

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA APARECIDA FABRINI

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VÍSCERAS DE *Macrobrachium rosenbergii*
PROVENIENTES DE PROCESSAMENTO

PALOTINA

2020

SABRINA APARECIDA FABRINI

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VÍSCERAS DE *Macrobrachium rosenbergii*
PROVENIENTES DE PROCESSAMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, Área de Concentração de Impactos Ambientais da Atividade de Aquicultura, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Stroher

PALOTINA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F127 Fabrini, Sabrina Aparecida
Hidrólise enzimática das vísceras de *Macrobrachium rosenbergii* provenientes de processamento / Sabrina Aparecida Fabrini – Palotina, 2020.
42f.

Orientador: Eduardo Luis Cupertino Ballester
Coorientadora: Raquel Stroher
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

1. Camarão. 2. Temperatura. 3. Proteína. 4. Solubilização. I. Ballester, Luis Cupertino. II. Stroher, Raquel. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 639

Ficha catalográfica elaborada por Liliane Cristina Soares Sousa – CRB 9/1736



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AQUICULTURA E
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL - 40001016078P2

TERMO DE APROVAÇÃO

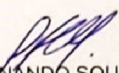
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **SABRINA APARECIDA FABRINI** intitulada: **HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VÍSCERAS DE *Macrobrachium rosenbergii* PROVENIENTES DE PROCESSAMENTO**, sob orientação do Prof. Dr. EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

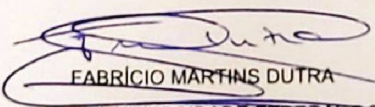
A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 28 de Fevereiro de 2020.


EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


LUIS FERNANDO SOUZA GOMES
Avaliador Externo (null)


FABRÍCIO MARTINS DUTRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por passarem a frente das dificuldades e não permitirem que eu desistisse.

Ao meu orientador professor Dr. Eduardo Luís Cupertino Ballester pela orientação, confiança e auxílio para a realização desse trabalho. Aos ensinamentos e amizade ao longo desses dois anos. Muito obrigada!

A minha coorientadora professora Dra. Raquel Stroher pelo apoio desde o início da graduação, aos ensinamentos nesta caminhada, carinho e amizade sempre. Muito obrigada! Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Luis Fernando Souza Gomes e Dr. Fabrício Martins Dutra. Obrigada por aceitarem o convite e pelas sugestões e contribuições para elaboração desse trabalho.

A minha mãe Cecília, meu pai Paulo e meu irmão Octávio pelo apoio incondicional e compreensão nos momentos de angústia. Amo vocês!

Aos amigos de longa data Amanda, Greice, Fernanda, Victória, Luzia, que sempre estão ao meu lado nas alegrias e tristezas. Amo vocês!

Aos amigos que fiz durante a caminhada, Karen, Gabi, Kelviane, Letícia, Aline, Luciana, Rafaela, Chaiana. Muito obrigada a cada uma de vocês! Sem essa amizade não seria possível a concretização desse trabalho.

As professoras Dras. Lilian Dena, dos Santos, Lucíola Thais Baldan e ao professor Dr. Américo Froés Garcez Neto pelo apoio prestado, sem o qual não seria possível obter os resultados deste trabalho.

Ao professor Dr. Fabiano pela colaboração com o desenvolvimento do delineamento experimental. Muito obrigada!

Aos técnicos Marlise, Rafaela, Sandra, Suzi, Ademir, Dr^a. Izabel e ao Dr. Fabrício, pelo auxílio na realização deste trabalho.

A todo pessoal do Laboratório de Carcinicultura pela contribuição com a seleção das amostras de camarão, muito obrigada.

A empresa Tovani Benzaquin Ingredientes que gentilmente forneceram as enzimas utilizadas para realização deste trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa.

A UFPR pela oportunidade de uma formação de qualidade.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada o meu muito obrigada!

*Peça a Deus que Ele faça tudo o que você não
consegue fazer!*

São Padre Pio

Nunca perca de vista o seu ponto de partida.

Santa Clara de Assis

*Ninguém é suficientemente perfeito que não
possa aprender com o outro.*

São Francisco de Assis

RESUMO

A aquicultura está em constante ascensão, e um dos setores que mais destaca-se é a carcinicultura, por sua ampla difusão no mundo e expansão na produção. Aliado a essa produção, a geração de resíduos é inevitável e, consequentemente, buscam-se formas de tratar e aproveitar os mesmos. Os resíduos da carcinicultura são ricos em componentes como proteínas, lipídeos e minerais que podem ser utilizados na formulação de rações, o que permite sua valorização e aproveitamento. O objetivo desse trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática proteica das vísceras de camarões *Macrobrachium rosenbergii* oriundas de seu processamento, como alternativa para aproveitamento desse material. Para o preparo das dispersões foram utilizadas as vísceras do camarão com teor de proteína bruta de 19,43% e as enzimas Alcalase® 2.4L e Flavourzyme® 1000L. Foram realizados 2 planejamentos experimentais a fim de otimizar o processo. No primeiro foi feito um delineamento fatorial 2³ sobre o efeito de três fatores, cada um em 3 níveis: temperatura (45; 55; 65 °C) e concentração das enzimas (0,75; 1,50 e 2,25% proteína da enzima/proteína do substrato). Em seguida foi feito um delineamento composto central rotacional sobre o efeito de três fatores, cada um em 5 níveis: temperatura (34,2; 41,0; 51,0; 61,0 e 67,8 °C) e concentração das enzimas (0,08; 0,25; 0,50; 0,75 e 0,92%). Para ambos os delineamentos foram conduzidas reações controles, que são reações nas mesmas condições das reações enzimáticas, mas sem a adição das enzimas. Foi demonstrado que a temperatura teve uma maior influência na hidrólise enzimática proteica das vísceras de camarão *M. rosenbergii*, obtendo-se valores de GH de 2,11%±0,25 na temperatura de 67,8 °C, e concentração das enzimas Alcalase® 2.4L e Flavourzyme® 1000L 0,50%. No entanto, uma das reações controle apresentou um GH de 2,06%±0,11 em uma temperatura de 61,0 °C, sendo estatisticamente igual ao valor encontrado para a reação enzimática. Além disso, a variável temperatura em 51,0 °C atingiu um rendimento otimizado. Dessa forma, utilizando essa temperatura, foi possível solubilizar a proteína presente nas vísceras de camarão *M. rosenbergii*, podendo tornar o hidrolisado uma fonte de proteína para a aquicultura.

Palavras- chave: camarão; temperatura; proteína; solubilização.

ABSTRACT

Aquaculture is constantly on the rise, and one of the sectors that stands out the most is carciniculture, for its wide spread in the world and expansion in production. Allied to this production, the generation of waste is inevitable and, consequently, ways of treating and taking advantage of it are sought. Carciniculture residues are rich in components such as proteins, lipids and minerals that can be used in the formulation of rations, which allows their valorization and utilization. The objective of this work was to evaluate the protein enzymatic hydrolysis of the viscera of *Macrobrachium rosenbergii* shrimps from their processing, as an alternative for the use of this material. For the preparation of the dispersions, the shrimp viscera with raw protein content of 19.43% and the enzymes Alcalase[®] 2.4L and Flavourzyme[®] 1000L were used. Two experimental plans were made in order to optimize the process. In the first one, a 2³ factorial design was made on the effect of three factors, each in 3 levels: temperature (45; 55; 65 °C) and enzyme concentration (0.75; 1.50 and 2.25% enzyme/protein protein of the substrate). Then a rotational central compound delineat was made on the effect of three factors, each in 5 levels: temperature (34.2; 41.0; 51.0; 61.0 and 67.8 °C) and enzyme concentration (0.08; 0.25; 0.50; 0.75 and 0.92%). For both delineations, control reactions were conducted, which are reactions under the same conditions as enzymatic reactions, but without the addition of enzymes. It was demonstrated that the temperature had a greater influence on the proteinic enzymatic hydrolysis of *M. rosenbergii* shrimp viscera, obtaining GH values of 2.11%±0.25 at a temperature of 67.8 °C, and concentration of the enzymes Alcalase[®] 2.4L and Flavourzyme[®] 1000L 0.50%. However, one of the control reactions presented a GH of 2.06%±0.11 at a temperature of 61.0 °C, being close to the value found for the enzymatic reaction. In addition, the temperature variable at 51.0 °C achieved an optimum yield. Thus, using this temperature, it was possible to solubilize the protein present in the viscera of *M. rosenbergii* shrimps, which could make hydrolysate a source of protein for aquaculture.

Keywords: shrimp; temperature; protein; solubilization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - GRÁFICO DE PARETO OBTIDO NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VÍSCERAS DE CAMARÕES	21
FIGURA 2 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ALCALASE® 2.4L	22
FIGURA 3 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA FLAVOURZYME® 1000L	22
FIGURA 4 - GRÁFICO DE PARETO PARA O MODELO OBTIDO NO PLANEJAMENTO DCCR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VÍSCERAS DE CAMARÕES	24
FIGURA 5 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO GRAU DE HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA ALCALASE® 2.4L.....	26
FIGURA 6 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO GRAU DE HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA FLAVOURZYME® 1000L.....	26
FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO GRAU DE HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA FLAVOURZYME® 1000L E DA ENZIMA ALCALASE® 2.4L FIXADA A TEMPERATURA 67,8 °C	29
FIGURA 8 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO GRAU DE HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA FLAVOURZYME® 1000L E DA ENZIMA ALCALASE® 2.4L FIXADA A TEMPERATURA 34,2	29
FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DO GRAU DE HIDRÓLISE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA FLAVOURZYME® 1000L E DA ENZIMA ALCALASE® 2.4L FIXADA A TEMPERATURA 51,0 °C	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MATRIZ DO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ COM OS NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS	16
TABELA 2 - MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL COM OS NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS	17
TABELA 3 - ANÁLISE QUÍMICA BROMATOLÓGICA DAS VÍSCERAS DE CAMARÕES <i>MACROBRACHIUM ROSENBERGII</i>	19
TABELA 4 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COMPLETO COM OS RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL E TEOR DE PROTEÍNA SOLÚVEL APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	19
TABELA 5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COMPLETO COM OS RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL E TEOR DE PROTEÍNA SOLÚVEL APÓS A HIDRÓLISE SEM ADIÇÃO DE ENZIMA (CONTROLE).....	20
TABELA 6 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO DCCR COMPLETO COM OS RESULTADOS DE GRAU DE HIDRÓLISE	23
TABELA 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O PLANEJAMENTO DCCR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS VÍSCERAS DE CAMARÕES	25
TABELA 8 - RESULTADOS DE GRAU DE HIDRÓLISE DAS REAÇÕES CONTROLE E REAÇÕES ENZIMÁTICAS COM DESVIO PADRÃO	27
TABELA 9 - TEORES DE PROTEÍNA SOLUBILIZADA PELA AÇÃO DAS ENZIMAS E SOMENTE COM ÁGUA E TEMPERATURA	31

LISTA DE SIGLAS

AOAC – Official Methods of Analysis

AU/g – unidade Anson por grama

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

EE – extrato etéreo

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FIGIS – Fisheries Statistics

GH – grau de hidrólise

LANA – Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal

LAPU/g – unidade de leucina aminopeptidase por grama

MM – matéria mineral

MS – matéria seca

PB – proteína bruta

SOFIA – The State of World Fisheries and Aquaculture

T – temperatura

TCA – ácido tricloroacético

UFPR – Universidade Federal do Paraná

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1:.....	17
EQUAÇÃO 2:.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Material	14
3.1.2	Métodos	15
3.1.2.1	Caracterização do resíduo de camarão <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	15
3.1.2.2	Hidrólise enzimática	15
3.1.2.3	Avaliação e otimização das condições do processo de hidrólise enzimática	16
3.1.2.4	Determinação do Grau de Hidrólise	17
3.1.3	Análise estatística	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1	Caracterização do resíduo de camarão <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	18
4.2	Otimização das condições de hidrólise enzimática	19
4.2.1	Delineamento fatorial 2 ³	19
4.2.2	Delineamento composto central rotacional	22
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	33
	APÊNDICE	39
	ANEXOS	41

1 INTRODUÇÃO

Devido a estabilidade da produção de pescado por captura desde o final dos anos 1980, a aquicultura está provendo o pescado necessário para atender a demanda mundial deste alimento (FAO, 2018). Esta atividade tem sido frequentemente promovida como um caminho para aumentar os lucros das comunidades tradicionais, melhorando assim, a segurança alimentar local (THE WORLD BANK, 2013). Globalmente, a produção aquícola tem crescido significativamente nos últimos 30 anos. Em 2018, a produção total de animais aquáticos foi de 82,1 milhões de toneladas, rendendo US \$ 250,1 bilhões (FAO, 2020).

