



RESÍDUOS DE LARANJA E CAMARÃO UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA COM *PENICILLIUM COMMUNE* E *ASPERGILLUS SP.*

*Orange and shrimp waste used to enzyme production with *Penicillium commune* and *Aspergillus sp.**

Bianca D'arck Melo CAVALCANTE^{*1}, Thamarys SCAPINI², Aline Frumi CAMARGO³, Robson Marcelo DI PIERO⁴, Helen TREICHEL⁵

RESUMO: Os resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substrato em processos fermentativos para obter bioprodutos de interesse comercial. Devido ao elevado volume de cascas de laranja e camarão gerados e aos seus nutrientes, o objetivo deste estudo é avaliar a viabilidade do uso desses resíduos como substrato para a fermentação submersa e produção enzimática. Foi realizada fermentação submersa com casca de laranja e camarão; *Penicillium commune* e um fungo isolado de uva (F-39) identificado como *Aspergillus sp.* foram usados separadamente para a produção dos extratos enzimáticos. Os extratos foram caracterizados quanto às atividades enzimáticas de pectinase, celulase, amilase e peroxidase. Os extratos produzidos por *P. commune* apresentaram maiores valores de atividades enzimáticas, especialmente celulase (16,87 U mg⁻¹) e amilase (50,73 U mg⁻¹) com $p \leq 0,05$. Ambos os extratos apresentaram elevada atividade de peroxidase (> 90 U mg⁻¹). Diante dos resultados obtidos, as cascas de laranja e camarão são uma alternativa eficiente e de baixo custo para a produção enzimática.

Palavras-chave: aproveitamento de resíduos agroindustriais, fermentação submersa, produção enzimática.

ABSTRACT: Agro-industrial waste can be used as a substrate in fermentation processes to obtain bioproducts of commercial interest. Due to the high volume of orange and shrimp peels generated and their nutrients, the objective of this study is to evaluate the feasibility of using these residues as a substrate for submerged fermentation and enzymatic production. Submerged fermentation was carried out with orange peel and shrimp; *Penicillium commune* and an isolated grape fungus (F-39) identified as *Aspergillus sp.* were used separately for the production of enzymatic extracts. The extracts were characterized for the enzymatic activities of pectinase, cellulase, amylase and peroxidase. The extracts produced by *P. commune* showed higher values of enzymatic activities, especially cellulase (16.87 U mg⁻¹) and amylase (50.73 U mg⁻¹) with $p \leq 0.05$. Both extracts showed high peroxidase activity (> 90 U mg⁻¹). In view of the results obtained, orange and shrimp peels are an efficient and low-cost alternative for enzymatic production.

Key words: use of agro-industrial waste, submerged fermentation, enzymatic production.

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021; aprovado em 05/06/2021

¹Mestre em Ciência dos Alimentos - Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil; +55 (48) 3721-5423; biancaadarck@gmail.com (* - autor correspondente);

²Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental - Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, Universidade Federal da Fronteira Sul, CEP 99700-000, Erechim, RS, Brasil; scapini.thamarys@gmail.com;

³Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental - Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, Universidade Federal da Fronteira Sul, CEP 99700-000, Erechim, RS, Brasil; alinefrumi@gmail.com;

⁴Doutor em Fitopatologia - Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil; robson.piero@ufsc.br;

⁵Doutora em Engenharia de Alimentos - Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, Universidade Federal da Fronteira Sul, CEP 99700-000, Erechim, RS, Brasil; helentreichel@gmail.com.

INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios para os tempos atuais é manter a produção e distribuição de alimentos de forma igualitária e com baixo impacto ambiental (MENDOZA-HERNÁNDEZ; FURNES; BELDA, 2014). Apesar disso, a demanda por alimentos é cada vez maior devido ao aumento populacional, tal qual a geração de resíduos (PANDA et al., 2018; VAREJÃO et al., 2013). Para minimizar o impacto dos resíduos agroindustriais no meio ambiente e reaproveitá-los, os processos biotecnológicos, como a fermentação, são amplamente utilizados (SADH et al., 2018). Estes processos visam o desenvolvimento de bioprodutos e biocompostos de interesse comercial com diferentes aplicações (SADH et al., 2018; KLAIC et al., 2017; VAREJÃO et al., 2013).

