



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PROTEASES FÚNGICAS: PRODUÇÃO UTILIZANDO FARELO DE SOJA E FARINHAS DE BANANA, CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO EM FARINHA DE GRILO

MELIANE AKEMI KOIKE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração *Bioprocessos*.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Francisco Fleuri

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marcela Pavan Bagagli

BOTUCATU - SP
2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PROTEASES FÚNGICAS: PRODUÇÃO UTILIZANDO FARELO DE SOJA E FARINHAS
DE BANANA, CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO EM FARINHA DE
GRILO**

MELIANE AKEMI KOIKE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração *Bioprocessos*.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Luciana Francisco Fleuri

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Marcela Pavan Bagagli

BOTUCATU - SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Koike, Meliane Akemi.

Proteases fúngicas : produção utilizando farelo de soja e farinhas de banana, caracterização enzimática e aplicação em farinha de grilo / Meliane Akemi Koike. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luciana Francisco Fleuri
Coorientador: Marcela Pavan Bagagli
Capes: 20800002

1. Resíduos orgânicos - Reaproveitamento. 2. Fermentação em estado sólido. 3. Enzimas proteolíticas. 4. Hidrólise. 5. Antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidante; Farinha de grilo; Fermentação em estado sólido; Hidrólise; Proteases fúngicas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Luzia, meu irmão Akio e sua esposa Milena, e aos meus sobrinhos Yuji e Eiji, os quais me proporcionaram muitas alegrias, que me ajudaram em todos os sentidos a ser uma pessoa melhor a cada dia, e a chegar até esta etapa da minha vida.

Ao meu mestre da vida Dr. Daisaku Ikeda por sempre nos incentivar a nunca desistir, ter esperança e seguir sempre em frente, sem arrependimentos.

Ao meu querido companheiro Bressan, que me apoiou, com muito amor, todo esse tempo, sempre confiante e cuidadoso em todos os momentos.

À minha talentosa orientadora Prof^ª Dr^ª Luciana Francisco Fleuri, uma pessoa que sempre vou me lembrar, por ser tão guerreira, mesmo nos momentos mais difíceis. Gratidão Lu, com muito carinho, por todo aprendizado e oportunidades!!

À minha co-orientadora Prof^ª Dr^ª Marcela Pavan Bagagli, por me proporcionar todo aprendizado e desenvolvimento profissional que tive ao longo de todo esse período. Sou muito grata, de coração, a todo esforço que fez, sempre buscando o melhor. Uma profissional extremamente competente e inteligente que abracei para ser minha mentora.

Aos meus colegas e amigos da pós-graduação da Biotecnologia, e do Laboratório de Bioprocessos, que, mesmo de longe, me “salvaram” de apuros e me fizeram companhia quando estava em Botucatu. Em especial, Mirella, Milene, Dafne, Débora, Clarissa, Andressa, Mariana, Joseana, Ana Livia, Paula, “Gaz”, Martin, Luiz (“Valentim”), Paulo e João.

Nestas viagens para Botucatu, conheci uma pessoa que, logo na primeira vez que a vi, senti algo muito bom. Nossa amizade nasceu, porque era para ser, ela me ajudou muito, ofereceu sua casa, comida, até lençol lavado!! Me levou para o hospital, para fazer compras e foi companhia até no bar! A você Geyssane, meu agradecimento, por ser essa linda amiga e companheira! Amizade eterna! Do “kokoro”!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Campus Botucatu), ao Instituto de Biociências (IBB) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Aos docentes, técnicos e terceiros que compõe esta instituição, meu muito obrigado!

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré, por me dar condições para a realização deste trabalho. Em especial às professoras Gabi e Dani que realizaram e realizam muitos esforços para o crescimento do nosso campus. E não menos importante, à minha ex-chefe Mari e ao meu diretor “Seba” que tornou minha vida mais leve me autorizando para realizar este objetivo. Ao casal Hugo e Adria por compartilhar aprendizado, software e sentimentos. Gratidão também aos companheiros da sala dos técnicos de laboratório: Gustavo, Zé, Danilo e Luis (“Cirilo”) por toda ajuda, atenção dispensada e, principalmente, pela amizade e as risadas.

Aos meus amigos e amigas desta vida que me acolheram nos momentos que mais precisei, Márcia, Leila, Martinha, Midori Sato, Analía e Toledinho.

Gratidão também por conseguir, de forma inédita para mim, defender o Mestrado por vídeo-conferência, em função do isolamento por conta da pandemia do COVID-19. Me sinto vitoriosa por enfrentar mais esta etapa na minha vida.

“Sofra o que tiver que sofrer, desfrute o que existe para ser desfrutado. Considere tanto o sofrimento quanto a alegria como fatos da vida e continue recitando Nam-myoho-renge-kyo, independentemente do que aconteça”
(CEND, v. I, p. 713)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
RESUMO GRÁFICO.....	17
1. Introdução e Justificativa.....	18
2. Revisão Bibliográfica.....	20
2.1 Proteases: aspectos gerais, caracterização bioquímica e aplicação	20
2.2 Fermentação como bioprocesso para a obtenção de proteases: aspectos gerais, resíduos como substrato e planejamento de misturas.	26
3. Objetivos.....	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. Materiais e métodos.....	34
4.1 Culturas fúngicas e substratos da FES	34
4.2 Pré-inóculo	35
4.3 Estudo da Composição do Meio de Cultivo.....	35
4.4 Extração das enzimas extracelulares.....	37
4.5 Determinação da atividade enzimática de protease.....	37
4.6 Determinação da concentração de proteínas.....	38
4.7 Cinética de produção da protease.....	38
4.8 Caracterização bioquímica enzimática.....	38
4.8.1 <i>Influência do pH e temperatura na atividade enzimática.....</i>	38
4.8.2 <i>Efeito de íons metálicos e L-cisteína na atividade proteolítica.....</i>	38
4.9 Hidrólise da farinha de grilo.....	39
4.9.1 <i>Purificação parcial e concentração do EEB.....</i>	39
4.9.2 <i>Hidrólise da farinha de grilo.....</i>	39
4.9.3 <i>Fator de hidrólise da farinha de grilo.....</i>	40

4.9.4 Atividade Antioxidante	41
4.9.5 Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas das frações sólida e sobrenadantes após 3 h de hidrólise	42
4.10 Cálculos e Estatísticas	43
5. Resultados e Discussões	44
5.1 Estudo da Composição do Meio de Cultivo para Produção de Proteases	44
5.2 Cinética de produção de protease	48
5.3 Caracterização Bioquímica	50
5.4 Hidrólise da farinha de grilo, fator de hidrólise e atividade antioxidante.	56
5.4.1 Fator de hidrólise.	56
5.4.2 Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas das frações sólidas e sobrenadantes após 3 h de hidrólise da farinha de grilo.	59
6. Conclusões	62
7. Sugestões para trabalhos futuros e considerações finais.	63
8. Referências Bibliográficas	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AOXC	Extrato de compostos antioxidantes da farinha tratada do controle (sem enzima) após 3h de hidrólise
AOXA	Extrato de compostos antioxidantes da farinha hidrolisada com enzima após 3h de hidrólise
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata Dextrose Ágar
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
E1	Ensaio com farelo de soja
E2	Ensaio com farinha de casca de banana madura
E3	Ensaio com farinha de banana verde
E4	Ensaio com 50 % de farelo de soja e 50 % de farinha de casca de banana madura
E5	Ensaio com 50 % de farelo de soja e 50 % de farinha banana verde
E6	Ensaio com 50 % de farinha de casca de banana madura e 50 % de farinha de banana verde
E7	Ensaio com 1/3 de farelo de soja, 1/3 de farinha de casca de banana madura e 1/3 de farinha de banana verde
EEB	Extrato Enzimático Bruto
FBV	Farinha de Banana Verde
FCBM	Farinha de Casca de Banana Madura
FAO	Food and Agriculture Organization
FES	Fermentação em estado sólido
FL	Fermentação líquida
FS	Farelo de Soja
FTC	Fração sólida da farinha de grilo tratada do controle (sem enzima) após 3h de hidrólise

FHA	Fração sólida da farinha de grilo hidrolisada com enzima após 3h de hidrólise
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
TCA	Ácido tricloroacético
TNBS	Ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico
SA	Amostras do sobrenadante da hidrólise com enzima
SC	Amostras do sobrenadante da hidrólise do controle
SA0	Amostras com enzima do sobrenadante da hidrólise no tempo zero
SA1	Amostras com enzima do sobrenadante após 1h de hidrólise
SA2	Amostras com enzima do sobrenadante após 2h de hidrólise
SA3	Amostras com enzima do sobrenadante após 3h de hidrólise
SC0	Amostras do sobrenadante do controle (sem enzima) da hidrólise no tempo zero
SC1	Amostras do sobrenadante do controle (sem enzima) após 1h de hidrólise
SC2	Amostras do sobrenadante do controle (sem enzima) após 2h de hidrólise
SC3	Amostras do sobrenadante do controle (sem enzima) após 3h de hidrólise

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Processo de Fermentação em Estado Sólido (FES).*

Figura 2. *Fermentação em estado sólido contempla alguns objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU.*

Figura 3. *Representação das curvas de nível da superfície de resposta do delineamento experimental com 7 ensaios (E1 a E7) utilizando 3 substratos, FS (farelo de soja), FCBM (farinha de casca de banana madura) e FBV (farinha de banana verde).*

Figura 4. *Procedimento de hidrólise da farinha de grilo por proteases fúngicas, frações obtidas e análises bioquímica realizadas.*

Figuras 5a e 5b. *Atividade de protease dos 7 ensaios (E1 a E7) do planejamento de misturas para os dois fungos filamentosos, *Trichoderma koningii* (INCQS 40331) e *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).*

Figura 6. *Curva de contorno da atividade de protease do *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) presente no extrato enzimático bruto da fermentação em estado sólido de meio de cultivo composto por diferentes proporções de farelo de soja (FS), farinha banana verde (FBV) e farinha de casca de banana madura (FCBM).*

Figura 7. *Cinética de produção de protease por *Trichoderma koningii* (INCQS 40331) sob fermentação em estado sólido utilizando como substrato farinha de casca de banana madura e farelo de soja.*

Figura 8. *Cinética de produção de protease por *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) sob fermentação em estado sólido utilizando como substrato farinha de casca de banana madura e farelo de soja.*

Figura 9. *Estudo da influência do pH na atividade de proteases obtidas de *T. koningii* (INCQS 40331) e *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato farelo de soja e farinha de casca de banana madura.*

Figura 10. *Estudo da influência da temperatura na atividade de proteases obtidas de *T. koningii* (INCQS 40331) e *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato farelo de soja e farinha de casca de banana madura.*

Figura 11. *Estudo da influência de sais e L-cisteína na protease obtida de *T. koningii* (INCQS 40331) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato farelo de soja e farinha de casca de banana madura.*

Figura 12. *Estudo da influência de sais e L-cisteína na protease obtida de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o farelo de soja e farinha de casca de banana madura.*

Figura 13. *Atividade antioxidante dos sobrenadantes (expressos em μM de Trolox Equivalente) ao longo de 3 h de hidrólise da farinha de grilo pela protease de T. koningii (INCQS 40331) e A. oryzae (ATCC 1003 / INCQS 40068).*

Figura 14. *Atividade antioxidante (expressos em μM de Trolox Equivalente) das farinhas de grilo (C) e das hidrolisadas com proteases (AOXA) de T. koningii (INCQS 40331) e de A. oryzae (ATCC 1003 / INCQS 40068).*

Figuras 15a e 15b. *Perfil eletroforético das amostras sólidas: farinha de grilo (C), farinha tratada sem enzima (FTC) e das farinhas hidrolisadas (FHA) com proteases de T. koningii (INCQS 40331) e de A. oryzae (ATCC 1003 / INCQS 40068) e sobrenadantes da 3 h de hidrólise: controle sem enzima (SC) e hidrolisados (SA) dos dois micro-organismos.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Hidrolisados proteicos de diferentes fontes de proteínas utilizando proteases comerciais e microbianas.

Tabela 2. Matriz do delineamento experimental dos substratos para os dois fungos estudados.

Tabela 3. Coeficientes de regressão obtidos a partir do modelo quadrático ajustado do delineamento de misturas para atividade proteolítica de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático ajustado do delineamento de misturas para atividade proteolítica de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).

Tabela 5. Fator de hidrólise referente à ação de proteases de *T. koningii* (INCQS 40331) e *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) sobre a farinha de grilo – análise dos sobrenadantes. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$.

RESUMO

Resíduos e subprodutos agroindustriais são extensivamente estudados a fim de se reaproveitar seu potencial biológico e agregar valor. A fermentação em estado sólido (FES) é uma das formas de utilizar estes resíduos e subprodutos para obtenção de enzimas, como as proteases. Este trabalho objetivou estudar a produção de proteases fúngicas por FES utilizando farelo de soja e farinhas de banana, caracterizar bioquimicamente as proteases mais promissoras e, por fim, aplicar na hidrólise da farinha de grilo (*Gryllus assimilis*), avaliando os produtos de hidrólise. O estudo da composição do meio de cultivo foi conduzido através de um delineamento experimental, o planejamento de misturas, para definir a proporção ótima de parte sólida dos substratos de fermentação. Posteriormente, realizou-se a cinética de produção de protease por FES, a caracterização bioquímica das proteases mais promissoras quanto ao pH e temperatura ótimos de atuação, bem como a influência de íons metálicos e L-cisteína em diferentes concentrações. Por meio de relargagem (*salting-out*), fez-se a purificação parcial das enzimas, seguida de diálise e liofilização, para então serem aplicadas na hidrólise da farinha de grilo. O fator de hidrólise, a atividade antioxidante e o perfil eletroforético dos produtos de hidrólise foram avaliados. O planejamento de misturas resultou em duas proporções com altas atividades proteolíticas, 50 % de farelo de soja (FS) e 50 % de farinha de casca de banana madura (FCBM) e um terço de cada componente estudado (farelo de soja, farinha de casca de banana madura e farinha de banana verde) para os dois micro-organismos estudados: *Trichoderma koningii* (INCQS 40331) e *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068). Foi possível obter um modelo quadrático apenas para o *A. oryzae*, com $p < 0,15$. A cinética de produção enzimática em 168 h revelou que em 48 h a atividade proteolítica atingiu o seu máximo, na mistura de substratos contendo 50 % de FS e 50 % de FCBM. Por meio da caracterização bioquímica foram definidos temperatura ótima das proteases de 40°C produzidas por ambos micro-organismos e pH ótimo de 6,0 para protease de *T. koningii* e pH 7,0 para protease de *A. oryzae*. Os íons metálicos e L-cisteína não resultaram em efeito positivo na atividade proteolítica. A análise dos sobrenadantes dos hidrolisados obtidos por ação das proteases de ambos fungos revelaram potencial antioxidante, com destaque para os hidrolisados da protease de *A. oryzae*, correspondente a 101,09 μM de TE. A eletroforese em gel dos hidrolisados indicou proteínas menores

que 14,4 kDa, corroborando a ação hidrolítica das proteases do *A. oryzae* na farinha de grilo.