A criação de camarões é o setor da aquicultura que apresenta o maior crescimento na produção, com destaque para a espécie marinha *Litopenaeus vannamei*, vulgarmente conhecida como camarão branco do Pacífico (FAO, 2014). A criação de camarões de água doce também ocupa um lugar de destaque entre as atividades de aquicultura. Os dados mais recentes da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2018) mostraram uma produção de aproximadamente 548.000 toneladas com destaque para as espécies *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) e *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849). Atualmente, a produção de camarões contribui com mais de 60% (7,8 milhões de toneladas) do consumo mundial (FAO-FIGIS, 2017).

O consumo de camarões aumentou significativamente devido ao rápido crescimento da indústria de *fast-food*, entretanto, apenas aproximadamente 50% do camarão é comestível, o restante é descartado como lixo não comestível, sendo o cefalotórax responsável por cerca de 44% deste desperdício (Ferrer et al., 1996; Gernat, 2001). Além dos resíduos do cefalotórax e exoesqueleto também há a produção de vísceras de camarão, onde, a maior parte destes resíduos do processamento, sobrecarregam aterros sanitários (Costa & Souza, 2012). Esta realidade implica um maior volume de resíduos, cuja disposição inadequada pode levar a problemas ambientais e para a saúde humana (Heu, Kim, & Shahidi, 2003; Yadav et al., 2019; Zhang et al., 2018).

Os resíduos de camarões podem ser compostos por partes do cefalotórax, exoesqueleto e vísceras, que podem ser uma excelente fonte proteica, apresentando em sua composição, aminoácidos essenciais, conferindo ótima palatabilidade e atratividade à ração animal (Guimarães et al., 2008). Esses resíduos de camarão têm sido utilizados na produção de quitosana, com aplicações na medicina e nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química, além da quitosana, os carotenóides, os hidrolisados proteicos e o glicosaminoglicanos também são extraídos do cefalotórax e exoesqueleto de camarões (Cahú

108 et al., 2012). Desta forma, é importante que exista um aproveitamento destes resíduos de
109 forma a evitar a disposição incorreta no meio ambiente e também como forma de utilizar os
110 mesmos como fonte de substâncias de alto valor econômico e nutricional (Kim & Venkatesan,
111 2014).

112 Um dos processos alternativos para esse aproveitamento é a hidrólise enzimática das
113 proteínas encontradas nos subprodutos do pescado, que possibilita agregar valor nutricional a
114 eles. O processo envolve o uso de enzimas para clivar as ligações peptídicas das proteínas e
115 pode ser usado para alterar as propriedades químicas, funcionais e sensoriais das proteínas,
116 sem prejudicar seu valor nutricional (Pasupuleti & Braun, 2010). A hidrólise enzimática
117 proteica tem muitas vantagens quando comparada a outros métodos, pois ocorre em condições
118 brandas de temperatura, pH e pressão, produzem hidrolisados mais homogêneos e as enzimas
119 utilizadas no processo possuem especificidade ao substrato, diminuindo a probabilidade de
120 ocorrerem reações indesejáveis, que possam resultar na formação de produtos tóxicos
121 (Damodaran, Parkin & Fennema, 2010; Duarte de Hollanda & Netto, 2006; He et al., 2013).

122 Um dos critérios para quantificar a reação de proteólise é o grau de hidrólise (GH)
123 (Nielsen & Olsen, 2002). O GH foi definido segundo Adler-Nissen (1986), como o número de
124 ligações peptídicas clivadas ou número de grupos amino livres formados durante o processo
125 de hidrólise, expresso em equivalente de hidrólise. O GH também é amplamente usado como
126 indicador para comparar diferentes hidrolisados de proteínas, sendo o principal determinante
127 das propriedades do hidrolisado de proteína (Mahmoud, 1994; Neves et al., 2004).

128 Para a aquicultura, a proteína representa o componente mais oneroso e importante na
129 fabricação de ração (Savoie et al., 2011), pois é o nutriente que exerce maior influência no
130 crescimento animal, bem como no ganho de peso, conversão alimentar e na composição de
131 carcaça (Araripe et al., 2011). Plascencia et al. (2002), estudando a substituição parcial da
132 farinha de peixe pelo hidrolisado proteico da cabeça de camarão para alevinos de tilápia,
133 concluíram que esse ingrediente é uma promissora fonte proteica para a espécie, nessa fase,
134 melhorando a taxa de crescimento com níveis de inclusão de até 15%.

135 Diante do exposto, os resíduos do processamento do camarão podem ser uma fonte
136 alternativa para a produção de hidrolisados proteicos permitindo sua valorização e ainda
137 usufruindo de suas propriedades funcionais.

138

139

140 2 OBJETIVOS

141

142 2.1 Objetivo geral

143

144 O objetivo desse trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática proteica das vísceras
145 resultantes do processamento de camarões *Macrobrachium rosenbergii* como processo
146 alternativo para aproveitamento desse material.

147

148 2.2 Objetivos específicos

149

150 ✓ Realizar a hidrólise enzimática proteica das vísceras do camarão *Macrobrachium*
151 *rosenbergii*;

152 ✓ Analisar a temperatura e a concentração das enzimas Alcalase® 2.4L e Flavourzyme®
153 1000L na catálise para a obtenção do grau de hidrólise (GH);

154 ✓ Comparar o os valores de GH das vísceras hidrolisadas com enzima e sem adição de
155 enzima.

156

157 3 MATERIAL E MÉTODOS

158

159 3.1 Material

160

161 Os resíduos do camarão *M. rosenbergii* (cefalotórax, carapaças, pereópodes e vísceras)
162 foram obtidos de indústria de processamento localizada no Oeste do Paraná. As amostras
163 foram selecionadas para retirada de carapaças, cefalotórax e pereópodes, restando apenas as
164 vísceras. Como o trabalho tem como intuito produzir um componente que possa ser utilizado
165 como suplemento na ração animal, foram utilizadas apenas as vísceras para o procedimento
166 enzimático, pois a proteína presente nesse material é digestível. O restante do material
167 (carapaça, pereópodes), são compostos principalmente por quitina, material que pode
168 interferir na digestibilidade animal (Brito et al., 2008). Posteriormente foram secas em estufa
169 de secagem e esterilização (marca Marconi, modelo MA 033/5) a 55 °C por 72 horas e
170 armazenadas em freezer a -3 °C até o uso para a produção dos hidrolisados. Para a hidrólise
171 enzimática foram utilizadas as proteases comerciais Alcalase® 2.4L e Flavourzyme® 1000L
172 (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) fornecidas pela Tovani Benzaquen Ingredientes (São
173 Paulo, Brasil).

174 Para cada reação enzimática, foram utilizadas simultaneamente proteases que atuam
175 em localidades diferentes da cadeia proteica no processo, a fim de melhorar a catálise. A
176 Flavourzyme® 1000L apresenta atividade enzimática na qual sua atuação é exopeptidase, que
177 libera aminoácidos por hidrólise da ligação peptídica N-terminal é uma enzima produzida pela
178 fermentação de um tipo de *Aspergillus oryzae*, apresentando pH ótimo em torno de 6,0 e
179 temperatura ótima em torno de 50 °C. Sua atividade declarada é de 1100 LAPU/g (Unidades
180 de Leucina Aminopeptidase) (Jung et al., 2006).

181 A Alcalase® 2.4L é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa de
182 uma cepa selecionada do *Bacillus licheniformis*. É uma protease bacteriana altamente
183 eficiente desenvolvida para a hidrólise de todos os tipos de proteínas. O principal componente
184 enzimático, a Subtilisina A, é uma endoproteínase com condições ótimas de temperatura 55 e
185 70 °C, dependendo do tipo do substrato, e pH entre 6 e 8. Sua atividade declarada é de 2,4
186 Unidades Anson por grama (AU/g), em que uma Unidade Anson equivale a um
187 miliequivalente de tirosina liberada na hidrólise de hemoglobina por minuto (Novozymes,
188 2018).

189

190 3.1.2 Métodos

191

192 3.1.2.1 Caracterização do resíduo de camarão *M. rosenbergii*

193

194 Foi realizada a caracterização centesimal do resíduo *in natura*, no Laboratório de
195 Nutrição e Alimentação Animal (LANA), na Universidade Federal do Paraná (UFPR) Setor
196 Palotina. Para isso foram realizadas análises bromatológicas para a determinação dos teores
197 de matéria seca (MS) submetidos a secagem à 105 °C em estufa (Biopar Equipamentos
198 Eletro-Eletrônicos Ltda MOD: S15OSD) por 12 horas; proteína bruta (PB) realizada pelo
199 método de Kjeldahl; extrato etéreo (EE) em extrator (ANKOM® XT10) e matéria mineral
200 (MM) obtido pela queima da amostra à 600 °C em forno mufla (GP científica) por 3 horas. Os
201 procedimentos foram realizados de acordo com a Association of Official Analytical Chemists
202 – AOAC (2010).

203

204 3.1.2.2 Hidrólise enzimática

205

206 Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados utilizando-se 10 gramas de
207 amostra que foram descongeladas e homogeneizadas com 100 mL de água destilada.

Posteriormente era realizada a adição das enzimas conforme planejamento experimental e a suspensão era mantida em um *shaker* (SP – 223 – SPLABOR) por 2 horas a 100 rpm de agitação, com ajuste de temperatura conforme planejamento experimental.

Ao fim do processo, uma alíquota das amostras seguia para análise do GH, e o restante para a inativação enzimática, as quais eram colocadas em um banho maria de bocas (Quimis® modelo Q334M-28,) à 90 °C por 15 minutos e, posteriormente, filtradas em filtro de polipropileno. Em seguida, era realizada a análise de proteína total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2010).

Os testes de hidrólise enzimática foram realizados de acordo com planejamentos experimentais, simultaneamente com ensaios controle, realizados sem a adição das enzimas.

