



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CEILÂNDIA**  
**CURSO DE FARMÁCIA**

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE PROTEASES DOS FUNGOS**  
***ASPERGILLUS ORYZAE E ASPERGILLUS NIGER***

**JÉSSICA VITÓRIA BENKE RACTZ**

Brasília, DF

2015

JESSICA VITÓRIA BENKE RACTZ

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE PROTEASES DOS FUNGOS  
*ASPERGILLUS ORYZAE* E *ASPERGILLUS NIGER***

Monografia de Conclusão de Curso  
apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Farmacêutico, na  
Universidade de Brasília, Faculdade de  
Ceilândia.

**Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

**Co-orientador: Profa. Dra. Eliana Fortes Gris**

BRASÍLIA, DF  
2015

JÉSSICA VITÓRIA BENKE RACTZ

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE PROTEASES DOS FUNGOS  
ASPERGILLUS ORYZAE E ASPERGILLUS NIGER**

**BANCA EXAMINADORA**



Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)



Co-orientador: Profa. Dra. Eliana Fortes Gris  
(FCE/ Universidade de Brasília)



Farmacêutico: Igor Albuquerque de Souza

Brasília, DF

2015

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a aquele que me criou, ao meu bom Deus. Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente.

Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todos os momentos, aos dois todo o meu amor e gratidão, e em especial a minha amada e querida mãe, Ruth, o meu maior exemplo de vida e de mulher, aquela que me proporcionou tudo o que sou hoje e nunca mediu esforços ao meu favor.

À minha irmã Natalia e ao meu sobrinho Mateus que fazem a minha vida mais alegre e colorida.

A todos os colegas, professores e mestres que se fizeram presentes durante toda a graduação me ensinando a respeito da vida e da profissão da qual escolhi.

E Por último, porém não menos importante à professora Daniela Castilho Orsi, que sempre esteve disposta a ensinar e me auxiliar durante todo o processo de construção deste trabalho.

## RESUMO

O presente trabalho de pesquisa teve como principal objetivo a produção e aplicação de proteases dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*. As proteases produzidas por *A. oryzae* e *A. niger* mostraram uma maior atividade e estabilidade enzimática em temperaturas entre 60 a 70°C, com maior atividade na temperatura de 70°C. A atividade proteolítica máxima do extrato enzimático bruto obtido a partir do *A. oryzae* ocorreu em pH 7,0 e as enzimas obtidas do *A. niger* apresentaram uma protease ácida estável em pH 4,0 e uma protease neutra estável em pH 6,0. Foi utilizado planejamento composto central 2<sup>2</sup> e metodologia de superfície de resposta para estudar a influência das variáveis: concentração de caseína (0,2-2,0%, p/v) e volume de extrato enzimático bruto de *A. niger* e de *A. oryzae* (1-4 mL) na hidrólise da caseína em peptídeos. Foi possível observar que se obter uma maior hidrólise é preciso utilizar menores concentrações de caseína (0,2-0,4%) e maiores volumes de extrato enzimático bruto (2,5-3,6 mL). Verificou-se que os hidrolisados de caseína obtidos com proteases de *A. oryzae* apresentaram maior atividade antioxidante que os hidrolisados de caseína obtidos com proteases de *A. niger*. Na aplicação dos extratos enzimáticos brutos do *A. oryzae* e *A. niger* na coagulação do leite para fabricação de queijo, ambos os extratos enzimáticos possuíram capacidade de coagulação do leite. Os resultados deste trabalho são importantes para as futuras aplicações dessas enzimas, que depois de concentradas poderão ser utilizadas na produção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante.

**Palavras –chave:** proteases, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, caseína, hidrolisado proteico

## **ABSTRACT**

The aim of this study was the production and application of proteases from *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. Proteases produced by *A. niger* and *A. oryzae* showed a higher activity and enzymatic stability at temperatures between 60 to 70°C, with greatest activity at 70°C. The maximum proteolytic activity of the crude enzyme extract obtained from *A. oryzae* occurred at pH 7.0 and the enzymes obtained from *A. niger* presented an acid protease stable at pH 4.0 and a neutral protease stable at pH 6.0. It was used 2<sup>2</sup> central composite design and response surface methodology to study the influence of the variables: concentration of casein (0.2-2.0% w/v) and volume of crude enzyme extract of *A. niger* and *A. oryzae* (1-4 mL) in the hydrolysis of the casein into peptides. It was found that the casein hydrolysates with proteases of *A. oryzae* showed a higher antioxidant activity than casein hydrolysates with proteases from *A. niger*. During the application of the crude enzyme extract of *A. oryzae* and *A. niger* in the clotting of milk for cheese production, both enzyme extracts presented milk clotting ability. These results are important for future applications of these enzymes, which after concentrated may be used in the production of protein hydrolysates with antioxidant activity.

**Key-words:** proteases, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, casein, protein hydrolysate

## SUMRIO

1. Introdução.....	11
1.1. Proteases: fontes de produção e classificação.....	11
1.2. Uso dos fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus oryzae</i> para produção de enzimas.....	14
1.3. Fermentação em estado sólido (FES) e características dos substratos para FES.....	17
1.4. Aplicação das proteases.....	18
1.5. Hidrolisados proteicos.....	20
1.6. Peptídeos biologicamente ativos (PBA) e peptídeos antioxidantes.....	23
2. Objetivos.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Justificativa.....	27
4. Metodologia.....	29
4.1. Microrganismos e manutenção das cepas.....	29
4.2. Obtenção da solução de esporos para inocular os meios de cultivo na fermentação no estado sólido.....	29
4.3. Fermentação no estado sólido (FES) para obtenção dos extratos enzimáticos brutos.....	29
4.4. Determinação da atividade proteolítica dos extratos enzimáticos brutos para os testes de efeito de pH e da temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	30
4.5. Estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	30
4.6. Determinação do grau de hidrolise da caseína.....	31
4.7. Planejamento experimental para estudo da hidrólise da caseína em peptídeos utilizando os extratos enzimáticos brutos dos fungos <i>Aspergillus oryzae</i> ou <i>Aspergillus niger</i> . ....	32

4.8. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseína obtidos pela ação dos extratos enzimáticos brutos de <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i> .....	34
4.9. Aplicação dos extratos enzimáticos brutos do <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i> na coagulação do leite para fabricação de queijo.....	35
5. Resultados e discussão.....	36
5.1. Atividade das proteases dos extratos enzimáticos brutos de <i>A. oryzae</i> e de <i>A. niger</i> sobre a caseína.....	36
5.2. Estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade enzimática dos extratos enzimáticos brutos de <i>A. oryzae</i> e de <i>A. niger</i> .....	38
5.3. Determinação do grau de hidrólise da caseína.....	44
5.4. Planejamento experimental para estudo da hidrólise da caseína em peptídeos com o extrato enzimático brutos do fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	45
5.5. Planejamento experimental para estudo da hidrólise da caseína em peptídeos com o extrato enzimático brutos do fungo <i>Aspergillus oryzae</i> .....	48
5.6. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseína pelo método de ABTS.....	52
5.7. Aplicação dos extratos enzimáticos brutos do <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i> na coagulação do leite para fabricação de queijo.....	54
6. Conclusão.....	55
7. Referências Bibliográficas.....	56



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das proteases de acordo com seu sítio ativo catalítico.....	12
Tabela 2. Características de algumas endopeptidases.....	13
Tabela 3. Fontes de proteases e suas aplicações.....	19
Tabela 4. Métodos de determinação de atividade antioxidante de peptídeos.....	25
Tabela 5. Valores decodificados utilizados no planejamento experimental.....	33
Tabela 6. Planejamento composto central 2 <sup>2</sup> codificado.....	33
Tabela 7. Atividade das proteases obtidas a partir dos extratos enzimáticos brutos de <i>A. oryzae</i> sobre a caseína.....	36
Tabela 8. Atividade das proteases do extrato enzimático bruto de <i>A. niger</i> e do coalho comercial sobre a caseína.....	37
Tabela 9. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade enzimática de <i>A. oryzae</i> .....	38
Tabela 10. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade enzimática de <i>A. niger</i> .....	39
Tabela 11. Efeito do pH sobre a estabilidade enzimática de <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i> .....	41
Tabela 12. Grau de hidrólise da caseína após ação das proteases de <i>A. oryzae</i> ou <i>A. niger</i> .....	44
Tabela 13. Planejamento composto central 2 <sup>2</sup> codificado e decodificado (valores reais entre parênteses) utilizando as proteases de <i>A. niger</i> , com os resultados experimentais (grau de hidrólise da caseína em peptídeos).....	46
Tabela 14. Efeitos da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de <i>A. niger</i> no grau de hidrólise da caseína.....	46
Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental utilizando as proteases de <i>A. niger</i> .....	47
Tabela 16. Planejamento composto central 2 <sup>2</sup> codificado e decodificado (valores reais entre parênteses) utilizando as proteases de <i>A. oryzae</i> , com os resultados experimentais (grau de hidrólise da caseína em peptídeos).....	49
Tabela 17. Efeitos da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de <i>A. oryzae</i> no grau de hidrólise da caseína.....	50

Tabela 18. Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental utilizando as proteases de <i>A. oryzae</i> .....	50
Tabela 19. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseína obtidos pela ação do extrato enzimático bruto de <i>A. oryzae</i> .....	52
Tabela 20. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseína obtidos pela ação do extrato enzimático bruto de <i>A. niger</i> .....	52

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de <i>A. oryzae</i> ....	38
Gráfico 2. Efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática <i>A. oryzae</i> ....	39
Gráfico 3. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de <i>A. niger</i> .....	40
Gráfico 4. Efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática <i>A. niger</i> .....	40
Gráfico 5. Efeito do pH sobre a estabilidade enzimática de <i>A. oryzae</i> .....	42
Gráfico 6. Efeito do pH sobre a estabilidade enzimática de <i>A. niger</i> .....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de contorno e superfície de resposta com as interações da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de <i>A. niger</i> no grau de hidrólise da caseína em peptídeo.....	48
Figura 2. Curva de contorno e superfície de resposta com as interações da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de <i>A. oryzae</i> no grau de hidrólise da caseína em peptídeos.....	51
Figura 3. Coagulação do leite com uso do extrato enzimático bruto de <i>A. oryzae</i> .....	54
Figura 4. Coagulação do leite com uso do extrato enzimático bruto de <i>A. niger</i> .....	54
Figura 5. Coagulação do leite com uso do coalho comercial HÁ-LA.....	54

## **1. Introdução**

### **1.1. Proteases: fontes de produção e classificação**

As proteases são um grupo de enzimas que catalisam reações de hidrólise de proteínas em seus peptídeos e aminoácidos. Essas enzimas estão presentes em todos os seres vivos e desempenham papel fundamental na fisiologia, catalisando várias reações metabólicas (GIONGO, 2006; SILVA, 2013; SUMANTHA et al., 2006). Uma vez que as proteases são encontradas de forma universal nos seres vivos, podem ser extraídas de diversas fontes (animais, vegetais e microrganismos) (FREITAS, 2013).

As principais proteases isoladas de fontes vegetais são: a papaína extraída do látex do mamão verde, a bromelina presente no abacaxi e a ficina retirada do látex do figo verde. A extração de enzimas de origem vegetal depende de inúmeros fatores, como a disponibilidade e viabilidade de terras para o cultivo, boas condições climáticas que influenciam no crescimento das plantas, bem como tempo disponível. Estes fatores se mostram pouco favoráveis à obtenção dessas enzimas em larga escala (FREITAS, 2013; GIONGO, 2006).

As proteases de origem animal são retiradas de tecidos específicos e entre as principais estão: a renina e pepsina retiradas do estômago de ruminantes, a tripsina e a quimotripsina extraídas de tecido pancreático de suínos e bovinos. A obtenção destas enzimas depende da disponibilidade de animais suficientes para o abate, processo este controlado e regulamentado por políticas agropecuárias e governamentais que dificultam sua obtenção, proporcionando assim um elevado custo (FREITAS, 2013; GIONGO, 2006; SILVA, 2013).

Devido aos obstáculos na obtenção de enzimas de origem vegetal e animal em grande escala, com baixo custo e de forma sustentável, as enzimas de origem microbiana se destacam, apresentando diversas vantagens. São obtidas através de processos mais simples, mais rápidos e de baixo custo, e

em geral são mais estáveis que as homólogas de plantas e animais (FREITAS, 2013; GIONGO, 2006).

De acordo com o Comitê Internacional de Enzimas (Enzyme Commission) as proteases são enzimas que pertencem à classe das hidrolases (3) e subclasse das peptídeo-hidrolases ou peptidases (4), sendo classificadas como EC 3.4. As outras classificações das proteases são em relação ao tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e relação evolucionária em conformidade com a estrutura (GIONGO, 2006; SILVA, 2013; SUMANTHA et al., 2006).

As proteases são divididas em 2 grandes grupos de acordo com a sua ação catalítica: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases exibem preferência pelas extremidades C- ou N- terminais da cadeia peptídica. As exopeptidases que agem na região N-terminal da proteína são denominadas aminopeptidases e as exopeptidases que agem na região C-terminal da proteína são denominadas carboxipeptidases. As carboxipeptidases são subdivididas de acordo com a natureza do seu sítio catalítico em serina, metalo e cisteína carboxipeptidases (Tabela 1). Já as endopeptidases atuam dentro da cadeia peptídica. As endopeptidases são classificadas em 4 grupos de acordo com a natureza do seu sítio catalítico: serina proteases, cisteína proteases, aspártico ou carboxil proteases e metalo proteases (Tabela 1 e Tabela 2) (MERHEB, 2007; SILVA, 2013; SUMANTHA et al., 2006).

**Tabela 1. Classificação das proteases de acordo com seu sítio ativo catalítico**

<b>Exopeptidases</b>	<b>EC nº</b>	<b>Endopeptidases</b>	<b>EC nº</b>
Serina carboxipeptidases	3.4.16	Serina proteases	3.4.21
Metalo carboxipeptidases	3.4.17	Cisteína proteases	3.4.22
Cisteína carboxipeptidases	3.4.18	Aspártico proteases	3.4.23
		Metallo proteases	3.4.24

Fonte: adaptado de SUMANTHA et al. (2006) e SILVA (2013).