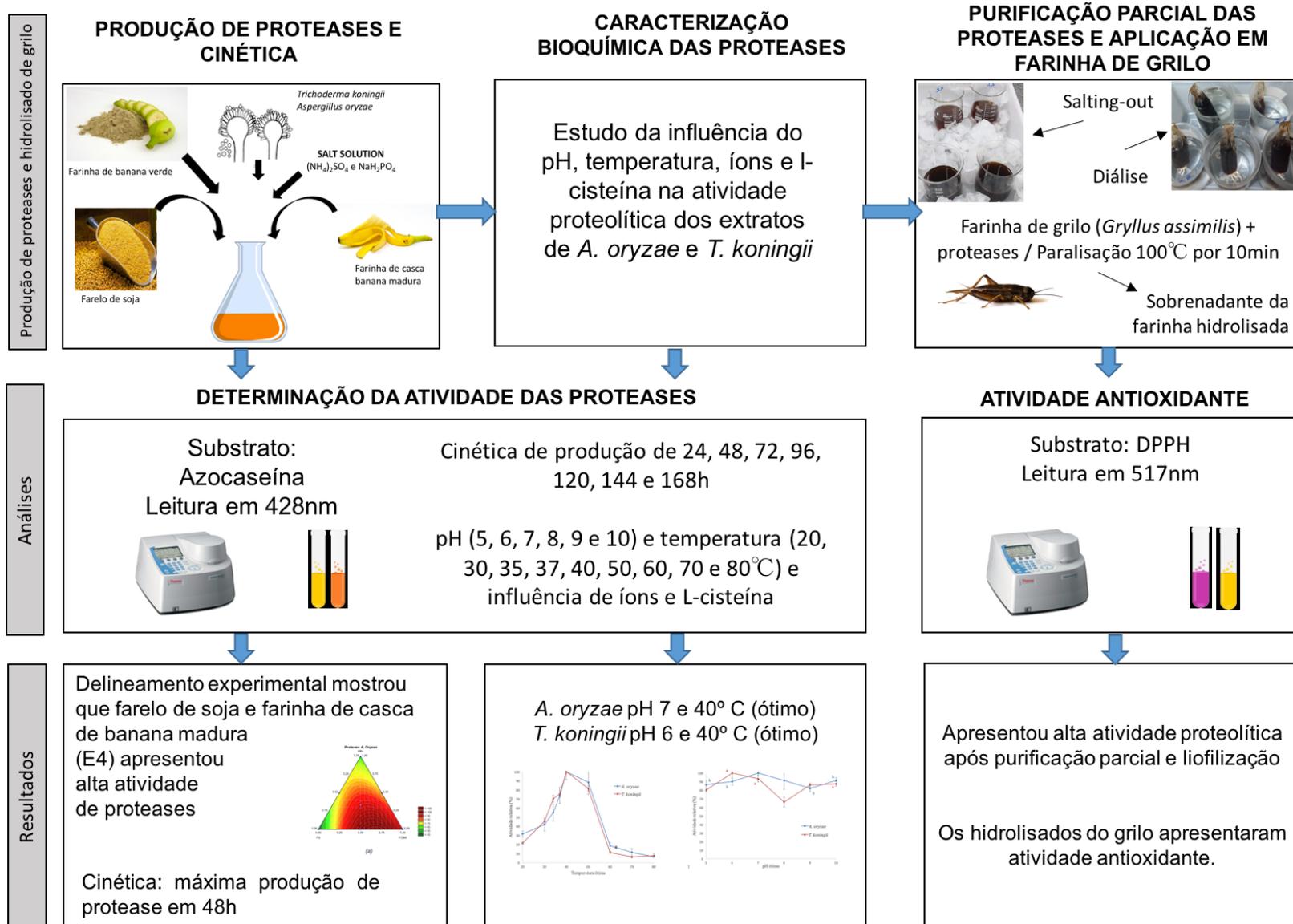
Palavras-chaves: banana, soja, proteases fúngicas, hidrólise, farinha de grilo, antioxidante

ABSTRACT

Agro-industrial waste and by-products are extensively studied aiming to add value and explore their full biological potential. Solid state fermentation (SSF) is a technique that use agro-industrial waste and by-products and may be used to obtain enzymes, such as proteases. This study aimed to produce fungal proteases by SSF using soybean bran and banana flours as substrate, characterize biochemically and apply most promising proteases to hydrolysis of cricket flour (*Gryllus assimilis*), and evaluate the hydrolysis products. The composition of the culture medium was evaluated through an experimental design to define the optimal proportion of solid part of the fermentation substrates. Subsequently, the protease production kinetics were performed by SSF, the most promising proteases were characterized biochemically according to the optimal pH and temperature, as well as according to the influence of metal ions and L-cysteine in different concentrations. Proteases were partially purified by salting-out, followed by dialysis and lyophilization and applied in hydrolysis of the cricket flour. The hydrolysis factor, the antioxidant activity and the electrophoretic profile of the hydrolysis products were evaluated. The mixture design resulted in two combinations with high proteolytic activities, 50% soybean bran (SB) and 50% ripe banana peel flour (RBPF) and one third of each component (soybean bran, ripe banana peel flour and green banana flour) for the microorganisms *Trichoderma koningii* (INCQS 40331) and *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068). It was possible to obtain a quadratic model only for *A. oryzae* ($p < 0.15$). The kinetics of proteases showed that after 48 h the proteolytic activity reached its maximum in the mixture of substrates containing 50% of SB and 50% of RBPF. Biochemical characterization showed that the optimum temperature was 40°C for both fungi proteases, as well as pH 6.0 optimum for *T. koningii* protease and pH 7.0 optimum for *A. oryzae* protease. Metal ions and L-cysteine did not result in a positive effect on proteolytic activity. The analysis of hydrolysate supernatants obtained by both fungi proteases showed antioxidant potential, with emphasis on the hydrolysates of *A. oryzae* protease, corresponding to 101.09 μM of TE. Gel electrophoresis of hydrolysates indicated proteins smaller than 14.4 kDa, corroborating the hydrolytic action of *A. oryzae* proteases in cricket flour.

Key words: banana, soy, fungal proteases, hydrolysis, cricket flour, antioxidant

RESUMO GRÁFICO



1. Introdução e Justificativa

Proteases constituem uma classe de enzima comercialmente importante, está presente em diversas indústrias como de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, couro e detergentes (SINGH *et al.*, 2016). Também são utilizadas em biotecnologia para obtenção de peptídeos antioxidantes, através da hidrólise enzimática de diferentes proteínas (ZANUTTO-ELGUI *et al.*, 2019). São produzidas principalmente por micro-organismos, embora possam também ser encontradas em plantas e animais. Respondem por mais de 60 % do mercado global de enzimas e a produção pelos micro-organismos é mais atrativa em função da especificidade do substrato e possibilidade de manipulação genética (CASTRO; SATO, 2013; KALAIYARASI *et al.*, 2017). O estudo das características bioquímicas das enzimas é importante pois definem alguns parâmetros tais como, pH e temperatura ótimos de atuação enzimática, possibilitando, conseqüentemente, melhor escolha na sua aplicação.

O processo pelo qual as proteases são produzidas pelos micro-organismos é a fermentação. Em especial, a fermentação em estado sólido (FES) tem sido estudada amplamente para esse fim, pois seu processo apresenta características interessantes, tais como: obtenção de produtos em alta concentração e estabilidade, menor repressão catabólica, baixo volume de geração de efluentes e pode ser conduzida de forma bem simples e com baixo custo. Apesar disso, ainda são necessários estudos de produção que incluem, dentre vários fatores, a maximização da produção de metabólitos (LIMA *et al.*, 2001; HÖLKER; LENZ, 2005; SINGHANIA *et al.*, 2009; SOCCOL *et al.*, 2017; CASTRO, A. *et al.*, 2018).

Os substratos utilizados como meio de cultivo para FES podem ser bem variados, sendo os resíduos agroindustriais mais interessantes economicamente, pois são constituídos de diversos componentes orgânicos e inorgânicos que ainda podem ser aproveitados (GUO; CHANG; LEE, 2018). A soja e a banana são duas culturas do agronegócio brasileiro com bastante destaque tanto pela quantidade que são produzidos quanto em relação aos resíduos e/ou subprodutos gerados por meio dessas culturas (FAOSTAT, 2017), os quais podem ser utilizados como substrato de fermentação.

Os fungos filamentosos apresentam facilidade para se desenvolver em FES e habilidade para produzir diversas enzimas extracelulares, as quais podem ser facilmente recuperadas do meio fermentado e aplicadas em diversos ramos (FLEURI *et al.*, 2013). O *Aspergillus oryzae*, por exemplo, é um fungo reconhecido como GRAS (*Generally recognized as safe*) pela *US Food and Drug Administration* (FDA) e bastante estudado, principalmente por sua longa história de utilização na indústria de alimentos por sua alta atividade proteolítica e amilolítica (CASTRO; SATO, 2013). Já o *Trichoderma koningii*, também reconhecido como GRAS, é um fungo conhecido por produzir celulases, entretanto, segundo Manonmani, Joseph (1993) ele também apresentou habilidade de produção de protease alcalina, inclusive, não há tantas pesquisas na literatura em relação à natureza das proteases deste fungo.

O aumento da produção enzimática pelos fungos, pode se dar por meio de delineamento experimental, a qual é uma ferramenta estatística com grande aplicação no estudo de efeitos sinérgicos ou antagônicos entre os componentes de um meio de cultura. O delineamento de misturas, mais especificamente, avalia as proporções entre os substratos que irão compor o meio de cultivo, bem como a interação entre os mesmos e os efeitos sobre a variável resposta, podendo ser utilizado para aperfeiçoar processos (CASTRO, 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases fúngicas obtidas a partir da FES utilizando farelo de soja e farinhas de banana, estudo da composição do meio de cultivo na produção dessas enzimas por planejamento experimental, caracterização enzimática e aplicação na hidrólise da farinha de grilo, a fim de se obter produtos com atividade antioxidante.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Proteases: aspectos gerais, caracterização bioquímica e aplicação

As proteases são enzimas que catalisam a quebra de ligações peptídicas de proteínas podendo ter como produtos, polipeptídeos, oligopeptídeos e aminoácidos (RAO *et al.*, 1998). Como toda enzima, aumenta a velocidade das reações sem serem consumidas durante o processo. A velocidade de uma reação está relacionada com a sua energia de ativação, sendo que as enzimas atuam em baixas concentrações e possuem temperatura e pH ótimos de atuação, podendo ter sua atividade regulada por ativadores e inibidores (NELSON; COX, 2014). Assim, a caracterização bioquímica de enzimas é importante, pois nos traz informações de atuação, classificação, bem como o direcionamento para os melhores bioprocessos.

Em função de sua enorme variedade são classificadas por três critérios principais: tipo de reação catalisada, estrutura proteica e natureza química do sítio catalítico. Podem também ser divididas por seu local de ação em endopeptidases (clivam ligações peptídicas no interior da molécula) e exopeptidases (clivam ligações peptídicas nos grupos terminais) (RAO *et al.*, 1998).

Hartley (1960), com base no sítio ativo (mecanismo de ação) e na sensibilidade a inibidores, classificou as endopeptidases em quatro grupos: proteases ácidas (aspárticas), tiol (cisteína) proteases, serina alcalina proteases e metaloproteases, cada grupo com diferentes pHs e temperaturas ótimas de atuação (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006; AGUILAR; SATO, 2018). As exopeptidases atuam somente em um grupo N-terminal ou C-terminal, desta forma são classificadas em aminopeptidases (liberando desde aminoácido até tripeptídeo) e carboxipeptidases (liberando de aminoácido ou dipeptídeos), respectivamente.

Proteases ainda podem ser classificadas de acordo com seu pH ótimo de atuação: ácida, neutra ou alcalina. (RAO *et al.*, 1998) Proteases alcalinas, por exemplo, são utilizadas principalmente em indústrias de detergentes (MANONMANI; JOSEPH, 1993).

Estudos têm sido conduzidos com proteases visando à caracterização enzimática. Segundo Rao *et al.* (1998) o *Aspergillus oryzae* produz proteases ácidas, neutras e alcalinas. Suas proteases ácidas têm pH ótimo entre 4,0 e 4,5; as proteases neutras são metaloproteases, apresentam pH ótimo de 7,0 e são inibidas

por agentes quelantes; enquanto que proteases alcalinas (pH ótimo entre 9,0 e 10,0) agem em proteínas alimentares.

Castro (2012) caracterizou uma protease ácida produzida por *A. oryzae*, utilizando farelo de trigo como substrato, com faixa de pH ótimo de 5,0-5,5 e faixa de temperatura ideal entre 55-60°C. O estudo da influência de íons indicou que íons metálicos [MgSO₄, CaCl₂, NaCl, (NH₄)₂SO₄] não eram necessários para a atividade enzimática, pois foi inibida pelo EDTA 5 mM. A enzima foi inibida por CuSO₄, KCl e cisteína (soluções na concentração de 5,0 mM), mantendo 13,98 %, 30,65 % e 46,80 % de sua atividade inicial, respectivamente.