3.1.2.3 Avaliação e otimização das condições do processo de hidrólise enzimática

Visando analisar as faixas das variáveis que influenciam a hidrólise enzimática das vísceras de camarão, inicialmente foi elaborado um delineamento fatorial 2³ no qual foram avaliadas as variáveis temperatura (45; 55 e 65 °C), conforme condições ótimas das enzimas e concentração das enzimas Alcalase® 2.4L e Flavourzyme® 1000L (0,75; 1,50 e 2,25% proteína da enzima / proteína do substrato), de acordo com a literatura, cuja matriz referente ao planejamento citado, sendo as variáveis codificadas X1 (T °C); X2 (C. Alc) e X3 (C. Fla) está exposta na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz do Delineamento Fatorial 2³ com os Níveis Reais e Codificados

Ensaio	X1 (T °C)	X2 (C. Alc %)	X3 (C. Fla %)	T (°C)	C. Alc (%)	C. Fla (%)
1	-1	-1	-1	45,0	0,75	0,75
2	1	-1	-1	65,0	0,75	0,75
3	-1	1	-1	45,0	2,25	0,75
4	1	1	-1	65,0	2,25	0,75
5	-1	-1	1	45,0	0,75	2,25
6	1	-1	1	65,0	0,75	2,25
7	-1	1	1	45,0	2,25	2,25
8	1	1	1	65,0	2,25	2,25
9	0	0	0	55,0	1,50	1,50
10	0	0	0	55,0	1,50	1,50
11	0	0	0	55,0	1,50	1,50
12	0	0	0	55,0	1,50	1,50

X1 (T °C) (Temperatura); X2 (C. Alc) (Concentração Alcalase) e X3 (C. Fla) (Concentração Flavourzyme);
T (°C) (Temperatura); C. Alc (%) (Concentração de Alcalase); C. Fla (%) (Concentração Flavourzyme)
FONTE: O autor (2020).

Ao determinar os intervalos significativos das variáveis sobre a hidrólise, foi proposto um delineamento composto central rotacional (DCCR), visando a otimização do

processo. O planejamento DCCR utilizado contemplou 3 variáveis (temperatura, concentração da enzima Alcalase® 2.4L e concentração da enzima Flavourzyme® 1000L), com os níveis (-1 e +1), os pontos axiais (-1,68 e +1,68) e quatro repetições no ponto central (0), resultando em 18 ensaios. Sendo que os valores das variáveis foram: temperatura (34,2; 41,0; 51,0; 61,0 e 67,8 °C) e concentração das enzimas Alcalase® 2.4L e Flavourzyme® 1000L (0,08; 0,25; 0,50; 0,75 e 0,92% proteína da enzima / proteína do substrato), cuja a matriz referente ao planejamento citado, sendo as variáveis codificadas X1 (T °C); X2 (C. Alc) e X3 (C. Fla) está exposta na Tabela 2. Os valores de referência das variáveis estudadas foram baseados em dados encontrados na literatura (Dey & Dora, 2014; Yen & May, 2019; Gunasekaran et al., 2014; Zhang et al., 2016).

Tabela 2. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional com os Níveis Reais e Codificados

Ensaio	X1 (T °C)	X2 (C. Alc%)	X3 (C. Fla %)	T (°C)	C. Alc (%)	C. Fla (%)
1	-1	-1	-1	41,0	0,25	0,25
2	-1	-1	1	61,0	0,25	0,25
3	-1	1	-1	41,0	0,75	0,25
4	-1	1	1	61,0	0,75	0,25
5	1	-1	-1	41,0	0,25	0,75
6	1	-1	1	61,0	0,25	0,75
7	1	1	-1	41,0	0,75	0,75
8	1	1	1	61,0	0,75	0,75
9	-1,68	0	0	34,2	0,50	0,50
10	1,68	0	0	67,8	0,50	0,50
11	0	-1,68	0	51,0	0,08	0,50
12	0	1,68	0	51,0	0,92	0,50
13	0	0	-1,68	51,0	0,50	0,08
14	0	0	1,68	51,0	0,50	0,92
15	0	0	0	51,0	0,50	0,50
16	0	0	0	51,0	0,50	0,50
17	0	0	0	51,0	0,50	0,50
18	0	0	0	51,0	0,50	0,50

X1 (T °C) (Temperatura); X2 (C. Alc) (Concentração Alcalase) e X3 (C. Fla) (Concentração Flavourzyme);
T (°C) (Temperatura); C. Alc (%) (Concentração de Alcalase); C. Fla (%) (Concentração Flavourzyme)

FONTE: O autor (2020).

3.1.2.4 Determinação do Grau de Hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi estimado segundo o método descrito por Hoyle & Marrit (1994) e por Baek & Cadwallader (1995), expresso como a porcentagem de proteínas solúveis no ácido tricloroacético (TCA) em relação à quantidade de proteína inicial total, sendo a proteína solúvel em TCA obtida pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), em mg/mL e a proteína total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2010), em mg/mL, calculado utilizando-se a Equação 1:

$$GH = \frac{\text{Proteína Solúvel em TCA}}{\text{Proteína Total da Amostra}} \times 100$$

(1)

Finalizado o tempo de hidrólise enzimática, alíquotas de 1 mL de hidrolisado (fase solúvel) foram inativadas pela adição de 9 mL de solução de TCA 6,5% e deixadas em repouso por 10 minutos para inativação enzimática. Após filtração em papel quantitativo (JP41 – Faixa Preta), para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA, foi determinado o teor de proteínas solúveis no filtrado pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), expresso em miligramas de albumina. As leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis digital (Nova modelo 1600) a 625 nanômetros.

3.1.3 Análise estatística

Todos os delineamentos foram realizados em triplicata. Foi realizado um delineamento fatorial 2^3 com 12 ensaios, sendo 4 ensaios do ponto central a fim de investigar quais variáveis eram significativas, para isso foi utilizado um gráfico de Pareto e superfícies de resposta. Verificado quais as variáveis significativas, foi feito um DCCR com 18 ensaios, sendo 4 no ponto central, com intuito de otimizar as condições de hidrólise enzimática, foi analisado gráfico de Pareto, superfícies de resposta e feita análise de variância para avaliar a significância dos resultados, por meio do teste F. Os resultados foram expressos como os valores médios com desvios padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das vísceras de camarão *M. rosenbergii*

Os resultados apresentados na Tabela 3 referem-se aos componentes que constituem as vísceras provenientes de *M. rosenbergii*, através da caracterização química do mesmo. De acordo com Cahú et al. (2012) e Cheong et al. (2014), os resíduos de camarões, são ricos em proteínas e fornecem aminoácidos essenciais para suplementos de ração animal ou nutrição humana.

292 **Tabela 3.** Análise Química Bromatológica das Visceras de Camarões *Macrobrachium rosenbergii*

Componente	Resultado base seca (%)
Umidade Total	-
Matéria Seca Total	100±0,33
Proteína Bruta	19,43±0,28
Extrato Etéreo	59,70±3,60
Matéria Mineral	2,56±0,02

293 FONTE: O autor (2020).

294

295 O teor de proteína nos resíduos de camarão compreende aproximadamente 35% a
 296 65% do seu peso seco, e as quantidades dependem dos modos e espécies de processamento
 297 (Mizani et al., 2005), cujos aminoácidos essenciais e aminoácidos não essenciais são 56,8% e
 298 43,2%, respectivamente (Narayan et al., 2010). No estudo de Synowiecki & Al-Khateeb
 299 (2000), utilizando os resíduos de casca do processamento do camarão *Crangon crangon*,
 300 determinaram que o peso seco do camarão compreende 18% de quitina, 43% de proteína,
 301 29% de cinza e 10% de lipídeos. Guerard et al., (2007), utilizaram resíduos de camarões
 302 selvagens (uma mistura de *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus subtilis*) sendo o teor de proteína
 303 bruta no resíduo de 51,9% (peso seco).

304 As diferenças observadas entre esse trabalho e os estudos da literatura devem-se
 305 principalmente pelo tipo de material utilizado na caracterização, enquanto no presente estudo
 306 foi utilizado apenas vísceras, nos estudos de Synowiecki & Al-Khateeb (2000), Guerard et al.
 307 (2007) os autores utilizaram casca, e todo o resíduo do camarão, respectivamente. Além disso,
 308 fatores como tipo de espécie, idade, estação do ano e condições ambientais também podem
 309 afetar a composição do crustáceo e dificultar a comparação com o estudo (Guerard et al.,
 310 2007).

311

312 4.2 Otimização das condições de hidrólise enzimática

313

314 4.2.1 Delineamento fatorial 2³

315

316 Na Tabela 4 estão apresentados os resultados referentes aos ensaios do delineamento
 317 fatorial 2³ de concentração de proteína solúvel e os correspondentes teores de proteína solúvel
 318 após a hidrólise enzimática.

319

320 **Tabela 4.** Matriz do Planejamento Fatorial 2³ completo com os resultados de concentração de proteína solúvel e
 321 teor de proteína solúvel após a hidrólise enzimática

Ensaio	T (°C)	C. Alc (%)	C. Fla (%)	Concentração Proteína Solúvel (mg/ml)	Teor Proteína Solubilizada (%)
1	45,0	0,75	0,75	0,71±0,02	36,45±0,80
2	65,0	0,75	0,75	1,20±0,17	61,66±5,18

3	45,0	2,25	0,75	0,51±0,02	26,13±1,24
4	65,0	2,25	0,75	0,99±0,05	51,03±2,48
5	45,0	0,75	2,25	0,47±0,05	24,08±2,49
6	65,0	0,75	2,25	0,86±0,02	44,06±1,12
7	45,0	2,25	2,25	0,42±0,02	21,72±0,96
8	65,0	2,25	2,25	0,72±0,05	36,99±2,67
9	55,0	1,50	1,50	0,63±0,02	32,29±1,19
10	55,0	1,50	1,50	0,76±0,05	39,05±2,50
11	55,0	1,50	1,50	0,61±0,04	31,55±2,13
12	55,0	1,50	1,50	0,64±0,04	32,77±2,13

322 T (°C) (Temperatura); C. Alc (%) (Concentração de Alcalase); C. Fla (%) (Concentração Flavourzyme); DP±
 323 (desvio padrão)

324 FONTE: O autor (2020).

325

326 Observa-se na Tabela 4, que a maior concentração de proteína solúvel foi obtida no
 327 ensaio 2 (1,20±0,17 mg/mL) conduzido a 65,0 °C e concentração de 0,75% para ambas as
 328 enzimas. Na Tabela 5 estão apresentados os resultados referentes aos ensaios do delineamento
 329 fatorial 2³ de concentração de proteína solúvel e os correspondentes teores de proteína solúvel
 330 após a hidrólise sem adição de enzima (controle).