Tabela 2. Características de algumas endopeptidases

Classificação	Aminoácido do sítio ativo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Cofatores íons metálicos	Principais fontes
Aspártico ou carboxil proteases EC nº 3.4.23	Aspártico ou Cisteína	2–5	40–55	Ca <sup>2+</sup>	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , Estômago de animais
Cisteína proteases EC nº 3.4.22	Aspártico ou Cisteína	5-9	40–55	----	<i>Aspergillus</i> , abacaxi, mamão verde e figo verde
Metalo proteases EC nº 3.4.24	Fenil alanina ou Leucina	5–9	65–85	Ca <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup>	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>
Serina proteases EC nº 3.4.21	Serina, Histidina ou Aspártico	6-11	50-70	Ca <sup>2+</sup>	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , intestino de animais

Fonte: adaptado de SUMANTHA et al.(2006).

Outra importante divisão das proteases é com relação a faixa de pH de melhor atuação: proteases neutras, ácidas e alcalinas. As ácidas incluem principalmente as aspártico proteases que apresentam melhor atividade na faixa de pH de 2,0 a 6,0. As proteases ácidas são encontradas em células animais, fungos, mas não em bactérias. As proteases ácidas microbianas tipo renina são produzidas por *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* e outras espécies de *Mucor*. As proteases ácidas microbianas tipo pepsina são produzidas por *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp. O coalho bovino, composto de uma mistura de enzimas proteolíticas ácidas (88–94 % de renina e pepsina 6–12 %), é usualmente obtido do estômago de bovinos lactentes (SILVA, 2013; SUMANTHA et al., 2006).

As proteases neutras apresentam melhor atividade na faixa de pH de 6,0 a 8,0, sendo representadas principalmente pelas cisteína proteases, metalo proteases e algumas serina proteases. A papaína, presente em maior

quantidade no látex do fruto verde do mamão (*Carica papaya*); a bromelina, presente no abacaxi e a ficina, obtida a partir do látex do *Ficus sp.*; são exemplos de cisteína proteases neutras. Várias espécies de *Bacillus ssp.* produzem metalo proteases neutras e termoestáveis. As proteases fúngicas neutras estão entre os principais componentes de preparações usadas em panificação, tratamento de couro e aplicações farmacêuticas. *Aspergillus oryzae* é a principal fonte de protease neutra fúngica. Espécies de *Penicillium spp.* também tem sido identificadas como produtoras de proteases neutras (SILVA, 2013; SUMANTHA et al., 2006).

Já as proteases básicas apresentam melhor atividade na faixa de pH de 8,0 a 13,0, sendo representadas principalmente pelas serina proteases. As serina proteases alcalinas são produzidas por muitas bactérias, fungos (*Aspergillus e Neurospora spp.*) e leveduras, no entanto a principal fonte de protease alcalina vem de *Bacillus ssp.* (SILVA, 2013; SUMANTHA et al., 2006).

## **1.2. Uso dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* para produção de enzimas**

As proteases microbianas industriais são originárias de várias espécies fúngicas, incluindo *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.* e *Aspergillus sp.* e também de bactérias como *Bacillus sp.* Em geral, as proteases fúngicas tem um pH ótimo ácido ou neutro e não são termoestáveis (CORREA, 2013; GIONGO, 2006; SUMANTHA et al., 2006).

É notável o aumento da busca por parte da indústria na utilização de fontes fúngicas que produzam enzimas em grande escala para a fermentação de produtos com baixo valor agregado e também para a degradação de resíduos industriais. Os fungos filamentosos são muito utilizados uma vez que produzem enzimas em grande quantidade e variedade e possuem facilidade em crescer ao natural em substratos sólidos, tendo uma excelente capacidade de fermentação (PEREIRA, 2014). Em geral suas colônias apresentam um rápido e abundante crescimento, com densa distribuição sobre o meio de crescimento (LIMA, 2012).

As espécies mais comuns e mais bem estudadas de fungos filamentosos fazem parte do gênero *Aspergillus spp.* São anamórficos e pertencem ao reino

*Fungi*, filo *Ascomycota*, ordem dos *Eurotiales*, família *Trichocomaceae* e gênero *Aspergillus*. Este gênero pode ser encontrado amplamente na natureza, principalmente em solos, associado com a deterioração de materiais vegetais e alimentos e principalmente em regiões tropicais e subtropicais (LIMA, 2012).

As espécies mais comuns de *Aspergillus* são: *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e *A. versicolor*. Esses fungos filamentosos se reproduzem por meio de esporos (conídios) e são formados por micélios compostos por hifas septadas e ramificadas. A classificação das espécies do gênero *Aspergillus* spp. pode ser realizada por características morfológicas, sendo que suas colônias podem apresentar coloração branca, amarela, verde, entre outras cores. Além das características morfológicas, a classificação pode ser feita por testes moleculares, identificação dos perfis dos metabólitos secundários, taxa de crescimento em determinadas temperaturas e atividade de água (MONTEIRO, 2010; PEREIRA, 2014; ROCHA, 2010; SLIVINSK, 2007).

Algumas espécies como *A. flavus* e *A. fumigatus* podem ser consideradas patogênicas aos seres humanos devido à produção de toxinas como, por exemplo, as aflatoxinas. No entanto, outras espécies são reconhecidas como seguras para a utilização em alimentos (GRAS – *Generally Regarded as Safe*) e entre elas estão o *A. oryzae* e o *A. niger* (LIMA, 2012; MACHIDA et al., 2008; SCHUSTER et al., 2002). O uso do *A. niger* e *A. oryzae* para produção de enzimas apresenta vantagens como facilidade de manipulação, habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (MONCLARO, 2014; ROSA et al., 2002).

O *Aspergillus niger* é pertencente a seção *Nigri* do gênero *Aspergillus* e é popularmente denominado como “mofo negro”. Suas colônias apresentam cores esbranquiçadas a amareladas, porém ocorre um rápido crescimento de milhares de esporos negros (SLIVINSK, 2007). O fungo *Aspergillus niger* é geralmente encontrado em ambientes comuns, como solo, plantas e material vegetal em decomposição. *A. niger* é um fungo filamentoso que cresce aerobicamente em matéria orgânica. Sua ampla utilização pela indústria se deve ao fato de ser produtor de ácido cítrico e de várias enzimas (proteases, pectinases, amiloglicosidase, alfa-amilase, celulases, hemicelulases, lipases,

glicose oxidase e catalase). Entre as enzimas extraídas deste fungo, as proteases ácidas se destacam devido a sua ampla produção. As proteases ácidas são endopeptidases, ou seja, dependem de resíduos de ácido aspártico para que ocorra a sua atividade catalítica e demonstram a sua máxima atividade em pHs baixos(2,0 a 6,0). O sequenciamento do genoma do *A.niger* revelou a presença de um grande número de genes que codificam proteases ácidas (PASTORE et al., 2011; PEL et al., 2007; SCHUSTER et al., 2002; TICHOTA et al., 2010).

O *Aspergillus oryzae* é um fungo pertencente ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi*. Essa seção tem como características morfológicas espécies com conídios em tons de branco a amarelo escuro ou amarronzado (MONCLARO, 2014). Entre os fungos filamentosos, o *Aspergillus oryzae* é conhecido pelo seu potencial de produção de várias enzimas, tais como proteases, amilases, beta-galactosidase, lipases, celulase, glutaminase e metalopeptidase. O fungo *Aspergillus oryzae* é utilizado há centenas de anos na indústria japonesa na produção de alimentos fermentados tradicionais como *sake* (bebida alcoólica japonesa), *miso* (pasta de soja) e *shoyu* (molho de soja). A protease alcalina de *Aspergillus oryzae* é considerada uma das mais importantes, principalmente na produção do molho de soja (MACHIDA et al., 2008; U.S. Environmental Protection Agency, 2014; PEREIRA, 2014; FREITAS, 2013).

A capacidade de alta produção de enzimas de *A. oryzae* deve-se a uma maior expressão de genes envolvidos no metabolismo, com destaque para aqueles voltados para a síntese de metabólitos secundários, confirmando que o *A. oryzae* é um microrganismo ideal para a fermentação. Quando se compara o genoma do *A. oryzae* com outras duas outras espécies do gênero *Aspergillus* (*A. fumigatus* e *A. nidulans*) constatou-se que o genoma do *A. oryzae* é bem maior, com um aumento de 2000 a 3000 genes (MACHIDA et al., 2008; PEREIRA, 2014; FREITAS, 2013).

Embora os detalhes da relação genética entre *A. oryzae* e *A. flavus* não estejam totalmente esclarecidos, é bem estabelecido que as duas espécies são tão intimamente relacionadas, que alguns autores consideram que todas as linhagens de *A. oryzae* são variantes naturais domesticadas de *A. flavus*, modificadas através de anos de seleção com uso na fermentação de alimentos. Apesar de *A.oryzae* ser geneticamente muito similar ao *A. flavus*, esse fungo é



genomicamente bem caracterizado e considerado um microrganismo de segurança para a produção de enzimas para uso em alimentos, porque não tem a capacidade de produzir aflatoxina ou quaisquer outros metabólitos cancerígenos (MACHIDA et al., 2008; U.S. Environmental Protection Agency, 2014; PEREIRA, 2014; FREITAS, 2013).

### **1.3. Fermentação em estado sólido (FES) e características dos substratos para FES**

A fermentação em estado sólido pode ser definida como o crescimento de microrganismos na superfície ou interior de substratos sólidos os quais possuem a capacidade de absorver água, porém para o processo poder ocorrer se faz necessário que não haja água livre aparente. A produção de enzimas ocorre diretamente sobre o substrato insolúvel umedecido (LIMA, 2012; PEREIRA, 2014; ZÚÑIGA et al., 2011).

A fermentação submersa é extremamente utilizada na atualidade, totalizando um percentual de 90% dos preparados enzimáticos industriais, entretanto a FES apresenta inúmeras características que a torna vantajosa. Uma das principais características da FES é a baixa atividade de água, condição que se aproxima do ambiente de crescimento natural dos fungos filamentosos, o que torna mais fácil de controlar e conservar o seu ciclo morfológico. Além disto, a FES apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH e uma maior facilidade de obtenção de esporos quando comparada a fermentação submersa. Outra vantagem ao se escolher este método de fermentação é a possibilidade de utilização de resíduos gerados em processos agroindustriais para o crescimento celular (LIMA, 2012; ZÚÑIGA, et al, 2011).

Ao iniciar a FES é de suma importância a escolha correta do substrato a ser utilizado uma vez que este irá refletir de forma direta no rendimento do extrato enzimático. O substrato utilizado poderá estar em sua forma natural ou na forma sintética, isto dependerá do processo que se deseja realizar, mas de forma geral são utilizados resíduos agroindustriais devido a grande produção pela indústria brasileira, ao seu baixo ou até mesmo nenhum valor comercial e, além disto, seu uso favorece a sustentabilidade. É possível incorporar

nutrientes ao substrato, melhorando as condições de crescimento do microrganismo para a fermentação desejada (LIMA, 2012; PEREIRA, 2014; FERNANDES, 2007).

Entre os resíduos utilizados na FES os principais são: farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, casca e polpa de café, casca e bagaço de maçã e outros resíduos do processamento de frutas. É importante que o substrato esteja em sua forma fragmentada sendo de natureza granular ou fibrosa o que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. (LADEIRA, et al., 2010; KRONBAUER, et al., 2007; PEREIRA, 2014; OLIVEIRA, et al., 2013; SANTOS, 2006).

#### **1.4. Aplicações das proteases**

A hidrólise enzimática das proteínas pode ser feita por ácidos, bases ou enzimas. A hidrólise enzimática aparenta ser o método mais apropriado para a obtenção de peptídeos devido à disponibilidade comercial de enzimas em grande escala, custo moderado, alta qualidade dos produtos formados e possibilidade de controlar a hidrólise e conseqüentemente as propriedades dos produtos gerados. A hidrólise química é um processo de difícil controle, originando produtos com reduzida qualidade nutricional, devido à formação de substâncias tóxicas (como a lisino-alanina), a racemização dos aminoácidos e a possibilidade de destruição dos aminoácidos triptofano, lisina e treonina (BIASUTTI et al., 2007; SINHA et al., 2007).

O processo enzimático de hidrólise apresenta uma série de vantagens sobre os métodos químicos, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado final e, ainda, a formação mínima de subprodutos. As enzimas podem ser empregadas, na maioria das vezes, em concentrações muito baixas e sua remoção do sistema da reação é frequentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (BIASUTTI et al., 2007; SINHA et al., 2007).

As principais enzimas utilizadas comercialmente são: proteases, amilases, lactases, pectinases, celulasas, lipases e xilanases, porém as proteases representam cerca de 60% deste mercado devido à ampla

versatilidade de aplicação na indústria de detergentes, farmacêutica e de alimentos (HASAN et al., 2014; KUMAR et al., 2005; THANAPIMMETHAA et al. 2012). A tabela 3 mostra a origem das proteases e suas principais aplicações. As proteases fúngicas destacam-se por serem muito utilizadas na indústria de alimentos, com papel fundamental na panificação, na fabricação de cervejas, produção de queijos, amaciamento de carnes e produção de hidrolisados funcionais (SILVA, 2013).

**Tabela 3. Fontes de proteases e suas aplicações**

Fonte	Enzima	Aplicação industrial
Animal	Tripsina, Quimotripsina	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, hidrólise proteica.
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelina	Amaciamento de carne, produção de extratos de leveduras, cerveja clarificada, panificação, fármacos.
<i>Aspergillus niger</i>	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais, bebidas.
<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise proteica, processamento de carne e pescado, cervejas e panificação.
<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo (coagulação do leite).
<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes, indústria de couro, processamento de carnes e pescado.
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Proteases neutras	Produção de bebidas e panificação.

Fonte: Adaptado de SILVA (2013).