Manonmani, Joseph (1993) purificaram uma protease alcalina de *T. koningii* por troca iônica, filtração em gel e cromatografia de afinidade. Estudaram suas características bioquímicas, identificando pH e temperatura ótimos de 10,5 e 50°C, respectivamente. A atividade da enzima aumentou na presença de FeSO₄, CoCl₂, CaCl₂, CuSO₄ e MgCl₂, todos na concentração de 1mM.

Triveni, Shamala (1999) selecionaram dentre 10 cepas de fungos aqueles que lisavam células bacterianas de *X. campestris* em ágar batata dextrose (BDA), a fim de clarificar goma xantana que estas produzem. O *T. koningii* foi um dos que apresentou atividade lítica celular mais potente. Os autores verificaram que este micro-organismo apresentou atividade de protease de 47 U/mL, a qual atribuíram como a maior responsável pela lise. Otimizaram a produção e caracterizaram bioquimicamente as enzimas, cujos resultados de pH e temperatura ótimos foram 7,0 e 50°C.

Uma vez estudada as características bioquímicas de enzimas como proteases, pode-se escolher a aplicação levando em consideração os melhores parâmetros de atuação enzimática.

As proteases podem ser aplicadas em alimentos, fármacos, cosméticos, couro e detergentes (KREDICS *et al.*, 2005), no entanto, a aplicação para a obtenção de peptídeos bioativos tem crescido (ZANUTTO-ELGUI *et al.*, 2019). Nesse sentido surge a oportunidade de utilizar como substrato de hidrólise das proteases, farinhas de insetos por várias razões que estão explicitadas a seguir.

Desde 2003, a FAO vem trabalhando tópicos sobre entomofagia, já prevendo um aumento da população para 2050, o que pressionaria o aumento de produção de alimentos, escassez de recursos hídricos e terras para pastagens e plantios (FAO,

2015). A criação de insetos apresenta uma vantagem em comparação com a criação de gados e aves relacionada à sustentabilidade, ou seja, apresenta menor impacto ambiental por não requerer tantos recursos de terra e água; possui baixas emissões de gases do efeito estufa e amônia; e implica em menor poluição ambiental. No entanto, é preciso que toda a infra-estrutura de produção, ações governamentais e muita pesquisa, sejam adequadas e suficientes para garantir o desenvolvimento deste novo setor na economia (VAN HUIS, 2013). Segundo Van Huis (2013) a taxa de conversão alimentar (quilograma de alimentação por quilograma do peso animal) é bastante interessante, o grilo precisa de menos alimento que o gado para produzir/adquirir um quilograma do seu peso. Considerando que 80 % do grilo e 40 % do gado é comestível, a criação de grilo passa a ser vantajosa.

Os insetos então constituem uma alternativa interessante e inovadora tanto na alimentação animal quanto humana, pois possuem alto teor de proteína e quantidades significativas de outros nutrientes importantes, tais como lipídeos, ácidos graxos benéficos, vitaminas e minerais (CASTRO, R. *et al.*, 2018).

Em relação às proteínas vegetais e de carne, as dos insetos possuem alta concentração proteica com elevada qualidade em termos de valor nutricional, nível total de proteínas e perfil de aminoácidos (RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013).

Jayanegara, Yantina, Novandri (2017) realizaram estudos que determinaram a composição química do grilo de campo jamaicano (*Gryllus assimilis*). Os dados apresentados em base seca (%) tem destaque para a quantidade de proteína bruta de 67,7 %.

Segundo Józefiak *et al.* (2016) o grilo (*Gryllus assimilis*) apresentou todos os aminoácidos essenciais, sendo que os mais importantes relacionados a atividade antioxidante são histidina (2,1 %), tirosina (4,5 %), triptofano (0,7 %), lisina (5,0 %) e metionina (1,2 %) (Castro, R. *et al.*, 2018).

Oibiokpa *et al.* (2017) avaliaram a composição centesimal e outros componentes de diversos insetos. O grilo (*Gryllus assimilis*) foi um dos insetos avaliados, obtendo a quantidade de potássio (K) e magnésio (Mg) de aproximadamente 367,13 e 8,92 mg/100g de grilo, respectivamente, sendo a maior quantidade de 20,28 % de ácido erúico [C22:1(n-9)] e, em segundo lugar, o ácido margárico (C17:0) com 18,04 %. Em relação aos antinutrientes, os autores concluíram que as doses destes são geralmente baixas se o inseto for considerado

para alimentação humana.

Em relação a segurança alimentar da entomofagia, Oibiokpa *et al.* (2018) concluíram que a alimentação à base de insetos é nutritiva e segura. Os autores avaliaram a qualidade da proteína de quatro diferentes insetos: lagarta de mariposa, cupim, grilo e gafanhoto, suplementados em rações para ratos. Foi constatado que o grilo (*Gryllus assimilis*) possui a mais alta qualidade de proteínas em relação aos outros insetos estudados e que a dieta com o grilo reduziu a concentração sérica de colesterol LDL. Assim sendo, os insetos são fontes promissoras para a produção de peptídeos bioativos utilizando proteases ou complexos multienzimáticos com atividades de protease.

A utilização de complexos multienzimáticos tem maximizado a hidrólise de diversos substratos, pois são constituídos de diferentes macromoléculas. O estudo de extratos contendo diversos tipos de enzimas, brutas ou semi-purificadas, torna-se uma alternativa interessante, pois elas podem agir no substrato de forma sequencial e coordenada, como se um “exército” fosse necessário para quebrar todos os tipos de ligações existentes no resíduo, a fim de se obter unidades menores das macromoléculas, as quais podem ser facilmente absorvidas e aproveitadas (PEDERSEN *et al.*, 2015; MANISHA; YADAV, 2017; GUO; CHANG; LEE, 2018; YANG *et al.* 2018), podendo, portanto serem aplicadas para a obtenção de peptídeos na hidrólise de insetos.

Há décadas se incentiva quanto à utilização de produtos da hidrólise proteolítica na nutrição humana e animal, com diversos efeitos benéficos à saúde (RAO *et al.*, 1998; CLEMENTE, 2000; SEGURA-CAMPOS *et al.*, 2013; HOU *et al.*, 2017), tanto pela diminuição dos compostos antinutricionais (MAHAJAN; DUA, 1998) do substrato, quanto pela ação biológica que os peptídeos podem desempenhar, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Fontes de proteases, características bioquímicas das enzimas, fonte proteica e ação biológica dos peptídeos resultantes.

Fontes de proteases	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Fonte proteica	Ação biológica dos peptídeos	Referência
<i>Aureobasidium pullulans</i>	9,0	45	<i>Yarrowia lipolytica</i> N3C <i>Hanseniaspora uvarum</i> YA03a <i>Arthospira platensis</i> (pó de espirulina) <i>Trachypenaeus curvirostris</i> (camarão) Leite Caseína	Inibição da enzima de conversão da angiotensina I (ECA) e atividade antioxidante.	Ma <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus sp.</i> P7	8,0	45	Caseinato de leite ovino	Antimicrobiana, anti-hipertensiva e antioxidante.	Corrêa <i>et al.</i> , 2011
Alcalase	8,5	50	Farinha de larva de <i>Tenebrio molitor</i> desengordurada	Inibição da enzima de conversão da angiotensina I.	Dai <i>et al.</i> , 2013
Alcalase Flavourzyme	7,0 8,0	50	Fração rica em proteína de chia	Anti-hipertensiva e antioxidante.	Segura-Campos <i>et al.</i> , 2013.
Fungos: FP400 FPII	6,5	50	Plasma de sangue de veado Plasma de sangue de ovelha Plasma de sangue de porco	Atividades antioxidantes.	Bah <i>et al.</i> , 2015
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> URM 4622	8,0	25	Colágeno bovino	Antimicrobiana e antioxidante.	Lima <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus</i> HT	6,0	45	Proteína miofibrilar e de tecido conjuntivo de carne	Inibição da enzima de conversão da angiotensina I e atividade antioxidante.	Ryder <i>et al.</i> , 2016
<i>A. oryzae</i> ATCC1003 <i>A. flavipes</i> ATCC1681	7,0	37	Leite bovino e caprino	Antimicrobiana e antioxidante.	Zanutto-Elgui <i>et al.</i> , 2019

<i>Diversas enzimas (digestão gastrointestinal in vitro e comerciais)</i>	-	-	Insetos comestíveis	Antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana.	Castro, R. <i>et al.</i> , 2018
---	---	---	---------------------	---	---------------------------------

A Tabela 1 mostra estudos de diferentes fontes de proteínas utilizando proteases comerciais e/ou obtidas em laboratório, bem como suas aplicações e atividades biológicas de seus respectivos hidrolisados. Portanto, diferentes substratos podem ser utilizados para obtenção de hidrolisados bioativos.

Desta forma, o grilo constitui importante fonte de proteínas e a sua hidrólise por proteases pode gerar produtos com atividades biológicas interessantes. O estudo deste substrato torna-se valioso, pela questão de se constituir uma alternativa inovadora de fonte proteica sustentável, o que pode ser ainda mais valorizada pela forma de obtenção das proteases.

As enzimas, como as proteases, provêm de diversas fontes, tais como, plantas, animais e micro-organismos (Rao *et al.*, 1998), sendo que desses últimos a forma de obtenção baseia-se, principalmente, pela utilização de processos fermentativos, comumente denominada de fermentação.

2.2 Fermentação como bioprocesso para a obtenção de proteases: aspectos gerais, resíduos como substrato e planejamento de misturas.

Fermentações são classificadas em cinco grupos comercialmente importantes: as que produzem células microbianas (ou biomassa) como o produto; as que produzem enzimas microbianas; as que produzem metabólitos microbianos; as que produzem produtos recombinantes; e as que modificam um composto que é adicionado na fermentação – processo de transformação (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

As fermentações podem ser realizadas de duas formas, fermentação submersa ou líquida (FL) e fermentação em estado sólido (FES). Industrialmente a mais utilizada é a primeira, no entanto, diversos estudos têm mostrado vantagens na utilização da segunda, tal como a utilização de resíduos/subprodutos como substratos de fermentação com reatores e manejo simples, baixo consumo de energia no processo, baixa geração de efluentes e altos rendimento e estabilidade do produto. Vale ressaltar a importância de se fazer uma boa escolha do micro-organismo, bem como do substrato da fermentação, a fim de que seu bioprocessos seja efetivo (LIMA *et al.*, 2001; SCHMIDELL *et al.*, 2001; HÖLKER; LENZ, 2005;

BHARGAV *et al.*, 2008; SINGHANIA *et al.*, 2009; MIENDA; IDI, 2011, SOCCOL *et al.*, 2017).

A FES é o cultivo de micro-organismos em substratos sólidos sem a presença de água circulante, mas com atividade de água significativa para o seu desenvolvimento, cujo processo pode ser utilizado para produção de enzimas (PINTO *et al.*, 2005). Os micro-organismos mais utilizados e adequados para serem cultivados por esta técnica de fermentação são os fungos filamentosos, pois esse bioprocessamento mimetiza seu habitat natural (sem água livre como na FL, ambiente com bastante umidade e pouca luz) embora bactérias também possam ser utilizadas (LIMA *et al.*, 2001; ABDULLAH *et al.*, 2018). Este processo de produção de enzimas em escala laboratorial pode ser observado na Figura 1.



Figura 1. Processo de Fermentação em Estado Sólido (FES) para obtenção de enzimas. Os micro-organismos são conservados em "slants" inclinados, inoculados de forma estéril em pré-inóculo ou diretamente em reatores contendo substrato umedecido previamente esterilizado. Em seguida os reatores são incubados em temperatura e tempo, dependendo do micro-organismo para realizar a fermentação. A etapa de extração das enzimas contempla adição de água ou outro eluente, homogeneização, filtração e centrifugação para se obter as moléculas com atividade biológica (FLEURI *et al.*, 2013, 2016 adaptado).

Entre as desvantagens da FES estão a necessidade de pré-tratamento do resíduo, muitas vezes necessita de redução de tamanho das partículas e padronização da granulometria, inferindo mais etapa de preparação, tempo de execução e, conseqüentemente, custo; limitação quanto aos micro-organismos que crescem nas condições de atividade de água e contaminação por àqueles que são hábeis em crescer nessas condições; informações e reatores de maior escala limitados; dificuldade e necessidade de equipamentos e técnicas específicos e acurados para a mensuração do pH, teor de umidade, oxigênio e biomassa (PANDEY, 2003; MIENDA; IDI, 2011).

Embora existam muitas dificuldades, a viabilidade e vantagem econômica precisam ser estudadas. É importante frisar que a questão ambiental é uma característica positiva da FES e atende alguns dos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU, 2019; Figura 2).



Figura 2. Fermentação em estado sólido atrelada aos objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU.

Alguns estudos indicam vantagens da FES para a produção de proteases.

Belmessikh *et al.* (2013) realizaram um estudo comparativo entre a aplicação dos dois tipos de fermentação na produção de protease neutra de *Aspergillus oryzae*

NRRL 2220 utilizando bagaço de tomate como substrato. A atividade proteolítica observada em FES foi nove vezes superior que a obtida em FL. Mazotto *et al.* (2013) estudaram linhagens de *Aspergillus niger* mutantes para produção de queratinases, um tipo de proteases, tendo como substrato penas de galinha, sendo observada maior atividade queratinolítica da cepa 3T5B8 por FES (172,7 U/mL, após 7 dias de fermentação em pH 5,0) sete vezes maior do que em FL.

