto, torna-se necessário buscar alternativas que aumentem a estabilidade da enzima sem inviabilizar o crescimento do micro-organismo.

Conclusão

O resíduo de camarão de água doce mostrou-se uma boa fonte de proteínas para a produção de proteases com a *Candida parapsilosis*.

Referências

- Amaral, F.A.P.C. (2017) Produção de protease por *Aspergillus niger* (SIS 18) através de fermentação submersa utilizando meios alternativos contendo resíduos agroindustriais. Dissertação de Mestrado. (PE): Universidade Católica de Pernambuco.
- Assis, A. S, Stamford, T.C.M, Stamford, T.L.M. (2008). Bioconversão de resíduos de camarão *Litopenaeus vannamei* (booner, 1931) para produção de biofilme de quitosana. *Rev. Ibero., de Polímeros*, 9(5): 480-491.
- Azevedo, M.S.P. (2014). Processamento e avaliação nutricional da farinha de resíduo de camarão para frangos de corte. Dissertação de Mestrado. São Cristóvão. (SE): Universidade Federal de Sergipe.
- Bellaver, C, Zanotto, D. (2004). Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal. In: *Conferência APINCO*, Santos-SP.
- Bessa-Junior, A.P, Gonçalves, A. A. (2013). Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. *Acta Of Fisheries and Aquatic Resources*, 1(1):13-28.
- Costa, C.N, Portz, L, Hisano H, Druzian, J.I & Ledo, C.A.S. (2009) Silagem ácida do resíduo do camarão *Litopenaeus vannamei* em rações para tilápia do Nilo. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 31(2): 161-167.

- Fernandes, T.M, Silva, J.A, Silva, A.H.A.; Cavaleiro, J.M.O, Conceição, M.L. (2013). Flour production from shrimp by-products and sensory evaluation of flour-based products. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8): 962-967.
- Heu, M.S, Kim, J.S, Shahidi, F. (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82(2):235-242.
- Holanda, H. D. Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos. (2004) Tese de Doutorado. (SP) Universidade Federal de Campinas, Campinas.
- Ladeira, S. A, Delatorre, A. B, Andrade, M.V.V. (2012). Utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus sp.* termofílico. *Braz. J. Food Technol.*, Campinas, 15(1):92-98,
- Lima, S. B. P, Rabello, C. B.V, Dutra Junior, W.M, Ludke, M. C. M. M, Costa, F. G. P. (2007). Avaliação nutricional da farinha da cabeça do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) para frangos de corte. *Revista Caatinga*, Mossoró. 20(3):38-41.
- Mezzomo, N. (2012). Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão. Tese de Doutorado. (SC) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Moura, C. M. (2008). Avaliação da reação de desacetilação da quitina e estudo da secagem de pellets de quitosana para a aplicação em filmes poliméricos. Dissertação de Mestrado. (RS) Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- Nascimento, W. C. A, Silva, C. R, Carvalho, R. V, Martins, M. L. L. (2007). Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* Termofílico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27(2): 417-421.
- Neves, K.C.S, Porto, A. L. F, Teixeira, M. F. S. (2006). Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Revista Acta Amazonica*. 36(3):299-306, 2006.
- Silva, C.R. (2006). Otimização do meio de cultura a base de soro de leite e água de maceração de milho para produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2. Tese de Mestrado, (RJ). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.
- Singh, J, Vohra, R.M, Sahoo, D.K. (2003). Enhanced production of alkaline protease by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. *Process Biochemistry*. 39(9):1093-1101.
- Soares, K. L. S. (2016). Utilização de resíduos do beneficiamento de camarões cultivados para obtenção de novos insumos para aquicultura. Tese de Doutorado, (PE). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Vieira, P.M.C. (2009). Utilização de materiais de baixo custo (casca de camarão) para a remoção de cromo. 2009. Dissertação de Mestrado, (PA). Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- Wissmann, M.A, Hein, A.F, Follmann, J, Rachow, N.I.P. (2012). Custos ambientais: análise de sua incidência e importância na busca da ecoeficiência em uma indústria de queijo. *Revista Custos e Agronegócio Online*. 8(3).