331

332 **Tabela 5.** Matriz do Planejamento Fatorial 2³ completo com os resultados de concentração de proteína solúvel e
 333 teor de proteína solúvel após a hidrólise sem adição de enzima (controle)

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração Proteína Solúvel (mg/ml)	Teor de Proteína Solubilizada (%)
1	45,0	0,72±0,06	37,08±2,84
2	65,0	0,89±0,05	45,60±2,70
3	45,0	0,75±0,05	38,37±2,57
4	65,0	1,13±0,07	58,38±3,57
5	45,0	0,41±0,04	21,21±1,82
6	65,0	0,88±0,02	45,37±0,81
7	45,0	0,57±0,04	29,35±1,88
8	65,0	0,69±0,04	35,32±2,13
9	55,0	0,61±0,02	31,37±1,15
10	55,0	0,61±0,02	31,32±1,17
11	55,0	0,59±0,07	30,39±3,55
12	55,0	0,66±0,02	33,79±1,02

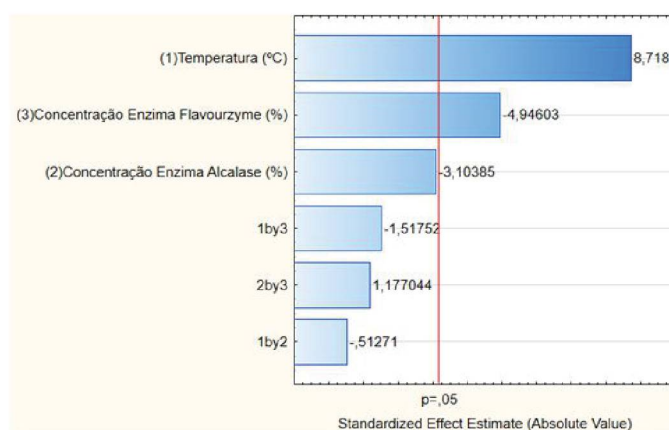
334 DP± (desvio padrão)

335 FONTE: O autor (2020).

336

337 Ao comparar os resultados de concentração de proteína solúvel apresentados nas
 338 Tabelas 4 e 5, nota-se que em temperaturas mais altas, nas reações enzimáticas, os resultados
 339 foram melhores que os das reações controle, isso mostra que a temperatura apresenta
 340 influência positiva no processo de hidrólise. No entanto, em temperaturas menores os
 341 resultados das reações controles foram melhores que nas reações enzimáticas, isso pode ter
 342 ocorrido devido as enzimas comerciais atuarem melhor em temperaturas entre 50 e 70 °C
 343 (Jung et al., 2006; Novozymes, 2018).

Na Figura 1 é apresentado o gráfico de Pareto, onde os valores à direita da linha vermelha são significativos. Desta forma, observa-se que a temperatura é a única variável significativa positivamente, ou seja, quanto maiores os valores de temperatura melhores serão os resultados de concentração de proteína solúvel. Já a concentração da enzima Flavourzyme® 1000L foi significativa negativamente, ou seja, a enzima não incrementou na solubilização proteica.



351

Figura 1. Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial 2^3 da hidrólise enzimática das vísceras de camarões, onde os valores à direita da linha vermelha são significativos.

FONTE: O autor (2020).

355

O planejamento fatorial auxilia na direção a ser tomada nos próximos experimentos para os intervalos de variáveis, e para tanto, foram obtidas as superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 2 e 3.

359

360

361

362

363

364

365

366

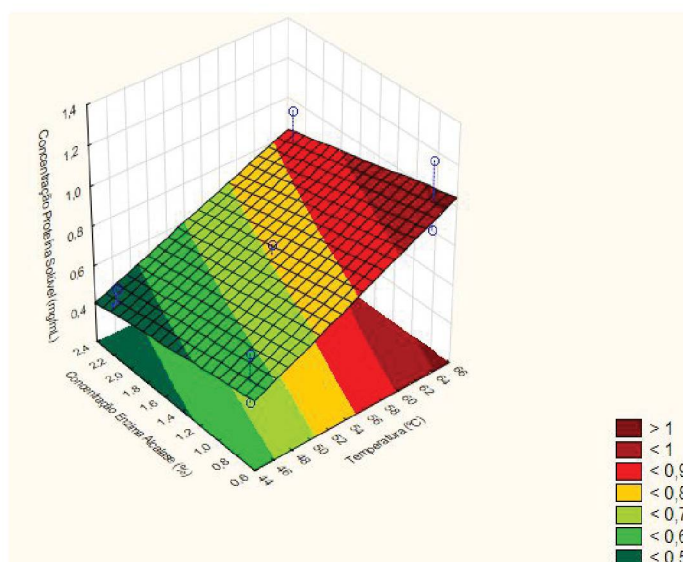


Figura 2. Superfície de resposta da concentração de proteína solúvel em função da temperatura e da concentração da enzima Alcalase® 2.4L
 FONTE: O autor (2020).

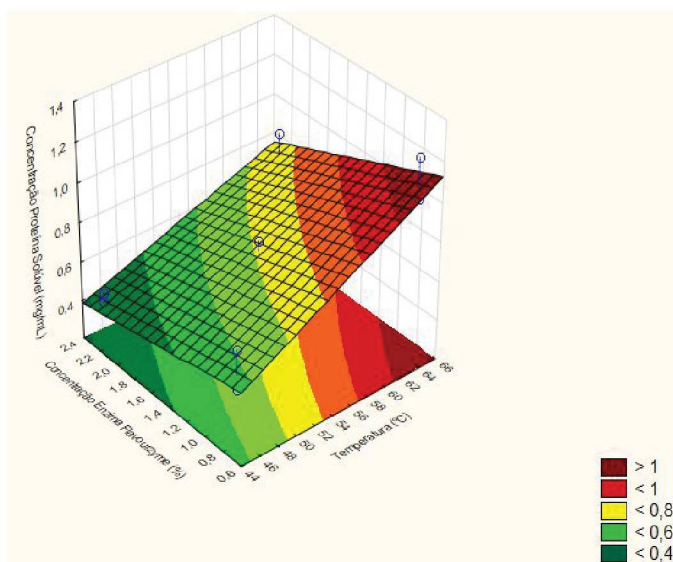


Figura 3. Superfície de resposta da concentração de proteína solúvel em função da temperatura e da concentração da enzima Flavourzyme® 1000L
 FONTE: O autor (2020).

Nas Figuras 2 e 3 são apresentadas as superfícies de resposta que representam o comportamento da concentração de proteína solúvel mediante a interação das variáveis temperatura e concentração das enzimas Alcalase® 2.4L e Flavourzyme® 1000L respectivamente. Ambas as superfícies apresentam comportamento similar, visto que, em maiores temperaturas atingem-se os valores mais favoráveis de concentração de proteína solúvel, mesmo usando baixas concentrações das enzimas.

Ao aumentar a temperatura, bem como a energia cinética das enzimas, a taxa reacional torna-se maior. O aumento gradativo da temperatura favorece as colisões entre os sítios ativos das enzimas e o substrato, de forma a aumentar a taxa de reação (Fields, 2001; Shuler & Kargi, 2002). Tal fato foi exemplificado no presente trabalho, no qual temperaturas mais elevadas beneficiaram as reações.

4.2.2 Delineamento composto central rotacional

Como observado no delineamento fatorial 2³, a temperatura foi a única variável significativa positivamente. Além disso, foi verificado nas superfícies de resposta que menores concentrações das enzimas já eram favoráveis para bons resultados de concentração de proteína solúvel. Tomando isso como base, foram modificados os níveis das variáveis em um novo planejamento experimental do tipo DCCR, com o intuito de otimizar as condições experimentais da hidrólise enzimática das vísceras de camarões.

Na Tabela 6 está apresentada a matriz referente ao DCCR com as variáveis utilizadas e com os resultados de GH após a hidrólise enzimática. Observa-se que no ensaio 10 obteve-se um maior resultado de GH 2,11%±0,25, correspondente a temperatura de 67,8 °C e concentração de 0,50% para ambas as enzimas.

Tabela 6. Matriz do Planejamento DCCR completo com os resultados de grau de hidrólise

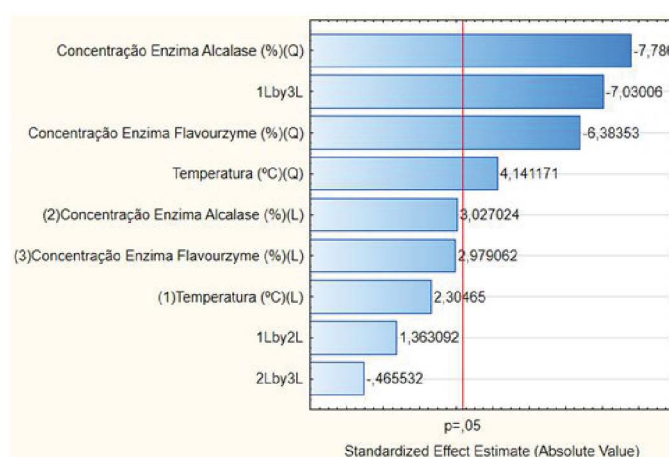
Ensaio	T (°C)	C. Alc (%)	C. Fla (%)	GH (%)
1	41,0	0,25	0,25	1,48±0,28
2	61,0	0,25	0,25	1,59±0,15
3	41,0	0,75	0,25	1,48±0,04
4	61,0	0,75	0,25	2,00±0,04
5	41,0	0,25	0,75	1,79±0,57
6	61,0	0,25	0,75	1,59±0,03
7	41,0	0,75	0,75	2,05±0,11
8	61,0	0,75	0,75	1,66±0,08
9	34,2	0,50	0,50	1,83±0,13
10	67,8	0,50	0,50	2,11±0,25
11	51,0	0,08	0,50	1,40±0,01
12	51,0	0,92	0,50	1,37±0,09
13	51,0	0,50	0,08	1,41±0,09
14	51,0	0,50	0,92	1,49±0,11
15	51,0	0,50	0,50	1,88±0,09
16	51,0	0,50	0,50	1,86±0,13
17	51,0	0,50	0,50	1,86±0,14
18	51,0	0,50	0,50	1,75±0,08

T (°C) (Temperatura); C. Alc (%) (Concentração de Alcalase); C. Fla (%) (Concentração Flavourzyme); GH (%) (Grau de hidrólise); DP± Desvio padrão
 FONTE: O autor (2020).

O hidrolisado de proteína de camarão, produzido a partir de cabeça e casca de *Penaeus monodon*, usando Alcalase com uma razão de enzima-substrato de 1,05% a 50 °C por 30 min resultou em um valor de GH de 2,3%, valor este próximo ao obtido nesse estudo (Dey & Dora, 2014). Yen & May (2019) obtiveram um GH de 4,21% com o hidrolisado do subproduto do camarão da indústria de processamento de camarão, utilizando alcalase com uma concentração fixa de 0,2% (4,8AU / kg de proteína), 0,25% de flavourzyme pH 6, 55 °C por 5 horas. Zhang et al. (2016), avaliaram a otimização do processo de hidrólise enzimática de resíduos de camarão rosa do norte, incluindo cabeças, cascas e caudas, onde observaram que o GH foi maximizado em 48,83 ± 0,30% utilizando a relação enzima-substrato de 1,64%,

tempo de hidrólise a 3,59 h, pH inicial a 9 e temperatura a 52,57 °C. Gunasekaran et al. (2014), obtiveram após 3 horas de hidrólise de cabeça de *Metapenaeus dobsoni* em pH 8,2, temperatura de 45,4 °C, e relação enzima-susbttrato de 1,8%, GH de 42,44%. Com relação as diferenças observadas entre o presente estudo e o as pesquisas de Zhang et al. (2016) e Gunasekaran et al. (2014), podem ser explicadas pelo maior tempo de reação de hidrólise por estes autores, ou também pela diferença química e física nos resíduos utilizados.