Segundo Panda et al. (2018), o mercado de biocomodities apresenta receitas anuais superiores a US \$ 700 bilhões. Portanto, processos fermentativos utilizando resíduos agroindustriais como substrato são uma alternativa para agregar valor aos resíduos e obter bioprodutos de interesse comercial. O uso de resíduos agroindustriais como substrato, além de reduzir os custos do processo de fermentação, possibilita a produção de um *pool* de enzimas com diferentes especificidades, o que pode influenciar positivamente na sua aplicação (SADH et al., 2018).

A laranja é uma das frutas mais produzidas e consumidas no mundo, ultrapassa 80 milhões de toneladas por ano, e o Brasil é o maior produtor mundial. No entanto, cerca de 40 a 60% do peso fresco da laranja é considerado resíduo (CYPRIANO; DA SILVA; TASIC, 2018; INÁCIO et al., 2015). A casca de laranja possui elevados teores de açúcares solúveis, pectina, proteínas, hemicelulose e celulose e fibras, sendo, portanto, fonte de nutrientes para a produção enzimática (DE LA TORRE et al., 2019). A casca de camarão é outro resíduo gerado em grande volume, porém ainda pouco explorado. A produção mundial de camarão varia de 145,9 a 167,2 milhões de toneladas (FAO, 2016), considerando o resíduo gerado (até 60% do peso inicial), seu aproveitamento é de grande relevância, visto que é uma matéria-prima de baixo custo para o desenvolvimento de novos produtos (ANTUNES-VALCAREGGI, 2016; OGAWA, et al., 2007).

A fim de explorar as potencialidades da utilização de casca de laranja e camarão, o objetivo deste estudo é avaliar a viabilidade do uso desses resíduos como substrato para a fermentação submersa e produção enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

Resíduos de casca de laranja e camarão

Foram utilizadas cascas de laranja orgânica, cedidas por uma agroindústria de sucos, e cascas de camarão coletadas em um restaurante local (Erechim, RS, Brasil). Ambos os materiais foram secos em estufa de circulação de ar a 65 °C por 48 h, triturados em moinho de facas com peneira 10 *mesh* e armazenados a -20 °C até o uso.

Microrganismos

Para a produção dos extratos enzimáticos foram utilizados dois fungos filamentosos: *Penicillium commune*, do banco de microrganismos da Fundação André Tosello – Coleção de Culturas Tropicais (Campinas, SC, Brasil) e um

fungo isolado de uva (F-39) (Erechim, RS, Brasil). Ambos os microrganismos foram cultivados em cultura estoque em placas de Petri com meio PDA (Merck, Alemanha) e mantidos em crescimento por 7 dias a 28 °C.

Identificação molecular do fungo isolado

O DNA do fungo isolado (F-39) foi extraído de acordo com o método descrito por Doyle e Doyle (1987), a partir do micélio cultivado em meio de cultura. O DNA foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) e amplificação da região do espaçador interno transcrito por rDNA (ITS). Foram utilizados os iniciadores ITS1 (50-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (50-TCTCCGCTTATTGATATGC-30) para o sequenciamento. Os produtos amplificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, purificados e submetidos ao sequenciamento. Sequências semelhantes foram encontradas no GenBank, através da ferramenta Blastn (SCHMITZ; RIESNER, 2006).

Processo fermentativo

O meio de fermentação foi preparado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de água destilada, casca de laranja a 10% (m/v) (adaptado de Mamma, Kourtoglou e Christakopoulos, 2008) e casca de camarão a 0,3% (m/v) (adaptado de Suresh e Anil Kumar, 2012), esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm por 15 minutos. O processo fermentativo foi iniciado com a adição de 10 mL da suspensão contendo 10^7 esporos mL⁻¹ ao meio de fermentação. Cada microrganismo foi testado separadamente. A fermentação ocorreu durante 72 h em agitador orbital (New BrunswickTM, Alemanha), sob agitação constante (120 rpm) e temperatura controlada (28 °C). Após a fermentação, a biomassa fúngica foi separada do meio líquido com filtro de nylon, seguido de centrifugação (NT 815 - NovaTécnica, Brasil) a 4 °C e 2.000 rpm por 10 min. O sobrenadante (extrato enzimático) foi coletado e caracterizado quanto ao teor de proteínas solúveis totais, pelo método de Bradford (1976), posteriormente foram determinadas as atividades enzimáticas.

