

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**Paola Gouvêa Manfredini**

**Produção concomitante de proteases e peptídeos bioativos por fermentação  
em estado sólido**

**Passo Fundo**

**2020**



**Paola Gouvêa Manfredini**  
**Médica Veterinária**

**Produção concomitante de proteases e peptídeos bioativos por fermentação  
em estado sólido**

Dissertação de Mestrado apresentada para  
obtenção do título de Mestra em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira  
Costa

Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Maria  
Colla

Linha de pesquisa: Processos Biotecnológicos  
e não Convencionais na Produção de  
Alimentos e Ingredientes.

**Passo Fundo**

**2020**



CIP – Catalogação na Publicação

---

- M276p Manfredini, Paola Gouvêa  
Produção concomitante de proteases e peptídeos bioativos por fermentação em estado sólido [recurso eletrônico] / Paola Gouvêa Manfredini. – 2020.  
2.6 MB ; PDF.
- Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.  
Coorientadora: Profª. Dra. Luciane Maria Colla.  
Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2020.
1. Fermentação. 2. Peptídeos. 3. Antioxidantes.  
4. Enzimas. I. Costa, Jorge Alberto Vieira, orientador.  
II. Colla, Luciane Maria, coorientadora. III. Título.

CDU: 664

---

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427



**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**Produção concomitante de proteases e peptídeos bioativos por fermentação em estado sólido**

Elaborada por  
**Paola Gouvêa Manfredini**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Comissão Examinadora**



**Jorge Alberto Vieira Costa, Dr., UPF  
(Orientador/Presidente)**



**Luciane Maria Colla, Dra., UPF  
(Orientadora)**



**Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF**



**Eliane Colla, Dra., UTFPR**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2020**





## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus principais incentivadores, meu filho Joaquim e meu esposo Michael. Por me lembrarem todos os dias da minha capacidade, o quanto sou forte e que mesmo com tantas dificuldades, no final tudo daria certo. Vocês foram essenciais para essa conquista.

Ao meu pai e minha mãe, que mesmo de longe, cada um do seu jeito, me estimulam a querer dar sempre meu melhor em tudo o que faço.

À minha irmã, por ser meu exemplo de dedicação desde que me entendo por gente e por me ajudar, seja revisando meu inglês, seja com palavras de incentivo.

À minha sogra Dete e minhas cunhadas Juliana e Flávia pela força e conselhos.

Ao meu orientador professor Dr, Jorge. A. V. da Costa pela orientação, suporte e conhecimento transmitido.

À minha coorientadora e amiga professora Dra. Luciane Maria Colla, peça fundamental em todo o meu processo, do início ao fim do mestrado. É a pessoa que tornou tudo isso possível, me desafiando, ensinando, questionando minhas escolhas e me mostrando todo o meu potencial.

À minha parceira de mestrado Viviane Durante pela amizade, conversas intermináveis, por todo choro e toda risada compartilhada.

Aos colegas do PPGCTA, principalmente às amigas Daiane dos Santos e Marieli Rosseto por todo incentivo, palavras de conforto e companheirismo ao longo desses dois anos.

Aos meus IC's maravilhosos, Victor e Raíssa, pela grande ajuda durante todo o processo.

Ao pessoal do Laboratório de Bioprocessos pela amizade, parceria, risadas e conselhos: professora Dra. Telma Bertolin, Danúbia, Lara, Naiara, Viviane, Alan, Bárbara, Mateus, Gabi, Thaís, Kátia, Samuel, Júlia L, Júlia G., Thainá, Larissa, João, Victória, Bruna, André e outros que por ali passaram.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade de Passo Fundo, por toda a transmissão do conhecimento, principalmente aos professores Christian Reinehr e Vandrê Brião pelas orientações nas bancas de projeto e qualificação.

Aos laboratórios em que a pesquisa foi desenvolvida, aos técnicos que auxiliaram com dicas, empréstimos de reagentes e equipamentos e acompanhamento das análises, principalmente no início dos trabalhos.

Aos amigos de São José do Ouro, cidade que me acolheu em todo o processo, que acompanharam essa conquista de perto: Deise, Emanuel, Luísa, Neiva, Mariane, Tatiane, Shelly, Miguel, Iara e vários outros que me ajudaram, me ouvindo, cuidando do meu filho e me aconselhando.

As minhas amigas da vida Fê e Nanda, aos amigos da faculdade Mi, Jamile, Rodrigo, Clarisse, Dani, Thaís, Carlos e Pâmela, por estarem sempre comigo, mesmo de longe.

A todos aqueles que contribuíram, meu muito obrigada!

## RESUMO

Os biopeptídeos são compostos que possuem efeitos benéficos para a saúde, tais como: redução da pressão arterial, atividade antioxidante, redução de problemas ocasionados pela diabetes, ação anticancerígena, antimicrobiana, entre outras. Eles podem ser obtidos pela hidrólise de proteínas por enzimas, entre elas, as enzimas produzidas por microrganismos através da fermentação em estado sólido (FES). Este processo mimetiza o habitat natural dos microrganismos fazendo com que eles atuem no meio, produzindo enzimas, como as proteases, e outros compostos em um mesmo processo. Uma das suas principais vantagens é a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato, reduzindo a poluição ambiental e permitindo a valoração destes compostos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo biotecnológico de fermentação em estado sólido para a produção simultânea de proteases e biopeptídeos. Para isso, o experimento foi dividido em três etapas. A primeira foi realizada de acordo com um Delineamento de Misturas, com a utilização de três substratos em diferentes proporções: farelo de soja, casca de soja e farelo de trigo, para a fermentação em estado sólido por *A. niger*, com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante e proteínas solúveis em meio ácido em cada meio e ainda, o sinergismo e antagonismo dos substratos. Outros parâmetros como pH (7), temperatura (30°C) e umidade (60%) foram fixados, de acordo com a literatura. A segunda etapa, correspondeu a um Delineamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup>, com três pontos centrais, com o estudo das variáveis pH (5, 6 e 7), umidade (50, 60 e 70%), e concentração de nitrogênio inorgânico (0,5, 1,25 e 2%). Os substratos utilizados para a fermentação por *A. niger* foram farelo de soja e casca de soja (70:30). Como variáveis respostas foram avaliadas atividade proteásica, proteínas solúveis em meio ácido e potencial antioxidante. Na terceira etapa, fez-se o aumento de escala e estudou-se a variação de pH (6, 7 e 8) do meio. As determinações analíticas foram novamente realizadas e os peptídeos e proteases foram caracterizados quanto ao tamanho por eletroforese em gel. Como resultado, ocorreu a produção simultânea de proteases e peptídeos por FES. A melhor condição apresentada na etapa 1 foi a mistura de farelo e casca de soja. Na etapa 2 a maior produção de protease ocorreu no ensaio 2 (pH 7, 50% umidade e 0,5% nitrogênio) em 48h de fermentação com 677 U g<sup>-1</sup> e em 96h com 426 U g<sup>-1</sup>. Já o maior potencial antioxidante foi em 96 horas de fermentação com 2.875,5 equivalente Trolox (mg/mL) para o ensaio 2 e 2.988,67 mg/mL para o ensaio 6 (pH 7, Umidade 50% e 2% nitrogênio). Ao final, a etapa 3, mostrou não haver diferenças significativas quanto ao pH estudado e o aumento de escala mostrou-se favorável quanto a produção de proteases e biopeptídeos antioxidantes, com resultados de 479 U g<sup>-1</sup> de proteases em 96 horas de fermentação e 1.678,88 equivalente em Trolox (mg/mL) para atividade antioxidante, quando em pH7. Sendo assim, a fermentação em estado sólido mostrou-se um ótimo biprocessos para a produção simultânea de proteases e biopeptídeos por *A. niger*.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido. Biopeptídeos. Soja. Fungos. Protease. Antioxidantes.



## ABSTRACT

Biopeptides are compounds that have beneficial effects on health, such as: lowering blood pressure, antioxidant activity, reducing problems caused by diabetes, anticancer and antimicrobial actions, among others. They can be obtained through the hydrolysis of proteins by enzymes, among them, enzymes produced by microorganisms through solid-state fermentation (SSF). This process mimics the natural habitat of the microorganisms, causing them to act in the environment, producing enzymes, such as proteases, and other compounds, all in the same process. One of its main advantages is the use of residues and agro-industrial by-products as substrates, reducing environmental pollution, and allowing the valuation of these compounds. Thus, the objective of this work was to develop a solid-state fermentation biotechnological process for the simultaneous production of proteases and biopeptides. For this, the experiment was divided into three stages. The first was carried out according to a Mixture Design, with the use of three substrates in different proportions: soy bran, soy husk, and wheat bran, in the solid-state fermentation by *A. niger*. It was evaluated the antioxidant activity and soluble proteins in an acid medium in each medium and, also, the synergism and antagonism of the substrates. Other parameters such as pH (7), temperature (30°C) and moisture (60%) were fixed, following the literature. The second step corresponded to a Complete Factorial Design 2<sup>3</sup>, with three central points, with the study of the variables: pH (5, 6 and 7), moisture (50, 60 and 70%), and nitrogen sources concentrations (0, 5, 1.25 and 2%). The substrates used in the fermentation by *A. niger* were soy bran and soy husk (70:30). As response variables, protease activity, soluble proteins in acid medium, and antioxidant potential were evaluated. In the third stage, was made the scale-up, and the pH variation (6, 7, and 8) of the medium was studied. The analytical determinations were again performed and the peptides and proteases were characterized in terms of size by gel electrophoresis. As a result, the simultaneous production of proteases and peptides by SSF occurred. The best condition presented in stage 1 was with the soy bran and soy husk mixture. In stage 2, the highest protease production was obtained with assay 2 (pH 7, 50% moisture, and 0.5% nitrogen) in a 48h fermentation with 677 U g<sup>-1</sup> and in 96h with 426 U g<sup>-1</sup>. The highest antioxidant potential was obtained with a 96h fermentation, 2875.5 Trolox equivalent (mg/mL) with the assay 2, and 2988.67 mg/mL with the assay 6 (pH 7, 50% moisture and 2% nitrogen). In the last stage, stage 3, were not observed significant differences concerning the studied pH, and the scale-up was favorable towards the production of proteases and antioxidant biopeptides, with results of 479 U g<sup>-1</sup> of proteases in a 96 hours fermentation and 1678.88 Trolox equivalent (mg/mL) for the antioxidant activity, when in pH 7. The solid state fermentation proved to be an excellent bioprocess for the simultaneous production of proteases and biopeptides by *A. niger*.

Keywords: Solid state fermentation. Biopeptides. Soy. Fungi. Protease. Antioxidants.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Efeitos dos biopeptídeos no corpo humano .....	50
Figura 2 - Etapas de hidrólise enzimática de proteínas .....	55
Figura 3 - Produção de biopeptídeos .....	56
Figura 4 - Fluxograma da Etapa I.....	66
Figura 5 - Fluxograma da etapa II .....	67
Figura 6 - Fluxograma da etapa III.....	67
Figura 7 - Frações Granulométricas dos substratos (%) utilizados na FES por <i>A. niger</i> .....	79
Figura 8 – Potencial de inibição da oxidação por meio da captura de espécies reativas de oxigênio (%), por dia, dos ensaios, decorrente da fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> , com diferentes proporções de substratos .....	81
Figura 9 - Curva de contorno para a resposta de atividade antioxidante determinada por ABTS (%) no tempo de 96 h em função das variáveis do planejamento de mistura, com diferentes proporções de substratos ( $p < 0,05$ ).....	84
Figura 10- Curva de contorno para a resposta de rendimento dos ensaios, por ABTS (%), no tempo de 96 h em função das variáveis do planejamento de mistura, com diferentes proporções de substratos ( $p < 0,05$ ).....	86
Figura 11 - Curva de contorno para a concentração de proteínas solúveis ( $\mu\text{g/mL}$ ) em 96 h de fermentação em estado sólido, por <i>A. niger</i> , em função das variáveis do planejamento de mistura ( $p < 0,05$ ), com diferentes proporções de substratos. ....	89
Figura 12 - Atividade proteásica por dia ( $\text{U g}^{-1} \cdot \text{d}$ ) dos ensaios, decorrente da fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	93
Figura 13 - Superfície de Resposta (pH por % Umidade) da atividade proteásica, em 48 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> . ....	94
Figura 14 - Superfície de Resposta (% Concentração de nitrogênio por % Umidade) da atividade proteásica, em 48 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	95
Figura 15 – Atividade proteásica em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 48 h de Fermentação em estado sólido com o <i>A. niger</i> .....	96
Figura 16 - Superfície de Resposta (pH por % Umidade) da atividade proteásica, em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> . ....	98
Figura 17- Superfície de Resposta (% concentração de nitrogênio por % Umidade) da atividade proteásica, em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	99

Figura 18 - Atividade proteásica em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 96 h de fermentação em estado sólido com o <i>A. niger</i> .....	100
Figura 19 - Superfície de Resposta (% concentração de nitrogênio por % Umidade) da proteínas solúveis em meio ácido, em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> ..	103
Figura 20 – Concentração de proteínas solúveis ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 96 h de Fermentação em estado sólido com o <i>A. niger</i> .....	104
Figura 21 - Rendimento da Atividade Antioxidante, em Equivalente Trolox $\text{mg}/\text{mL}$ (final - inicial), por ABTS em fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	106
Figura 22 - Correlação entre concentração de proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e potencial de inibição da oxidação de radicais livres (%) dos meios fermentados (Ensaio 1 a 4). .....	108
Figura 23 - Correlação entre concentração de proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e potencial de inibição da oxidação de radicais livres (%) dos meios fermentados (Ensaio 5 a 8). .....	108
Figura 24 - Correlação entre concentração de proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e potencial de inibição da oxidação de radicais livres (%) dos meios fermentados(Ensaio 9 a 10). .....	109
Figura 25 - Superfície de Resposta (pH e % Umidade) da atividade antioxidante, em equivalente Trolox ( $\text{mg}/\text{mL}$ ), em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> . .....	110
Figura 26 - Atividade antioxidante em equivalente Trolox ( $\text{mg}/\text{mL}$ ) em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 96 h de fermentação em estado sólido com o <i>A. niger</i> .....	111
Figura 27 - Rendimento da Atividade antioxidante (final - inicial) em Equivalente Trolox ( $\text{mg}/\text{mL}$ ) por ABTS em fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	115
Figura 28 - Rendimento da atividade antioxidante (final – inicial) em Equivalente Trolox ( $\text{nmol}/\text{L}$ ) por DPPH em fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	116
Figura 29 – Peso molecular (kDa) de proteases e peptídeos antes (0 h) e depois da fermentação em estado sólido (96 h) por <i>A. niger</i> . .....	117



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz de Delineamento de Mistura (Simplex-centroide mixture design) para determinar a melhor proporção dos substratos na produção simultânea de protease e biopeptídeos antioxidantes, via FES.....	68
Tabela 2 - Delineamento Composto Central 2 <sup>3</sup> utilizado para identificação das variáveis significativas sobre a produção simultânea de proteases e biopeptídeos .....	69
Tabela 3 - Composição Centesimal (%) dos subprodutos agroindustriais utilizados como substrato na FES por <i>A. niger</i> .....	77
Tabela 4 - Composição Centesimal dos substratos e suas misturas, em base seca, conforme o delineamento de misturas utilizado para a FES por <i>A. niger</i> .....	78
Tabela 5 – Potencial de Inibição da oxidação por meio de captura de espécie reativas de oxigênio, determinado por ABTS (%) em fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> com diferentes proporções de substratos.....	81
Tabela 6 - Análise de Variância do Potencial de inibição da oxidação por meio de captura de radicais livres determinado por ABTS (%), em 96 h de fermentação em estado sólido, por <i>A. niger</i> , utilizando farelo de trigo, farelo de soja e casca de soja como substratos .....	83
Tabela 7 - Potencial de inibição da oxidação por meio da captura de espécies reativas de oxigênio (%) (Rendimento: PI no tempo final “t” – PI “tempo inicial t0”) durante a fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> , com diferentes substratos.....	85
Tabela 8 – análise de Variância do rendimento do potencial de inibição da oxidação por meio da captura de radicais livres, determinado por ABTS (%), em 96 h de fermentação em estado sólido, por <i>A. niger</i> , utilizando farelo de soja, farelo de trigo e casca de soja como substratos. ....	86
Tabela 9 - Proteínas solúveis em meio ácido (µg/mL) e Rendimento (Valor Final - Valor Inicial) (µg/mL) dos ensaios durante a fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> , com diferentes substratos. ....	87
Tabela 10- Análise de Variância da concentração de proteínas solúveis (µg/mL), em 96h de fermentação em estado sólido, por <i>A. niger</i> , em função das variáveis do planejamento de mistura, com diferentes proporções de substratos. ....	88
Tabela 11 - Atividade proteásica (U g <sup>-1</sup> ) durante a segunda etapa de produção de proteases e de biopeptídeos por fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	90

Tabela 12 - Análise de Variância de Atividade Proteásica em 48 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	93
Tabela 13 - Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central 2 <sup>3</sup> sobre a atividade proteásica em 48 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	96
Tabela 14 - Análise de Variância de atividade proteásica em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	98
Tabela 15 - Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central 2 <sup>3</sup> sobre atividade proteásica em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	100
Tabela 16 - Concentração de proteínas solúveis (µg/mL) produzidas durante a FES por <i>A. niger</i> .....	101
Tabela 17 - Análise de variância de proteínas solúveis em meio ácido em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	102
Tabela 18 - Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central 2 <sup>3</sup> sobre proteínas solúveis em meio ácido em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> ...	104
Tabela 19 - Atividade antioxidante em Equivalente Trolox (mg/mL) por ABTS em fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	105
Tabela 20 - Inibição de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (%) por ABTS em fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	107
Tabela 21 - Análise de variância sobre atividade antioxidante em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	110
Tabela 22 - Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central 2 <sup>3</sup> sobre atividade antioxidante em 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	111
Tabela 23 - Atividade proteásica em 0 e 96 h (U g <sup>-1</sup> ) de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	112
Tabela 24 - Concentração de proteínas solúveis (µg/mL) e Rendimento (final - inicial) na fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	113
Tabela 25 - Atividade antioxidante em Equiv. Trolox (mg/mL) e potencial de inibição (%) por ABTS em 0 e 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	114
Tabela 26 - Atividade antioxidante em Equiv. Trolox (umol/L) e potencial de inibição (%) por DPPH em 0 e 96 h de fermentação em estado sólido por <i>A. niger</i> .....	115

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Aplicação de fungos filamentosos na FES.....	33
Quadro 2 - Principais métodos para avaliar atividade antioxidante dos biopeptídeos .....	54
Quadro 3 - Vantagens e desvantagens de métodos clássicos de isolamento e purificação de peptídeos.....	60
Quadro 4 - Comparativo de artigos encontrados nas bases de dados Science Direct e Scopus	62
Quadro 5 - Produção simultânea de proteases e biopeptídeos.....	63



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Substratos para a FES .....	28
2.1.2 Microrganismos utilizados na FES .....	30
2.1.3 Biorreatores para FES .....	34
2.1.4 Vantagens, desvantagens e limitações da FES .....	35
<b>2.2 PROTEASES.....</b>	<b>37</b>
2.2.1 Condições para a produção de proteases por FES .....	40
<b>2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS .....</b>	<b>43</b>
2.3.1 Fontes alimentares de peptídeos bioativos .....	46
2.3.2 Efeitos fisiológicos dos peptídeos bioativos .....	49
2.3.3 Métodos de produção dos peptídeos bioativos .....	55
2.3.4 Métodos de determinação dos peptídeos bioativos .....	58
<b>2.4 PRODUÇÃO CONCOMITANTE DE PROTEASES E BIOPEPTÍDEOS .....</b>	<b>61</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1 SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS.....</b>	<b>65</b>
<b>3.2 MICRORGANISMO E PREPARO DE INÓCULO .....</b>	<b>65</b>
<b>3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>66</b>
3.3.1 Etapa I.....	67
3.3.2 Etapa II.....	68
3.3.3 Etapa III .....	69
<b>3.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....</b>	<b>70</b>
3.4.1 Caracterização dos substratos .....	70
3.4.1.1 <i>Composição Centesimal</i> .....	70
3.4.1.2 <i>Tamanho de partícula</i> .....	70
3.4.2 Análises após o processo fermentativo .....	71
3.4.2.2 <i>Atividade Proteásica</i> .....	71
3.4.2.3 <i>Atividade Antioxidante</i> .....	72
3.4.2.4 <i>Proteínas Solúveis</i> .....	73
3.4.2.5 <i>Atividade Antibacteriana</i> .....	74
3.4.2.6 <i>Caracterização do peso molecular de proteases e biopeptídeos</i> .....	75

<b>3.5 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>75</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E GRANULOMETRIA DOS SUBSTRATOS.</b>	<b>77</b>
<b>4.2 ETAPA I.....</b>	<b>80</b>
4.2.1 Atividade Antioxidante .....	80
4.2.2 Proteínas solúveis em meio ácido .....	87
<b>4.3 ETAPA II .....</b>	<b>90</b>
4.3.1 Atividade Proteásica.....	90
4.3.2 Proteínas Solúveis em meio ácido.....	100
4.3.3 Atividade Antioxidante .....	105
<b>4.3 ETAPA III.....</b>	<b>112</b>
4.3.1 Atividade Proteásica.....	112
4.3.2 Proteínas Solúveis .....	113
4.3.3 Atividade Antioxidante .....	114
4.3.4 Atividade Antimicrobiana .....	116
4.3.5 Caracterização do peso molecular de proteases e biopeptídeos.....	116
4.3.6 Considerações Finais da Etapa III.....	118
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO CIÊNTIFICO.....</b>	<b>141</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O aumento crescente do número de pessoas acometidas por doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e hipertensão, tornou-se uma séria preocupação global, devido as suas altas taxas de incidência e mortalidade. A mudança de hábitos de vida e uma alimentação saudável são consideradas as melhores estratégias para a prevenção destes transtornos (SAADI et al., 2015). Esta relação entre dieta e saúde levou os consumidores a um interesse em prevenir doenças e melhorar seu próprio bem-estar através do uso de alimentos funcionais que, além de nutrir o corpo, podem exercer efeito positivo sobre a saúde (RUTTARATTANAMONGKOL, 2012).

As proteínas possuem um papel nutricional muito importante no crescimento e manutenção do organismo e, além disso, apresentam propriedades funcionais atribuídas principalmente aos biopeptídeos (KITTS; WEILER, 2003). Os biopeptídeos são cadeias compostas por 2 a 20 resíduos de aminoácidos com baixo peso molecular que podem ser liberados pela hidrólise enzimática das proteínas e possuem diversas atividades fisiológicas no organismo, tais como: potencial antioxidante, anti-hipertensivo, antitumoral, antimicrobiano, antitrombótico, entre outros. Suas atividades dependem do comprimento da cadeia, composição e sequência de aminoácidos, podendo melhorar as propriedades funcionais dos alimentos e atuar como alternativa natural para várias drogas sintéticas (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

Os biopeptídeos são formados por hidrólise catalisada por proteases (MAMO; ASSEFA, 2018), que são importantes enzimas usadas nas indústrias de detergentes, processamento de couro, processamento de alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos, produtos químicos e tratamento de resíduos (MCCOTTER; HORIANOPOULUS; KRONSTAD, 2016). Essas enzimas podem ser encontradas em fluidos gastrointestinais (*in vivo*), ou podem ser enzimas comerciais oriundas de plantas, animais ou microrganismos, ou ainda podem ser produzidas por fermentação microbiana (AGYEI; DANQUAH, 2011). Destas fontes, os microrganismos apresentam um grande potencial para a produção de proteases, sintetizando estas enzimas por fermentação submersa (SmF) ou fermentação em estado sólido (FES) (CHUTMANOP et al., 2008).

A fermentação em estado sólido (FES) é um bioprocesso onde os microrganismos, principalmente fungos filamentosos, crescem sobre a superfície de substratos sólidos úmidos na ausência de fluxo livre de água, nos quais seus componentes são hidrolisados por enzimas excretadas pela população microbiana (PANDEY, 2003, COSTA et al., 2018, THOMAS;

LARROCHE; PANDEY, 2013, SOCCOL et al, 2017). A FES tem sido aplicada na produção de enzimas tais como amilases (AFRISHAM et al., 2016, BERTOLIN; COSTA, PASQUALI, 2001, CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2015), lipases (COLLA et al., 2015), celulases (BEHERA; RAY, 2016, CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2015), xilanases (BAKIR et al., 2001, CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2015, COSTA, 2016), proteases (AGRAWAL et al., 2004, BASU; BANIK; DAS, 2008, AMADOU et al., 2011, CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2015), além de outros bioprodutos como ácidos orgânicos (DAS; BRAR; VERMA, 2016, DHILLON et al., 2017), compostos fenólicos (DEY; KUHAD, 2014, JANISZEWSKA et al., 2019), corantes (ERYILMAZ.; DURSUN; DALGIÇ, 2016) e biopeptídeos (AYYASH et al., 2019, CHENG et al., 2017, BOUGATEF et al., 2010, JANISZEWSKA et al., 2019). Estudos mostram que pode ser também utilizada para melhorar as propriedades funcionais de alimentos e redução de seus componentes antinutricionais, como aumento de solubilidade e digestibilidade e redução do inibidor de tripsina e alérgenos, principalmente da soja (CHI; CHO, 2016, ZHENG, et al., 2017).

A FES é um processamento eficiente, que tem como uma das principais vantagens a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato para a ação de microrganismos, com isso tem-se a redução de custos e a valorização dos subprodutos agroindustriais (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2003, SOCCOL et al., 2017, SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). Esses resíduos devem receber grande atenção, pois um terço dos alimentos produzidos no mundo para consumo humano a cada ano é perdido ou desperdiçado (FAO, 2018). Portanto, a busca de alternativas para sua reutilização e geração de novos produtos, é muito importante para reduzir o desperdício da indústria de alimentos e minimizar os impactos ambientais (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Entre os resíduos agroindustriais, a casca e farelo de soja devem receber grande atenção, visto que, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja totalizando uma produção de aproximadamente 115 milhões de toneladas, na safra de 2018/2019 (EMBRAPA, 2020) A casca de soja, obtida na extração do óleo, representa de 8 a 10% da composição do grão (ZHANG; HU, 2012) e apesar desta grande quantidade gerada, tem recebido pouca atenção como matéria-prima de baixo custo tanto para a alimentação humana quanto animal. Já o farelo de soja, devido ao seu alto valor proteico (entre 42 e 50%) e por ser digestível e muito palatável, quando processado corretamente, é muito utilizado para a alimentação animal (BELLAVAR; SNIZECK, 2009). A busca de alternativas para o reaproveitamento destes subprodutos na geração de novos produtos é muito importante, pois aumenta o seu valor



agregado, reduz custos dos processos, o desperdício da indústria de alimentos e a poluição ambiental.

Sendo assim, devido à importância dos biopeptídeos na produção de alimentos funcionais para a manutenção da saúde e diante da importância relatada sobre o reaproveitamento e valoração de subprodutos agroindustriais, este estudo se enquadra na linha de pesquisa de “Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes”, dentro do projeto de pesquisa de “Produção de alimentos, ingredientes e produtos de interesse industrial por bioprocessos” do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnológica de Alimentos da Universidade de Passo Fundo e tem como objetivo a produção simultânea de proteases e biopeptídeos, utilizando subprodutos agroindustriais como substratos para FES. Os objetivos específicos são: Caracterizar os resíduos utilizados na preparação do meio; Determinar a melhor proporção de casca de soja, farelo de soja e farelo de trigo através de um delineamento de misturas; Realizar a seleção de variáveis para a produção concomitante de enzimas e biopeptídeos; Avaliar a atividade antioxidante, atividade proteásica, proteínas solúveis em meio ácido e atividade antimicrobiana do fermentado; Caracterizar os biopeptídeos quanto ao peso molecular.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) é conhecida desde a antiguidade em diversos países. Sua importância histórica para a humanidade data de milhares de anos atrás, principalmente para processamento de alimentos, tanto em países ocidentais (pão e queijo) como orientais (Koji). Entretanto, somente nas últimas décadas esta tecnologia está se expandindo com crescente importância, devido as suas várias vantagens biotecnológicas para a produção de produtos de alto valor agregado, de biomoléculas e produtos importantes para muitas indústrias, incluindo alimentos, produtos farmacêuticos, têxteis, bioquímicos e bioenergéticos, entre outros (BEHERA; RAY, 2016, PANDEY, 2003).

A FES é um processo heterogêneo de três fases, compreendendo fases sólidas, líquidas e gasosas e envolve o crescimento de microrganismos em substratos sólidos úmidos na ausência, ou quase ausência, de água fluindo livremente. A fase líquida corresponde ao filme aquoso que envolve as células, os espaços entre as partículas compreendem a fase gasosa, enquanto o que a fase sólida é representada pelo substrato com suas fontes de nutrientes. Este substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do microorganismo, fornecendo a ele um ambiente mais próximo possível do seu natural. Na fase líquida, ocorre a difusão de nutrientes e solutos, e na fase gasosa: oxigenação, remoção de CO<sub>2</sub>, dissipação de calor (para regular a temperatura média), distribuição de vapor de água e compostos voláteis (COSTA et al., 2018).

A FES é governada por vários fatores críticos relacionados tanto com os aspectos técnicos, quanto com a viabilidade econômica para o desenvolvimento do processo, tais como: seleção de microrganismos e substratos, processo físico-químico, parâmetros biológicos e purificação do produto final, sendo este último, considerado o grande desafio da FES (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013, SALIM et al., 2017, DIVATE et al., 2017, COSTA et al., 2018).

Por muito tempo, a fermentação microbiana tem sido uma das fontes mais importantes de produção de enzimas, entre elas as proteolíticas, que podem efetivamente resultar na liberação de biopeptídeos da proteína parental, que dependendo da sua sequência de aminoácidos, exibe várias propriedades funcionais. Os biopeptídeos podem ser formados através destas enzimas derivadas dos microrganismos ou ainda pela atividade do

microrganismo nos alimentos fermentados (KORHONEN; PIHLANTO, 2006, SANJUKTA; RAI, 2016).

A FES pode ser uma tecnologia integrada e econômica para a biotransformação das proteínas. A fermentação utilizando microrganismos com capacidade de produzir o grupo desejado de enzimas pode ser aplicada no desenvolvimento de bioprocessos de baixo custo, o que amplia a possibilidade de sua aceitação pelas indústrias (RAI et al., 2017).

Produtos da FES podem ter diversas aplicações industriais como produção de ácidos orgânicos, como ácido cítrico produzido do bagaço de maçã por *A. niger* (DHILLON et al., 2013) e de casca da banana, palha de arroz e casca de coco (SHARMA et al., 2017), ambos por *A. Niger*, ou ainda o ácido fumárico produzido de resíduos de papel e celulose por *R. oryzae* 1526 (DAS et al., 2016); de pigmentos, como a astaxantina produzida por *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Sporidiobolus salmonicolor* a partir do bagaço de azeitona (ERYILMAZ; DURSUN; DALGIÇ, 2016) ; de aromas, como os 132 compostos voláteis caracterizados utilizando bagaço de maçã e leveduras (MADRERA; BEDRINANA; VALLES, 2015); de compostos fenólicos, por *Aspergillus awamari*, com milho como substrato (SALAR et al., 2016); produção e recuperação de materiais com propriedades biossorbentes, com *A. niger* utilizando bagaço de maçã (DHILLON et al., 2017); aprimoramento de processos tradicionais como bio-branqueamento e compostagem. Sucessos notáveis de FES também foram alcançados na produção de peptídeos bioativos (AMADOU et al., 2011; HE et al., 2012), bem como proteases de fungos para hidrólise de proteínas de soja (AGRAWAL et al., 2004).

### 2.1.1 Substratos para a FES

Diversos substratos podem ser utilizados na FES e a sua natureza química, propriedades mecânicas, tamanho de partícula, capacidade de retenção de água, superfície aérea, são fatores muito importantes na produtividade do processo (COSTA et al., 2018). Os substratos funcionam como um suporte sólido para absorção de nutrientes e crescimento da biomassa e são fontes de proteínas, carbono e energia, fornecendo condições ótimas de fermentação. Possuem como função fornecer nutrientes para a cultura e servir como ancoragem para as células microbianas. Os principais fatores a serem considerados na escolha de um substrato ou para a FES são custo, disponibilidade, cristalinidade, área acessível, área de superfície, porosidade e tamanho de partícula (FARINAS, 2015; SINGHANIA et al., 2009)

A utilização de matéria-prima de baixo custo como substrato principal é uma das vantagens da FES, sendo os resíduos agrícolas e florestais os substratos mais promissores para a utilização na técnica, pois são abundantes e normalmente subutilizados (COUTO; SANROMÁN, 2006). Esses resíduos são normalmente subprodutos de processos industriais, gerados em grande quantidade e com baixo valor comercial e, muitas vezes, sua eliminação é feita sem qualquer tipo de tratamento, podendo levar a problemas ambientais (FARINAS, 2015). Os resíduos agrícolas que podem ser utilizados como substratos para FES incluem bagaço de cana, bagaço de mandioca, farelo de cereais como farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de aveia e farelo de soja, polpa de café e cascas, cascas de frutas e polpas, espigas de milho, palhas e cascas de origens diferentes (SOCCOL et al., 2017). Alguns estudos têm apontado a promissora produção de enzimas por FES com diferentes resíduos orgânicos, como farelo de soja, trigo e arroz, casca de laranja, maçã e banana (KARATAS et al., 2013, CHUTMANOP et al., 2008, MONTON et al., 2013).

A casca de soja constitui de 8 a 10% do peso da matéria-prima e é um importante subproduto do processamento de soja. A produção de enzimas utilizando a casca de soja como substrato até agora recebeu pouca atenção. A maioria dos estudos utilizou as cepas de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus* na fermentação em estado sólido (FES) e avaliou as atividades de celulase e xilanase (LI et al., 2007).

Em um estudo, investigou-se a formação de peptídeos bioativos, a composição química e a atividade antioxidante a partir de farelo de semente de algodão fermentado por *Bacillus subtilis* BJ-1. Após 48h de FES, as concentrações de peptídeos e a população microbiana atingiram seus valores máximos. Estes resultados sugerem que as proteínas do caroço de algodão podem ser usadas como fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e efetivamente hidrolisadas a peptídeos durante a fermentação. Constatou-se também que o produto fermentado apresentou um alto valor nutricional devido à sua proporção equilibrada de aminoácidos essenciais e que devido seu aumento do potencial antioxidante, pode ser usado como uma boa fonte de antioxidantes naturais para ingredientes alimentícios (SUN et al., 2015).

Divate et al. (2017) estudaram a ação de *Xylaria nigripes*, sob FES, utilizando farelo de trigo e farelo de soja como substratos e foi observado um aumento de potencial antioxidante, antiinflamatório e neuroprotetor, atribuídos principalmente, aos fenóis totais e flavonóides. Em outro estudo utilizou-se farelo de trigo e bagaço de uva para a FES. Enquanto o farelo puro obteve maior atividade enzimática, o consórcio farelo de trigo e bagaço de uva alcançaram maior atividade antioxidante (TELES, et al., 2019).

Os substratos diferem muito na composição, natureza química, propriedades mecânicas, tamanho de partículas, capacidade de retenção de água, área de superfície, entre outros, o que afeta o processo e o desenvolvimento do produto. Normalmente, partículas menores fornecem uma área de superfície maior para a ação do microrganismo, mas se forem muito pequenas, podem resultar em aglomeração do substrato e crescimento deficiente. Já as partículas maiores, permitem melhor aeração, entretanto, uma superfície limitada para o crescimento microbiano (PANDEY et al., 2001).

A umidade também é um fator que influencia a FES e varia de acordo com a natureza do substrato, microrganismo utilizado e metabólito final. Quando há um nível de umidade muito alto, existe uma diminuição de porosidade, baixa difusão do oxigênio, aumento do risco de contaminação e redução da troca gasosa. Entretanto, níveis baixos de umidade, podem levar a um menor grau de crescimento e baixa utilização do substrato (LONSANE, et al., 1985). Para o preparo do meio da fermentação, os níveis de umidade do substrato e a umidade requerida no experimento devem ser observados e adiciona-se água ou solução de nutrientes para correção.

A suplementação do substrato normalmente é necessária para fornecer todos os nutrientes necessários para o crescimento ideal, pois a composição inicial pode não corresponder às exigências do microrganismo. Macro e micronutrientes que são normalmente adicionados ao meio incluem fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto e iodo (FARINAS, 2015). Alguns substratos ainda necessitam de um pré-tratamento físico e/ou químico devido a existência de complexos que limitam a ação das enzimas gradativas e, conseqüentemente, a assimilação dos nutrientes (SCHOLL et al., 2015).

### **2.1.2 Microrganismos utilizados na FES**

A escolha do microrganismo está ligada à seleção do substrato, ao produto final para qual se destina, à fisiologia do microrganismo e aos fatores físico-químicos do meio, como: temperatura, pH, aeração, água atividade e umidade, propriedades do leite (espessura, porosidade), natureza do substrato sólido empregado, incluindo o tamanho das partículas (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Os microrganismos mais adequados para a FES são os fungos filamentosos, uma vez que a técnica simula seu habitat natural, possibilitando a sintetização de quantidades consideráveis de enzimas e seus metabólitos (FARINAS, 2015). As leveduras também possuem capacidade de crescer em ambientes com baixa atividade de água e, portanto, são

muito apropriadas para a técnica. Existem algumas espécies de bactérias que foram descritas como capazes de produzir, com sucesso, enzimas, em condições de estado sólido, como por exemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* e *Lactobacillus* sp. (SINGHANIA et al., 2009). Outros microrganismos, como os Actinomicetos são indicados para o processo, uma vez que apresentam como características a abundante colonização de resíduos sólidos, produção de uma ampla gama de enzimas degradativas e alta resistência a condições extremas (OROZCO et al., 2008).

Considerando a produção de hidrolisado bioativo de importância industrial pela fermentação em estado sólido, a seleção de cepas específicas é muito importante, pois o perfil dos metabólitos responsáveis pela bioatividade é dependente da enzima específica produzida pela cultura inicial (SANJUKTA; RAI, 2016, RAI et al., 2016, SALIM et al., 2017 ). Estudos mostram que diferentes cepas proeolíticas de *B. subtilis* resultam na produção de biopeptídeos antioxidantes com comportamentos diferentes em relação à digestão gastrointestinal (SANJUKTA et al., 2015).

De Castro e Sato (2014) avaliaram a atividade antioxidante de hidrolisados proteicos obtidos pela hidrólise da proteína do soro de leite. Foram utilizados dois tipos de enzimas: a protease de *Aspergillus oryzae* produzidas por FES, utilizando farelo de trigo como substrato e proteases comerciais de *A. oryzae* e *Bacillus lichiniformis*. Como resultado, a protease obtida por FES apresentou-se superior às demais enzimas quanto ao aumento da atividade antioxidante. Entretanto, De Castro e Sato (2015) avaliaram o efeito da hidrólise enzimática das proteínas da clara de ovo e suas propriedades antioxidantes utilizando as mesmas enzimas do estudo anterior. Como resultado, a hidrólise enzimática microbiana aumentou as propriedades antioxidantes das proteínas da clara de ovo, contudo, os preparados com protease comercial apresentaram maior atividade antioxidante que o resultado da protease por FES.

#### 2.1.2.1 Fungos Filamentosos

O uso de culturas de fungos e leveduras é mais comumente utilizado para a FES, baseado no conceito teórico de atividade de água. Como fungos e leveduras requerem menores teores de atividade de água (aw), os tornam mais adequados para o processo. Além disso, os fungos filamentosos possuem propriedades estruturais e fisiológicas que facilitam o crescimento em substratos sólidos e, como principal característica deste crescimento, tem-se a secreção de enzimas nas pontas delas (GOMES et al., 2018). A morfologia dos fungos

filamentosos permite a colonização da superfície do substrato e a matriz em busca dos nutrientes, conseqüentemente secretando níveis mais elevados de metabólitos e enzimas (BARRIOS-GONZÁLES, 2012).

Os fungos filamentosos são usados em numerosos processos biotecnológicos e conhecidos por produzir várias enzimas que degradam as paredes celulares e outras enzimas com poder de melhorar a composição química e bioatividade dos substratos empregados, tais como, fitases, glicoamilases, xilanases, proteases, lipases,  $\alpha$ -galactosidades, poligalacturonases e pectinases (COUTO; SANROMÁN, 2006, PANDEY et al., 2010). Da mesma forma, outros bioprodutos de interesse podem ser fabricados, como por exemplo: ácidos orgânicos, compostos aromáticos e corantes, através da fermentação. A fermentação fúngica, quando aplicada nos alimentos, é capaz de melhorar a digestibilidade e a disponibilidade de proteínas e impedir o crescimento de bactérias indesejáveis e/ou patogênicas, por meio de produção de compostos com atividades antibióticas. (LIZARD-JIMÉNEZ; HERNÁNDEZ-MÁRTINEZ, 2017). A biotecnologia por meio de fungos desempenha um papel central em muitas indústrias, como a de alimentos ( $\alpha$ -amilases, glicoamilases, proteases, pectinases, xilanases), rações (fitases, xilanases), produtos farmacêuticos, papel, celulose, detergentes (lipases, endo-glucanases), têxteis e biocombustíveis (glucoamilases, invertases) (MEYER et al., 2016).

Uma característica interessante de alguns fungos é sua classificação de segurança para diferentes usos pela *Food and Drug Administration* (FDA), na qual os bioprodutos produzidos por eles são classificados como “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS), garantindo que não contêm qualquer componente tóxico deletério para os seres humanos, desde que efetuados da maneira descrita (SCHUSTER et al., 2002).

Vários fungos filamentosos são empregados na FES, tais como: *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp., entre outros . Alguns exemplos de estudos utilizando fungos filamentosos estão citados no Quadro 1.



**Quadro 1 - Aplicação de fungos filamentosos na FES**

<b>Microrganismos</b>	<b>Substrato</b>	<b>Produto (valor máximo)</b>	<b>Autores</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Castanha de caju	Tanase (10,22 U <sub>mg</sub> <sup>-1</sup> de m.s.)	VISWANATH et al., (2015)
<i>Cordyceps militaris</i>	Aveia	Aumento de compostos fenólicos e atividade antioxidante	XIAO et al., (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo (FT), farelo de soja (FS) e farelo de algodão (FA)	Protease FT: 186,42 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> FS: 152,38 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> FA: 118,83 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup>	DE CASTRO et al., (2014)
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de moinhos de arroz	Protease (67,7 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> de m.s.)	PARANTHAMAN et al., (2009)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farelo de arroz e Farelo de Trigo (75:25)	Protease (1200 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> de m.s.)	(CHUTMANOP et al., (2008)
<i>Pleurotus ostreatus</i> / <i>Trametes versicolor</i>	Polpa de tomate e hastes de sorgo	Lacase (15 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> m.s./35 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> m.s.), xilanase (9 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> m.s./50 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> m.s.) e protease (13.000/35.000 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> m.s.)	IANDOLO et al., (2011)
<i>Candida tropicalis</i> / <i>Aspergillus oryzae</i>	Resíduo de Ginko biloba L.	Biodetoxificação de toxinas (redução de 90%), celulase (1.168,26 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> ) e protease (3.145,68 U <sub>g</sub> <sup>-1</sup> )	ZHOU et al., (2015)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Semente de soja	Aumento de compostos fenólicos e da ação antioxidante	HARIKESH et al., 2010
<i>Aspergillus ibericus</i> <i>Aspergillus uvarum</i> <i>Aspergillus niger</i>	Resíduos da indústria do vinho, azeite e cerveja	Aumento no teor de proteínas e enzima lignocelulolíticas	SOUSA et al., 2018
<i>Mucor circinelloides</i>	Ramos de amoreira	Produção de lipídios de 42,43±4,02mg por grama de substrato seco pela bioconverão de biomassa lignocelulósica.	QUIAO et al., 2018

Fonte: elaborado pelo autor (2020).

O microrganismo *Aspergillus niger* caracteriza-se por ser um fungo filamentoso eucariótico, e desenvolve-se em meio aeróbico e em matéria orgânica. Consegue multiplicar-se em temperaturas entre 6°C e 47°C, sendo a temperatura ótima para cultivo entre 35°C e 37°C, o que justifica sua maior frequência de desenvolvimento em localidades quentes e úmidas, em uma ampla faixa de pH, de 1,4 até 9,8. Pode ser cultivado com teores de umidade entre 40% e 70%, sendo a umidade ideal em 60%. Na natureza, pode ser encontrado no solo, em processos de decomposição por resíduos através da compostagem, e em plantas em processo de degradação (SCHUSTER et al., 2002). Apesar da existência de algumas cepas patogênicas de *Aspergillus*, muitas outras são exploradas biotecnologicamente. Inúmeras enzimas, industrialmente relevantes e outras moléculas são produzidas por este fungo (CAIRNS; NAI; MEYER, 2018) e possuem aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética

(detergentes, produção de soluções de tampão de pH e no curtimento de couro) e na obtenção de etanol de segunda geração, através da hidrólise enzimática realizada na etapa de sacarificação (COSTA, 2016).

Quando produzido em laboratório, o *A. niger* apresenta acelerado incremento em sua biomassa, são capazes de se adaptarem ao substrato e produzem diversos metabólitos com alta atividade biológica. Em seu estágio inicial de crescimento é caracterizado pelas cores branca ou amarela, já os estágios posteriores possuem coloração marrom ou negro (DIAS, 2011).

*A.niger* possui um grande tradição na produção e uso seguro de enzimas e ácidos orgânicos e muitos desses produtos são considerados como geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) (SCHUSTER et al., 2002). Este microrganismo é considerado umas das fontes mais importantes de proteases fúngicas. O sequenciamento do genoma mostra que *A. niger* possui 198 proteínas envolvidas no processo de degradação proteolítica (PEL et al., 2007).

### **2.1.3 Biorreatores para FES**

A FES é realizada em biorreatores também conhecidos como fermentadores e diferentes tipos têm sido utilizados dependendo do processo empregado. Em estudos laboratoriais, normalmente utiliza-se frascos Erlenmeyer, garrafas Roux, béqueres, frascos ou colunas de vidro (PANDEY, 2003). Quando em larga escala, a FES pode ser realizada com fermentadores tipo bandejas, tambor ou tanque de profundidade. Entretanto, os biorreatores mais frequentemente empregados são os de bandeja, de leite empacotado, tambor rotativo, de leite fluidizado e o biorreator instrumentado em escala de laboratório (BEHERA; RAY, 2016).

Os biorreatores são classificados com base no sistema de mistura utilizado: estáticos (leito fixo, bandejas forradas) ou dinâmicos (tambor horizontal ou tambor roto), quanto ao tipo de aeração empregado (com ou sem aeração forçada), ou ainda relacionado ao sistema de mistura empregado. O projeto de biorreatores é muito complexo e devem-se considerar algumas particularidades dos materiais usados como substrato e suas características (composição, tamanho, resistência, porosidade, capacidade de retenção de água), bem como os detalhes sobre o microrganismo e se será aeração por difusão ou forçada (DURAND, 2003).

Diferentes tipos de biorreatores estáticos podem ser utilizados tanto em laboratório, quanto em escala industrial: frascos de erlenmeyer, bandejas pequenas forradas, biorreatores de leite fixo ou colunas de *Raimbault*, placas de Petri, potes, garrafas de *Roux* e garrafas rotativas. Eles possuem a vantagem da simplicidade e a possibilidade de trabalhar com pequenos volumes. A principal característica é a ausência de agitação. Os frascos de Erlenmeyer são comumente usados em escala de laboratório para estudos iniciais e otimização de processo. São de vidro e normalmente são fechados com algodão para permitir aeração por difusão. Suas vantagens são fácil manuseio, baixo custo e permite testes múltiplos simultâneos (SINGHANIA et al., 2009).

Outros tipos de biorreatores usados na FES são os que recebem agitação contínua ou intermitente do meio sólido. Eles podem ser tambores rotativos ou misturadores de pás horizontais, com ou sem aquecimento. Com este tipo de biorreator espera-se aumentar a homogeneidade do meio sólido e melhorar a transferência de oxigênio para o microrganismo (DURAND, 2003; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). A agitação e a rotação, na FES, são realizadas para melhorar a transferência de calor e massa, mas a força do cisalhamento causada pela agitação pode resultar em efeitos adversos na porosidade e romper o micélio fúngico (COUTO; SANROMÁN, 2006). Tsouko et al. (2017) utilizaram biorreatores de bandeja e de tambor rotativo para a fermentação de torta de dendê e fibra prensada de palma, por *Aspergillus oryzae*, para a produção de protease. Finkler et al. (2017) realizaram a FES com biorreator de leite empacotado para a produção de pectinase por *A. niger*, com farelo de trigo e bagaço de cana como substratos e observaram uma aglomeração do meio, superaquecimento e baixa uniformidade nos níveis da enzima que foram minimizados com agitação intermitente como estratégia.

#### **2.1.4 Vantagens, desvantagens e limitações da FES**

A FES foi por muito tempo ignorada pelos países ocidentais, muito provavelmente, em consequência da descoberta da penicilina pelo uso de fermentação submersa (FSm), na qual envolve um tipo de fermentação realizada num meio com água excedente. Contudo, nas últimas décadas, a FES recuperou a atenção devido a suas várias vantagens biotecnológicas sobre a FSm (PANDEY, 2003).

Entre as vantagens da FES pode-se citar: imita o habitat natural dos microrganismos (principalmente fungos); demanda menor energia para esterilização (devido sua menor

atividade de água); é menos susceptível a contaminação bacteriana; permite maior produtividade enzimática; é menos vulnerável à inibição do substrato, permitindo maior concentração final de produtos; é *ecofriendly*, possibilitando a utilização de resíduos agroindustriais como substrato e/ou fonte de energia; menor produção de efluentes; maior qualidade e maior atividade dos extratos; não há necessidade de solventes orgânicos (que geralmente conferem algum nível de toxicidade ao extrato); menor capital e custos operacionais; redução da agitação; alta capacidade de fermentação; maior estabilidade do produto final; menor repressão metabólica (COSTA, et al., 2018; SINGHANIA; PATEL; SOCCOL; PANDEY, 2009).

A FES pode ser considerada ambientalmente correta, pois utiliza matérias-primas de baixo custo subutilizadas ou rejeitas pela indústria agrícola durante o processo de produção. No cenário brasileiro, voltado para a economia agrícola; especialmente soja, trigo, milho e cana-de-açúcar, o potencial tecnológico para a reutilização eficiente de resíduos agroindustriais pode contribuir para o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, aromas e fragrâncias, pigmentos, polissacarídeos e hormônios, agregando valor este resíduo produzido em grandes quantidades, (SOCCOL; VANDENBERHE, 2003).