Na Figura 4 é apresentando o gráfico de Pareto para o modelo obtido no planejamento DCCR da hidrólise enzimática das vísceras de camarão, onde os valores que se encontram à direita da linha vermelha são significativos, é possível observar que a temperatura em sua forma quadrática foi significativa positivamente. Já a interação das variáveis concentração da enzima Alcalase® 2.4L em sua forma quadrática e temperatura em sua forma linear, bem como, a concentração da enzima Flavourzyme® 1000L tanto em sua forma linear como em sua forma quadrática foram significativas negativamente. A temperatura foi a única variável significativa, no entanto, segundo Tavano (2013), o tratamento térmico pode melhorar a velocidade de proteólise, mas, pode alterar a acessibilidade do substrato para hidrólise e o perfil do hidrolisado, pois a estrutura enzimática pode ser modificada, ou seja, ocorre a desnaturação da enzima, o que impede o encaixe específico com o substrato. Sendo assim, existe uma temperatura ideal para cada enzima, na qual a taxa reacional é máxima (Fields, 2001; Shuler & Kargi, 2002). Essa pode ser uma das justificativas, na qual as enzimas não terem significância no processo de hidrólise proteica.



451

452 **Figura 4.** Gráfico de Pareto para o modelo obtido no planejamento DCCR da hidrólise enzimática das vísceras
453 de camarões

454 FONTE: O autor (2020)

455

Pela análise de variância, pelo teste F, comparando-se o valor de F calculado com o F tabelado, é possível afirmar se o modelo proposto é válido e se os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais.

Tabela 7. Análise de Variância obtida para o planejamento DCCR da hidrólise enzimática das vísceras de camarões

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}
Regressão	0,635545	4	0,158886	21,46933
Resíduo	0,096208	13	0,007401	
Falta de Ajuste	0,14704	10	0,014704	3,885835
Erro Puro	0,011352	3	0,003784	
Total	0,9375	17		

FONTE: O autor (2020).

Na Tabela 7 está apresentada a análise de variância da hidrólise enzimática das vísceras de camarão pelo teste F, onde para a regressão $F_{cal} > F_{tab} (4,13; 0,05) = 3,18$, sendo esse resultado significativo. Já para a falta de ajuste $F_{cal} < F_{tab} (10,3; 0,05) = 8,79$, visto que a falta de ajuste não é significativa. Considerando esses resultados o modelo proposto é válido e é possível escrever o modelo matemático empírico de GH em função das variáveis reais e suas interações que foram significativas, o coeficiente de correlação foi bom ($R^2 = 0,831$). A função que representa o processo está apresentada na Equação 2.

$$GH = 1,831 + 0,071xT^2 - 0,134 \times C.Alc^2 - 0,110 \times C.Fla^2 - 0,152 T \times C.Fla \quad (2)$$

Foi possível observar que os maiores resultados de GH foram encontrados nas temperaturas extremas avaliadas e nas concentrações medianas da enzima Alcalase® 2.4L (Figura 5).

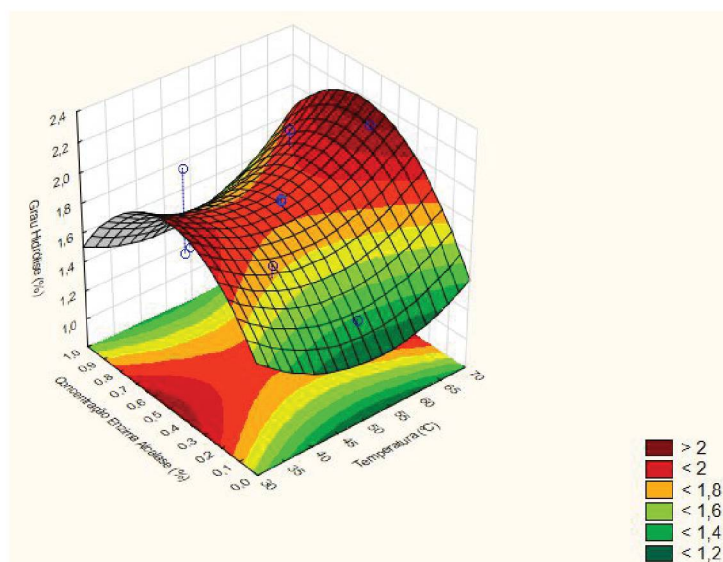


Figura 5. Superfície de resposta do grau de hidrólise em função da temperatura e da concentração da enzima Alcalase® 2.4L

Na Figura 6 é apresentada a superfície de resposta para os valores de GH em relação as variáveis concentração de Flavourzyme® 1000L e temperatura da reação. É possível observar que os maiores resultados de GH foram encontrados em duas regiões distintas: para maiores concentrações dessa enzima e menores temperaturas, e também para menores concentrações dessa enzima e maiores temperaturas.

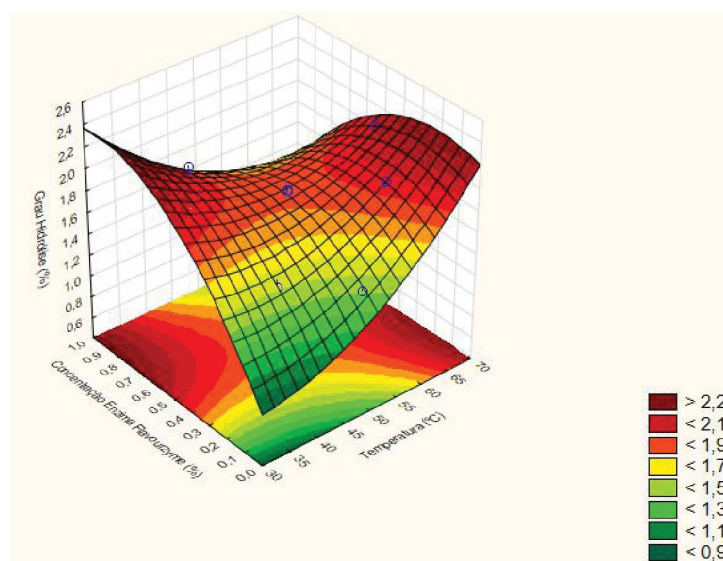


Figura 6. Superfície de resposta do grau de hidrólise em função da temperatura e da concentração da enzima Flavourzyme® 1000L
FONTE: O autor (2020).

491

492 Na Tabela 8 é apresentado os valores de GH das reações controle (sem adição de
 493 enzima) e reações enzimáticas para comparação dos resultados.

494

495 **Tabela 8.** Resultados de grau de hidrólise das reações controle e reações enzimáticas com desvio padrão

Ensaio	T (°C)	C. Alc (%)	C. Fla (%)	GHreações enzimáticas (%)	GH reações controle (%)
1	41,0	0,25	0,25	1,48±0,28	1,60±0,11
2	61,0	0,25	0,25	1,59±0,15	2,06±0,11
3	41,0	0,75	0,25	1,48±0,04	1,64±0,17
4	61,0	0,75	0,25	2,00±0,04	1,86±0,13
5	41,0	0,25	0,75	1,79±0,57	1,40±0,07
6	61,0	0,25	0,75	1,59±0,03	1,74±0,12
7	41,0	0,75	0,75	2,05±0,11	1,62±0,09
8	61,0	0,75	0,75	1,66±0,08	1,90±0,38
9	34,2	0,50	0,50	1,83±0,13	1,65±0,24
10	67,8	0,50	0,50	2,11±0,25	1,94±0,30
11	51,0	0,08	0,50	1,40±0,01	1,34±0,21
12	51,0	0,92	0,50	1,37±0,09	1,45±0,05
13	51,0	0,50	0,08	1,41±0,09	1,61±0,09
14	51,0	0,50	0,92	1,49±0,11	1,52±0,09
15	51,0	0,50	0,50	1,88±0,09	1,79±0,21
16	51,0	0,50	0,50	1,86±0,13	1,71±0,19
17	51,0	0,50	0,50	1,86±0,14	1,86±0,22
18	51,0	0,50	0,50	1,75±0,08	1,74±0,09

496 GH (Grau de hidrólise) DP± (Desvio padrão)

497

498 No ensaio 2 da reação controle o GH obtido foi de 2,06%±0,11, na temperatura de
 499 61,0 °C. No ensaio 10 da reação enzimática o valor de GH foi 2,11%±0,25, na temperatura de
 500 67,8 °C e concentração enzimática 0,50%. Tais resultados são estatisticamente iguais, o que
 501 não justifica a utilização das enzimas, dado que, um dos limitantes do uso de enzimas nos
 502 processos industriais é o alto custo de produção e purificação (Monteiro & Silva, 2009;
 503 Nalinanon; Benjakul; Visessanguan & Kishimura, 2009).

504 Apesar dos processos enzimáticos serem considerados uma alternativa vantajosa para
 505 acelerar as reações, nesse caso, ao comparar os resultados da Tabela 8, observou-se que as
 506 reações controles (sem adição de enzima) alcançaram resultados de GH relevantes, sendo em
 507 alguns casos até maiores do que nas reações enzimáticas. Isso pode ter ocorrido devido a
 508 algumas enzimas hidrolíticas endógenas que são encontradas no material biológico, como
 509 proteases, lipases e carboidrases as quais, sob certas condições, hidrolisarão o resíduo
 510 (Senphan, Benjakul, & Kishimura, 2014). As enzimas podem ser inibidas por substâncias que
 511 se ligam à enzima livre ou ao complexo enzima-substrato ou competem pelo sítio catalítico da
 512 enzima. O resultado final é uma diminuição ou anulação da atividade enzimática (Monteiro &
 513 Silva, 2009).

O hepatopâncreas do camarão apresenta funções vitais, envolvido em diversas atividades metabólicas (Gibson & Barker, 1979). Este órgão está envolvido na manutenção do balanço de sais e íons, metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, remoção de corpos estranhos do sistema vascular, desintoxicação de metais e outras substâncias orgânicas, secreta enzimas digestivas que são derramadas no estômago, armazena substâncias úteis e controla a composição bioquímica corporal (Icely & Nott, 1992; Gibson & Barker, 1979). Além disso, o hepatopâncreas é uma grande fonte de proteases, principalmente tripsina e quimotripsina, que têm a capacidade de hidrolisar vários substratos proteicos (Sriket et al., 2012). Essas enzimas, já presentes no substrato, podem ter competido com as enzimas comerciais pelo sítio ativo, ou alguns componentes, podem ter inibido a ação das mesmas, por isso os valores de GH das reações enzimáticas e das reações controle podem ter permanecido próximos.

Inúmeros fatores influenciam as propriedades e os constituintes do hidrolisado final, tendo como exemplo, composição e variação de matérias-primas, especificidade da enzima, tempo de reação, atividade e concentração de enzimas endógenas, pH e temperatura (Opheim et al., 2015). Segundo Slizyte et al. (2005), o processo de hidrólise pode ser influenciado negativamente pelo teor de lipídeos, pela formação de complexos proteína/lipídeos, mais resistentes ao rompimento enzimático. Estes autores ao analisarem a composição de diferentes frações obtidas após a hidrólise de bacalhau (*Gadus morhua*) com as enzimas Flavourzyme® e Neutrase® observaram que matérias-primas com elevado conteúdo de lipídeos resultavam em um hidrolisado com menor quantidade de proteína solubilizada. Considerando que no presente estudo o teor de lipídeos foi de 59,70% isso pode ser um indicativo dos baixos valores de GH.