Determinação da atividade de amilase

A atividade de amilases foi quantificada em meio reacional contendo 0,5 mL de extrato e 0,5 mL de solução de amido 1 % preparado em tampão acetato 100 mM pH 5,0, incubado a 38 °C por 10 min (adaptado de Fuwa, 1954). Posteriormente, a atividade enzimática do meio reacional foi determinada pelo método de Miller (1959), utilizando ácido dinitrosalicílico (DNS) em banho fervente por 10 min e mensurado por leitura de absorbância a 540 nm. Uma unidade de atividade de amilase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a reação de 1 μmol min⁻¹ de glicose nas condições da reação.

Determinação da atividade de celulase

A atividade de celulase foi determinada pelo método de Ghose (1987), onde 50 mg de papel filtro Whatman n°. 1 picado (1x1 cm²), foram adicionados em 2 mL de tampão acetato de sódio 0,2 mM (pH 5,5) e 0,5 mL do extrato enzimático. O meio reacional foi incubado a 50 °C por 60 min.

Após a atividade enzimática foi quantificada pelo método DNS a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade de celulase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a reação de 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de glicose nas condições de reação.

Determinação da atividade de pectinase

Atividade de pectinase foi determinada utilizando como substrato padrão Pectina Cítrica (Sigma-Aldrich), conforme proposto por Phutela et al (2005). 1 mL do extrato enzimático foi submetido a reação com 1 mL de pectina cítrica a 1% preparada em tampão citrato 0,05 mM (pH 7). As amostras foram incubadas a 50 °C por 30 min. A atividade enzimática foi quantificada pelo método DNS a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade da pectinase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a reação de até 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de ácido galacturônico liberado por mL nas condições da reação.

Determinação da atividade de peroxidase

Atividade de peroxidase foi mensurada por meio da reação de oxidação do substrato padrão guaiacol a tetraguaiacol, conforme metodologia proposta por Devaiah e Shetty (2009). 1 mL de extrato enzimático foi adicionado ao meio reacional composto por 2 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 5,0), 0,5 mL de guaiacol 1 %, 0,8 mL de peróxido de hidrogênio 0,08 % e 2 mL de água destilada. O meio reacional foi incubado a 35 °C por 10 min em banho termostático. Posteriormente foi realizada a leitura da absorbância a 470 nm. Uma unidade de atividade (U) de peroxidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de causar um aumento na unidade de absorbância de 0,001 por mL por minuto nas condições de reação.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey considerando $p \leq 0,05$, por meio do software TIBCO Statistica 13.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo isolado de uva (F-39) foi identificado a nível de gênero como *Aspergillus* (99,9% de certeza). Existem mais de 200 espécies de fungos filamentosos dentro deste gênero, as quais apresentam grande relevância biotecnológica, sendo utilizados para a produção de ácidos orgânicos, enzimas e medicamentos (CONTESINI et al., 2010; SAMSON; VARGA, 2009). Além disso, são capazes de secretar altos níveis de proteínas, apresentam boas propriedades de fermentação, possibilitando assim a produção enzimática em larga escala (CONTESINI et al., 2010; DE VRIES, 2003).