Apesar de várias vantagens da FES, o principal problema do processo são os fatores relacionados à engenharia, como o projeto e operação dos biorreatores e a ampliação da técnica para comercialização. Não existem regras gerais para orientar o aumento de escala dos biorreatores de FES. Cada caso deve ser analisado isoladamente (MAULINI-DURAN et al., 2015, FINKLER et al., 2017). Concomitante a isso, há uma dificuldade em monitorar e controlar os diferentes parâmetros do processo como pH, temperatura, aeração, transferência de oxigênio e umidade (COUTO; SANROMÁN, 2006) e as variáveis que afetam o crescimento microbiano e a produção de metabólitos (BEHERA; RAY, 2016. COSTA et al., 2018). Normalmente, o produto final possui maior impureza, acarretando em custos mais elevados para a sua recuperação (COUTO; SANROMÁN, 2006). Sendo assim, os principais critérios que devem ser analisados na FES são: transferência de calor e massa dentro do substrato, monitoramento online de parâmetros chaves do processo e mistura adequada do substrato sem danificar os microrganismos e os tamanhos de partículas (COSTA, et al., 2018).

A geração de calor advinda das atividades metabólicas dos microrganismos não é desejável e pode ser prejudicial para a FES, pois as enzimas produzidas durante o processo podem desnaturar-se pelo calor. Isto ocorre, pois existe uma dificuldade em remover o excesso de calor gerado pelo metabolismo microbiano devido a baixa condutividade térmica

do meio sólido e as baixas taxas de fluxo de ar. A temperatura pode atingir até 20°C acima da temperatura ideal de fermentação, inibindo o crescimento dos microrganismos e a produção de seus metabólitos. Por causa disso, a aeração do meio é mais importante para a dissipação do calor do que como fonte de oxigênio (CASCIATORI, et al., 2016).

Outro fator importante que deve ser considerado é o isolamento e a purificação de um bioproduto advindo da FES em larga escala. Economicamente, essa etapa representa de 70 a 90% dos custos totais do processo e, quanto ao aspecto técnico, a purificação a partir de um meio fermentado, necessita de uma combinação de técnicas para a sua separação, que pode ser de acordo com tamanho, carga, hidrofobicidade ou capacidade de se ligar em certos compostos (GALAEV; MATTIASSON, 2001). As técnicas mais utilizadas para a purificação de proteínas são as cromatográficas. O método é muito específico e permite obter frações muito puras, entretanto, apresentam baixos rendimentos e são difíceis de escalonar, aumentando o custo do produto final. Na indústria de alimentos e bebidas, as enzimas microbianas requerem certo grau de purificação, mas para viabilizar o uso destas enzimas no processamento o custo deve ser minimizado (PRZYBYCIEN; PUJAR; STEELE, 2004, AFRISHAM et al., 2016, SINK; CHAUHAN; KENNEDY, 2017).

## 2.2 PROTEASES

As enzimas são proteínas formadas através de ligações peptídicas, pela interação entre aminoácidos. Sua principal função é acelerar a velocidade de reações, atuando como catalisador, sem comprometer a relação entre reagentes e produtos que devem ser obtidos no final da reação e faz as reações ocorrerem com menor energia de ativação. Cada enzima possui uma estrutura química específica para o seu substrato, o que faz com que o sítio ativo da enzima ligue-se somente com um tipo específico de substrato, gerando grande especificidade para o processo de catálise (MARZZOCO; TORRES, 1999).

A maioria das enzimas usadas em todo o mundo é produzida por fungos filamentosos. Em 2015, o mercado global de enzimas industriais foi estimado em 3,5 bilhões de euros. Várias espécies de fungos como *Aspergillus*, *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila*, são importantes para a produção de enzimas industriais. A diversidade metabólica dos fungos e a ampla gama de nichos ecológicos que habitam, significa que muitas espécies, especialmente os basidiomicetos, têm um potencial significativo como fontes de novas enzimas (MEYER, et al., 2016).

Grande parte das enzimas microbianas é produzida por fermentação submersa, em meio líquido, contendo os nutrientes necessários. Este processo possui como benefícios a homogeneidade do meio e a possibilidade de controlar parâmetros como temperatura e pH (COLLA et al., 2010). Entretanto, a fermentação em estado sólido (FES) permite a produção dessas biomoléculas com maior atividade e estabilidade, com baixo custo pelo uso de resíduos agroindustriais e equipamentos simples, além de ser ambientalmente correta, com menor volume de efluente produzido (COLLA et al., 2010, EL-BAKRY et al., 2015). A maioria dos trabalhos científicos sobre FES, publicados nos últimos anos, relaciona-se à produção de enzimas, principalmente a produção de celulases e xilanases. Já as proteases foram o terceiro grupo mais estudado sobre enzimas produzidas por FES, produzidas a partir de resíduos agroindustriais e também da indústria de curtumes, especialmente os fungos do gênero *Aspergillus* (SOCCOL et al., 2017).

As proteases são enzimas multifuncionais que catalisam a hidrólise de proteínas. Quando quebram as ligações peptídicas no N ou C terminal das cadeias, são conhecidas como exopeptidases (LONDOÑO-HÉRNADEZ et al., 2017) e denominadas Flavourzyme®, carboxipeptidase, aminopeptidase, dipeptidases. Quando as quebras das ligações estão dentro da cadeia, elas são conhecidas como endopeptidases (LONDOÑO-HÉRNADEZ et al., 2017), como tripsina, quimotripsina, pepsina e Alcalase®. As proteases são classificadas em protease de serina, protease de treonina, protease de cisteína, protease aspártica e protease glutamínica, dependendo dos aminoácidos presentes no sítio ativo. Há ainda as metaloproteases, quando um íon metálico é requerido para a ação catalítica (HSIAO et al., 2014). As proteases exibem especificidade quanto ao substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, pH, temperatura e perfis de estabilidade (SETHI, et al., 2016).

Essas enzimas são consideradas as mais importantes produzidas pela indústria de biotecnologia, respondendo por cerca de 60% do mercado global, com aplicações em detergentes, processamento de couro, processamento de alimentos e rações, produtos farmacêuticos, produtos químicos e tratamento de resíduos. Nos alimentos, as proteases têm duas aplicações principais: no processamento de produtos alimentares tradicionais e no processamento de novos ingredientes à base de proteínas, que devido a suas características podem ser denominados alimentos funcionais (MACCHIONE et al., 2008, RAMAKRISHNA; RAJASEKHAR; REDDY, 2010, SEVINC; DEMIRKAN, 2011, RIBEIRO et al., 2015, NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016).

As proteases podem ser isoladas de plantas (papaína e bromelina), animais (pepsina, tripsina e quimotripsina) e microorganismos. Destas fontes, os microorganismos apresentam

um grande potencial para a produção de proteases, devido à sua ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética (DE CASTRO et al., 2015), e uma alta taxa de crescimento (SWAMY et al., 2012). Além disso, a protease microbiana pode ser produzida em grandes quantidades em um período relativamente curto, tem uma vida útil mais longa e pode ser armazenada em condições abaixo do ideal por semanas, sem perdas significativas de atividade (GUPTA et al., 2002).

Os fungos produzem uma variedade de proteases maiores que as bactérias. Essas proteases são ativas em uma ampla faixa de pH, possuem alta especificidade de substrato e podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (RAO et al., 1998).

O processo de produção de proteases fúngicas atrai grande atenção dos biotecnologistas devido ao crescimento de fungos em substratos de baixo custo, à secreção de um grande número de enzimas no meio (SOUZA et al., 2015), facilidade de filtração de biomassa e à alta taxa de crescimento do fungo (SNYMAN; THERON; DIVOL, 2019). Além disso, os fungos filamentosos, quando aplicados como cultura inicial nas indústrias de alimentos fermentados, bebidas e bioprocessos secretam suas enzimas diretamente no meio, que se beneficia da sua atividade hidrolítica, eliminando a necessidade de etapas adicionais de recuperação enzimática, extração e aplicação exógena das enzimas. Os fungos são economicamente vantajosos em termos de tempo e custo (SNYMAN; THERON; DIVOL, 2019).

As proteases também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que as atividades são ótimas, podendo ser ácidas, neutras ou alcalinas (SETHI et al., 2016). As proteases neutras são importantes na indústria de alimentos devido à hidrólise de ligações peptídicas envolvendo aminoácidos hidrofóbicos a um pH neutro, reduzindo a amargura dos hidrolisados (SANDHYA et al., 2005). As proteases ácidas são endopeptidases que exibem uma variedade de aplicações na indústria de alimentos, bebidas e medicamentos. São proteínas microbianas aspárticas que dependem de resíduos de ácido aspártico, mostram sua atividade máxima em pH baixo e podem ser divididas em enzimas tipo pepsina e renina (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2009). As proteases alcalinas são ativas em pH neutro a alcalino, possuem um centro de serina ou são do tipo metalo e são usadas nas indústrias de detergente, alimentos, farmacêutica e couro (SHARMA et al., 2017). Estudos mostram que os fungos do gênero *Aspergillus* são capazes de sintetizar os três tipos de proteases: ácido (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2009), neutro (SANDHYA et al., 2005) e alcalino (HAJJI et al., 2008).

### 2.2.1 Condições para a produção de proteases por FES

Os principais fatores que afetam a síntese de enzimas microbianas em um sistema FES incluem a seleção de um substrato apropriado, tamanho de partícula, atividade da água, umidade relativa, pré-tratamento do substrato, microorganismos utilizados, tipo e tamanho do inóculo, período de cultivo, controle de temperatura e de pH da matéria fermentadora, remoção de calor metabólico, período de cultivo, manutenção da uniformidade no ambiente do sistema e na atmosfera de gás, ou seja, taxa de consumo de oxigênio e taxa de evolução de dióxido de carbono (SHARMA et al., 2017; PANDEY; SOCCOL; MITCHEL, 2000; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013; COSTA et al., 2018).

Existem vários estudos descrevendo o uso de resíduos agroindustriais para a produção de proteases por bactérias e fungos sob FES. Macchione et al. (2008) fizeram um estudo comparativo para avaliar a produção de proteases por FES e FSm, por nove fungos termofílicos, utilizando substratos contendo proteínas para induzir a secreção enzimática (extrato de soja, farinha de soja, leite em pó, arroz e farelo de trigo). Na FES os resultados mais satisfatórios foram obtidos com o uso do farelo de trigo e os fungos que se destacaram foram: *Thermomyces lanuginosus*, *T. lanuginosus* TO. 03, *Aspergillus* sp. 13,34, *Aspergillus* sp. 13,35 e *Rhizomucor* sp. 13,37.

Resíduos de café foram testados para a produção de protease por *A. oryzae* CFR305 e a produção máxima de protease foi de 12.236 U/gds. A enzima foi purificada e caracterizada como serina protease (MURTHY; NAIDU, 2010).

Bolo de soja desengordurado foi utilizado para produção de protease por *Penicillium* sp. e o estudo mostrou que a enzima era estável na faixa de pH 6,0 - 9,0 e temperaturas de aproximadamente 35 ° - 45 °C. O pH 6,5 foi encontrado como o ideal, no qual foi apresentada a maior atividade proteásica (43 U/mL). Purificação e caracterização parciais sugeriram a presença de serina protease neutra (GERMANO et al., 2003).

De Castro et al. (2016) demonstraram que as proteases produzidas usando *A. niger* por fermentação em estado sólido apresentaram diferentes comportamentos bioquímicos na presença de solventes orgânicos, NaCl, surfactantes e agentes oxidantes, dependendo do resíduo agroindustrial utilizado como substrato.

De Castro et al. (2015) avaliaram a produção de protease por *A. niger* usando diferentes sub agroindustriais sob FES. Misturas contendo farelo de trigo (50%) e farelo de soja (50%) resultaram em produção máxima de protease, atingindo 262,78 U g<sup>-1</sup> em 48 horas de fermentação. Houve também um aumento de 7,6% para 582,7% na produção de protease



quando comparado aos substratos individuais com misturas quaternárias de farelo de trigo, farelo de soja, farelo de algodão e casca de laranja nas mesmas proporções em uma fermentação de 48 horas.

O tamanho das partículas dos substratos é um fator muito importante do processo e deve ser selecionado para cada técnica em particular, pois a área de superfície desempenha um papel vital para a fixação microbiana, transferência de massa de vários nutrientes e substratos e conseqüente crescimento dos microrganismos e produção do produto. A produção de protease por *A. Oryzae* foi considerada mais alta com tamanho de partícula de 1mm de casca de café, quando comparados com 0,5mm e 2mm (MURTHY; NAIDU, 2010). Já Elibol e Moreira (2005), verificaram que o tamanho de 2mm da soja era o ideal para maior produção de protease por *Teredinobacter turniare* e o rendimento máximo de protease foi de 1.950 U mL<sup>-1</sup>.

O teor de água de um meio tem grande influência na FES, pois é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos e absorção celular, causando grande impacto nas propriedades físicas do substrato, fator que diferencia da FSm (PANDEY, 2003). Foi observado que 50% do teor de umidade inicial é melhor para a produção de protease por *Penicillium* sp. e o fermentado exibiu atividade máxima (8.907 U g<sup>-1</sup>) a pH 9,0 e 45 ° C (AGRAWAL et al., 2004). Outros estudos também utilizaram 50% de umidade inicial: uma FES com *A. oryzae* NRRL 2217 produziu uma metaloprotease (SUMANTHA et al., 2005); a produção de protease por *A. niger* usando soja, trigo e farelo de algodão como substratos (DE CASTRO et al. , 2015) e produção de compostos fenólicos por *R. oryzae* (SCHMIDT et al., 2014). Em um estudo com *A. oryzae*, *R. oryzae* e *B. subtilis*, 90% de umidade foi usada na FES com soja, a fim de obter farinha com alto teor de compostos antioxidantes (FERNANDEZ-OROZCO et al., 2007) .

Uma avaliação da produção de proteases por diferentes linhagens de fungos GRAS, usando farelo de soja e farelo de trigo como substratos, concluiu que, dependendo do resíduo e do fungo utilizado, houve uma produção de enzimas com características distintas que podem ser aplicadas na indústria de várias maneiras. *A. oryzae* mostrou estabilidade em todos os valores de pH estudados (4 a 9). *P. roquefortii* e *A. flavipes* apresentaram dois picos de atividade ótima de protease a 50 ° C e 90 ° C (NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016).

Pesquisas comparando diferentes espécies de *Aspergillus* indicam que, dependendo da cepa utilizada, há uma alteração no caráter bioquímico da protease produzida. Ortiz et al. (2016) conduziram um estudo comparativo da produção de protease utilizando 12 cepas diferentes de *Aspergillus* (*A. terreus* ICFC 744/11, *A. oryzae* NRRL 2217 e ICFC 8/12, *A.*

*awamori* NRRL 356, *A. flavipes* NRRL 295, *A. kawachii* IFO 4308, *Aspergillus* sp. ICFC 7/14, *A. japonicus* NRRL 1782, *A. giganteus* NRRL 10, *A. rhizopodus* NRRL 6136, *A. sojae* NRRL 5595 e ATCC 20235), via fermentação em estado sólido, para ampliar a faixa de espécies do gênero *Aspergillus* para produção adequada de enzimas. Entre as espécies, quatro obtiveram altos níveis de atividade proteolítica em um curto período de fermentação, reduzindo os custos de produção: *A. oryzae* NRRL 2217, *A. flavipes* NRRL 295, *A. oryzae* ICFC 8/12 e *A. sojae* ATCC 20235. A atividade proteásica observada foi de aproximadamente 300 U/gds, 280 U/gds, 350 U/gds e 450 U/gds, respectivamente. *A. sojae* ATCC 20235 foi a cepa mais promissora para a produção de proteases úteis a serem usadas na produção de peptídeos com relevância nutricional e medicinal (ORTIZ et al., 2016).

Para a maioria dos fungos, foi relatada uma faixa ideal de temperatura de 28 a 30 ° C para a produção de protease sob FES, conforme observado para *A. niger* (DE CASTRO et al., 2015), *A. oryzae* CFR305 (MURTHY E NAIDU, 2010) e *Penicillium* sp. (AGRAWAL et al., 2004). M'hir et al. (2009) realizaram a FES com *R. oryzae* a 30 ° C. Janiszewska et al. (2019) utilizaram 31 ° C para a fermentação de *Rhizopus oligosporus* e 25 ° C para *Aspergillus oryzae*. Ortiz et al. (2016) utilizaram 28 ° C para a produção de proteases e hidrolisados de proteínas usando 12 espécies de *Aspergillus*.

Sabe-se que os fungos termofílicos produzem enzimas termoestáveis que suportam altas temperaturas e são úteis na indústria de alimentos. Temperaturas mais altas são importantes em processos para reduzir ou eliminar a contaminação microbiana, reduzir a viscosidade e melhorar a solubilidade do substrato (NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016). O uso dessas enzimas pode ter muitas vantagens, especialmente na indústria de alimentos, onde altas temperaturas podem ser usadas na produção de alimentos. As proteases produzidas por *R. oryzae* são termoestáveis, com temperaturas ótimas entre 60-70 ° C, com a adição de ácido e pH entre 3,4 - 5,5 (LONDOÑO-HERNÁNDEZ et al., 2017).

Um estudo relatou que pH entre 7,0 e 7,5 é ideal para a produção de proteases por bactérias e fungos, incluindo *A. niger* usando resíduos de moinhos de arroz. Neste estudo, a maior atividade de protease foi de 67,7 U g<sup>-1</sup> (PARANTHAMAN et al., 2009). Um pH levemente ácido (6) foi considerado ideal para FES por *Pseudomonas aeruginosa* PseA, usando torta de semente de pinhão-manso para produção de protease (1.818 U g<sup>-1</sup>) (MAHANTA; GUPTA; KHARE, 2008). Tunga et al. (1998) relataram um pH inicial ideal de 5,5 para a produção de protease, com a atividade ótima de 341 U g<sup>-1</sup>, por *R. oryzae*, usando farelo de trigo como substrato para a FES.

Geralmente, o tempo necessário para a produção ideal de protease por bactérias ou fungos é de 48h a 9 dias de fermentação e pode estar associado ao crescimento exponencial ou à fase estacionária de microrganismos. O tempo de incubação para produção máxima de protease por diferentes espécies de fungos por FES foi de 72 h para *Penicillium* sp (AGRAWAL et al., 2004) e *A. niger* (PARANTHAMAN et al., 2009); 48h para *A. niger* (DE CASTRO et al., 2015); 120h para *A. oryzae* CFR305 (MURTHY; NAIDU, 2010).

Em relação aos biorreatores, Tsouko et al. (2017) usaram biorreatores de bandeja e um biorreator de tambor rotativo para a fermentação de torta de palmiste e fibra prensada com palma, usando *Aspergillus oryzae* para a produção de protease. Em outro estudo utilizou um biorreator cilíndrico de leito fixo com aeração forçada, para investigar a produção de um grupo de enzimas industrialmente relevantes, incluindo protease, por *Aspergillus awamori* IOC-3914, usando o bolo de babaçu como matéria-prima. O objetivo deste estudo foi superar as limitações de aumento de escala dos biorreatores convencionais de fermentação em estado sólido (FES) do tipo bandeja. Como resultado, os biorreatores de leito fixo com aeração forçada apresentaram uma alternativa promissora em termos de biorreatores instrumentados para processos FES (CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2015).

### 2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

As proteínas constituem um dos componentes essenciais da dieta, sendo o seu consumo necessário ao longo da vida. Elas desempenham um papel nutricional muito importante no crescimento e manutenção do organismo e podem atuar como enzimas, transportadores de membranas, reguladores de processos metabólicos, transportadores de oxigênio, e seus aminoácidos, desempenham papel de precursores de ácidos nucleicos, hormônios, vitaminas e outras moléculas essenciais para a vida (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2005). Além disso, as proteínas também são conhecidas por oferecer benefícios à saúde *in vivo* e *in vitro* na forma intacta ou hidrolisada. Estas propriedades biofuncionais das proteínas da dieta são atribuídas principalmente aos hidrolisados proteicos, chamados de peptídeos bioativos, que podem ter efeito positivo sobre a função e saúde do corpo quando liberados (HARTMANN; MEISEL, 2007, SAADI et al., 2015).

Os peptídeos bioativos são moléculas orgânicas normalmente formadas por 2 a 20 resíduos de aminoácidos, unidos por ligações covalentes também conhecidas como ligações amida ou peptídicas (SÁNCHEZ; VÁZQUEZ, 2017), com massas moleculares abaixo de 6000 Da (SUN; HE; XIE, 2004). Entretanto, este número pode ser maior, como por exemplo,

a Lunasina, um peptídeo encontrado naturalmente na soja, com potencial ação contra doenças crônicas como câncer, doenças cardiovasculares e imunológicas e que contém 44 aminoácidos com peso de 5139,25 Da (HSIEH et al., 2018). Conforme Panchaud, Affolter e Kussman (2012) os biopeptídeos são classificados como peptídeos curtos, que possuem menos de sete aminoácidos, peptídeos de comprimento moderado, de sete a vinte e cinco aminoácidos e peptídeos grandes, com mais de vinte e cinco aminoácidos. Atualmente, mais de 3942 peptídeos bioativos diferentes foram relatados em um banco de dados chamado 'BIOPEP', que frequentemente é atualizado (MINKIEWICZ; IWANIAK; DAREWICZ; 2019).

Sequências de aminoácidos presentes nas proteínas podem ser liberadas na forma de peptídeos bioativos por meio de hidrólise enzimática gastrointestinal durante a digestão no corpo ou durante o processamento dos alimentos (maturação de queijos e fermentação do leite). Além disso, os peptídeos bioativos também podem ser gerados pela hidrólise *in vitro* da proteína utilizando enzimas digestivas proteolíticas, hidrólise por microrganismos proteolíticos ou através de agente proteolíticos derivados de enzimas provenientes de microrganismos ou plantas (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Os peptídeos bioativos pode também originar-se de proteínas endógenas como hemoglobina, citocromo e colágeno clivados por enzimas proteolíticas e são conhecidos como criptídeos (SAMIR; LINK, 2011).

A natureza do substrato protéico, a especificidade da enzima usada para a proteólise, as condições utilizadas durante a hidrólise (tempo e temperatura), bem como relação enzima/substrato influenciam o peso molecular e a composição de aminoácidos de peptídeos bioativos, e assim, suas atividades biológicas (SILA; BOUGATEF, 2016, VAN DER VEN; et al., 2002).

Uma característica importante dos peptídeos bioativos é que o intestino humano os absorve facilmente, especialmente di e tripeptídeos (SILK, et al., 1979). Hara et al. (1984) mostraram que em ratos a absorção de pequenos peptídeos era 70 a 80% maior que a dos aminoácidos livres.

A passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) pode dificultar fortemente a eficácia, principalmente de peptídeos de cadeia longa, devido às condições de pH severo e à presença das enzimas do TGI. Pequenos peptídeos são mais absorvidos que os maiores, pois estes últimos estão propensos a serem hidrolisados por peptidases dos enterócitos. Apenas uma pequena fração de biopeptídeos é transportada intacta pelos enterócitos intestinais em direção aos receptores alvos (BOUGLÉ, BOUHALLAB, 2015). Em relação aos peptídeos curtos, García-Mora et al. (2017) relataram que a digestão gastrointestinal simulada de peptídeos derivados da lentilha geralmente aumentava a atividade antioxidante e a inibição da enzima

conversora de Angiotensina (ECA), resultando na liberação adicional de fragmentos peptídicos menores com efeitos biológicos sinérgicos. Os peptídeos com Prolina ou Hidroxiprolina no seu C-Terminal são geralmente resistentes à degradação digestiva (VERMEIRSEN; VAN CAMP; VERSTRAETE, 2004).

Diversas estratégias podem ser utilizadas para proteger a biofuncionalidade dos biopeptídeos durante seu transporte nos enterócitos para a circulação portal sem qualquer desnaturação ou deformação física. Para isso, eles podem ser incorporados, suspensos, dispersos ou encapsulados de diferentes formas como emulsões, lipossomas e polímeros comestíveis, garantindo a sua estabilidade e eficácia. Além disso, devido às suas características estruturais e seus resíduos de aminoácidos posicionados no N-terminal e C-terminal, os biopeptídeos podem exibir uma resistência natural, importante para garantir a biodisponibilidade máxima quando atingem o sangue e ajudar os biopeptídeos a contribuírem significativamente para várias funções biológicas (PATEL; VELIKOV, 2011, SAADI et al.; 2015).

Quando liberados da proteína, os peptídios bioativos podem atuar no organismo humano desempenhando diversas funções. A primeira indicação dos benefícios dos peptídeos bioativos derivados de alimentos foi feita por Mellander (1950, apud WANG; MEJIA, 2005) que observou que peptídeos fosforilados derivados de caseína atuaram na calcificação óssea de crianças raquíticas. Desde então, numerosos peptídeos com várias funções bioativas têm sido identificados e relatados em bancos de dados chamado 'Biopep' e BioPD (banco de dados do polipeptídeo bioativo) (DZIUBA; IWANIAK; MINKIEWICZ, 2003). Os biopeptídeos são indicados para diminuição da pressão arterial pela atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (ECA), redução do colesterol, ação antioxidante e antitrombótica, aumento da absorção e/ou biodisponibilidade de minerais, efeitos cito ou imunomoduladores, ação antimicrobiana entre outros (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Devido a estes benefícios há um grande interesse de pesquisadores e das indústrias na elaboração de alimentos que exploram o potencial destes biopeptídeos, tornando-os funcionais. Diversos estudos recentes confirmaram a aplicabilidade de peptídeos em alimentos funcionais. Chatterjee, Kanawjia e Khetra (2016) mostraram que a adição de um hidrolisado de proteína de soro de leite em iogurte indiano aumentou significativamente a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), reduzindo a pressão arterial e a atividade antioxidante e mostrou-se estável durante o processamento do alimento. Graves et al. (2016) relataram que um peptídeo anticâncer derivado do farelo de arroz teve uma boa estabilidade, com degradação de apenas 10%, em suco de laranja seco por spray reidratado quando

armazenado refrigerado por seis meses. Yu et al. (2016) observaram que um extrato de peptídeo de soro de leite de baixo peso molecular oriundo de uma mistura de soro de leite de vaca, cabra e ovelha estimularam o crescimento de bactérias probióticas em ratos.

Os biopeptídeos já são comercializados industrialmente e são utilizados como ingredientes funcionais, principalmente os derivados de soro de leite, tais como *Praventin*<sup>TM</sup>, um suplemento alimentar em cápsulas, com hidrolisado de proteína de soro de leite enriquecido em lactoferrina, fabricado na Holanda e utilizado para redução de acne; *Dermylex*<sup>TM</sup>, suplemento fabricado no Canadá composto por extrato de proteína de soro de leite XP-828L para reduzir sintomas de psoríase; linha de produtos *BioZate*<sup>®</sup>, hidrolisados de proteína de soro de leite com fragmentos de  $\beta$ -lactoglobulina para redução de pressão arterial (DULLIUS et al., 2018). No Brasil, há um composto denominado *Lactium*, produzido em farmácias de manipulação, composto por um biopeptídeo derivado da caseína do leite, com descrição de propriedades relaxantes. Também podemos encontrar no Brasil colágeno hidrolisado para fortalecimento da pele.

### 2.3.1 Fontes alimentares de peptídeos bioativos

Todos os materiais alimentares, especialmente os ricos em proteínas, podem ser utilizados na produção de peptídeos bioativos, como por exemplo, o leite e seus derivados, que, por meio de um processo fermentativo microbiano, há a fabricação de vários tipos de queijos e leites fermentados (KORHONEN; PIHLANTO, 2006); ovos; peixes; cereais, como trigo, arroz e milho; e soja, incluindo seus derivados (WANG; MEJIA, 2005). Além disso, os biopeptídeos podem ser produzidos a partir de subprodutos de empresas de processamento de proteínas alimentares, que resultará em redução no custo de produção com a vantagem adicional de um descarte eficiente de resíduos (YANG, et al., 2009).

#### 2.3.1.1 Produtos de origem animal

Os produtos de origem animal são considerados uma fonte rica de biopeptídeos devido a seu alto valor proteico. Subprodutos como pele de peixe, ossos e carne picada residual são relativamente baratos e também podem ser utilizados na produção de peptídeos bioativos (YANG et al., 2009).

Os peptídeos do leite podem ser formados a partir da caseína ( $\alpha_s$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\kappa$ - caseína) e proteínas de soro de leite ( $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, lactoferrina e imunoglobulina) e

podem ser liberados por hidrólise enzimática, realizada por enzimas únicas ou uma combinação de enzimas como: tripsinase, carboxipeptidase, alcalase, entre outras; ou fermentação microbiana, por algumas bactérias do ácido láctico, tais como: *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus delbruski* subsp. *bulgaricus*, na qual produzem leite fermentado e iogurtes e queijos (WANG; MEJIA, 2005).

As condições do processamento de leite e derivados afetam a formação dos biopeptídeos e sua biofuncionalidade (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Em estudo realizado por García-Tejedor et al. (2013), 20 cepas de leveduras da espécie *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Debaryomyces hansenii* foram utilizadas para formação de biopeptídeos com ação anti-hipertensiva a partir de proteínas do leite, onde utilizaram a caseína e lactoferrina como fontes de nitrogênio. Como resultado das análises in vitro e in vivo (ratos), obtiveram-se potentes inibitórios da ECA e a espécie com melhor ação foi *K. marxianus*. Em outro estudo mais recente observaram que biopeptídeos provenientes de leite de camelo possuem propriedades antioxidantes quando hidrolisados pela enzima pepsina in vitro (IBRAHIM; ISONO; MIYATA, 2018). Ashar e Chand (2004) isolaram biopeptídeos de um leite fermentado indiano (*Dahi*) com ação inibitória da ECA.

Os ovos também são considerados boas fontes de biopetídeos. Vários destes compostos bioativos com ações de vasodilatação e inibidores da ECA foram encontrados na ovalbumina do ovo tratada com quimotripsina e pepsina (KORHONEN; PIHLANTO, 2006). Estudo feito com a levedura *Yarrowia lipolytica* produziu biopetídeos com ação antioxidante e inibitória da ECA por hidrólise da clara de ovo (POKORA et al., 2017).

Biopetídeos também podem ser encontrados nos pescados. Kleekayai et al. (2015) estudaram a extração de peptídeos com ação antioxidante de pastas de camarão tailandesas fermentadas. Ratos alimentados com hidrolisados de proteínas de peixe obtiveram a redução do colesterol e aumento do colesterol HDL quando comparados com ratos alimentados com caseína, sugerindo que o hidrolisado de proteínas de peixes pode ter um efeito cardioprotetor (WERGEDAHL et al., 2004).

Produtos de abelhas como a geleia real, um alimento rico em proteína, também pode ser considerado como uma boa fonte de peptídeos inibidores da ECA. Em pesquisa feita por Matsui et al. (2002) a geleia real quando não hidrolisada não apresentou a ação inibitória da ECA. Entretanto, após hidrólise com tripsina e quimiotripsina esta capacidade foi desenvolvida. Além disso, a administração oral deste hidrolisado diminuiu a pressão arterial de ratos hipertensos.

### 2.3.1.2. Produtos de origem vegetal

Diversos produtos de origem vegetal são fontes de biopéptidos, tais como a soja, o trigo, o milho, o arroz, a aveia, a cevada, o trigo mourisco, o girassol entre outros. A soja é uma fonte de proteína vegetal muito reconhecida. Pode ser consumida de duas formas, não fermentada (óleo de soja, soja torrada, frita) e fermentada (molho de soja, picles, iogurte, queijos). A fermentação da soja pode ser aplicada para melhorar propriedades biofuncionais, devido ao aumento de isoflavonas e peptídeos e reduzir fatores antinutricionais, como inibidores da proteinase, ácido fítico, urease, ácidos oxálicos (SANJUKTA; RAI, 2016).

As proteínas de soja são capazes de modular funções biológicas específicas. Entretanto, seus hidrolisados são fisiologicamente melhores que as proteínas intactas, pois sua absorção intestinal parece ser mais eficaz devido ao aumento de solubilidade e do conteúdo dos peptídeos (ZIEGLER et al., 1998).

As sementes de soja possuem de 35 a 40% de teor de proteína em base seca. As principais proteínas de soja são glicina (11S globulina) e  $\beta$ -conglucina (7S globulina), representando de 65 a 85% do total das proteínas da soja. São os precursores da maioria dos peptídeos bioativos isolados. A glicina é composta por cinco subunidades principais, onde cada uma contém um ácido e uma cadeia polipeptídica básica ligada entre si por ligações de dissulfeto. A heterogenicidade da glicina se dá pela diferença nas sequências de aminoácidos entre as diferentes cultivares. A  $\beta$ -Conglicinina é um trímero com peso molecular de aproximadamente 200 kDa, na qual pertence a uma classe de proteínas glicosiladas com quatro subunidades,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e que estão associados a cada outro por interações hidrofóbicas. Estudos dessas frações de proteínas revelam que os genes de ambas são derivados de um ancestral comum e que tanto o ambiente e a genética influenciam na composição do conteúdo das proteínas de soja. Sendo assim, devido a variação do conteúdo proteico entre diferentes variedades há a probabilidade de formação de peptídeos com diferentes propriedades (SANJUKTA; RAI, 2016). Gibbs et al. (2003) revelaram que a glicina foi precursora de 95% dos peptídeos formados pela hidrólise da proteína de soja e que a  $\beta$ -Conglicinina parece ser resistente a degradação proteolítica.

A soja pode ser fermentada usando bactérias (*Bacillus subtilis* e bactérias acidoláticas) e fungos filamentosos (*Mucor* spp., *Aspergillus* spp. e *Rhizopus* spp.), resultando em diferentes tipos de produtos fermentados. O tofu é um produto de soja fermentado por fungos filamentosos e tem sido relatado por possuir efeitos anti-hipertensivos



e redução do colesterol (KUBA; SHINJO; YASUDA, 2004). O leite de soja fermentado com cepas de *Enterococcus faecium* demonstraram ação antioxidante e inibitória da ECA (MARTINEZ-VILALUENGA et al., 2012). A atividade inibitória da ECA também foi relatada em outro estudo com iogurte fermentado usando cultura mista de *Lb. delbrueckii* spp. *Bulgaricus* LB 1466, *S. thermophilus* St 1342 juntamente com cepas probióticas (*Lb. acidophilus* LAFTI L10, *B. lactis* LAFTI B94, *Lb paracasei* LAFTI L26) (DONKOR et al., 2005). As propriedades anticancerígenas da soja fermentada são devido às surfactinas, lipopeptídios ou peptídeos formados na hidrólise da proteína de soja. A lunasina é um peptídeo encontrado em produtos de soja com ação contra o câncer, estresse oxidativo, inflamação e distúrbios cardiovasculares (FERNÁNDEZ-TOME et al., 2014). Weng e Chen (2011) relatam que fermentações por *R. oligosporus* e *B. subtilis* resultaram em aumento de grau de hidrólise, maior conteúdo de Glutamato e Aspartato, o perfil de aminoácidos essenciais permaneceu inalterado e ocorreu um aumento de peptídeos menores que 20kDa.

### 2.3.2 Efeitos fisiológicos dos peptídeos bioativos

Estudos indicam que peptídeos bioativos podem ter diversas atividades terapêuticas e reguladoras do organismo, como: antioxidante, anti-hipertensiva, antitumorais, antimicrobiana, antitrombótica, antidiabética e prevenção da aterosclerose, enquanto alguns fragmentos peptídicos podem exibir mais de uma função biológica (Figura 1).

Numerosos peptídeos com várias funções bioativas foram identificados e relatados em bancos de dados chamados 'Biopep' (DZIUBA, IWANIAK E MINKIEWICZ, 2003), BioPD (LI et al., 2018), AHTPDB (plataforma para peptídeos anti-hipertensivos) (KUMAR et al., 2014), CAMPR3 (peptídeos antimicrobianos) (WAGHU et al., 2016), entre outros. Como exemplo, a lactoferricina, um peptídeo multifuncional derivado da hidrólise ácida pela pepsina da lactoferrina (AOKI; UEDA, 2013) e que possui propriedades antimicrobianas, imunomodulatória (MEISEL; FITZGERALD, 2003) e antitumorais (ELIASSEN et al., 2006). Os biopeptídeos podem ser utilizados como ingredientes naturais, substituindo os sintéticos, para o desenvolvimento de alimentos funcionais na indústria alimentar, ou agindo como alternativas para os medicamentos convencionais, causando vários benefícios para a saúde humana e animal.

**Figura 1- Efeitos dos biopeptídeos no corpo humano**



Fonte: Adaptado de Korhonen and Pihlanto, 2006.

Como agentes terapêuticos, os biopeptídeos oferecem várias vantagens sobre moléculas convencionais: alta bioatividade, bioespecificidade aos alvos, amplo espectro de ação, baixos níveis de toxicidade, diversidade estrutural e ausência ou baixos níveis de acúmulo nos tecidos do corpo (MARX, 2005).

Os peptídeos anticancerígenos (ACP) têm um comprimento de 5-30 aminoácidos e uma carga catiônica (CHEN et al., 2016). ACPs são anfipáticos, têm 4-60% de conteúdo de aminoácido hidrofóbico e são abundantes em Arginina e Lisina. A lactoferricina, um ACP, exerce atividade citotóxica em células cancerígenas, como neuroblastomas, por sua capacidade de interagir negativamente com as membranas mitocondrial e citoplasmática, levando à morte celular. O estudo revelou uma redução significativa do tumor (ELIASSEN et al., 2006).

Peptídeos com atividades opióides têm uma afinidade pelos receptores opiáceos, porque a presença do aminoácido aromático tirosina no terminal N e a presença de outro resíduo aromático, fenilalanina ou tirosina, na terceira ou quarta posição, formam uma estrutura adequada no local de ligação dos receptores opióides (MEISEL; FITZGERALD, 2003). Os receptores opióides estão localizados nas regiões nervosas, endócrinas, sistemas imunológicos e trato gastrointestinal de mamíferos e podem interagir com seus ligantes endógenos, opióides externos ou antagonistas opióides. Portanto, peptídeos opióides,

administrado por via oral, podem modular a absorção intestinal e influenciar a função gastrointestinal (KORHONEN; PHILANTO, 2006).

O efeito anti-hipertensivo de vários peptídeos tem sido relacionado com a inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA) e conseqüentemente a redução da pressão arterial. A atividade da ECA resulta em aumento da pressão arterial convertendo a angiotensina I em angiotensina II, um vasoconstritor potente e bradicinina degradante, um vasodilatador (YAMADA et al., 2013). Geralmente, estes peptídeos possuem sequências entre 2 e 12 aminoácidos de comprimento (HERNÁNDEZ-LEDESMA; CONTRERAS; RECIO, 2011). Quando aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina, fenilalanina e prolina estão localizados no C-terminal, eles podem interagir com a ECA e, assim, inibir a atividade enzimática (GARCÍA-MORA et al., 2017). Os aminoácidos Leucina, Valina, Lisina, Arginina e Isoleucina também foram evidenciados por desempenhar um papel importante no aumento significativo da inibição da ECA (PAN et al., 2012).

Xiao et al. (2018) avaliaram os efeitos da FES por *Cordyceps militaris* sobre as propriedades funcionais, nutricionais e físico-químicas, bem como a atividade inibitória da ECA da farinha de feijão vermelho. Constatou-se que a FES aumentou a quantidade de pequenos peptídeos e reduziu significativamente os grandes peptídeos. Além disso, aumentou a quantidade de proteínas e aminoácidos essenciais e melhorou a digestibilidade proteica *in vitro*. Ao contrário do feijão vermelho não fermentado, o feijão vermelho fermentado apresentou atividade inibitória da ECA, com IC<sub>50</sub> valor de 0,63 mg de proteína/ml. Como conclusão, a farinha de feijão vermelho pode ser utilizada como um novo ingrediente funcional para a aplicação nos alimentos.

Estudos indicam que peptídeos que possuem atividade inibidora da ECA também podem atuar como antioxidantes, devido a requisitos compartilhados para ambas as atividades em termos de comprimento e estrutura do peptídeo (DE GOBBA; TOMPA; OTTE, 2014). Tripeptídeos e tetrapeptídeos são ideais para uso como ingredientes alimentares funcionais com alta atividade anti-hipertensiva e baixo amargor. É relatado que pequenos peptídeos são eficazes como inibidores da ECA, mas têm um sabor amargo e não podem ser usados como ingrediente alimentar (ZHOU et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos são uma nova classe de agentes antimicrobianos. São capazes de agir eficientemente em uma ampla variedade de espécies, incluindo bactérias, vírus e fungos, inclusive sendo eficiente contra patógenos resistentes a quase todos os antibióticos convencionais (AOKI; UEDA, 2013). A maioria dos peptídeos antimicrobianos

apresentam similaridades físico-químicas, incluindo tamanho molecular pequeno (10 – 50 aminoácidos) e características catiônicas e anfipáticas, que são essenciais para a atividade (HANCOCK; SAHL, 2006). Vale ressaltar que os peptídeos antimicrobianos atuam no organismo através de diferentes mecanismos, reduzindo assim a probabilidade de resistência microbiana (KIM; WIJESEKARA, 2010).

### *2.3.2.1 Peptídeos com potencial antioxidante*

O estresse oxidativo é o desequilíbrio no estado de oxidação e redução do organismo resultante de um aumento no número de agentes oxidantes e uma diminuição dos agentes redutores. Essa situação leva ao desenvolvimento radicais livres e modificação estrutural de biomoléculas, com consequente perda de suas funções biológicas (NIU et al., 2015).

A superprodução desses radicais desempenha um papel significativo na indústria de alimentos, porque podem causar perda de cor, valor nutricional e funcionalidade, bem como sabores desagradáveis, compostos tóxicos e deterioração dos alimentos contendo lipídios e proteínas. Os radicais livres gerados em excesso num sistema biológico danificam macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídios de membranas. Se o corpo humano não puder controlar sua formação ou alguma forma de eliminá-los, como resultado, ocorre a indução do estresse oxidativo que desempenha um papel crítico em muitas doenças crônicas relacionadas ao estilo de vida, incluindo aterosclerose, cancro, diabetes, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e outras doenças degenerativas. Por isso que é tão importante inibir reações de oxidação e formação de radicais livres em produtos alimentícios e no organismo vivo, por meio de antioxidantes. (UTTARA et al., 2009, WATTANASIRITHAM et al., 2016).

Antioxidantes são importantes compostos que retardam ou inibem significativamente a oxidação de um substrato. No corpo humano, antioxidantes endógenos como enzimas (catalase), selênio, vitamina C, proteínas e peptídeos, ajudam a proteger tecidos dos danos oxidativos. Entretanto, com a progressão da idade, poluição ambiental e ingestão calórica excessiva, o potencial antioxidante do organismo e a absorção de nutrientes reduzem gradualmente e o uso de antioxidantes dietéticos tem sido reconhecidos como potencialmente eficazes no aumento da carga antioxidante do organismo (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

Para fornecer esta proteção no corpo humano, muitos antioxidantes sintéticos, como o butil- hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT) são utilizados como aditivos

alimentares para evitar a deterioração. Embora estes antioxidantes sintéticos mostrem atividades mais fortes do que os de antioxidantes naturais, tais como  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico, o uso desses compostos químicos começou a ser restrito por causa de sua indução de dano ao DNA e sua toxicidade (ITO et al., 1986) e a identificação de propriedades antioxidantes de fontes naturais atrai cada vez mais atenção (PAN; JIANG; PAN, 2011, ZHANG et al., 2011), como  $\alpha$ -tocoferol, vitamina C, fitoquímicos derivados de plantas como licopeno, luteína, isoflavonas, extratos de sementes de uva, entre outros (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011).

Na formação destes peptídeos antioxidantes, a ação catalítica das enzimas na hidrólise das proteínas parece ser diferente para cada uma e, portanto, diversos fragmentos ativos podem ser gerados no meio de uma reação, com pesos moleculares variáveis. Nos biopeptídeos antioxidantes, os pesos moleculares variam entre 500 e 1800 Da. Características como hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e cargabilidade fazem com que os peptídeos curtos possuem maior capacidade de serem completamente absorvidos sem alterações físicas ou químicas (SAADI et al., 2015). Korhonen e Pihlanto (2006) observaram que peptídeos derivados de leite com atividade antioxidante geralmente contêm 5 a 11 aminoácidos, incluindo resíduos hidrofóbicos como prolina, histidina, tirosina ou triptofano e descrevem que, em média, peptídeos antioxidantes são relatados como sendo maiores que os inibitórios da ECA, com 5-15 aminoácidos de comprimento.

De acordo com Roblet et al. (2012), duas categorias de aminoácidos são bem conhecidas por suas atividades antioxidantes: os aminoácidos fenólicos, como tirosina, triptofano ou fenilalanina, e os aminoácidos redutores (contendo enxofre), como metionina ou cisteína. Além disso, o grupo enxofre pode neutralizar espécies reativas de radicais livres para formar produtos de oxidação estáveis, cisteína e sulfóxido de metionina (HE et al., 2012). Conforme Elias et al. (2008), peptídeos antioxidantes geralmente contêm aminoácidos hidrofóbicos como valina ou leucina na extremidade terminal e prolina, histidina, tirosina, triptofano, metionina e cisteína em suas seqüências.

Recentes estudos relataram que várias proteínas hidrolisadas de diversas fontes de origem animal e vegetal apresentaram atividade antioxidante. Um estudo feito por Janiszewska et al. (2019) utilizando a quinoa como substrato para a FES por *Rhizopus oligosporus* (ATCC 64063), *Aspergillus oryzae* (DSM 1861) e *Neurospora intermedia* (DSM 1965) observou o aumento do potencial antioxidante da quinoa colorida relacionado com o acúmulo significativo de produtos da hidrólise de proteínas (peptídeos e aminoácidos). Peng et al. (2009) demonstraram que após uma hidrólise de cinco horas utilizando a enzima

Alcalase®, a proteína de soro de leite isolada apresentou uma capacidade significativa de redução de radicais livres.

Devido à complexidade dos processos oxidativos que ocorrem em alimentos ou em sistemas biológicos, bem como os diferentes mecanismos antioxidantes pelos quais vários compostos podem agir, encontrar um método que possa caracterizar o potencial antioxidante dos alimentos não é uma tarefa fácil. Alguns ensaios têm sido amplamente relatados na literatura para medir a capacidade antioxidante *in vitro*. Os métodos FRAP, ABTS, DPPH e ORAC são mais comuns (Quadro 2).

**Quadro 2 - Principais métodos para avaliar atividade antioxidante dos biopeptídeos**

Método	Mecanismo	Reação	Referência
ABTS (2,2' azinobis (3- etilbenzotiazolina - 6 - ácido sulfônico))	Captura do radical ABTS	O radical ABTS é estabilizado na presença de doadores de hidrogênio, resultando no clareamento da coloração azul esverdeada.	RE et al., 1999
FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )	Poder de redução do ferro	Antioxidantes doadores de elétrons reduzem o complexo Fe <sup>+3</sup> -TPTZ para Fe <sup>+2</sup> -TPTZ, formando uma coloração azul intensa.	BENZIE; STRAIN, 1996
DPPH (1,1-difenil-2- picrilidrazil)	Captura do radical DPPH	O radical reage com antioxidantes doadores de hidrogênio, com alteração de coloração de marrom claro para amarelo	HE et al., 2012
ORAC ( <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> )	Captura do radical peroxila	A decomposição do AAPH gera o radical peroxila. Quando, na presença de fluoresceína e radicais peroxil, a fluorescência é perdida. Na presença de antioxidantes, a fluorescência é preservada.	CAO et. al, 1993

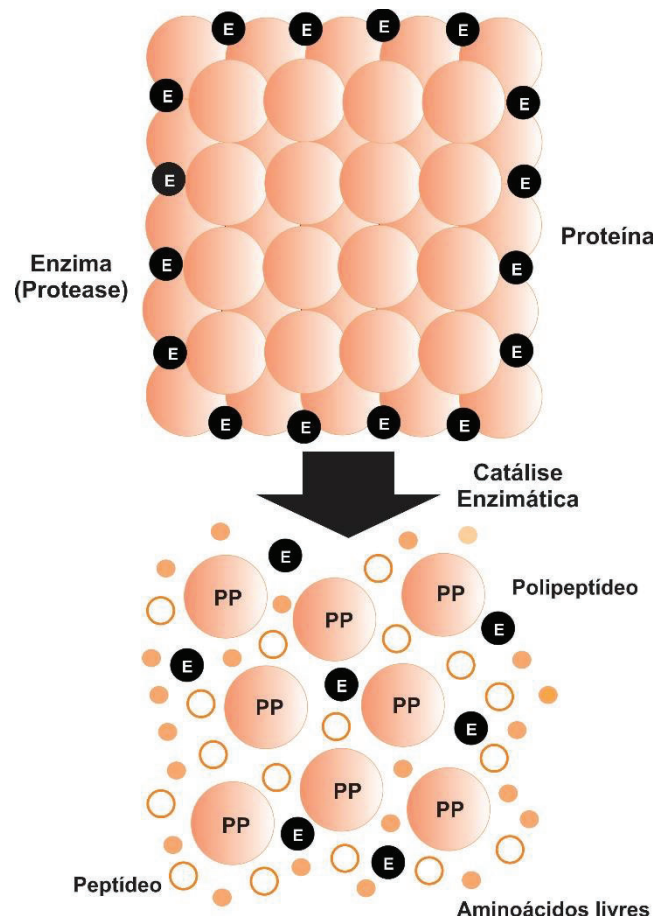
Fonte: elaborado pelo autor (2020)

Bougatef et al. (2010) relataram as atividades antioxidantes de diferentes hidrolisados de proteínas usando vários ensaios antioxidantes *in vitro*, como atividade de eliminação de radicais DPPH, poder redutor, capacidade antioxidante total, inibição da peroxidação lipídica de fígado de camundongo e ensaio de clareamento com β-caroteno. Enquanto Saidi et al. (2014), utilizaram os ensaios de eliminação de radicais superóxido, ensaio de eliminação de radicais hidroxila, ensaio de redução de potência, atividade quelante de íons ferrosos e inibição da autooxidação do ácido linoleico, para avaliação das propriedades antioxidantes das frações peptídicas do subproduto do escuro proteína muscular do atum hidrolisado.

### 2.3.3 Métodos de produção dos peptídeos bioativos

A hidrólise enzimática é o tratamento eficiente destinado à produção de biopeptídeos a partir de proteínas. Diferentes enzimas têm sido usadas para a produção de hidrolisados proteicos. Proteinases industriais de grau alimentício, como Alcalase®, Flavourzyme® e Protamex® derivadas de microorganismos, bem como enzimas de plantas (papaína) e fontes animais (pepsina, quimiotripsina e tripsina), têm sido amplamente utilizados para a produção de peptídeos bioativos (SILA; BOUGATEF, 2016). Embora vários hidrolisados proteicos tenham sido produzidos de plantas e animais usando proteases exógenas, poucos estudos foram realizados sobre a geração de peptídios biologicamente ativos utilizando a fermentação microbiana (SILA; BOUGATEF, 2016). Entretanto, pesquisas evidenciam a eficiência da FES na produção destes compostos. A Figura 2 mostra o comportamento das enzimas na hidrólise enzimática (SAADI et al., 2015).