Na panificação, a farinha de trigo é o principal componente dos processos e contém uma proteína insolúvel chamada glúten, que determina as propriedades das massas. Proteases de *Aspergillus oryzae* têm sido usadas para modificar o glúten através de proteólise limitada. A adição de proteases reduz o tempo de mistura da massa e resulta em pães mais volumosos. Especificamente para a confecção de biscoitos tipo “água e sal” ou *cracker*, utilizam-se proteases que conferem à massa maior extensibilidade, permitindo uma laminação isenta de fraturas e de espessura fina, adequada para a correta tostagem do material durante o forneamento (MERHEB, 2007; SUMANTHA et al., 2006).

Nas cervejarias, proteases como a papaína são utilizadas na clarificação de cervejas. Durante o processo de maturação das cervejas com a baixa temperatura tem-se a insolubilização dos complexos proteína-fenol, que naturalmente são encontrados no malte e nos cereais utilizados para a produção de cervejas. Estes complexos então geram a turvação, as proteases são responsáveis por hidrolisar estas proteínas. (CASTRO, 2014).

Dentro da indústria de laticínios uma importante aplicação das proteases ácidas é a capacidade de coagular as proteínas do leite (caseínas), evidenciado pelo seu uso generalizado na indústria de laticínios para a fabricação de queijos e derivados. Atualmente, as proteases ácidas microbianas de origem fúngica têm substituído amplamente o coalho animal. Entre as proteases coagulantes microbianas se destacam as obtidas de *Rhizomucor miehi*, *Endothia parasítica* e *Aspergillus niger* (MERHEB, 2007; MONROY, 2013).

Como amaciadores de carnes, geralmente são empregadas proteases alcalinas termofílicas, que possuem a capacidade e a habilidade de hidrolisar proteínas do tecido conjuntivo e também proteínas da fibra muscular. O processo de amaciamento se dá através do polvilhamento de uma preparação enzimática ou através da imersão do produto em uma solução enzimática e/ou injetando a preparação concentrada de protease na própria carne do animal (MERHEB, 2007).

## 1.5. Hidrolisados proteicos

Os hidrolisados proteicos vêm sendo utilizados desde 1940 na fabricação de alimentos especiais. Estas preparações têm sido usadas em formulações infantis (recém-nascidos prematuros, crianças com diarreia, gastroenterite, quadros gerais de má-absorção), para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas e para o tratamento de portadores de fenilcetonúria. Além disso, essas preparações podem ser usadas na suplementação dietética de idosos, na nutrição de esportistas e em pessoas com alergia às proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídeos possui relação direta com a diminuição da imunogenicidade (AFONSO et al., 2009; BIZZOTTO et al., 2006; CAPOBIANGO et al., 2006; LI-JUN et al., 2008; PACHECO et al., 2005; ROGERO e TIRAPEGUI, 2008).

A hidrólise de proteínas é uma tecnologia desenvolvida para melhorar as características físicas, químicas e também funcionais, sem que haja prejuízos no valor nutricional, com a melhoria de forma mais específica das características de absorção destas proteínas. Os hidrolisados proteicos são compostos por peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres e apresentam a vantagem de serem absorvidos mais eficientemente e possuírem um maior valor nutritivo do que as proteínas intactas (SILVA, 2010; PACHECO et al., 2005).

Os hidrolisados proteicos apresentam fácil digestibilidade, alta solubilidade em água, longa vida de prateleira (quando na forma desidratada) e baixa viscosidade em solução, mesmo quando em altas concentrações. A alta solubilidade e a estabilidade dos hidrolisados proteicos em relação a uma mistura de aminoácidos livres se deve ao fato de que alguns aminoácidos apresentam problemas com relação a estas duas propriedades quando estão na forma livre. Assim, a tirosina e a cistina são pouco solúveis, a glutamina e a cisteína são instáveis em solução e facilmente destruídas durante as etapas de esterilização e armazenamento (SILVA, 2010).

É possível encontrar na literatura estudos que comparam a absorção de aminoácidos resultantes da hidrólise enzimática com misturas equivalentes de aminoácidos livres. A taxa de absorção intestinal de aminoácidos livres é

consideravelmente maior para as soluções contendo di- e tri-peptídeos ou proteínas parcialmente hidrolisadas do que para as soluções contendo apenas aminoácidos livres. As soluções de hidrolisados proteicos contendo di- e tripeptídeos apresentam uma osmolaridade menor do que as soluções de aminoácidos livres e, por isso são mais bem toleradas por indivíduos com dificuldade de absorção. Além disso, são mais palatáveis, sendo, portanto, mais tolerados por um longo período de tempo do que uma mistura de aminoácidos (SILVA, 2010; SILVA, 2009; SOARES, et al, 2004).

Os hidrolisados proteicos também apresentam várias aplicações na indústria alimentícia, associadas à melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante e textura. Neste sentido, estes hidrolisados são utilizados como ingrediente em vários alimentos, como patês, pães, doces, produtos alimentícios fortificados e para crianças (CASTRO et al., 2015; SILVA, 2010).

Ao escolher que tipo de proteína utilizar na obtenção de hidrolisados é importante seguir alguns critérios de seleção entre eles estão: o valor nutricional, custo, sabor, antigenicidade, solubilidade e funcionalidade. As proteínas mais comumente usadas para a produção de hidrolisados proteicos são as derivadas do leite (caseína e as proteínas do soro), soja, carne e pescado (HARTMAN e MEISEL, 2007).

Um aspecto negativo do processo enzimático está relacionado ao desenvolvimento de gosto amargo no decorrer da catálise, devido à liberação de peptídeos pequenos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas proteicas. Proteínas intactas não apresentam gosto amargo porque seu tamanho molecular afeta sua habilidade de interagir com receptores de amargor na cavidade oral. Já peptídeos menores que 6 KDa contendo resíduos de leucina, prolina, fenilalanina, tirosina, isoleucina e triptofano provavelmente terão gosto amargo (FITZGERALD e O'CUINN, 2006).

Este fato constitui um dos principais obstáculos na aplicação dos hidrolisados, contudo, várias alternativas têm sido usadas para prevenir, eliminar ou mascarar este efeito, com destaque para o tratamento com carvão ativado, a extração com álcool, a precipitação isoelétrica, a cromatografia em sílica gel, a cromatografia de interação hidrofóbica, a adição de polifosfatos,

glicina ou ciclodextrina durante o processo de hidrólise e a aplicação/tratamento por exopeptidases. Muita atenção tem sido dada ao uso de exopeptidases para remover gosto amargo, principalmente as que hidrolisam ligações adjacentes aos resíduos hidrofóbicos, em especial a prolina, mostrando que a especificidade é um fator importante para escolher a estratégia enzimática para remoção de gosto amargo. Outra técnica adotada para reduzir o sabor amargo dos hidrolisados proteicos consiste na sua encapsulação em lipoesferas e lipossomas (FITZGERALD e O'CUINN, 2006; MERHEB, 2007; SILVA, 2010).

#### **1.6. Peptídeos biologicamente ativos (PBA) e peptídeos antioxidantes**

Outra importante vantagem de aplicação dos hidrolisados proteicos é a liberação de peptídeos biologicamente ativos (PBA) que podem interagir com células no organismo, induzindo respostas fisiológicas e proporcionando benefícios aos principais sistemas do corpo humano, como: digestivo, cardiovascular, nervoso e imunológico (MOITA, 2011).

Peptídeos biologicamente ativos podem ser definidos como sequências de aminoácidos que se encontram inativas nas proteínas nativas, porém, após o processo de hidrólise, *in vitro* ou *in vivo*, tornam-se ativas, sendo capazes de modular respostas fisiológicas no organismo. Dentre as funções que estes peptídeos podem desempenhar destacam-se as atividades imunomoduladora, antimicrobiana, antiúlcera, anti-hipertensiva, anticariogênica, anticoagulante, opióide, hipocolesterolêmica e antioxidante. Neste sentido há perspectivas destes PBA serem incorporados como ingredientes em alimentos funcionais, nutracêuticos e medicamentos, onde essas bioatividades podem ser aliadas no controle e prevenção de doenças e também como auxiliares na conservação de alimentos (CHATTERTON et al., 2006; HARTMANN e MEISEL, 2007; SILVA, 2010).

Diversas fontes proteicas têm se mostrado como potenciais fontes de PBA, como as de origem animal (suína, frango, pescado, ovos) e vegetal (soja), porém o leite tem sido a principal fonte utilizada nas últimas décadas. O soro de leite é um resíduo obtido após a fabricação de queijo e contém proteínas de alto valor nutricional devido ao conteúdo de aminoácidos

essenciais, além de aminoácidos contendo enxofre, como a cisteína, os quais possuem funções antioxidantes. Contém aproximadamente 20% das proteínas originais do leite. As duas principais proteínas são: as  $\beta$ -lactoglobulinas e a  $\alpha$ -lactalbumina, que perfazem de 70 a 80% das proteínas totais do soro (HARAGUCHI et al., 2006; MORENO-INDIAS et al., 2009; PACHECO et al., 2005; SGARBIERI, 2004; SINHA et al., 2007).

Peptídeos gerados a partir da hidrólise de diferentes fontes proteicas têm sido relatados como possuidores de atividade antioxidante. Os antioxidantes são definidos como substâncias que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável são capazes de inibir ou retardar a oxidação daquele substrato. Os antioxidantes não se tornam radicais livres pela doação de elétrons, pois eles são estáveis em ambas as formas. No contexto dos peptídeos antioxidantes, eles podem ser utilizados com a finalidade de promover benefícios a saúde, bem como na preservação de alimentos (CASTRO, 2012; CORREA, 2013).

Em organismos aeróbios há inevitavelmente a formação de radicais livres durante a respiração, como o superóxido e a hidroxila. Estes radicais são bastante instáveis causando danos às proteínas e mutações no DNA, oxidação de fosfolípidios de membranas e em lipoproteínas de baixa densidade. Uma quantidade em excesso no organismo humano está associada ao desenvolvimento de várias doenças, como aterosclerose, artrite, diabetes e câncer (CASTRO, 2012).

Uma das principais causas de deterioração dos alimentos é a oxidação, comprometendo características como o sabor, aroma e coloração e reduzindo conseqüentemente o tempo de prateleira do alimento. A oxidação dos alimentos afeta lipídios, proteínas e carboidratos. Por isso é de suma importância a presença de substâncias como os antioxidantes que inibam essas reações, afetando de forma direta a qualidade dos alimentos (CORREA, 2013).

Existem duas categorias básicas de antioxidantes, os sintéticos e os naturais. Entretanto as substâncias sintéticas (como BHA, BHT e n-propilgalato) apresentam riscos potenciais *in vivo*, devido a sua relação com propriedades carcinogênicas. Devido a essas características desvantajosas dos antioxidantes sintéticos é que os naturais ganham destaque e o potencial



antioxidante de peptídeos gerados a partir da hidrólise de diferentes proteínas (origem vegetal e animal) vem sendo pesquisada (CASTRO, 2012; CORREA, 2013).

Os mecanismos de ação que explicam a atividade antioxidante de peptídeos não são totalmente compreendidos, mas vários estudos mostraram a capacidade destes peptídeos em inibir a peroxidação lipídica, sequestrar radicais livres, quelar íons metálicos e capturar espécies reativas de oxigênio. As propriedades antioxidantes dos peptídeos estão relacionadas com sua composição, estrutura e hidrofobicidade. A presença dos aminoácidos tirosina, triptofano, metionina, lisina e cisteína é um importante fator para a ação antioxidante dos peptídeos, especialmente pela capacidade de redução dos íons  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  e atividade quelante de íons  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  (CASTRO, 2012). A atividade antioxidante dos peptídeos pode ser avaliada por diversos métodos e na tabela 4 estão descritos os principais métodos e seus respectivos mecanismos de ação.

**Tabela 4. Métodos de determinação de atividade antioxidante de peptídeos**

<b>Método</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Reação</b>	<b>Medida Realizada</b>
<b>DPPH</b>	<b>Captura do radical DPPH</b>	O radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) reage com antioxidantes doadores de hidrogênio, com mudança de coloração violeta para amarela.	Redução da absorvância a 517nm
<b>ABTS</b>	<b>Captura do radical ABTS</b>	O radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) é estabilizado na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, com mudança de coloração verde escura para verde clara.	Redução da absorvância a 734nm
<b>ORAC</b>	<b>Captura do radical peroxila</b>	O radical peroxila, gerado pela decomposição do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] na presença de oxigênio atmosférico, reage com um indicador fluorescente formando um produto não fluorescente. Na presença de antioxidantes, a fluorescência é preservada.	Redução de fluorescência (excitação a 485nm e emissão a 520nm)

Fonte: Adaptado de CASTRO (2012).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho de pesquisa teve como principal objetivo a produção de proteases a partir de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (*A. niger* e *A. oryzae*) por fermentação no estado sólido.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar a atividade proteolítica sobre a caseína dos extratos enzimáticos brutos de *A. oryzae* e de *A. niger*.
- Determinar efeito de pH e da temperatura na atividade e estabilidade enzimática.
- Estudar através de planejamento experimental os efeitos da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de *A. niger* e *A. oryzae* no grau de hidrólise da caseína.
- Determinar a atividade antioxidante dos peptídeos liberados a partir da hidrólise da caseína com o uso dos extratos enzimáticos brutos de *A. niger* e *A. oryzae*.
- Aplicar o extrato enzimático bruto de *A. niger* e *A. oryzae* na coagulação do leite para fabricação de queijo.

### 3. Justificativa

Entre as enzimas utilizadas comercialmente as proteases representam mais da metade deste mercado, devido à ampla versatilidade de aplicação na indústria de detergentes, farmacêutica e de alimentos. As proteases são encontradas em diversas fontes: animais, vegetais e em microrganismos. As de origem microbiana se destacam por serem obtidas através de processos mais simples, mais rápidos e de baixo custo, e em geral são mais estáveis que as homólogas de plantas e animais.

Os fungos filamentosos são os mais utilizados para produção de enzimas, uma vez que apresentam facilidade de manipulação, produzem enzimas em grande quantidade e variedade, é possível a realização de modificações pós-traducionais, possuem facilidade em crescer ao natural em substratos sólidos e uma excelente capacidade de fermentação. Tanto o *Aspergillus oryzae* quanto o *Aspergillus niger* são reconhecidos como fungos seguros para a utilização em alimentos (GRAS – *Generally Regarded as Safe*), e por isso se sobressaem neste ramo da indústria.