As enzimas de degradação de polissacarídeos vegetais podem ser obtidas a partir de uma grande variedade de microrganismos. As espécies de *Aspergillus* sp. são comumente utilizadas, visto que esses fungos utilizam celulose, xiloglucano, xilano, galactoglucomanana e pectina como substrato, sendo capazes de secretar uma variedade de

enzimas capazes de degradar com eficiência diferentes estruturas (DE VRIES, 2003). Os resultados obtidos demonstram que não houve diferença estatística entre os extratos produzidos por *P. commune* e por *Aspergillus* sp. em relação às atividades de pectinase e peroxidase ($p \leq 0,05$) (Tabela 1). Por outro lado, os extratos produzidos por *P. commune* apresentaram maiores valores de atividade de celulase (16,87 U mg^{-1}) e amilase (50,73 U mg^{-1}) (Tabela 1). Ambas as espécies de fungos utilizadas neste estudo são consideradas produtoras de enzimas extracelulares que têm potencial para degradar a parede celular de biomassas, e com potencial para importantes aplicações industriais. Neste cenário, a utilização de abordagens que tenham produtividade elevada e menor custo econômico são exploradas.

As estratégias de produção de enzimas utilizando biomassas alternativas são consideradas melhores ou equivalentes às preparações comerciais (ADSUL et al., 2020). Além disso, a composição dos resíduos utilizados como substrato pode influenciar na produção enzimática (CYPRIANO; DA SILVA; TASIC, 2018), nesse caso, especialmente a casca de laranja pode ter influenciado nas atividades enzimáticas observadas (Tabela 1) por ter sido utilizada em maior quantidade. Esse resíduo possui compostos solúveis em água, como a glicose, frutose e sacarose, também é rico em pectina, celulose e hemicelulose (DE LA TORRE et al., 2019). A liberação de diferentes oligossacarídeos e açúcares livres possibilita a produção de um *pool* de enzimas, o que foi observado no presente estudo (Tabela 1), visto a variedade de atividades enzimáticas quantificadas em ambos os extratos.

A liberação e a diversidade de enzimas que são secretadas por microrganismos são influenciadas pelo substrato disponível, o que torna ainda mais relevante o uso de substratos heterogêneos, como resíduos agroindustriais, para produção de enzimas de interesse biotecnológico. A influência da fonte de carbono é determinada pela capacidade de coordenação metabólica de biossíntese e secreção de proteínas fundamentais para a sobrevivência do microrganismo (BROWN; RIES; GOLDMAN, 2014). Sendo assim, a produção de enzimas é reduzida em meios fermentativos com fonte única de carbono prontamente disponível (COLOGNA et al., 2018).

Para o desenvolvimento de *pools* enzimáticos geralmente são utilizados fungos, sendo que as cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* são amplamente utilizadas pela indústria por serem ótimos candidatos em processo estáveis e robustos de produção enzimática (ADSUL et al., 2020; CONTESINI et al., 2010). Quando avaliamos as produções enzimáticas de ambas as cepas fúngicas no sistema proposto neste trabalho (Tabela 1), pode-se prospectar a aplicação das mesmas em diferentes áreas, dentre elas a hidrólise de biomassas de frutas para produção de biocombustíveis, a aplicação na indústria de alimentos e aumento de rendimento de processos baseados em biomassas residuais. O uso de enzimas de baixo custo em processos de hidrólise enzimática é necessário para reduzir os custos da obtenção de enzimas comerciais (ADSUL et al., 2020).

Em termos de desenvolvimento biotecnológico, a avaliação de sistemas baseados no uso de enzimas como biocatalisadores ou como produtos alvo está em constante expansão. Isso ocorre principalmente pela vantagem de os processos enzimáticos apresentarem fácil operação e a capacidade de catálise ocorrer em condições amenas, reduzindo a necessidade energética.

Tabela 1 – Atividades das enzimas pectinase, celulase, peroxidase e amilase produzidas por *Penicillium commune* e *Aspergillus* sp. em meio contendo casca de laranja e camarão.

Extrato	Atividades enzimáticas (U mg ⁻¹)			
	Pectinase	Celulase	Peroxidase	Amilase
<i>P. commune</i>	8,15 ± 0,66 ^a	16,87 ± 0,40 ^b	98,58 ± 1,03 ^a	50,73 ± 1,54 ^b
<i>Aspergillus</i> sp.	6,90 ± 0,92 ^a	9,87 ± 1,80 ^a	98,65 ± 3,68 ^a	33,14 ± 3,76 ^a

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não mostraram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os progressos científicos estão a cada novo desenvolvimento mais próximos da alcançar processos de larga escala com maior viabilidade econômica, e umas das táticas é a substituição de sistemas baseados em meios fermentativos de alto custo (COLLADOS et al., 2020; PRAJAPATI et al., 2020). Nesse sentido, a utilização de resíduos agroindustriais em processos fermentativos agrega maior desenvolvimento às estratégias que visam sistemas de produção integrada baseados em processos biológicos mais sustentáveis e de menor geração de resíduos.