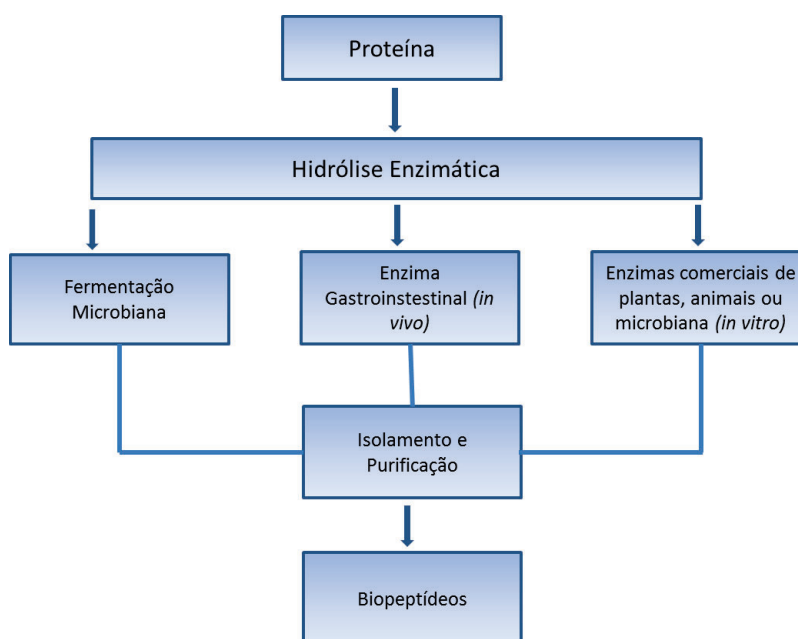
Figura 2 - Etapas de hidrólise enzimática de proteínas



Fonte: Adaptado de SAADI, et al., 2015

Peptídeos bioativos podem ser produzidos naturalmente a partir de proteínas da dieta durante o trânsito gastrointestinal. Entretanto, quando produzido por este meio, a hidrólise não pode ser controlada e pode ser insuficiente para gerar uma resposta fisiológica, havendo, portanto, necessidade de processos tecnológicos e industriais para ampliar a produção destes compostos bioativos com atividade biológica específica (GAUTHIER et al., 2006, CARRASCO-CASTILLA et al., 2012). A Figura 3 mostra uma breve descrição das principais etapas para a produção dos biopeptídeos.

Figura 3 - Produção de biopeptídeos



Fonte: Adaptado de AGYEI; DANQUAH, 2011.

Bougatef et al. (2010) utilizaram Alcalase®, enzimas de *Bacillus licheniformis* NH1 e *Aspergillus clavatus* ES1 e um extrato enzimático de vísceras de sardinha para produzir biopeptídeos antioxidantes de subprodutos da sardinha. Pesquisa semelhante, utilizando proteína liofilizada em pó de tilápia, hidrolisada pelas enzimas Alcalase®, Flavourzyme® e Neutrase®, foi realizada para obter biopeptídeos antioxidantes (FOH et al. 2011).

A literatura normalmente define como fermentação microbiana aquela que ocorre diretamente no alimento, principalmente, nos laticínios e suas culturas *starters*. Muitos exemplos são descritos sobre a potencialidade da fermentação microbiana na produção de produtos lácteos, tais como: bactérias probióticas comerciais e bactérias *starters* de queijos (SAADI, et al., 2015). Os sistemas proteolíticos de algumas bactérias como as ácido lácticas e *Lactococcus lactis*, consiste em uma proteinase ligada à parede celular e algumas peptidases



intracelulares (CHRISTENSEN et al., 1999). A soja também é um alimento muito consumido em sua forma fermentada (molho de soja, iogurtes, queijos), pois além de aumentar seus componentes bioativos, pode reduzir fatores antinutricionais, como inibidores de proteinase, ácido fítico, urease, ácidos oxálicos, melhorando também sua digestibilidade. A soja pode ser fermentada tanto por bactérias (*Bacillus subtilis*) quanto por fungos (*Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp.), resultando diferentes tipos de produtos fermentados (SANJUKTA; RAI, 2016).

Os biopeptídeos ainda podem ser produzidos por fermentação em estado sólido e fermentação submersa. Torino et al. (2013) estudaram o efeito da fermentação submersa espontânea e com *L. plantarum*, e a fermentação em estado sólido por *B. subtilis* de lentilhas para produção de frações solúveis em água, observou-se um aumento nas atividades anti-hipertensivas e antioxidantes.

Wu et al. (2018) utilizaram a aveia fermentada por *Lactobacillus plantarum* B1-6, *Rhizopus oryzae* e uma combinação dos dois microrganismos para a FES. A análise do grau de hidrólise e do teor de peptídeos com massa moleculares menores que 10.000 Da indicaram que as proteínas da aveia fermentada pela combinação dos dois microrganismos podem ser degradadas em maior grau, fato confirmado por eletroforese e cromatografia líquida de alta performance de fase reversa. Entretanto, tanto a aveia fermentada por *R. oryzae* quanto a combinação dos dois microrganismos, apresentaram maior atividade inibitória da ECA do que a aveia não fermentada.

Para avaliar o impacto da fermentação em estado sólido por *B. amyloliquefaciens*, *Lactobacillus* sp e *Saccharomyces cerevisiae* na qualidade nutricional do farelo de soja, um estudo avaliou fatores antinutricionais, conteúdo de peptídeos, peso molecular de proteínas e atividade antioxidante. Como resultado, eles observaram que *B. amyloliquefaciens*, *L. acidophilus* e *L. plantarum* removeram inibidores de tripsina, produziram protease e levaram a uma redução do pH. Além disso, a fermentação por *B. amyloliquefaciens* produziu pequenos peptídeos e aumentou a atividade antioxidante, aumentando os níveis de compostos fenólicos e peptídeos bioativos (CHI; CHO, 2016).

O uso de dois tipos de hidrólise (por enzima comercial e por FES) também pode ser observado em estudos como um método para otimizar o processo. Diferentes linhagens de bactérias do ácido láctico foram utilizadas na fermentação em estado sólido do farelo de soja com a adição de protease produzida por *A. oryzae*. Durante a fermentação, a adição de protease melhorou a atividade antioxidante e inibidora da ECA, mostrando a viabilidade do uso de diferentes tipos de hidrólise simultaneamente na produção de ingredientes funcionais (ZHAO et al., 2018).

### 2.3.4 Métodos de determinação dos peptídeos bioativos

O processamento de biopeptídeos, após a seleção de proteínas e hidrólise enzimática, geralmente passa por etapas de separação, purificação, aplicação de métodos *in vitro* para determinar a atividade biológica, determinação da sequência peptídica e propostas de possíveis relações entre estrutura e função (CARRASCO -CASTILLA et al., 2012).

Os métodos geralmente utilizados para o fracionamento e enriquecimento de peptídeos são precipitação seletiva, ultrafiltração (KORHONEN; PIHLANTO, 2006, CHABEAUD et al., 2009), cromatografia de troca iônica (SHEU et al., 2004), tecnologias de filtração em gel (PEDROCHE et al. al., 2007) e cromatografia líquida (SAADI et al., 2015). Um sistema de membrana de ultrafiltração pode ser usado para separar os peptídeos que possuem os pesos moleculares e propriedades funcionais desejados, e de acordo com Roblet et al. (2012), parece ser uma tecnologia mais simples quando comparada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia de troca iônica. Dependendo do tipo de fracionamento e purificação usado para isolar os biopeptídeos, essas substâncias ativas exibem pesos moleculares variáveis e, conseqüentemente, diferentes funções biológicas (SAADI et al., 2015).

A eletroforese de dodecilsulfato de sódio (SDS) é um método alternativo usado para caracterizar a composição estrutural e de aminoácidos dos peptídeos. A hidrólise da proteína é mostrada por uma diminuição gradual na intensidade das bandas de maior peso molecular e um aumento nas bandas de menor peso molecular (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012). A ionização por electropulverização (ESI), a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e a espectrometria de massa (EM) têm aparecido como ferramentas importantes para a identificação e caracterização de proteínas (PENG et al., 2007). Cromatografia líquida seguida de detecção em espectrometria de massa em tandem (LC-MS / MS) é comumente usada para identificar sequências peptídicas. A espectrometria de massa por dessorção a laser e o tempo de análise por ionização assistida por matriz (MALDI-TOF) são úteis para gerar perfis peptídicos de hidrolisados de proteínas. A espectrometria de massa permite a determinação precisa da massa molecular, sequências de proteínas, identificação de produtos de degradação de proteínas e o estudo de conformações proteicas. Além disso, a HPLC de fase reversa pode ser usada para fracionar peptídeos com base em suas propriedades hidrofóbicas, especialmente ao estudar as propriedades estruturais - funcionais dos peptídeos (CONTRERAS et al., 2008).

Os métodos considerados clássicos de isolamento e purificação de peptídeos por Agyei et al. (2016) são: precipitação seletiva, filtração por membrana e métodos cromatográficos. As vantagens e desvantagens destes processos são apresentados no Quadro 3.

**Quadro 3 - Vantagens e desvantagens de métodos clássicos de isolamento e purificação de peptídeos**

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Precipitação Seletiva	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pode ser usado em todas as etapas de purificação, desde a recuperação em massa até o isolamento seletivo;</li> <li>- Fácil de escalonar, especialmente para precipitação <math>(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4</math> (sulfato de amônia);</li> <li>- Tem alto rendimento e possibilidade de operação contínua;</li> <li>- Simples, rápido e barato;</li> <li>- Alcança algum grau de concentração do produto durante a separação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difícil para peptídeos hidrofóbicos com baixa solubilidade em solventes aquosos e orgânicos;</li> <li>- A precipitação de <math>(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4</math> não é eficaz para a precipitação seletiva de algumas proteínas e peptídeos;</li> <li>- Agentes de precipitação fortes podem comprometer as propriedades dos peptídeos através de reações indesejáveis, como oxidação da sulfidrina,</li> <li>- Muitas vezes, requer uma etapa de "limpeza" subsequente para remover o agente de precipitação do peptídeo de interesse.</li> </ul>
Filtração por Membrana	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tem alto rendimento, é escalonável e permite operação contínua;</li> <li>- Mantém atividade e integridade biológica de proteínas e peptídeos;</li> <li>- Usa um agente de separação insolúvel;</li> <li>- Permite transporte seletivo e boa separação;</li> <li>- Não requer aditivos e pode ser realizado isotermicamente a um pH fixo;</li> <li>- Fácil de <i>upscale</i> e <i>downscale</i>;</li> <li>- Pode ser combinado com outros processos;</li> <li>- Alcança algum grau de concentração do produto durante a separação.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muitas vezes resulta em baixas taxas de transferência de massa para substâncias altamente concentradas;</li> <li>- Resulta em aumento da viscosidade do retido;</li> <li>- Incrustação de membrana;</li> <li>- Seletividade reduzida ao separar proteínas ou peptídeos de tamanho similar.</li> </ul>
Métodos Cromatográficos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Separação altamente seletiva e de alta resolução, geralmente em um tempo relativamente curto;</li> <li>- Usa um agente de separação insolúvel;</li> <li>- Pode concentrar materiais de partida diluídos e estabilizar moléculas alvo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altamente caro, especialmente para aplicações de aumento de escala;</li> <li>- Ligação lenta e capacidade reduzida devido à resistência de transferência de massa das limitações difusionais e impedimento estérico;</li> <li>- Dificuldade no tratamento de materiais viscosos (como pode ser observado com hidrolisados proteicos) que podem causar entupimento e taxas de fluxo reduzidas;</li> <li>- Limitações de escala devido à deformação do cordão com maiores quedas de pressão.</li> </ul>

Fonte: Agyei et al., 2016.

Pesquisadores estudaram abordagens em escala com a combinação de dois ou mais métodos de produção e isolamento de biopeptídeos: Ellegard et al. (1999), utilizaram precipitação ácida, diafiltração e cromatografia de troca iônica para a produção e isolamento de fosfopeptídeos de caseína; Kim e Wijesekara (2010), fizeram o uso de reator de membrana de reciclagem combinando um sistema de membrana de ultrafiltração para a separação dos biopeptídeos produzidos; Zhang et al. (2011) identificaram um peptídeo antioxidante usando técnicas cromatográficas consecutivas em combinação com analisador proteômico ABI 4700 para analisar uma amostra de grão de bico; Lu et al. (2010) purificaram peptídeos antioxidantes por MALDI-TOF/TOF MS/MS.

Sila e Bougategf (2016) revelaram o processo que pode ser utilizado para a produção, purificação e identificação de peptídeos antioxidantes a partir de resíduos de peixe. De acordo com os pesquisadores, a purificação pode ser realizada por Filtração em Gel, HPLC-RP, Cromatografia de Troca iônica ou Membrana de ultrafiltração. A identificação dos peptídeos pode-se utilizar Espectrometria de massa por eletropulverização ou Espectrometria de massa Tandem.

As técnicas de purificação são um fator limitante para a comercialização de produtos à base de peptídeos, devido à indisponibilidade de tecnologias em larga escala e altos custos, representando até 70% dos custos totais. No entanto, a falta de processos economicamente rentáveis deve ser considerada um incentivo para novos estudos sobre o desenvolvimento de processos e produtos a partir de biopeptídeos (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; AGYEI et al., 2016; AGYEI; DANQUAH, 2011).

## **2.4 PRODUÇÃO CONCOMITANTE DE PROTEASES E BIOPEPTÍDEOS**

Em análise feita em duas bases de dados, *Scopus* e *Science Direct*, entre os anos de 2010 e 2020, observamos que há uma grande maioria de artigos que descrevem a fermentação em estado sólido e a produção de protease, quando comparamos com a produção simultânea de protease e peptídeo bioativo (Quadro 4). Foi utilizado o termo peptídeo bioativo, pois biopetideo não obteve resposta satisfatória.

**Quadro 4 - Comparativo de artigos encontrados nas bases de dados Science Direct e Scopus**

Palavras-chave	Science Direct	Scopus
“solid state fermentation” AND protease	1037 (480 Research)	426 (398 Research)
“solid state fermentation” AND protease AND “bioactive peptide”	31 (todos Research)	7 (5 Research)

Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Apesar de vários estudos envolvendo a produção de proteases via FES, muitos retratam apenas a síntese enzimática para posterior purificação e utilização em outro substrato para a produção de metabólitos, tal qual o estudo realizado por Zanutto-Elgui et al. (2019), com a produção de peptídeos de leite, antimicrobianos e antioxidantes, por proteases fúngicas produzidas por *A. oryzae* e *A. flavipes*, sob FES, utilizando farelo de soja e farelo de trigo como substrato. Como também o extrato bruto enzimático produzido por FES, com *A. oryzae* e meio composto por farelo de trigo e amendoim que posteriormente foi utilizado para obter hidrolisado de amendoim (SU, et. al., 2011).

Entretanto, as proteases microbianas promovem a degradação das proteínas e geram biopeptídeos ativos durante a fermentação. Guan et. al. (2017) concluíram que o aumento do conteúdo peptídico do resíduo de leite de soja fermentado via FES é atribuído à atividade proteolítica de enzimas produzidas por *Actinomucor elegans* durante a fermentação, por mostrar relações lineares positivas entre valores de peptídeos e atividades de protease. Outro estudo, feito com farinha de grão de bico, fermentada por *Cordiceps militaris*, também observou a decomposição de proteínas complexas em formas mais simples e solúveis, pela ação da protease produzida pelo fungo durante a fermentação. Os peptídeos formados em questão possuíram significativa atividade inibidora da ECA. (XIAO, et. al., 2015). Outros estudos que relatam a produção simultânea de proteases e biopeptídeos, principalmente por bactérias podem ser observados no Quadro 5.

**Quadro 5 - Produção simultânea de proteases e biopeptídeos**

Microrganismo	Substrato	Resultados	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Farelo de soja	Aumento de: Capacidade antioxidante: 1.03 to 2.35 mg AAE/g Polifenóis totais: 3,89 a 9,16 mg GAE/g, Proteínas solúveis em TCA: 0,61 a 1,16 mg equivalente de tirosina/g, Protease: 2,6 a 9,62 U/mg Amilase: 24,98 a 8235 U/mg, Glucosidase: 5,23 a 51,90 U/mg.	RAI et. al., 2017
<i>Lactobacillus reuteri</i> and <i>L. plantarum</i>	Tremoço (T) Quinoa (Q) Trigo (Tr)	Antioxidante: 25 to 65% (DPPH), 12 a 73% (ABTS), Anti-hipertensivo: 2,3 a 58,9%, Aumento do grau de hidrólise (proteólise): 8,5 a 35% (T), 11,5 a 30% (Q), 2,5 a 20% (Tr). Fenólicos Totais: 22 a 33 mg GAE/g (T), 12 a 32 mg GAE/g (Q), 7 a 18 mg GAE/g (Tr), Anticâncer	AYYASH et. al., 2019
<i>Bacillus subtilis</i>	Farelo de trigo	Aumento de: Fenólicos: 26,09 mg GAE/g, Peptídeos: 4,31 a 29,68%, Atividade antioxidante: 80%, Grau de hidrólise: 8,92 a 17,25%.	LIU et. al., 2017
Co-fermentation: <i>Bacillus subtilis</i> e <i>L. plantarum</i>	Inicialmente, pasta de abóbora Para a segunda FES foi misturado leite desnatado à pasta	Aumento de: Ácido $\gamma$ -aminobutírico: 1,47%, Teor de peptídeos: 0,18 mg/g a 0,83 mg/g, Atividade proteásica: 5,22 U/mL a 14,65 U/mL, Grau de hidrólise: (SDS- PAGE): peptídeos grandes foram decompostos em peptídeos com baixo peso molecular	PARK, et. al., 2019
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Farelo de soja esterilizado e não esterilizado	O meio não estéril apresentou melhores resultados: aumento Peptídeos: 131,21%, Proteína bruta: 5,3% Proteína solúvel: 15,52%, Atividade antioxidante: 57,02 (DPPH), 238,92% (capacidade redutora),	WU et al., 2019

		368,26% (atividade de eliminação de radicais livres de hidroxila) Atividade inibidora da ECA: de 1,43 a 26,89% Atividade inibidora da tripsina: diminuída em 74,05%.	
--	--	--	--

Fonte: elaborado pelo autor (2020).

O estudo da produção simultânea de proteases e seus metabólitos, como os peptídeos bioativos, é de suma importância, visto que o meio utilizado como substrato pode se beneficiar da capacidade hidrolítica das enzimas fúngicas.



## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Para a preparação do meio de cultivo para a realização da FES, foram utilizados como substratos os subprodutos agroindustriais casca de soja e farelo de soja provenientes da empresa BSBios, localizada em Passo Fundo e farelo de trigo procedente do Laboratório de Cereais da Universidade de Passo Fundo. Os substratos foram mantidos congelados a  $-10^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

### 3.2 MICRORGANISMO E PREPARO DE INÓCULO

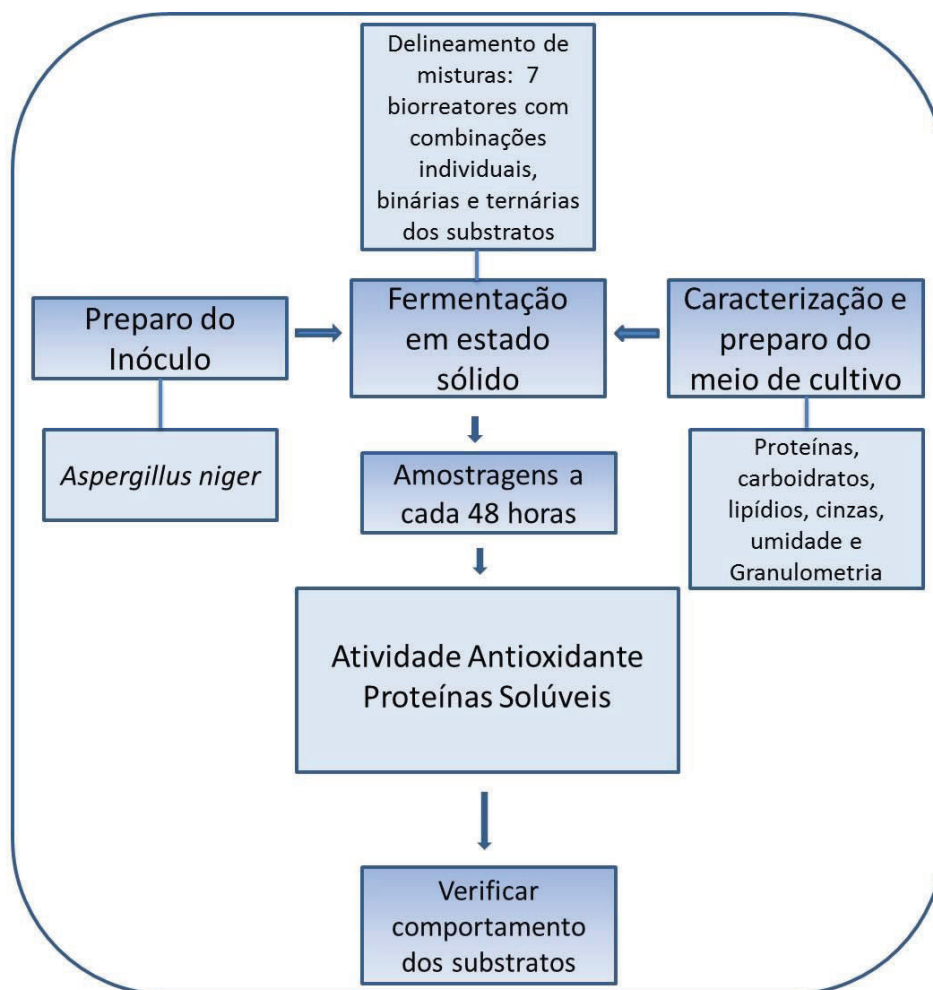
O fungo utilizado foi o *Aspergillus niger* O4, proveniente do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo, identificado como *Aspergillus niger* DAOM (100% identity, GenBank accession number: KC545858.1) por Colla et al. (2015). O microrganismo foi armazenado e mantido em meio Ágar Batata Dextrose (ABD), sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este fungo é considerado microrganismo produtor de bioproduto não tóxico e seguro, designado como GRAS (generally recognized as safe) podendo, portanto, ser usado na obtenção de produtos para nutrição humana e animal.

O preparo do inóculo foi realizado através da adição de 10 mL de uma solução 0,01 % (v/v) de Tween 80 em tubo de ensaio contendo a cepa isolada, obtendo-se uma suspensão de esporos. Uma alíquota de 2 mL desta suspensão foi adicionada em um erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de meio de cultivo ágar-batata-dextrose previamente esterilizado em autoclave por 20 min a  $121^{\circ}\text{C}$ . O microrganismo foi incubado em estufa por 5 dias a  $30^{\circ}\text{C}$  para crescimento e formação das hifas. Após este período, 50 mL de solução 0,01 % de Tween 80 e 3 pérolas de vidro foram adicionados ao erlenmeyer de 1 L e misturados a fim de obter-se uma suspensão de esporos. Esta suspensão foi filtrada em gaze e utilizada para a inoculação dos substratos da fermentação em estado sólido, a fim de obter-se  $10^6$  esporos/gmeio. A concentração de esporos na suspensão foi determinada a partir de contagem em câmara de Neubauer.

### 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

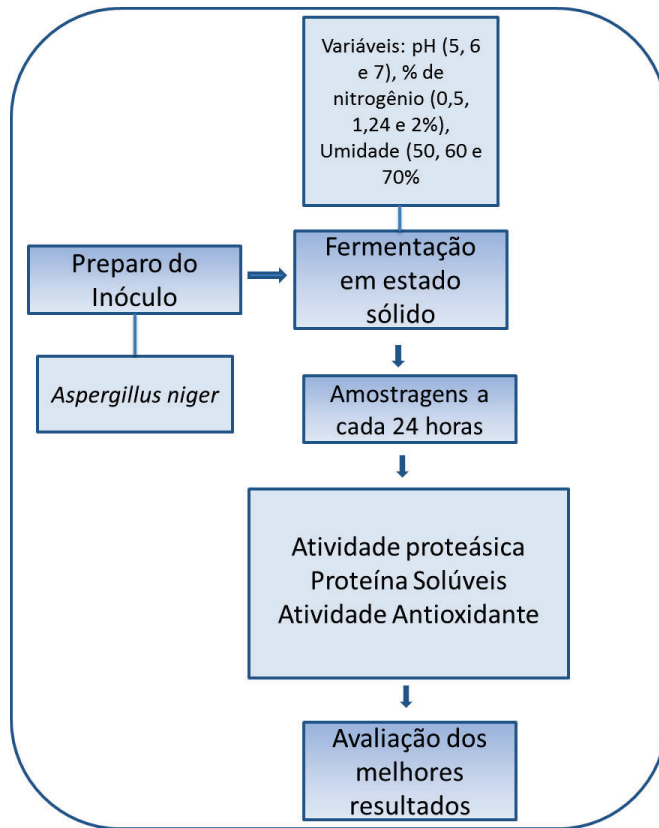
O trabalho foi dividido em três etapas. As Figuras 4, 5 e 6 mostram as etapas da metodologia experimental proposta para realizar a obtenção de proteases e biopeptídeos por fermentação em estado sólido (FES).

Figura 4 - Fluxograma da Etapa I



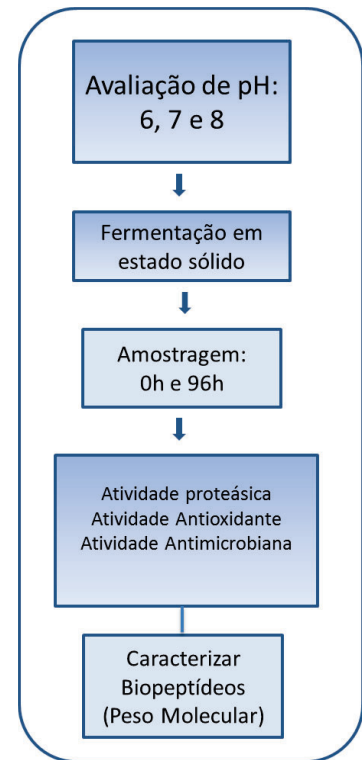
Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Figura 5 - Fluxograma da etapa II



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Figura 6 - Fluxograma da etapa III



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

### 3.3.1 Etapa I

A primeira etapa foi realizada com base num delineamento de misturas, no qual utilizou-se três diferentes substratos (farelo de soja, casca de soja e farelo de trigo) para a realização da FES, mantendo os demais parâmetros fixos, de acordo com a literatura (pH, temperatura e umidade). Esta etapa objetivou observar o comportamento de cada meio e avaliar os efeitos da interação entre os componentes (sinergismo/antagonismo). Como variáveis respostas foram analisadas o potencial antioxidante e as proteínas solúveis em meio ácido (Figura 4).

Os meios de cultivo apresentados na Tabela 1 foram preparados em duplicata segundo as variações previstas no Delineamento de Misturas. Na Tabela 1, os níveis 0 (0%), 1 (100%), 1/2 (50%) e 1/3 (33,3%) representam o percentual de cada componente na composição final do meio. Os demais parâmetros como temperatura de incubação (30 °C), umidade (60%) e pH inicial (7) foram mantidos constantes. Para correção de umidade utilizou-se uma

solução Tampão Fosfato pH 7, o pH foi ajustado através de soluções de NaOH (1M) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5M).

**Tabela 1 - Matriz de Delineamento de Mistura (Simplex-centroide mixture design) para determinar a melhor proporção dos substratos na produção simultânea de protease e biopeptídeos antioxidantes, via FES**

Ensaio	Farelo de soja	Farelo de trigo	Casca de Soja
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/3	1/3	1/3
5	1/2	1/2	0
6	0	1/2	1/2
7	1/2	0	1/2

Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Nesta primeira etapa, os experimentos foram executados em béqueres de 250 mL, com 40 g de meio e incubados em estufa a 30 °C durante 7 dias. Amostras de 5 g de cada biorreator foram retiradas a cada 48 h durante 7 dias, e congeladas para posterior extração de biopeptídeos e análises.

Para todos os ensaios, a cada 40 g de meio de cultivo foram adicionados 30 mL de solução salina (BERTOLIN et al., 2001), como fonte de micronutriente, composta por 2 g/L de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1 g/L de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e 10 mL/L de solução traço, composta por 0,63 mg/L de sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 0,01 mg/L de sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>) e 0,62 mg/L de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>), sendo esse volume de solução descontado da água a ser adicionada para o ajuste de umidade.

### 3.3.2 Etapa II

Na etapa II, a partir de resultados encontrados na primeira etapa do experimento, novos cultivos foram realizados via FES, através de um Delineamento Composto Central (DCC), objetivando avaliar os efeitos das variáveis nas faixas indicadas: umidade (50 %, 60 % e 70 %), pH (5, 6, 7,) e % de nitrogênio inicial (0,5 %, 1,25 % e 2 %) sob a produção de proteases e biopeptídeos por *Aspergillus niger* em meio contendo substratos determinados pela etapa anterior.

Os experimentos foram realizados em béqueres de 250 mL com 40 g de meio, adicionado de solução salina conforme Bertolin et al. (2001). Foram realizadas as mesmas determinações analíticas da etapa I: atividade antioxidante e proteínas solúveis em meio ácido, acrescido de atividade proteásica (Figura 5).

Os efeitos destas variáveis sobre a produção de enzimas e biopeptídeos foram estudados através de um Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup> com pontos centrais conforme a Tabela 2, totalizando 11 experimentos. Os experimentos foram realizados durante 4 dias com amostragem de 5 gramas a cada 24 horas (0, 24, 48, 72 e 96 horas). Após a avaliação dos efeitos das variáveis estudadas e a determinação das melhores condições dentro das faixas estudadas, foi realizada a etapa III.

**Tabela 2 - Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup> utilizado para identificação das variáveis significativas sobre a produção simultânea de proteases e biopeptídeos**

Ensaio	x <sub>1</sub> (pH inicial)	x <sub>2</sub> (Umidade %)	x <sub>3</sub> (Concentração de nitrogênio %)
1	-1 (5)	-1 (50)	-1 (0,5)
2	+1 (7)	-1 (50)	-1 (0,5)
3	-1 (5)	+1 (70)	-1 (0,5)
4	+1 (7)	+1 (70)	-1 (0,5)
5	-1 (5)	-1 (50)	+1 (2)
6	+1 (7)	-1 (50)	+1 (2)
7	-1 (5)	+1 (70)	+1 (2)
8	+1 (7)	+1 (70)	+1 (2)
9	0 (6)	0 (60)	0 (1,25)
10	0 (6)	0 (60)	0 (1,25)
11	0 (6)	0 (60)	0 (1,25)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

### 3.3.3 Etapa III

A terceira etapa do experimento foi composta pelo aumento de escala, de 40 para 80 gramas de meio, e variação do pH (6, 7 e 8) para a validação da Etapa II e verificar o efeito positivo do pH para a produção de proteases e biopeptídeos. Além das determinações analíticas já realizadas (atividade proteásica, atividade antioxidante e proteínas solúveis em meio ácido), ainda foram realizadas as análises de atividade antimicrobiana e eletroforese em gel para avaliar o peso molecular dos peptídeos contidos nos extratos (Figura 6).

O meio desta etapa foi preparado com as melhores condições encontradas na Etapa II, variando apenas o pH (6, 7 e 8). O pH foi corrigido com NaOH (1 M) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5 M) até o valor desejado e a umidade foi corrigida com água destilada. Neste momento, preparou-se 80 g de meio, visto que análises adicionais foram realizadas. A cada 40 g, utilizou-se solução salina conforme Bertolin et al. (2001).

Os experimentos foram executados em béqueres de 600 mL e incubados em estufa a 30 °C durante 96 horas. Amostras de 15 g de cada biorreator foram retiradas nos tempos 0, 48 (melhor atividade proteásica) e 96 horas (melhor atividade antioxidante) para posterior análise.

### **3.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS**

#### **3.4.1 Caracterização dos substratos**

##### *3.4.1.1 Composição Centesimal*

Os substratos foram avaliados quanto ao teor de carboidratos, proteínas, lipídios, cinzas e umidade, utilizando a metodologia descrita pela AOAC (2005). Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25, as cinzas foram determinadas pelo método gravimétrico em mufla (550 – 600 °C) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa (105 °C). Os lipídios foram extraídos empregando a metodologia de Soxhlet, e os carboidratos foram determinados por diferença.

##### *3.4.1.2 Tamanho de partícula*

O tamanho de partícula foi determinado pelo método AOAC 965.22 por peneiramento (mesh), utilizando peneiras nos tamanhos: 10 mesh (1,70 mm), 20 mesh (0,850 mm), 28 mesh (0,600 mm), 48 mesh (0,300 mm), 80 mesh (0,180 mm), 140 mesh (0,160 mm) e 170 mesh (0,090 mm).

### 3.4.2 Análises após o processo fermentativo

#### 3.4.2.1 Extração de proteases e biopetídeos

Para a realização da extração de proteases e biopeptídeos, utilizou-se o método de Ortiz et al. (2016), com modificações. Foi coletada 1 g de cada amostra e acondicionada em erlenmeyer de 250 mL juntamente com 10 mL de solução Tampão Fosfato pH 7, na primeira etapa e água destilada nas etapas seguintes. Os erlenmeyers foram agitados em banho-maria a 180 rpm, 28°C, por 1 hora. Após, o conteúdo foi filtrado em algodão e centrifugado a 5.000 rpm, por 30 minutos. O sobrenadante, denominado como extrato, foi coletado em um frasco de amostra e congelado até ser utilizado para as determinações de atividade proteásica e biopeptídios.

#### 3.4.2.2 Atividade Proteásica

A atividade da protease foi determinada, a partir da segunda etapa, usando azocaseína de acordo com Charney e Tomarelli (1947), com modificações. A reação foi realizada com a incubação a 37°C da mistura contendo 500 µL do extrato com 500 µL de azocaseína a 0,5% (p/v), em tampão pH 7 e interrompida adicionando 500 µL de TCA a 10% . Os tubos de ensaio foram centrifugados a 3.000 rpm durante 10 min. Uma alíquota de 1,0 mL de o sobrenadante foi neutralizada com 1,0 mL de KOH 5 M. Mediu-se a absorvância a 428 nm com um espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática por grama ( $U\ g^{-1}$ ) é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,01/min na absorvância a 430 nm, sob as condições de ensaio descritas. O branco da reação foi feito utilizando-se solução tampão pH 7 no lugar do extrato enzimático. O branco é utilizado para zerar o espectrofotômetro. Além disso, para cada amostra, fez-se um tubo zero, adicionando-se TCA 10% antes do extrato enzimático.

A azocaseína é um derivado de caseína na qual foi adicionado um grupo sulfonilamida. Na digestão da azocaseína por enzimas proteolíticas, ocorre a formação de componentes alaranjados quando em contato com pH alcalino fornecido pelo KOH. A intensidade da cor alaranjada é em função da atividade proteolítica presente na amostra (SOUZA, 2015).

A produtividade (P), por dia, de atividade proteásica, de cada biorreator foi calculada pela equação 1:

$$P = \frac{pf - p0}{\Delta t} \times 100 \quad (1)$$

Onde, *pf* refere-se a atividade proteásica final encontrada no tempo estudado e *p0* ao atividade proteásica no tempo 0.

### 3.4.2.3 Atividade Antioxidante

O método ABTS (ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico) descrito por Re et al., (1999), determina a atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>.

O radical catiônico ABTS<sup>+</sup> foi preparado a partir da reação da solução estoque de ABTS (7 mmol/L) com a solução de persulfato de potássio (2,45 mmol/L), a uma razão de 1:1 v/v. A solução permaneceu em repouso no escuro, a temperatura ambiente, por no mínimo 12 a 16 h antes da utilização.

O espectrofotômetro UV-Vis foi zerado com etanol a 734 nm para a leitura das amostras. Após, a solução ABTS<sup>+</sup> foi diluída em etanol 96° até obter uma absorbância de 0,70 nm (+- 0,05 nm), no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 734 nm.

Em ambiente protegido da luz, foi adicionado 1 mL do radical ABTS diluído em 10 µL da amostra de extrato (10 µL de água destilada para o tubo branco), seguido de homogeneização em agitador por 5 segundos. A solução permaneceu no escuro por 6 minutos para reagir. Após foi realizada a leitura da absorbância (*A<sub>f</sub>*), em triplicata, utilizando cubeta de 1 mL.

O potencial de inibição (PI) do radical ABTS foi calculado utilizando a equação 2:

$$PI (\%) = \frac{Abs\ branco - Abs\ amostra}{Abs\ do\ branco} \times 100 \quad (2)$$

O rendimento (R) de cada biorreator foi calculada pela equação 3:

$$R = pf - p0 \quad (3)$$

Onde, *pf* refere-se ao potencial antioxidante final encontrado no tempo estudado e *p0* ao potencial antioxidante no tempo 0.



Na segunda e terceira etapa, além de calcular o potencial de inibição, utilizou-se a curva padrão e obteve-se o resultado em Equivalente Trolox. Na terceira etapa também foi realizada a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.

O método DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) proposto por Brand-Willians, Cuvelier, Berset (1995), se baseia na transferência de elétrons onde, por ação do antioxidante, os radicais livres de DPPH que apresentam inicialmente uma coloração roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor, quando um radical hidrogênio é doado por uma molécula antioxidante. O DPPH é considerado um radical estável, com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. A baixa absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres (BORGES et al., 2011).

Para a realização do teste, com modificações, foi preparada uma solução de 0,1 mM de DPPH com etanol e esta solução foi ajustada entre 0,500 e 0,600 de absorbância a 515 nm. Em tubos de ensaio foi acrescentado 0,1 mL da amostra e 2 mL da solução preparada. Os tubos foram agitados por 3 segundos e acondicionados no escuro por 30 min. A absorbância foi medida a 515 nm. A atividade antioxidante é expressa em mmol de Trolox/g de amostra de acordo com a curva padrão preparada previamente.

Foi calculado também o potencial de inibição (PI), pela equação (4). Onde Af é absorbância final e A0 absorbância inicial.

$$PI (\%) = \frac{A0 - Af}{A0} \times 100 \quad (4)$$

#### 3.4.2.4 Proteínas Solúveis

Para a determinação da quantidade de proteínas solúveis em meio ácido, a análise foi feita a partir de alíquotas de 1 mL do extrato da fermentação com adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25 %, sendo deixadas em repouso por 10 min, para a inativação da protease. Após este procedimento, foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas solúveis do sobrenadante utilizando o método de Folin-Lowry, com a curva padrão, expresso em mg de albumina.

Na primeira etapa, realizou-se a análise do tempo zero, sem fermentação e do tempo 96 horas, que obteve maior atividade antioxidante, para avaliar se esse potencial foi

decorrente da formação de biopeptídeos ou outros compostos. Na etapa seguinte, realizou-se a análise de proteínas solúveis em todas as amostras coletadas. Já na terceira etapa, a análise foi realizada no tempo zero e 96 horas.

#### 3.4.2.5 Atividade Antibacteriana

Atividade antibacteriana do extrato foi avaliada apenas na terceira etapa do experimento para as bactérias *Salmonella typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus*. Para isso, utilizou-se ensaio de difusão em disco (Bauer et al., 1966), descrito por Osman et al. (2016) com modificações. Primeiramente, as cepas estudadas foram cultivadas em ágar padrão para contagem, a 37 °C, por 24 horas. Após este período, produziu-se uma suspensão das bactérias em solução salina até atingir a turbidez  $0,5 < Mc$  Farland (equivalente  $1,5 \cdot 10^8$ ). Com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril, a suspensão de bactérias foi semeada em placas com Ágar Muller Hilton (MH). Os extratos de biopeptídeos foram filtrados através de filtro de membrana de acetato com tamanho de poro de 0,22 µm. Os extratos (10 mL) foram colocados sob discos de papel estéreis (com diâmetro de 5 mm) situados nas placas de ágar MH anteriormente inoculados com as cepas previamente preparadas. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C e foram examinadas posteriormente quanto à presença das zonas de inibição indicativas de atividade antibacteriana. Também realizou-se uma variação deste teste, substituindo os discos por poços feitos por perfurador de aço de 8 mm, com o objetivo de aumentar a quantidade de extrato (25 µL) em contato com as bactérias.

Testou-se ainda uma segunda metodologia descrita por Cabo et al. (1999) e Touraki et al. (2012), com modificações. Foram adicionados 500 µL de extrato em 5 mL ao caldo BHI. Em seguida, 100 µL de uma suspensão do microrganismo indicador com densidade ótica de 0,1 a 630 nm foram adicionados aos tubos. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas, sendo posteriormente realizada a leitura da absorvância de cada tubo em espectrofotômetro a 630 nm. O potencial de inibição do crescimento do organismo indicador foi calculado através da Equação 5, na qual PI é o potencial de inibição (%), A0 é a absorvância do controle (tempo inicial de fermentação, sem a produção de compostos antimicrobianos) e Af a absorvância de cada amostra.

$$PI (\%) = \frac{(A0 - Af)}{A0} \times 100 \quad (5)$$

#### ***3.4.2.6 Caracterização do peso molecular de proteases e biopeptídeos***

A caracterização, quanto a massa molecular aproximada dos biopeptídeos e da protease contidos no extrato, foi feita por Eletroforese em Gel 15% baseada no método de Laemmli (1970). As amostras foram submetidas em corrente constante de 300 mA e tensão de 250 V, por aproximadamente 60 minutos. As bandas das proteínas foram visualizadas por corante azul brilhante Comassie blue. Utilizou-se como padrões os tamanhos moleculares de 200 kDa até 53 kDa.

### **3.5 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão de triplicatas. Os resultados dos planejamentos experimentais de Mistura e do DCC foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste de Tukey usado intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E GRANULOMETRIA DOS SUBSTRATOS

As composições centesimais dos subprodutos agroindustriais utilizados como substrato na FES para a produção concomitante de proteases e biopeptídeos estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3 - Composição Centesimal (%) dos subprodutos agroindustriais utilizados como substrato na FES por *A. niger***

Componente Químico	Farelo de Soja	Farelo de Trigo	Casca de Soja
Umidade	11,76±0,75 <sup>a</sup>	11,28±0,08 <sup>a</sup>	6,16±0,07 <sup>b</sup>
Cinzas	5,72±0,05 <sup>a</sup>	3,45±0,07 <sup>c</sup>	4,27±0,06 <sup>b</sup>
Proteínas	40,68±1,81 <sup>a</sup>	14,40±0,57 <sup>b</sup>	9,53±0,21 <sup>c</sup>
Lipídios	2,52±0,27 <sup>b</sup>	4,81±0,05 <sup>a</sup>	2,83±0,14 <sup>b</sup>
Carboidratos*	39,32±2,74 <sup>c</sup> *	66,06±0,30 <sup>b</sup> *	77,21±0,21 <sup>a</sup>

Valores médios ± erro padrão. Médias seguidas de mesma letra, numa mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. \*Carboidratos foram determinados por diferença. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

A composição dos substratos utilizados na fermentação em estado sólido é um dos principais fatores que afetam a produção de enzimas e metabólitos pelos microrganismos. Na produção de proteases, uma fonte rica em proteína é importante para induzir a secreção enzimática pelo microrganismo. Por outro lado a relação carbono e nitrogênio (C:N) do substrato, deve estar adequada para que esta fermentação ocorra (DE CASTRO; SATO, 2014).

O farelo de soja foi o substrato que apresentou maior teor de proteínas. O farelo de trigo e a casca de soja apresentaram elevado conteúdo de carboidratos, sendo a casca de soja composta por 32,32% de fibras. Resultados semelhantes foram encontrados na ficha técnica do fornecedor.

Com a finalidade de determinar a melhor proporção de substratos para o preparo do meio de cultivo a ser utilizado na produção de proteases e biopeptídeos, utilizou-se um delineamento de misturas (Tabela 4), sendo apresentados os resultados de composição centesimal dos meios resultantes, em base seca, calculados a partir dos resultados da Tabela 1.

O maior teor de proteína foi identificado no ensaio 1, compostos apenas pelo farelo de soja, seguido das misturas em que este substrato se encontrou presente.

**Tabela 4 - Composição Centesimal dos substratos e suas misturas, em base seca, conforme o delineamento de misturas utilizado para a FES por *A. niger***

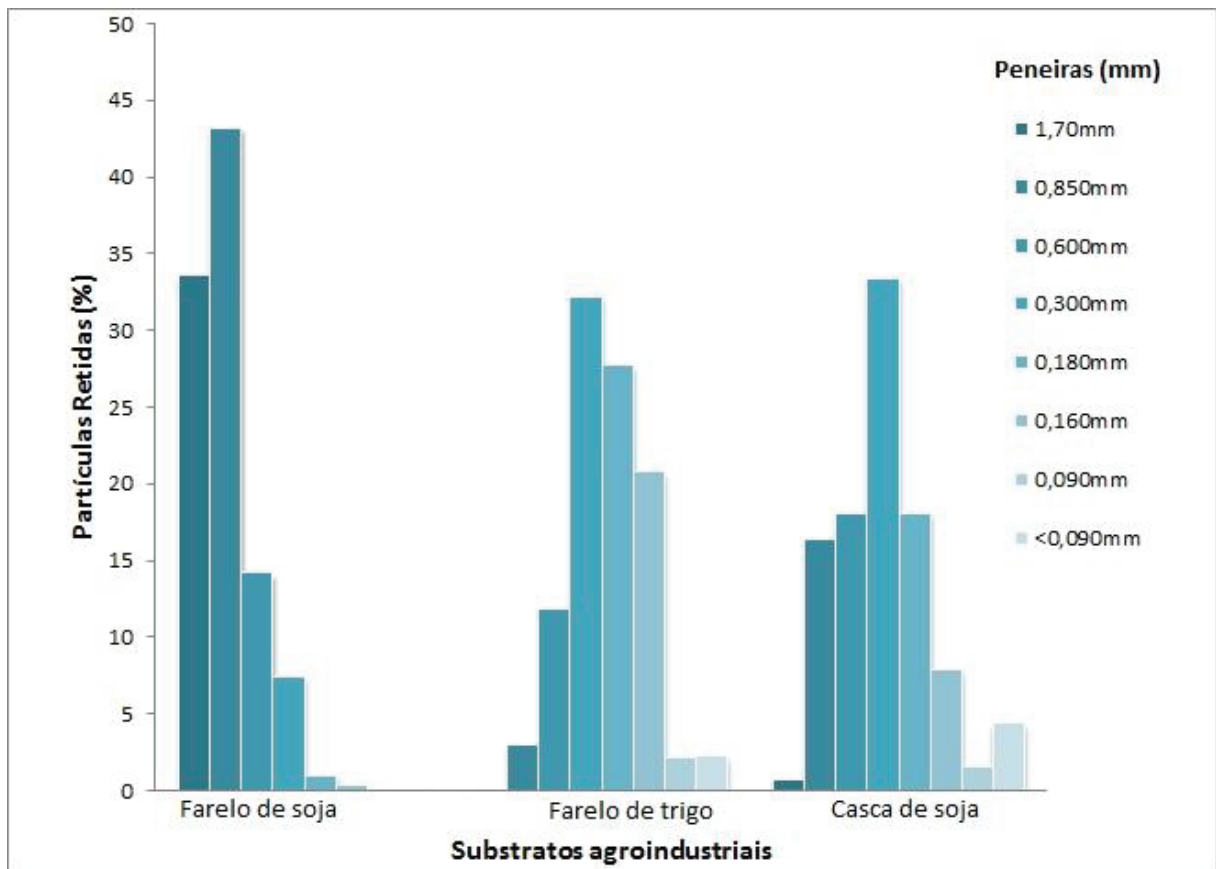
Biorreator	Variáveis independentes			Composição centesimal dos substratos e suas misturas (%)			
	Farelo de Soja(X <sub>1</sub> )	Farelo de Trigo(X <sub>2</sub> )	Casca de Soja(X <sub>3</sub> )	Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Cinzas
1	1	0	0	45,35±3 <sup>a</sup>	45,34±3,5 <sup>c</sup>	2,86±0,33 <sup>d</sup>	6,48±0,11 <sup>a</sup>
2	0	1	0	15,86±0,92 <sup>d</sup>	74,49±0,41 <sup>b</sup>	5,42±0,08 <sup>a</sup>	3,85±0,03 <sup>e</sup>
3	0	0	1	10,18±0,23 <sup>d</sup>	82,28±0,28 <sup>a</sup>	3,02±0,15 <sup>cd</sup>	4,53±0,07 <sup>cd</sup>
4	1/3	1/3	1/3	23,8±1,39 <sup>c</sup>	67,33±1,41 <sup>c</sup>	3,77±0,19 <sup>bc</sup>	4,95±0,06 <sup>bc</sup>
5	1/2	1/2	0	30,62±1,96 <sup>b</sup>	59,92±1,96 <sup>d</sup>	4,14±0,21 <sup>b</sup>	5,17±0,07 <sup>b</sup>
6	0	1/2	1/2	13,02±0,58 <sup>d</sup>	78,39±0,35 <sup>ab</sup>	4,23± <sup>b</sup>	4,20±0,5 <sup>de</sup>
7	1/2	0	1/2	27,77±1,62 <sup>bc</sup>	63,81±1,9 <sup>cd</sup>	2,95±0,25 <sup>d</sup>	5,51±0,09 <sup>f</sup>

Valores médios ± erro padrão. Médias seguidas de mesma letra, numa mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Todo o meio formulado teve o nível de umidade ajustado para 60% de acordo com a umidade inicial. Ensaio 1: farelo de soja (100%); Ensaio 2: farelo de trigo (100%); Ensaio 3: casca de soja (100%); Ensaio 5: casca de soja, farelo de soja e farelo de trigo (1/3 cada); Ensaio 5: farelo de soja (50%) e farelo de trigo (50%); Ensaio 6: farelo de trigo (50%) e casca de soja (50%); Ensaio 7: farelo de soja (50%) e casca de soja (50%). Fonte: elaborado pelo autor (2020)

De Castro e Sato (2014) verificaram a correlação entre o teor de proteínas dos substratos com a produção de protease. De acordo com os autores, o farelo de soja apresentou maior teor de proteína e como resultado, evidenciou-se uma correlação forte, positiva e significativa entre conteúdo proteico dos substratos e produção de protease em 24 horas (coeficiente de Pearson = 0,99, p = 0,08) e 48 horas de fermentação (coeficiente de Pearson = 0,99, p = 0,08). Nesta primeira etapa, não houve a possibilidade de correlacionar produção de protease com conteúdo proteico, devido a adaptações ao método.

Outro parâmetro importante a ser considerado na FES é o tamanho de partícula dos substratos, pois está diretamente relacionado com a porosidade e compactação do meio. É necessário um tamanho de partícula que não comprometa o processo, permitindo uma melhor aeração e maior superfície de crescimento microbiano possível. A distribuição de partículas de cada substrato está apresentada na Figura 7, conforme as peneiras utilizadas: 10 mesh (1,70 mm), 20 mesh (0,850 mm), 28 mesh (0,600 mm), 48 mesh (0,300 mm), 80 mesh (0,180 mm), 140 mesh (0,160mm), 170 mesh (0,090 mm) e o fundo, com 200 mesh (<0,090 mm).