Elevadas temperaturas resultaram em melhores GH, no entanto, alguns cuidados devem ser tomados com temperaturas altas. As oscilações nas condições de hidrólise, como temperatura, pressão, pH, salinidade ou concentração de solvente, podem provocar a desnaturação de proteínas, sendo a temperatura um dos principais fatores para desnaturar moléculas de proteína, o que pode ocasionar a perda de valor nutricional e funcional do hidrolisado final (Franks, Hatley & Friedman, 1988; Tedford et al., 1998).

Nas superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 7 e 8, foram fixadas a maior e a menor temperatura que foram utilizadas nas reações enzimáticas.

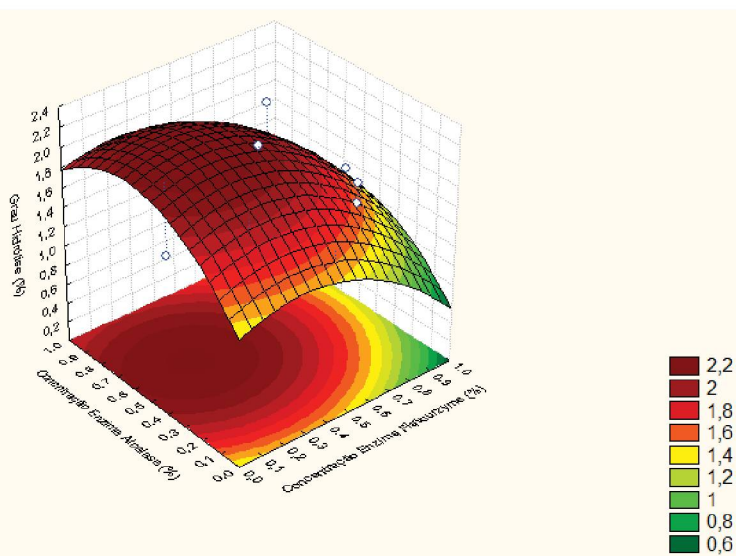


Figura 7. Superfície de resposta do grau de hidrólise em função da concentração da enzima Flavourzyme® 1000L e da enzima Alcalase® 2.4L fixada a temperatura 67,8 °C
Fonte: O autor (2020).

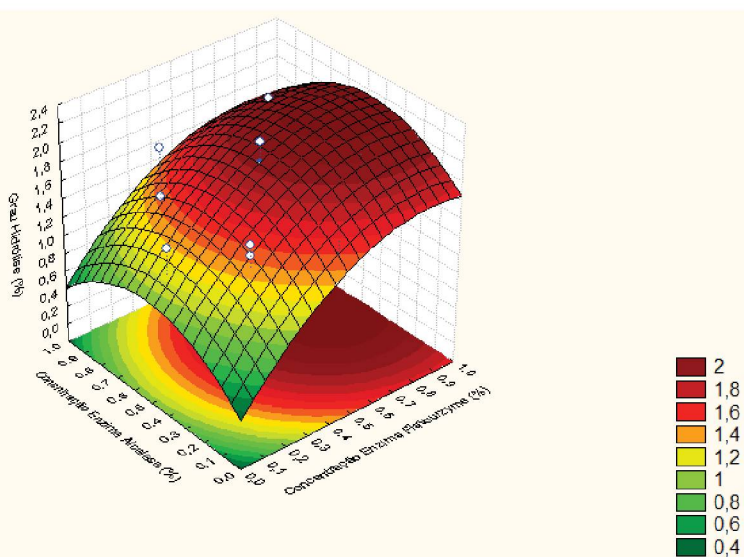


Figura 8. Superfície de resposta do grau de hidrólise em função da concentração da enzima Flavourzyme® 1000L e da enzima Alcalase® 2.4L fixada a temperatura 34,2
FONTE: O autor (2020).

579

580

581 Na Figura 7, nota-se que os maiores valores de GH são obtidos com a influência da
 582 Alcalase® 2.4L na maior temperatura, isso pode ter ocorrido, pois as condições ótimas de
 583 atuação da enzima, são em temperaturas entre 50 e 70 °C, conforme citado anteriormente. Na
 584 superfície de resposta na Figura 8 a influência da Flavourzyme® 1000L foi maior, já que a
 585 mesma atua em temperaturas até 50 °C. Por meio destas superfícies verifica-se como a

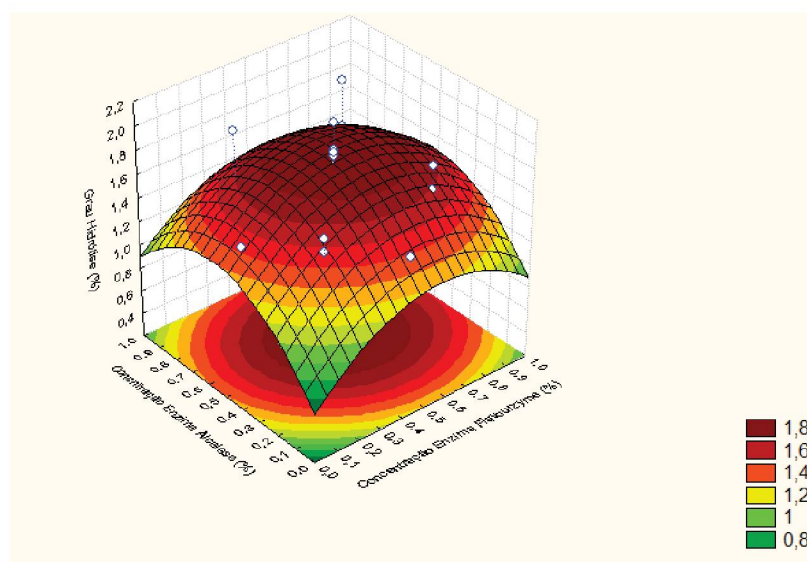
586

587 Como a temperatura foi a variável que apresentou maior influência nas reações
 588 proteicas, sendo ela a única significativa, foram geradas superfícies de resposta nos 5 níveis,
 (Figuras 7, 8 e 9) e (APÊNDICE, 1A e 2A) da mesma.

589

590 Na superfície de resposta apresentada na Figura 9, sendo fixado a temperatura de
 591 51,0 °C, para ambas as enzimas as concentrações foram intermediárias, onde atingiram o
 592 ponto mais alto do planejamento. Esse resultado pode ter sido alcançado, pois essa
 593 temperatura é mediana em relação as outras testadas, onde para a Flavourzyme® 1000L a
 594 melhor temperatura é até 50 °C e para a Alcalase® 2.4L entre 50 e 70 °C, tornando mais
 favorável a atuação conjunta.

595



596

597

598 **Figura 9.** Superfície de resposta do grau de hidrólise em função da concentração da enzima Flavourzyme®
 599 1000L e da enzima Alcalase® 2.4L fixada a temperatura 51,0 °C
 600 Fonte: O autor (2020).

601

602

603 Por meio dos resultados de GH, foi verificado que houve a clivagem proteica, já que
 o GH é definido como a proporção de ligações peptídicas clivadas pela enzima proteolítica.

Dependendo do grau de hidrólise, o peso molecular e a estrutura primária dos peptídeos o hidrolisado terá diferentes aplicações (Amiza, Kong, & Faazaz, 2012; Balti et al., 2011; Liu et al., 2014).

Na Tabela 9, pode-se notar que houve uma solubilização da proteína presente nas vísceras do camarão, tanto nas reações enzimáticas, quanto nas reações controle (sem adição das enzimas). O material *in natura* apresenta 19,43% de PB, após a hidrólise, os resultados de teor de proteína solúvel ficaram entre 22 e 38%. Isso demonstra a aplicabilidade dessa proteína na nutrição animal, evitando o descarte desse resíduo, que poderia prejudicar o meio ambiente.

Tabela 9. Teores de Proteína solubilizada pela ação das enzimas e somente com água e temperatura

Ensaio	T (°C)	Teor Proteína Solubilizada % (água; temperatura)	Teor Proteína Solubilizada % (enzimas)
1	41,0	24,71±2,28	27,60±3,07
2	61,0	32,50±1,56	28,20±2,27
3	41,0	24,97±2,69	23,23±0,60
4	61,0	27,88±1,63	30,51±0,45
5	41,0	22,22±1,36	31,08±11,04
6	61,0	26,99±2,05	29,13±0,46
7	41,0	24,65±1,20	28,95±0,39
8	61,0	32,84±6,53	29,07±1,05
9	34,2	26,04±4,00	26,48±1,64
10	67,8	32,31±5,41	38,05±4,78
11	51,0	24,65±3,12	24,20±0,22
12	51,0	26,35±0,82	24,65±1,82
13	51,0	25,37±1,23	24,22±1,76
14	51,0	25,71±1,17	26,61±1,92
15	51,0	29,49±3,54	28,49±1,24
16	51,0	25,20±2,16	25,22±1,78
17	51,0	31,44±3,51	30,83±1,97
18	51,0	25,66±1,13	27,93±1,58

T °C (temperatura); DP± (Desvio padrão)

Fonte: O autor (2020).

Segundo Leduc et al., (2018), os hidrolisados de camarões podem ser utilizados para alimentação animal, tais autores, verificaram que o hidrolisado de camarão *Litopenaeus vannamei* melhorou a organização das células intestinais aumentando a altura das vilosidades intestinais de peixes *Dicentrarchus labrax*. Isso evidencia o potencial de uso do hidrolisado proteico das vísceras de camarões *M. rosenbergii*, visto que o material apresentou resultados de solubilização proteica positivos.

6 CONCLUSÃO

627 No processo de hidrólise enzimática proteica das vísceras do camarão
628 *Macrobrachium rosenbergii*, a temperatura em 51,0 °C atingiu um rendimento otimizado. O
629 maior GH foi de 2,11%±0,25 na reação enzimática a 67,8 °C e concentração 0,50% para
630 ambas as enzimas. No entanto a 61,0 °C, a reação controle, apresentou um GH de
631 2,06%±0,11, sendo estatisticamente igual ao obtido para a reação enzimática. Isso indica que
632 as enzimas utilizadas não proporcionaram aumento no percentual de ligações peptídicas
633 clivadas para as vísceras de camarão. Entretanto, foi observado solubilização da proteína
634 presente em tal resíduo, tanto nas reações enzimáticas, quanto nas reações controle. Os
635 resultados de teor de proteína solúvel ficaram entre 22 e 38%, podendo tornar o hidrolisado
636 uma fonte de proteína para a aquicultura.