Novelli, Barros, Fleuri (2016) realizaram um estudo comparativo para produção de proteases utilizando dois substratos (farelo de trigo e farelo de soja) e diversos fungos, tais como: *Aspergillus niger* (INCQS 40018), *A. niger* (INCQS 40065), *A. flavipes* (INCQS 40024), *A. brasiliensis* (INCQS 40036), *A. oryzae* (INCQS 40068), *Penicillium roquefortii* (INCQS 40074), entre outros. O estudo da cinética de produção de proteases revelou que cada micro-organismo apresentou tempo de produção máxima diferenciado, inclusive dependendo do substrato utilizado. *A. oryzae* e *A. flavipes* tiveram destaque na produção de protease utilizando farelo de trigo, cujas atividades alcançaram seu máximo em torno de 39 U/mL (120 h de fermentação) e 37 U/mL (144 h), respectivamente. Em relação ao farelo de soja, os destaques foram para *A. flavipes* (aproximadamente 32 U/mL em 168 h) e o fungo codificado como 13 (aproximadamente 34 U/mL por 168 h).

Soccol *et al.* (2017) reforçaram as potencialidades e vantagens da FES enfatizando a importância da escolha do micro-organismo, do substrato/suporte e do biorreator e chamaram atenção à viabilidade econômica, a qual depende de uma comparação cuidadosa dos processos de FES e FL.

Desta forma, estudos indicam a FES como promissora para a produção de proteases, e isso se deve em maior parte pela possibilidade de utilização de resíduos ou subprodutos agroindustriais como substrato desse tipo de fermentação. Assim sendo, premissas importantes de resíduos ou subprodutos agroindustriais estão descritas a seguir.

O Brasil é um dos principais produtores e exportadores mundiais de produtos agrícolas com perspectivas de crescimento. Estima-se que em 2030, devido à crescente demanda asiática, um terço dos produtos do agronegócio comercializados no mundo sejam brasileiros. Desta forma, grande quantidade de produtos, subprodutos e resíduos agroindustriais são gerados e, ao longo da cadeia produtiva, ocorrem também muitas perdas e desperdícios (FORSTER-CARNEIRO *et al.*, 2013).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, sigla do inglês *Food and Agriculture Organization*, 2011), atualmente um terço dos alimentos é perdido ou desperdiçado. Os resíduos na agroindústria têm sido objeto de pesquisas nos últimos anos como fonte direta e indireta de inúmeros compostos de importância comercial como, por exemplo, enzimas, ácidos orgânicos, pigmentos entre outros (FORSTER-CARNEIRO *et al.*, 2013; FLEURI, 2016; SOCCOL *et al.*, 2017; OKINO-DELGADO *et al.*, 2018; ZANUTTO-ELGUI *et al.*, 2019).

A utilização dos termos “resíduos” e “subprodutos” agroindustriais variam em diferentes estudos. Segundo a União Européia, por meio da diretiva 2008/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 19 de novembro de 2008, resíduo e subprodutos são definidos da seguinte forma:

“Art. 3º – Para efeitos da presente diretiva entende-se por:

- 1) Resíduo: quaisquer substâncias ou objetos de que o detentor se desfaz ou tem a intenção ou obrigação de se desfazer. “

“Art. 5º - Subprodutos

- 1) Uma substância ou objeto resultante de um processo de produção cujo principal objetivo não seja a produção desse item, só pode ser considerado um subproduto e não um resíduo na acepção do ponto 1 do artigo 3.º se estiverem reunidas as seguintes condições:
 - a) Existir a certeza de posterior utilização da substância ou objeto;
 - b) A substância ou objeto poder ser utilizado diretamente, sem qualquer outro processamento que não seja o da prática industrial normal;
 - c) A substância ou objeto ser produzido como parte integrante de um processo de produção; e
 - d) A posterior utilização ser legítima, isto é, a substância ou objeto satisfazer todos os requisitos relevantes do produto em matéria ambiental e de proteção da saúde para a utilização específica e não acarretar impactos globalmente adversos do ponto de vista ambiental ou da saúde humana. “ (UNIÃO EUROPÉIA, 2008)

A soja é um importante produto do agronegócio brasileiro ocupando em 2017 a segunda posição mundial em produção (FAOSTAT, 2017). Tem como principais produtos e subprodutos, o grão, o óleo e o farelo (EMBRAPA, 2019). O farelo, além

de diversas aplicações na agroindústria, é comumente utilizado, como substrato em processos fermentativos (MACIEL, 2006; NOVELLI *et al.*, 2017) e por possuir grande quantidade de proteínas (cerca de 43 %) (MENDES *et al.*, 2004), é também utilizado como ingrediente na alimentação animal e humana.

Além do Brasil se destacar na produção de soja, nosso país está entre os cinco maiores produtores mundiais de banana, sendo consumida principalmente *in natura*, enquanto que 3 % é processada. A produção mundial de bananas em 2017 chegou a 113,9 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2017), sendo que os maiores produtores são o continente asiático (54,18 %), americano (26,33 %) e o africano (17,57 %). A Índia é o maior produtor mundial de banana, seguida da China, Indonésia e Brasil.

Assim como o farelo de soja, o cultivo da banana também gera resíduos e subprodutos resultantes do seu processamento. Segundo alguns autores, seus resíduos constituem do pseudocaule, rizoma, folhas, caule de frutos e cascas. Alguns subprodutos da cultura da banana são: farinhas de banana verde e de casca da banana, as quais podem ser utilizadas em receitas de culinária; e folhas da bananeira, que também se tornaram subproduto à medida que substituem algumas embalagens de isopor (BEZERRA *et al.*, 2013; REBELLO *et al.*, 2014; MEBRATIE *et al.*, 2016). Tanto os resíduos como os subprodutos podem ser utilizados em fermentação para a conversão de compostos de interesse como enzimas e outros compostos bioativos (REDDY *et al.* 2003; PADAM; TIN; CHYE, 2014).

Em 2015, Pappu *et al.* estimaram a geração mundial de cerca de 288 milhões de toneladas de resíduos de bananas como casca, folhas e caules. Aproximadamente 35 % da banana é casca (VU; SCARLETT; VUONG, 2018), considerando também os outros resíduos do plantio, a proporção destes são maiores que o fruto em si. Estes resíduos são fontes, majoritariamente, de moléculas de celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e outras fibras (SOCCOL *et al.*, 2017).

Os constituintes dos resíduos e subprodutos da agroindústria fazem deles promissores para a produção de enzimas por FES, principalmente pelos macronutrientes, tais como, oligossacarídeos, celulose, amido, proteínas e lipídeos. Em algumas situações, é necessária a suplementação no substrato de alguns minerais para obter um crescimento ótimo (SOCCOL *et al.*, 2017). A composição

química dos substratos, que são adicionados ou que estão presentes naturalmente no meio de cultivo, pode atuar como nutriente e/ou indutora para a produção de enzimas microbianas (CASTRO; NISHIDE; SATO, 2014).

Em relação à composição centesimal do farelo de soja, farinha de banana verde e farinha de casca de banana madura, podemos destacar os macronutrientes (em aproximadamente): 43,1 % de proteína bruta no farelo de soja (MENDES *et al.*, 2004); 68,6 % de amido total na farinha de banana verde (LIAO; HUNG, 2015); e 60,6 % de carboidratos na farinha de casca de banana madura (FLORÊNCIO *et al.*, 2011). Vale ressaltar também que nesses resíduos/subprodutos contém micronutrientes (potássio, magnésio, sódio, entre outros) importantes para o metabolismo celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Levando em consideração que resíduos e subprodutos da soja e banana são promissores para FES e que a partir dessa fermentação pode-se obter proteases, o planejamento de misturas pode constituir uma estratégia interessante para aumentar o rendimento do produto alvo. O planejamento de misturas permite a utilização de substratos com diferentes composições para a maximização da produção de enzimas e outras biomoléculas. Essa ferramenta é uma classe especial de planejamento de superfície de resposta onde se estuda as proporções relativas dos componentes (ingredientes) da mistura e não da quantidade total (RAO; BARAL, 2011; CASTRO, 2015).

Alguns estudos descrevem a maior obtenção de enzimas utilizando essa ferramenta. Sathish *et al.* (2008) estudaram a produção de glutaminase por *Bacillus sp.* em fermentação em estado sólido utilizando planejamento de misturas com três substratos; farelo de trigo, fibra de semente de palma e casca de grão-de-bico. O estudo concluiu que a casca de grão-de-bico é o substrato mais adequado para produção de glutaminase por *Bacillus sp.* A máxima produção enzimática (3300 U/gds) se deu numa mistura na proporção de 66:34 (m:m) de casca de grão-de-bico e farelo de trigo, respectivamente.

Ohara *et al.* (2018) verificaram que a mistura ternária de farelo de soja, farelo de trigo e farelo de algodão na proporção de (1:1:1, em massa) foi a mais versátil quanto à produção de carboximetilcelulase (> 5 U/g) e α -amilase (> 8 U/g) após 24 h de fermentação, lipase (> 320 U/g) após 72 h e β -glucosidase (> 10 U/g) após 48 h, utilizando FES e o fungo *A. niger* LBA02.

Castro *et al.* (2015) reportaram atividades proteolíticas acima de 260U/g em, pelo menos, três diferentes formulações de substratos de fermentação, envolvendo a mistura de farelo de trigo, farelo de soja, farelo de algodão e casca de laranja, por *A. niger* LBA 02, por meio do planejamento de misturas. Os aumentos na produção de proteases das misturas variaram de 7,6 % a 581,7 % em relação aos substratos individuais. Neste estudo foi comprovada a versatilidade e a eficiência do planejamento de mistura como uma ferramenta para otimizar meios de cultivo para fermentação em estado sólido maximizando a produção de proteases.

Assim, por meio dessa revisão, ressaltamos a importância das proteases do ponto de vista exploratório quanto sua produção sustentável e caracterização enzimática associada à aplicação para a obtenção de peptídeos bioativos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Produção de proteases por fermentação em estado sólido a partir de subprodutos agroindustriais utilizando planejamento de misturas, caracterização enzimática e aplicação em farinha de grilo para obtenção de peptídeos bioativos.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir de proteases em subprodutos da soja e da banana por fermentação em estado sólido (FES);
- Estudar a composição de meio de cultivo (utilizando farelo de soja, farinha de banana verde e farinha de casca de banana madura), utilizando planejamento de misturas para obtenção de proteases fúngicas por FES;
- Avaliar a cinética de produção de proteases para o meio selecionado;
- Realizar a caracterização bioquímica dos extratos enzimáticos de proteases selecionados em relação ao pH e temperatura ótimos de atividade e a influência de íons metálicos e cisteína na atividade catalítica;
- Aplicar os melhores extratos enzimáticos obtidos na hidrólise da farinha de grilo (*Gryllus assimilis*) verificando o fator de hidrólise, a atividade antioxidante e o perfil eletroforético dos hidrolisados.

4. Materiais e métodos

4.1 Culturas fúngicas e substratos da FES

Os fungos filamentosos foram obtidos da Fundação Oswaldo Cruz e estão regularizados quanto ao acesso ao Patrimônio Genético sob o n. A3B348F na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN), conforme preconizado pela Lei da Biodiversidade brasileira (n. 13.123/15).

- a) *Trichoderma koningii* (INCQS 40331);
- b) *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).

As linhagens, reconhecidas como GRAS (*Generally recognized as safe*), foram cultivadas a 30°C por 120 h e mantidas em “slants” de ágar batata dextrose

(BDA) sob camada de vaselina esterilizada, mantidos a 5°C, sendo repicados a cada 6 meses de armazenamento (FIGUEIRA *et al.*, 2011).

O farelo de soja (FS), farinha de banana verde (FBV) e o farelo de trigo foram adquiridos em comércio local. A farinha de casca de banana madura (FCBM) foi produzida no Laboratório de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - Câmpus Avaré. As cascas de banana madura foram primeiramente secas em estufa com circulação de ar (Marconi, Brasil) por 96 h a 50°C. Após secagem, o material foi reduzido em moinho de facas com rotor vertical 4x4 (Matoli, Brasil). Utilizou-se de peneiras granulométricas (8, 16, 30, 50 mesh) (A Bronzinox, Brasil) apenas para padronização dos tamanhos das partículas da farinha, aproveitou-se a fração que passou pela peneira de 16 mesh e ficou retida na peneira de 30 mesh (ASTM).

4.2 Pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado, para os dois fungos estudados, em farelo de trigo umedecido (1:1, m/m) com solução de sais [NaH_2PO_4 1,7 % (m/v) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 % (m/v)]. Nove gramas da mistura foram adicionados em Erlenmeyer de 125 mL, os quais foram autoclavados a 121°C por 15 min a 1 atm. Os fungos foram inoculados pelo método de alçada e incubados em estufa a 30°C por 168 h. Posteriormente, realizou-se a extração de esporos adicionando-se 50 mL de água destilada estéril, sendo a mistura submetida à agitação em shaker a 100 rpm por 30 min. Após, filtrou-se em gaze estéril e o filtrado padronizado (10^7 esporos/mL) foi utilizado para as fermentações (CASTRO, 2015).

4.3 Estudo da Composição do Meio de Cultivo

O estudo da composição do meio de cultivo visando a maior produção de protease foi realizado por meio de um delineamento de mistura simplex-centroide. Os subprodutos utilizados para a fermentação, que constituem as variáveis independentes, foram farelo de soja (FS), farinha de casca de banana madura (FCBM) e farinha de banana verde (FBV). A Tabela 2 apresenta a matriz do delineamento de misturas, indicando as variáveis independentes codificadas e os respectivos valores reais. A variável dependente avaliada foi a atividade enzimática de protease.

Tabela 2. Matriz do delineamento experimental dos substratos para os dois fungos estudados.

Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais (g)		
	FS	FCBM	FBV	FS	FCBM	FBV
E1	1	0	0	9	0	0
E2	0	1	0	0	9	0
E3	0	0	1	0	0	9
E4	½	½	0	4,5	4,5	0
E5	½	0	½	4,5	0	4,5
E6	0	½	½	0	4,5	4,5
E7	1/3	1/3	1/3	3	3	3

FS: farelo de soja; FCBM: farinha de casca de banana madura; FBV: farinha de banana verde.