CONCLUSÕES

A casca de laranja e camarão demonstraram-se potenciais substratos para a produção de um *pool* de enzimas com diferentes especificidades. Os extratos obtidos da fermentação submersa desses resíduos com *P. commune* e *Aspergillus* sp., separadamente, apresentaram atividade de pectinase, celulase e amilase, principalmente peroxidase. Portanto, as cascas de laranja e camarão são uma alternativa eficiente e de baixo custo para a produção enzimática.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. et al. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 133, 1 fev. 2020.
- ANTUNES-VALCAREGGI, S. A.; HENSE, H.; FERREIRA, S. R. S. Subprodutos com importância tecnológica provenientes do resíduo de crustáceos e suas aplicações. *Revista ETech: Tecnologias para competitividade industrial*, v. 9, n. 2, p. 117-136, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, N. A.; RIES, L. N. A.; GOLDMAN, G. H. How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion. *Fungal Genetics and Biology*, v. 72, p. 48-63, 1 nov. 2014.
- COLLADOS, A. et al. Applying food enzymes in the kitchen. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, v. 21, 1 out. 2020.
- COLOGNA, N. M. et al. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 109, p. 1-10, 1 fev. 2018.
- CONTESINI, F. J. et al. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, n. 3-4, p. 163-171, 1 dez. 2010.
- CYPRIANO, D. Z.; DA SILVA, L. L.; TASIC, L. High value-added products from the orange juice industry waste. *Waste Management*, v. 79, p. 71-78, 1 set. 2018.
- DE LA TORRE, I. et al. Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, n. 15, p. 5975-5991, 11 jun. 2019.
- DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2009.
- DE VRIES, R. P. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, n. 1, p. 10-20, 2003.
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *Journal of Biochemistry*, v. 41, p. 583-603, jun. 1954.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.
- INÁCIO, F. D. et al. Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. *Advances in Microbiology*, n. 5, p. 1-8, 2015.
- KLAIC, R. et al. Optimization of solid-state fermentation for bioherbicide production by *Phoma* sp. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 34, n. 2, p. 377-384, 2017.
- MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2373-2383, 2008.
- MENDOZA-HERNÁNDEZ, D.; FORNES, F.; BELDA, R. M. Compost and vermicompost of horticultural waste as substrates for cutting rooting and growth of rosemary. *Scientia Horticulturae*, v. 178, p. 192-202, out. 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

PRAJAPATI, B. P. et al. Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 152, p. 653-663, 1 jun. 2020.

OGAWA, M. et al. Waste from the processing of farmed shrimp: A source of carotenoid pigments. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 333-337, 2007.

PANDA, S. K. et al. Microbial processing of fruit and vegetable wastes into potential biocommodities: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 38, n. 1, p. 1-16, 2 jan. 2018.

PHUTELA, U. et al. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, n. 1, p. 63-69, 2005.

RIVAS, B. et al. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 7, p. 2380-2387, 9 abr. 2008.

SADH, P. et al. Fermentation: A Boon for Production of Bioactive Compounds by Processing of Food Industries Wastes (By-Products). *Molecules*, v. 23, n. 10, p. 2560, 8 out. 2018.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, v. 47, p. 13-20, 2009.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*, v. 354, n. 2, p. 311-313, 15 jul. 2006.

SURESH, P. V; ANIL KUMAR, P. K. Enhanced degradation of α -chitin materials prepared from shrimp processing by product and production of N-acetyl-d-glucosamine by thermoactive chitinases from soil mesophilic fungi. *Biodegradation*, v. 23, n. 4, p. 597-607, 2012.

VAREJÃO, E. V. V. et al. The search for new natural herbicides - Strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. *Crop Protection*, 1 jun. 2013.