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

REFERÊNCIAS

- Adler-Nissen, J (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science, 365-404. <https://doi.org/10.1021/jf60208a021>.
- Alavi, F., Jamshidian, M & Rezaei, K (2019). Applying native proteases from melon to hydrolyze kilka fish proteins (*Clupeonella cultriventris caspia*) compared to commercial enzyme Alcalase. Food Chemistry. 277, 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.122>.
- Amiza, MA., Kong, YL & Faazaz, AL (2012). Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of Cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. International Food Research Journal, 19, (1), 199-206. [http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20\(01\)%202011/\(26\)IFRJ-2010-302-Ama.pdf/](http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20(01)%202011/(26)IFRJ-2010-302-Ama.pdf/). Acessado em 24 de junho de 2019.
- AOAC – Association Of Official Analytical Chemists (2010). Official methods of analysis. (18^a ed.). Washington DC.
- Araripe, MNBA., Lopes, JB., Castro, PL., Braga, TEA., Ferreira, AHC & Abreu, MLT (2011). Redução da proteína bruta com suplementação de aminoácidos em rações para alevinos de tambatinga. Revista Brasileira de Zootecnia, 40, (9), 1845-1850. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000900001>.
- Baek, HH & Cadwallader, KR (1995). Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. Journal of Food Science, 60, 929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb06264.x>.
- Balti, R., Jridi, M., Sila, A., Souissi, N., Nedjar-Arroume, N., Guillochon, D., & Nasri, M (2011). Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process. Food Hydrocolloids, 25, (5), 943-950. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.005>.
- Brito, MS., Oliveira, CFS., Silva, TRG., Lima, RB., Morais, SN., Silva, JHV (2008). Polissacarídeos não amiláceos na nutrição de monogástricos – revisão. Acta Veterinaria Brasilica, 2, (4), 111-117. <https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.4.917>.
- Cahú, TB., Santos, SD., Mendes, A., Cordula, CR., Chavante, SF., Carvalho JR, LB., Nader, HB & Bezerra, RS (2012). Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. Process Biochemistry, 47, (4), 570-577. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.012>.
- Chakrabarti, R (2002). Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process. Food Biotechnology, 16, 81-90. <https://doi.org/10.1081/GBT-120004202>.
- Charoenphun, N., Cheirsilp, B., Sirinupong, N & Youravong, W (2013). Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. European Food Research and Technology, Germany, 236, (1), 57-63. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1860-2>.

- 710
 711 Cheong, JY., Azwady, AA., Nor Rusea, G., Noormasshela, UA., Shaziera, AG., Nurul,
 712 Azleen, AA & Muskhazli, M. (2014). The availability of astaxanthin from shrimp activity of
 713 carotenoprotein from shells of Pacific white shrimp extracted using hepatopancreas proteases.
 714 Food Bioscience, 5, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.004>.
 715
 716 Costa, SR e Souza, PAR (2012). O impacto dos resíduos de pescado: o caso da “Feira do
 717 Bagaço” no município de Parintins no Amazonas. DELOS: Desarrollo Local Sostenible 5,
 718 (14), 1-11. www.eumed.net/rev/delos/14/ Acessado em 18 de maio de 2019.
 719
 720 Damodaran, S., Parkin, KL & Fennema, OR (2010). Química de Alimentos de Fennema. (4ª
 721 ed.). São Paulo: Artmed.
 722
 723 Duarte De Holanda H & Netto FM (2006). Recovery of components from shrimp
 724 (*Litopenaeus setiferus*) processing waste by enzymatic hydrolysis. Journal of Food Science,
 725 71, (5), 298- 303. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00040.x>.
 726
 727 FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations (2018). The state of world
 728 fisheries and aquaculture. FAO, Rome, 200 pp. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>/
 729 Acessado em 15 de janeiro de 2020.
 730
 731 FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations (2018). El estado mundial de
 732 la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible, 2018.
 733 <http://www.fao.org/3/I9540es/i9540es.pdf>/ Acessado em 12 de dez de 2019.
 734
 735 FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations (2018). The State of World
 736 Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence:
 737 CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf>/ Acessado em 30 de
 738 maio de 2019.
 739
 740 FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). The state of world
 741 fisheries and aquaculture: Contributing to food security and nutrition for all. Rome: FAO.
 742 <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>/ Acessado em 13 de março de 2018.
 743
 744 FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.
 745 Rome. <http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf> / Acessado em 12 de fevereiro de
 746 2021.
 747
 748 FAO-FIGIS. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017). Global
 749 Aquaculture Production 1950-2017. [http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-](http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en/)
 750 [production/query/en/](http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en/) Acessado em 15 de janeiro de 2020.
 751
 752 Ferrer, J., Paez, G., Marmol, Z., Ramones, E., Garcia, H & Forster, C (1996). Acid hydrolysis
 753 of shrimp-shell wates and the production of single cell protein from the hydrolysate.
 754 Bioresource Technology, 57, 55-60. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00057-0](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00057-0).
 755
 756 Fields, PA (2001). Review: Protein function at thermal extremes: Balancing stability and
 757 flexibility. Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Biochemistry and
 758 Physiology Part A, 129, (2-3), p. 417-431. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(00\)00359-7](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(00)00359-7).
 759

- Franks, F., Hatley, RHM & Friedman, H. L (1988). The thermodynamics of protein stability: cold destabilization as a general phenomenon. *Biophysical chemistry*, 31, (3), 307-315. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(88\)80037-1](https://doi.org/10.1016/0301-4622(88)80037-1).
- Gernat, AG (2001). The effect of using different levels of shrimp meal in laying hen diets. *Poultry Science*, Champaign, 80, (5), 633-636. <https://doi.org/10.1093/ps/80.5.633>.
- Gibson, R & Barker, P. L (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanography Marine Biology: an annual review*, 17, 285-346.
- Guerard, F., Sumaya-Martinez, MT., Laroque, D., Chabeaud, A & Dufosse, L (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42, 1486-1491. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.016>.
- Guimarães, IG., Miranda, EC., Martins, GP., Louro, RV & Miranda, CC (2008). Farinha de camarão em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*); *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9, (1), 140-149. <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/838/552/> Acessado em 13 de março de 2019.
- Guimarães, IG., Miranda, EC., Martins, GP., Louro, RV., Heu, MS., Kim, JS & Shahidi, F (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82, 235-242. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00519-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00519-8).
- He, R., Girgih, AT., Malomo, SA., JU, X & Aluko, RE (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, 5, (1), 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.008>.
- Heu, MS., Kim, JS & Shahidi, F (2003). Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, 82, 235-242. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00519-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00519-8).
- Hoyle, NT., Merritt, JH (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59, 76-79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x>.
- Icelly, JD & Nott, JÁ (1992). Digestion and absorption: digestive system and associated organs. In: Harrison FW & Humes AG (eds) *Microscopic anatomy of the invertebrates. Decapod Crustacea*. Wiley, New York, 10, 147-201.
- Jung, W., Karawita, R., Heo, S., Lee, B., Kima, S & Jeon, Y (2006). Recovery of a novel cabinding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 41, 2097-2100. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.008>.
- Kim, S & Venkatesan, J (2014). *Seafood processing by-products: Trends and applications*. (ed.). New York: Springer.

- Leduc, A., Zatylny-Gaudin, C., Robert, M., Corre, E., Corguille, GL., Castel, H., Lefevre-scelles, A., Fournier V, Gisbert E., Andree, KB & Henry J (2018). Dietary aquaculture byproduct hydrolysates: impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets. BMC Genomics, 19 (396), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4780-0>.
- Liu, Z., Zeng, M., Dong, S., Xu, J., Song, H., & Zhao, Y (2007). Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on harvested strawberries. Postharvest biology and technology, 46, (1), 95-98. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.013>.
- Lowry, OH., Rosenbrough, NJ & Randall, RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, (1), 265-275. <https://www.jbc.org/content/193/1/265.full.pdf/> Acessado em 20 de março de 2018.
- Mahmouud, MI., Malone, WT & Cordle, CT (1992). Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. Journal of Food Science, 57 (5), 1223-1229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb11304.x>.
- Mizani, M., Aminlari, M., Khodabandeh, M (2005). An Effective Method for Producing a Nutritive Protein Extract Powder from Shrimp-head Waste. Food Science and Technology International, 11 (1), 49-54. <https://doi.org/10.1177/1082013205051271>.
- Monteiro, V. N & Silva, RN (2009). Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. Revista Processos Químicos, 3, (5), 9-23. https://www.senaigo.com.br/repositoriosites/repositorio/senai/download/Publicacoes/Revista_Cientifica_Processos_Quimicos_/2010/processosquimicos_052009.pdf/ Acessado em 12 de dezembro de 2019.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W & Kishimura, H (2009). Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems. Process Biochemistry, 44, 471-476. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.018>.
- Neves, RA., M., Mira, NVM & Marquez, LUM (2004). Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 24, (1), 101-108. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000100019>.
- Nielsen, PM & Olsen, HS (2002). Enzymic modification of food protein. In: "Enzymes in food technology". Robert J. Whitehurst and Barry A. Law (eds.) Sheffield Academic Press, Cap. 6, 109-143. <https://doi.org/10.1002/9781444309935.ch13>
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering, 70, 571-578. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.011>.
- Noman, A., Xua, Y., Q. AL-Bukhaitia, W., Abeda, SM., Alia, AH., Ramadhana, AH & Xia, W (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon. (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. Process Biochemistry, 67, 19-28 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009>.

- Novozymes. Ficha Técnica da enzima Alcalase® 2.4L. Special Food/2001 0828103. pdf. <http://www.ebiosis.co.kr/Novozymes%20Product%20Sheet/Alcalase%202.4L.pdf/> Acessado em 28 de maio de 2018.
- Opheim, M., Šližytė, R., Sterten, H., Provan, F., Larssen, E & Kjos, NP (2015). Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) rest raw materials—Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates. *Process Biochemistry*, 50(8), 1247-1257. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.017>.
- Pasupuleti, VK., Braun, S (2010). State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In: Pasupuleti, VK., Demain, AL. (Ed.). *Protein hydrolysates in biotechnology*. Dordrecht: Springer, 11-32. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_2.
- Plascencia, JM., Olvera, NMA., Arredondo, FJL., Hall, GM & Shirai, K (2002). Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*), diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, (7), 753-759. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1092>.
- Rossini, K., Norena, CPZ., Oliveira, FC & Brandelli, A (2009). Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. *Food Science and Technology*, 42, 862-867. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.002>.
- Savoie, ALE., François, NR., Lamarre, SG., Bilier, PU., Beaulieu, L & Cahu, C (2011). Dietary protein hydrolysate and trypsin inhibitor effects on digestive capacities and performance during early-stages of spotted Wolf fish: Suggested mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 158, (4), 525-530. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.017>.
- Senphan, T., Benjakul, S & Kishimura, H (2014). Characteristics and antioxidative shell wastes through microbial fermentations, *Aeromonas hydrophila* and cell disruptions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16, (2), 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.ijab.2014.16-2-277-284>.
- Shuler, M. L & Kargi, F (2002). *Bioprocess Engineering*. (2ª ed.). New Jersey: Prentice-Hall.
- Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I & Rustad, T (2005). Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by products. *Process Biochemistry*, London, 40, (3-4), 1415-1424. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.033>.
- Sriket, C., Benjakul, S., Visessanguan, W., Hara, K., Yoshida, A & Liang, X (2012). Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Characteristics and biochemical properties *Food Chemistry*, 68, (2), 147-152. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00165-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00165-X).
- Synowiecki, J., Al-Khateeb, NAAQ (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards. *Food Chemistry*, 68, (2), 147-152. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00165-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00165-X).
- Tedford, L. A., Kelly, S. M., Price, N. C., & Schaschke, C. J. (1998). Combined effects of thermal and pressure processing on food protein structure. *Food and bioproducts processing*, 76, (2), 80-86. <https://doi.org/10.1205/096030898531837>.