Figura 7 - Frações Granulométricas dos substratos (%) utilizados na FES por *A. niger*



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

O farelo de soja apresentou a maior granulometria de todos os substratos com predominância de partículas maiores que 1,70 mm (33,58%) e maiores 0,850 mm (43,16%). Partículas entre 0,160 mm e 0,090 mm representam menos de 1%. Com isso, o meio composto de farelo de soja apresenta maior espaço entre as partículas, facilitando a aeração, mas menor área superficial de contato para os microrganismos. A casca de soja e o farelo de trigo mostraram uma distribuição mais uniforme do tamanho das partículas. Enquanto a casca de soja apresentou tamanhos de partículas entre 0,850 mm e 0,180 mm, com predominância de partículas maiores entre 0,300 mm e 0,600mm (33,35%), o farelo de trigo apresentou predominância de tamanho de partículas maiores que 0,600 mm até 0,160 mm, representando 80,44% do total. Com partículas de substrato menores, o farelo de trigo possibilita uma maior superfície para o crescimento microbiano, entretanto, isso resulta em uma maior possibilidade de compactação do material.

Em um estudo sobre a produção de protease por *A. oryzae* utilizando subprodutos do café como substrato, entre as variáveis observadas, o tamanho de partícula (0,5; 1 e 2 mm) exerceu influência na síntese da enzima. A maior atividade proteásica ( $7.998 \text{ Ug}^{-1}$  extrato seco) foi constatada no meio com tamanho de partícula de 1mm e a pior de 0,5 mm. Os autores atribuíram este resultado a aeração do leito (MURTHY; NAIDU, 2010). De Castro e Sato (2013) observaram que um tamanho de partícula maior, dificultou a produção de protease quando utilizaram farelo de soja com 72,9% da sua distribuição granulométrica maior que 1,68 mm.

Entretanto, em nosso estudo, como os meios são compostos por substratos com composição centesimal diferentes há uma dificuldade em avaliar se o tamanho de partícula exerceu alguma influência sobre a produção dos metabólitos da fermentação, pois não foi uma variável estudada, mas possibilita observar qual meio obteve maior ou menor tamanho de partícula, interferindo na sua aeração e conseqüentemente no crescimento microbiano e produção de metabólitos.

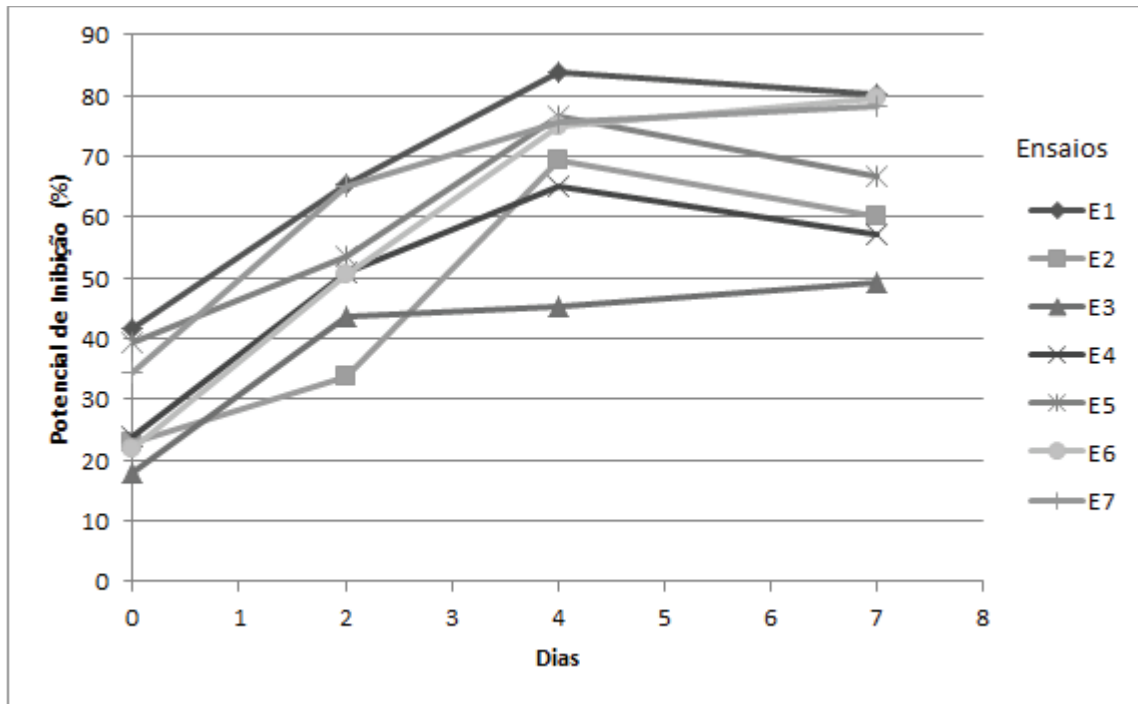
## **4.2 ETAPA I**

### **4.2.1 Atividade Antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos foi analisada em tempos diferentes de fermentação (0 h, 48 h, 96 h e 144 h). Observou-se que o meio exerceu influência sobre a variável resposta. A cinética do processo fermentativo indica que os melhores resultados foram observados em 96 horas de fermentação (Figura 8) e os valores de potencial de inibição das espécies reativas ao oxigênio mostraram diferenças significativas entre eles ( $p < 0,05$ ), o que pode ser observado na Tabela 5.



**Figura 8 – Potencial de inibição da oxidação por meio da captura de espécies reativas de oxigênio (%), por dia, dos ensaios, decorrente da fermentação em estado sólido por *A. niger*, com diferentes proporções de substratos**



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

**Tabela 5 – Potencial de Inibição da oxidação por meio de captura de espécie reativas de oxigênio, determinado por ABTS (%) em fermentação em estado sólido por *A. niger* com diferentes proporções de substratos**

Ensaio	0 h	48 h	96 h	144 h
1	41,69 ± 1,05 <sup>a</sup>	65,52 ± 1,92 <sup>a</sup>	83,81 ± 0,14 <sup>a</sup>	80,27 ± 0,18 <sup>a</sup>
2	22,83 ± 4,69 <sup>bc</sup>	33,57 ± 2,50 <sup>c</sup>	69,21 ± 0,24 <sup>b</sup>	59,94 ± 0,63 <sup>bc</sup>
3	17,79 ± 5,01 <sup>c</sup>	43,77 ± 5,98 <sup>bc</sup>	45,24 ± 5,26 <sup>c</sup>	49,22 ± 1,51 <sup>c</sup>
4	23,91 ± 7,35 <sup>bc</sup>	50,93 ± 3,81 <sup>abc</sup>	65,00 ± 0,94 <sup>b</sup>	57,26 ± 1,36 <sup>c</sup>
5	39,48 ± 4,24 <sup>ab</sup>	53,62 ± 1,09 <sup>ab</sup>	76,5 ± 3,83 <sup>ab</sup>	66,74 ± 1,97 <sup>abc</sup>
6	21,97 ± 0,74 <sup>c</sup>	50,46 ± 7,97 <sup>abc</sup>	74,82 ± 2,64 <sup>ab</sup>	79,53 ± 2,58 <sup>a</sup>
7	34,43 ± 2,61 <sup>abc</sup>	64,92 ± 6,01 <sup>a</sup>	74,75 ± 2,99 <sup>ab</sup>	78,19 ± 11,96 <sup>ab</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Ensaio 1: farelo de soja (100%); Ensaio 2: farelo de trigo (100%); Ensaio 3: casca de soja (100%); Ensaio 5: casca de soja, farelo de soja e farelo de trigo (1/3 cada); Ensaio 5: farelo de soja (50%) e farelo de trigo (50%); Ensaio 6: farelo de trigo (50%) e casca de soja (50%); Ensaio 7: farelo de soja (50%) e casca de soja (50%). Fonte: elaborado pelo autor (2020)

Pode-se observar que no tempo zero, os ensaios já apresentarem potencial de inibição de oxidação de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio, pelo método ABTS, visto que

os substratos componentes dos meios já possuem substâncias com esta capacidade. A soja é um alimento considerado funcional, e possui ação antioxidante devido a presença das proteínas e polifenóis, como flavonóides, isoflavonas e ácidos fenólicos (LEE et al., 2015). Conforme Singh et al. (2014) os compostos fenólicos e isoflavonóides da soja se concentram na matriz da semente. Já o farelo de trigo, possui uma camada chamada aleurona contendo compostos bioativos, como, lignanos, ácidos fenólicos e arabinoxilanos que apresentam quantidades expressivas de ácido ferúlicos, compostos que apresentam esta mesma potencialidade (ESPOSITO, 2005). A FES pode melhorar as propriedades funcionais destes compostos pela hidrólise de proteínas e polifenóis, produzindo peptídeos e polifenóis livres, respectivamente.

O maior potencial de inibição foi verificado no tempo de 96 h, para a maioria dos ensaios, já que a formação do metabólito está frequentemente ligada ao crescimento celular. Sendo assim, no crescimento máximo do microrganismo, há a tendência de maior produção de metabólitos. Além disso, conforme reduz a oferta de nutriente para a atuação do microrganismo, a velocidade de produção do metabólito decai. Outro fator importante a ser considerado é que o potencial antioxidante dos peptídeos é maior e mais estável que o dos aminoácidos. Portanto, quanto maior a hidrólise do peptídeo, mais aminoácidos livres serão formados, reduzindo o potencial antioxidante.

O substrato que apresentou melhor ação antioxidante durante todo o processo de fermentação foi o farelo de soja 100% (ensaio 1). Já a casca de soja 100% (ensaio 3) mostrou-se como o meio menos propício para a formação dos compostos antioxidantes. Entretanto a casca de soja, quando em misturas com farelo de soja (50/50) (ensaio 7) e com farelo de trigo (50/50) (ensaio 6), estimulou a produção de compostos com atividade antioxidante, sendo os resultados estatisticamente semelhantes aos apresentados pelo farelo de soja (100%) e por farelo de soja com farelo de trigo (50/50) (ensaio 5) em 96 horas. Este substrato apresentou sinergismo quando adicionado ao farelo de trigo, ao comparar os ensaios na qual foi utilizado os substratos de formas individuais, mostrando-se um bom resíduo agroindustrial a ser utilizado na FES para a produção de antioxidantes, quando adicionado a um outro subproduto.

Há a dificuldade de comparação com dados de literatura devido às diferenças de substratos, microrganismos, métodos de extração e variáveis apresentadas. Janiszewska et al. (2019) avaliaram a fermentação da quinoa por *R. oligosporus*, *N. intermedia* e *A. oryzae* e observaram que no primeiro estágio de fermentação *R. oligosporus* e *N. intermedia* se mostraram mais eficiente na produção de antioxidantes. Os métodos empregados foram

ABTS<sup>+</sup> ( $\mu\text{mol}$  equivalente Trolox/g), neutralização do radical  $\cdot\text{OH}$  ( $\text{CE}_{50}$ ) e poder redutor ( $\text{PR}_{0,5}$ ). Após 4 dias, o *R. oligosporus* ainda aumentou em 66% sua atividade antioxidante, correspondida ao aumento de peptídeos e aminoácidos, visto que reduziu os compostos fenólicos neste tempo de fermentação.

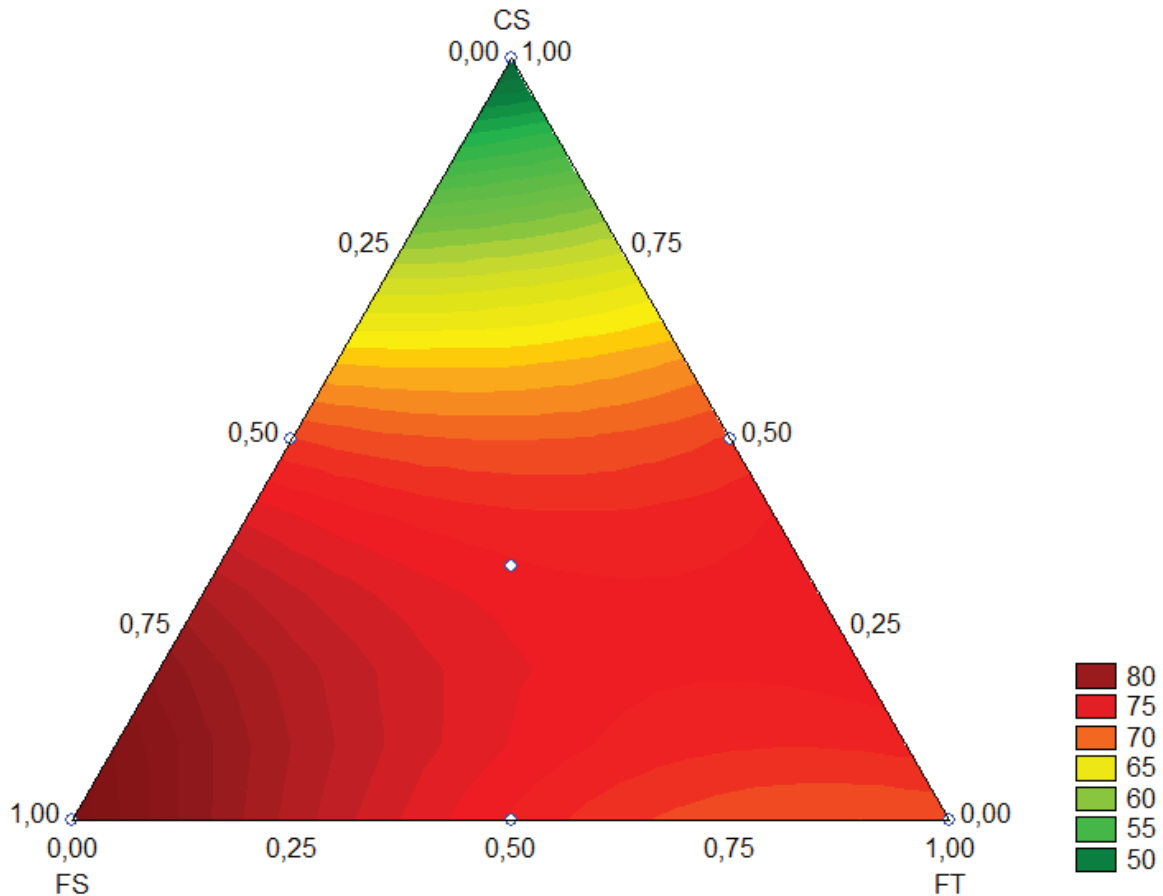
Por meio da análise da matriz de ensaios do planejamento de mistura, foram obtidas as superfícies de resposta para avaliar a influencia das proporções dos substratos na resposta da atividade antioxidante. Cada fator (componente da mistura pura) é representado em um canto do triângulo equilátero e cada ponto deste triângulo refere-se a uma proporção diferente de componentes de misturas. A porcentagem de misturas máxima de cada ingrediente é descrita no canto correspondente, enquanto o mínimo é colocado no canto oposto. Já o centro representa a mistura em partes iguais (DE CASTRO et al., 2015).

A Figura 9 mostra a superfície de resposta do potencial de inibição da oxidação de radicais livres em 96 horas de fermentação, utilizando modelo Linear demonstrado por ANOVA (Tabela 6) e pode-se observar um maior potencial de inibição quando utiliza-se farelo de soja como substrato da fermentação.

**Tabela 6 - Análise de Variância do Potencial de inibição da oxidação por meio de captura de radicais livres determinado por ABTS (%), em 96 h de fermentação em estado sólido, por *A. niger*, utilizando farelo de trigo, farelo de soja e casca de soja como substratos**

Modelo	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p - valor	R-sqr	R-sqr ajustado
Linear	1270,73	2	635,36	11,21291	0,002214	0,670913	0,611079
Quadrático	342,033	3	114,01	3,24	0,081441	0,851498	0,758685
<b>Total Ajustado</b>	1894,026	13	145,69				

**Figura 9 - Curva de contorno para a resposta de atividade antioxidante determinada por ABTS (%) no tempo de 96 h em função das variáveis do planejamento de mistura, com diferentes proporções de substratos ( $p < 0,05$ )**



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Ao analisarmos os tamanhos de partícula dos meios, o ensaio 1 composto por farelo de soja, possuiu maior tamanho de partícula e melhores resultados de atividade antioxidante em 96 horas de fermentação. Entretanto, os ensaios 5, 6 e 7, compostos por misturas binárias, também apresentaram potencial de inibição da oxidação comparáveis aos observados para o ensaio realizado apenas com farelo de soja, e são formados por um meio com partículas de tamanhos variados. Contudo, ao compararmos a quantidade inicial e final de antioxidantes, ou seja, o rendimento de cada biorreator, os resultados demonstraram que o maior rendimento em todos os tempos de fermentação foi maior na mistura de farelo de trigo e casca de soja (ensaio 6), e na mistura entre farelo de soja e casca de soja (ensaio 7) como podemos observar na Tabela 7.

**Tabela 7 - Potencial de inibição da oxidação por meio da captura de espécies reativas de oxigênio (%) (Rendimento: PI no tempo final “t” – PI “tempo inicial t0”) durante a fermentação em estado sólido por *A. niger*, com diferentes substratos**

Ensaio	Rendimento 48 h	Rendimento 96 h	Rendimento 144h
1	23,83±0,87 <sup>abc</sup>	42,12±0,91 <sup>ab</sup>	38,58±0,87 <sup>b</sup>
2	10,75± 2,18 <sup>c</sup>	46,39±4,45 <sup>ab</sup>	36,67±4,06 <sup>b</sup>
3	25,98±0,96 <sup>ab</sup>	27,46±0,25 <sup>c</sup>	32,44±3,5 <sup>b</sup>
4	27,02±3,54 <sup>ab</sup>	41,09±6,41 <sup>ab</sup>	33,35±5,98 <sup>b</sup>
5	14,15±3,15 <sup>bc</sup>	37,03±0,4 <sup>bc</sup>	27,27±2,26 <sup>b</sup>
6	28,49±7,30 <sup>ab</sup>	54,85±1,97 <sup>a</sup>	57,55±3,26 <sup>a</sup>
7	30,54±3,34 <sup>a</sup>	38,86±2,45 <sup>ab</sup>	30,39±9,29 <sup>ab</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Ensaio 1: farelo de soja (100%); Ensaio 2: farelo de trigo (100%); Ensaio 3: casca de soja (100%); Ensaio 5: casca de soja, farelo de soja e farelo de trigo (1/3 cada); Ensaio 5: farelo de soja (50%) e farelo de trigo (50%); Ensaio 6: farelo de trigo (50%) e casca de soja (50%); Ensaio 7: farelo de soja (50%) e casca de soja (50%). Fonte: elaborado pelo autor (2020).

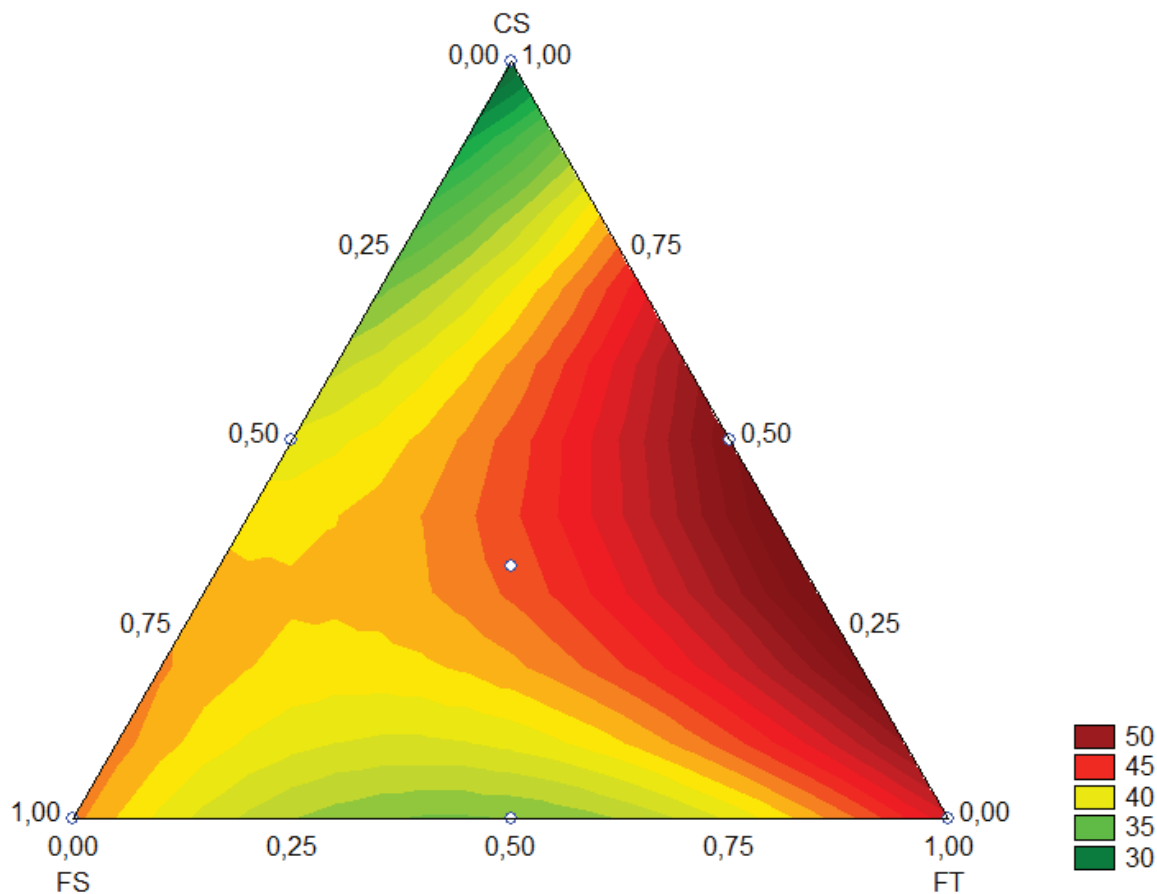
Todavia, em 48 horas de fermentação, estes ensaios são estatisticamente semelhantes ao 4 (1/3 de cada substrato), 3 (100% casca de soja) e ao 1 (100% farelo de soja). Em 96 horas, tempo onde há maior potencial de inibição, a maioria dos ensaios não possuem diferenças significativas, exceto o ensaio 3 (100% casca de soja) e 5 (50% farelo de soja e 50% farelo de trigo). Ao final da fermentação, em 144 h, os ensaios 6 e 7 mostraram-se semelhantes e com maior rendimento, enquanto os ensaios 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram o menor rendimento.

Ao estudar a análise de variância (ANOVA) do ensaios na Tabela 8, em 96 horas de fermentação, pelo modelo quadrático ( $p < 0,05$ ) e sua a superfície de resposta (Figura 10) confirmamos a análise acima, mostrando um maior rendimento na mistura binária de casca de soja e farelo de trigo em todos os tempos de fermentação. O que comprova, novamente que a casca de soja quando misturada com outros subprodutos mostra-se um ótimo substrato para a FES.

**Tabela 8 – análise de Variância do rendimento do potencial de inibição da oxidação por meio da captura de radicais livres, determinado por ABTS (%), em 96 h de fermentação em estado sólido, por *A. niger*, utilizando farelo de soja, farelo de trigo e casca de soja como substratos.**

Modelo	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p - valor	R-sqr	R-sqr ajustado
Linear	242,16	2	121,08	2,32873	0,143447	0,297459	0,169755
Quadrático	479,80	3	159,93	13,88629	0,001547	0,886821	0,816085
Total Ajustado	814,09	13	62,62				

**Figura 10- Curva de contorno para a resposta de rendimento dos ensaios, por ABTS (%), no tempo de 96 h em função das variáveis do planejamento de mistura, com diferentes proporções de substratos ( $p < 0,05$ ).**



A análise da capacidade antioxidante do extrato precisa ser complementada com o ensaio de proteínas solúveis em meio ácido para atestar que houve a formação dos biopeptídeos e não de outro composto que possui tal ação.

#### 4.2.2 Proteínas solúveis em meio ácido

A Tabela 9 mostra que maior concentração de proteína solúvel, ao final de 96 h, foi observada no ensaio 7 composto por farelo de soja e casca de soja na proporção de 50% cada. O rendimento, em 96 horas também foi maior no ensaio 7, juntamente com o ensaio 4, composto pelos três farelos (proporção de 1/3 cada). Estes ensaios possuem em comum o substrato farelo de soja, que possui alto teor de proteína total inicial. O menor valor encontrado em 96 h de fermentação foi o ensaio 6 (farelo de trigo e casca de soja) que possuiu também menor rendimento, juntamente com o ensaio 3 (casca de soja) (Tabela 9). Estes ensaios são os que possuem menor concentração de proteína total inicial. Este fato sugere que o alto potencial antioxidante do ensaio 6 (Tabela 7) pode ser explicado pelo aumento da concentração de outros compostos com tal atividade, como os compostos fenólicos, durante o tempo de fermentação.

**Tabela 9 - Proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g/mL}$ ) e Rendimento (Valor Final - Valor Inicial) ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos ensaios durante a fermentação em estado sólido por *A. niger*, com diferentes substratos.**

Ensaio	Tempo inicial	96 horas de FES	Rendimento Final – Inicial
1	719,95 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	1855,34 $\pm$ 3,0 <sup>c</sup>	1135,40 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
2	773,30 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	1439,17 $\pm$ 24,2 <sup>d</sup>	665,87 $\pm$ 24,2 <sup>d</sup>
3	602,56 $\pm$ 6 <sup>d</sup>	976,05 $\pm$ 33,2 <sup>f</sup>	373,49 $\pm$ 27,2 <sup>e</sup>
4	623,92 $\pm$ 18,1 <sup>d</sup>	2070,90 $\pm$ 66,4 <sup>b</sup>	1447,22 $\pm$ 48,3 <sup>a</sup>
5	1165,99 $\pm$ 12,1 <sup>a</sup>	2049,56 $\pm$ 18,1 <sup>b</sup>	883,56 $\pm$ 6 <sup>c</sup>
6	778,22 $\pm$ 11,2 <sup>b</sup>	1247,10 $\pm$ 66,4 <sup>e</sup>	468,88 $\pm$ 55,2 <sup>c</sup>
7	700,74 $\pm$ 6,0 <sup>c</sup>	2273,63 $\pm$ 51,3 <sup>a</sup>	1572,91 $\pm$ 45,3 <sup>a</sup>

Valores médios  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Ensaio 1: farelo de soja (100%); Ensaio 2: farelo de trigo (100%); Ensaio 3: casca de soja (100%); Ensaio 5: casca de soja, farelo de soja e farelo de trigo (1/3 cada); Ensaio 5: farelo de soja (50%) e farelo de trigo (50%); Ensaio 6: farelo de trigo (50%) e casca de soja (50%); Ensaio 7: farelo de soja (50%) e casca de soja (50%). Fonte: elaborado pelo autor (2020).

O tamanho dos peptídeos é um fator significativo e diretamente relacionado com a atividade antioxidante e outras propriedades funcionais dos hidrolisados. Diante deste fato, os níveis de proteólise são frequentemente avaliados por meio da quantificação de peptídeos solúveis em meio com ácido tricloroacético (TCA) (DE CASTRO; SATO, 2015). Este parâmetro indica a formação de pequenos peptídeos e aminoácidos, além de possuir uma correlação significativa e positiva com grau de hidrólise ( $p < 0,05$ ) (ZHOU et al., 2012).

A análise de proteína solúvel em meio ácido é utilizada para atestar que o potencial antioxidante é devido ao aumento das proteínas solúveis e não do incremento de outros compostos, visto que Sanjukta et al. (2015) estudou a FES de soja por *B. subtilis* e comprovou o aumento tanto de compostos fenólicos livres pela produção de  $\beta$ -glucosidade, quanto de biopeptídeos, pela produção de proteases, durante a fermentação; Wen e Chen (2011) relataram o aumento do grau de hidrólise de proteínas, via FES por *R. oligosporus* e *B. subtilis* e Dey e Kuhad (2014) constataram o aumento de compostos fenólicos por meio de FES, por *R. oryzae*, utilizando trigo como substrato

Pela análise estatística da matriz do planejamento de misturas, pode-se verificar na Figura 11 que a melhor combinação é a de casca de soja e farelo de soja na proporção entre 75:25 e 50:50, na qual podem ser observadas as maiores concentrações de proteínas solúveis. O modelo utilizado foi o Quadrático, demonstrado por ANOVA (Tabela 10).

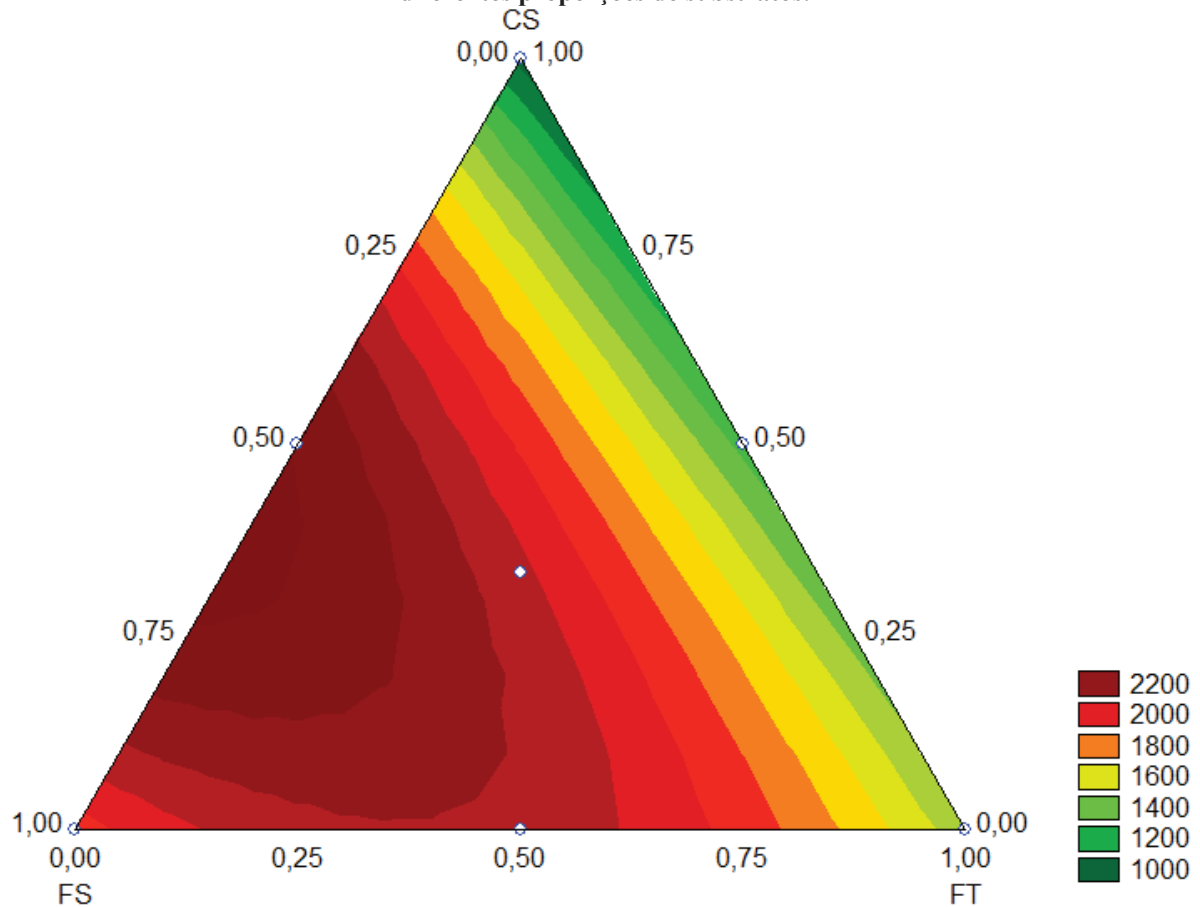
**Tabela 10- Análise de Variância da concentração de proteínas solúveis ( $\mu\text{g/mL}$ ), em 96h de fermentação em estado sólido, por *A. niger*, em função das variáveis do planejamento de mistura, com diferentes proporções de substratos.**

Modelo	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p - valor	R-Sqr	R-Sqr ajustado
Linear	1400988	2	700494,2	5,3776	0,023499	0,494376	0,402444
Quadrático	1413427	3	471142,3	193,8937	0,000000	0,993140	0,988853
<b>Total</b>	1894,026	13	145,69				
<b>Ajustado</b>							

Fonte: elaborado pelo autor (2020)



**Figura 11 - Curva de contorno para a concentração de proteínas solúveis ( $\mu\text{g/mL}$ ) em 96 h de fermentação em estado sólido, por *A. niger*, em função das variáveis do planejamento de mistura ( $p < 0,05$ ), com diferentes proporções de substratos.**



Fonte: elaborado pelo autor (2020)

Ao correlacionar o aumento de potencial antioxidante com a formação de uma maior quantidade de proteínas solúveis, e, conseqüentemente, de peptídeos, observou-se que o ensaio 7 (50% farelo de soja e 50% casca de soja) apresentou melhores resultados. Sendo assim, a segunda etapa do experimento foi realizada com os substratos farelo de soja e casca de soja. A mistura dos dois subprodutos foi definida com o intuito de utilizar um substrato com alto teor de proteína e aumentar o valor agregado dos subprodutos, visto que a casca de soja é um composto de menor valor comercial que o farelo de soja. Além disso, o uso de casca de soja na FES para a produção de proteases e biopeptídeos não foi encontrado na literatura.

### 4.3 ETAPA II

Na segunda etapa do experimento, utilizou-se uma mistura de farelo de soja e casca de soja (70:30). Utilizou-se uma nova proporção de farelo e casca de soja com o objetivo principal de aumentar a quantidade de proteína do meio, visto que está diretamente relacionado com quantidade de protease produzida na. A quantidade de proteína, em base seca, das amostras foi estabelecida em 34,80%.

#### 4.3.1 Atividade Proteásica

O microrganismo *A. niger* foi capaz de digerir o substrato e utilizar as proteínas e outras substâncias disponíveis no meio, como fonte de nutrientes para seu crescimento e produção de metabólitos, fato que pode ser observado pelo aumento da atividade proteásica em 48 horas de fermentação (Tabela 11). De forma semelhante este microrganismo já foi indicado como produtor de enzimas proteases por De Castro et al. (2015). Pel et al. (2007) afirmam que *A. niger* possui um conjunto completo de enzimas para degradar polipeptídeos.

**Tabela 11 - Atividade proteásica ( $U\ g^{-1}$ ) durante a segunda etapa de produção de proteases e de biopeptídeos por fermentação em estado sólido por *A. niger*.**

Ensaio	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
E1	0	0	597±4,24 <sup>b</sup>	462±11,31 <sup>b</sup>	315±4,24 <sup>bc</sup>
E2	0	0	677±11,31 <sup>a</sup>	529±1,41 <sup>a</sup>	426±5,52 <sup>a</sup>
E3	0	0	214±5,66 <sup>f</sup>	136±2,83 <sup>f</sup>	264±8,49 <sup>cde</sup>
E4	0	0	143±4,24 <sup>g</sup>	115±1,41 <sup>f</sup>	365±41,01 <sup>ab</sup>
E5	0	0	420 <sup>cd</sup>	310±5,66 <sup>d</sup>	233±4,24 <sup>de</sup>
E6	0	0	466±19,80 <sup>c</sup>	379±1,41 <sup>c</sup>	286±11,31 <sup>cde</sup>
E7	0	0	100±8,49 <sup>g</sup>	143±12,73 <sup>f</sup>	116±11,31 <sup>f</sup>
E8	0	0	143±1,41 <sup>g</sup>	195±21,21 <sup>e</sup>	229±18,38 <sup>c</sup>
E9	0	0	406±22,63 <sup>d</sup>	408±8,49 <sup>c</sup>	298±16,97 <sup>cd</sup>
E10	0	0	334±16,97 <sup>e</sup>	410±25,46 <sup>c</sup>	301±9,90 <sup>bc</sup>
E11	0	0	392±14,14 <sup>d</sup>	372 <sup>c</sup>	275±1,41 <sup>cde</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, numa mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. E1: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E2: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E3: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 0,5%; E4: pH7, Umidade 70, Nitrogênio 0,5%; E5: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E6: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E7:

pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E8: pH7, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E9, E10 e E11: pH6, Umidade 60%, Nitrogênio 1,25%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

No tempo zero, ou seja, quando não havia ainda ocorrido a fermentação do substrato e em 24 horas de fermentação, não houve detecção de produção da protease pela análise utilizada. Isto explica-se pelo fato de que neste período inicial o *A. niger* utilizou os nutrientes para sua nutrição, crescimento e manutenção.

A análise realizada com as amostras coletadas com 48 h de fermentação apresentou melhores resultados de atividade proteásica para a maioria dos ensaios, destacando-se o ensaio E2 (50% de umidade, pH 7 e 0,5% de nitrogênio disponível, com 677 U g<sup>-1</sup> de atividade proteásica. Este mesmo ensaio apresentou maior atividade proteásica em 72 e 96 horas, quando compararam-se as médias de todos os ensaios (Tabela 11).

A produção de proteases foi reduzindo conforme o passar do tempo para a maioria dos ensaios. Sugerem-se como possíveis causas a depleção de nutrientes do meio e alteração de pH que podem inibir a síntese da enzima; e o aumento de temperatura do meio devido ao processo de fermentação, na qual pode afetar o metabolismo microbiano (SATTAR et al., 2019).

Finkler et al., (2017) estudaram o aumento de temperatura da FES por *A. niger* em biorreatores com e sem agitação e avaliaram que nas fermentações sem agitação a temperatura alcançou valores superiores a 40°C com 15-16 h de fermentação, quando a temperatura de entrada foi 30°C. Fato que pode prejudicar a produção de metabólitos, visto que em nosso estudo, a aeração era feita apenas no momento das coletas das amostras. Além disso, observou-se uma aglomeração do substrato, encolhimento do leito e formação de espaço entre o leito e parede do biorreator, o que faz o ar fluir através dessas lacunas e não através da própria cama, favorecendo o superaquecimento e reduzindo a aeração, para permitir uma quantidade de O<sub>2</sub> necessária para o microrganismo e a remoção de CO<sub>2</sub>. A produção de enzimas pode ser afetada por altas temperaturas, pela desnaturação das proteínas catalíticas e alteração nas vias metabólicas que diminuem a síntese do produto.

Os menores valores de atividade proteásica, em 48 h, foram observados nos ensaios E4, E7 e E8, com valores de 143 U g<sup>-1</sup>, 100 U g<sup>-1</sup> e 143 U g<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes ensaios possuem como característica comum o meio com maior umidade. Diferente da maioria dos ensaios, nestes casos, E4 e E8 tiveram um aumento da protease durante a fermentação, o que mostra que a alteração das condições do meio levou a diferenças na atividade da protease ao longo do processo. A alta umidade dificultou a produção de protease, mas simultaneamente

mostrou que o *A. niger* possui um metabolismo muito versátil, visto que a cepa se adaptou molecular e fisiologicamente ao meio e aumentou a secreção da enzima ao longo da fermentação. Uma umidade muito alta pode resultar na diminuição da porosidade, redução da difusão do oxigênio e da troca gasosa, dificultando a produção de metabólitos (LONSANE, et al., 1985).

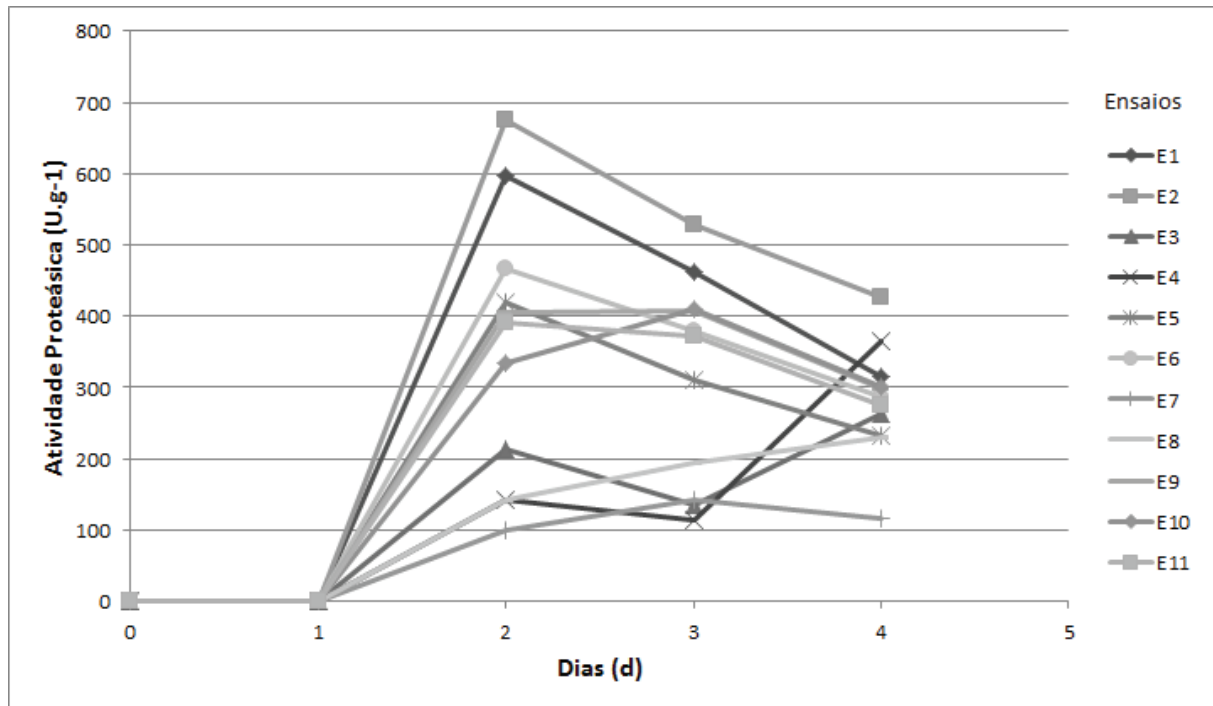
A atividade da protease obtida por FES varia de 20 a 50.000 U g<sup>-1</sup> (EL-BAKRY et al., 2015). Muitos estudos relatam a produção de protease por *A. niger*, via FES. Purushothaman et al. (2019) produziram protease por *A. niger* utilizando farelo de trigo como substrato e como resultado, obtiveram 38.362 U mg<sup>-1</sup> de atividade proteásica quando a enzima foi purificada com sulfato de amônio, filtração em gel e técnicas cromatográficas. De Castro et al. (2015) conseguiram atividade proteásica máxima de 262,78 U g<sup>-1</sup> quando utilizaram farelo de trigo e farelo de soja como substrato, em uma FES com 50% de umidade e 30°C de temperatura de fermentação. Entretanto, Noveli, Barros e Fleuri (2016) não obtiveram atividade proteásica satisfatória quando *A. niger* foi inoculado em farelo de trigo e farelo de soja como substratos para a FES.

Um estudo sobre a produção de protease por *Streptomyces sp* CN902 com a utilização de diferentes subprodutos agroindustriais sob FES, resultou que a mistura entre farelo de trigo e *chopped date stones* (5%) resultou na maior atividade enzimática (90,50 U g<sup>-1</sup>). Num segundo estudo com FES a 45°C, 60% de umidade por 5 dias resultou em uma produção de 220,50 U g<sup>-1</sup> de protease (LAZIM et al., 2009).

A comparação com outros estudos é difícil por usarem substratos e metodologias diferentes, como pH, tempo de incubação e temperatura. Assim, atividades de protease mais alta, não sugere necessariamente uma maior produção quando há a comparação dos estudos (NEGI, BENERJEE, 2006).

A produção de proteases (Equação 1), também foi maior em 48 horas (Figura 12), o que confirma o rápido aumento da atividade enzimática neste período e a redução da atividade ao longo do tempo.

**Figura 12 - Atividade proteásica por dia ( $U\ g^{-1}\cdot d$ ) dos ensaios, decorrente da fermentação em estado sólido por *A. niger***



E1: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E2: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E3: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 0,5%; E4: pH7, Umidade 70, Nitrogênio 0,5%; E5: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E6: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E7: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E8: pH7, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E9, E10 e E11: pH6, Umidade 60%, Nitrogênio 1,25%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Para analisar o comportamento das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio disponível, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de efeitos das variáveis (Tabelas 12 e 13).

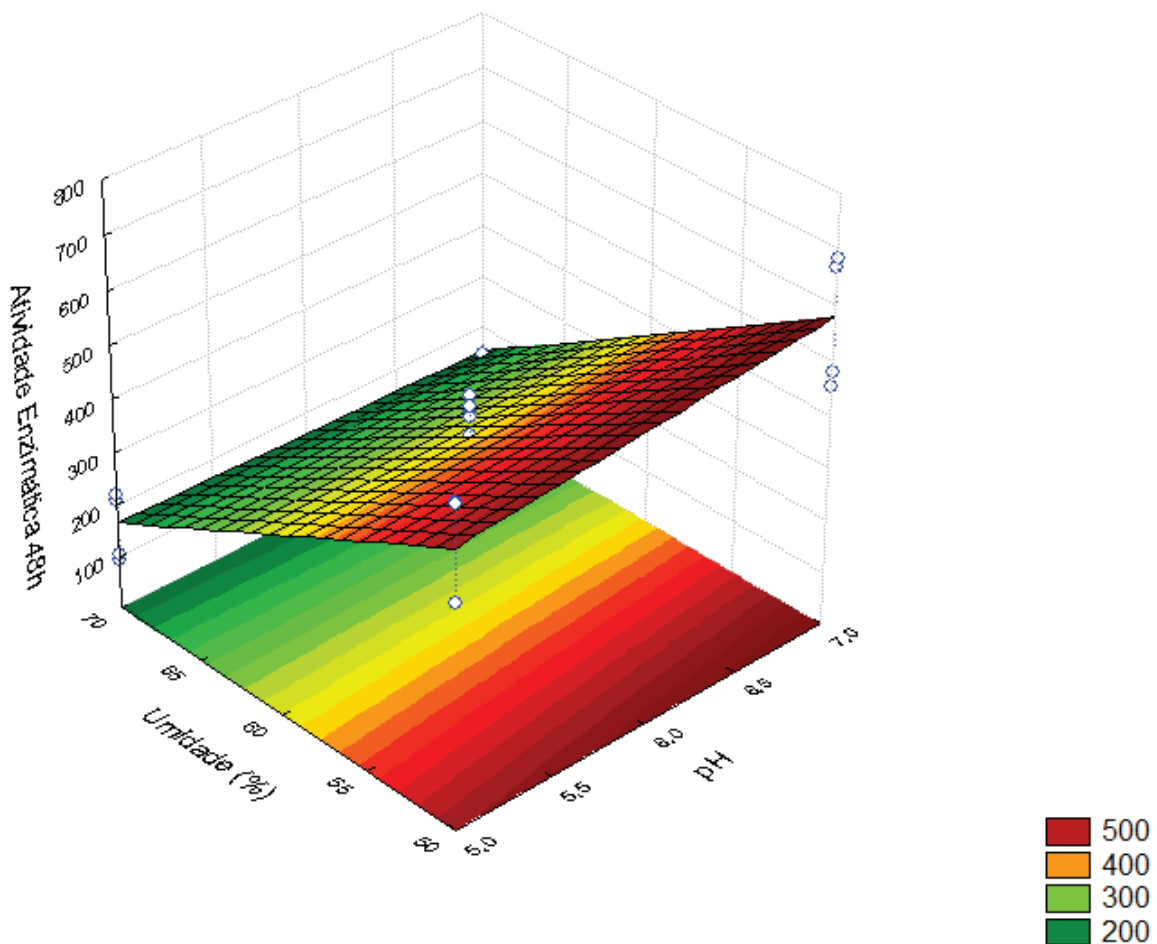
**Tabela 12 - Análise de Variância de Atividade Proteásica em 48 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F	p - valor
(1)pH	2352,3	1	2352,3	2,7242	0,121085
(2) Umidade (%)	607620,3	1	607620,3	703,6939	0,000000
(3) [Nit]%	62750,3	1	62750,3	72,6720	0,000001
1 by 2	5852,3	1	5852,3	6,7776	0,020840
1 by 3	1640,2	1	1640,2	1,8996	0,189752
2 by 3	18632,2	1	18632,2	21,5783	0,000378
1*2*3	5402,3	1	5402,3	6,2564	0,025404
Error	12088,6	14	863,5		
Total SS	716338,4	10			

R-sqr=,98312; Adj; 97469

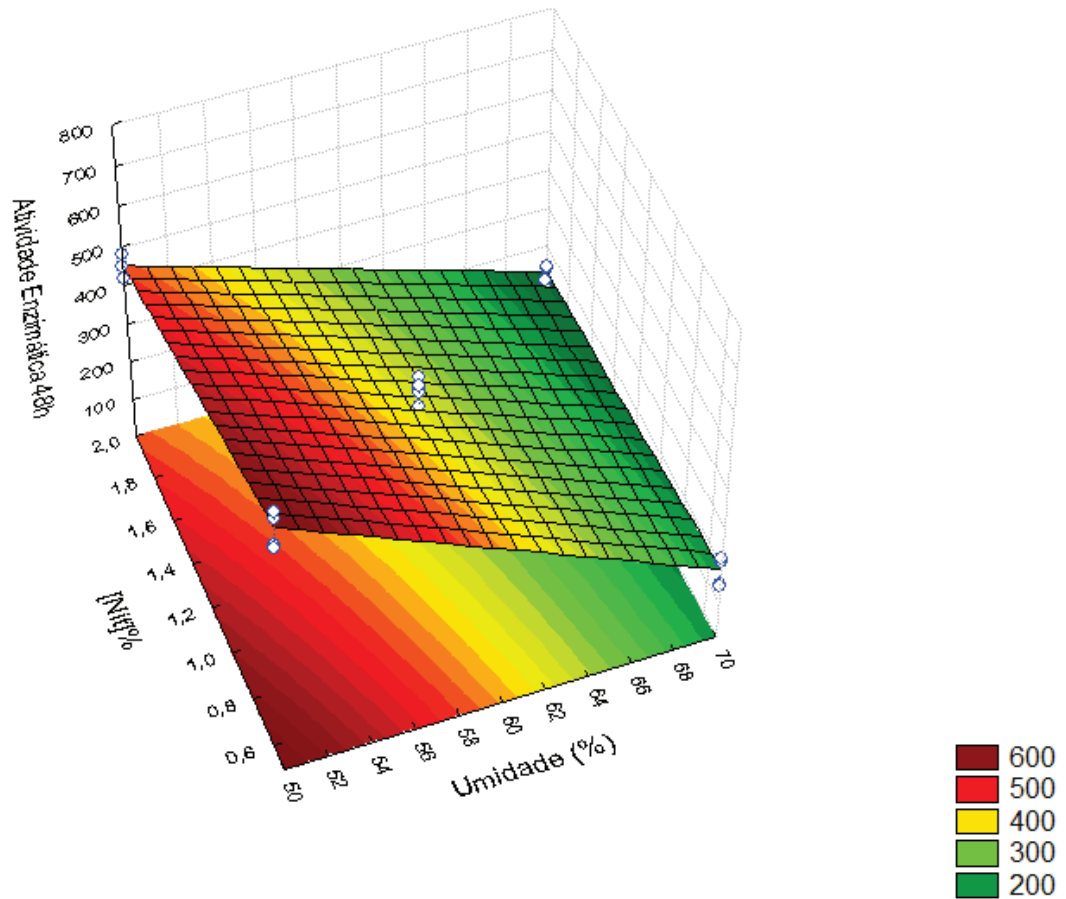
Em 48 horas de fermentação, observa-se que umidade e concentração de nitrogênio foram significativas sobre a atividade proteásica bem como a interação entre pH e umidade e umidade e quantidade de nitrogênio. Conforme a superfície de resposta, quanto maior o pH e menor a umidade, maior é a atividade proteásica (Figura 13). Ao correlacionar umidade com concentração inicial de nitrogênio, observa-se que os menores valores utilizados favorecem a atividade proteásica (Figura 14).