A representação da variação das atividades de protease, usando diferentes substratos, é mostrada em gráficos de contorno de mistura, conforme a Figura 3.

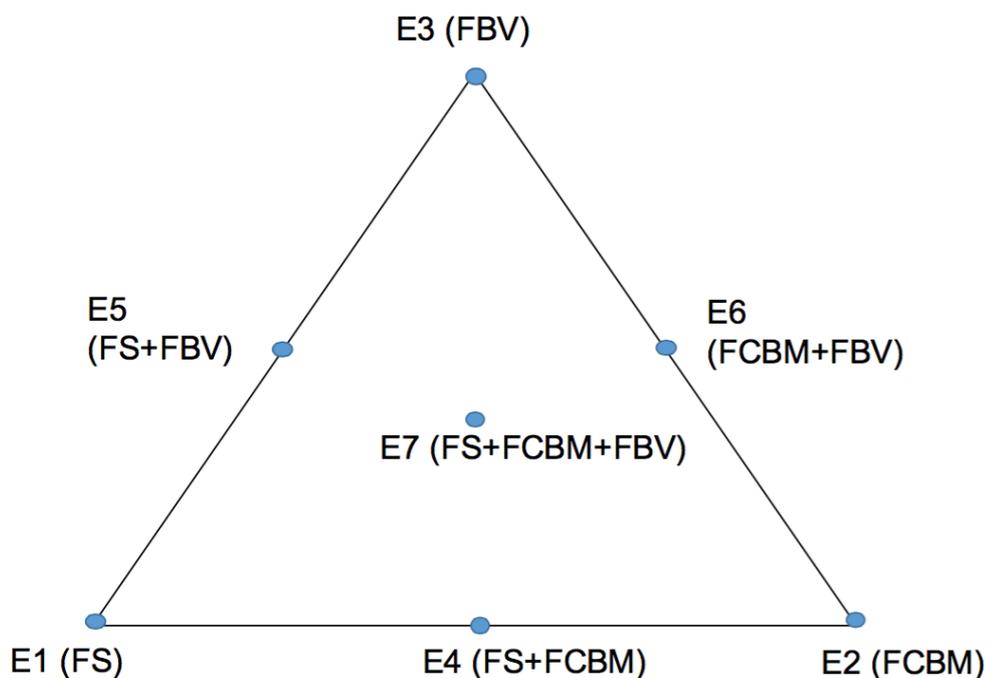


Figura 3. Representação das curvas de nível da superfície de resposta do delineamento experimental com sete ensaios (E1 a E7) utilizando três substratos, FS (farelo de soja), FCBM (farinha de casca de banana madura) e FBV (farinha de banana verde). Cada fator (componente puro) é representado nos vértices do triângulo equilátero; cada ponto dentro deste triângulo se refere a uma proporção diferente destes três fatores, sendo que a somatória das proporções será sempre 100 %. Os pontos nos lados do triângulo representam suas misturas binárias. O centro do triângulo é a mistura dos três ingredientes em iguais proporções (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo a proporção de 1:1 (m/m) de mistura de substratos e solução de sais [NaH_2PO_4 1,7 % (m/v) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 % (m/v)] e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min e 1 atm. Os frascos foram inoculados com solução de esporos dos fungos de interesse (*T. koningii* e *A. oryzae*) na concentração de 10^7 esporos/mL e incubados a 30°C por 168 h. Após o período de fermentação, foi realizada a extração das enzimas extracelulares de acordo com o item 4.4.

O modelo proposto para maximizar a produção enzimática foi validado, realizando-se três fermentações no ponto onde a produção enzimática foi maior.

4.4 Extração das enzimas extracelulares.

A extração das enzimas extracelulares foi realizada adicionando-se 50 mL de água destilada aos meios de cultivo, o qual foi homogeneizado com bastão de vidro e permaneceu sob agitação em shaker a 100 rpm por 60 min a 25°C . O extrato foi então filtrado em algodão estéril para remoção de sólidos e esporos. O filtrado foi, posteriormente, centrifugado a 4°C , 8.400 rpm por 30 min em aparelho Hettich modelo 320R (Hettich, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante foi denominado de extrato enzimático bruto (EEB), o qual foi mantido a -18°C até o momento da análise enzimática (FIGUEIRA *et al.*, 2011, adaptado).

4.5 Determinação da atividade enzimática de protease

A atividade da protease foi medida usando a azocaseína como substrato (CHARNEY; TOMARELLI, 1947 adaptado). A mistura reacional contendo 0,5 mL de azocaseína a 0,5 % (m/v) em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (0,1 M) e 0,5 mL da solução do EEB, foi incubada durante 40 min a 37°C . A reação foi paralisada adicionando 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % (m/v). Centrifugou-se os eppendorfs a 6.000 rpm por 15 min a 15°C em aparelho Hettich modelo 200R (Hettich, Tuttlingen, Alemanha). Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi neutralizada com 1,0 mL de KOH 5,0 M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância a 428 nm em 0,01 nas condições de ensaio descritas. O espectrofotômetro utilizado foi da Thermo Scientific modelo Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA). As atividades enzimáticas foram expressas em U/g de substrato fermentado.

4.6 Determinação da concentração de proteínas

O método de Bradford (BRADFORD, 1976) foi utilizado para a determinação de proteínas dos EEBs e da enzima liofilizada; enquanto o de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) para a quantificação nos extratos da hidrólise. Segundo Zaia, Zaia e Lichtig (1998), diversos fatores devem ser analisados antes da escolha de uma metodologia para determinação de proteínas totais, em especial a natureza dos constituintes da amostra e suas concentrações aproximadas. Neste sentido, dois métodos foram utilizados para determinação de proteínas ao longo do estudo.

4.7 Cinética de produção da protease

Após o planejamento de misturas, o ensaio de cada micro-organismo com as maiores atividades de protease foi escolhido para a cinética enzimática.

As fermentações foram realizadas de acordo com o item 4.3, no entanto apenas com a mistura de substratos do ensaio selecionado, retirando as amostras nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h. A extração das enzimas foi realizada de acordo com o item 4.4. e, posteriormente, determinou-se a atividade de protease, em triplicata, de todos os EEBs.

4.8 Caracterização bioquímica enzimática

A partir dos dados da cinética, um EEB de cada fungo, no tempo de fermentação com maior atividade de protease, foi escolhido para a realização do estudo de pH e temperatura ótimos e influência de íons metálicos e L-cisteína na atividade enzimática.

4.8.1 Influência do pH e temperatura na atividade enzimática

No estudo da influência do pH na atividade das proteases foram utilizados diferentes tampões na medição da atividade enzimática, a saber: acetato 0,1M pH 5,0; fosfato de sódio 0,1M pH 6,0 a 8,0; borax-ácido bórico 0,1M pH 9,0 e 10,0. No estudo da influência da temperatura na atividade das proteases fixou-se o pH ótimo de cada enzima e variou-se a faixa de temperatura (de 20 a 80°C) na medição da atividade enzimática (NOVELLI, 2015).

4.8.2 Efeito de íons metálicos e L-cisteína na atividade proteolítica

Para avaliar os efeitos de íons metálicos na atividade enzimática, diferentes íons foram utilizados, a saber: MgCl₂, BaCl₂, ZnCl₂, KCl, CuSO₄ e CaCl₂ e L-cisteína nas concentrações de 10,0 mM, 1,0 mM e 0,1mM para cada substância. As

atividades enzimáticas foram determinadas utilizando pH e temperatura ótimos previamente determinados, seguindo a metodologia descrita no item 4.5 (CASTRO, 2012 adaptado).

4.9 Hidrólise da farinha de grilo

4.9.1 Purificação parcial e concentração do EEB.

Os EEBs dos dois micro-organismos foram purificados parcialmente pelo método de relargagem (*salting-out*). Neste método, primeiramente, fez-se a precipitação de proteínas com a adição de sulfato de amônio a 80 % de saturação (NELSON; COX, 2014). Posteriormente, fez-se a centrifugação (8.400 rpm por 15 min a 5° C). Os precipitados foram ressuspensos em solução tampão no pH ótimo de cada protease, obtido no item 4.8.1. e dialisados através de membrana de diálise celulósica (47 mm, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e água destilada refrigerada. A diálise ocorreu por 24 h com trocas de água a cada 2 h. Após diálise, os extratos foram congelados e liofilizados a -90° C por 96 h em liofilizador SP Scientific modelo Virtis Benchtop6K-flexível (SP Scientific®, USA) (ZANUTTO-ELGUI, 2019) e denominados de extrato de protease semi-purificada e liofilizada. Realizou-se a determinação de atividade proteolítica da enzima liofilizada conforme item 4.5, bem como a determinação de proteínas totais como descrito por Bradford (BRADFORD, 1976).

4.9.2 Hidrólise da farinha de grilo

Amostras de grilo-preto (*Gryllus assimilis*) abatidas e congeladas foram gentilmente cedidas pela empresa Agrin Criação e Comércio de Insetos Ltda (Avaré, São Paulo). Os grilos foram liofilizados e reduzidos em multiprocessador doméstico até adquirir aspecto de farinha, com partículas o mais reduzido possível para facilitar o acesso da enzima ao substrato.

Não encontramos na literatura estudos de hidrólise de farinha de grilo bruta, desta forma, baseado em estudos de hidrólise de proteínas (LIMA, 2015; CASTRO, 2015) foi delineado o processo a seguir. Preparou-se uma suspensão de farinha de grilo (100 mg/mL) em solução tampão no pH ótimo da enzima, conforme definido no item 4.8.1 e a ele foi adicionado o extrato enzimático liofilizado (200 U/g de farinha). A hidrólise ocorreu sob agitação de 150 rpm durante 3 h, incubada na temperatura ótima da enzima, conforme determinado no item 4.8.1. Alíquotas de 10,0 mL foram retiradas nos tempos 0, 1, 2 e 3 h. As alíquotas e o volume reacional final de

sobrenadante na terceira hora de hidrólise foram centrifugados a 8.400 rpm na temperatura de 5°C por 20 min. As reações de hidrólise foram paralisadas por tratamento térmico em banho em ebulição por 10 min. Os sobrenadantes dos controles e das amostras (SC0, SC1, SC2, SC3, SA0, SA1, SA2 e SA3) foram congelados para posterior análise de antioxidantes e determinação de proteínas totais por Lowry *et al.* (1951, adaptado).

A Figura 4 mostra um resumo do procedimento de hidrólise, bem como as amostras retiradas e respectivas análises.

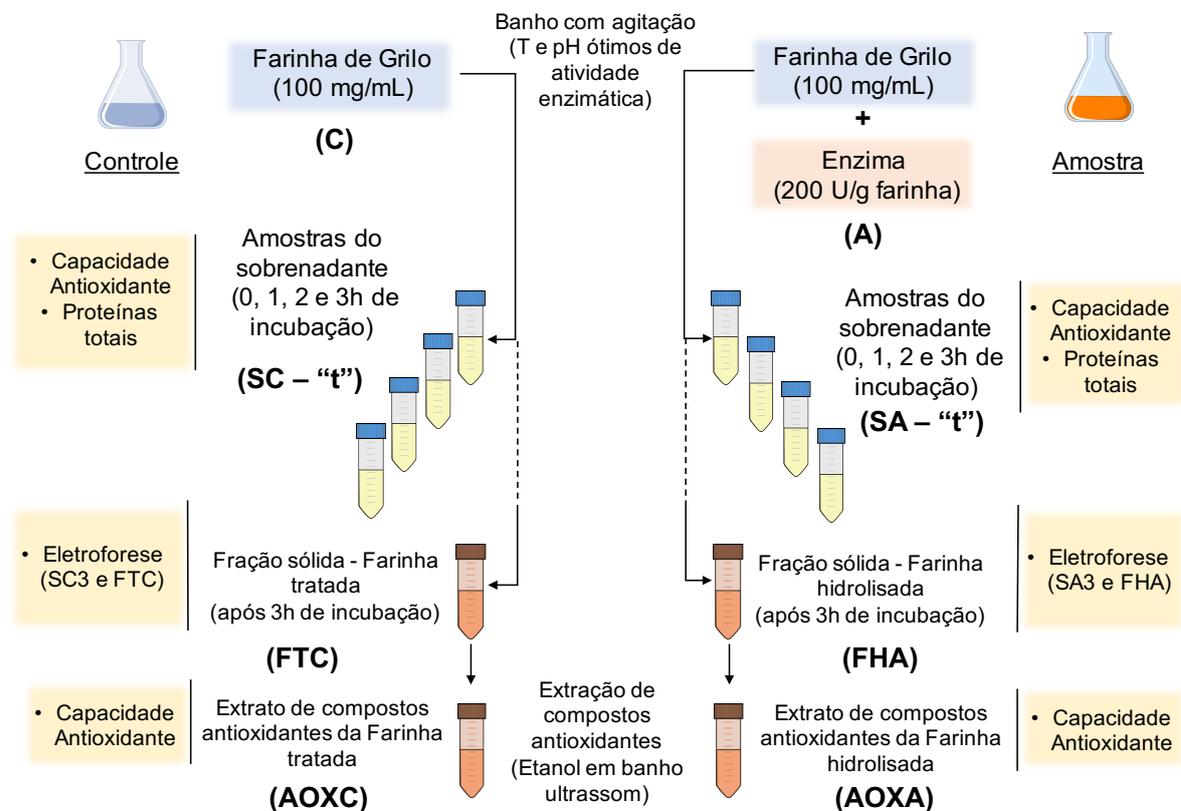


Figura 4. Procedimento de hidrólise da farinha de grilo por proteases fúngicas, frações obtidas e análises bioquímica realizadas. As amostras analisadas foram dos sobrenadantes do controle (SC0, SC1, SC2 e SC3) e das amostras com enzima (SA0, SA1, SA2 e SA3) nos tempos de 0 a 3 h; das frações sólidas da farinha tratada sem enzima (FTC) e da farinha hidrolisada (FHA) e seus respectivos extratos de compostos antioxidantes da farinha tratada sem enzima (AOXC) e da farinha hidrolisada (AOXA).