A fermentação no estado sólido ainda não é tão utilizada como a fermentação submersa, porém é uma técnica promissora dentro da indústria devido as suas vantagens como, por exemplo, a possibilidade do uso de resíduos agroindustriais como substrato de fermentação, o que reduz os custos do processo e promove a sustentabilidade, uma vez que estes resíduos são produzidos em grandes quantidades e por não serem utilizados de outra forma se tornam um problema ecológico e sanitário.

A utilização de hidrolisados proteicos vem ganhando força devido ao fato de que preparações compostas por peptídeos menores apresentam a vantagem de serem absorvidas mais eficientemente e possuem um maior valor nutritivo do que as proteínas intactas ou do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres. Assim, os hidrolisados proteicos contendo aminoácidos livres e peptídeos pequenos, constituem uma alternativa às proteínas intactas e estão presentes em formulações especiais desenvolvidas para fornecer suporte nutritivo a pacientes com diferentes necessidades.

Outra importante vantagem de aplicação dos hidrolisados proteicos é a liberação de peptídeos biologicamente ativos (PBA) que podem interagir com células no organismo, induzindo respostas fisiológicas benéficas desempenhando diversas funções, como atividade imunomoduladora, antimicrobiana, antiúlcera, anti-hipertensiva, anticariogênica, anticoagulante, opióide, hipocolesterolêmica e antioxidante. Neste sentido há perspectivas destes PBA serem incorporados como ingredientes em alimentos funcionais, nutracêuticos e medicamentos. Os peptídeos possuidores de atividade antioxidante podem ser utilizados com a finalidade de promover benefícios à saúde, na prevenção de varias doenças, como aterosclerose, artrite, diabetes e câncer, bem como na preservação de alimentos. O desenvolvimento de antioxidantes naturais é de extrema importância como alternativa aos antioxidantes sintéticos, uma vez que estes apresentam relação a propriedades carcinogênicas.

Considerando as informações acima, é de extrema importância a realização de estudos que utilizem fungos seguros, como o *Aspergillus oryzae* e o *Aspergillus niger* para a obtenção de enzimas proteolíticas com finalidade de aplicação na indústria de alimentos. Além do estudo mais aprofundado sobre a obtenção e determinação de hidrolisados que contenham peptídeos biologicamente ativos.

## 4. Metodologia

### 4.1. Microrganismos e manutenção das cepas

Foram utilizadas as cepas dos fungos filamentosos *Aspergillus oryzae*, (Ahlburg) Cohn nº CCT: 3940 ou ATCC 12891 e *Aspergillus niger* van Tieghem (variedade awamori) nº CCT: 3941 ou ATCC 22342, adquiridas na Fundação André Tosello (Coleção de Culturas Tropicais). Os fungos foram conservados sob-refrigeração a 8°C em meio ágar Sabouraud dextrose, sendo repicados a cada três meses.

### 4.2. Obtenção da solução de esporos para inocular os meios de cultivo na fermentação no estado sólido

O meio para produção de esporos foi constituído por 50 mL do Agar Sabouraud dextrose distribuído em frascos erlenmeyers de 250 mL, posteriormente inclinados e, após solidificação, o micro-organismo foi repicado no mesmo. Após o crescimento do fungo (*A. oryzae* ou *A. niger*), incubado a 24°C por aproximadamente 5-7 dias, a biomassa formada na superfície do meio foi raspada com auxílio de uma espátula, adicionando-se 30 mL de água destilada estéril, para obter uma solução de esporos. A contagem da solução de esporos foi realizada em câmara de Neubauer (PEREIRA, 2014). A concentração de esporos utilizada para inocular os meios de cultivo na FES foi de  $10^5$ –  $10^6$  esporos/g.

### 4.3. Fermentação no estado sólido (FES) para obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Como meio de cultivo no processo de FES para obtenção das proteases, foi utilizada farinha grossa de arroz, suplementada com 2% (p/v) de peptona e 2% (p/v) de extrato de levedura. A FES foi conduzida em erlenmeyer de 500 mL contendo 25 g de meio de cultivo e água destilada (100 mL). Então, no

erlenmeyer de 500 mL para cada 25 gramas de farinha de arroz e 100 mL de água destilada foram adicionados 0,5 g de peptona e 0,5 g de extrato de levedura. Todos os erlenmeyers foram autoclavados a 121°C por 20 min. e após autoclavagem o meio estava úmido, mas sem água aparente. Após o resfriamento, cada meio foi inoculado com uma suspensão de esporos de *A. oryzae* ou *A. niger* (3-4 mL,  $10^5$  -  $10^6$  esporos/g) e o material inoculado foi incubado à 24°C por 7 dias. Após 7 dias de crescimento do fungo (*A. oryzae* ou *A. niger*), foi obtido um extrato enzimático bruto pela adição de 100 mL de água destilada. Essa suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro e em seguida foi filtrada para remoção dos sólidos. A atividade enzimática de cada extrato foi medida conforme descrito no item 4.4.

#### **4.4. Determinação da atividade proteolítica dos extratos enzimáticos brutos para os testes de efeito de pH e da temperatura na atividade e estabilidade enzimática**

Para medir a atividade enzimática de cada extrato, a mistura da reação foi composta de 2,5 mL de solução de caseína 0,5% (p/v) e 2,0 mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada em banho-maria e ao final de 60 minutos a reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Para o controle, o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. O branco (sem adição de caseína) foi composto por 2,5 mL de água destilada, 2,0 mL de extrato enzimático e 2,5 mL de solução de TCA 10% (p/v). As amostras, o branco e o controle foram filtrados e a leitura dos filtrados foi feita a 280 nm, utilizando cubetas de quartzo. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,01 na absorbância a 280 nm, nas condições do ensaio. O TCA tem a função de precipitar a caseína não hidrolisada, que fica retida na etapa de filtração. No filtrado restarão os peptídeos e aminoácidos solúveis que serão medidos a 280 nm, pois absorvem a luz UV.

#### 4.5. Estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado incubando-se 2,5 mL de solução de caseína 0,5% (p/v) e 2,0 mL de extrato enzimático nas seguintes temperaturas: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C por 1 hora. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). As amostras foram filtradas e a leitura do sobrenadante foi realizada a 280 nm.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática de *A. oryzae* foi determinado incubando-se 3,0 mL de extrato enzimático bruto em ausência de substrato nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C por 30 minutos. Para o teste com *A. niger* incubou-se 3,0 mL de extrato enzimático bruto em ausência de substrato nas temperaturas de 10-80°C por 1 hora. A atividade residual de cada extrato enzimático nas diferentes temperaturas foi determinada incubando-se 2,5 mL de solução de caseína 0,5% (p/v) e 2,0 mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a 60°C e ao final de 60 minutos a reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). As amostras foram filtradas e a leitura do sobrenadante foi realizada a 280 nm.

O efeito do pH na estabilidade enzimática foi determinado na faixa de pH de 3,0 a 10,0, com uso das seguintes soluções tampão: citrato-fosfato (pH 3,0); acetato (pH 4,0 e 5,0); fosfato (pH 6,0, 7,0 e 8,0) e bicarbonato (pH 9,0 e 10,0), todos na concentração 0,1 M e dentro da faixa de capacidade tamponante. As misturas de 3,0 mL de extrato enzimático bruto e 3,0 mL das soluções tampão de diferentes valores de pH foram incubadas pelo período de 40 minutos a 60°C. A atividade residual de cada uma das misturas de extrato enzimático nos tampões com diferentes valores de pH foi determinada incubando-se 2,5 mL de solução de caseína 0,5% (p/v) e 2,0 mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a 60°C e ao final de 60 minutos a reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). As amostras foram filtradas e a leitura do sobrenadante foi realizada a 280 nm.

#### 4.6. Determinação do grau de hidrólise da caseína

O grau de hidrólise (GH) foi definido como a porcentagem de grupamentos amino que foram liberados no rompimento da molécula proteica pela ação de enzimas (RODRIGUES, 2014). Neste caso, o GH foi calculado por meio da relação entre as proteínas hidrolisadas e a proteína total da amostra de acordo com a equação 1:

$$\%GH = \frac{\text{proteínas hidrolisadas}}{\text{proteína total da amostra}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

Para determinação das proteínas hidrolisadas e da proteína total da amostra foi utilizado o método do Biureto (GORNALL et al., 1949), onde se construiu uma curva padrão com concentrações conhecidas de caseína (ANEXO 1). A partir da equação da reta resultante da curva padrão de caseína foram realizados os cálculos de concentração de proteínas hidrolisadas e proteína total da amostra.

A hidrólise da caseína em peptídeos foi determinada incubando-se 1,0 mL de solução de caseína 0,5% (p/v) e 1,0 ml de extrato enzimático de *A. oryzae* ou *A. niger*, por 60 minutos na temperatura de 60°C. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). As amostras foram filtradas para precipitar a caseína não hidrolisada e no sobrenadante contendo os peptídeos hidrolisados foram adicionados 4,0 mL de reagente de Biureto. Após 30 minutos de repouso, a leitura das amostras foi realizada a 540 nm.

#### 4.7. Planejamento experimental para estudo da hidrólise da caseína em peptídeos utilizando os extratos enzimáticos brutos dos fungos *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus niger*

Foi utilizado planejamento composto central 2<sup>2</sup> e metodologia de superfície de resposta para estudar a influência das variáveis: concentração de caseína (0,2-2,0%, p/v) e do volume de extrato enzimático bruto (1-4 mL) na



hidrólise da caseína em peptídeos. Os ensaios totalizaram 12 experimentos, incluindo quatro ensaios referentes ao fatorial  $2^2$  (-1 e +1), quatro repetições no ponto central (0) para se estimar o erro e consequente análise de variância e quatro ensaios nos pontos axiais ( $\alpha = 1,41$ ) para se obter o modelo polinomial quadrático, gerando após validação estatística, a superfície de resposta e curva de contorno. A análise estatística do modelo foi feita através de análise de variância (ANOVA) com uso do programa computacional STATISTICA, versão 10.0. Essa análise incluiu o teste Fisher (teste F) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). A Tabela 1 mostra as variáveis independentes e os valores decodificados do planejamento experimental e a tabela 2 mostra o planejamento composto central  $2^2$  codificado.

**Tabela 5. Valores decodificados utilizados no planejamento experimental**

Variável	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentração de caseína (%)	0,2	0,4	1,0	1,7	2,0
Volume de enzima (mL)	1,0	1,4	2,5	3,6	4,0

**Tabela 6. Planejamento composto central  $2^2$  codificado**

Ensaio	Concentração de caseína (%)	Volume de enzima (mL)	Grau de hidrólise (%) Resposta do experimento
1	-1	-1	
2	+1	-1	
3	-1	+1	
4	+1	1	
5	$-\alpha$	0	
6	$+\alpha$	0	
7	0	$-\alpha$	
8	0	$+\alpha$	
9	0	0	
10	0	0	
11	0	0	
12	0	0	

A hidrólise da caseína em peptídeos foi determinada incubando-se 1,0 mL de solução de caseína nas diferentes concentrações e diferentes volumes de extrato enzimático em solução aquosa, conforme determinado no planejamento experimental, por 30 minutos na temperatura de 70°C. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). As amostras foram filtradas para precipitar a caseína não hidrolisada e no sobrenadante contendo os peptídeos hidrolisados foram adicionados 4,0 mL de reagente de biureto. Após 30 minutos de repouso, a leitura das amostras foi realizada a 540 nm.

#### **4.8. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseína obtidos pela ação dos extratos enzimáticos brutos de *A. oryzae* e *A. niger***

Para realizar a hidrólise da caseína com extrato enzimático bruto de *A. oryzae* ou *A. niger*, a reação foi composta de 2,5 mL de solução de caseína 0,5% (p/v) e 2,0 mL de extrato enzimático. Foram realizados 2 tipos de testes: um com a solução de caseína 0,5% (p/v) neutralizada com solução de NaOH 1 N (pH 7,0) e outro com a solução de caseína 0,5% (p/v) não neutralizada e que naturalmente tinha um pH ácido de 3,5. A mistura de reação (2,5 mL de solução de caseína 0,5% (p/v) e 2,0 mL de extrato enzimático) foi incubada em banho-maria a 70°C e ao final de 30 e 60 minutos a reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). As amostras foram filtradas para precipitar a caseína não hidrolisada e o sobrenadante contendo os peptídeos hidrolisados foi neutralizado com solução de NaOH 1 N. A atividade antioxidante de cada hidrolisado de caseína foi determinada pela metodologia do ABTS, conforme RUFINO et al. (2007), com modificações.

Para se determinar a quantidade de caseína hidrolisada em cada teste (necessário para realizar os cálculos de atividade antioxidante), utilizou-se a metodologia do Biureto. A mistura de reação (2,5 mL de solução de caseína 0,5% (p/v) e 2,0 mL de extrato enzimático) foi incubada em banho-maria a 70°C e ao final de 30 e 60 minutos a reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). As amostras foram filtradas para precipitar a caseína não hidrolisada e o sobrenadante contendo

os peptídeos hidrolisados foram adicionados 4,0 mL de reagente de biureto. Após 30 minutos de repouso, a leitura das amostras foi realizada a 540 nm. A partir da equação da reta resultante da curva padrão de caseína foram realizados os cálculos de concentração de proteínas hidrolisadas.