**Figura 13 - Superfície de Resposta (pH por % Umidade) da atividade proteásica, em 48 h de fermentação em estado sólido por *A. niger*.**



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Figura 14 - Superfície de Resposta (% Concentração de nitrogênio por % Umidade) da atividade proteásica, em 48 h de fermentação em estado sólido por *A. niger*.



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

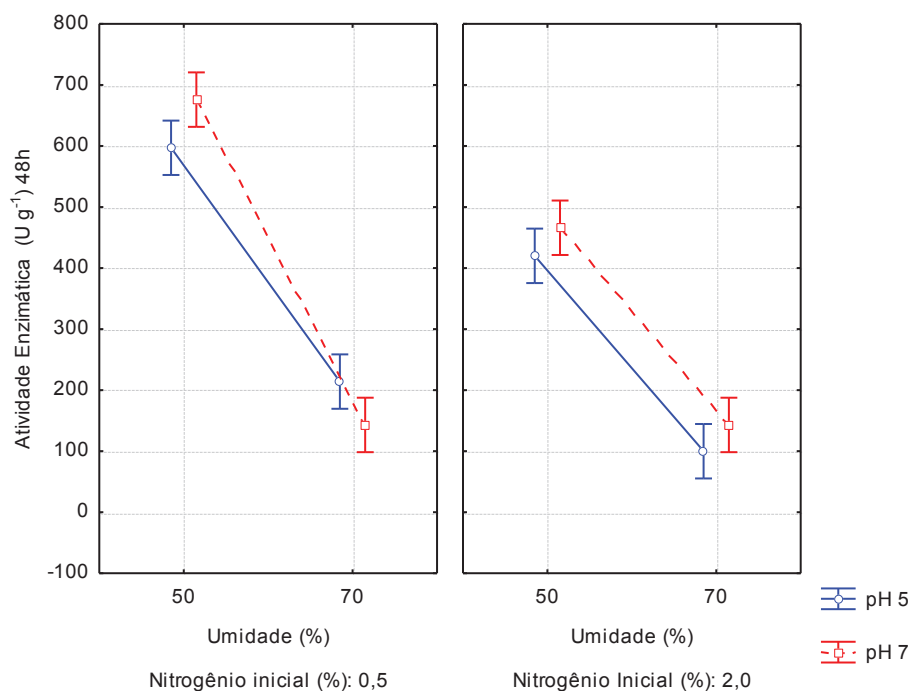
Entretanto, como a interação de terceira ordem foi significativa, esta deve ser analisada em detrimento dos fatores individuais e, conforme a tabela de efeitos das variáveis (Tabela 13), o maior pH (7), menor umidade (50%) e menor concentração de nitrogênio (0,5%), mostraram-se mais favoráveis para a produção de protease em 48 h. O gráfico da interação de efeitos representa esta afirmação na Figura 15.

**Tabela 13 - Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup> sobre a atividade proteásica em 48 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

Variáveis	Efeitos	Erro padrão.	t(3)	p - valor
Mean/Interc.	353,73	6,26	56,46	0,000000
(1)pH	24,25	14,69	1,65	0,121085
(2)Umidade (%)	-389,75	14,69	-26,53	0,000000
(3)[Nit](%)	-125,25	14,69	-8,52	0,000001
1 by 2	-38,25	14,69	-2,60	0,020840
1 by 3	20,25	14,69	1,38	0,189752
2 by 3	68,25	14,69	4,65	0,000378
1*2*3	36,75	14,69	2,50	0,025404

-sqr=,98312; Adj:,97469

**Figura 15 – Atividade proteásica em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 48 h de Fermentação em estado sólido com o *A. niger***



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

El-Braky et al. (2015) citam estudos que revelam como condições para o processo de produção de protease com pH de 6 a 8,5, umidade de 50% e temperatura mesofílica (30°C) até termofílica (50°C), condições semelhantes as encontradas como ideais em nosso experimento.

O pH do meio pode afetar o crescimento e a regulação metabólicas dos microrganismos, visto que são sensíveis à concentração de íons hidrogênio presente no meio. A influência do pH inicial da fermentação também determina a natureza do produto final (SATTAR et al, 2019). O tipo de protease secretada é diretamente ditada pelo pH do meio



(SNYMAN et al., 2019). Um estudo sobre o efeito do pH na atividade da protease produzida por *A. niger*, utilizando diferentes valores de pH (3 a 12), revelou que o pH 7 foi o considerado ideal e a enzima se manteve ativa na faixa de pH 6 e 9, mantendo 60% de sua atividade (BASU, BANIK, DAS, 2008). Pagare et al. (2009) observaram que o pH 8 foi o pH ideal para a atividade de protease produzida por *A. niger* e *B. subtilis*, que apresentou atividade máxima de  $26 \text{ U mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . A produção de protease utilizando resíduos de diferentes variedades de arroz como substratos para a FES por *A. niger*, revelou uma maior atividade proteásica de  $67,7 \text{ U g}^{-1}$  sob condições otimizadas para a máxima produção da enzima ( $34^\circ\text{C}$ , pH 7 e 96 h de fermentação) (PARANTHAMAN, ALAGUSUNDARA, INDHUMATHI, 2009), mesmo pH encontrado como favorável em nosso estudo.

A menor concentração de nitrogênio foi favorável para a produção de protease contrariando estudos que indicam que a produção de protease é aumentada por fonte específica de nitrogênio quando incorporada no meio de fermentação (SATTAR et al., 2019). Este resultado revela que a quantidade de nitrogênio presente na amostra com casca e farelo de soja é praticamente suficiente para a produção de protease, não sendo necessária uma grande suplementação, visto que os subprodutos utilizados possuem uma alta concentração de proteínas, principalmente o farelo de soja, com 40,68%, tal qual observado na Etapa I do experimento.

Em 96 h, apesar de apresentar menor produção de protease em comparação com o obtido em 48 h de fermentação, verificou-se que no tempo de 96 h a atividade antioxidante foi superior, fato que será apresentado posteriormente.

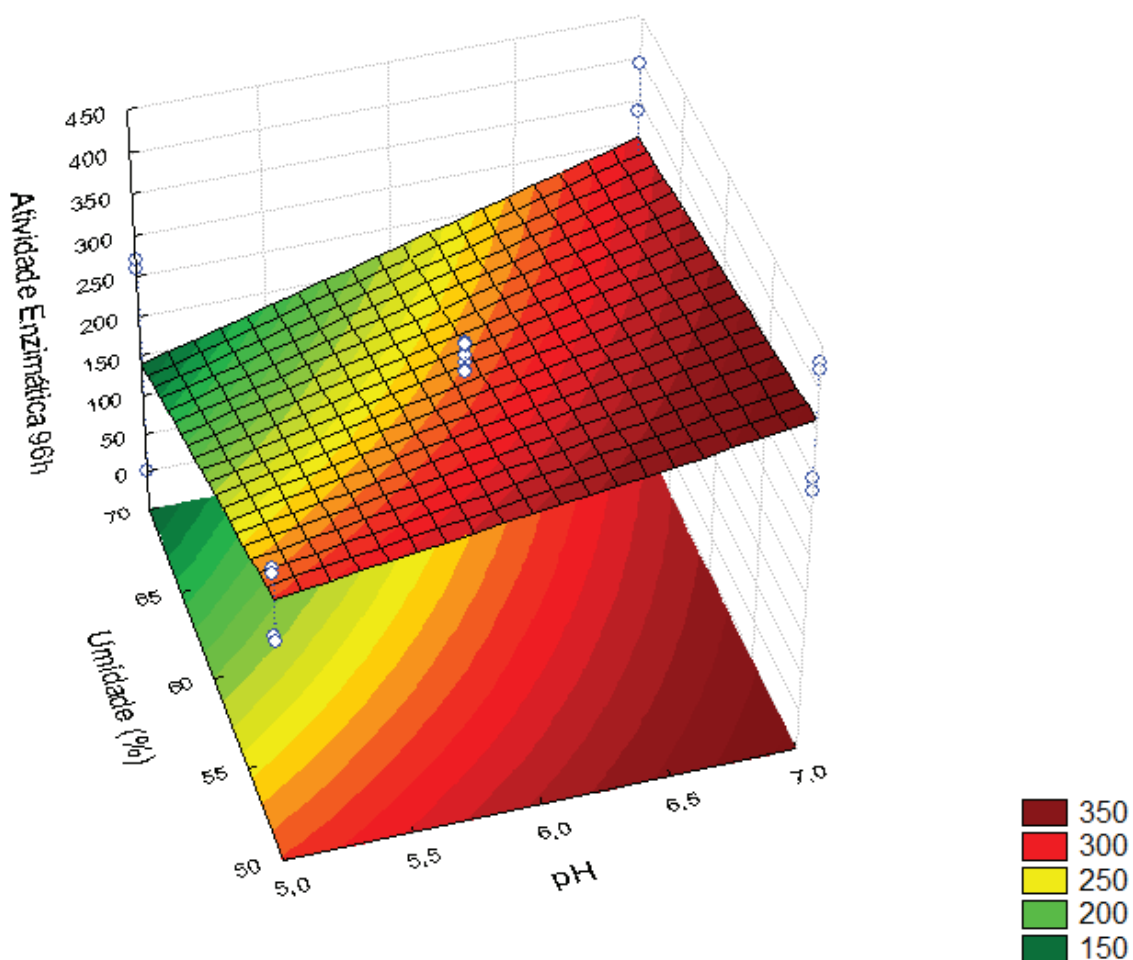
Desta forma, foi avaliada a atividade de protease também neste tempo e observou-se nas Tabelas 14 e 15, correspondentes a ANOVA e efeitos das variáveis, respectivamente, que todas as variáveis possuem efeito significativo sobre a atividade proteásica e obteve-se a mesma interação das variáveis significativas, encontradas em 48 horas de fermentação. Ao analisar a superfície de resposta da interação entre pH e umidade, neste tempo, constata-se, novamente, que quanto maior o pH e menor a umidade, maior a atividade proteásica (Figura 16). Tal qual a interação entre umidade e concentração de nitrogênio, onde quanto menor a umidade e o nitrogênio, maior será a atividade proteásica (Figura 17).

**Tabela 14 - Análise de Variância de atividade proteásica em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p - valor
(1)pH	61033,7	1	61033,7	130,1652	0,000000
(2) Umidade (%)	40421,1	1	40421,1	86,2051	0,000000
(3) [Nit]%	96752,1	1	96752,1	206,3410	0,000000
1 by 2	6880,7	1	6880,7	14,6743	0,001836
1 by 3	1221,5	1	1221,5	2,6051	0,128826
2 by 3	7912,1	1	7912,1	16,8740	0,001066
1*2*3	8658,3	1	8658,3	18,4654	0,000738
Error	6564,5	14	468,89		
Total SS	229444,0	21			

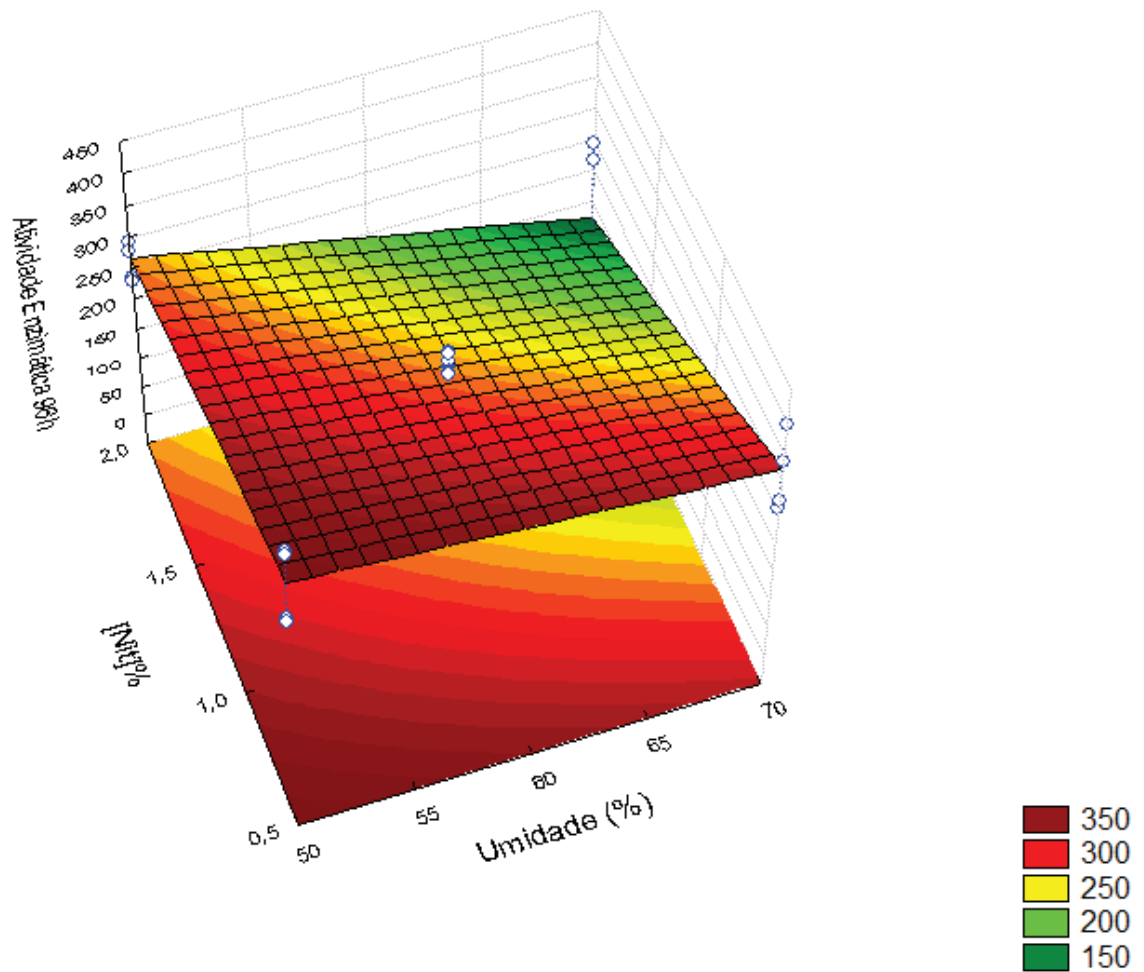
R-sqr=,97139; Adj; 95708

**Figura 16 - Superfície de Resposta (pH por % Umidade) da atividade proteásica, em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger*.**



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

**Figura 17- Superfície de Resposta (% concentração de nitrogênio por % Umidade) da atividade proteásica, em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger*.**



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

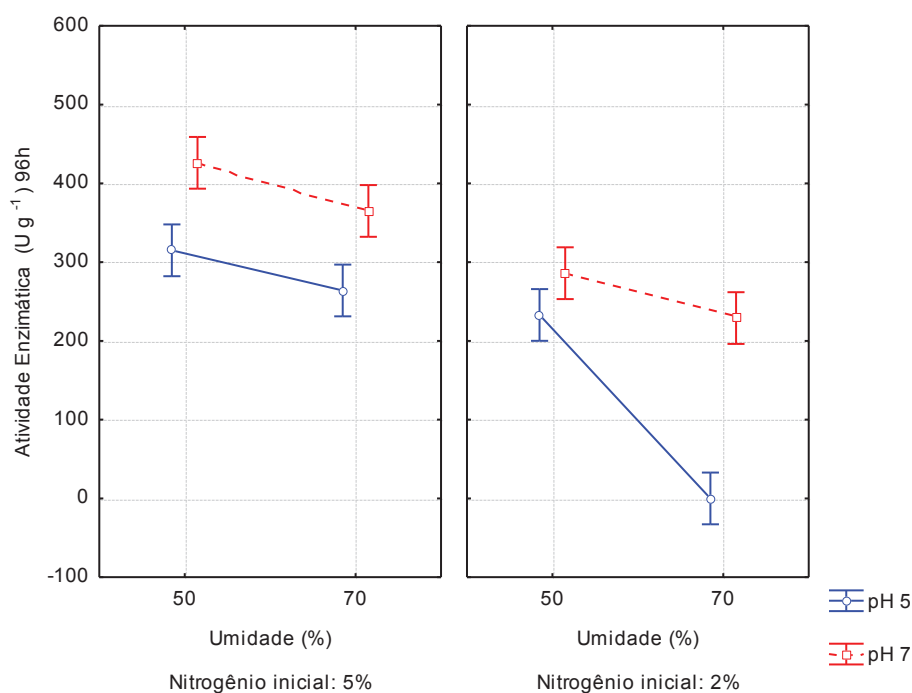
A interação entre as três variáveis também é significativa no tempo de 96 horas e quanto maior pH (7), menor umidade (50%) e menor concentração de nitrogênio (0,5%), maior é atividade da enzima, conforme observado na tabela (Tabela 15) de efeitos das variáveis e gráfico da interação dos efeitos (Figura 18).

**Tabela 15 - Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup> sobre atividade proteásica em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

Variáveis	Efeitos	Erro padrão	t(3)	p-valor
Mean/Interc.	272,01	4,62	58,92	0,000000
(1)pH	123,53	10,83	11,41	0,000000
(2)Umidade (%)	-100,53	10,83	-9,28	0,000000
(3)[Nit](%)	-155,53	10,83	-14,36	0,000000
1 by 2	41,47	10,83	3,83	0,001836
1 by 3	17,48	10,83	1,61	0,128828
2 by 3	-44,48	10,83	-4,11	0,001066
1*2*3	46,53	10,83	4,30	0,000738

R-sqr=,97139; Adj:,95708

**Figura 18 - Atividade proteásica em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 96 h de fermentação em estado sólido com o *A. niger***



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

#### 4.3.2 Proteínas Solúveis em meio ácido

A protease produzida pelo *A. niger* durante a FES levou à decomposição de proteínas complexas em formas mais simples e solúveis (Tabela 16). Os hidrolisados de farelo e casca de soja fermentados apresentaram aumento da proteína solúvel em TCA durante a fermentação, o que reflete a hidrólise da proteína de soja durante o processo. Na fermentação as proteínas são degradadas em peptídeos por endoproteases, que então são degradados em aminoácidos livres por exoprotease (LIU et al., 2017).

Tabela 16 - Concentração de proteínas solúveis ( $\mu\text{g/mL}$ ) produzidas durante a FES por *A. niger*

Ensaio	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
E1	1926,49 $\pm$ 6,03	2511,26	3685,07 $\pm$ 78,47 <sup>c</sup>	3249,7 $\pm$ 6,03 <sup>cd</sup>	3898,49 $\pm$ 6,03 <sup>b</sup>
E2	1559,41 $\pm$ 18,11	2455,77 $\pm$ 6,03	4154,6 $\pm$ 30,18 <sup>a</sup>	3723,49 <sup>b</sup>	4090,57 <sup>a</sup>
E3	1320,38 $\pm$ 18,11	2216,74 $\pm$ 6,03	2515,53 $\pm$ 18,11 <sup>g</sup>	2489,92 $\pm$ 6,03 <sup>f</sup>	2191,13 $\pm$ 6,03 <sup>i</sup>
E4	1102,69 $\pm$ 72,43	2156,99 $\pm$ 30,18	2643,58 $\pm$ 6,04 <sup>g</sup>	2331,99 $\pm$ 60,36 <sup>f</sup>	1666,12 $\pm$ 60,36 <sup>l</sup>
E5	1495,38 $\pm$ 60,36	2067,35 $\pm$ 36,22	3023,47 $\pm$ 24,15 <sup>c</sup>	2763,1 $\pm$ 6,03 <sup>c</sup>	3642,39 $\pm$ 30,18 <sup>c</sup>
E6	1696 $\pm$ 6,04	2293,57 $\pm$ 6,04	3313,72 $\pm$ 12,07 <sup>d</sup>	3975,32 $\pm$ 6,03 <sup>a</sup>	2711,88 $\pm$ 18,11 <sup>g</sup>
E7	1410,02 $\pm$ 12,07	1999,05 $\pm$ 60,36	2865,54 $\pm$ 54,33 <sup>f</sup>	2831,39 $\pm$ 12,76 <sup>c</sup>	2370,41 $\pm$ 30,18 <sup>h</sup>
E8	1277,7 $\pm$ 42,26	1981,98	3219,82 $\pm$ 24,15 <sup>d</sup>	3177,13 <sup>d</sup>	2707,61 $\pm$ 60,36 <sup>g</sup>
E9	1589,29	2972,25	3945,45 $\pm$ 12,07 <sup>b</sup>	3207,01 $\pm$ 18,11 <sup>d</sup>	3441,77 $\pm$ 72,44 <sup>d</sup>
E10	1529,53 $\pm$ 12,07	2831,39 $\pm$ 42,25	3843 $\pm$ 60,36 <sup>b</sup>	3403,36 $\pm$ 6,04 <sup>c</sup>	3044,81 $\pm$ 6,04 <sup>f</sup>
E11	1529,53 $\pm$ 48,29	2566,75 $\pm$ 30,18	3633 $\pm$ 6,03 <sup>c</sup>	3219,82 $\pm$ 12,07 <sup>d</sup>	3228,35 <sup>c</sup>

Valores médios  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. E1: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E2: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E3: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 0,5%; E4: pH7, Umidade 70, Nitrogênio 0,5%; E5: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E6: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E7: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E8: pH7, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E9, E10 e E11: pH6, Umidade 60%, Nitrogênio 1,25%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Os melhores resultados foram observados em 48 h e 96 horas de fermentação. Em alguns ensaios, houve uma redução na quantidade de proteínas solúveis no tempo de 72 h. Há a hipótese de que o fungo utilizou aminoácidos e pequenos peptídeos como forma de nutrição e posteriormente, pela ação da atividade enzimática, pequenos peptídeos foram novamente formados.

O melhor ensaio em 48 e 96 horas foi o E2 (pH 7, umidade de 50 % e 0,5 % de nitrogênio), o mesmo ensaio no qual observou-se as maiores atividades proteásicas. Em 48 horas o aumento foi de 166,49% e em 96 horas de 162,32%, quando comparados aos valores encontrados antes da fermentação. No tempo de 72h o ensaio com melhor desempenho foi o E6, com um acréscimo de 134,39% e diferencia do E2 apenas na quantidade de nitrogênio (2%). Com isso, sugere-se que a baixa umidade e pH mais neutro mostraram-se como características propícias para a hidrólise das proteínas. Fato que deve ser comprovado com o estudo dos efeitos das variáveis.

Muitos estudos relatam o aumento da concentração de proteínas solúveis durante o processo de fermentação em estado sólido da soja. Chi e Cho (2016) verificaram o aumento

significativo de proteína solúvel do farelo de soja por *B. amyloliquefaciens* U304, sugerindo que esta cepa melhora a propriedade hidrofílica do composto através do processo de hidrólise. Rai et al. (2017) realizaram uma FES da soja, utilizando diferentes linhagens de *B. subtilis* para a produção de compostos antioxidantes. Os hidrolisados de soja fermentados apresentaram alta proteína solúvel em TCA durante a fermentação, o que reflete a hidrólise da proteína de soja durante a fermentação. A hidrólise também resultou em aumento da atividade de eliminação do radical DPPH (atividade antioxidante).

Ao observar o comportamento das três variáveis apresentadas durante 96 horas de fermentação, verificou-se que o pH e a umidade influenciam na formação das proteínas solúveis, bem como a interação entre umidade e concentração de nitrogênio. Igualmente na atividade da protease, a interação entre umidade, concentração de nitrogênio e pH foi significativa, conforme Tabela ANOVA (Tabela 17) e Tabela de efeito das variáveis (Tabela 18) ( $p < 0,05$ ).

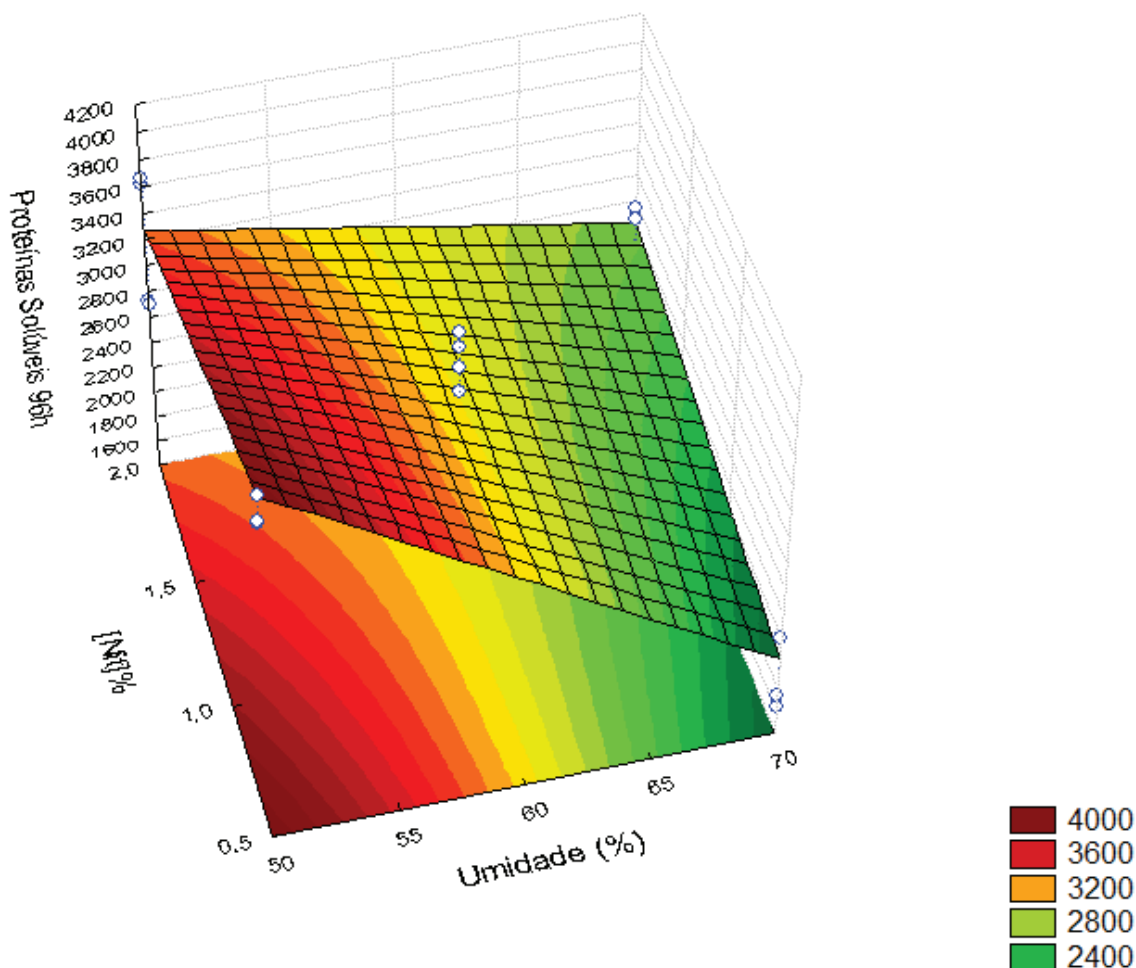
**Tabela 17 - Análise de variância de proteínas solúveis em meio ácido em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p - valor
(1)pH	214480	1	214480	4,6661	0,048592
(2) Umidade (%)	7311778	1	7311778	159,0708	0,000000
(3) [Nit]%	42855	1	42855	0,9323	0,350642
1 by 2	75708	1	75708	1,6490	0,219937
1 by 3	16949	1	16949	0,3687	0,553413
2 by 3	2038556	1	2038556	44,3496	0,000011
1*2*3	984868	1	984868	21,4262	0,000390
Error	643568	14	45966		
Total SS	11328804	21			

R-sqr=,9432; Adj; 91479

A superfície de resposta de interação entre umidade e concentração de nitrogênio, nos mostra que quanto menor a umidade e a concentração de nitrogênio, utilizada no experimento, maior é a formação de proteínas solúveis em meio ácido, ocorrendo maior hidrólise de peptídeos (Figura 19).

Figura 19 - Superfície de Resposta (% concentração de nitrogênio por % Umidade) da proteínas solúveis em meio ácido, em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger*.



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

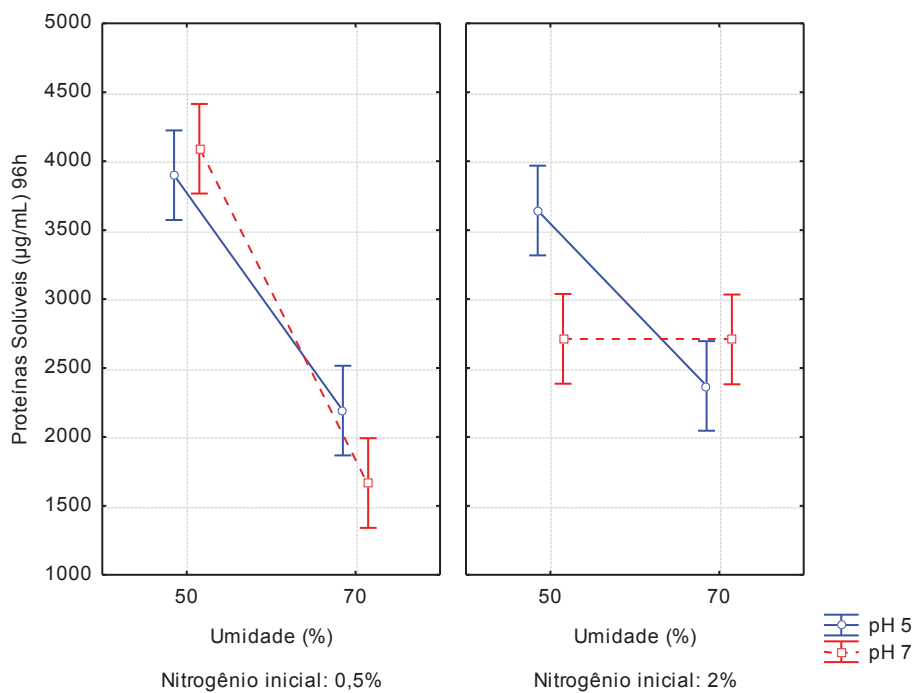
A tabela de efeitos das variáveis (Tabela 18) mostra que quanto menor o pH há a maior concentração de proteínas solúveis. Entretanto, quando observa-se o gráfico de interações das três variáveis, na menor concentração de nitrogênio (0,5%), maior pH (7) e menor umidade (50%), obtêm-se maiores concentrações de proteínas solúveis final (Figura 20). Sugere-se que as mesmas condições que favorecem a atividade proteásica, permitem uma maior hidrólise e, conseqüentemente, a formação de pequenos peptídeos, quando em menores concentrações de nitrogênio inicial.

**Tabela 18 - Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup> sobre proteínas solúveis em meio ácido em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

Variáveis	Efeitos	Erro padrão	t(3)	p-valor
Mean/Interc.	2999,41	45,71	65,62	0,000000
(1)pH	-231,56	107,20	-2,16	0,048592
(2)Umidade (%)	-1352,02	107,20	-12,61	0,000000
(3)[Nit](%)	-103,51	107,20	-0,97	0,350642
1 by 2	137,66	107,20	1,28	0,219937
1 by 3	-65,10	107,20	-0,61	0,553413
2 by 3	713,89	107,20	6,66	0,000011
1*2*3	496,20	107,20	4,63	0,000390

R-sqr=,9432; Adj:,91479

**Figura 20 – Concentração de proteínas solúveis (µg/mL) em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 96 h de Fermentação em estado sólido com o *A. niger***



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Há uma diferença de quantidade de proteínas solúveis entre as Etapas I e II, pois na primeira etapa foram utilizados meios com substratos em proporções diferentes, com diferentes níveis de proteína inicial, umidade, pH e nitrogênio inicial. Possivelmente ainda houve a falta de uma homogeneização adequada ao longo do experimento, devido à adaptação ao método.



### 4.3.3 Atividade Antioxidante

Durante a fermentação, a atividade proteolítica fúngica leva a liberação de peptídeos que podem exercer a função de eliminação de radicais livres de compostos, alimentos ou do organismo, conhecida como atividade antioxidante.

Através do método ABTS<sup>+</sup>, utilizando a curva analítica de Trolox padrão, foi possível obter os resultados de atividade antioxidante que são expressos em Equivalente Trolox mg/mL de amostra, conforme a Tabela 19.

**Tabela 19 - Atividade antioxidante em Equivalente Trolox (mg/mL) por ABTS em fermentação em estado sólido por *A. niger***

Ensaio	0h	24h	48h	72h	96h
E1	886,29±26,65 <sup>D</sup>	949,11±17,77 <sup>D</sup>	1692,97±33,32 <sup>cb</sup>	1589,28±6,66 <sup>cdC</sup>	2607,03±6,66 <sup>bcA</sup>
E2	806,19±19,99 <sup>E</sup>	1201,97±33,31 <sup>D</sup>	1952,11±39,98 <sup>abC</sup>	2178,26±53,31 <sup>bb</sup>	2875,6±13,33 <sup>abA</sup>
E3	672,69±48,86	949,11±35,54	1259,49±33,31 <sup>d</sup>	1221,8±33,32 <sup>f</sup>	1768,35±33,32 <sup>f</sup>
E4	851,53±26,65	1203,54±17,77	1377,29±53,31 <sup>d</sup>	1410,27±19,99 <sup>e</sup>	2263,08±26,65 <sup>de</sup>
E5	933,4±26,65	1302,48±46,64	1787,2±59,97 <sup>bc</sup>	1678,83±39,98 <sup>c</sup>	2738,95±86,62 <sup>abc</sup>
E6	1134,46±48,86 <sup>E</sup>	1299,34±2,22 <sup>D</sup>	2013,36±19,99 <sup>aC</sup>	2371,44±6,66 <sup>aB</sup>	2988,67±93,29 <sup>aA</sup>
E7	660,13±17,76	1018,21±4,44	1047,47±79,96 <sup>e</sup>	1207,67±66,63 <sup>f</sup>	1895,57±66,63 <sup>f</sup>
E8	919,27±19,98	1190,97±22,21	1410,27±46,64 <sup>d</sup>	1462,1±66,63 <sup>de</sup>	2215,96±39,98 <sup>e</sup>
E9	1082,6±11,11	1381±11,11	1711,81±59,97 <sup>c</sup>	1537,48±13,33 <sup>cdC</sup>	2541,06±15,32 <sup>cd</sup>
E10	1076,32±33,31	1376,29±4,44	1716,52±66,63 <sup>c</sup>	1561,04±59,97 <sup>cdC</sup>	2483,47±13,32 <sup>c</sup>
E11	1136±2,22	1376,16±31,1	1711,81±46,64 <sup>c</sup>	1565,75±26,65 <sup>cdC</sup>	2771,93±10,66 <sup>abc</sup>

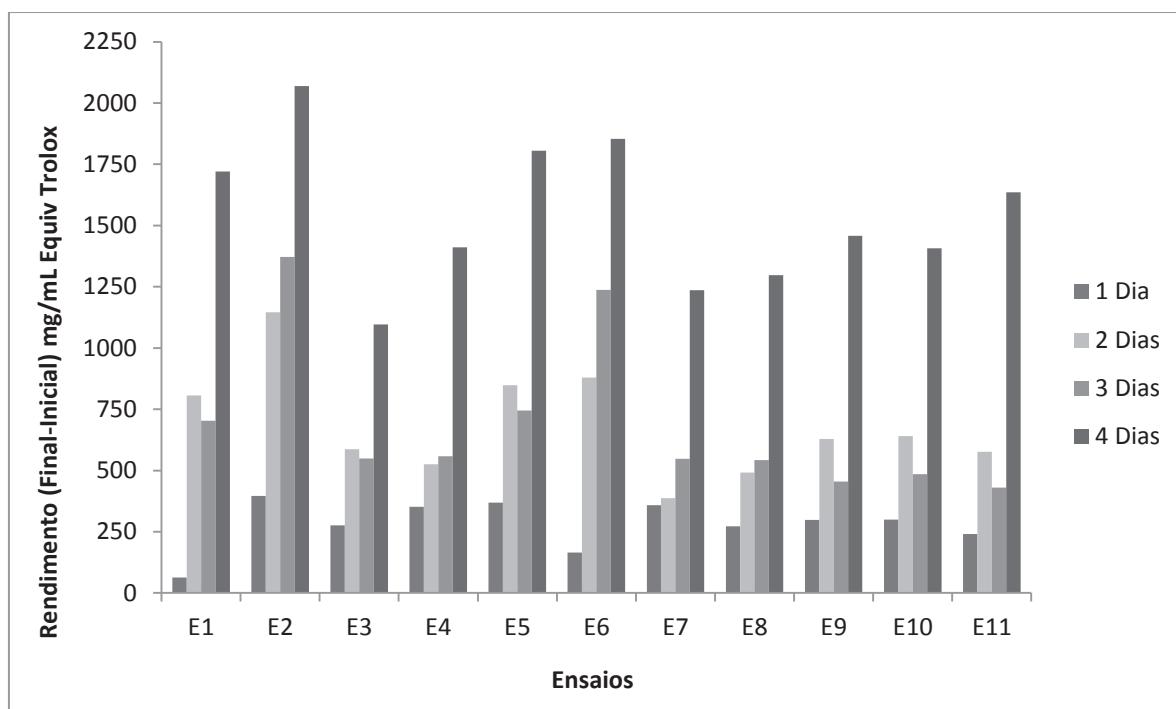
Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, numa mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. E1: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E2: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E3: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 0,5%; E4: pH7, Umidade 70, Nitrogênio 0,5%; E5: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E6: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E7: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E8: pH7, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E9, E10 e E11: pH6, Umidade 60%, Nitrogênio 1,25%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

De acordo com os resultados encontrados no estudo, os fermentados exibiram diferentes atividades antioxidantes e o melhor potencial foi encontrado em 96 h de fermentação, revelando que o processo aumentou a concentração de compostos antioxidantes ao longo do tempo (Tabela 19). Os ensaios que apresentaram melhor desempenho foram E2, E5 e E6 que possuem em comum a baixa umidade do meio. Entretanto quando se analisa o rendimento da atividade antioxidante, do tempo analisado subtraída da atividade antioxidante

do tempo inicial, verificou-se que o ensaio E2 (pH 7, umidade de 50% e 0,5% de nitrogênio), apresentou melhor comportamento, com um aumento de 256, 69%. Estas mesmas condições também foram consideradas as ideais ao analisar a atividade proteásica e formação de proteínas solúveis, correlacionando a hidrólise enzimática à formação de peptídeos antioxidante. É importante ressaltar que a soja já possui potencial antioxidante em sua forma natural e o processo de fermentação melhora esta propriedade do composto.

Ao analisar o rendimento, ou seja, quanto foi produzido até cada dia, reduzindo o valor final pelo inicial, observa-se pela Figura 21 que a fermentação até 96 horas foi a que obteve maior rendimento da atividade antioxidante.

**Figura 21 - Rendimento da Atividade Antioxidante, em Equivalente Trolox mg/mL (final - inicial), por ABTS em fermentação em estado sólido por *A. niger***



E1: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E2: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E3: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 0,5%; E4: pH7, Umidade 70, Nitrogênio 0,5%; E5: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E6: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E7: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E8: pH7, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E9, E10 e E11: pH6, Umidade 60%, Nitrogênio 1,25%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Ao analisar o percentual de inibição de radicais livres, preferivelmente denominados de espécies reativas do metabolismo do oxigênio, as mesmas condições apresentaram as melhores atividades antioxidantes (Tabela 20). Pode-se observar que da mesma forma que as proteínas solúveis, os resultados do potencial de inibição foi maior na Etapa II. Além de

possuir um meio com maior teor de proteína inicial houve melhor homogeneização do meio e consequentemente melhor aeração e difusão de gases.

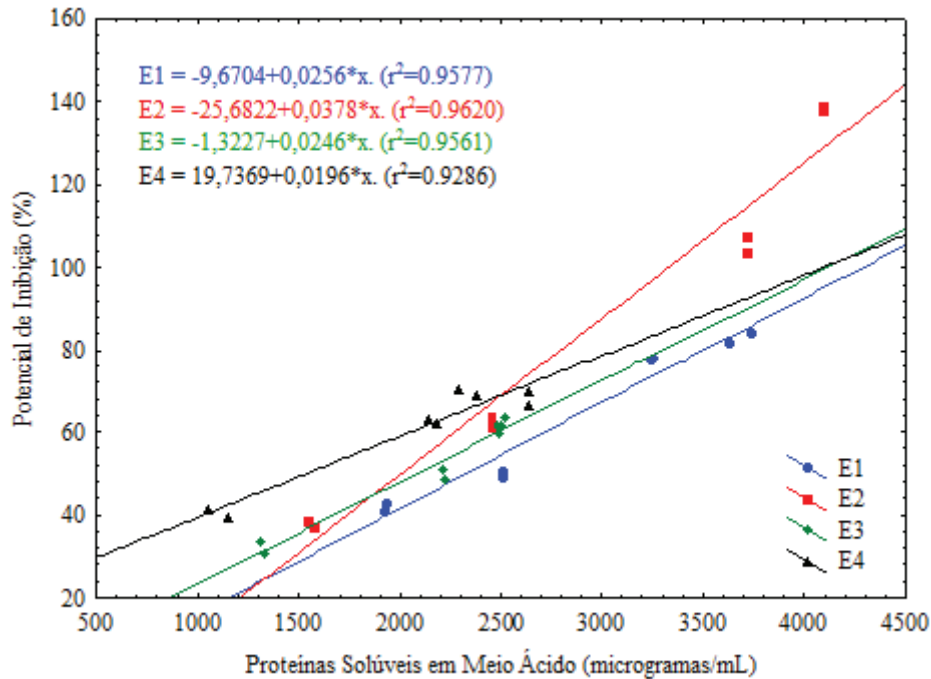
**Tabela 20 - Inibição de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (%) por ABTS em fermentação em estado sólido por *A. niger***

Ensaio	0h	24h	48h	72h	96h
E1	41,85±1,22	49,6±0,91	82,96±1,56 <sup>c</sup>	77,87±0,31 <sup>cd</sup>	125,89±0,31 <sup>bc</sup>
E2	37,52±0,9	62,48±1,7	95,13±1,88 <sup>ab</sup>	105,44±2,5 <sup>b</sup>	138,50,63 <sup>ab</sup>
E3	32,03±2,24	49,6±1,81	62,83±1,56 <sup>d</sup>	60,66±1,56 <sup>f</sup>	86,5±1,56 <sup>f</sup>
E4	40,26±1,22	62,56±0,91	68,14±2,5 <sup>d</sup>	69,49±0,94 <sup>c</sup>	109,73±1,25 <sup>dc</sup>
E5	44,01±1,22	67,6±2,38	87,39±2,82 <sup>bc</sup>	82,06±1,87 <sup>c</sup>	132,08±4,07 <sup>abc</sup>
E6	53,25±2,24	67,44±0,11	98,74±0,95 <sup>a</sup>	114,49±0,31 <sup>a</sup>	143,81±4,38 <sup>a</sup>
E7	31,46±0,82	53,12±0,23	52,65±3,75 <sup>e</sup>	60±3,12 <sup>f</sup>	92,48±3,13 <sup>f</sup>
E8	43,36±0,92	61,92±1,13	69,69±2,19 <sup>d</sup>	71,91±3,12 <sup>dc</sup>	107,52±1,88 <sup>e</sup>
E9	50,87±0,51	71,6±0,57	83,24±2,8 <sup>c</sup>	75,44±0,62 <sup>cde</sup>	122,79±7,17 <sup>cd</sup>
E10	50,58±1,53	71,36±0,23	83,45±3,11 <sup>c</sup>	76,54±2,81 <sup>cde</sup>	124,41±0,62 <sup>c</sup>
E11	53,32±0,1	71,2±1,58	83,24±2,17 <sup>c</sup>	76,76±1,25 <sup>cde</sup>	133,24±4,99 <sup>abc</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, numa mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. E1: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E2: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E3: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 0,5%; E4: pH7, Umidade 70, Nitrogênio 0,5%; E5: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E6: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E7: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E8: pH7, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E9, E10 e E11: pH6, Umidade 60%, Nitrogênio 1,25%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

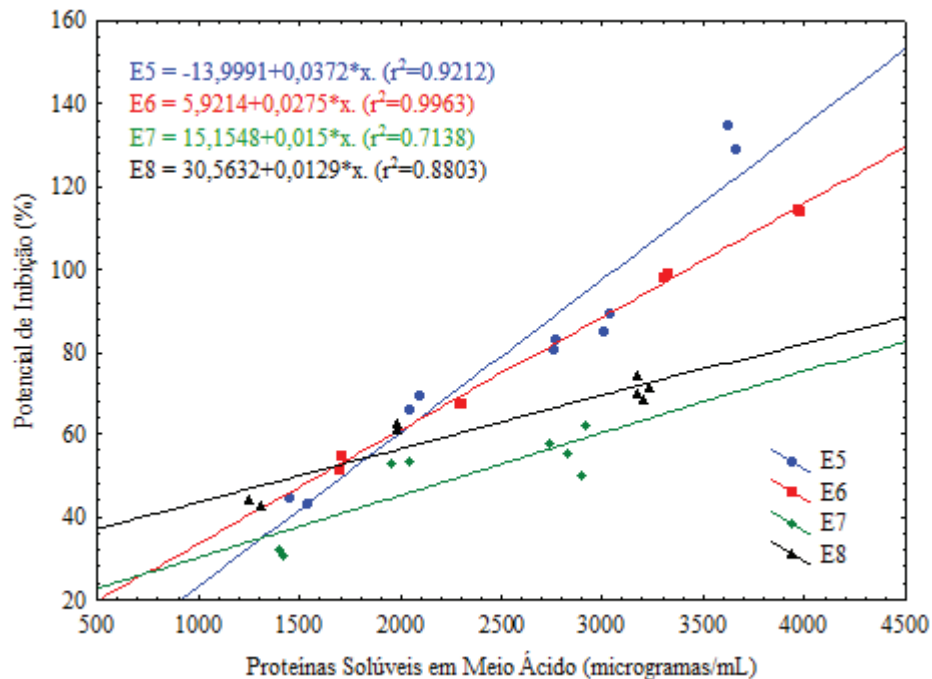
Verificando-se a correlação entre aumento da concentração de proteínas solúveis em meio ácido e potencial antioxidante dos ensaios, tem-se uma correlação significativa, alta e positiva para a maioria dos ensaios, conforme Figuras 22 a 24. Esta relação, entre proteínas solúveis e percentual de inibição da oxidação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio, demonstra que o aumento de peptídeos menores levou ao acréscimo da atividade antioxidante, comprovando a produção de biopeptídeos antioxidantes ao longo da fermentação.

**Figura 22 - Correlação entre concentração de proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g/mL}$ ) e potencial de inibição da oxidação de radicais livres (%) dos meios fermentados (Ensaio 1 a 4).**



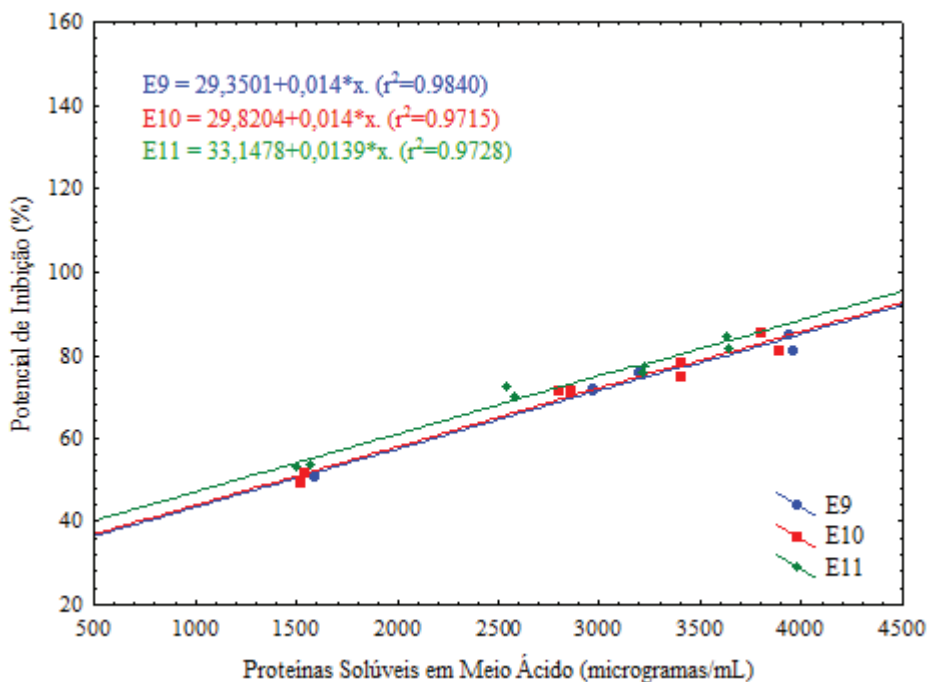
E1: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E2: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E3: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 0,5%; E4: pH7, Umidade 70, Nitrogênio 0,5%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

**Figura 23 - Correlação entre concentração de proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g/mL}$ ) e potencial de inibição da oxidação de radicais livres (%) dos meios fermentados (Ensaio 5 a 8).**



E5: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E6: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E7: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E8: pH7, Umidade 70%, Nitrogênio 2%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Figura 24 - Correlação entre concentração de proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g/mL}$ ) e potencial de inibição da oxidação de radicais livres (%) dos meios fermentados (Ensaio 9 a 10).



E9, E10 e E11: pH6, Umidade 60%, Nitrogênio 1,25%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Chi e Cho (2016) verificaram na fermentação de farelo de soja que *B. amyloliquefaciens* U304 exerceu melhor atividade antioxidante em relação a remoção do ABTS+ quando comparado ao substrato não fermentado e a outros microrganismos estudados. Os fermentados por *L. acidophilus* e *L. plantarum* apresentaram menor atividade que o não fermentado e *S. cerevisiae* mostrou atividade semelhante, fatos que mostram que a força da protease secretada pelo microrganismo pode afetar a bioatividade e as propriedades físico-químicas do fermentado.