4.9.3 Fator de hidrólise da farinha de grilo

O fator de hidrólise da farinha de grilo foi determinado quantificando-se as proteínas totais por Lowry *et al.* (1951, adaptado) das amostras dos sobrenadantes retirados nos tempos 0, 1, 2 e 3 h (SA0, SA1, SA2 e SA3).

Desta proteína total das amostras foi subtraído a concentração de proteína total do controle sem enzima (SC0, SC1, SC2 e SC3) e também de proteína da própria enzima. O fator de hidrólise foi calculado conforme Equação 1.

$$FH = \text{Proteína amostra} - \text{proteína controle} - \text{proteína enzima} \quad (\text{Equação 1})$$

Os resultados foram expressos em mg de proteína/mL do volume reacional.

4.9.4 Atividade Antioxidante

Os sobrenadantes das amostras retiradas ao longo de 3 h de hidrólise foram analisados diretamente (SA0, SA1, SA2 e SA3), bem como os sobrenadantes do controle sem enzima (SC0, SC1, SC2 e SC3). Porém, as amostras sólidas, farinha tratada sem enzima e farinha hidrolisada com enzima (FTC e FHA, respectivamente) passaram previamente por processo de extração, conforme descrito a seguir.

Utilizou-se 0,5 g de farinha e acrescentou-se 10,0 mL de etanol 99,8 % para ser submetido a 16 min em ultrassom Cristófoli 42 KHz e, posterior, centrifugação a 3.600 rpm por 10 min a 25° C. O sobrenadante destas amostras sólidas foram utilizados na análise de atividade antioxidante, os quais foram denominados de extrato de compostos antioxidantes da farinha tratada e hidrolisada (AOXC e AOXA, respectivamente). As enzimas liofilizadas também foram analisadas para saber sua capacidade antioxidante.

A atividade antioxidante foi avaliada pela quantificação da redução do radical sintético 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), conforme proposto por Blois (1958) com adaptações.

Alíquotas de 500 µL das amostras (SCs, SAs, AOXc e AOXA) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3,0 mL de etanol 99,8 % e 300 µL de solução de DPPH (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) a 0,2 mg/mL etanol 99,8 %. A mistura foi homogeneizada e mantida por 1 h no escuro à temperatura ambiente, posteriormente, realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV-visível Bel Photonics UV-M51 a 517nm. O branco foi preparado com etanol 99,8 % no lugar das amostras.

Os resultados foram expressos em Trolox Equivalente (TE) (µM de TE), sendo que quanto maior o valor de TE, maior a capacidade antioxidante. Para isso,

foi realizada uma curva de calibração com soluções em concentrações de 0 a 100 μM de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico, Sigma Aldrich®, St Louis, EUA).

4.9.5 Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas das frações sólida e sobrenadantes após 3 h de hidrólise.

Para a realização da eletroforese, seguindo metodologia de Laemmli (1970, adaptado), foi utilizado gel de poliacrilamida pré-preparado de 10 % (m:v) (Mini-PROTEAN® TGX™, BioRad). As amostras analisadas com esta técnica foram as farinhas de grilo in natura, farinha tratada e farinha hidrolisada (C, FTC FHA, respectivamente) e os sobrenadantes (SC3 e SA3) resultantes do processo de hidrólise após 3 h. Para tanto, preparou-se uma solução de 0,4 % de proteína de cada amostra, tampão da amostra, o qual foi preparado misturando-se 3,4 mL de água destilada, 1,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de solução 10 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,4 mL de β -mercaptoetanol e 0,1 % de azul de bromofenol. Agitou-se levemente as amostras e estas foram aquecidas a 95°C por 4 min. Posteriormente, fez um resfriamento, e 10 μL das amostras e 5 μL dos padrões foram injetados nos poços do gel e após 5 min de repouso, foi aplicada corrente elétrica de 120V. A corrida foi conduzida até que a marcação atingisse a base da placa de gel. O tampão de corrida utilizado foi o tris-glicina-SDS pH 8,3, preparado misturando-se 15 g de Tris-base, 72 g de glicina e 5 g de SDS em 900 mL de água destilada. O volume foi completado para 1.000 mL com água destilada. Para o desenvolvimento da eletroforese o tampão foi diluído com água destilada na proporção de 1:4 (v:v).

Os padrões de massas moleculares utilizados foram: fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) (Pharmacia®, Uppsala, Suécia). Após o término da corrida, as proteínas foram coradas com Coomassie Blue (Bio-Safe Coomassie Stain, 161-0787EDU, BioRad). Foi feita a descoloração do gel utilizando solução de ácido acético (10 %), metanol (30 %) e água (60 %).

4.10 Cálculos e Estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram representados como média \pm desvio padrão (DP), com exceção das fermentações da cinética que foram feitas em duplicatas. Os dados foram tratados utilizando o software RStudio, análise de variância e médias para teste de Tukey. Quando $p < 0,05$ as diferenças foram consideradas significativas. O delineamento de misturas foi analisado pelo software Statistica 7.0 (StatSoft, USA, 2004).

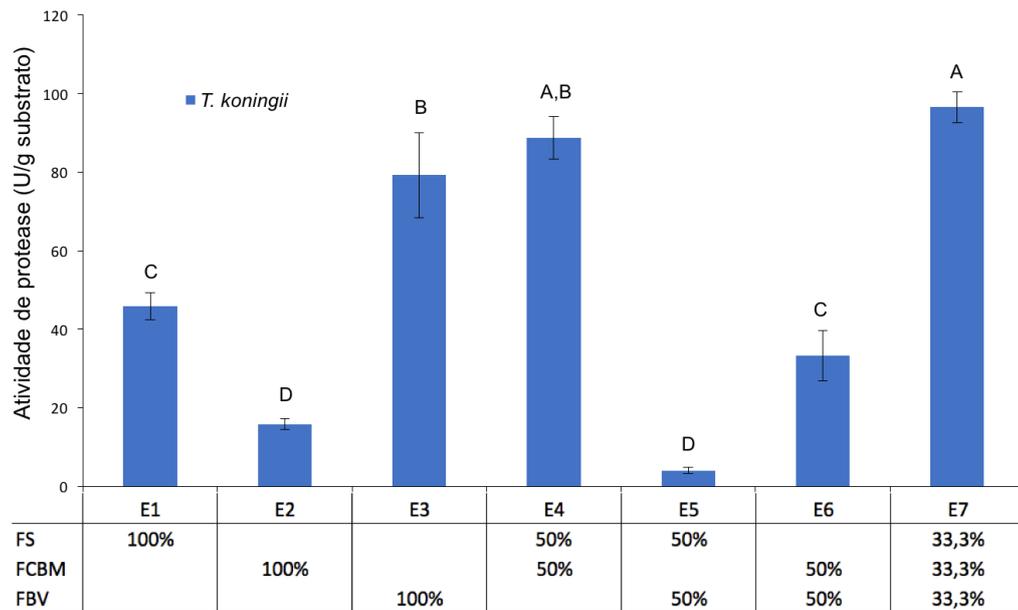
5. Resultados e Discussões

5.1 Estudo da Composição do Meio de Cultivo para Produção de Proteases

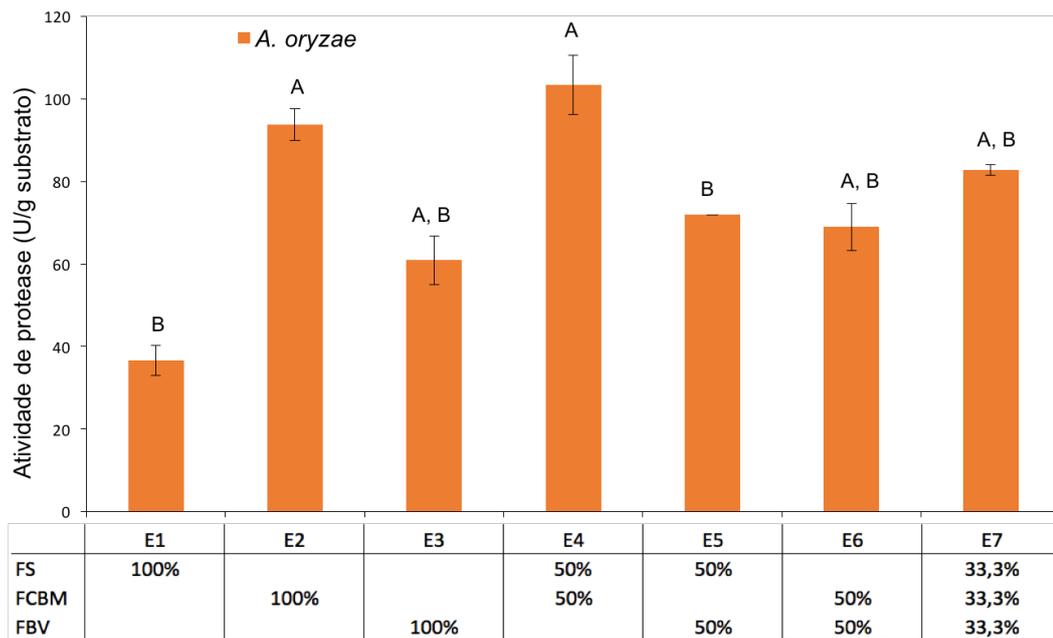
Os resultados para atividade de protease obtida nos ensaios do planejamento de misturas (E1 a E7), com 168 h de fermentação, estão apresentados nas Figuras 5a e 5b. Após o tempo de fermentação (168 h), as atividades de proteases dos EEBs (extratos enzimáticos brutos) obtidas nas condições dos ensaios E4 (FS e FCBM) e E7 (FS,FCBM e FBV) para o *T. koningii* foram de $88,74 \pm 5,42$ U/g e $96,51 \pm 3,88$ U/g e para o *A. oryzae* foram de $103,33 \pm 7,15$ U/g e $82,76 \pm 1,27$ U/g, respectivamente. Não houve diferença significativa, com 95 % de confiança, entre os ensaios citados de cada micro-organismo. No E2, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os micro-organismos, o mesmo ocorre no E5. Nestes ensaios (E2 e E5) podemos observar o quanto o meio influenciou negativamente a atividade do *T. koningii*.

Foi analisado, também, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) a variável resposta (atividade proteolítica) de todos os dados dos ensaios dos dois micro-organismos, afim de verificar se os dois fungos se comportaram da mesma forma em relação aos substratos avaliados. Como a dispersão dos dados da atividade de protease do *T. koningii* foi maior, a análise de todos os dados do planejamento dos dois micro-organismos apontou os ensaios E2, E5 e E6 do *T. koningii* como estatisticamente iguais. O que não ocorreu quando analisamos os dados do planejamento de misturas do *T. koningii* separado dos dados de *A. oryzae*.

De qualquer forma, o *A. oryzae* apresentou a maior atividade proteolítica em valor absoluto no E4 e o *T. koningii* no E7, cujos meios eram compostos por misturas. Portanto, no E4 (50 % FS e 50 % FCBM) utilizando o *T. koningii* foram observados aumentos na atividade de protease de 93,4 %, 458,7 % e 12,0 % em relação aos substratos individuais, FS, FCBM e FBV, respectivamente; enquanto que o ensaio 7 para *T. koningii*, atingiu aumentos de 110,3%, 507,7% e 21,8%, respectivamente. Para o *A. oryzae*, observou-se aumentos de atividade de protease de 181,88 %, 10,2 % e 69,5 % para o ensaio 4 e de 125,7 %, -12 % e 35,8 % para o E7, em relação aos substratos individuais, FS, FCBM e FBV, respectivamente. Isso significa que algumas misturas atingiram atividades enzimáticas superiores aos dos substratos puros, ou seja, a interação dos substratos foi positiva em relação a obtenção de maior produção de proteases.



(a)



(b)

Figuras 5a e 5b. Atividade de protease dos sete ensaios (E1 a E7) do planejamento de misturas para os fungos *Trichoderma koningii* (INCQS 40331) e *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068). Sendo que FS (farelo de soja), FCBM (farinha de casca de banana madura) e FBV (farinha de banana verde) os substratos. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$.

O modelo quadrático obtido para *T. koningii* apresentou coeficiente de determinação de 0,76 e $p > 0,15$. Desta forma, o modelo não pode ser utilizado no

estudo de composição de meio de cultivo, nas condições estudadas. Apesar de $p > 0,15$, a curva de contorno traçada para o modelo quadrático do delineamento de misturas para atividade de protease de *T. koningii* apresentou região ótima em torno do ensaio 4.

Ao contrário, a análise de variância (ANOVA) do delineamento simplex centroide para *A. oryzae* resultou em um modelo quadrático, com $p < 0,15$ e coeficiente de determinação de 0,97 (ou seja, 97 % de variação dos dados pode ser explicada por este modelo). As Tabelas 3 e 4 mostram os coeficientes de regressão deste modelo, cujos valores são os mesmos para efeitos, e análise de variância, considerando apenas os valores significativos. O termo do modelo quadrático FBV*FCBM foi desconsiderado, pois não foi significativo ($p > 0,15$).

Tabela 3. Coeficientes de regressão obtidos a partir do modelo quadrático ajustado do delineamento de misturas para atividade proteolítica de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).

Fatores	Coefficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor
FS ¹	37,2617	6,59	5,65	0,029
FCBM ²	90,6009	6,03	15,01	0,004
FBV ³	57,7557	6,03	9,57	0,010
FS * FCBM	148,1061	30,29	4,88	0,039
FS * FBV	88,0241	30,29	2,90	0,101

(¹) FS: farelo de soja; (²) FCBM: farinha de casca de banana madura; (³) FBV:

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático ajustado do delineamento de misturas para atividade proteolítica de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Teste F	p-valor
Modelo	2835,099	4	708,7749	16,15	0,059
Erro total	87,738	2	43,8688		
Ajustado	2922,837	6	487,1395		

Desta forma, a atividade de protease de *A. oryzae* pode ser descrita, de acordo com a composição do meio de cultivo, tendo como substratos FS, FCBM e FBV, pela Equação 2.

$$\text{Atividade de protease (U/g)} = 37,3 \cdot \text{FS} + 90,6 \cdot \text{FCBM} + 57,7 \cdot \text{FBV} + 148,1 \cdot \text{FS} \cdot \text{FCBM} + 88,0 \cdot \text{FS} \cdot \text{FBV}$$

(Equação 2)

A Figura 6 apresenta a curva de contorno do modelo proposto para a composição do meio de cultivo para obtenção de atividade de protease por *A. oryzae*.