The World Bank (2013). FISH to 2030 Prospects for Fisheries and Aquaculture, 102, 83177-GLB. <http://www.fao.org/3/i3640e/i3640e.pdf/> Acessado em 24 de março de 2018.

Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B & Beermann, C (2016). Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. Food Chemistry, 205, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.002>.

Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K., Kumar, M., Pareek, N., Vivekanand, V (2019). Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. Bioresources and Bioprocessing, 6, 8, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0243-y>.

Zhang, A., Wei, G., Mo, X., Zhou, N., Chen, K., Ouyang, P (2018). Enzymatic hydrolysis of chitin pretreated by bacterial fermentation to obtain pure N-acetyl-d-glucosamine. Green Chem. 20, (10), 2320–2327. <https://doi.org/10.1039/C8GC00265G>.

Dey, S. S., Dora, K. C (2018). Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. Journal of food science and technology, v. 51, n. 1, p. 16-24. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0455-4>.

Yen, D.T., May, N. T (2019). Optimization of enzymatic hydrolysis process from shrimp by-product for shrimp sauce production. Vietnam Journal of Science and Technology, v. 57, n. 3B, p. 97-104. <http://doi.org/10.15625/2525-2518/57/3B/14426>.

Zhang, K., Zhang, B., Chen, B., Jing, L., Zhu, Z., Kazemi, K (2016). Modeling and optimization of Newfoundland shrimp waste hydrolysis for microbial growth using response surface methodology and artificial neural networks. Marine pollution bulletin, v. 109, n. 1, p. 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.075>.

Gunasekaran, J., Kannuchamy, N., Kannaiyan, S., Chakraborti, R., Gudipati, V (2015). Protein hydrolysates from shrimp (*Metapenaeus dobsoni*) head waste: optimization of extraction conditions by response surface methodology. Journal of Aquatic Food Product Technology, v. 24, n. 5, p. 429-442. <http://dx.doi.org/10.1080/10498850.2013.787134>.

APÊNDICE

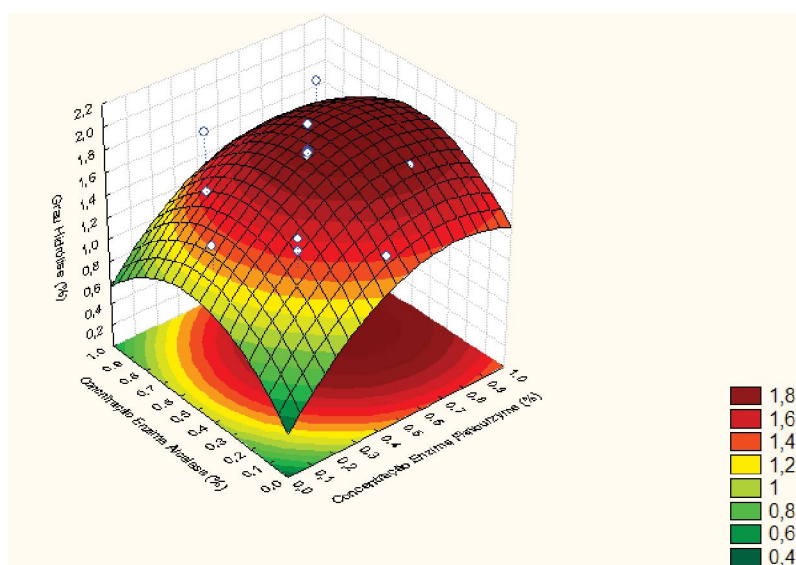


Figura 1A. Superfície de resposta do grau de hidrólise em função da concentração da enzima Flavourzyme® 1000L e da enzima Alcalase® 2.4L fixada a temperatura 41,0 °C
FONTE: O autor (2020).

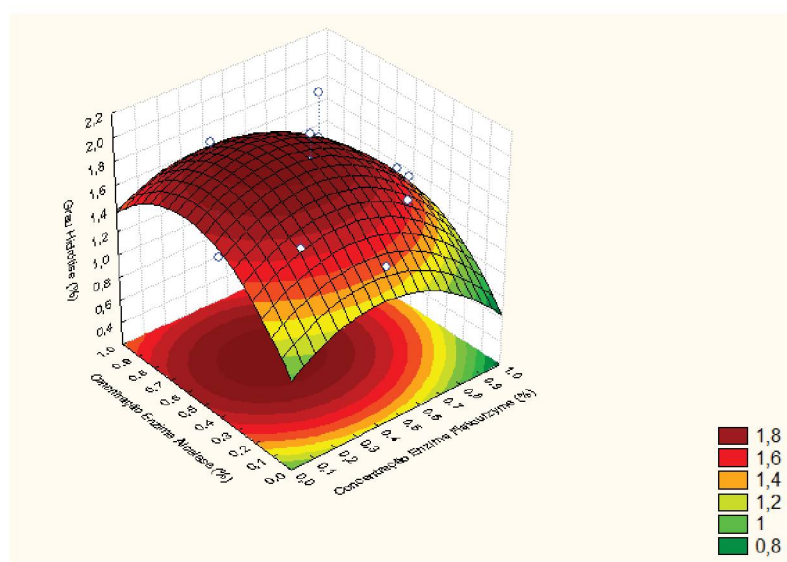


Figura 2A. Superfície de resposta do grau de hidrólise em função da concentração da enzima Flavourzyme® 1000L e da enzima Alcalase® 2.4L fixada a temperatura 61,0 °C
FONTE: O autor (2020).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ensaio	1	0.002817	0.002817	0.071	0.8028
erro	4	0.158267	0.039567		
Total corrigido	5	0.161083			
CV (%) =	9.52				
Média geral:	2.0883333	Número de observações:		6	

Teste Tukey para a FV Ensaio

DMS: 0,450935636565201 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
 Erro padrão: 0,114842887846348

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	2.066667	a1
2	2.110000	a1

ANEXOS

Ficha de Informação do Produto



novozymes
Rethink Tomorrow

1 de 2

Valido a partir de 2016-02-22

Alcalase®

2.4 L FG

Neste produto a atividade enzimática chave é fornecida por serina endoprotease, que hidrolisa ligações peptídicas internas

CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

Enzima Declarada	protease (Subtilisina)
Atividade declarada	2,4 AU-A/g
Cor	marrom claro a escuro
Apresentação	Líquido

A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicador da atividade enzimática.

ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Protease unit AU-A	2,4		/g
Contagem total de viáveis	-	50000	/g
Fungo	-	100	/g
Levedura	-	100	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E.Coli	Não detectado		/25 g
Staphylococcus aureus	Não detectado		/1 g
Salmonella	Não detectado		/25 g
Metais pesados		Máx: 30	mg/kg
Chumbo		Máx: 5	mg/kg
Arsenico		Máx: 3	mg/kg
Cádmio		Máx: 0.5	mg/kg
Mercurio		Máx: 0.5	mg/kg

O método analítico da enzima está disponível no Portal do Cliente (Customer Centre) ou com o seu representante de vendas.

COMPOSIÇÃO

Ingredientes	% aprox. (g/g)
Glicerol, CAS no. 56-81-5	50
Água, CAS no. 7732-18-5	41
Protease (Subtilisina), CAS no. 9014-01-1*	9

*Definido como enzima conc. (base matéria seca)

INFORMAÇÃO SOBRE ALERGIA

Alergênico	Substância contém¹	Alergênico	Substância contém¹
Algo	não	Moluscos	não
Cereais contendo glúten**	não	Mostarda	não
Crustáceos	não	Nozes*	não
Ovo	não	Amendoim	não
Peixe	não	Sergelim	não
Tramopo	não	Soja	não
Leite (incluindo lactose)	não	Dióxido de enxofre/sulfatos, mais que 10 mg por kg ou l	não

¹Definição de substâncias de acordo com o Regulamento da EU 1169/11, conforme alteração. A lista cobre os alérgenos mencionados no 21 USC 301 (US) e GB 7718-2011 (China).

**isto é, trigo, centeio, cevada, aveia, espelta, kamut

*isto é, amêndoa, avelã, noz, castanha de caju, noz-pecã, castanha do Pará, pistache, macadâmia e noz de Queensland

* Se não: Livre de glúten, isto é, < 20ppm (Regulamento UE 41/2009)

VALORES NUTRICIONAIS

O produto possui um valor nutricional típico de aproximadamente 653 kJ/100 g produto enzimático.

• Proteína	9 g/100 g
• Polióis	50 g/100 g
• Umidade	41 g/100 g

STATUS GM

Este produto não é um OGM.

Organismo de produção: *Bacillus licheniformis*

O produto enzimático é produzido por fermentação de um microrganismo que não está presente no produto final. O organismo de produção não é modificado usando uma biotecnologia moderna.

Ficha de Informação do Produto
Válido a partir de 2017-08-24

1 de 2

Flavourzyme®

1000 L

Neste produto a atividade enzimática chave é fornecida por exopeptidase, que libera aminoácidos por hidrólise da ligação peptídica N-terminal

CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

Enzima Declarada	Aminopeptidase
Atividade declarada	1100 LAPU/g
Atividades secundárias	O produto apresenta atividade de protease
Cor	marrom claro a escuro
Apresentação	Líquido
Propriedades	O produto pode apresentar turbidez e conter pequena quantidade de precipitado, isto não afeta a atividade enzimática ou desempenho.
Densidade de aproximadamente (g/ml)	1,27

A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.

ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Aminopeptidase unit LAPU	1100		/g
Contagem total de viáveis	-	10000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E.Coli	Não detectado		/25 g
Salmonella	Não detectado		/25 g
Metais pesados		Máx 30	mg/kg
Chumbo		Máx 5	mg/kg
Arsenio		Máx 3	mg/kg
Cádmio		Máx 0,5	mg/kg
Mercurio		Máx 0,5	mg/kg

O método analítico da enzima está disponível no Novozymes Market ou com seu representante de venda.

COMPOSIÇÃO

Ingredientes	% aprox. (p/p)
Água, CAS no. 7732-18-5	42,80
Sacarose, CAS no. 57-50-1	30
Aminopeptidase, CAS no. 8001-81-0*	17
Cloreto de potássio, CAS no. 7447-40-7	10
Sorbato de potássio, CAS no. 24884-81-5	0,20

*Definido como enzima conc. (base matéria seca)

INFORMAÇÃO SOBRE ALERGIA

Alergénico	Substância contida*	Alergénico	Substância contida*
Alvo	não	Molasses	não
Cereais contendo glúten**	não	Mostarda	não
Crustáceos	não	Nozes*	não
Ovo	não	Amendoim	não
Peixes	não	Gergelim	não
Tempeço	não	Soja	não
Leite (incluindo lactose)	não	Diluido de erweitereitlos,	não
		mais que 10 mg por kg ou l	

*Definição de substâncias de acordo com o Regulamento da EU 1169/11, conforme alteração. A lista cobre os alérgenos mencionados no 21 USC 301 (US) e GB 7718-2011 (China).

**isto é, trigo, centeio, cevada, aveia, espelta, kamut

*isto é, amêndoa, avelã, noz, castanha de caju, noz-pecã, castanha do Pará, pistache, macadâmia e noz de Queensland

* Se não: Livre de glúten, isto é, < 20ppm (Regulamento UE 828/2014)

Rethink Tomorrow

novozymes 