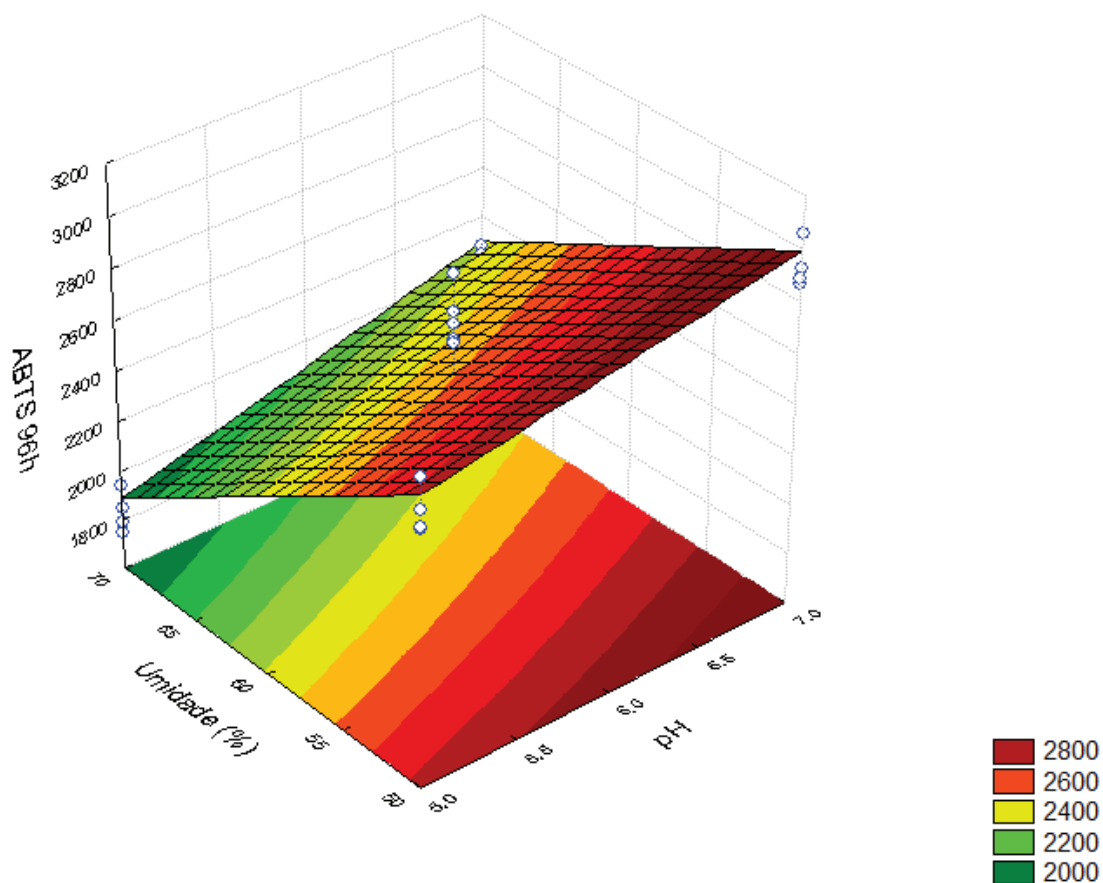
Ao avaliar o comportamento da interação das variáveis estudadas (umidade, pH e concentração de nitrogênio inicial), por ANOVA (Tabela 21) e Tabela de efeitos estimados das variáveis (Tabela 22) ( $p < 0,05$ ), no ensaio de atividade antioxidante, foi observado que os parâmetros que exercem influência na atividade antioxidante em 96 horas de fermentação foram pH e umidade. Conforme superfícies de resposta, quanto menor a umidade e maior o pH, dos valores estudados, maior é a atividade antioxidante (Figura 25). Ao construir o gráfico de efeitos, considerando apenas os coeficientes significativos das variáveis independentes, há esta mesma confirmação (Figura 26).

**Tabela 21 - Análise de variância sobre atividade antioxidante em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
(1)pH	444489	1	444489	19,5864	0,000576
(2) Umidade (%)	2352067	1	2352067	103,6437	0,000000
(3) [Nit]%	26423	1	26423	1,1643	0,298814
1 by 2	22028	1	22028	0,9707	0,341231
1 by 3	9329	1	9329	0,4111	0,531785
2 by 3	6798	1	6798	0,2996	0,592781
1*2*3	6044	1	6044	0,2663	0,613851
Error	317713	14	22694		
Total SS	3184891	21			

R-sqr=,90024; Adj; 85037

**Figura 25 - Superfície de Resposta (pH e % Umidade) da atividade antioxidante, em equivalente Trolox (mg/mL), em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger*.**



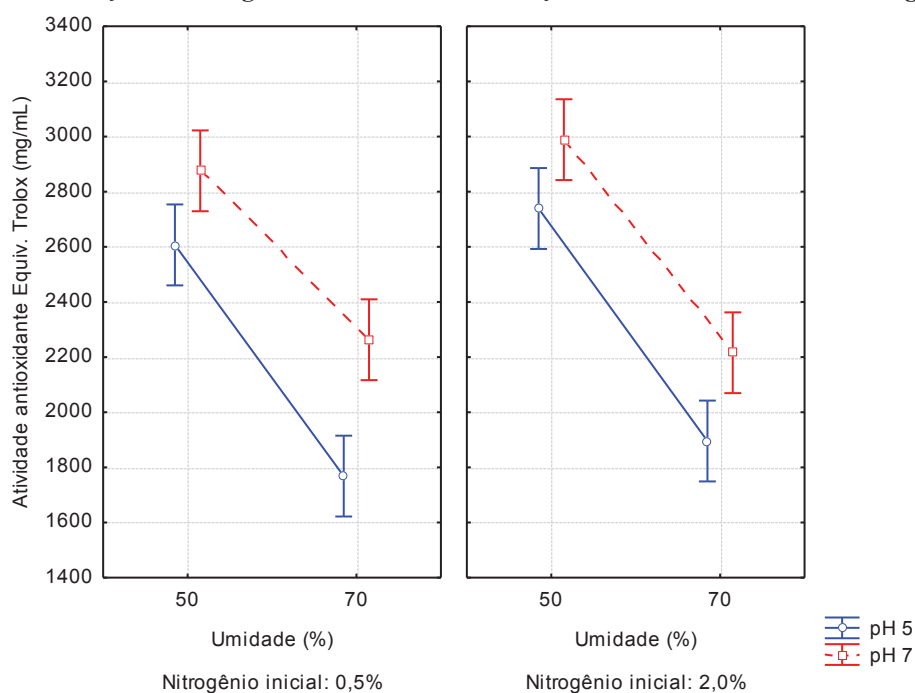
Fonte: elaborado pelo autor (2020).

**Tabela 22 - Efeitos estimados das variáveis do Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup> sobre atividade antioxidante em 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

Variáveis	Efeitos	Erro padrão	t(3)	p-valor
Mean/Interc.	2477,24	32,12	77,13	0,000000
(1)pH	333,35	75,32	4,43	0,000576
(2)Umidade (%)	-766,82	75,32	-10,18	0,000000
(3)[Nit](%)	81,28	75,32	1,08	0,298814
1 by 2	74,21	75,32	0,99	0,341231
1 by 3	-48,29	75,32	-0,64	0,531785
2 by 3	-41,23	75,32	-0,55	0,592781
1*2*3	-38,87	75,32	-0,52	0,613851

R-sqr=,90024; Adj:,85037

**Figura 26 - Atividade antioxidante em equivalente Trolox (mg/mL) em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 96 h de fermentação em estado sólido com o *A. niger***



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

#### 4.3.4 Considerações finais da etapa II

A segunda etapa do experimento estudou a interação entre as variáveis pH (5, 6 e 7), umidade (50%, 60% e 70%) e concentração inicial de nitrogênio inorgânico (0,5 %, 1,25 % e 2%), utilizando farelo de soja e casca de soja, na proporção 70:30, como substrato na FES por *A. niger*.

Após análises de atividade proteásica, proteínas solúveis em meio ácido e atividade antioxidante, foi observado que a menor umidade (50%) e a menor concentração de

nitrogênio (0,5%) mostraram-se favoráveis para as três análises realizadas. Nestas condições de menor umidade e concentração de nitrogênio, o maior pH (7), mostrou-se favorável. Em vista disso, estudou-se na terceira etapa o pH (6, 7 e 8), juntamente com o aumento de escala, passando de 40 para 80 gramas de substrato, com o objetivo de observar se afetaria a produção dos metabólitos estudados.

### 4.3 ETAPA III

Na terceira etapa, utilizou-se o meio conforme resultados encontrados no Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup> realizado na etapa II, na qual fixou-se os parâmetros umidade (50%) e concentração de nitrogênio (0,5%). Esta etapa teve como objetivo o estudo do aumento de escala, utilizando-se a quantidade dobrada de meio (80 g) e variação de pH (6, 7 e 8).

#### 4.3.1 Atividade Proteásica

Ao estudar o pH nesta etapa do processo, foi observado que esta variável não influenciou a atividade proteásica durante a fermentação e em todos os ensaios obteve-se uma boa atividade proteásica e estatisticamente semelhantes (Tabela 23).

**Tabela 23 - Atividade proteásica em 0 e 96 h (U g<sup>-1</sup>) de fermentação em estado sólido por *A. niger***

ENSAIO	0h(UAE/g)	96h (UAE/g)
pH6	0	467,5±10,6 <sup>a</sup>
pH7	0	479±18,4 <sup>a</sup>
pH8	0	433±18,4 <sup>a</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Na etapa 2 deste experimento, observamos que em 96 horas de fermentação, o ensaio 2, composto por 50% de umidade, concentração de nitrogênio de 0,5% e pH 7, obteve como resultado 426 U g<sup>-1</sup> de atividade proteásica, resultado ligeiramente menor que o observado nesta etapa (479 U g<sup>-1</sup>), quando utilizadas as mesmas condições, entretanto, com maior quantidade de substrato. Observa-se, neste caso, um efeito positivo no aumento de escala do meio.



Ao compararmos ainda o ensaio 1, da etapa 2, composto por pH 5, 50% umidade e 0,5% de concentração de nitrogênio, com 315 U g<sup>-1</sup> de atividade proteásica, verifica-se que o maior pH (6, 7 e 8) e maior quantidade de substrato obtiveram uma maior atividade enzimática no mesmo tempo de fermentação.

#### 4.3.2 Proteínas Solúveis

Na Tabela 24 pode-se verificar que a fermentação em 96 horas resultou em concentrações de proteínas solúveis diferentes entre os ensaios, revelando o pH 7 com maior quantidade de proteínas solúveis. Entretanto, ao observar a quantidade de proteína solúvel inicial, todos os ensaios obtiveram o mesmo rendimento e, portanto, são estatisticamente semelhantes, fato que pode ser explicado pela atividade proteásica verificada anteriormente.

**Tabela 24 - Concentração de proteínas solúveis (µg/mL) e Rendimento (final - inicial) na fermentação em estado sólido por *A. niger***

ENSAIO	0h	96h	Rendimento
pH6	1064,28±30,2 <sup>c</sup>	2865,54±66,4 <sup>b</sup>	1801,26±36,2 <sup>a</sup>
pH7	1320,38±18,1 <sup>a</sup>	3138,72±18,1 <sup>a</sup>	1818,34 <sup>a</sup>
pH8	1205,13±12,1 <sup>b</sup>	3014,93 <sup>ab</sup>	1809,8±12,1 <sup>a</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Ao compararmos estes resultados com os ensaios 1 (pH5, umidade 50% e 0,5% nitrogênio) e 2 (pH7, 50% umidade e 0,5% nitrogênio) da segunda etapa deste experimento, com 3898,49 µg/mL e 4090,57 µg/mL, respectivamente, observamos uma menor formação de proteínas solúveis, com 96 horas de fermentação. Este resultado, revela que uma maior atividade proteásica, não necessariamente, nos leva a maior hidrólise e formação de menores peptídeos. Um fator que pode influenciar na atuação das enzimas sobre as proteínas é a aeração que foi menor nesta etapa do processo, o que levou a uma aglomeração do meio, aumento de temperatura e menor hidrólise enzimática.

A temperatura é um fator crítico e o acúmulo do calor metabólico gerado, juntamente com a baixa condutividade térmica de diversos substratos, pode gerar diferentes gradientes de temperatura no biorreator. Além da temperatura, a aeração é importante para transferência de gases com a eliminação de dióxido de carbono. Há diversas formas de obter uma aeração no meio: uso de substrato poroso medianamente granuloso ou fibroso, pequena espessura de

cama de substrato, utilização de reatores de bandejas perfuradas, agitação do substrato ou ainda introdução de ar forçado estéril dentro do reator (LONSANE et al., 1985).

Entretanto, no início do processo, a quantidade de proteínas solúveis no meio era inferior ao encontrado na etapa 2, fato que pode ser explicado pela diferença na amostra inicial, no momento da produção do meio ou pelo maior ou menor tempo de autoclavagem do meio que expõe as frações hidrofóbicas das proteínas, reduzindo a solubilidade inicial.

### 4.3.3 Atividade Antioxidante

A análise da atividade antioxidante pelo método ABTS demonstrou que quanto maior o pH, melhor a atividade antioxidante e melhor o potencial de inibição do radical livre. (Tabela 25), sendo os ensaios com pH 7 e 8 iguais. Mesmo resultado foi confirmando pela análise do rendimento, quando leva-se em consideração o valor final e inicial, conforme Figura 27.

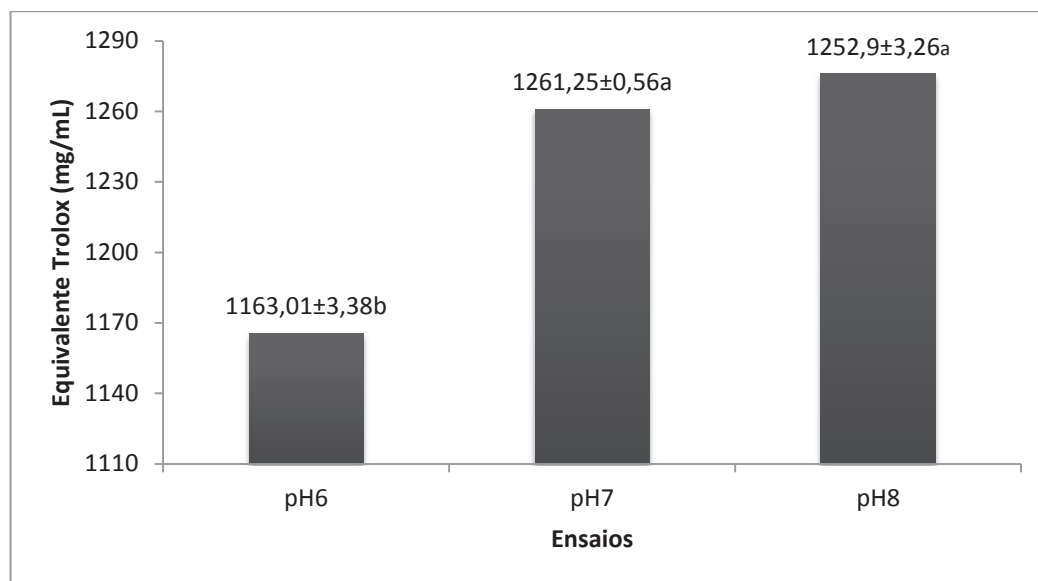
**Tabela 25 - Atividade antioxidante em Equiv. Trolox (mg/mL) e potencial de inibição (%) por ABTS em 0 e 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

ENSAIO	E. Trolox 0h	E. Trolox 96h	Pot. Inibição 0h	Pot. Inibição 96
pH6	332,11 <sup>c</sup>	1495,12±3,4 <sup>b</sup>	31,31 <sup>c</sup>	142,73±0,3 <sup>b</sup>
pH7	417,63±2,8 <sup>b</sup>	1678,88±3,4 <sup>a</sup>	39,34±0,3 <sup>b</sup>	159,97±0,3 <sup>a</sup>
pH8	461,78±2,3 <sup>a</sup>	1714,68±3,4 <sup>a</sup>	43,47±0,2 <sup>a</sup>	163,33±2,8 <sup>a</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Na etapa 2 deste experimento, os ensaios 1 (50% umidade, pH5 e 0,5% nitrogênio) e 2 (pH7, 50% umidade e 0,5% de nitrogênio) obtiverem maior atividade antioxidante, em equivalente Trolox (mg/mL), com 96 horas de fermentação, com valores de 2.607,03 mg/mL e 2.875,6 mg/mL, respectivamente. Entretanto, no início do processo, o meio também obteve maior atividade antioxidante, nesta segunda etapa. Sendo assim, ao analisarmos o potencial de inibição da oxidação das espécies reativas de oxigênio, que leva em consideração este valor inicial encontrado antes da FES, esta terceira etapa obteve valores semelhantes, ligeiramente maiores. Enquanto o ensaio 2 da segunda etapa demonstrou 138,5% de PI, o ensaio com as mesmas características, nesta terceira etapa, atingiu o valor de 159,97%.

**Figura 27 - Rendimento da Atividade antioxidante (final - inicial) em Equivalente Trolox (mg/mL) por ABTS em fermentação em estado sólido por *A. niger***



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Nesta etapa, foi realizado também o ensaio DPPH que é um dos métodos mais antigos para determinar a atividade antioxidante para se descobrir os doadores de hidrogênio em substâncias naturais.

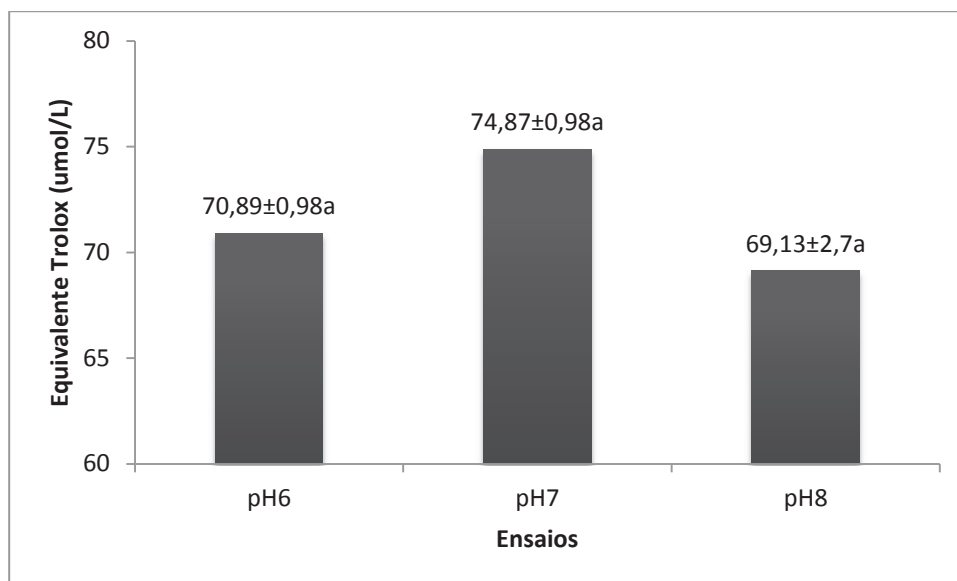
Por este método, no tempo zero, sem fermentação, não detectou ou obteve uma baixa atividade antioxidante, diferentemente do método ABTS. Em 96 horas de fermentação todos os ensaios mostraram-se estatisticamente iguais. Entretanto o potencial de inibição das espécies reativas do metabolismo do oxigênio foi menor que o revelado pelo método ABTS (Tabela 26). Quando avalia-se o valor inicial e final do DPPH, é possível observar que o ensaio com pH 7 possui um rendimento maior que os demais, mas são considerados estatisticamente iguais (Figura 28).

**Tabela 26 - Atividade antioxidante em Equiv. Trolox (umol/L) e potencial de inibição (%) por DPPH em 0 e 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

ENSAIO	Equiv. Trolox 0h	Equiv. Trolox 96h	Pot. Inibição 0h	Pot. Inibição 96 h
pH6	3,71±1,1 <sup>a</sup>	74,60±2,1 <sup>a</sup>	7,14 <sup>a</sup>	44,23 <sup>a</sup>
pH7	0	74,86±1 <sup>a</sup>	0	44,36 <sup>a</sup>
pH8	0	69,13±2,7 <sup>a</sup>	0	41,36 <sup>a</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

**Figura 28 - Rendimento da atividade antioxidante (final – inicial) em Equivalente Trolox (nmol/L) por DPPH em fermentação em estado sólido por *A. niger***



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

#### 4.3.4 Atividade Antimicrobiana

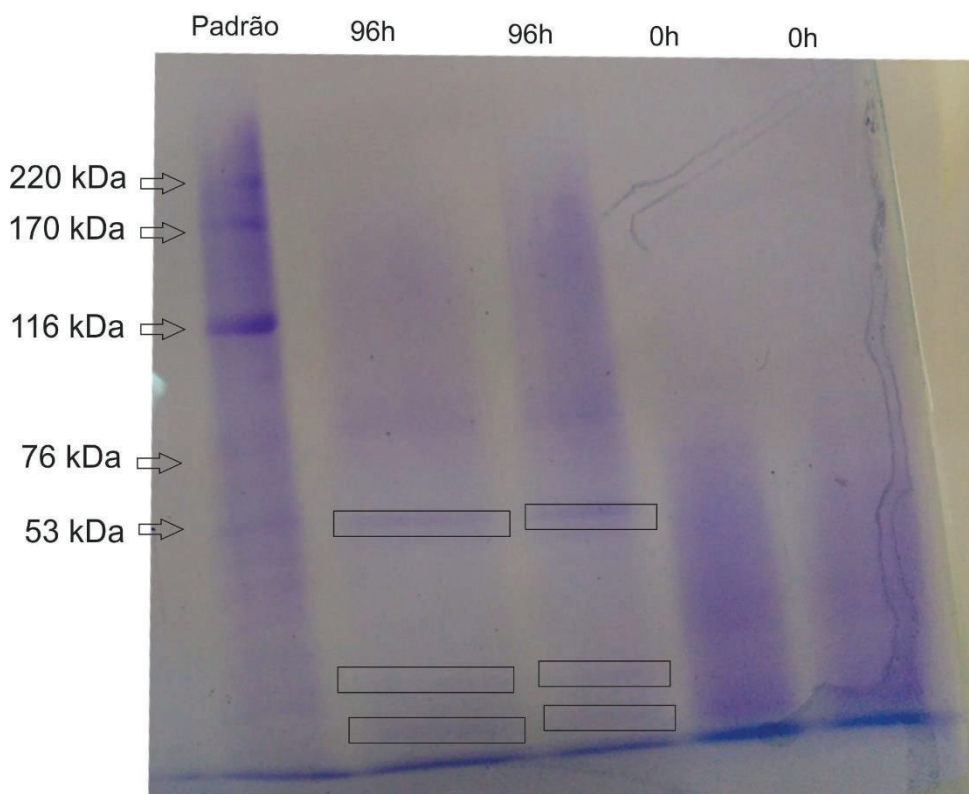
Foram realizados três testes de atividade antimicrobiana: difusão em placas com disco, difusão em placas com poços e por inibição do crescimento (por absorbância) e não houve resultados satisfatórios quanto à atividade antimicrobiana do extrato. Sugerem-se estudos sobre a extração do fermentado de forma estéril, pois a contaminação cruzada pode causar interferências no teste.

#### 4.3.5 Caracterização do peso molecular de proteases e biopeptídeos

A eletroforese em gel foi realizada com padrões com pesos moleculares de 220 a 53kDa (Figura 29). O tempo zero, sem fermentação, não apareceu nenhuma banda. Sugere-se que neste tempo, haviam bandas apenas superiores a 220kDa, visto que a proteína da soja é composta majoritariamente por glicina que possui peso molecular entre 300 a 380 kDa, e  $\beta$ -conglucina com aproximadamente 200 kDa (FUKUSHIMA, 2011). No tempo de 96 horas, mostrou bandas no menor peso molecular, entretanto, como o menor padrão estudado foi o 53 kDa, não conseguiu-se avaliar peptídeos ainda menores (Figura 29). Este tamanho de peptídeos pode estar relacionados a proteases, visto que, proteases aspárticas produzidas por *A. niger* possuíram massa molecular de 50  $\pm$  0,5 kDa (PURUSHOTHAMAN et al., 2019) e

47,5 KDa (YIN; HSU; JIANG, 2013). Além disso, a hidrólise da  $\beta$ -conglucina formam subunidades principalmente compostas por:  $\alpha'$  (72kDa),  $\alpha$  (68 kDa) e  $\beta$  (52 kDa). Enquanto a glicina tem como subunidades prevalentes a ácida com aproximadamente 35 kDa e e a básica com 20 kDa (FUKUSHIMA, 2011).

**Figura 29 – Peso molecular (kDa) de proteases e peptídeos antes (0 h) e depois da fermentação em estado sólido (96 h) por *A. niger*.**



Fonte: elaborado pelo autor (2020)

Entretanto, na eletroforese é ideal demonstrar a hidrólise do fermentado com uma diminuição gradual na intensidade das bandas de maior peso molecular e um aumento nas bandas de menor peso molecular. Assim, as proteínas de grande e médio peso molecular devem ser hidrolisadas em massas moleculares menores através da ação da protease durante a fermentação por *A. niger*. Processo semelhante ao relatado por Xiao et al. (2015), na qual as bandas de proteínas com alto peso molecular, (>60kDa) desapareceram e proteínas de menor tamanho (<30kDa) aumentaram, totalizando 66,87% das proteínas totais do fermentado de grão de bico.

#### 4.3.6 Considerações Finais da Etapa III

O aumento de escala de 40 para 80 gramas de meio, mostrou-se favorável para a produção dos metabólitos estudados (atividade proteásica, proteínas solúveis em meio ácido e atividade antioxidante), com resultados semelhantes aos encontrados nas etapas anteriores. Quanto ao pH, não houve diferença significativa entre os valores encontrados nos pH 7 e 8, e portanto, recomenda-se o uso do pH com maior facilidade de ajuste.

A atividade proteásica da Etapa III mostrou-se similar e ligeiramente maior, à observada na etapa anterior, em 96 horas de fermentação. Já a concentração de proteínas solúveis, revelou-se menor que a etapa 2, mesmo com uma maior atividade enzimática.

Alguns fatores podem influenciar a ação da protease no meio, como pH, tempo, temperatura e quantidade de proteína solúvel na amostra inicial. A falta de aeração do meio, já que só houve a homogeneização em 0, 48 e 96 horas de fermentação, pode ter levado a uma aglomeração, aumento da temperatura e conseqüentemente, uma menor quebra das proteínas, visto que a FES é um processo exotérmico. Ainda há a possibilidade de o fungo ter utilizado os aminoácidos do meio para sua nutrição, reduzindo a quantidade de proteínas solúveis no meio.

Quando observa-se a atividade antioxidante, a etapa II obteve maior atividade antioxidante final, entretanto, também já possuía maior capacidade antes da fermentação, fato que influencia na resposta, visto que o potencial de inibição das espécies reativas ao oxigênio, foi levemente maior na terceira etapa.

Com isso, pode-se notar que cada experimento se comporta de maneira distinta, mesmo quando seu meio é composto pelo mesmo substrato, fungo e mesmas condições de pH, umidade e concentração de nitrogênio. Vários podem ser os fatores que afetam a fermentação, levando a uma variabilidade nas respostas: quantidade de meio a ser utilizado na fermentação; composição do substrato inicial na qual pode variar conforme a coleta da amostra para a produção dos meios; homogeneização do meio para auxiliar o processo de fermentação, aumentando a superfície de contato entre fungo e substrato e ainda melhorando a aeração do meio e reduzindo a temperatura e ainda, a homogeneização do meio para a coleta de amostra de fermentado, com o objetivo de coletar uma maior representatividade do produto final.

## 5 CONCLUSÕES

A fermentação em estado sólido por *A. niger* é um bioprocesso que demonstrou ser viável para a produção simultânea de proteases e biopeptídeos antioxidantes. Além disso, a FES possibilita o uso de diferentes tipos de resíduos agroindustriais e a utilização de uma variedade de microrganismos, resultando em baixo custo, aumento do valor agregado de subprodutos e formação de produtos com características distintas.

Ao analisar o comportamento de diferentes substratos como farelo de soja, casca de soja, farelo de trigo e suas misturas para a FES, verifica-se que a casca de soja, de forma isolada, não é um bom substrato para a fermentação, entretanto, quando combinada com farelo de soja ou farelo de trigo, se mostra um subproduto de elevado potencial, tal qual o farelo de soja isolado, o composto que obteve maior atividade antioxidante.

No estudo das variáveis pH (5, 6 e 7), umidade (50, 60 e 70%) e concentração de nitrogênio inicial (0,5, 1,25 e 2%), utilizando casca de soja e farelo de soja como substratos (70:30), a interação entre as três variáveis mostrou-se significativa para a produção de proteases e biopéptídeos antioxidantes e a melhor condição foi em pH neutro, menor umidade (50%) e menor concentração de nitrogênio final (0,5%), dentro das faixas estudadas. Nesta condição, enquanto a atividade proteásica é maior em 48 horas de fermentação ( $677 \text{ U g}^{-1}$ ), a atividade antioxidante se mostra superior em 96 horas (2.875,6 Equiv. Trolox mg/mL). A alta umidade dificulta a sintetização dos biocompostos, entretanto, o fungo consegue se adaptar as condições do meio para a produção, mesmo que em menor quantidade. Ao estudar o pH (6, 7 e 8), os resultados foram estatisticamente semelhantes aos revelados pelo pH 7. O aumento de escala mostrou-se favorável para a produção de proteases e biopeptídeos antioxidantes, com maior atividade protéásica em 96 horas de FES, quando comparados a etapa e do experimento. Os biopeptídeos estudados não demonstraram ação antimicrobiana.

Poucos ainda são os estudos que tratam da produção simultânea destes compostos, sugerindo-se estudos mais aprofundados quanto a caracterização das proteases e dos biopeptídeos, associadas aos substratos, condições e microrganismos utilizados. Além disso, são importantes mais estudos sobre a adição dos biopeptídeos em alimentos, aplicação em embalagens inteligentes ou substituição de medicamentos sintéticos em busca de uma saúde melhor para a população.





## REFERÊNCIAS

- AFRISHAM, S.; BADOEI-DALFARD, A.; NAMAKI-SHOUSHTARI, A.; KARAMI, Z. Characterization of a thermostable, CaCl<sub>2</sub>-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: production under solid-state fermentation by utilizing agricultural wastes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p 98-106, 2016.
- AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Production of alkaline protease by *Penicillium sp.* under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 977-981, 2004.
- AGYEI, D.; DANQUAH, M. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 272-277, 2011.
- AGYEI, D.; ONGKUNDON, C. M.; WEI C. Y.; CHAN A. S.; DANQUAH, M. K. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p.244-256, 2016.
- AMADOU, I.; LE, G. W.; SHI, Y. H.; GBADAMISI, O. S.; KAMARA, M. T.; JIN, S. Optimized *Lactobacillus plantarum* LP6 solid-state fermentation and proteolytic hydrolysis improve some nutritional attributes of soybean protein meal. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 1686-1694, 2011.
- AOKI, W.; UEDA, M. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. **Pharmaceuticals**. v. 6, p. 1055-1081, 2013.
- ASHAR, M. N.; CHAND, R. Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. **Milchwissenschaft**, v. 59, p. 363-366, 2004.
- AYYASH, M.; JOHNSON, S. K.; LIU, S. Q.; MESMARI, N.; DAHMANI, S.; AL DHAHERI, A. S.; KIZHAKKAYIL, J. In vitro investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using *Lactobacillus* spp. **Food Chemistry**. v. 275, p. 50-58, 2019.
- BAKIR, U.; YAVASCAOGLUB, S.; GUVENCB, F.; ERSAYINB, A. An endo-beta-1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 328-334, 2001.
- BARRIOS-GONZÁLES, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175-185, 2012.
- BASU, B. R.; BANIK, A.; DAS, M. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 449-455, 2008.

BEHERA, S.S.; RAY, R.C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656-669, 2016.

BELLAVER, C. ; SNIZEK, P. N. **Processamento de soja e suas implicações na alimentação de animais e aves**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2009.

BENZIE, I. F.F; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BERTOLIN, T. E.; COSTA, J.A.V.; PASQUALI, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1-20, 2011.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinella (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v.118, p. 559–565, 2010.

BOUGLÉ, D.; BOUHALLAB, S. Dietary bioactive peptides: Human studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 335-343, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 29, p. 25-30, 1995.

CABO, M. L.; MURADO, M. A.; GONZÁLEZ, M. P.; PASTORIZA, L. A method for bacteriocin quantification. **Journal Applied Microbiology**, v. 87, p. 907-914, 1999.

CAIRNS, T. C.; NAI, C.; MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, 2018.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p.303-311, 1993.

CARRASCO-CASTILLA, J.; HERNANDÉZ-ALVAREZ, A. J.; JIMENEZ-MARITNEZ, C.; JACINTO-HERNANDÉZ, C.; ALAIZ, M.; GIRON-CALLE, J.; VIOQUE, J.; DÁVILA-ORTIZ, G. Antioxidant and metal chelating activities of peptides fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1789, 2012.

CASCIATORI, F. P.; BÜCK, A.; THOMÉO, J. C. TSOTSAS, Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 103-116, 2016.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 303-308, 2015.

CHABEAUD, A.; VANDAJON, L.; BOURSEAU, P.; JAOUEN, P.; CHAPLAIN-DEROUINIOT, M.; GUERARD, L. Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. **Separation and Purification Technology**, v. 66, p. 463-472, 2009.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, L. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.

CHATTERJEE, A.; KANAWJIA, S.; KHETRA, Y. Properties of sweetened Indian yogurt (mishi dohi) as affected by added tryptic whey protein hydrolysate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 824-831, 2016.

CHEN, W.; DING, H.; FENG, P.; LIN, H.; CHOU, K. C. iACP: a sequence-based tool for identifying anticancer peptides. **Oncotarget**, v. 7, p. 16895-16909, 2016.

CHENG, A. C.; LIN, H. L.; SHIU, Y. L.; TYAN, Y. C.; LIU, C. H.. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v.67, p. 270-279, 2017

CHI, C. H.; CHO, S. J. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 619-625, 2016.

CHRISTENSEN, J. E.; DUDLEY, E. G.; PEDERSON, J. A.; STEELE, J. L. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 217-246, 1999.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1012–1018, 2008.

COLLA, L. M.; FICANHA, A. M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINERHR, C. O.; COSTA, J. A. Production and Characterization of Lipases by two new isolates of *Aspergillus* trough solid-state and submerged fermentation. **BioMed Research International**, article ID 725959, 2015.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8308-8314, 2010.

CONTRERAS, M.; IVAN, L.; BLANCA, H.; RAMOS, M.; SIDRA, R. Application of mass spectrometry to the characterization and quantification of food-derived bioactive peptides. **Journal of AOAC International**, v. 91, p. 981-994, 2008.

COSTA, J. A. V.; TREICHEL, H.; KUMAR, V.; PANDEY, A. **Chapter 1 - Advances in Solid-State Fermentation**. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Ed. Elsevier. 2018.

COSTA, M. A. **Estudo da precipitação com etanol de xilanases de complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido e fermentação submersa**. Tese (Doutor em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2016.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

DAS, R. K.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential use of pulp and paper solid waste for the bio-production of fumaric acid through submerge and solid state fermentation. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 4435-4444, 2016.

DE CASTRO, R. J. S.; NISHIDE, T. G.; SATO, H. H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 236-245, 2014.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3, p. 58-65, 2014.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their Generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v.74, p. 185-198, 2015.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and  $\alpha$ -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.

DE CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 678-684, 2015.

DE CASTRO, R. J. S.; SOARES, M. H.; ALBERNAZ, J. R. M.; SATO, H. H. Biochemical characterization of solvent, salt, surfactant and oxidizing agent tolerant proteases from *Aspergillus niger* produced in different agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 94-98, 2016.

DE GOBBA, C.; TOMPA, G.; OTTE, J.; Bioactive peptides from caseins release by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*. **Food Chemistry**, v. 165, p. 205-215, 2014.

DEY, T. B.; KUHAD, R. C. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 120-127, 2014.

- DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S. VERMA, M. Screening of agro-industrial wastes for citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 through solid state fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1560-1567, 2013.
- DHILLON, G. S.; LEA ROSINE, G. M.; KAUR, S.; HEGDE, K.; BRAR, S. K.; DROGUI, P.; VERMA, M. Novel biomaterials from citric acid fermentation as biosorbents for removal of metals from waste chromated copper arsenate wood leachates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 119, p. 147-154, 2017.
- DIAS, D. S. B. **Produção, caracterização parcial e aplicação de  $\beta$ -glucosidases de *Aspergillus niger***. Dissertação (Mestre em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2011.
- DIVATE, R.D.; WANG, C.C.; CHOU, S.T.; CHANG, C.T.; WANG, P.M.; CHUNG, Y.C. Using wheat bran and soybean meal as solid-state fermentation substances for the production of *Xylaria nigripes* with bioactivities. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 127-133, 2017.
- DONKOR, O.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. **Journal of Food Science**, v. 70, p. M375–M381, 2005.
- DULLIUS, A.; GOETTERT, M. I.; DE SOUZA, C. F. V. Whey protein hydrolysates as source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. **Journal of Functional Foods**, v. 42, p. 58-74, 2018.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113-125, 2003.
- DZIUBA, A.; IWANIAK, J.; MINKIEWICZ, P. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. **Polimery**, v. 48, p. 50-53, 2003.
- EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: Novel aspects of SSF in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 1999-2042, 2015.
- ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.
- ELIASSEN L. T.; BERGE, G.; LEKNESSUND, A.; WIKMAN, M.; LINDIN, I.; LOKKE, C.; PONTAN, F.; JOHNSEN, J.; SVEINBJORNSSON, B.; KOGNER, P.; FLAEGSTAD, T.; REKDAL, O. The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells in vitro and inhibits xenograft growth in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 119, p. 493-500, 2006.
- ELIBOL, M.; MOREIRA, A. R. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1951-1956, 2005.

ELLEGARD, K. H.; GAMMELGARD-LARSEN, C.; SORENSEN, E. S.; FEDOSOV, S. Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 639-652, 1999.

EMBRAPA SOJA. Dados Econômicos. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acessado em: 04/04/2020.

ERYILMAZ, E. B.; DURSUN, D.; DALGIÇ, A. C. Multiple optimization and statistical evaluation of astaxanthin production utilizing olive pomace. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 224-227, 2016.

ESPOSITO, F., ARLOTTI, G., BONIFATI, A.M., NAPOLITANO, A., VITALE, D., FOGLIANO, V. Antioxidant activity and dietary fiber in durum wheat bran by-products, **Food Research International**, v. 38, p. 1167-1173, 2005.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

FERNANDEZ-OROZCO, R.; FRIAS, J.; MUNOZ, R.; ZIELINSKI, H.; PISJULOA, M.; KOZLOWSKA, H.; VIDAL-VALVERDE, C. Fermentation as a bioprocess to obtain functional soybean flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8972-8979, 2007.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; RAMOS, S.; CORDERO-HERRERA, I.; RECIO, I.; GOYA, L.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. In vitro chemo-protective effect of bioactive peptide lunasin against oxidative stress in human HepG2 cells. **Food Research International**, v. 62, p. 793-800, 2014.

FINKLER, A. T. J.; PITOL, L. O.; MEDINA, B. S.; LUITHARDT, H.; LUZ JR., L. F. L.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Intermittent agitation contributes to uniformity across bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in pilot scale packed-bed bioreactor. **Biochemistry Engineer Journal**, v. 121, p. 1-12, 2017.

FOH, M. B. K.; AMADOU, I.; KAMARA, M. T.; FOH, B. M.; XIA, W. Effect of enzymatic hydrolysis on the nutritional and functional properties of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) proteins. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 54-57, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Food Loss and Food Waste. Available in: <http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/en/>. Access in: 20/11/2018.

FOOD AND NUTRITION BOARD. Institute of Medicine. **Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids**. The National Academies Press. Washington, D. C. p. 589-600. 2005.

FUKUSHIMA, D. Recent Progress in Research and technology on Soybeans. **Food Science and Technology Research**, v. 7, p. 8-16, 2001.

GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B. **Protein purification by affinity ultrafiltration Protein purification by affinity ultrafiltration**, W.K. Wang, Membrane Separations in Biotechnology, 2 ed., 2001.

GARCÍA-MORA, P.; MARTÍN-MARTÍNEZ, M.; ANGELES, B. M.; GONZÁLEZ-MÚNIZ, R.; PEÑAS, E.; FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C. Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 221, p. 464-472, 2017.

GARCÍA-TEJEDOR, A.; PADILLA, B.; SALOM, J. B.; BELLOCH, C.; MANZANARES, P. Dairy yeast produce milk protein-derived antihypertensive hydrolysates. **Food Research International**, v. 53, p. 203-208, 2013.

GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y.; SAINT-SAUVEUR, D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1315-1323, 2006.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246-251, 2003.

GIBBS, B. F.; ZOYGMAN, A.; MASSE, R.; MULLINGAN, C. Production and characterization of bioactive 643 peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**, v. 37, p. 123-131, 2003.

GRAVES, A. M.; HETTIARACHCHY, N.; RAYAPROLU, S.; LI, R.; HORAX, R.; SEO, H. S. Bioactivity of a rice bran-derived peptide and its sensory evaluation and storage stability in orange juice. **Journal of Food Science**, v. 81, p. H1010-H1015, 2016.

GUAN, Y.; WANG, J.; WU, J.; WANG, L.; RUI, X.; XING, G.; DONG, M. Enhancing the functional properties of soymilk residues (okara) by solid-state fermentation with *Actinomucor elegans*. **CyTA – Journal of Food**, v. 14, p. 144-163, 2017.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 381-395, 2002.

HAJJI, M.; REBAI, A.; GHARSALLAH, N.; NASRI, M. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.79, p. 915–923, 2008.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1551, 2006.

HARA, H.; FUNABIKI, R.; IWATA, M.; YAMAZAKI, K.I. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. **The Journal of Nutrition**, 114,p. 1122–1129, 1984.

HARIKESH, S.; SINGH, B. N.; SATYENDRA, P.; NAUTIYAL, C. S. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6444-6453, 2010.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food- derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163-169, 2007.

HE, R.; JU, X.; YUAN, J.; WANG, L.; GIRGIH, A. T.; ALUKO, R. E. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. **Food Research International**, v. 49, p. 432-438, 2012.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; CONTRERAS, M. D. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, p. 23-35, 2011.

HSIAO, N. W.; CHEN, Y.; KUAN, Y.C.; LEE, Y.C.; LEE, S.K.; CHAN, H.H.; KAO, C.H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 89–94, 2014.

HSIEH, C.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; LUMEN, B. O.; HERNANDEZ-LEDESMA, B. Updating the research on the chemopreventive and therapeutic role of the peptide lunasin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, 2018.

IANDOLO, D.; PISCITELLI, A.;SANNIA, G.; FARACO, V. Enzyme production by solidsubstrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* ontomato pomace. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 163, p. 40-51, 2011.

IBRAHIM, H. R.; ISONO, H.; MIYATA, T. Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. **Animal Nutrition**, v. 4, p. 273-280, 2018.

ITO N.; HIROSE M.; FUKUSHIMA S.; TSUDA H.; SHIRAI T.; TATEMATSU M. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, p. 1071-1082, 1986.

JANISZEWSKA, A. S.; STODOLAK, B.; GOMEZ-CARAVACA, A. M.; MICKOWSKA, B.; MARTIN-GARCIA, B.; BYCZYNSKI. Mould starter selection for extended solid-state fermentation of quinoa. **LWT – Food and Science Technology**, v.99, p. 231-237, 2019.

KARATAS, H.; UYAR, F.; TOLAN, V.; BAYSAL, Z. Optimization and enhanced production of  $\alpha$ -amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 45-52, 2013.

KIM, S. K.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 1-9, 2010.

KITTS, D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1309-1323, 2003.



- KLEEKAYAI, T.; HARNEDY, P. A.; O'KEEFFE, M. B.; POYARKOV, A. A.; CUNHANEVES, A.; SUNTORNSUK, W.; FITZGERALD, R. J. Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes. **Food Chemistry**, v. 176, p. 441-447, 2015.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945-960, 2006.
- KUBA, M.; SHINJO, S.; YASUDA, M. Antihypertensive and hypercholesterolemic effects of tofuyo in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Health Science**, v. 50, p. 670-673, 2004.
- KUMAR, R.; CHAUDHARY, K., SHARMA, M.; NAGPAL, G.; CHAUHAN, J. S.; SINGH, S.; GAUTAM, A.; RAGHAVA, G. P. AHTPDB: a comprehensive platform for analysis and presentation of antihypertensive peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 956-962, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LEE, J. H.; HWANG, S. R.; LEE, Y. H.; KIM, K.; CHO, K.; LEE, Y. B. Changes occurring in compositions and antioxidant properties of healthy soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merr.] and soybean seeds diseased by *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii* fungal pathogens. **Food Chemistry**, v. 15, p. 205-211, 2015.
- LI, G. H.; QU, M. R.; WAN, J. Z.; YOU, J. M. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, p. 275-280, 2007.
- LI, Q.; ZHANG, C.; CHEN, H.; XUE, J.; GUO, X. ; LIANG, M; CHEN, M. BioPepDB: an integrated data platform for food-derived bioactive peptides. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 69, 2018.
- LIU, F.; CHEN, Z.; SHAO, J.; WANG, C.; ZHAN, C. Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ. **Food Bioscience**, v. 20, p.141-148, 2017.
- LONDOÑO-HERNÁNDEZ, L.; RAMÍREZ-TORO, C.; RUIZ, H. A.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; AGUILLA-GONZALES, M. A.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; AGUILLAR, C. N. *Rhizopus oryzae* - Ancient microbial resource with importance in modern food industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 110-127, 2017.
- LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. O.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.
- LU, R. R.; QIAN, P.; SUN, Z.; ZHOU, X.; CHEN, T. P.; FENG, J. Hempseed protein derived antioxidative peptides: purification, identification, and protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC 12 cells. **Food Chemistry**, p. 1210-1218, 2010.

M'HIR, S.; RIZZELLO, C. G.; DI CAGNO, R.; CASSONE, A.; HAMDI, M. Use of selected enterococci and *Rhizopus oryzae* proteases to hydrolyze wheat proteins responsible for celiac disease. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 421-431, 2009.

MACCHIONE, M. M.; MERHEB, C.; GOMES, E.; SILVA, R. Protease production by different thermophilic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 223-230, 2008.

MADRERA, R. R.; BEDRIÑANA, P. R.; VALLES, S. B. Production and characterization of aroma compounds from apple pomace by solid-state fermentation with selected yeast. **LWT-Food Science Technology**, v. 64, p. 1342-1353, 2015.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, 1729-1735, 2008.

MAMO, J.; ASSEFA, F. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. **Journal of Food Quality**, v. 8, 2018.

MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; TORINO, M. I.; MARTÍN, V.; ARROYO, R.; GARCIA-MORA, P.; ESTRELLA, P. I.; VIDAL-VALVERDE, C.; RODRIGUEZ, J. M.; FRIAS, J. Multifunctional properties of soy milk fermented by *Enterococcus faecium* strains isolated from raw soy milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 10235 – 10244, 2012.

MARX, V. Watching peptide drugs grow up. **Chemical and Engineering News**, v. 83, p. 17-24, 2005.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MATSUI, T.; YUKIYOSHI, A.; DOI, S.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H.; MATSUMOTO, K. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 80-6, 2002.

MAULINI-DURAN, C.; ABRAHAM, J.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, S.; CERDA, A.; JIMÉNEZ-PEÑALVER, P.; GEA, T.; BARRENA, R.; ARTOLA, A.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A. Gaseous emissions during the solid state fermentation of different wastes for enzymes production at pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 211-218, 2015.

MCCOTTER, S. W.; HORIANOPOULOS, L. C.; KRONSTAD, J. W. Regulation of the fungal secretome. **Current Genetics**, v. 62, p. 533-545, 2016.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Curr Pharm**, 2003.

MEYER, V.; ANDERSEN, M. R.; BRAKHAGE, A. A.; BRAUS, G. H.; CADDICK, M. X.; CAIRNS, T. C.; VRIES, R. P.; HAARMANN, T.; HANSEN, K.; HERTZ-FOWLER, C.; KRAPPMANN, S.; MORTENSEN, U. H.; PEÑALVA, M. A.; RAM, A. F. J.; HEAD, R. M.

Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, 2016.

LAZIM, H.; MANKAI, H.; SLAMA, N.; INSAF, B.; LIMAN, F. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN 902. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 36, p. 531-537, 2009.

MINKIEWICZ P., IWANIAK A., DAREWICZ M. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 5978, 2019.

MONTON, S.; UNREAN, P.; PIMSAMARN, J.; KITSUBUN, P.; TONGTA, A. Fuzzy logic control of rotating drum bioreactor for improved production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 335-342, 2013.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. **World Applied Science Journal**, v. 8, p. 199-205, 2010.

NEGI, S.; BENERJEE, R. Optimization of Amylase and Protease production from *Aspergillus awamori* in Single Bioreactor Through EVOP Factorial Design Technique. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 257-261, 2006.

NIU, Y.; DESMARAIS, T. L.; TONG, Z.; YAO, Y.; COSTA, M. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 82, p. 22-28, 2015.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v.198, p. 119-124, 2016.

OROZCO, A. L.; PÉREZ, M. I.; GUEVARA, O.; RODRÍGUEZ, J.; HERNANDÉZ, M.; GONZÁLES-VILA, F. J.; POLVILLO, O.; ARIAS, M. E. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces* Py-GC/MS analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 81, p. 247-252, 2008.

ORTIZ, G. E.; NOSEDA, D. G.; PONCEMORA, M. C.; RECUPER, M. N.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E. A comparative study of new *Aspergillus* strains for proteolytic enzymes production by solid state fermentation. **Enzyme Research**, 2016.

OSMAN, A.; GODAN, H. A.; ABDEL-HAMID, M.; BADRAN, S. M.; OTTE, J. Antibacterial peptides generated by alcalase hydrolysis of goat whey. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 480-486, 2016.

PAGARE, R. S.; RAMDASI, A. M.; KHAANDELWAL, S. R.; LOKHANDE, M. O.; AGLAVE, B. A. Production and enzyme activity of an extracellular protease from *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*. **International Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 5(3), p. 335, 2009.

- PAN, D.; CAO, H.; GUO, H.; ZHAO, B. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 130, p. 121-126, 2012.
- PAN, M.; JIANG, S.; PAN, J. L. Antioxidant Activities of Rapeseed Protein Hydrolysates. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1144, 2011.
- PANCHAUD, A.; AFFOLTER, M.; KUSSMANN, M. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 3546-3559, 2012.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. Solid-state fermentation in Biotechnology. **Fundamental Applications Asiatech Publishers**, New Delhi, p. 21-31, 2001.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme technology**. Springer: New York, p. 742, 2010.
- PARANTHAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMATHI, J. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, p. 308–312, 2009.
- PARK, E. J.; GARCIA, C. V.; YOUN, S. J.; PARK, C. D.; LEE, A. P. Fortification of  $\gamma$ -aminobutyric acid and bioactive compounds in *Cucurbit moschata* by novel two-step fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 102, p. 22-29, 2019.
- PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. **LWT – Food Science Technology**, v. 44, p. 1958-1964, 2011..
- PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; LQARI, H.; MEGIAS, C.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; MILLÁN, F. Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. **Food Research International**, v. 40, p. 931-938, 2007.
- PEL, H. J.; WINDE, J. H.; ARCHER, D. B.; DYER, P. S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P. J.; et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 221-231, 2007.
- PENG, I. X.; SHIEA, J.; LOO, R. R. O.; LOO, J. A. Electrospray-assisted lases desorption/ionization and tandem mass spectrometry of peptides and proteins. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 2541-2546, 2007.