#### **4.9. Aplicação dos extratos enzimáticos brutos do *A. oryzae* e *A. niger* na coagulação do leite para fabricação de queijo**

Para a aplicação dos extratos enzimáticos brutos do *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* na coagulação do leite para fabricação de queijo, foram aquecidos dois litros de leite já pasteurizado a 35°C e em seguida foi adicionado 3 mL de cloreto de cálcio. Após a dissolução do cloreto de cálcio, foram adicionados 10 mL do extrato enzimático bruto de *A. oryzae* ou *A. niger* e efetuou-se a homogeneização das amostras por 1 minuto. O leite ficou em repouso por 12 horas em estufa a 45°C. Após coagulação, com o auxílio de uma faca foram feitos cortes paralelos e cruzados por toda a extensão da massa, com uma distância mínima de três centímetros entre os cortes e a coalhada ficou em repouso por mais cinco minutos, possibilitando a formação do soro. Após o repouso, foi feita a mexedura da massa cortada em movimentos circulares e lentos por toda extensão e profundidade do recipiente. E por último a massa formada foi transferida para uma forma circular própria para produção de queijo, possibilitando a saída do soro. Este processo foi realizado de forma separada para os extratos enzimáticos de *A. oryzae* e *A. niger*. Como forma de comparação da eficiência de coagulação do leite pelos extratos enzimáticos, o processo de coagulação do leite para fabricação de queijo também foi realizado com um coalho comercial para fabricação de queijo da marca Há-La®, produzido a partir de *A. niger*.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Atividade das proteases dos extratos enzimáticos brutos de *A. oryzae* e de *A. niger* sobre a caseína

Na determinação da atividade enzimática do extrato bruto de *A. oryzae* foi realizado um teste utilizando somente farinha grossa de arroz na FES para obtenção das proteases e outro teste utilizando farinha grossa de arroz, suplementada com peptona e extrato de levedura. Os resultados da determinação da atividade enzimática (realizada como descrito no item 4.4) de cada extrato enzimático bruto de *A. oryzae* estão descritos na tabela 7.

**Tabela 7. Atividade das proteases obtidas a partir dos extratos enzimáticos brutos de *A. oryzae* sobre a caseína**

<b>Extrato enzimático de <i>A. oryzae</i></b>	<b>Absorbância (280 nm)</b>	<b>Atividade enzimática (U)</b>
Meio de cultivo suplementado com peptona e extrato de levedura	1,482 amostra 0,206 controle	127,6
Meio de cultivo não suplementado com peptona e extrato de levedura	0,336 amostra 0,207 controle	12,9

Os resultados dos testes realizados com extrato bruto de *Aspergillus oryzae* demonstram que a atividade enzimática apresentou-se maior quando o meio de cultivo foi suplementado com fontes de nitrogênio, como o extrato de levedura e a peptona. A produção de proteases depende da disponibilidade de carbono e nitrogênio no meio de cultivo e ambos exercem efeitos reguladores sobre a síntese enzimática. As espécies de *Aspergillus* possuem a capacidade de utilizar uma grande variedade de substratos para o seu crescimento e também possuem diferentes vias bioquímicas para a sua assimilação (SOUZA, 2015). Naturalmente o nitrogênio é encontrado no solo na forma de nitrato ou amônio e sua utilização pelos fungos ocorre no momento em que é requerido nos processos metabólicos. Em casos de cultivo do fungo em laboratório, quando o substrato utilizado pode não fornecer uma quantidade adequada de

nitrogênio como é o caso do arroz, se faz necessário à suplementação do meio de cultivo (SLIVINSK, 2007). Por este motivo escolheu-se trabalhar com a farinha de arroz suplementada para o cultivo de ambos os fungos, *A. oryzae* e *A. niger*.

Na determinação da atividade enzimática do extrato bruto de *A. niger* (crescido em meio de cultivo suplementado com peptona e extrato de levedura) foi realizado um teste de hidrólise da caseína utilizando o extrato enzimático bruto de *A. niger* e um coalho comercial disponível para fabricação de queijo (marca Há-La®) produzido a partir de *A. niger*, para comparar os resultados de atividade enzimática. Os resultados da determinação da atividade enzimática (realizada como descrito no item 4.4) do extrato bruto de *A. niger* e do coalho comercial estão descritos na tabela 8.

**Tabela 8. Atividade das proteases do extrato enzimático bruto de *A. niger* e do coalho comercial sobre a caseína**

<b>Extrato enzimático</b>	<b>Absorbância (280 nm)</b>	<b>Atividade enzimática (U)</b>
<b><i>A. niger</i></b>	1,714 amostra 0,180 controle	153,4
<b>Coalho comercial</b>	1,062 amostra 0,180 controle	88,2

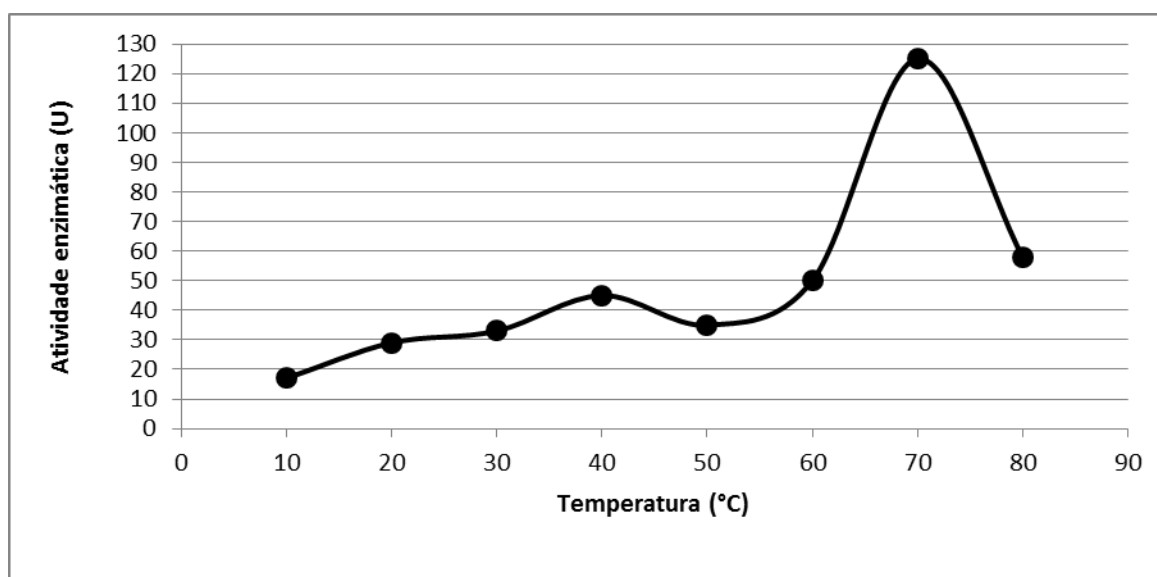
Pode-se observar que o extrato enzimático de *A. niger* apresentou atividade enzimática maior que o coalho comercial. Muitas proteases extracelulares de origem microbiana atuam de forma semelhantes à quimosina na sua capacidade para clivar os macro peptídeos caseíno da K-caseína, o que desencadeia a desestabilização das micelas da caseína. Este mecanismo induz a coagulação do leite, o que proporciona o seu uso na produção de queijo (FREITAS, 2013).

## 5.2. Estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade enzimática dos extratos enzimáticos brutos de *A. oryzae* e de *A. niger*

As tabelas 9 e 10 e os gráficos 1, 2, 3 e 4 apresentam a determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática dos extratos enzimáticos brutos de *A. oryzae* e de *A. niger*.

**Tabela 9. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade enzimática de *A. oryzae***

Temperatura (°C)	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática		Efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática	
	Absorbância (280 nm) <i>A. oryzae</i>	Atividade enzimática (U)	Absorbância (280 nm) <i>A. oryzae</i>	Atividade enzimática (U)
10	0,170	17,0	0,080	8,0
20	0,240	24,0	0,300	30,0
30	0,330	33,0	0,322	32,2
40	0,390	39,0	0,373	37,3
50	0,350	35,0	0,280	28,0
60	0,480	48,0	0,482	48,2
70	1,125	112,5	0,500	50,0
80	0,580	58,0	0,429	42,9



**Gráfico 1. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de *A. oryzae***

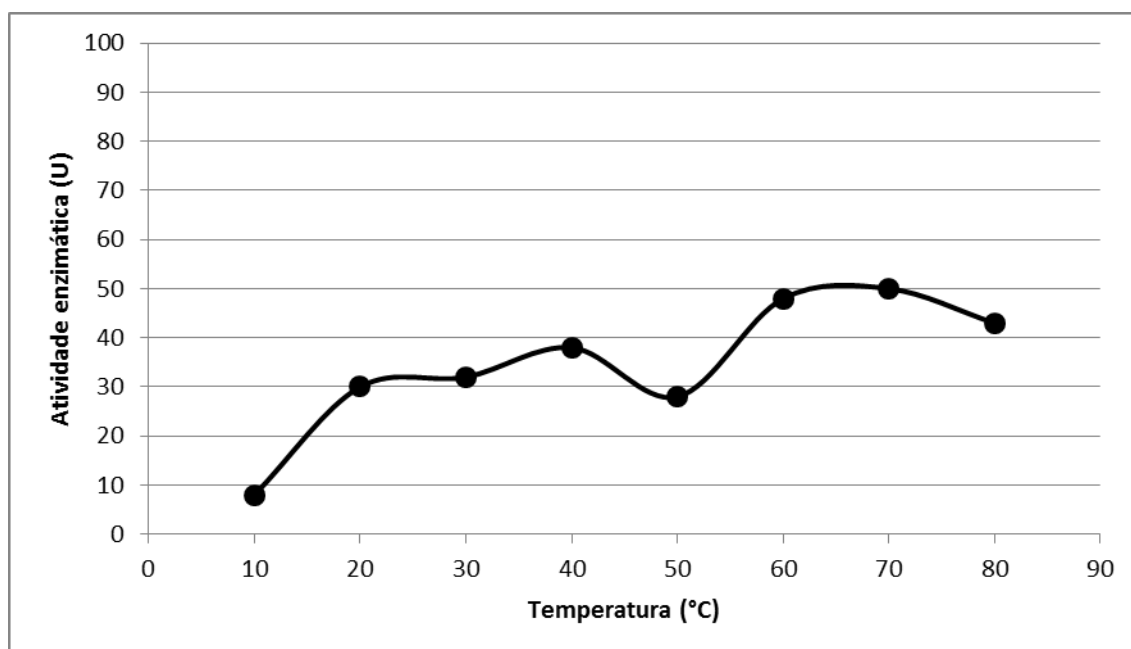
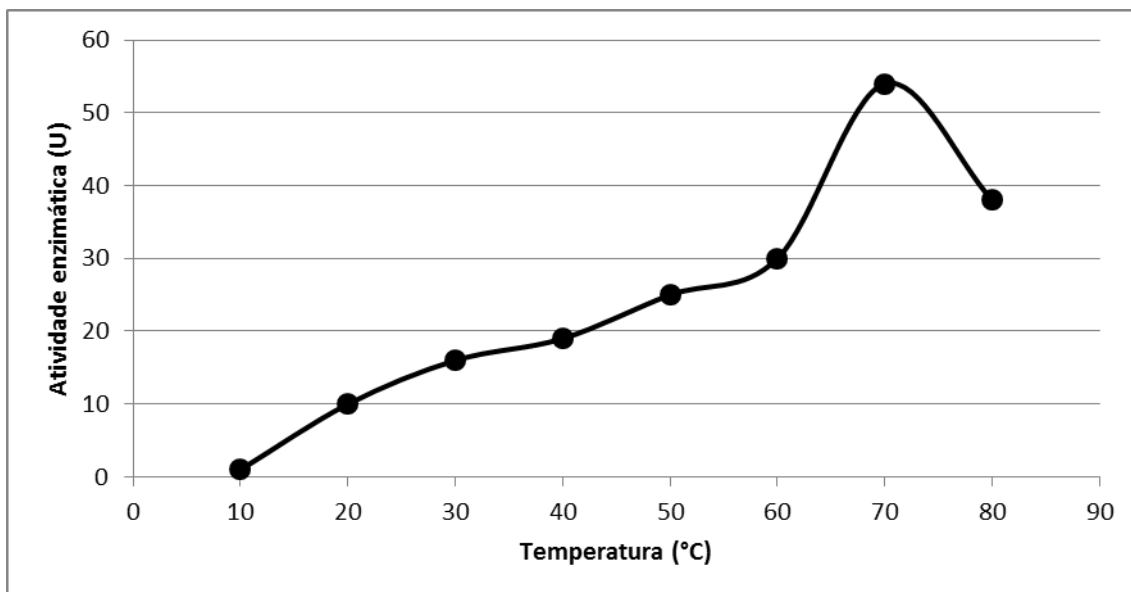


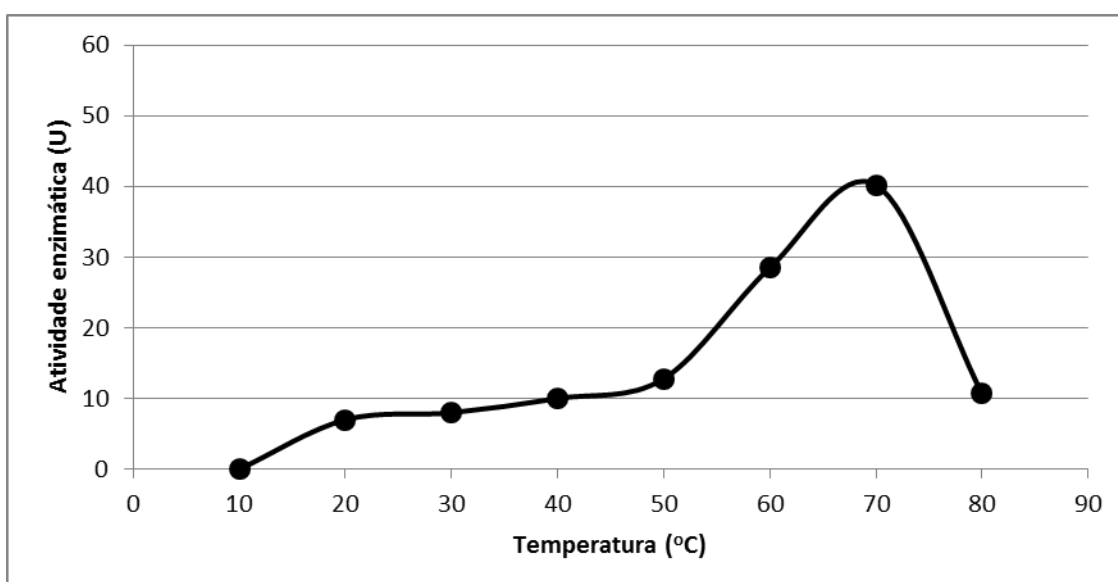
Gráfico 2. Efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática *A. oryzae*