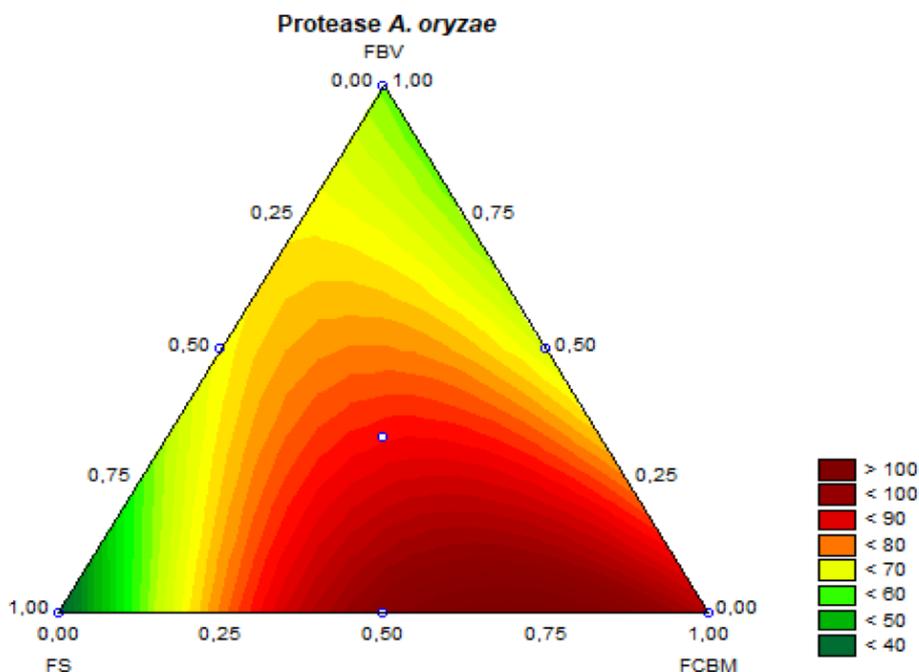


Figura 6. Curva de contorno da atividade de protease (U/g de substrato) do *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) presente no extrato enzimático bruto (EEB) da fermentação em estado sólido, de 168 h, do meio de cultivo composto por diferentes proporções de farelo de soja (FS), farinha banana verde (FBV) e farinha de casca de banana madura (FCBM).

Os resultados do delineamento de misturas para *A. oryzae* nos mostraram que o ponto ótimo, onde a produção de protease é maior, é uma mistura dos três substratos. O ensaio 4 (que contém FS e FCBM) está na região ótima do modelo proposto e não difere estatisticamente do ensaio 7 (que contém FS, FCBM e FBV), do ponto de vista operacional, pensando em aumento de escala, o ensaio 4 é facilitado e menos custoso. Vale ressaltar que a FCBM é bastante interessante do ponto de vista econômico e o FS possui ampla disponibilidade. Já a FBV é mais onerosa, pois está atrelada a mercados mais rentáveis como, por exemplo, o de alimentos funcionais. Nesse sentido, o desejo de seguir o estudo com formulações próximas para os dois micro-organismos, os melhores resultados para o *T. koningii* ocorrerem próximo ao ensaio 4, e a não obtenção de um modelo estatisticamente válido para este último fungo, optou-se em escolher o ensaio 4 para continuidade dos estudos.

5.2 Cinética de produção de protease

Conforme justificado anteriormente, o ensaio 4 (50 % FS e 50 % FCBM) foi escolhido para seguir o estudo da cinética de produção de protease. As Figuras 7 e 8 apresentam os resultados da cinética de produção de proteases dos EEBs ao longo de 168h para o *T. koningii* e *A. oryzae*.

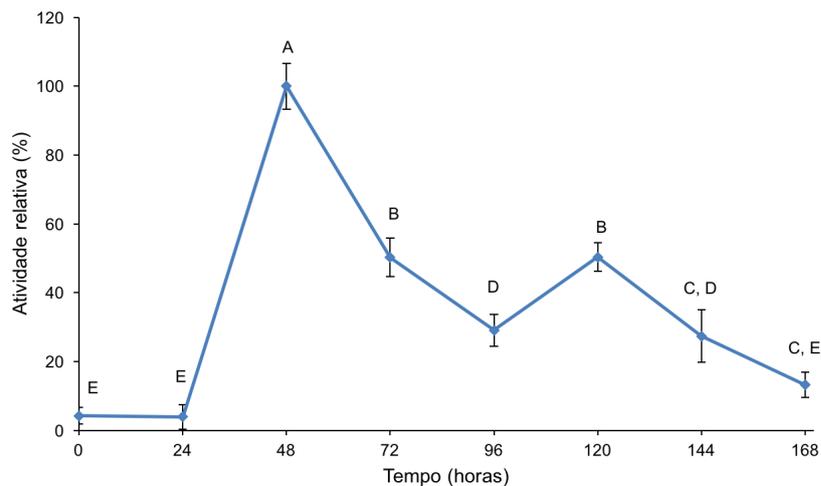


Figura 7. Cinética de produção de protease obtida por fermentação em estado sólido com *Trichoderma koningii* (INCQS 40331) nos substratos farelo de soja e farinha de casca de banana madura. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$.

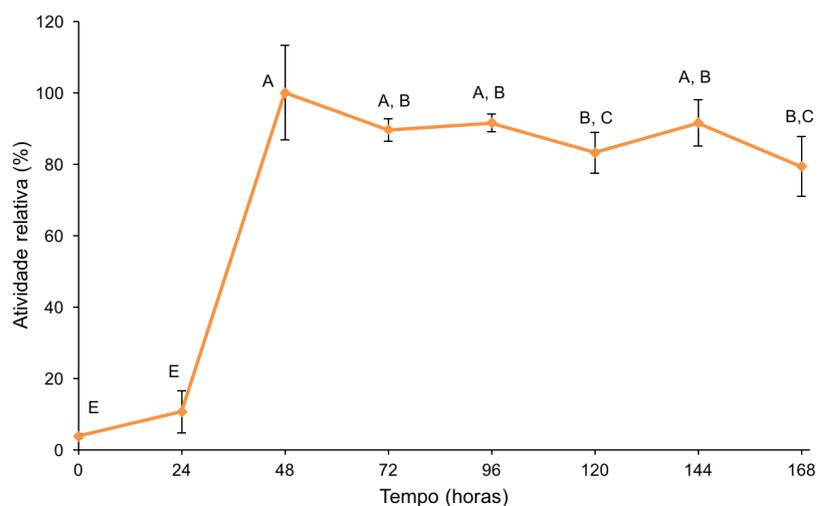


Figura 8. Cinética de produção de protease obtida por fermentação em estado sólido com *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) nos substratos farelo de soja e farinha de casca de banana madura. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$.

As cinéticas apresentadas nas Figuras 7 e 8 indicam que a máxima atividade de proteases ocorreu após 48 h de fermentação, sendo obtida atividade máxima de $64,30 \pm 6,65$ U/g para *T. koningii* e $121,66 \pm 13,20$ U/g para *A. oryzae*. Após este período a atividade proteolítica do *T. koningii* diminuiu significativamente, enquanto que para *A. oryzae* estabilizou, não havendo diferença estatisticamente significativa entre o valor de 48 h e os obtidos nos extratos de 72, 96 e 144 h de fermentação ($p < 0,05$). Desta forma, a extração das proteases pode ser realizada em 48 h de fermentação, já que foi o maior valor da atividade enzimática obtida nas condições experimentais estudadas para *A. oryzae*, e, em relação ao bioprocessamento, representa uma grande vantagem pelo menor tempo de produção enzimática. O mesmo pode ser relatado para o *T. koningii*, no entanto, após 48 h observou-se queda em sua atividade proteolítica. Uma explicação para esta queda é o fato das proteases terem ação sobre elas mesmas. Outro ponto que vale ressaltar é as fases de crescimento microbiano, onde, na fase logarítmica e estacionária ocorre maior produção das enzimas extracelulares, que pode estar acontecendo nas primeiras 48 h; seguida das fases de declínio ou morte microbiana, na qual há lise celular e liberação de compostos que podem interferir e/ou desnaturar as enzimas.

Novelli, Barros, Fleuri (2016) estudaram a produção de proteases utilizando dois substratos e diversos fungos. Verificou-se que cada micro-organismo apresentou tempo de produção máxima diferenciado, inclusive, tempos maiores que os obtidos no presente trabalho, nas condições do E4.

Nas Figuras 5a e 5b observa-se que a máxima atividade proteolítica alcançada pelo *T. koningii* após 168h de fermentação, nas condições do ensaio 4, foi de $88,74 \pm 5,42$ U/g, ou seja, maior do que o valor encontrado em 168h na cinética ($8,52 \pm 3,70$ U/g), o que deveria ser bem próximo pelas mesmas condições de fermentação (substratos e tempo). Inclusive foi também maior que o valor máximo encontrado na cinética em 48h ($64,30 \pm 6,65$ U/g). A diferença dos valores pode ser explicada pela característica do micro-organismo, que em alguns momentos do estudo não apresentou metabolismo constante.

5.3 Caracterização Bioquímica

Os EEBs, obtidos após 48h de fermentação com substratos do ensaio 4, tanto para *T. koningii* quanto para *A. oryzae*, foram caracterizados em relação à influência de pH, temperatura, de íons metálicos em diferentes concentrações e L-cisteína. A Figura 9 apresenta as atividades enzimáticas relativas observadas em diferentes valores de pH.

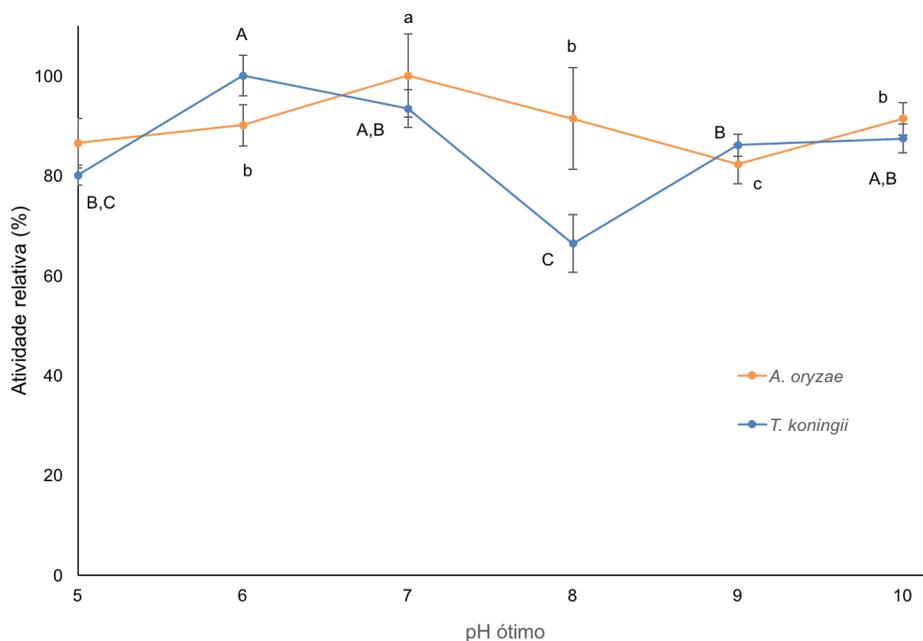


Figura 9. Estudo da influência do pH na atividade de proteases obtidas de *T. koningii* (INCQS 40331) e *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato farelo de soja e farinha de casca de banana madura. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$. Letras maiúsculas comparam médias do *T. koningii*, minúsculas do *A. oryzae*.

O EEB obtido pela fermentação do *T. koningii* resultou em maiores atividades enzimáticas nas faixas de pHs 6-7 e 9-10. Para o *A. oryzae* a maior atividade foi observada no pH 7,0, não havendo diferença significativa, com 95 % de confiança, entre as atividades relativas. Kredics *et al.* (2005) relataram que existem estudos com a linhagem do gênero *Trichoderma* que produz sistema complexo de enzimas incluindo isoenzimas. Neste sentido, podemos sugerir que há a possibilidade de existir mais de um tipo de protease no EEB do *T. koningii*, o que caracteriza a

presença de isoenzimas. Estudos posteriores de purificação dos extratos proteolíticos podem confirmar este indicativo.

A temperatura ótima para a protease de *T. koningii* e *A. oryzae* foi de 40°C (Figura 10), apresentando diferenças significativas com outras temperaturas estudadas, com 95 % de confiança. Esta temperatura é bastante interessante para bioprocessos, pois não demanda muita energia e, dependendo da aplicação, é uma temperatura que não degrada nutrientes e/ou compromete atividades biológicas de biomoléculas.