- PENG, X.; XIONG, Y. L.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measure by electron spin resonance. **Food Chemistry**, v. 113, p. 196-201, 2009.
- POKORA, M.; ZAMBROWICZ, A.; ZABLOCKA, A.; DABROWSKA, A.; SZOLTYSIK, M.; BABIJ, K.; ECKERT, E.; TRZISKA, T.; CHRZANOWSKA, J. The use of serine protease from *Yarrowia lipolytica* yeast in the production of biopeptides from denatured egg white proteins. **Acta biochimica Polonica**, v. 64, p. 245-253, 2017.
- PRZYBYCIEN, T.M.; PUJAR, N.S.; STEELE, L.M. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography, **Current Opinions in Biotechnology**, v. 5. p. 469-478, 2004.
- PURUSHOTHAMAN, K.; BHAT, S. K.; SINGH, S. A.; MARATHE, G. K.; RAO G. A.; RAO, A. mAspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 199-212, 2019.
- RAI, A. K.; SANJUKTA, S.; CHOURASIA, R.; BHAT, I.; BHARDWAJ, P. K.; SAHOO, D.; Production of bioactive hydrolysate using protease,  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* spp. isolated from *kinema*. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 358-365, 2017.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 597-653, 1998.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALLA, A; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- RIBEIRO, R. C. S.; RIBEIRO, T. R. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MEDEIROS, E. V.; MOREIRA, K. A. Production and partial characterization of proteases from *Mucor hiemalis* URM 3773. **Acta Scientiarum. Biological Science**, v. 37, p. 71-79, 2015.
- ROBLET, C.; AMIOT, J.; LAVIGNE, C.; MARETTE, A.; JEAN, J.; RAMASSAMY, C.; MORESOLI, C.; BAZINET, L. Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. **Food Research International**, v. 46, p. 237-249, 2012.
- RUTTARATTANAMONGKOL, K. Functionalization of whey proteins by reactive supercritical fluid extrusion. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 34, p. 395-402, 2012.
- SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; HAMID, A. A.; GHAZALI, H. M. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 80-116, 2015.
- SAIDI, S.; DERATANI, A.; BELLEVILLE, M. P.; BEN AMAR, R. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by product hydrolysate produced by membrane fractionation process. **Food Research International**, v. 65, p. 329-336, 2014.

SALAR, R. K.; PUREWAL, S. S.; BHATTI, M. S. Optimization of extraction conditions and enhancement of phenolic content and antioxidant activity of pearl millet fermented with *Aspergillus awamori* MTCC-548. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, p. 148-157, 2016.

SALIM, A. A.; GRBAVCIC, S.; SEKULJICA, N.; STEFANOVI, A.; JAKOVETIC, T. S.; LUKOVI, N.; KENZEVI-JUGOVIC, Z. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid-state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods, **Bioresource Technology**, v. 228, p. 193-200, 2017.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 229-254, 2011.

SAMIR, P.; LINK, A. Analyzing the cryptome: uncovering secret sequences. **The AAPS Journal**, v. 13, p. 152-158, 2011.

SÁNCHEZ, A.; VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: a review. **Food Quality and Safety**, v. 1, p. 29-46, 2017.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 1-10, 2016.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K.; MUHAMMED, A.; JEYARAM, K.; TALUKDAR, N. C. enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 650-658, 2015.

SATTAR, H. BIBI, Z.; KAMRAN, A.; AMAN, A.; ALI, S.; QADER, U. Degradation of complex casein polymer: Production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, 2019.

SCHMIDT, C. G.; GONÇALVES, L. M.; PRIETTO, L.; HACKBART, H. S.; FURLONG, E. B. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rhizopus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 146, p. 371-377, 2014.

SCHOLL, A.L.; MENEGOL, D.; PITARELO, A. P.; FONTANA, R.C.; FILHO, A. Z.; RAMOS, L.P.; DILLON, A.J.P.; CAMASSOLA, M. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 97-107, 2015.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.

SETHI, B. K.; JANA, A.; NANDA, P. K.; DAS MOHAPATRA, P. K.; SAHOO, S. L. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, p. 571-583, 2016.

SEVINC, N.; DEMIRKAN, E. Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. **Journal of Biological and Environmental Sciences**, v. 5, p. 95-103, 2011.

SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115-126, 2017.

SHEU, F.; CHEIN, P. J.; CHIEN, A. L.; CHEN, Y. F.; CHIN, K. L. Isolation and characterization of an immunomodulatory protein (APP) from the Jew's Ear mushroom *Auricularia polytricha*. **Food Chemistry**, v. 87, p. 593-600, 2004.

SILA, A.; BOUGATEF, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 10–26, 2016.

SILK, D. B. A.; CHUNG, Y. C.; BERGER, K. L.; CONLEY, K.; BEIGLER, M.; SLEISENGER, M. H.; KIM, Y. S. Comparison of oral-feeding of peptide and amino acid meals to normal human subjects. **Gut**, v.20, p.291-299, 1979.

SILVA, M. O. **Atividade antioxidante e composição de oligossacarídeos em subproduto obtido do processamento industrial da goiaba (*Psidium guajava*)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2015.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171-179, 2014.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13–18, 2009.

SINK, R.S.; CHAUHAN, K.; KENNEDY, J.F. A panorama of bacterial inulinases: production, purification, characterization and industrial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v 96, p. 312-322, 2017.

SNYMAN, C.; THERON, L. W.; DIVOL, B. Understanding the regulation of extracellular protease gene expression in fungi: a key step towards their biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 5517-5532, 2019.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 2017.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOUSA, D.; VENÂNCIO, A.; BELO, I.; SALGADO, J. M. Mediterranean agro-industrial wastes as valuable substrates for lignocellulolytic enzymes and protein production by solid-state fermentation. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 98, p. 5248-5246, 2018.

SOUZA, P. M. BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; JUNIOR, A. P.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337-346, 2015.

SUMANTHA, A.; SNADHYA, C.; SZACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Production and partial purification of neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, p. 313-319, 2005.

SUN, H.; YAO, X.; WANG, X.; WU, Y.; LIU, Y.; TANG, J.; FENG, J. Chemical composition and in vitro antioxidant property of peptides produced from cottonseed meal by solid-state fermentation. **CyTA - Journal of Food**, v. 13, p. 264-272. 2015.

SUN, J.; HE, H.; XIE, B. J. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6646–6652, 2004.

SWAMY, M. K. KASHYAP, S. S. N.; VIJAY, R.; TIWARI, R.; ANURADHA, M. Production and optimization of extracellular protease from *Bacillus* sp. Isolated from soil. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 3. P. 564-569, 2012.

TELES, A. S.C.; CHÁVEZ, D. W. H.; OLIVEIRA, R. A.; BOM, E. P. S., TERZI, S. C.; SOUZA, E. F.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TONON, R. V. Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. **Food Research International**, v. 120, p. 441-448, 2019.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

TORINO, M. I.; LIMÓN, R. I.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; MAKINEN, S.; PIHLANTO, A.; VIDAL-VALVERDE, C.; FRIAS, J. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1030-1037, 2013.

TOURAKI, M., KARAMANLIDOU, G., KARAVIDA, P., CHRYSI, K. Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia nauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 2425 – 2433, 2012.

TRINDADE, E. A. Dossiê: Proteínas. **Revista Food Ingredients Brasil**, n. 28, 2014.

TSOUKO, E.; KACHRIMANIDOU, V.; SANTOS, A. F.; NASCIMENTO, V. L. M. E.; PAPANIKOLAOU, S.; CASTRO, A. M.; GUIMARAES, D. M.; KOUTINAS, A. A. Valorization of by-products from palm oil mills for the production of generic fermentation



media for microbial oil synthesis (Report). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, p. 1241- 1257, 2017.

TUNGA, R.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 187-190, 1998.

UTTARA, B.; SINGH, A.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, p. 65-74, 2009.

VAN DER VEN, C.; GRUPPEN, H.; DE BONT, D. B. A.; VORAGEN, A. G. J. Optimization of the angiotensin-converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. **International Dairy Journal**, v. 12, p.813–820. 2002.

VERMEIRSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **British Journal of Nutrition**, V. 92, P. 357-366, 2004.

VISHWANATHA, K. S., RAO, A., SINGH, S. A. Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, p. 402-407, 2009.

VISWANATH, V.; LEO, V.; PRABHA, S.; PRABHAKUMARI, C.; POTTY, V.; JISHA, M. Biosynthesis of tannase from cashew testa using *Aspergillus niger* MTCC 5889 by solid state fermentation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 7433-7440, 2015.

WAGHU, F. H.; BARAI, R. S.; GURUNG, P.; IDICULA-THOMAS, S. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p.1094-1097, 2016.

WANG, W.; MEJIA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related Chronic Diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and food Safety**, v. 4, 2005.

WATTANASIRITHAM, L.; THEERAKULKAIT, C.; WICKRAMASEKARA, S.; MAIER, C. S.; STEVENS, J. F. Isolation and identification of antioxidante peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. **Food Chemistry**, v. 192, p. 156-162, 2016.

WENG, T. M.; CHEN, M. T. Effect of two-steps fermentation by *Rhizopus oligosporus* and *Bacillus subtilis* on protein of fermented soybean. **Food Science and Technology Research**, v. 17, p. 393-400, 2011.

WERGEDAHL, H.; LIASET, B.; GUDBRANDSEN, O. A.; LIED, E.; ESPE, M.; MUNA, Z.; MARK, S.; BERGE, R. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. **The Journal of nutrition**, v. 134, p. 1320-1327, 2004.

WIJESEKARA, I.; KIM, S. K. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Marine Resources: Prospects in the pharmaceutical Industry. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1080-1093, 2010.

- WU, P. GUO, Y.; GOLLY, M. K.; MA, H.; HE, R.; LUO, S.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; ZHUA, J. Feasibility study on direct fermentation of soybean meal by *Bacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 3291-3298, 2019.
- WU, R.; WU, C.; LIU, D.; YANG, X.; HUANG, J.; ZHANG, J. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. **Food Chemistry**, v. 248, p. 346-352, 2018.
- XIAO, Y.; RUI, Y.; XING, G.; WU, H.; LI, W.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 enhanced antioxidant capacity and DNA damage protective effect of oats (*Avena sativa* L.). **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 58-73, 2015.
- XIAO, Y.; SUN, M.; ZHANG, Q.; CHEN, Y.; MIAO, J.; RUI, X., DONG, M. Effects of *Cordyceps militaris* (L.) Fr. fermentation on the nutritional, physicochemical, functional properties and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of red bean (*Phaseolus angularis* [Willd.] W.F. Wight.) flour. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 1244-1255, 2018.
- YAMADA, A.; SAKURAI, T.; OCHI, D.; MITSUYAMA, E.; YAMAUCHI, K.; ABE, F. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3781-3789, 2013.
- YANG, R.; ZHANG, Z.; PEI, X.; HAN, X.; WANG, J.; WANG, J.; LONG, Z.; SHEN, X.; LI, Y. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice. **Food Chemistry**, v. 113, p. 464-470, 2009.
- YIN, L.; HSU, T.; JIANG, S. Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720, **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 662-666, 2013.
- YU, Y.J.; AMORIN, M.; MARQUES, C.; CALHAU, C.; PINTADO, M. Effects of whey peptide extract on the growth of probiotics and gut microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 21, 507-516, 2016.
- ZANUTTO-ELGUI, M. R.; VIEIRA, J. C. S.; PRADO, D. Z.; BUZALAF, M. A. R.; PADILHA, P. M.; OLIVEIRA, D. E.; FELURI, L. F. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. **Food Chemistry**, v. 278, p. 823-831, 2019.
- ZHANG, J.; HU, B.O. Solid-state fermentation of *Mortierella isabellina* for Lipid Production from Soybean Hull. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1034-1046, 2012.
- ZHANG, T.; YANHONG, L.; MING, M.; BO, J. Purification and characterization of new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium*) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.128, p. 28-33, 2011.

ZHAO, Y.; SUN-WATERHOUSE, D.; ZHAO, M.; ZHAO, Q.; QIU, C.; SU, G. Effects of solid-state fermentation and proteolytic hydrolysis on defatted soybean meal. **LWT – Food Science and Technology**, v. 97, p. 496-502, 2018.

ZHENG, H. G.; YANG, X. Q.; AHMAD, I.; MIN, W.; ZHU, J. H.; YUAN, D. B. Soybean b-conglycinin constituent subunits: Isolation, solubility and amino acid composition. **Food Research International**, v.42, p. 998–1003, 2009.

ZHENG, L.; LI, D.; LI, Z. L.; KANG, L. N.; JIANG, Y. Y.; LIU, X. Y.; CHI, Y. P.; LI, Y. Q.; WANG, J. H. Effects of *Bacillus* fermentation on the protein microstructure and anti-nutritional factor of soybean meal. **Letters in applied microbiology**, v. 65, p. 520-526, 2017.

ZHOU, H.; WANG, C. Z.; YE, J. Z.; CHEN, H. X.; TAO, R.; ZHANG, Y. S. Solid-state fermentation of *Ginkgo biloba* L. residue for optimal production of cellulase, protease and the simultaneous detoxification of *Ginkgo biloba* L. residue using *Candida tropicalis* and *Aspergillus oryzae*. **European Food Research and Technology**, v. 240, p. 379–388, 2015.

ZHOU, P.; YANG, C.; REN, Y.; WANG, C.; TIAN, F. What are the ideal properties for functional food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2967–2973, 2013.

ZHOU, D.; QIN, L.; ZHU, B.; LI, D.; YANG, J.; DONG, X.; MURATA, Y. Optimisation of hydrolysis of purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad by response surface methodology and evaluation of in vitro antioxidant activity of the hydrolysate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 1694-1701, 2012.

ZIEGLER, F.; NITENBERG, G.; COUDRAY-LUCAS, C.; LASSER, P.; GIBOUDEAU, J.; CYNOBER, L. Pharmacokinetic assessment of an oligopeptide-based enteral formula in abdominal surgery patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 124-128, 1998.



## APÊNDICE A – ARTIGO CIÊNTÍFICO

### PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE PROTEASES E BIOPEPTÍDEOS ANTIOXIDANTES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

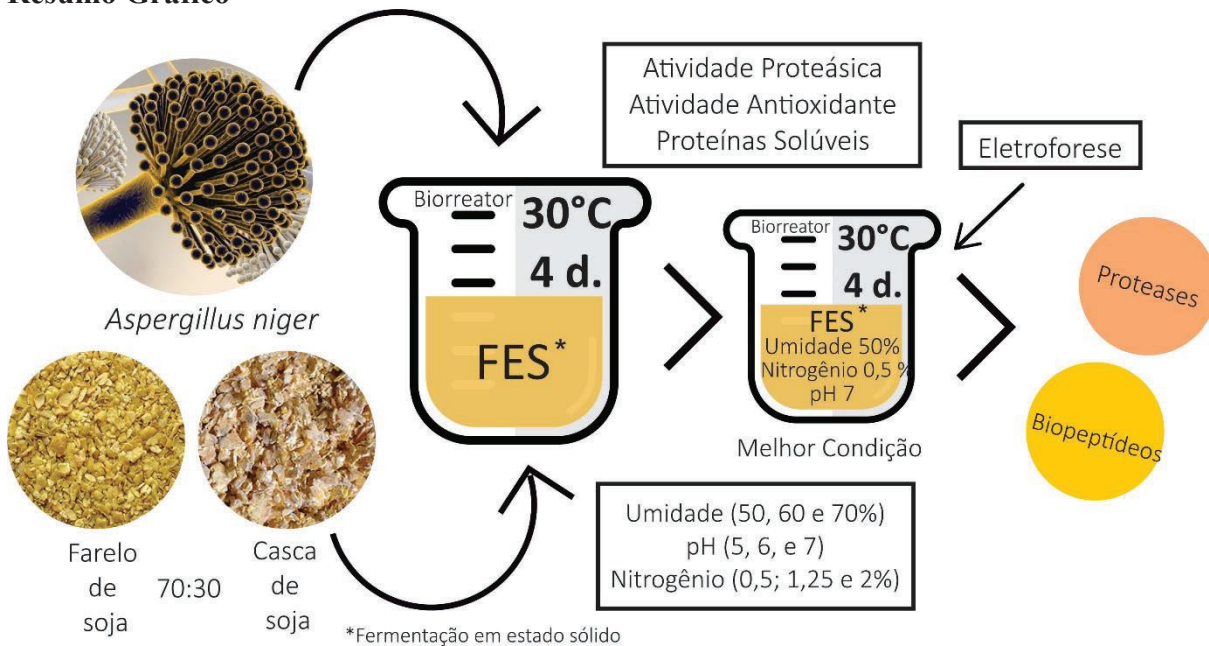
Paola Gouvêa Manfredini; Jorge Alberto Vieira da Costa<sup>1</sup>; Luciane Maria Colla<sup>1</sup>, Vitor Augusto Farina Cavanhi<sup>2</sup>, Raíssa Vieira da Silva<sup>2</sup>.

1. Programa de pós-graduação em Ciência e tecnologia de alimentos.

#### RESUMO

Os biopeptídeos são compostos hidrolisados a partir de uma proteína inativa que possui efeitos benéficos para a saúde, tais como: redução da pressão arterial, atividade antioxidante, redução de problemas ocasionados pela diabetes, ação anticancerígena, antimicrobiana, entre outras. Estes compostos podem ser obtidos pela hidrólise de proteínas por enzimas, entre elas, as proteases produzidas por microrganismos através da fermentação em estado sólido (FES). As principais vantagens deste processo são a produção de proteases e biopeptídeos simultâneas e utilização de subprodutos agroindustriais como substrato, reduzindo a poluição ambiental e permitindo a valoração destes compostos. Desta forma, foi desenvolvido um processo biotecnológico de FES para a produção simultânea de proteases e biopeptídeos, por *Aspergillus niger*. Para isso, realizou-se um Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup>, com três pontos centrais, com o estudo das variáveis pH (5, 6 e 7), umidade (50, 60 e 70%), e concentração de fontes de nitrogênio (0,5, 1,25 e 2%). Os substratos utilizados para a fermentação foram farelo de soja e casca de soja (70:30). Como resultado, ocorreu a produção simultânea de proteases e biopeptídeos e a melhor condição apresentada foi: pH 7, umidade de 50% e 0,5% de fonte de nitrogênio. A produção de protease foi maior em 48h de fermentação, já o maior potencial antioxidante ocorreu em 96 horas. Ao realizar o aumento de escala, os resultados mantiveram-se, confirmando a produção simultânea de proteases e biopeptídeos por FES.

## Resumo Gráfico



## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas muitos alimentos foram documentados com propriedades antioxidantes, antihipertensiva, antimicrobiana e imunomoduladoras, com potencial aplicação para preservação de alimentos, inibição microbiana e aplicações medicinais (SAADI et al., 2015). Estes compostos bioativos encontrados nos alimentos têm sido considerados tendência no desenvolvimento de novos alimentos e nutraceuticos. Como as proteínas que possuem um papel nutricional muito importante no crescimento e manutenção do organismo e, além disso, apresentam propriedades funcionais atribuídas principalmente aos peptídeos bioativos (KITTS; WEILER, 2003).

Os peptídeos bioativos são moléculas orgânicas normalmente formadas por 2 a 20 resíduos de aminoácidos, unidos por ligações covalentes também conhecidas como ligações amida ou peptídicas (SÁNCHEZ; VÁZQUEZ, 2017), com massas moleculares, normalmente, abaixo de 6000 Da (SUN; HE; XIE, 2004). Podem ser liberados pela hidrólise enzimática das proteínas e possuem diversas atividades fisiológicas no organismo, tais como: potencial antioxidante, anti-hipertensivo, antitumoral, antimicrobiano, antitrombótico, entre outros. Suas atividades dependem do comprimento da cadeia, composição e sequência de aminoácidos, podendo melhorar as propriedades funcionais dos alimentos, atuar como alternativa natural para várias drogas sintéticas prevenindo doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e hipertensão arterial (KORHONEN; PIHLANTO, 2006,

HARTMANN; MEISEL, 2007, SAADI et al., 2015). Atualmente, mais de 3942 peptídeos bioativos diferentes foram relatados em um banco de dados chamado 'BIOPEP', que frequentemente é atualizado (MINKIEWICZ; IWANIAK; DAREWICZ; 2019).

Os peptídeos bioativos são formados por hidrólise catalisada por proteases (MAMO; ASSEFA, 2018), que são importantes enzimas usadas produzidas pela indústria de biotecnologia, respondendo por cerca de 60% do mercado global, com aplicações em detergentes, processamento de couro, processamento de alimentos e rações, produtos farmacêuticos, produtos químicos e tratamento de resíduos. Nos alimentos, as proteases têm duas aplicações principais: no processamento de produtos alimentares tradicionais e no processamento de novos ingredientes à base de proteínas, que devido a suas características podem ser denominados alimentos funcionais (MACCHIONE et al., 2008, RAMAKRISHNA; RAJASEKHAR; REDDY, 2010, SEVINC; DEMIRKAN, 2011, RIBEIRO et al., 2015, NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016).

As proteases podem ser isoladas de plantas (papaína e bromelina), animais (pepsina, tripsina e quimiotripsina) e microrganismos. Destas fontes, os microrganismos apresentam um grande potencial para a produção de proteases, devido à sua ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética (DE CASTRO et al., 2015), e uma alta taxa de crescimento (SWAMY et al., 2012). Além disso, a protease microbiana pode ser produzida em grandes quantidades em um período relativamente curto, tem uma vida útil mais longa e pode ser armazenada em condições abaixo do ideal por semanas, sem perdas significativas de atividade (GUPTA et al., 2002).

O processo de produção de proteases fúngicas atrai grande atenção dos biotecnologistas devido ao crescimento de fungos em substratos de baixo custo, à secreção de um grande número de enzimas no meio (SOUZA et al., 2015), facilidade de filtração de biomassa e à alta taxa de crescimento do fungo (SNYMAN; THERON; DIVOL, 2019), podendo ser sintetizada por fermentação submersa (SmF) ou fermentação em estado sólido (SSF) (CHUTMANOP et al., 2008).

A fermentação em estado sólido (FES) é um bioprocessamento onde os microrganismos, principalmente fungos filamentosos, crescem sobre a superfície de substratos sólidos úmidos na ausência de fluxo livre de água, nos quais seus componentes são hidrolisados por enzimas excretadas pela população microbiana (PANDEY, 2003, COSTA et al., 2018, THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013, SOCCOL et al., 2017). A FES tem sido aplicada na produção de enzimas tais como amilases (AFRISHAM et al., 2016, BERTOLIN; COSTA, PASQUALI, 2001, CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2015), lipases (COLLA et al., 2015), celulases

(BEHERA; RAY, 2016, CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2015), xilanases (BAKIR et al., 2001, CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2015, COSTA, 2016), proteases (AGRAWAL et al., 2004, BASU; BANIK; DAS, 2008, AMADOU et al., 2011, CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2015), além de outros bioprodutos como ácidos orgânicos (DAS; BRAR; VERMA, 2016, DHILLON et al., 2017), compostos fenólicos (DEY; KUHAD, 2014, JANISZEWSKA et al., 2019), corantes (ERYILMAZ.; DURSUN; DALGIÇ, 2016) e biopeptídeos (AYYASH et al., 2019, CHENG et al., 2017, BOUGATEF et al., 2010, JANISZEWSKA et al., 2019). Estudos mostram que pode ser também utilizada para melhorar as propriedades biofuncionais de alimentos e redução de seus componentes antinutricionais, como aumento de solubilidade e digestibilidade e redução do inibidor de tripsina e alérgenos, principalmente da soja (CHI; CHO, 2016, ZHENG, et al., 2009).

A FES é um processamento eficiente, que tem como principais vantagens a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para a ação de microrganismos (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2003, SOCCOL et al., 2017, SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003) e a produção de proteases, biopeptídeos e outros metabólitos em um mesmo processo (RAI et al., 2017, AYYASH et al., 2019, PARK et al.; 2019). Com isso tem-se a redução de custo e tempo de processo, valoração destes resíduos e subprodutos e, conseqüentemente, maior possibilidade de aceitação pela indústria. Os resíduos agroindustriais devem receber grande atenção, pois um terço dos alimentos produzidos no mundo para consumo humano a cada ano é perdido ou desperdiçado (FAO, 2018) e, portanto, a busca de alternativas para sua reutilização e geração de novos produtos é muito importante para reduzir o desperdício da indústria de alimentos e minimizar os impactos ambientais (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar a produção simultânea de proteases e biopeptídeos por *Aspergillus niger*, via FES, utilizando casca e farelo de soja como substratos, visto que o meio utilizado como pode se beneficiar da capacidade hidrolítica das enzimas fúngicas, tornando o processo menos dispendioso e mais atrativo. A protease pode ser aplicada em diversos tipos de indústrias e o biopeptídeos podem ser utilizados na produção de alimentos funcionais ou nutracêuticos, substituição de fármacos sintéticos e desenvolvimento de embalagens inteligentes.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Subprodutos Agroindustriais

Para a preparação do meio de cultivo para a realização da FES, foram utilizados como substratos os subprodutos agroindustriais casca de soja e farelo de soja provenientes da empresa BSBios, localizada em Passo Fundo e farelo de trigo procedente do Laboratório de Cereais da Universidade de Passo Fundo. Os substratos foram mantidos congelados a  $-10^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

Os substratos (farelo e casca de soja) foram avaliados quanto ao teor de carboidratos, proteínas, lipídios, cinzas e umidade, utilizando a metodologia descrita pela AOAC (2005). Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25, as cinzas foram determinadas pelo método gravimétrico em mufla ( $550 - 600^{\circ}\text{C}$ ) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa ( $105^{\circ}\text{C}$ ). Os lipídios foram extraídos empregando a metodologia de Soxhlet, e os carboidratos foram determinados por diferença.

O tamanho de partícula foi determinado pelo método AOAC 965.22 por peneiramento (mesh), utilizando peneiras nos tamanhos: 10 mesh (1,70 mm), 20 mesh (0,850 mm), 28 mesh (0,600 mm), 48 mesh (0,300 mm), 80 mesh (0,180 mm), 140 mesh (0,160 mm) e 170 mesh (0,090 mm).

### 2.2 Microrganismo e preparo de inóculo

O fungo utilizado foi o *Aspergillus niger* O4, proveniente do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo, identificado como *Aspergillus niger* DAOM (100% identity, GenBank accession number: KC545858.1) por Colla et al. (2015). O microrganismo foi armazenado e mantido em meio Ágar Batata Dextrose (ABD), sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este fungo é considerado microrganismo produtor de bioproduto não tóxico e seguro, designado como GRAS (generally recognized as safe) podendo, portanto, ser usado na obtenção de produtos para nutrição humana e animal.

O inóculo para o fungo foi preparado em 100 mL de meio de cultivo ABD previamente esterilizado em autoclave por 20 min a  $121^{\circ}\text{C}$ . O microrganismo foi incubado em estufa por 5 dias a  $30^{\circ}\text{C}$ . Após este período, 50 mL de solução 0,01% de Tween 80 e 3 pérolas de vidro foram adicionados e misturados a fim de obter-se uma suspensão de esporos. Esta

suspensão foi filtrada em gaze e utilizada para a inoculação dos substratos da fermentação em estado sólido.

### 2.3 Delineamento Experimental e preparo de meios

O trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira foram estudadas as variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio inicial. Já na segunda etapa, foi observado o aumento de escala e se a variação do pH resultaria em uma maior produção de metabólitos.

Para a preparação do meio de cultivo para a realização da FES, foram utilizados como substratos os subprodutos agroindustriais casca de soja e farelo de soja, numa proporção de 70:30, determinada por estudos anteriores.

Para a primeira etapa, as variáveis de cultivo estudadas foram: pH (5, 6 e 7), umidade (50%, 60% e 70%) e concentração de fonte de nitrogênio (0,5%, 1,25% e 2%), através de um Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup> com pontos centrais, conforme apresentado na Tabela 1, totalizando 11 experimentos.

**Tabela 1 - Delineamento Composto Central 2<sup>3</sup> utilizado para identificação das variáveis significativas sobre a produção concomitante de proteases e biopeptídeos**

Ensaio	x <sub>1</sub> (pH inicial)	x <sub>2</sub> (Umidade %)	x <sub>3</sub> (Concentração de nitrogênio %)
1	-1 (5)	-1 (50)	-1 (0,5)
2	+1 (7)	-1 (50)	-1 (0,5)
3	-1 (5)	+1 (70)	-1 (0,5)
4	+1 (7)	+1 (70)	-1 (0,5)
5	-1 (5)	-1 (50)	+1 (2)
6	+1 (7)	-1 (50)	+1 (2)
7	-1 (5)	+1 (70)	+1 (2)
8	+1 (7)	+1 (70)	+1 (2)
9	0 (6)	0 (60)	0 (1,25)
10	0 (6)	0 (60)	0 (1,25)
11	0 (6)	0 (60)	0 (1,25)

Fonte: elaborado pelo autor (2020)

Os meios de cultivo foram inoculados com uma suspensão de esporos a fim de obter-se 10<sup>6</sup> esporos/g meio. Os experimentos foram executados em béqueres de 250 mL e incubados em estufa a 30°C durante 7 dias. Amostras de 5 g de cada biorreator foram retiradas a cada 24 h e congeladas a -20°C, para posterior extração dos biocompostos e realização das determinações analíticas.

A segunda etapa do experimento foi constituída por 80 g de meio composto pela melhor condição apresentada na etapa II, com a variação do pH (6, 7 e 8) para avaliar se este fator ainda poderia aumentar a produção de proteases e biopeptídeos. Os experimentos foram executados em béqueres de 500 mL e incubados em estufa a 30°C, por 4 dias. Amostras de 14g de cada biorreator foram retiradas no tempo 0 e 96 horas e congelados a -20°C até a realização da extração e análises.

A correção do pH dos meios de cultivo foi realizada com soluções de NaOH (1 M) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5 M) até o valor de pH desejado para cada biorreator. A cada 40 g de meio de cultivo foram adicionados 30 mL de solução salina, conforme Bertolin et al. (2001) e a umidade foi ajustada com água destilada.

#### **2.4 Extração de proteases e biopeptídeos**

Para a realização da extração de proteases e biopeptídeos, utilizou-se o método conforme Ortiz, et al. (2016), com modificações. Foi coletada 1 g de cada amostra e para 10mL de água destilada e misturados em banho-maria com agitação, a 28°C, 180 rpm, por 1 hora. Após, o conteúdo foi filtrado em algodão e centrifugado 5.000 rpm, por 30 minutos. O sobrenadante foi passado para um frasco de amostra, sendo denominado de extrato e congelado até ser utilizado para as análises.

#### **2.5 Atividade Proteásica**

A atividade da protease foi medida usando azocaseína de acordo com Charney e Tomarelli (1947), com modificações. A reação foi realizada com a incubação a 37°C da mistura contendo 500 µL do extrato com 500 µL de azocaseína a 0,5% (p/v), em tampão pH 7 e interrompida adicionando 500 µL de TCA a 10% . Os tubos de ensaio foram centrifugados a 3.000 rpm durante 10 min. Uma alíquota de 1,0 mL de o sobrenadante foi neutralizada com 1,0 mL de KOH 5 M. Mediu-se a absorvância a 428 nm com um espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,01/min na absorvância a 430 nm, sob as condições de ensaio descritas. O branco da reação foi feito utilizando-se solução tampão pH 7 no lugar do extrato enzimático. Além disso, para cada amostra, fez-se um tubo zero, adicionando-se TCA 10% antes do extrato enzimático.

## 2.6 Atividade Antioxidante

O método ABTS (ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico) descrito por Re *et al.*, (1999), determina a atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS<sup>+</sup>. O radical catiônico ABTS<sup>+</sup> foi preparado a partir da reação da solução estoque de ABTS (7 mmol/L) com a solução de persulfato de potássio (2,45 mmol/L), a uma razão de 1:1 v/v. Essa solução permaneceu em repouso no escuro, a temperatura ambiente, por no mínimo 12 a 16 h antes da utilização.

O espectrofotômetro UV-Vis foi zerado com etanol a 734 nm para a leitura das amostras. Após, a solução ABTS<sup>+</sup> foi diluída em etanol 96° até obter uma absorbância de 0,70 nm (+- 0,05 nm), no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 734 nm.

Em ambiente protegido da luz, foi adicionado 1 mL do radical ABTS diluído em 10 µL da amostra de extrato (10 µL de água destilada para o tubo branco), seguido de homogeneização em agitador por 5 segundos e a solução permaneceu no escuro por 6 minutos para reagir até a leitura das amostras.

O resultado foi descrito de duas formas: a partir de uma curva padrão (Equivalente Trolox) e pelo percentual de inibição do radical ABTS, calculado utilizando a equação 1:

$$\text{Inib (\%)} = \frac{\text{Abs branco} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs do branco}} \times 100 \quad (1)$$

O rendimento (R) de cada biorreator foi calculada pela equação 3:

$$R = pf - p0 \quad (2)$$

Onde, *pf* refere-se ao potencial antioxidante final encontrado no tempo estudado e *p0* ao potencial antioxidante no tempo 0.

Na segunda etapa também foi realizada a determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH. (2,2-difenil-picril-hidrazil) proposto por Brand-Willians, Cuvelier, Berset (1995). Para a realização do teste, com modificações, foi preparada uma solução de 0,1 mM de DPPH com etanol e esta solução foi ajustada entre 0,500 e 0,600 de absorbância a 515 nm. Em tubos de ensaio foi acrescentado 0,1 mL da amostra e 2 mL da solução preparada. Os tubos foram agitados por 3 segundos e acondicionados no escuro por 30 min. A absorbância foi medida 515 nm. A atividade antioxidante é expressa em mmol de Trolox/g de amostra de acordo com a curva padrão preparada previamente.

Foi calculado também o potencial de inibição (PI), pela equação (4). Onde Af é absorvância final e A0 absorvância inicial.

$$PI (\%) = \frac{A0 - Af}{A0} \times 100 \quad (3)$$

## 2.7 Proteínas solúveis em meio ácido

A análise foi feita a partir de alíquotas de 1 mL do extrato da fermentação com adição de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25%, sendo deixadas em repouso por 10 min, para a inativação da protease. Após este procedimento, foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas solúveis do sobrenadante utilizando o método de Folin-Lowry, com a curva padrão, expresso em mg de albumina.

## 2.8 Análise de dados

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). As diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Composição Centesimal dos substratos

As composições centesimais determinadas para os resíduos e subprodutos agroindustriais utilizados como substrato na FES para a produção concomitante de proteases e biopeptídeos estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 27 - Composição Centesimal (%) dos subprodutos agroindustriais utilizados como substrato na FES**

<b>Componente Químico</b>	<b>Farelo de Soja</b>	<b>Casca de Soja</b>
<b>Umidade</b>	11,76±0,75 <sup>a</sup>	6,16±0,07 <sup>b</sup>
<b>Cinzas</b>	5,72±0,05 <sup>a</sup>	4,27±0,06 <sup>b</sup>
<b>Proteínas</b>	40,68±1,81 <sup>a</sup>	9,53±0,21 <sup>c</sup>
<b>Lipídios</b>	2,52±0,27 <sup>b</sup>	2,83±0,14 <sup>b</sup>
<b>Carboidratos</b>	39,32±2,74 <sup>c</sup> *	77,21±0,21 <sup>a</sup> *

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra, numa mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. \*Carboidrato foi calculado pela diferença.

Fonte: elaborado pelo autor (2020)

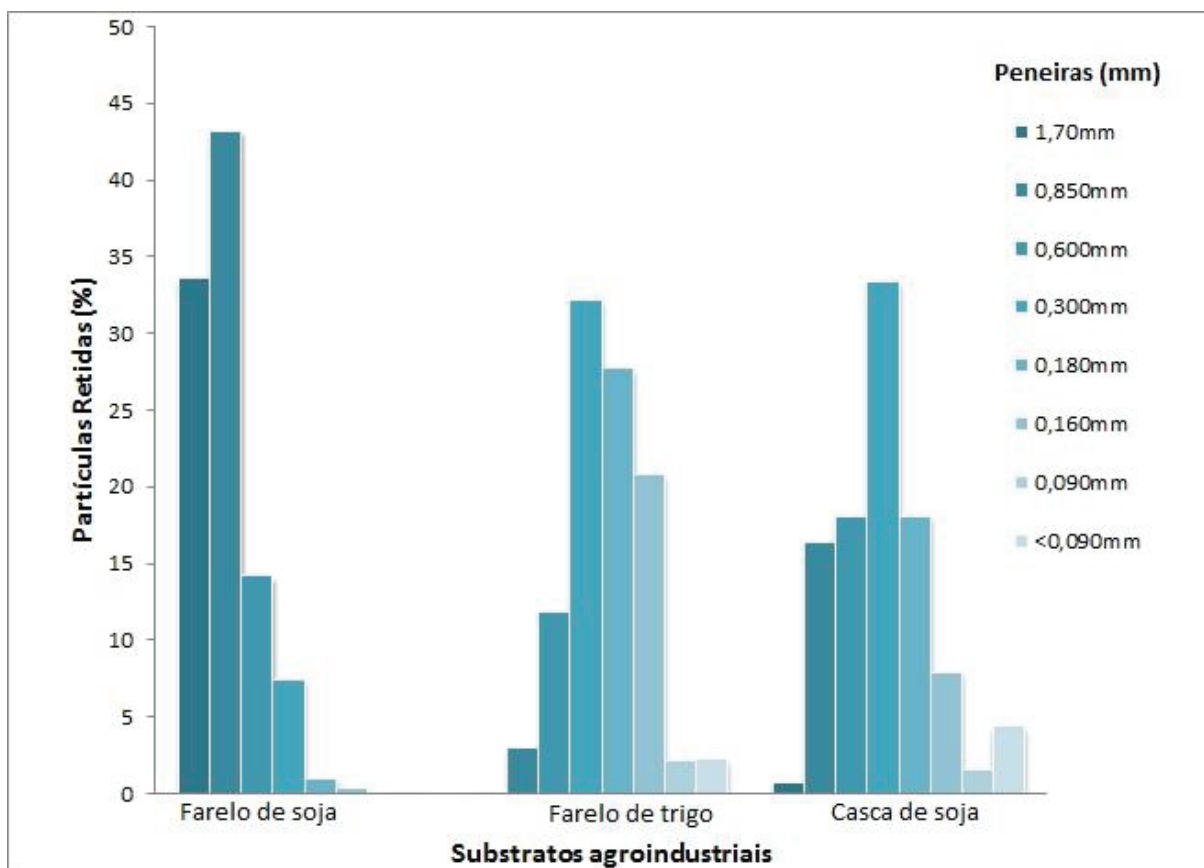
A composição dos substratos utilizados na fermentação em estado sólido é um dos principais fatores que afetam a produção de enzimas e metabólitos pelos microrganismos. Na produção de proteases, uma fonte rica em proteína é importante para induzir a secreção enzimática pelo microrganismo. Por outro lado a relação carbono e nitrogênio (C:N) do substrato, deve estar adequada para que esta fermentação ocorra (DE CASTRO; SATO, 2014).

O farelo de soja foi o substrato que apresentou maior teor de proteínas e a casca de soja apresentou elevado conteúdo de carboidratos, sendo composta por 32,32% de fibras. Resultados semelhantes foram encontrados na ficha técnica do fornecedor.

Com a finalidade de escolher o melhor meio de cultivo com a mistura dos substratos, utilizou-se a proporção de 70% de farelo de soja e 30% de casca de soja, obtendo 34, 80% como a quantidade de proteína total, em base seca.

Outro parâmetro importante a ser considerado na FES é o tamanho de partícula dos substratos, pois está diretamente relacionado com a porosidade e compactação do meio. É necessário um tamanho de partícula que não comprometa o processo, permitindo uma melhor aeração e maior superfície de crescimento microbiano possível. A distribuição de partículas de cada substrato está apresentada na Figura 1, conforme as peneiras utilizadas: 10 mesh (1,70 mm), 20 mesh (0,850 mm), 28 mesh (0,600 mm), 48 mesh (0,300 mm), 80 mesh (0,180 mm), 140 mesh (0,160mm), 170 mesh (0,090 mm) e o fundo, com 200 mesh (<0,090 mm).

Figura 1 - Frações granulométricas dos substratos utilizados na FES por *A. niger* (%)



O farelo de soja apresentou a maior granulometria com predominância de partículas maiores que 1,70 mm (33,58%) e maiores 0,850 mm (43,16%). Partículas entre 0,160 mm e 0,090 mm representam menos de 1%. Com isso, o meio composto de farelo de soja apresenta maior espaço entre as partículas, facilitando a aeração, mas menor área superficial de contato para os microrganismos. A casca de soja e mostrou uma distribuição mais uniforme dos substratos com tamanhos de partículas entre 0,850 mm e 0,180 mm, com predominância de partículas maiores entre 0,300 mm e 0,600mm (33,35%). Com partículas de substrato menores, a casca de soja possibilita uma maior superfície para o crescimento microbiano, entretanto, isso resulta em uma maior possibilidade de compactação do material.

Em um estudo sobre a produção de protease por *A. oryzae* utilizando subprodutos do café como substrato, entre as variáveis observadas, o tamanho de partícula (0,5; 1 e 2 mm) exerceu influência na síntese da enzima. A maior atividade proteásica (7.998 U/g extrato seco) foi constatada no meio com tamanho de partícula de 1mm e a pior de 0,5 mm. Os autores atribuíram este resultado a aeração do leito (MURTHY; NAIDU, 2010). De Castro e Sato (2013) observaram que um tamanho de partícula maior, dificultou a produção de

protease quando utilizaram farelo de soja com 72,9% da sua distribuição granulométrica maior que 1,68 mm.

### 3.2 Etapa I

#### 3.2.1 Atividade Proteásica

O microrganismo *A. niger* foi capaz de digerir o substrato e utilizar as proteínas e outras substâncias disponíveis no meio, como fonte de nutrientes para seu crescimento e produção de metabólitos, fato que pode ser observado pelo aumento da atividade proteásica em 48 horas de fermentação (Tabela 3). De forma semelhante este microrganismo já foi indicado como produtor de enzimas proteases por De Castro et al. (2015). Pel et al. (2007) afirmam que *A. niger* possui um conjunto completo de enzimas para degradar polipeptídeos.

**Tabela 3 - Atividade proteásica ( $U\ g^{-1}$ ) durante a produção de proteases e de biopeptídeos por fermentação em estado sólido por *A. niger***

	0h	24h	48h	72h	96h
<b>E1</b>	0	0	597±4,24 <sup>b</sup>	462±11,31 <sup>b</sup>	315±4,24 <sup>bc</sup>
<b>E2</b>	0 <sup>D</sup>	0 <sup>D</sup>	677±11,31 <sup>aA</sup>	529±1,41 <sup>aB</sup>	426±5,52 <sup>aC</sup>
<b>E3</b>	0	0	214±5,66 <sup>f</sup>	136±2,83 <sup>f</sup>	264±8,49 <sup>cde</sup>
<b>E4</b>	0	0	143±4,24 <sup>g</sup>	115±1,41 <sup>f</sup>	365±41,01 <sup>ab</sup>
<b>E5</b>	0	0	420 <sup>cd</sup>	310±5,66 <sup>d</sup>	233±4,24 <sup>de</sup>
<b>E6</b>	0	0	466±19,8 <sup>c</sup>	379±1,41 <sup>c</sup>	286±11,31 <sup>cde</sup>
<b>E7</b>	0	0	100±8,49 <sup>g</sup>	143±12,73 <sup>f</sup>	116±11,31 <sup>f</sup>
<b>E8</b>	0	0	143±1,41 <sup>g</sup>	195±21,21 <sup>c</sup>	229±18,38 <sup>c</sup>
<b>E9</b>	0	0	406±22,63 <sup>d</sup>	408±8,49 <sup>c</sup>	298±16,97 <sup>cd</sup>
<b>E10</b>	0	0	334±16,97 <sup>e</sup>	410±25,46 <sup>c</sup>	301±9,9 <sup>bc</sup>
<b>E11</b>	0	0	392±14,14 <sup>d</sup>	372 <sup>c</sup>	275±1,41 <sup>cde</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, numa mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância

No tempo zero, ou seja, quando não havia ainda ocorrido a fermentação do substrato e em 24 horas de fermentação, não houve detecção de produção da protease pela análise utilizada. Isto explica-se pelo fato de que neste período inicial o *A. niger* utilizou os nutrientes para sua nutrição, crescimento e manutenção.



A análise realizada com as amostras coletadas com 48 h de fermentação apresentou melhores resultados de atividade proteásica para a maioria dos ensaios, destacando-se o ensaio E2 (50% de umidade, pH 7 e 0,5% de nitrogênio disponível, com  $677 \text{ U g}^{-1}$  de atividade proteásica. Este mesmo ensaio apresentou maior atividade proteásica em 72 e 96 horas, quando comparam-se as médias de todos os ensaios (Tabela 3).

A produção de proteases foi reduzindo conforme o passar do tempo para a maioria dos ensaios. Sugerem-se como possíveis causas a depleção de nutrientes do meio e alteração de pH que podem inibir a síntese da enzima; e o aumento de temperatura do meio devido ao processo de fermentação, na qual pode afetar o metabolismo microbiano (SATTAR et al., 2019).

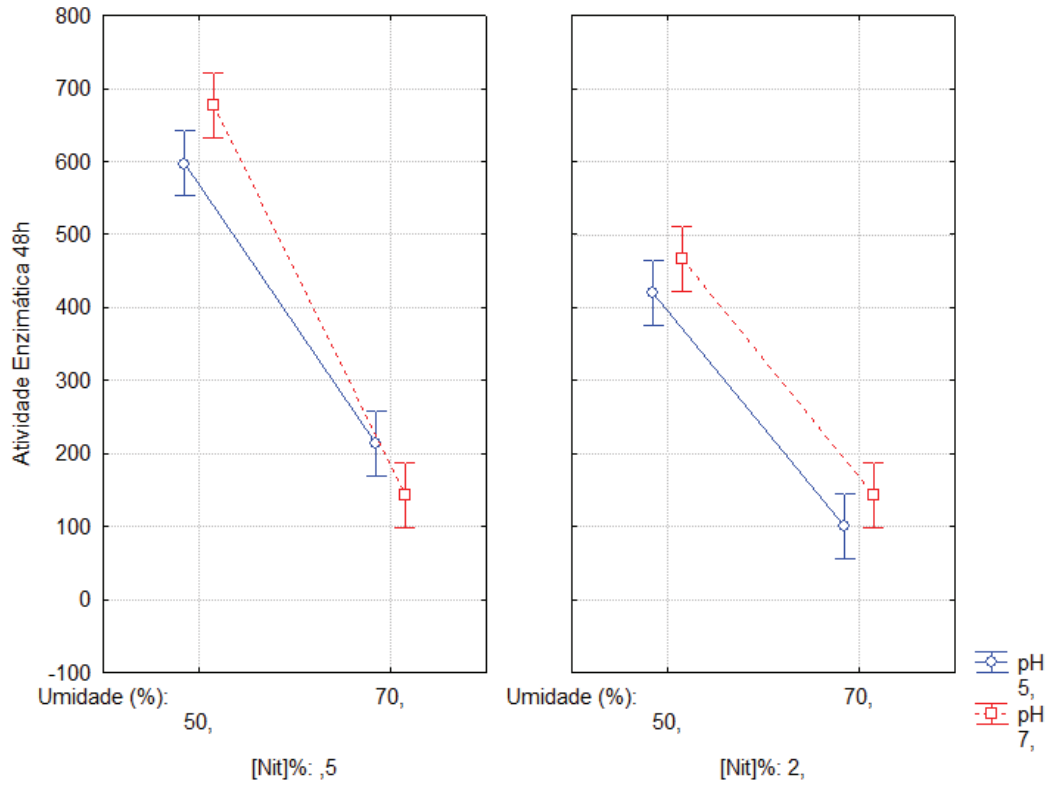
Os menores valores de atividade proteásica, em 48 h, foram observados nos ensaios E4, E7 e E8, com valores de  $143 \text{ U g}^{-1}$ ,  $100 \text{ U g}^{-1}$  e  $143 \text{ U g}^{-1}$ , respectivamente. Estes ensaios possuem como característica comum o meio com maior umidade. Diferente da maioria dos ensaios, nestes casos, E4 e E8 tiveram um aumento da protease durante a fermentação, o que mostra que a alteração das condições do meio levou a diferenças na atividade da protease ao longo do processo. A alta umidade dificultou a produção de protease, mas simultaneamente mostrou que o *A. niger* possui um metabolismo muito versátil, visto que a cepa se adaptou molecular e fisiologicamente ao meio e aumentou a secreção da enzima ao longo da fermentação. Uma umidade muito alta pode resultar na diminuição da porosidade, redução da difusão do oxigênio e da troca gasosa, dificultando a produção de metabólitos (LONSANE, et al., 1985).

A atividade da protease obtida por FES pode variar de 20 a  $50.000 \text{ U g}^{-1}$  (EL-BAKRY et al., 2015). Muitos estudos relatam a produção de protease por *A. niger*, via FES. Purushothaman et al. (2019) produziram protease por *A. niger* utilizando farelo de trigo como substrato e como resultado, obtiveram  $38.362 \text{ U mg}^{-1}$  de atividade proteásica após processos de purificação com sulfato de amônio, filtração em gel e técnicas cromatográficas. De castro et al. (2015) obtiveram atividade proteásica máximas de  $262,78 \text{ U g}^{-1}$  quando utilizaram farelo de trigo e farelo de soja como substrato, em uma FES com 50% de umidade e  $30^\circ\text{C}$  de temperatura de fermentação. Entretanto, Noveli, Barros e Fleuri (2016) não obtiveram atividade proteásica satisfatória quando *A. niger* utilizaram farelo de trigo e farelo de soja como substratos para a FES.