Tabela 10. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade enzimática de *A. niger*

Temperatura (°C)	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática		Efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática	
	Absorbância (280 nm)	Atividade enzimática (U)	Absorbância (280 nm)	Atividade enzimática (U)
	<i>A. niger</i>		<i>A. niger</i>	
10	0,010	1,0	0	0
20	0,105	10,5	0,070	7,0
30	0,160	16,0	0,080	8,0
40	0,192	19,2	0,100	10,0
50	0,255	25,5	0,128	12,8
60	0,301	30,1	0,285	28,5
70	0,540	54,0	0,402	40,2
80	0,380	38,0	0,107	10,7



**Gráfico 3. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de *A. niger***



**Gráfico 4. Efeito da temperatura sobre a estabilidade enzimática *A. niger***

As proteases produzidas por *A. oryzae* e *A. niger* neste trabalho mostraram uma maior atividade e estabilidade enzimática em temperaturas mais altas, entre 60 a 70°C e um pico maior de atividade na temperatura de 70°C. A maior resistência térmica exibida pelas proteases deste estudo tornam-nas interessantes do ponto de vista industrial. A temperatura ótima é um valor muito específico de cada enzima, podendo variar entre os diferentes tipos de proteases produzidas por um mesmo fungo (SILVA, 2013). No estudo realizado

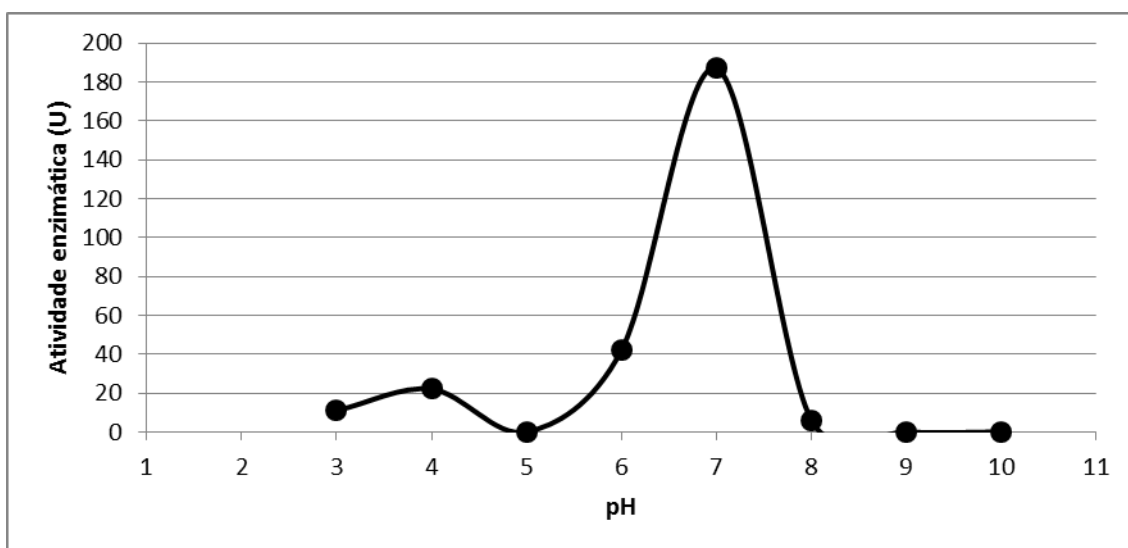


por Castro e Sato (2014) foi observada atividade ótima das proteases produzidas por *A. oryzae* LBA 01 na temperatura de 57,2°C e maior atividade nas temperaturas de 50-60°C. Em outro estudo também realizado por Castro et al. (2014), foi observado que as proteases de *A. niger* LBA 02 apresentaram temperatura ótima a 50°C, tiveram maior atividade nas temperaturas de 40-50°C e apresentaram decréscimo da atividade em temperaturas acima de 55°C.

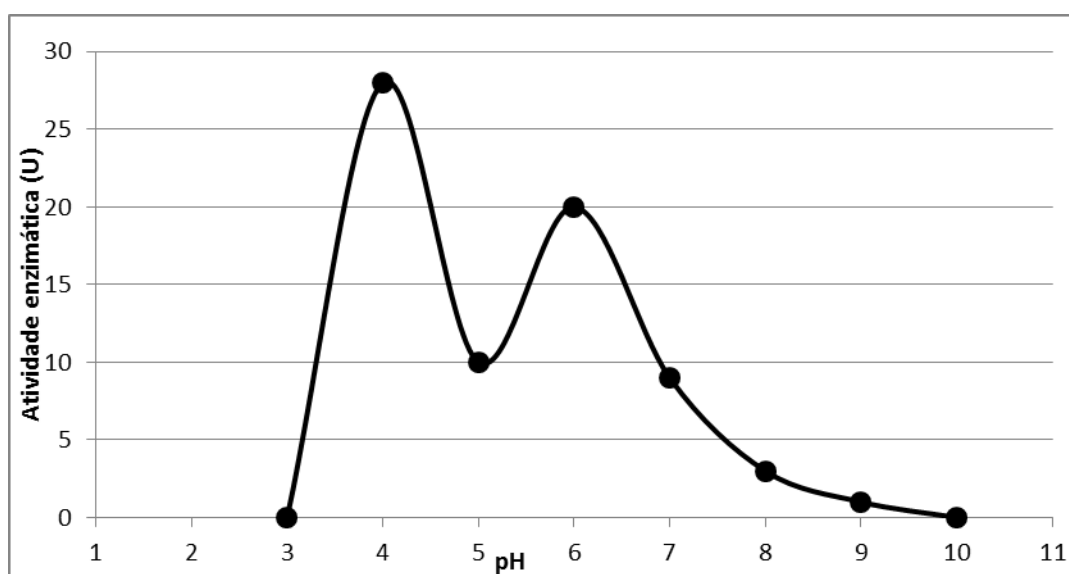
A tabela 11 e os gráficos 5 e 6 apresentam a determinação do efeito da pH na estabilidade enzimática dos extratos enzimáticos brutos de *A. oryzae* e de *A. niger*.

**Tabela 11. Efeito do pH sobre a estabilidade enzimática de *A. oryzae* e *A. niger***

pH	Absorbância	Atividade	Absorbância	Atividade
	(280 nm) <i>A. oryzae</i>	enzimática (U) <i>A. oryzae</i>	(280 nm) <i>A. niger</i>	enzimática (U) <i>A. niger</i>
3	0,106	10,6	0	0
4	0,218	21,8	0,283	28,3
5	0,000	0,0	0,104	10,4
6	0,415	41,5	0,207	20,7
7	1,878	187,8	0,094	9,4
8	0,063	6,3	0,03	3,0
9	0	0	0,01	1,0
10	0	0	0	0



**Gráfico 5. Efeito do pH sobre a estabilidade enzimática de *A. oryzae***



**Gráfico 6. Efeito do pH sobre a estabilidade enzimática de *A. niger***

A atividade enzimática é fortemente influenciada pelo pH, uma vez que os sítios ativos das enzimas são muitas vezes compostos por grupos iônicos cuja conformação deve ser mantida, para permitir com sucesso a ligação do substrato, por isso é de extrema importância conhecer o pH ótimo de cada enzima proporcionando uma otimização na reação (FREITAS, 2013). A atividade proteolítica máxima do extrato enzimático bruto obtido a partir do *A. oryzae* ocorreu em pH 7,0, caracterizando a enzima produzida como uma

protease neutra. No estudo realizado por Freitas (2013), as proteases obtidas a partir do *A. oryzae* também obtiveram maior atividade em pH neutro. Segundo SILVA (2013), *Aspergillus oryzae* é a principal fonte de protease neutra fúngica.

As enzimas obtidas do *A. niger* neste trabalho apresentaram uma estabilidade considerável na faixa de pH entre 4,0 e 7,0, com a caracterização de proteases ácidas estáveis em pH 4,0 e proteases neutras estáveis em pH 6,0. Ahmed et al. (2011) obtiveram uma faixa de estabilidade enzimática para as proteases de *A. niger* entre os pHs 5,0 e 8,0, com a maior atividade em pH 7,0. No estudo de Madhumithah et al. (2011), utilizando vários resíduos vegetais para produção de proteases por FES a partir do fungo *A. niger*, obtiveram-se maiores atividades das proteases quando os resíduos estavam com pH 6,0.

### **5.3. Determinação do grau de hidrólise da caseína**

Os fundamentos dos diferentes métodos de determinação do grau de hidrólise de proteínas baseiam-se na determinação do nitrogênio solúvel, na determinação de grupos amino livres e também na determinação de prótons liberados após a ruptura das ligações peptídicas em determinados valores de pH. Para determinar o grau de hidrólise a partir do nitrogênio solúvel, as técnicas de maior uso são: o método de Kjeldhal, o método de Lowry, a reação de Biureto e a determinação de peptídeos contendo grupos aromáticos, por meio da técnica da espectrofotometria na região UV (SILVA, 2009).

Neste estudo, o grau de hidrólise (GH) foi definido como a porcentagem de grupamentos amino que foram liberados no rompimento da molécula proteica (caseína) pela ação de enzimas proteases. No trabalho de RODRIGUES (2014), os peptídeos hidrolisados foram determinados pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) e a proteína total da amostra foi determinada pelo método de Kjeldahl (IAL, 2008). Neste trabalho, o método do Biureto (GORNALL et al., 1949) foi utilizado para determinar tanto os peptídeos hidrolisados quanto a proteína total da amostra. No método do Biureto qualquer proteína ou peptídeo contendo pelo menos duas ligações peptídicas pode formar complexos de coloração violeta ao reagir com o reagente biureto (máximo de absorção 540nm). Os aminoácidos histidina, serina e treonina

também são capazes de complexar o reagente biureto com produção de cor. Devido à simplicidade da reação e ao baixo custo dos reagentes, o método do biureto tem sido largamente usado na dosagem quantitativa de proteínas (MIWA, 2003).

A tabela 12 apresenta o grau de hidrólise da caseína após ação das proteases de *A. oryzae* ou *A. niger*, por 60 minutos, na temperatura de 60°C.

**Tabela 12. Grau de hidrólise da caseína após ação das proteases de *A. oryzae* ou *A. niger***

	<b>Absorbância 540 nm</b>	<b>Quantidade de caseína (mg)</b>	<b>GH (%)</b>
<b>Proteína total em 1 mL de caseína 0,5%</b>	0,296	5,28	
<b>Proteínas hidrolisadas com <i>A. niger</i></b>	0,106	1,75	33,14
<b>Proteínas hidrolisadas com <i>A. oryzae</i></b>	0,076	1,20	22,72

Através da validação da metodologia do grau de hidrólise da caseína utilizando o método do Biureto foi possível montar um planejamento experimental para estudo da hidrólise da caseína em peptídeos com os extratos enzimáticos brutos dos fungos *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus niger*.

#### **5.4. Planejamento experimental para estudo da hidrólise da caseína em peptídeos com o extrato enzimático brutos do fungo *Aspergillus niger***

Foi utilizada metodologia de planejamento experimental para o estudo do efeito da concentração de caseína (%) e do volume de extrato enzimático (mL) de *A. niger* no grau de hidrólise da caseína (%). A hidrólise da caseína em peptídeos foi determinada incubando-se a solução de caseína nas diferentes concentrações e diferentes volumes de extrato enzimático por 30 minutos na temperatura de 70°C. A Tabela 13 mostra o planejamento com os resultados observados (valores experimentais). Verificou-se que toda a caseína foi hidrolisada (100%) no ensaio 5 que continha a menor concentração de caseína (0,2%). Já o ensaio 6 que continha a maior concentração de caseína (2,0%) apresentou o menor grau de hidrólise (15%).

**Tabela 13. Planejamento composto central 2<sup>2</sup> codificado e decodificado (valores reais entre parênteses) utilizando as proteases de *A. niger*, com os resultados experimentais (grau de hidrólise da caseína em peptídeos)**

Ensaio	Concentração de caseína (%)	Volume de enzima (mL)	Valores experimentais Grau de hidrólise (%) <i>A. niger</i>
1	-1 (0,4)	-1 (1,4)	59,25
2	+1 (1,7)	-1 (1,4)	16,41
3	-1 (0,4)	+1 (3,6)	80,50
4	+1 (1,7)	+1 (3,6)	21,41
5	- $\alpha$ (0,2)	0 (2,5)	100
6	+ $\alpha$ (2,0)	0 (2,5)	15,00
7	0 (1,0)	- $\alpha$ (1,0)	23,50
8	0 (1,0)	+ $\alpha$ (4,0)	31,80
9	0 (1,0)	0 (2,5)	29,10
10	0 (1,0)	0 (2,5)	29,98
11	0 (1,0)	0 (2,5)	29,98

A Tabela 14 apresenta os efeitos das variáveis independentes na hidrólise da caseína pelas proteases de *A. niger*, usando limites de 95% de nível de confiança ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 14. Efeitos da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de *A. niger* no grau de hidrólise da caseína**

	Efeito	Erro padrão	t(2)	p
<b>Média</b>	29,686	0,2933	101,204	0,00009
<b>(1) Conc. caseína (L)</b>	-55,534	0,3592	-154,581	0,00004
<b>Conc. caseína (Q)</b>	28,722	0,4276	67,170	0,00022
<b>(2) Vol. enzima (L)</b>	9,497	0,3592	26,435	0,00142
<b>Vol. enzima (Q)</b>	-1,128	0,4276	-2,638	0,11865
<b>1L x 2L</b>	-8,125	0,5080	-15,992	0,00388

**L = linear, Q = quadrático**

Os valores de p são utilizados para checar a significância de cada coeficiente e também indicam a importância de cada variável ou interação entre variáveis na resposta do modelo. Quanto maior a magnitude do valor de t e menor o valor de p, maior será a significância do coeficiente, como pode ser observado na Tabela 14, onde somente uma variável (Concentração de

caseína Q) não foi significativa a 95% de nível de confiança e apresentou valor de  $p > 0,05$ . Analisando os parâmetros lineares, observou-se que a variável concentração de caseína apresentou efeito negativo e estatisticamente significativo, sendo a variável com a maior influência sobre o grau de hidrólise da caseína. Já a variável volume de extrato enzimático apresentou efeito positivo significativo, mas influenciou menos a resposta experimental.