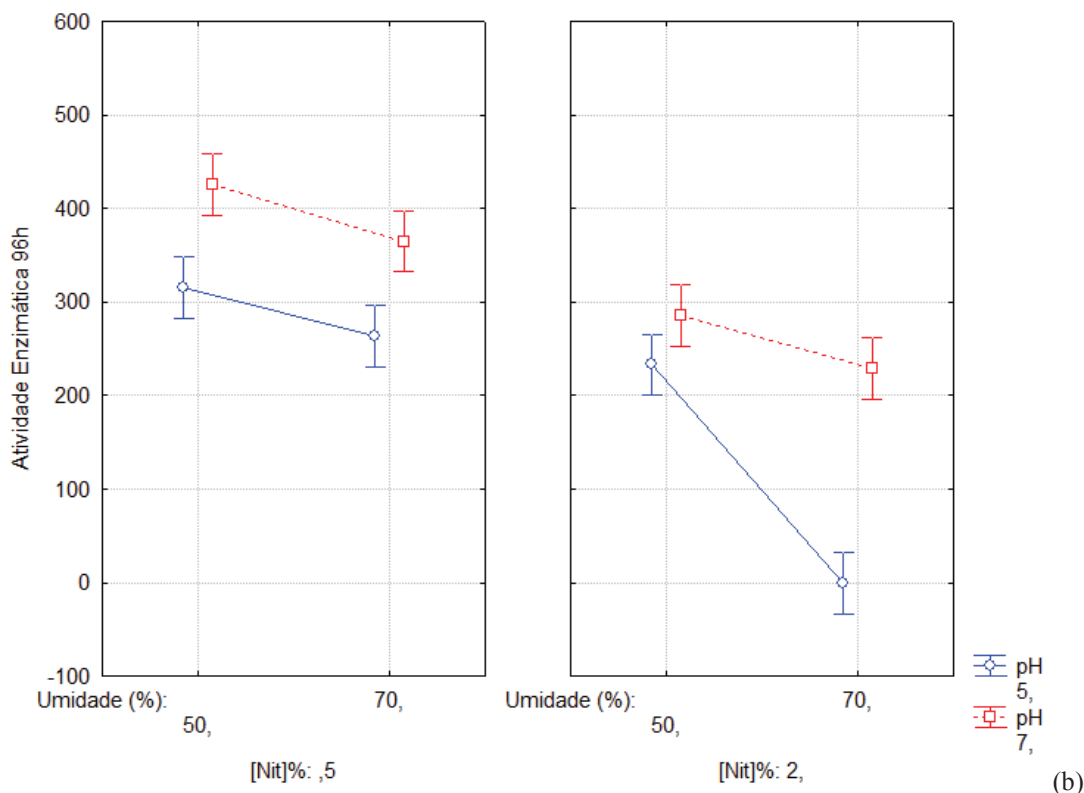
A análise dos resultados de atividade proteásica em 48 h e 96 de fermentação através de análise de variância resultou nos gráficos de interação de médias apresentados nas Figuras 2a e 2b. A interação das três variáveis foi significativa, demonstrando que o maior pH (7),

menor umidade (50%) e menor concentração de nitrogênio (0,5%) mostraram-se mais favoráveis para a produção de protease em 48 h.

**Figura 2 - Atividade proteásica em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio nos tempos de 48 h (a) e 96 h (b) de fermentação em Estado Sólido com o *A. niger* ( $p < 0,05$ )**



(a)



El-Braky et al. (2015) citam estudos que revelam como condições para o processo de produção de protease pH de 6 a 8,5, umidade de 50% e temperatura mesofílica (30°C) até termofílica (50°C), condições semelhantes as encontradas como ideais em nosso experimento.

O pH do meio pode afetar o crescimento e a regulação metabólicas dos microrganismos, visto que são sensíveis à concentração de íons hidrogênio presente no meio (SATTAR et al, 2019). O tipo de protease secretada é diretamente ditada pelo pH do meio (SNYMAN et al., 2019). Um estudo sobre o efeito do pH na atividade da protease produzida por *A. niger*, utilizando diferentes valores de pH (3 a 12), revelou que o pH 7 foi o considerado ideal e a enzima se manteve ativa na faixa de pH 6 e 9, mantendo 60% de sua atividade (BASU, BANIK, DAS, 2008). Pagare et al. (2009) observaram que o pH 8 foi o pH ideal para a atividade de protease produzida por *A. niger* e *B. subtilis*, que apresentou atividade máxima de 26 U mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

A produção de proteases utilizando resíduos de diferentes variedades de arroz como substratos para a FES por *A. niger*, revelou uma maior atividade proteásica de 67,7 U g<sup>-1</sup> sob condições otimizadas para a máxima produção da enzima (34°C, pH 7 e 96 h de fermentação) (PARANTHAMAN, ALAGUSUNDARA, INDHUMATHI, 2009).

A menor concentração de nitrogênio foi favorável para a produção de protease contrariando estudos que indicam que a produção de protease é aumentada por fonte

específica de nitrogênio quando incorporada no meio de fermentação (SATTAR et al., 2019). Este resultado revela que a quantidade de nitrogênio presente no meio, composto por casca e farelo de soja, é praticamente suficiente para a produção de protease, não sendo necessária uma grande suplementação, visto que os subprodutos utilizados possuem uma alta concentração de proteínas, principalmente o farelo de soja, com 40,68%, avaliado em análises anteriores.

### 3.2.2 Atividade Antioxidante

Durante a fermentação, a atividade proteolítica fúngica leva a liberação de peptídeos que podem exercer a função de eliminação de radicais livres de compostos, alimentos ou do organismo, conhecida como atividade antioxidante. Observou-se que o meio exerceu influência sobre a variável resposta, mostrando diferenças significativas entre eles ( $p < 0,05$ ) e os resultados podem ser encontrados na Tabela 4.

**Tabela 4 - Atividade antioxidante (Equiv. Trolox mg/mL) durante a produção de proteases e de biopeptídeos por fermentação em estado sólido por *A. niger***

	0h	24h	48h	72h	96h
E1	886,29±26,65	949,11±17,77	1692,97±33,32 <sup>c</sup>	1589,28±6,66 <sup>cd</sup>	2607,03±6,66 <sup>bc</sup>
E2	806,19±19,99	1201,97±33,31	1952,11±39,98 <sup>ab</sup>	2178,26±53,31 <sup>b</sup>	2875,6±13,33 <sup>ab</sup>
E3	672,69±48,86	949,11±35,54	1259,49±33,31 <sup>d</sup>	1221,8±33,32 <sup>f</sup>	1768,35±33,32 <sup>f</sup>
E4	851,53±26,65	1203,54±17,77	1377,29±53,31 <sup>d</sup>	1410,27±19,99 <sup>c</sup>	2263,08±26,65 <sup>dc</sup>
E5	933,4±26,65	1302,48±46,64	1787,2±59,97 <sup>bc</sup>	1678,83±39,98 <sup>c</sup>	2738,95±86,62 <sup>abc</sup>
E6	1134,46±48,86 <sup>E</sup>	1299,34±2,22 <sup>D</sup>	2013,36±19,99 <sup>aC</sup>	2371,44±6,66 <sup>aB</sup>	2988,67±93,29 <sup>aA</sup>
E7	660,13±17,76	1018,21±4,44	1047,47±79,96 <sup>e</sup>	1207,67±66,63 <sup>f</sup>	1895,57±66,63 <sup>f</sup>
E8	919,27±19,98	1190,97±22,21	1410,27±46,64 <sup>d</sup>	1462,1±66,63 <sup>de</sup>	2215,96±39,98 <sup>e</sup>
E9	1082,6±11,11	1381±11,11	1711,81±59,97 <sup>e</sup>	1537,48±13,33 <sup>cde</sup>	2541,06±15,32 <sup>cd</sup>
E10	1076,32±33,31	1376,29±4,44	1716,52±66,63 <sup>e</sup>	1561,04±59,97 <sup>cde</sup>	2483,47±13,32 <sup>c</sup>
E11	1136±2,22	1376,16±31,1	1711,81±46,64 <sup>e</sup>	1565,75±26,65 <sup>cde</sup>	2771,93±10,66 <sup>abc</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, numa mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância

Pode-se observar que no tempo inicial, os ensaios já apresentarem potencial antioxidante, visto que os substratos componentes dos meios já possuem substâncias com esta capacidade. A soja é um alimento considerado funcional, e possui ação antioxidante devido a

presença das proteínas e polifenóis, como flavonóides, isoflavonas e ácidos fenólicos (LEE et al., 2015). A FES pode melhorar estas propriedades funcionais pela hidrólise de proteínas e polifenóis, produzindo peptídeos e polifenóis livres, respectivamente.

Os fermentados exibiram diferentes atividades antioxidantes e o melhor potencial foi encontrado em 96 h de fermentação, revelando que o processo aumentou a concentração de compostos antioxidantes ao longo do tempo (Tabela 4). Os ensaios que apresentaram melhor desempenho foram E2, E5 e E6 que possuem em comum a baixa umidade do meio. Entretanto quando se analisa o rendimento da atividade antioxidante, do tempo analisado subtraída da atividade antioxidante do tempo inicial, verificou-se que o ensaio E2 (pH 7, umidade de 50% e 0,5% de nitrogênio), apresentou melhor comportamento, com um aumento de 256, 69%. Estas mesmas condições também foram consideradas as ideais ao analisar a atividade proteásica e formação de proteínas solúveis, correlacionando a hidrólise enzimática à formação de peptídeos antioxidante.

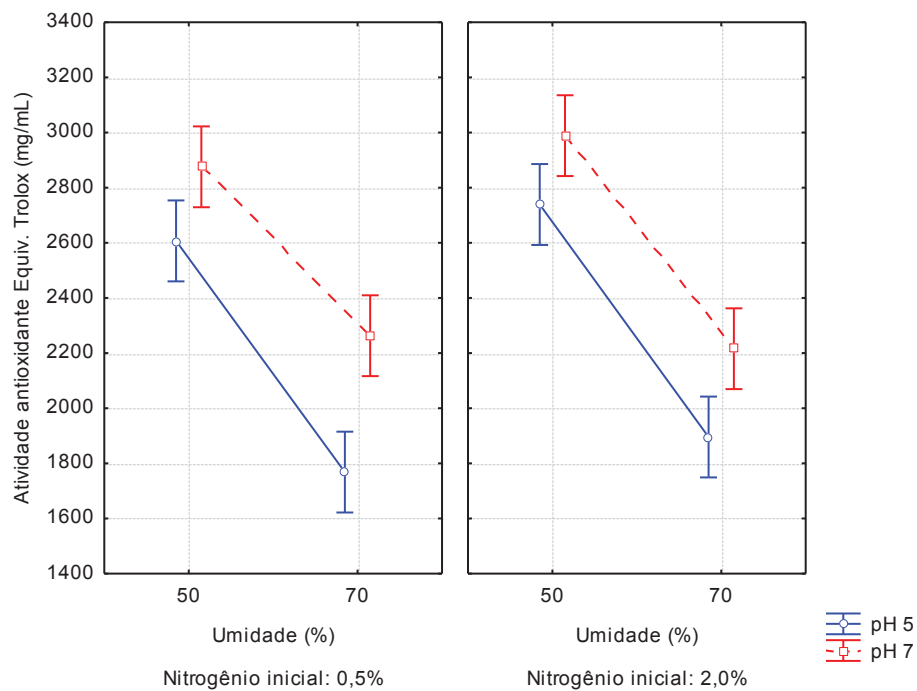
Há a dificuldade de comparação da atividade antioxidante com dados de literatura devido às diferenças de substratos, microrganismos, métodos de extração e variáveis apresentadas. Janiszewska et al. (2019) avaliaram a fermentação da quinoa por *R. oligosporus*, *N. intermedia* e *A. oryzae* e observaram que no primeiro estágio de fermentação *R. oligosporus* e *N. intermedia* se mostraram mais eficiente na produção de antioxidantes. Após 4 dias, o *R. oligosporus* ainda aumentou em 66% sua atividade antioxidante, correspondida ao aumento de peptídeos e aminoácidos, visto que reduziu os compostos fenólicos neste tempo de fermentação.

Chi e Cho (2016) verificaram na fermentação de farelo de soja que *B. amyloliquefaciens* U304 exerceu melhor atividade antioxidante em relação a remoção do ABTS+ quando comparado ao substrato não fermentado e a outros microrganismos estudados. Os fermentados por *L. acidophilus* e *L. plantarum* apresentaram menor atividade que o não fermentado e *S. cerevisiae* mostrou atividade semelhante, fatos que mostram que a força da protease secretada pelo microrganismo pode afetar a bioatividade e as propriedades físico-químicas do fermentado

A análise dos dados de atividade antioxidante pela análise de variância indicou que houve interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre duas das variáveis estudadas (umidade, pH e concentração de nitrogênio inicial) no tempo de 96 h de fermentação, por ANOVA e tabela de efeitos das variáveis ( $p < 0,05$ ), no ensaio de atividade antioxidante, foi observado que os parâmetros que exercem influência na atividade antioxidante em 96 horas foram pH e umidade. Quanto menor a umidade e maior o pH, melhor é a atividade antioxidante. Para

construir a superfície de resposta, foram considerados apenas os coeficientes significativos das variáveis independentes e confirma que quanto maior o pH e menor a umidade, maior é a atividade antioxidante (Figura 3).

**Figura 3 - Atividade antioxidante em equivalente Trolox (mg/mL) em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 96 h de fermentação em Estado Sólido com o *A. niger***



### 3.2.3 Proteínas Solúveis

A protease produzida pelo *A. niger* durante a FES levou à decomposição de proteínas complexas em formas mais simples e solúveis. Os hidrolisados de farelo e casca de soja fermentados apresentaram aumento da proteína solúvel em TCA durante a fermentação, o que reflete a hidrólise da proteína de soja durante o processo (Tabela 5). Na fermentação, as proteínas são degradadas em peptídeos por endoproteases, que então são degradados em aminoácidos livres por exoproteases (LIU et al., 2017).

Tabela 5 – Concentração de proteínas solúveis ( $\mu\text{g/mL}$ ) produzidas durante a FES por *A. niger*

Ensaio	0h	24h	48h	72h	96h
E1	1926,49 $\pm$ 6,03 <sup>E</sup>	2511,26 <sup>D</sup>	3685,07 $\pm$ 78,47 <sup>cdB</sup>	3249,7 $\pm$ 6,03 <sup>cdC</sup>	3898,49 $\pm$ 6,03 <sup>bA</sup>
E2	1559,41 $\pm$ 18,11 <sup>D</sup>	2455,77 $\pm$ 6,03 <sup>C</sup>	4154,6 $\pm$ 30,18 <sup>aA</sup>	3723,49 <sup>bb</sup>	4090,57 <sup>aA</sup>
E3	1320,38 $\pm$ 18,11	2216,74 $\pm$ 6,03	2515,53 $\pm$ 18,11 <sup>E</sup>	2489,92 $\pm$ 6,03 <sup>f</sup>	2191,13 $\pm$ 6,03 <sup>i</sup>
E4	1102,69 $\pm$ 72,43	2156,99 $\pm$ 30,18	2643,58 $\pm$ 6,04 <sup>E</sup>	2331,99 $\pm$ 60,36 <sup>f</sup>	1666,12 $\pm$ 60,36 <sup>j</sup>
E5	1495,38 $\pm$ 60,36	2067,35 $\pm$ 36,22	3023,47 $\pm$ 24,15 <sup>e</sup>	2763,09 $\pm$ 6,03 <sup>e</sup>	3642,19 $\pm$ 30,18 <sup>e</sup>
E6	1696 $\pm$ 6,04	2293,57 $\pm$ 6,04	3313,72 $\pm$ 12,07 <sup>d</sup>	3975,32 $\pm$ 6,03 <sup>a</sup>	2711,88 $\pm$ 18,11 <sup>E</sup>
E7	1410,02 $\pm$ 12,07	1999,05 $\pm$ 60,36	2865,54 $\pm$ 54,33 <sup>f</sup>	2831,39 $\pm$ 12,76 <sup>e</sup>	2370,41 $\pm$ 30,18 <sup>h</sup>
E8	1277,7 $\pm$ 42,26	1981,98	3219,82 $\pm$ 24,15 <sup>d</sup>	3177,13 <sup>d</sup>	2707,61 $\pm$ 60,36 <sup>E</sup>
E9	1589,29	2972,25	3945,44 $\pm$ 12,07 <sup>b</sup>	3207,01 $\pm$ 18,11 <sup>d</sup>	3441,07 $\pm$ 72,44 <sup>d</sup>
E10	1529,53 $\pm$ 12,07	2831,29 $\pm$ 42,25	3843 $\pm$ 60,36 <sup>b</sup>	3403,36 $\pm$ 6,04 <sup>e</sup>	3040,81 $\pm$ 6,04 <sup>f</sup>
E11	1529,53 $\pm$ 48,29	2566,75 $\pm$ 30,18	3633 $\pm$ 6,03 <sup>e</sup>	3219,82 $\pm$ 12,07 <sup>d</sup>	3228,35 <sup>e</sup>

Valores médios  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Médias seguidas de mesma letra maiúscula, numa mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Os melhores resultados foram observados em 48 h e 96 h (Tabela 5). Em alguns ensaios, houve uma redução na quantidade de proteínas solúveis no tempo de 72 h, fato que pode ser explicado pela utilização, pelo fungo, de aminoácidos e pequenos peptídeos como forma de nutrição. Posteriormente, pela ação da atividade enzimática, pequenos peptídeos foram novamente formados.

O melhor ensaio em 48 e 96 horas foi o E2 composto por pH 7, umidade de 50% e 0,5% de nitrogênio, o mesmo ensaio que obteve melhor atividade proteásica e atividade antioxidante. Em 48 horas o aumento foi de 166,49% e em 96 horas de 162,32%. No tempo de 72h o ensaio com melhor desempenho foi o E6, com um acréscimo de 134,39% e diferencia do E2 apenas na quantidade de nitrogênio (2%). Com isso, a baixa umidade e pH mais neutro mostraram-se como características propícias para a hidrólise das proteínas.

O tamanho dos peptídeos é um fator significativo e diretamente relacionado com a atividade antioxidante e outras propriedades funcionais dos hidrolisados. Diante deste fato, os níveis de proteólise são frequentemente avaliados por meio da quantificação de peptídeos solúveis em meio com ácido tricloroacético (TCA) (DE CASTRO; SATO, 2015). Este parâmetro indica a formação de pequenos peptídeos e aminoácidos, além de possuir uma correlação significativa e positiva com grau de hidrólise ( $p < 0,05$ ) (ZHOU et al., 2012).

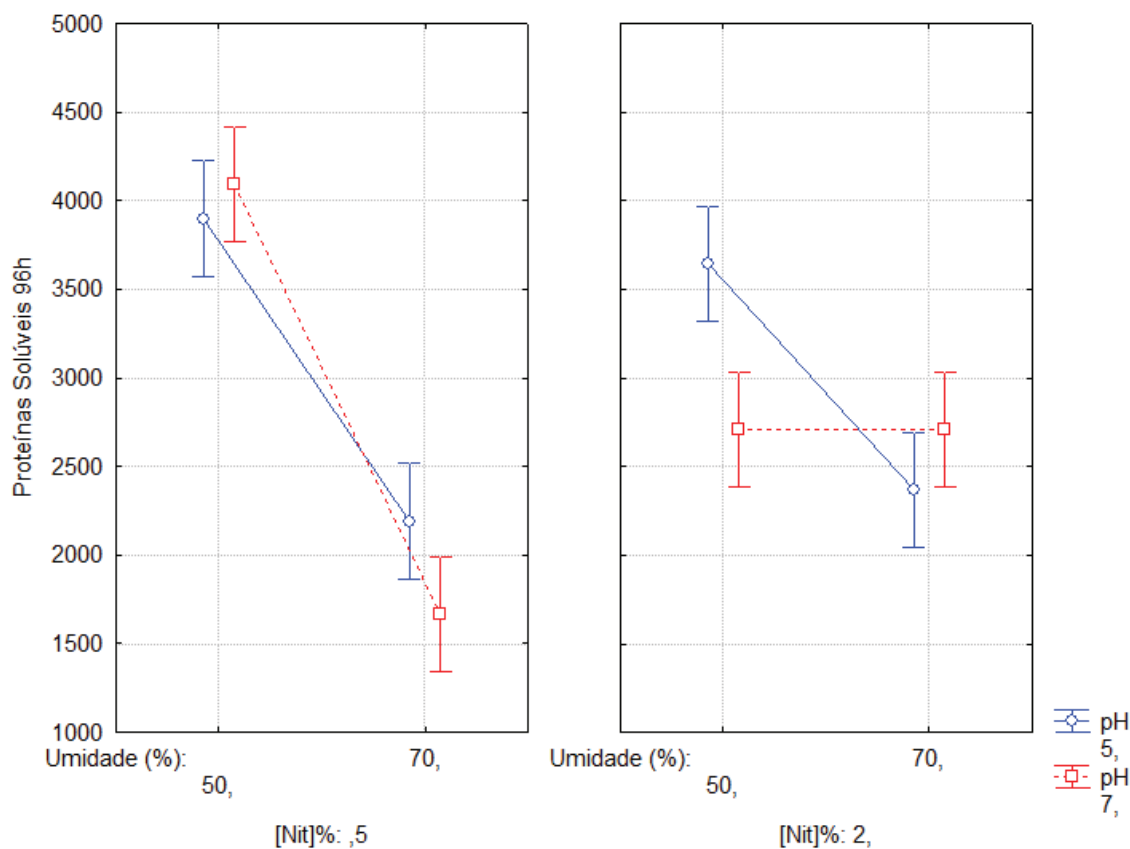
Além disso, a análise de proteína solúvel em meio ácido é utilizada para atestar que o potencial antioxidante é devido ao aumento das proteínas solúveis e não do incremento de

outros compostos, visto que Sanjukta et al. (2015) estudou a FES de soja por *B. subtilis* e comprovou o aumento tanto de compostos fenólicos livres pela produção de  $\beta$ -glucosidade, quanto de biopeptídeos, pela produção de proteases, durante a fermentação; Wen e Chen (2011) relataram o aumento do grau de hidrólise de proteínas, via FES por *R. oligosporus* e *B. subtilis* e Dey e Kuhad (2014) constataram o aumento de compostos fenólicos por meio de FES, por *R. oryzae*, utilizando trigo como substrato. Um estudo demonstrou que a concentração de proteína solúvel de farelo de soja fermentado por *B. amyloliquefaciens* U304 aumentou significativamente, sugerindo que esta cepa melhora a propriedade hidrofílica do composto através do processo de hidrólise (CHI, CHO, 2016). Rai et al. (2017) realizaram uma FES da soja, utilizando diferentes linhagens de *B. subtilis* para a produção de compostos antioxidantes. Os hidrolisados de soja fermentados apresentaram alta proteína solúvel em TCA durante a fermentação, o que reflete a hidrólise da proteína de soja durante a fermentação. A hidrólise também resultou em aumento da atividade de eliminação do radical DPPH (atividade antioxidante).

Ao observar o comportamento das três variáveis apresentadas durante 96 horas de fermentação, por ANOVA e Tabela de efeitos das variáveis ( $p < 0,05$ ), verificamos que igualmente à atividade da protease, a interação entre umidade, percentual de nitrogênio e pH é significativa. Quando foi utilizado a menor quantidade de nitrogênio (0,5%), maior pH (7) e menor umidade (50%), na fermentação, obtêm-se maiores concentrações de proteínas solúveis final (Figura 4). Sugere-se que as mesmas condições que favorecem a atividade proteásica, permitem uma maior hidrólise e, conseqüentemente, a formação de pequenos peptídeos.



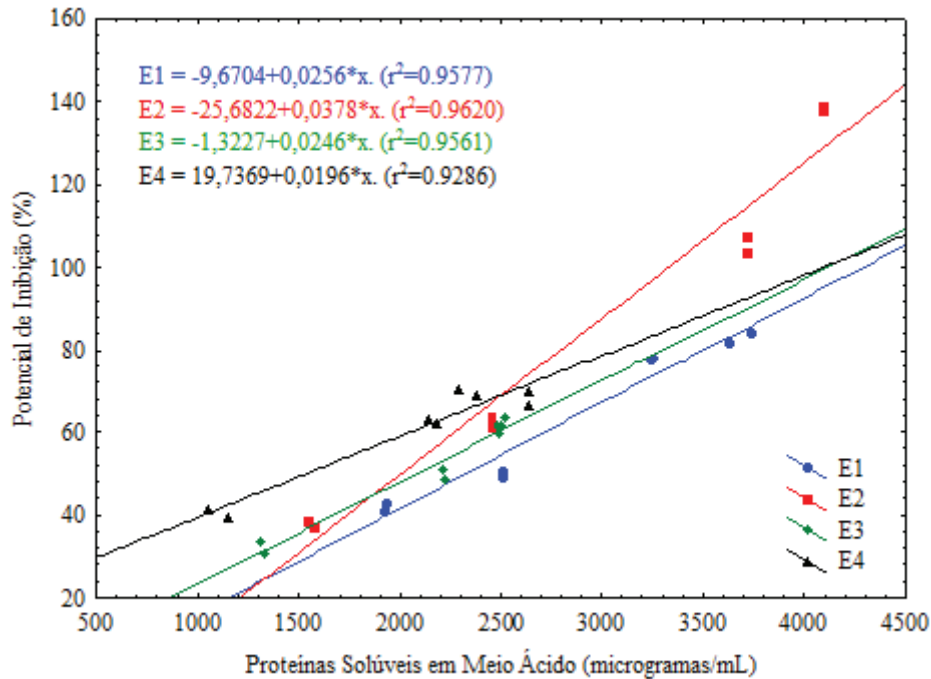
**Figura 4 - Proteínas solúveis ( $\mu\text{g/mL}$ ) em função das variáveis pH, umidade e concentração de nitrogênio em 96 h de Fermentação em Estado Sólido com o *A. niger***



### 3.2.4 Correlação entre Proteínas solúveis em meio ácido e Atividade Antioxidante

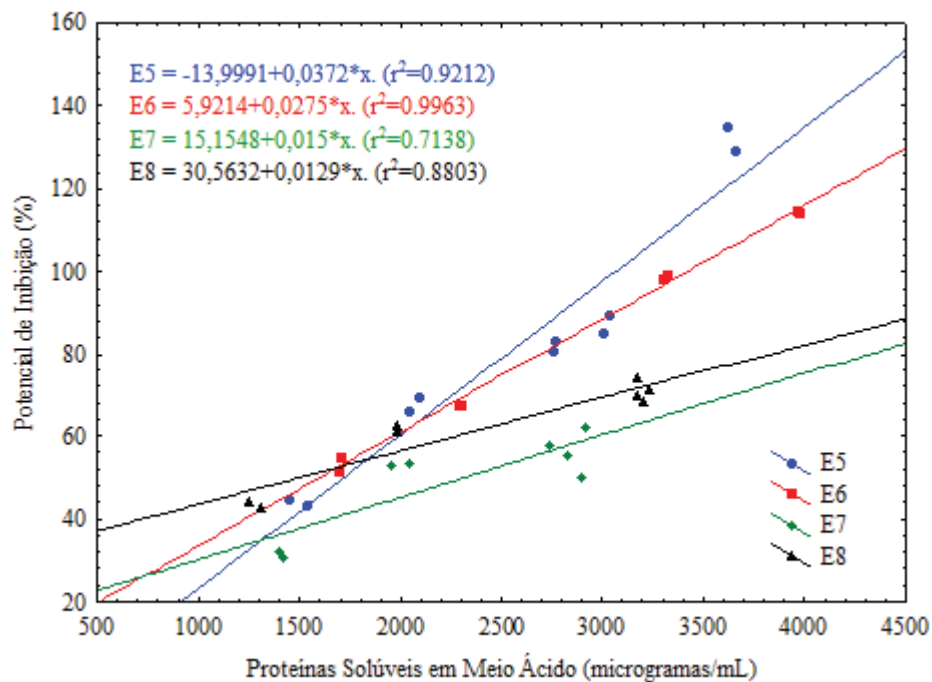
Verificando-se a correlação entre aumento da concentração de proteínas solúveis em meio ácido e potencial antioxidante dos ensaios, tem-se uma correlação significativa, alta e positiva para a maioria dos ensaios, conforme Figuras 5 a 7. Esta relação, entre proteínas solúveis e percentual de inibição da oxidação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio, demonstra que o aumento de peptídeos menores levou ao acréscimo da atividade antioxidante, comprovando a produção de biopeptídeos antioxidantes ao longo da fermentação.

**Figura 5 - Correlação entre concentração de proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g/mL}$ ) e potencial de inibição da oxidação de radicais livres (%) dos meios fermentados (Ensaio 1 a 4).**



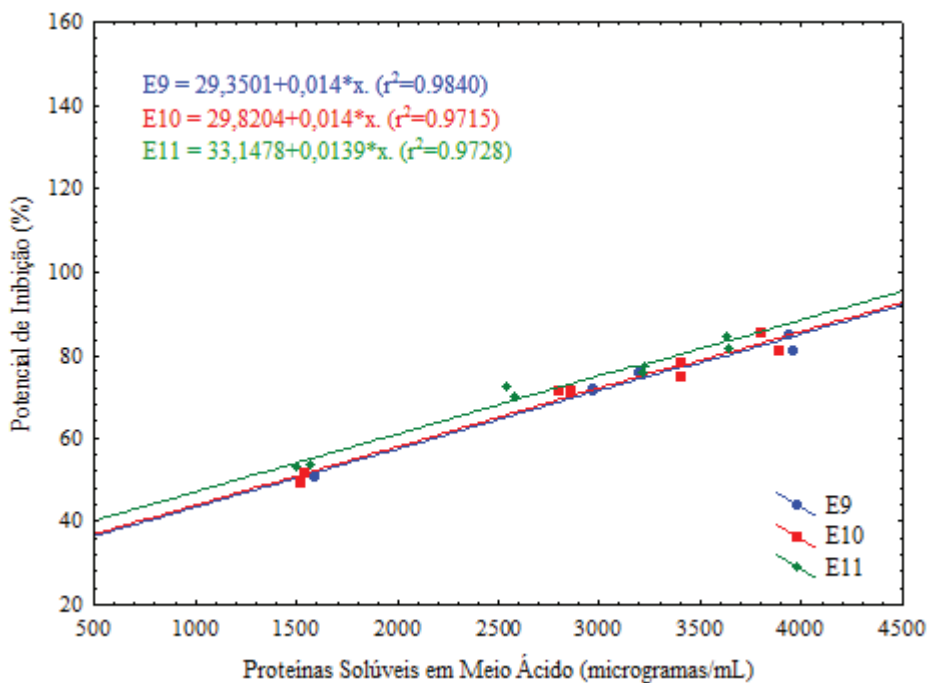
E1: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E2: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 0,5%; E3: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 0,5%; E4: pH7, Umidade 70, Nitrogênio 0,5%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

**Figura 6 - Correlação entre concentração de proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g/mL}$ ) e potencial de inibição da oxidação de radicais livres (%) dos meios fermentados (Ensaio 5 a 8).**



E5: pH5, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E6: pH7, Umidade 50%, Nitrogênio 2%; E7: pH5, Umidade 70%, Nitrogênio 2%; E8: pH7, Umidade 70%, Nitrogênio 2%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Figura 7 - Correlação entre concentração de proteínas solúveis em meio ácido ( $\mu\text{g/mL}$ ) e potencial de inibição da oxidação de radicais livres (%) dos meios fermentados (Ensaio 9 a 10).



E9, E10 e E11: pH6, Umidade 60%, Nitrogênio 1,25%. Fonte: elaborado pelo autor (2020).

### 3.3 Etapa II

#### 3.3.1 Atividade Proteásica

Ao estudar o pH nesta etapa do processo, foi observado que esta variável não influenciou a atividade proteásica durante a fermentação e em todos os ensaios obteve-se uma boa atividade proteásica e estatisticamente semelhantes (Tabela 6).

Tabela 628 - Atividade proteásica em 0 e 96 h ( $\text{U g}^{-1}$ ) de fermentação em estado sólido por *A. niger*

ENSAIO	0h(UAE/g)	96h (UAE/g)
pH6	0	467,5 $\pm$ 10,6 <sup>a</sup>
pH7	0	479 $\pm$ 18,4 <sup>a</sup>
pH8	0	433 $\pm$ 18,4 <sup>a</sup>

Valores médios  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Na etapa anterior deste experimento, observamos que em 96 horas de fermentação, o ensaio 2, composto por 50% de umidade, concentração de nitrogênio de 0,5% e pH 7, obteve como resultado  $426 \text{ U g}^{-1}$  de atividade proteásica, resultado ligeiramente menor que o observado nesta etapa ( $479 \text{ U g}^{-1}$ ), quando utilizadas as mesmas condições, entretanto, com maior quantidade de substrato. Observa-se, neste caso, um efeito positivo no aumento de escala do meio.

Ao compararmos ainda o ensaio 1, da etapa 2, composto por pH 5, 50% umidade e 0,5% de concentração de nitrogênio, com  $315 \text{ U g}^{-1}$  de atividade proteásica, verifica-se que o maior pH (6, 7 e 8) e maior quantidade de substrato obtiveram uma maior atividade enzimática no mesmo tempo de fermentação.

### 3.3.2 Proteínas Solúveis

A tabela 7 pode-se verificar que a fermentação em 96 horas resultou em concentrações de proteínas solúveis diferentes entre os ensaios, revelando o pH 7 com maior quantidade de proteínas solúveis. Entretanto, ao observar a quantidade de proteína solúvel inicial, todos os ensaios obtiveram o mesmo rendimento e, portanto, são estatisticamente semelhantes, fato que pode ser explicado pela atividade proteásica verificada anteriormente.

**Tabela 7 - Concentração de proteínas solúveis ( $\mu\text{g/mL}$ ) e Rendimento (final - inicial) na fermentação em estado sólido por *A. niger***

ENSAIO	0h	96h	Rendimento
<b>pH6</b>	1064,28±30,2 <sup>c</sup>	2865,54±66,4 <sup>b</sup>	1801,26±36,2 <sup>a</sup>
<b>pH7</b>	1320,38±18,1 <sup>a</sup>	3138,72±18,1 <sup>a</sup>	1818,34 <sup>a</sup>
<b>pH8</b>	1205,13±12,1 <sup>b</sup>	3014,93 <sup>ab</sup>	1809,8±12,1 <sup>a</sup>

Valores médios  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância

Ao compararmos estes resultados com os ensaios 1 (pH5, umidade 50% e 0,5% nitrogênio) e 2 (pH7, 50% umidade e 0,5% nitrogênio) da primeira etapa deste experimento, com  $3898,49 \mu\text{g/mL}$  e  $4090,57 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, observamos uma menor formação de proteínas solúveis, com 96 horas de fermentação. Este resultado revela que uma maior atividade proteásica, não necessariamente, nos leva a maior hidrólise e formação de menores peptídeos. Um fator que pode influenciar na atuação das enzimas sobre as proteínas é a

aeração que foi menor nesta etapa do processo, o que levou a uma aglomeração do meio, aumento de temperatura e menor hidrólise enzimática.

A temperatura é um fator crítico e o acúmulo do calor metabólico gerado, juntamente com a baixa condutividade térmica de diversos substratos, pode gerar diferentes gradientes de temperatura no biorreator. Além da temperatura, a aeração é importante para transferência de gases com a eliminação de dióxido de carbono. Há diversas formas de obter uma aeração no meio: uso de substrato poroso medianamente granulado ou fibroso, pequena espessura de cama de substrato, utilização de reatores de bandejas perfuradas, agitação do substrato ou ainda introdução de ar forçado estéril dentro do reator (LONSANE et al., 1985).

Entretanto, no início do processo, a quantidade de proteínas solúveis no meio era inferior ao encontrado na etapa 1, fato que pode ser explicado pela diferença na amostra inicial, no momento da produção do meio ou pelo maior ou menor tempo de autoclavagem do meio que expõe as frações hidrofóbicas das proteínas, reduzindo a solubilidade inicial.

### 3.3.3 Atividade Antioxidante

A análise da atividade antioxidante pelo método ABTS demonstrou que quanto maior o pH, melhor a atividade antioxidante e melhor o potencial de inibição do radical livre. (Tabela 8), sendo os ensaios com pH 7 e 8 iguais. Mesmo resultado foi confirmando pela análise do rendimento, quando leva-se em consideração o valor final e inicial, conforme figura 8.

**Tabela 8 - Atividade antioxidante em Equiv. Trolox (mg/mL) e potencial de inibição (%) por ABTS em 0 e 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

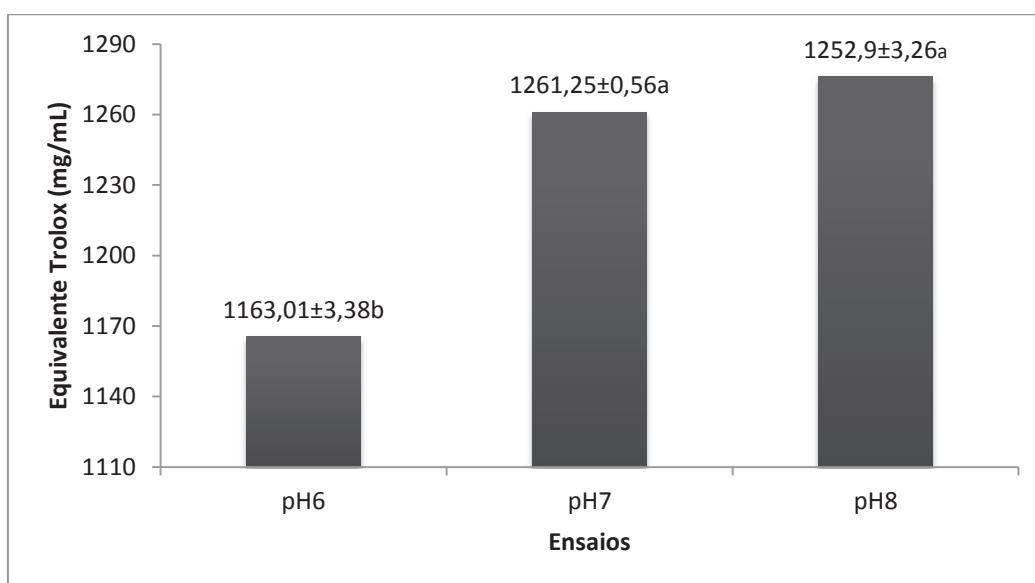
ENSAIO	E. Trolox 0h	E. Trolox 96h	Pot. Inibição 0h	Pot. Inibição 96
<b>pH6</b>	332,11 <sup>c</sup>	1495,12±3,4 <sup>b</sup>	31,31 <sup>c</sup>	142,73±0,3 <sup>b</sup>
<b>pH7</b>	417,63±2,8 <sup>b</sup>	1678,88±3,4 <sup>a</sup>	39,34±0,3 <sup>b</sup>	159,97±0,3 <sup>a</sup>
<b>pH8</b>	461,78±2,3 <sup>a</sup>	1714,68±3,4 <sup>a</sup>	43,47±0,2 <sup>a</sup>	163,33±2,8 <sup>a</sup>

Valores médios ± desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Na etapa 1 deste experimento, os ensaios 1 (50% umidade, pH5 e 0,5% nitrogênio) e 2 (pH7, 50% umidade e 0,5% de nitrogênio) obtiverem maior atividade antioxidante, em equivalente Trolox (mg/mL), com 96 horas de fermentação, com valores de 2.607,03 mg/mL e 2.875,6 mg/mL, respectivamente. Entretanto, no início do processo, o meio também obteve

maior atividade antioxidante, nesta primeira etapa. Sendo assim, ao analisarmos o potencial de inibição da oxidação das espécies reativas de oxigênio, que leva em consideração este valor inicial encontrado antes da FES, esta segunda etapa obteve valores semelhantes, ligeiramente maiores. Enquanto o ensaio 2 da primeira etapa demonstrou 138,5% de PI, o ensaio com as mesmas características, nesta segunda etapa, atingiu o valor de 159,97%.

**Figura 8 - Rendimento da Atividade antioxidante (final - inicial) em Equivalente Trolox (mg/mL) por ABTS em fermentação em estado sólido por *A. niger***



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

Nesta etapa, foi realizado também o ensaio DPPH que é um dos métodos mais antigos para determinar a atividade antioxidante para se descobrir os doadores de hidrogênio em substâncias naturais.

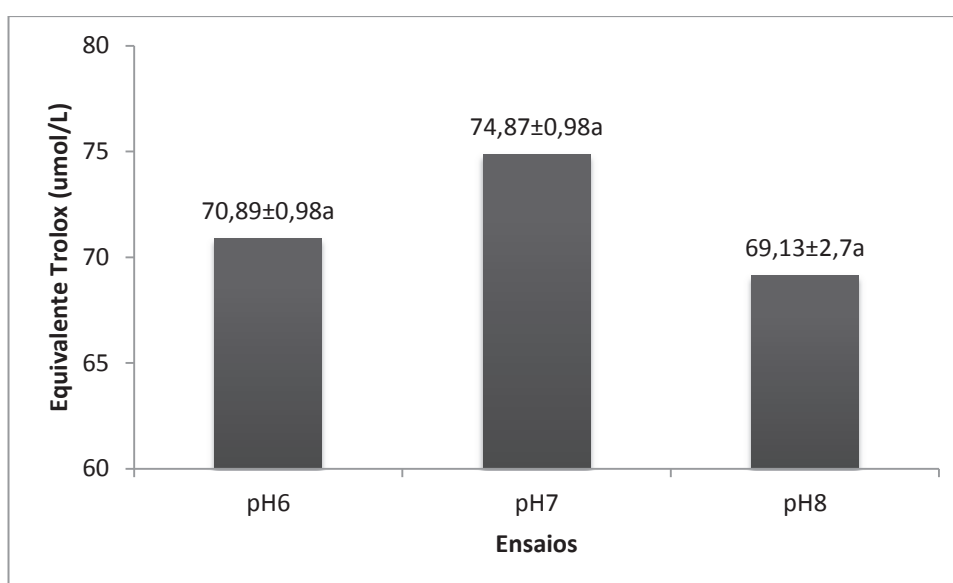
Por este método, no tempo zero, sem fermentação, não detectou ou se obteve uma baixa atividade antioxidante, diferentemente do método ABTS. Em 96 horas de fermentação todos os ensaios mostraram-se estatisticamente iguais. Entretanto o potencial de inibição das espécies reativas do metabolismo do oxigênio foi menor que o revelado pelo método ABTS (Tabela 9). Quando avalia-se o valor inicial e final do DPPH, é possível observar que o ensaio com pH 7 possui um rendimento maior que os demais, mas são considerados estatisticamente iguais (Figura 9).

**Tabela 9 - Atividade antioxidante em Equiv. Trolox ( $\mu\text{mol/L}$ ) e potencial de inibição (%) por DPPH em 0 e 96 h de fermentação em estado sólido por *A. niger***

ENSAIO	Equiv. Trolox 0h	Equiv. Trolox 96h	Pot. Inibição 0h	Pot. Inibição 96 h
pH6	3,71 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	74,60 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	7,14 <sup>a</sup>	44,23 <sup>a</sup>
pH7	0	74,86 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	0	44,36 <sup>a</sup>
pH8	0	69,13 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	0	41,36 <sup>a</sup>

Valores médios  $\pm$  desvio padrão. Médias seguidas de mesma letra minúscula, numa mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Figura 9 - Rendimento da atividade antioxidante (final – inicial) em Equivalente Trolox ( $\mu\text{mol/L}$ ) por DPPH em fermentação em estado sólido por *A. niger***



Fonte: elaborado pelo autor (2020).

#### 4 CONCLUSÃO

A fermentação em estado sólido por *A. niger* é um bioprocesso que demonstrou ser viável para a produção simultânea de proteases e biopeptídeos antioxidantes. Além disso, a FES possibilita o uso de diferentes tipos de resíduos agroindustriais e a utilização de uma variedade de microrganismos, resultando em baixo custo, aumento do valor agregado de subprodutos e formação de produtos com características distintas.

No estudo das variáveis: pH (5, 6 e 7), umidade (50, 60 e 70%) e quantidade de nitrogênio inicial (0,5, 1,25 e 2%), a interação entre as três variáveis é significativa para a produção de proteases e biopetídeos antioxidantes e a melhor condição é o ensaio composto por pH neutro, menor umidade e menor concentração de nitrogênio final. Nesta circunstância,

enquanto a atividade proteásica é maior em 48 horas de fermentação ( $677 \text{ U g}^{-1}$ ), a atividade antioxidante se mostra superior em 96 horas ( $2.875,6 \text{ Equiv. Trolox mg/mL}$ ). A alta umidade dificulta a sintetização dos biocompostos, entretanto, o fungo consegue se adaptar as condições do meio para a produção, mesmo que em menor quantidade.

Os resultados encontrados neste estudo são muito importantes, visto que as proteases são utilizadas em diversos tipos de indústrias, tais como a têxtil, detergente, couros, alimentos e bebidas e os biopeptídeos podem ser adicionados em alimentos, embalagens inteligentes e como substitutos de fármacos sintéticos. A produção dos dois metabólitos em uma mesma fermentação utilizando casca de soja e farelo de soja como substratos, reduz o tempo e permite a valoração dos subprodutos, principalmente da casca de soja, composto pouco utilizado na FES.

## REFERÊNCIAS

- AFRISHAM, S.; BADOEI-DALFARD, A.; NAMAKI-SHOUSHTARI, A.; KARAMI, Z. Characterization of a thermostable,  $\text{CaCl}_2$ -activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: production under solid-state fermentation by utilizing agricultural wastes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p 98-106, 2016.
- AMADOU, I.; LE, G. W.; SHI, Y. H.; GBADAMISI, O. S.; KAMARA, M. T.; JIN, S. Optimized *Lactobacillus plantarum* LP6 solid-state fermentation and proteolytic hydrolysis improve some nutritional attributes of soybean protein meal. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 1686-1694, 2011.
- AYYASH, M.; JOHNSON, S. K.; LIU, S. Q.; MESMARI, N.; DAHMANI, S.; AL DHAHERI, A. S.; KIZHAKKAYIL, J. In vitro investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using *Lactobacillus spp.* **Food Chemistry**, v. 275, p. 50-58, 2019.
- BAKIR, U.; YAVASCAOGLUB, S.; GUVENCB, F.; ERSAYINB, A. An endo-beta-1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 328-334, 2001.
- BASU, B. R.; BANIK, A.; DAS, M. Production and characterization of extracellular protease of mutant *Aspergillus niger* AB100 grown on fish scale. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 449-455, 2008.
- BEHERA, S.S.; RAY, R.C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656-669, 2016.



BERTOLIN, T. E.; COSTA, J.A.V.; PASQUALI, G.D.L. Glucoamylase production in batch and fed-batch solid state fermentation: effect of maltose or starch addition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 13-16, 2001.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinella (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, v.118, p. 559–565, 2010.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 303-308, 2015.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, L. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-505, 1947.

CHENG, A. C.; LIN, H. L.; SHIU, Y. L.; TYAN, Y. C.; LIU, C. H.. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v.67, p. 270-279, 2017

CHI, C. H.; CHO, S. J. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT- Food Science and Technology**, v. 68, p. 619-625, 2016.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1012–1018, 2008.

COLLA, L. M.; FICANHA, A. M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINERHR, C. O.; COSTA, J. A. Production and Characterization of Lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. **BioMed Research International**, article ID 725959, 2015.

COSTA, J. A. V.; TREICHEL, H.; KUMAR, V.; PANDEY, A. **Chapter 1 - Advances in Solid-State Fermentation**. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Ed. Elsevier. 2018.

COSTA, M. A. **Estudo da precipitação com etanol de xilanases de complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido e fermentação submersa**. Tese (Doutor em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2016.

DAS, R. K.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential use of pulp and paper solid waste for the bio-production of fumaric acid through submerge and solid state fermentation. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 4435-4444, 2016.

- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and  $\alpha$ -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.
- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3, p. 58-65, 2014.
- DE CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGALI, M. P.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. . A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 678-684, 2015.
- DEY, T. B.; KUHAD, R. C. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 120-127, 2014.
- EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: Novel aspects of SSF in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 1999-2042, 2015.
- ERYILMAZ, E. B.; DURSUN, D.; DALGIÇ, A. C. Multiple optimization and statistical evaluation of astaxanthin production utilizing olive pomace. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 224-227, 2016.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Food Loss and Food Waste. Available in: <http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/en/>. Access in: 20/11/2018.
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 381-395, 2002.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food- derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 163-169, 2007.
- JANISZEWSKA, A. S.; STODOLAK, B.; GOMEZ-CARAVACA, A. M.; MICKOWSKA, B.; MARTIN-GARCIA, B.; BYCZYNSKI. Mould starter selection for extended solid-state fermentation of quinoa. **LWT – Food and Science Technology**, v.99, p. 231-237, 2019.
- KITTS, D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1309-1323, 2003.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945-960, 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

- LEE, J. H.; HWANG, S. R.; LEE, Y. H.; KIM, K.; CHO, K.; LEE, Y. B. Changes occurring in compositions and antioxidant properties of healthy soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merr.] and soybean seeds diseased by *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii* fungal pathogens. **Food Chemistry**, v. 15, p. 205-211, 2015.
- LIU, F.; CHEN, Z.; SHAO, J.; WANG, C.; ZHAN, C. Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ. **Food Bioscience**, v. 20, p.141-148, 2017.
- LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. O.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.
- MAMO, J.; ASSEFA, F. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. **Journal of Food Quality**, v. 8, 2018.
- MINKIEWICZ P., IWANIAK A., DAREWICZ M. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 5978, 2019.
- NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v.198, p. 119-124, 2016.
- ORTIZ, G. E.; NOSEDA, D. G.; PONCEMORA, M. C.; RECUPER, M. N.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E. A comparative study of new *Aspergillus* strains for proteolytic enzymes production by solid state fermentation. **Enzyme Research**, 2016.
- PAGARE, R. S.; RAMDASI, A. M.; KHAANDELWAL, S. R.; LOKHANDE, M. O.; AGLAVE, B. A. Production and enzyme activity of an extracellular protease from *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*. **International Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 5(3), p. 335, 2009.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PARANTHAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMATHI, J. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentantion. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, p. 308–312, 2009.
- PARK, E. J.; GARCIA, C. V.; YOUN, S. J.; PARK, C. D.; LEE, A. P. Fortification of  $\gamma$ -aminobutyric acid and bioactive compounds in *Cucurbit moschata* by novel two-step fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 102, p. 22-29, 2019.
- PEL, H. J.; WINDE, J. H.; ARCHER, D. B.; DYER, P. S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P. J.; et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 221-231, 2007.

- PURUSHOTHAMAN, K.; BHAT, S. K.; SINGH, S. A.; MARATHE, G. K.; RAO G. A.; RAO, A. mAspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 199-212, 2019.
- RAI, A. K.; SANJUKTA, S.; CHOURASIA, R.; BHAT, I.; BHARDWAJ, P. K.; SAHOO, D.; Production of bioactive hydrolysate using protease,  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* spp. isolated from *kinema*. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 358-365, 2017.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALLA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; HAMID, A. A.; GHAZALI, H. M. Recents advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. **Biotechnology advances**, v. 33, p. 80-116, 2015.
- SÁNCHEZ, A.; VÁZQUEZ, A. Bioactive peptides: a review. **Food Quality and Safety**, v. 1, p. 29-46, 2017.
- SANJUKTA, S.; RAI, A. K.; MUHAMMED, A.; JEYARAM, K.; TALUKDAR, N. C. enhancement of antioxidante properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 650-658, 2015.
- SATTAR, H. BIBI, Z.; KAMRAN, A.; AMAN, A.; ALI, S.; QADER, U. Degradation of complex casein polymer: Production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, 2019.
- SNYMAN, C.; THERON, L. W.; DIVOL, B. Understanding the regulation of extracellular protease gene expression in fungi: a key step towards their biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 5517-5532, 2019.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 205-218, 2003.
- SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 2017.
- SOUZA, P. M. BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; JUNIOR, A. P.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 337-346, 2015.
- SUN, J.; HE, H.; XIE, B. J. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6646–6652, 2004.

SWAMY, M. K. KASHYAP, S. S. N.; VIJAY, R.; TIWARI, R.; ANURADHA, M. Production and optimization of extracellular protease from *Bacillus* sp. Isolated from soil. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 3. P. 564-569, 2012.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

ZHENG, H. G.; YANG, X. Q.; AHMAD, I.; MIN, W.; ZHU, J. H.; YUAN, D. B. Soybean b-conglycinin constituent subunits: Isolation, solubility and amino acid composition. **Food Research International** , v.42, p. 998–1003, 2009.