A análise estatística do modelo foi feita através de análise de variância (ANOVA) com uso do programa computacional STATISTICA, versão 10.0. Essa análise incluiu o teste Fisher (teste F) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). A análise de variância (ANOVA) está apresentada na Tabela 15.

**Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental utilizando as proteases de *A. niger***

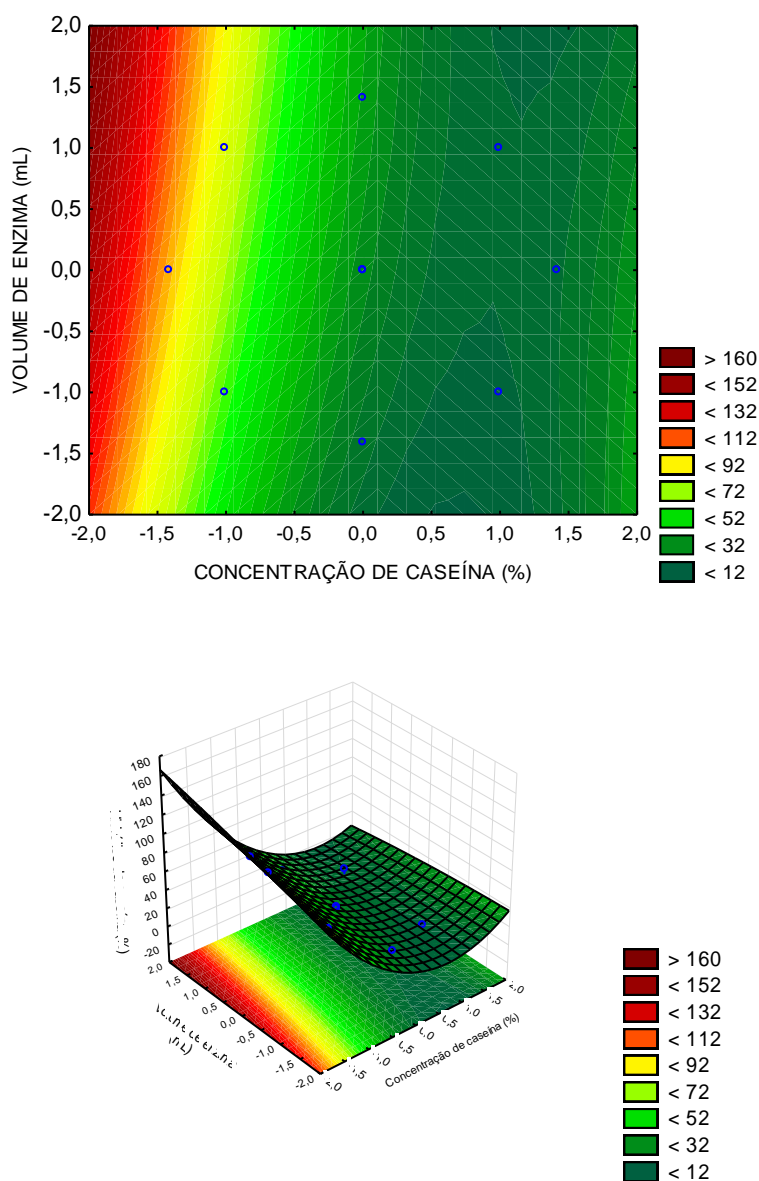
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	7720,922	4	1930,231	154,07
Resíduos	75,211	6	12,535	-
Falta de ajuste	74,695	4	-	-
Erro puro	0,516	2	-	-
<b>Total</b>	<b>7796,133</b>	<b>10</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

**Coeficiente de determinação  $R^2 = 0,99$ , F tabelado  $0,95,4,6 = 4,28$**

A partir da ANOVA foi obtido o modelo que possui um valor F significativo, o que caracteriza um modelo que pode ser utilizado para prever as respostas de grau de hidrólise da caseína em função das variáveis independentes. A adequação do modelo pode ser verificada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que explica 99% da variância total das respostas. O valor de F obtido a partir da ANOVA (154,07) foi 35,99 vezes maior do que o valor de F tabelado (4,28) e indicou que o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo a 95% de nível de confiança.

A Figura 1 mostra os efeitos da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de *A. niger* no grau de hidrólise da caseína. Foi possível observar que se obter uma maior hidrólise é preciso utilizar menores concentrações de caseína (0,2-0,4%) e maiores volumes de extrato enzimático

bruto (2,5-3,6 mL). O ensaio 3 onde se utilizou 0,4% de caseína e 3,6 mL de enzima resultou em 80,5% de hidrólise da caseína.



**Figura 1. Curva de contorno e superfície de resposta com as interações da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de *A. niger* no grau de hidrólise da caseína em peptídeos**

### **5.5. Planejamento experimental para estudo da hidrólise da caseína em peptídeos com o extrato enzimático brutos do fungo *Aspergillus oryzae***

O planejamento composto central  $2^2$  também foi executado para estudar como as proteases de *A. oryzae* influenciam o grau de hidrólise da caseína,

quando se varia a concentração de caseína (%) e o volume de extrato enzimático (mL). Os resultados obtidos no planejamento com *A. oryzae* foram similares aos resultados obtidos com o *A. niger*. A Tabela 16 mostra o planejamento com os resultados observados (valores experimentais). Verificou-se que o ensaio 5 que continha a menor concentração de caseína (0,2%) apresentou o maior grau de hidrólise (88%).

**Tabela 16. Planejamento composto central 2<sup>2</sup> codificado e decodificado (valores reais entre parênteses) utilizando as proteases de *A. oryzae*, com os resultados experimentais (grau de hidrólise da caseína em peptídeos)**

Ensaio	Concentração de caseína (%)	Volume de enzima (mL)	Valores experimentais Grau de hidrólise (%) <i>A. oryzae</i>
1	-1 (0,4)	-1 (1,4)	35,50
2	+1 (1,7)	-1 (1,4)	8,47
3	-1 (0,4)	+1 (3,6)	53,25
4	+1 (1,7)	+ 1 (3,6)	13,17
5	- $\alpha$ (0,2)	0 (2,5)	88,00
6	+ $\alpha$ (2,0)	0 (2,5)	9,45
7	0 (1,0)	- $\alpha$ (1,0)	8,90
8	0 (1,0)	+ $\alpha$ (4,0)	22,00
9	0 (1,0)	0 (2,5)	17,40
10	0 (1,0)	0 (2,5)	17,60
11	0 (1,0)	0 (2,5)	17,40

A Tabela 17 apresenta os efeitos das variáveis independentes na hidrólise da caseína pelas proteases de *A. oryzae*, usando limites de 95% de nível de confiança ( $p < 0,05$ ). Analisando os parâmetros lineares, observou-se que a variável concentração de caseína apresentou efeito negativo e estatisticamente significativo, sendo a variável com a maior influência sobre o grau de hidrólise da caseína. A variável volume de extrato enzimático apresentou efeito positivo significativo, mas influenciou menos a resposta experimental.



**Tabela 17. Efeitos da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de *A. oryzae* no grau de hidrólise da caseína**

	Efeito	Erro padrão	t(2)	p
Média	17,4667	0,066667	262,001	0,000015
(1) Conc. caseína (L)	-44,5493	0,081650	-545,612	0,000003
Conc. caseína (Q)	29,0137	0,097184	298,545	0,000011
(2) Vol. enzima (L)	10,2441	0,081650	125,464	0,000064
Vol. enzima (Q)	-4,2619	0,097184	-43,854	0,000520
1L x 2L	-6,5250	0,115470	-56,508	0,000313

**L = linear, Q = quadrático**

A análise estatística do modelo foi feita através de análise de variância (ANOVA) com uso do programa computacional STATISTICA, versão 10.0. Essa análise incluiu o teste Fisher (teste F) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). O valor de F obtido a partir da ANOVA (19,94) foi 3,95 vezes maior do que o valor de F tabelado (19,94) e indicou que o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo a 95% de nível de confiança. A adequação do modelo pode ser verificada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que explica 95% da variância total das respostas. A análise de variância (ANOVA) está apresentada na Tabela 18.

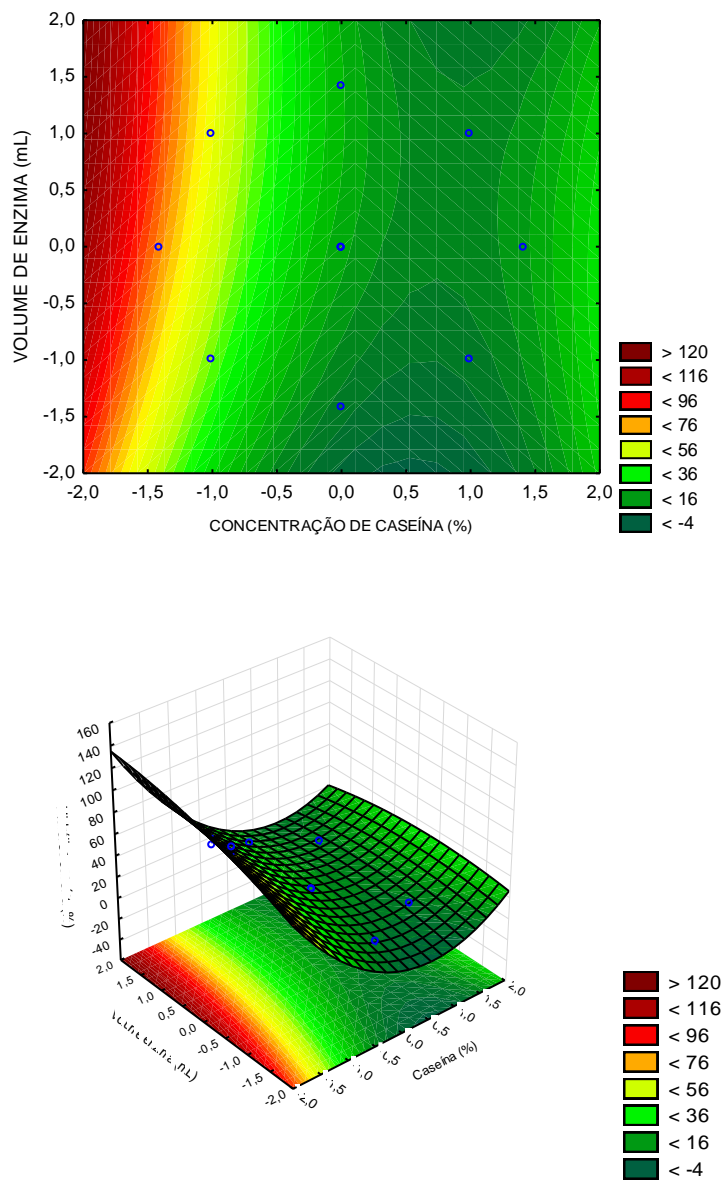
**Tabela 18. Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental utilizando as proteases de *A. oryzae***

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	5663,087	5	1132,6174	19,94
Resíduos	284,026	5	56,80	-
Falta de ajuste	283,999	3	-	-
Erro puro	0,027	2	-	-
Total	5947,113	10	-	-

**Coeficiente de determinação  $R^2 = 0,95$ , F tabelado  $0,95,5,5 = 5,05$**

A Figura 2 mostra os efeitos da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de *A. oryzae* no grau de hidrólise da caseína. Foi possível observar que se obter uma maior hidrólise é preciso utilizar menores

concentrações de caseína (0,2-0,4%) e maiores volumes de extrato enzimático bruto (2,5-3,6 mL). O ensaio 3 onde se utilizou 0,4% de caseína e 3,6 mL de enzima resultou em 53,25% de hidrólise da caseína.



**Figura 2. Curva de contorno e superfície de resposta com as interações da concentração de caseína e do volume de extrato enzimático bruto de *A. oryzae* no grau de hidrólise da caseína em peptídeos**

### 5.6. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseína pelo método de ABTS

As tabelas 19 e 20 apresentam os resultados da determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseína obtidos pela ação dos extratos enzimáticos brutos de *A. oryzae* e *A. niger*, pelo método de ABTS.

**Tabela 19. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseína obtidos pela ação do extrato enzimático bruto de *A. oryzae***

Tempo de hidrólise (minutos)	<i>Aspergillus oryzae</i>		
	Equivalente Trolox ( $\mu\text{M}$ )	Peptídeos hidrolisados (mg/mL)	Equivalente Trolox ( $\mu\text{M}$ )/ mg de peptídeos hidrolisados
30 (caseína ácida)	0,539	0,49	1,099 $\pm$ 0,03
60 (caseína ácida)	1,302	0,50	2,604 $\pm$ 0,07
30 (caseína neutra)	3,989	0,82	4,864 $\pm$ 0,17
60 (caseína neutra)	2,205	0,48	4,594 $\pm$ 0,17

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata  $\pm$  desvio padrão

**Tabela 20. Determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados de caseína obtidos pela ação do extrato enzimático bruto de *A. niger***

Tempo de hidrólise (minutos)	<i>Aspergillus niger</i>		
	Equivalente Trolox ( $\mu\text{M}$ )	Peptídeos hidrolisados (mg/mL)	Equivalente Trolox ( $\mu\text{M}$ )/ mg de peptídeos hidrolisados
30 (caseína ácida)	0,628	1,55	0,405 $\pm$ 0,01
60 (caseína ácida)	4,147	1,23	3,371 $\pm$ 0,07
30 (caseína neutra)	1,127	1,59	0,709 $\pm$ 0,02
60 (caseína neutra)	0,930	1,26	0,738 $\pm$ 0,02

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata  $\pm$  desvio padrão

Neste trabalho, verificou-se que os hidrolisados de caseína obtidos com proteases de *A. oryzae* apresentaram maior atividade antioxidante que os hidrolisados de caseína obtidos com proteases de *A. niger*. Outro resultado interessante foi que a atividade antioxidante dos hidrolisados proteicos obtidos com uso de *A. oryzae* foi maior quando se trabalhou com a caseína neutra,

mostrando que a atuação de protease neutra de *A. oryzae* é importante para a liberação de uma maior quantidade de peptídeos bioativos. Quando se trabalhou com a caseína neutra, o tempo de 30 ou 60 minutos de hidrólise da caseína com uso de *A. oryzae* não teve influencia na liberação de peptídeos com atividade antioxidante, mostrando que 30 minutos de reação é tempo suficiente para liberação dos peptídeos antioxidantes. Quando se utilizou as proteases de *A. niger* para hidrólise da caseína observou-se que a maior atividade antioxidante da caseína hidrolisada foi obtida com uso da caseína ácida e após 60 minutos de reação. Assim para o *A. niger* a atuação de protease ácida resultou em maior quantidade de peptídeos bioativos.

Neste trabalho a maior atividade antioxidante obtida a partir da hidrólise da caseína com uso de *A. oryzae*, pelo método ABTS foi de  $4,864 \pm 0,17$  Trolox. No estudo de Castro e Sato (2014), o hidrolisado de caseína obtido com as proteases de *A. oryzae* também apresentaram atividade antioxidante,  $4,92 \pm 0.09$  Trolox, determinada por DPPH.

### 5.7. Aplicação dos extratos enzimáticos brutos do *A. oryzae* e *A. niger* na coagulação do leite para fabricação de queijo

Os resultados da produção do queijo, utilizando os extratos enzimáticos brutos de *A. oryzae* e *A. niger* e também a produção do controle positivo realizado com um coalho comercial podem ser observados nas figuras 3, 4 e 5. Ambos os extratos enzimáticos possuíram capacidade de coagulação do leite, formando uma massa firme e homogênea.



Figura 3. Coagulação do leite com uso do extrato enzimático bruto de *A. oryzae*

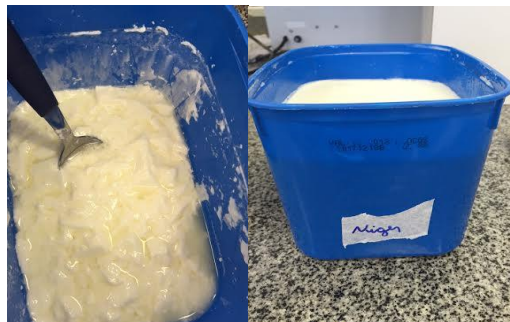


Figura 4. Coagulação do leite com uso do extrato enzimático bruto de *A. niger*



Figura 5. Coagulação do leite com uso do coalho comercial HÁ-LA

## 6. Conclusão

O presente trabalho de pesquisa estudou a produção e aplicação de proteases com o uso dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*. As proteases produzidas por *A. oryzae* e *A. niger* mostraram uma maior atividade e estabilidade enzimática em temperaturas entre 60 a 70°C. O extrato enzimático bruto obtido a partir do *A. oryzae* mostrou atividade proteolítica máxima em pH 7,0 e as enzimas obtidas do *A. niger* apresentaram uma protease ácida estável em pH 4,0 e uma protease neutra estável em pH 6,0.

O planejamento experimental utilizado para estudar a influência das variáveis concentração de caseína (%) e volume de extrato enzimático bruto de *A. niger* e de *A. oryzae* (mL) na hidrólise da caseína em peptídeos, mostrou que para obter uma maior hidrólise é preciso utilizar menores concentrações de caseína (0,2-0,4%) e maiores volumes de extrato enzimático bruto (2,5-3,6 mL).

Verificou-se que os hidrolisados de caseína obtidos com proteases de *A. oryzae* e de *A. niger* apresentaram atividade antioxidante. Na aplicação dos extratos enzimáticos brutos do *A. oryzae* e *A. niger* para fabricação de queijo, ambos os extratos enzimáticos possuíram capacidade de coagulação do leite.

Os resultados deste trabalho são importantes para as futuras aplicações dessas enzimas. Para a continuação do trabalho, a fim de verificar a viabilidade na área industrial, os próximos passos serão concentração das enzimas e estudo de estabilidade. E por fim, aplicar essas enzimas concentradas na produção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante.

## 7. Referências Bibliográficas

AFONSO, W. O.; BIASUTTI, E. A. R.; GERALDI, L. M.; SILVA, V. D. M.; CAPOBIANGO, M.; SILVESTRE, M. P. C. Use of enzymatic hydrolysis using subtilisin for increasing the nutritional value of whey. **Nutrire**, v. 34, n. 1, p. 97-114, 2009.

AHMED, I. ZIA, M. A. IFTIKHAR, T. IQBAL, H. M. N. Characterization and detergent compatibility of purified protease produced from *Aspergillus niger* by utilizing agro wastes. **Bio Resources**, v. 6, n. 4, p. 4505-4522, 2011.

BIASUTTI, E.A.; LOPES, D.C.; SOUZA, M.W.S.; CAMPOS, R.B.D.; SEGALL, S.D.; SILVESTRE, M. P. C. Obtenção de hidrolisados do soro de leite com alto teor de oligopeptídeos utilizando-se a subtilisina. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 4, p. 225-232, 2007.

BIZZOTTO, C. S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E. A. R.; SILVA, V. D. M.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Hidrolisados proteicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 308-316, 2006.

CAPOBIANGO, M.; BIZZOTTO, C. S.; BIASUTTI, E. A. R.; SILVESTRE, M. P. C. Action of pepsin on emulsifying properties of globin. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 2, p. 357-364, 2006.

CASTRO, R. J. S.; BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H. Improving the functional properties of milk proteins: focus on the specificities of proteolytic enzymes. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p.64–69, 2015.

CASTRO, R. J. S. SATO, H. H. Protease from *Aspergillus oryzae*: biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of

protein hydrolysates with antioxidant activities. **Journal of Food Processing**, p. 1-11, 2014.

CASTRO, R. J. S. OHARA, A. NISHIDE, T. G. ALBERNAZ, J. R. M. SOARES, M. H. SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2014.

CASTRO, R. J. S. **Production, biochemical characterization of a protease from *Aspergillus oryzae* and its application to protein hydrolysis for obtaining hydrolysates with antioxidant activity.** Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 80 p., 2012.

CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin - Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1229-1240, 2006.

CORREA, A. P. F. **Obtenção de peptídeos bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90 p., 2013.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 131 p., 2007.

FREITAS, A. C. **Produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillus oryzae* CCBP001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 115 p., 2013.

FITZGERALD R. J., O'CUINN G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 234–237, 2006.



GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** Tese (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 81 p., 2006.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biureto reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

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

HASAN, S. M.; SANTOS, J. P.; ZEMPULSKI, M. L. F. GOMES, S. D.; LUCENA, S. L. Otimização da extração de proteases fúngicas obtidas por fermentação em estado sólido de resíduos de cervejaria. **ENGEVISTA**, v. 16, n. 2, p.244-254, 2014.

IAL, Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 1. ed. digital São Paulo: IMESP, 2008. Disponível em: [http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf)

KRONBAUER, E. A. W. et al. Produção de xilanase por *Aspergillus casei* com diferentes fontes de carbono, **Boletim do CEPPA**, v. 25, n. 2, p. 207-216, 2007.

KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

LADEIRA, S. A. et al. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa, **Química Nova**, v.33 n.2, p. 324-328, 2010.

LI-JUN, L.; CHUAN-HE, Z.; ZHENG, Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, p. 1-6, 2008.

LIMA, M. B. **Avaliação do efeito da adição de fontes nitrogenadas e de sais minerais na fermentação em estado sólido para produção de fitase por *Aspergillus***. Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 80 p., 2012.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. **Oxford Journals**, v. 15, n. 4, p. 173-183, 2008.

MERHEB, C. W. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e determinação do padrão de ação de protease do fungo termofílico *Thermoas cusaurantiacus***. Tese (Mestrado), UNESP, São José do Rio Preto, 98 p., 2007.

MIWA, A. C. P. **Comparação e avaliação de métodos colorimétricos utilizados para a determinação de proteínas em lagoas de estabilização**. 133 p. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 2003.

MOITA, S. R. **Peptídeos biologicamente ativos extraídos de diferentes tipos de queijos e avaliados por meio de espectrometria de massas**.

Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 43 p., 2011.

MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em resíduos têxteis.** 110 p. Tese (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MONROY, Y. M. **Avaliação de resíduos agroindustriais para a obtenção de protease por cepas fúngicas através da fermentação em estado sólido.** Tese (Mestrado), UNICAMP, Campinas, 68 p., 2013.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado.** Tese (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 77 p., 2012.

MORENO-INDIAS, I.; CASTRO, N.; MORALES-DELANUEZ, A.; SÁNCHEZ-MACÍAS, D.; ASSUNÇÃO, P.; CAPOTE, J.; ARGÜELLO, A. Farm and factory production of goat cheese whey results in distinct chemical composition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4792-4796, 2009.

MADHUMITHAH, C. G.; KRITHIGA, R.; SUNDARAM S.; SASIKUMAR, C. S.; GUHATHAKURTA, S.; CHERIAN, K. M. Utilization of Vegetable Wastes for Production of Protease by Solid State Fermentation Using *Aspergillus niger*. **World Journal of Agricultural Sciences**. 7 (5): 550-555, 2011

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.1, p.19-26, 2013.

PACHECO, M.T.B.; DIAS, N.F.G.; BALDINI, V.L.S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V.C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 333-338, 2005.

PASTORE N. S.; HASAN, S. M. ZEMPULSKI, D. A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **ENGEVISTA**, v. 13, n. 3.p. 149-159, 2011.

PEL, H. 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.

PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido**. Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 56 p., 2014.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 161 p., 2010.

RODRIGUES, M. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos de minhoca e estudo das suas propriedades funcionais**. 74 p. Dissertação (Mestrado), Curso de Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2014.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 563-575, 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS.+ . Comunicado Técnico 128. **Embrapa**, Fortaleza, 2007.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática & Seropédia, 2002.

SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori***, 81 p., Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

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

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1501-1508, 2007.

SILVA, E. T. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica**. Tese (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 68 p., 2013.

SILVA, M. R. **Obtenção de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite com alto teor de oligopeptídeos e elevada atividade inibitória sobre a enzima conservadora de angiotensina, utilizando a pancreatina e a papaína**. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 89 p., 2010.

SILVA, M.C. **Hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro do leite: remoção de fenilalanina, grau de hidrólise e perfil peptídico**. Tese. (Mestrado em Ciência de Alimentos), Belo Horizonte, Faculdade de Farmácia da UFMG, 112 p., 2009.

SILVA, R. R. **Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 58 f. 2011.

SOUZA, P. M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 125 p., 2015.

SILVA, M. C. **Hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro do leite: remoção de fenilalanina, grau de hidrólise e perfil peptídico**. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de farmácia. Belo horizonte, 2009.

SLIVINSK, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. Tese (Mestrado), Universidade estadual de Ponta Grossa, Paraná, 93 p., 2007.

SOARES, D. L.; SILVA, V. D. M; LOPES, D. C. F. L. JUNQUEIRA, R. G.; FIGUEIREDO, A. F. S SILVESTRE, M. P. C. Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. **Revista Brasileira de Ciências**, v. 40, n. 3, p. 354-362, 2004.

SUMANTHA, A., LARROCHE, C. & PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food grade proteases - a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n.2, p. 211–220, 2006.

TICHOTA, D. M.; LOPES, F. C. L.; SILVA, L. A. D. BRANDELLI, A. **Otimização da produção de proteases de *Aspergillus niger***. XI Salão de Iniciação Científica - PUCRS, 2010, disponível em: [http://www.pucrs.br/edipucrs/XISalaoIC/Ciencias\\_Biologicas/Microbiologia/82889-DEISE\\_MICHELE\\_TICHOTA.pdf](http://www.pucrs.br/edipucrs/XISalaoIC/Ciencias_Biologicas/Microbiologia/82889-DEISE_MICHELE_TICHOTA.pdf), Acesso em: 12/10/15.

TITAPIWATANAKUNC, B.; SRINOPHAKUN, P. Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p.1-5. 2012.

U. S. Environmental Protection Agency, ***Aspergillus oryzae* final risk assessment; Attachment I**, Disponível em: <[http://www.epa.gov/biotech\\_rule/pubs/fra/fra007.htm](http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra007.htm)>. Acesso em: 12/10/15.

ZÚÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 912 – 919, 2011.

## ANEXO 1

### DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BIURETO

#### PREPARO DO REAGENTE DE BIURETO

- Dissolver 1,5g de sulfato cúprico e 6,0g de tartarato de sódio e potássio em 500 mL de água destilada.
- Com agitação constante, adicione 300 mL de solução de NaOH 10%.
- Dilua até 1000 mL com água.
- O reagente pode ser guardado indefinidamente em garrafa de polietileno (não deve ser vidro, pois o vidro é atacado por álcalis), mas deve ser descartado caso apareça um precipitado preto-avermelhado.

#### CURVA PADRÃO DE CASEÍNA

- Pesar 0,5g de caseína.
- Transferir para um béquer pequeno, adicionar 20 mL de água destilada e 1,0 mL de NaOH 0,5N.
- Esquentar em chapa elétrica rapidamente para solubilizar a proteína (não exceder 3 minutos no aquecimento).
- Transferir para um balão volumétrico de 50 mL e completar com água (filtrar se for preciso para retirar os insolúveis).
- Adicionar em tubos de ensaio previamente enumerados alíquotas de: 0,0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 mL do padrão albumina.
- Adicionar, respectivamente: 1,0 - 0,8 - 0,6 - 0,4 - 0,2 - 0,0 mL de água destilada.
- Adicionar 4 mL do reagente de biureto em cada tubo. **Agitar os tubos.**
- Deixar 30 minutos em repouso e ler a absorbância a 540nm.



**Curva Padrão de caseína obtida neste estudo:**

500 mg de caseína — — — 50 mL

↓

0,2 mL (2 mg)

X ————— 0,4 mL (4 mg)

0,6 mL (6 mg)

0,8 mL (8 mg)

1,0 mL (10 mg)

Ex: 500 mg -----50 ml

X ----- 0,2 ml

X = 2 mg

Caseína (mg)	Absorbância
2	0,097
4	0,203
6	0,316
8	0,418
10	0,529