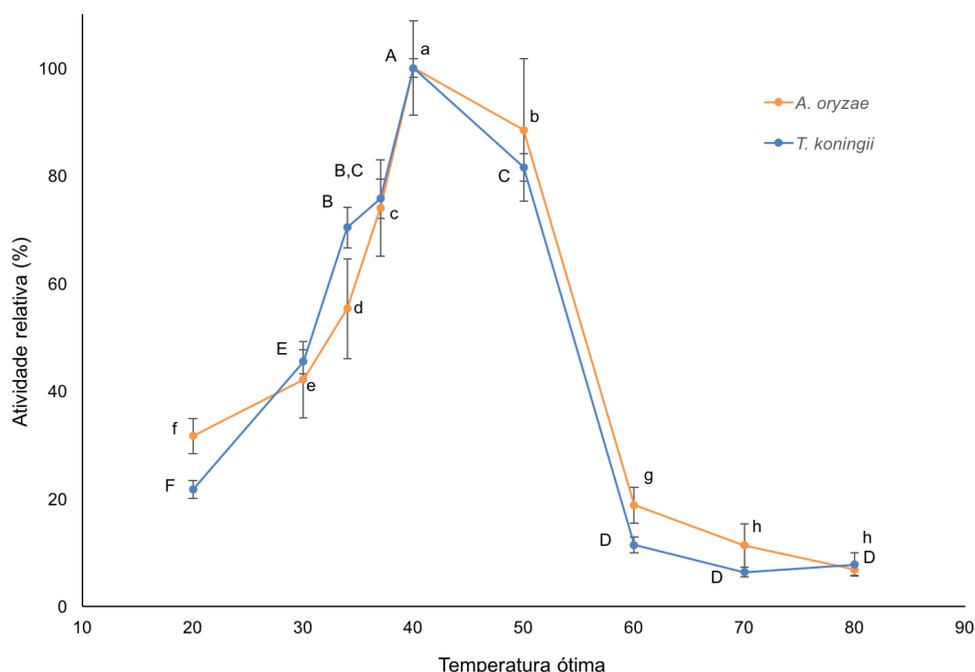


Figura 10. Estudo da influência da temperatura na atividade de proteases obtidas de *T. koningii* (INCQS 40331) e *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato farelo de soja e farinha de casca de banana madura. Letras maiúsculas comparam médias do *T. koningii*, minúsculas do *A. oryzae*.

Novelli *et al.* (2016) encontraram valor de pH ótimo (9,0) diferente para *A. oryzae* (mesma linhagem utilizada no presente estudo), porém utilizando substrato diferente na fermentação, o farelo de trigo. Isto indica que o mesmo micro-organismo foi capaz de produzir proteases com características bioquímicas diferentes dependendo do substrato utilizado na fermentação.

Gaida, Rudenskaia, Stepanov (1981) isolaram pela primeira vez protease de *T. koningii* e determinaram pH ótimo 10,5 e estabilidade na faixa de pH 4,0 a 11,0. Neste estudo concluíram que as propriedades enzimáticas e moleculares eram

semelhantes à de serina proteases. Prince (2016) encontrou os mesmos valores de pH (6,0) e temperatura (40° C) ótimos para protease purificada de *T. koningii* que ele mesmo isolou de solos de canaviais na Índia, cujo peso molecular também foi determinado (45kDa). Desta forma, a protease do presente estudo, embora tenha pH e temperatura semelhante ao estudo de Prince (2016), seria necessários mais estudos para classificá-la.

Segundo Machida *et al.* (2005) o *A. oryzae* (MTCC 5341) possui 135 genes de protease, os quais codificam proteases alcalinas, ácidas e neutras. Neste contexto, no estudo que realizaram, purificaram e caracterizaram uma protease ácida com atividade na faixa de pH de 3,0 a 4,0; estabilidade em pH de 2,5 a 6,5 e temperatura ótima de 55° C. A protease caracterizada, diferente do presente estudo, foi obtida por FES com farelo de trigo e farelo de soja desengordurada (4 %). Por meio deste trabalho, tem-se um indicativo da habilidade de produção de diferentes proteases.

Salihi, Asoodeh, Aliabadian (2017) caracterizaram bioquimicamente protease do *A. oryzae* CH93, determinaram pH e temperatura ótimos de 8,0 e 50° C, respectivamente. Ortiz *et al.* (2016) determinaram máxima atividade proteolítica de *A. oryzae* ICFC 8/12 em pH 6,0 a 6,8 e temperatura entre 43 e 53° C, sugerindo que os extratos enzimáticos obtidos por FES em farelo de trigo podem ser compostos principalmente de proteases neutras e termofílicas, similar às condições ótimas encontradas para a protease de *A. oryzae* do presente trabalho.

O estudo do efeito dos íons metálicos e da L-cisteína, em três diferentes concentrações, na atividade proteolítica dos EEBs estão ilustrados nas Figuras 11 e 12.

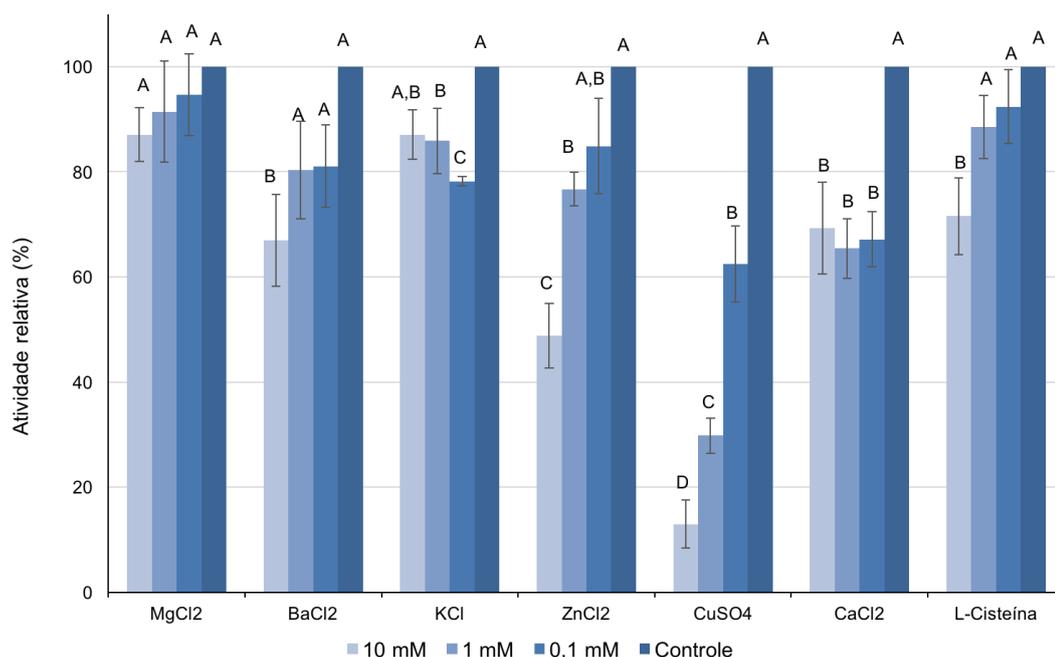


Figura 11. Estudo da influência de sais e L-cisteína na protease obtida de *T. koningii* (INCQS 40331) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato farelo de soja e farinha de casca de banana madura. Controle é a ausência de sais. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$. Teste feito entre diferentes concentrações do mesmo sal.

No estudo da influência de íons para o EEB do *T. koningii* (Figura 11), verificou-se um efeito inibitório da atividade enzimática nas três concentrações estudadas (0,1 mM, 1,0 mM e 10,0 mM) para o CuSO_4 e CaCl_2 . Para os outros sais, somente algumas concentrações tiveram efeito inibitório, a saber: BaCl_2 (10 mM), KCl (0,1 mM e 1 mM) e ZnCl_2 (1 mM e 10,0 mM). O MgCl_2 não apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) para as três concentrações na atividade de protease.

Com relação a L-cisteína, apenas a concentração de 10,0 mM apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), influenciando negativamente a atividade enzimática. Portanto, a atividade proteolítica não foi incrementada por nenhum íon estudado.

É importante dizer que algumas concentrações não alteraram significativamente a atividade enzimática, o que significa que dependendo das condições e da aplicação, a protease ainda se mantém ativa, mesmo na presença de alguns tipos e concentrações de sais. Do ponto de vista do custo do bioprocessamento, estes resultados podem ser benéficos, pois nenhum dos sais estudados é necessário para aumentar a atividade enzimática.

Manonmani, Joseph (1993) realizaram um estudo de influência de íons metálicos na protease de *T. koningii* isolado na Índia e verificaram que a maioria dos íons metálicos bivalentes (1mM) estimularam a atividade enzimática a 50°C por 1h, sendo observada atividade relativa de 166,7 % para CaCl₂, 133,3 % para CuSO₄, 108,3 % para MgCl₂. Os cátions monovalentes deste estudo inibiram a atividade enzimática, dentre todos estudados, sendo o valor de atividade relativa observado de 25,0 % para KCl. Estes resultados são divergentes ao do presente estudo em relação a influência de íons metálicos bivalentes, pois não foi observado incremento nas atividades proteolíticas.

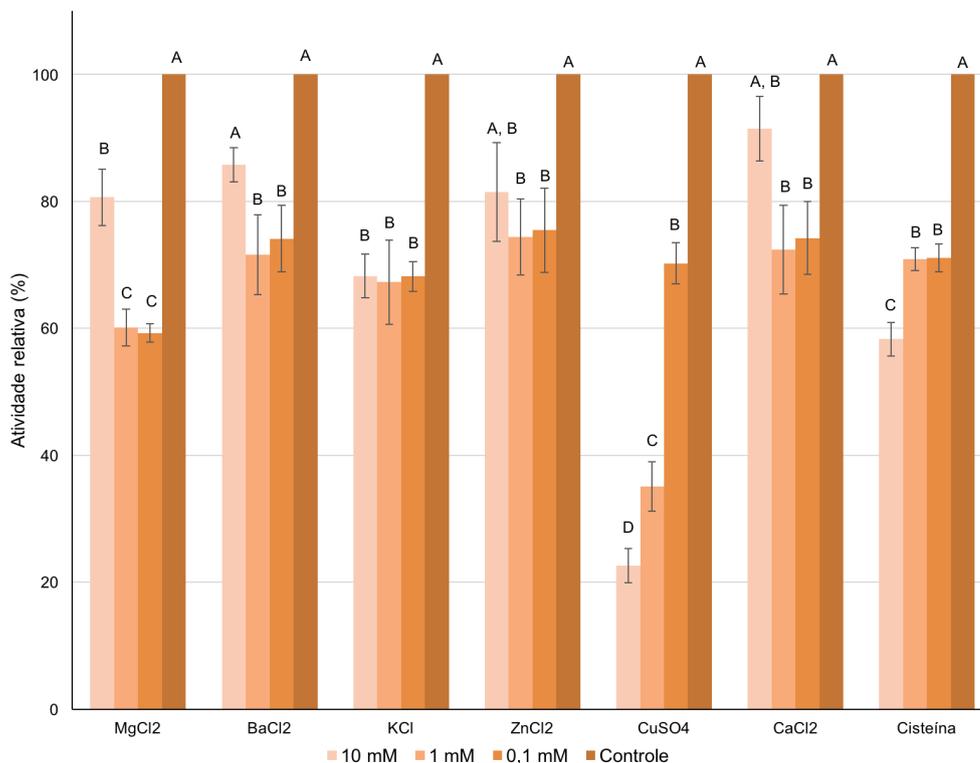


Figura 12. Estudo da influência de sais e L-cisteína na protease obtida de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o farelo de soja e farinha de casca de banana madura. Controle é a ausência de sais. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$. Teste feito entre as diferentes concentrações do mesmo sal.

Em relação ao EEB do *A. oryzae* (Figura 12), foi observado redução na atividade proteolítica para diferentes concentrações dos sais MgCl₂, BaCl₂, KCl, ZnCl₂, CuSO₄ e CaCl₂. Alguns sais não apresentaram influência na atividade proteolítica, de forma estatisticamente significativa, entre a ausência de sais (controle) e a concentração de 10,0 mM (BaCl₂, ZnCl₂ e CaCl₂); no entanto,

apresentaram diferença das atividades para as concentrações menores. A utilização de L-cisteína implicou em diferença significativa em relação à atividade enzimática em todas as concentrações, com valores inferiores. Desta forma, nenhum íon ou L-cisteína influenciou positivamente a atividade proteolítica.

Castro (2012) relatou que a protease do *A. oryzae* LBA01 apresentou atividades residuais acima de 92 % na presença dos compostos $MgSO_4$ e $CaCl_2$, nas concentrações de 0,05 mM a 5,0 mM. No mesmo estudo, a atividade de protease foi inibida com adição de 5,0 mM de $CuSO_4$, KCl e L-cisteína, com atividades residuais de 13,98 , 30,65 e 46,80 %, respectivamente.

Salihi, Asoodeh, Aliabadian (2017) verificaram que 5,0 mM de $MgCl_2$ e de $CaCl_2$ estimularam a atividade da protease com valores de atividade relativa de 120 % e 119 %, respectivamente. Por outro lado, não encontraram efeito ativador significativo para os íons Zn^{2+} e Cu^{2+} , com atividades relativas próximas de 100 %, nas concentrações de 2,0 mM e 5,0 mM. Os resultados encontrados por eles diferem dos encontrados neste estudo, o que é coerente já que o pH (8,0) e temperatura (50°C) ótimos encontrados também diferiram, sugerindo se tratar de diferentes tipos de proteases.

Segundo Rao *et al.* (1998), proteases neutras são metaloproteases, que é provavelmente o caso da protease de *A. oryzae*, cujo pH ótimo foi 7,0; no entanto necessita de mais estudos. Na presença dos íons estudados sua atividade não foi aumentada. Em se tratando de extratos não purificados, podem haver agentes quelantes que inibem a atuação dos íons.

O estudo da caracterização bioquímica das proteases dos dois micro-organismos fornece indícios de que no extrato enzimático bruto de *T. koningii* pode haver mais de um tipo de protease, enquanto, que no extrato bruto do *A. oryzae* observou-se um comportamento mais homogêneo, similar à de proteases neutras. Estudos utilizando outros ativadores e inibidores devem ser feitos para confirmar sua classificação, bem como sua purificação seguida da avaliação do perfil eletroforético.

5.4 Hidrólise da farinha de grilo, fator de hidrólise e atividade antioxidante.

5.4.1 Fator de hidrólise.

Em relação ao fator de hidrólise, não foi observado diferenças significativas entre os tempos de hidrólise para o extrato enzimático de *T. koningii*, ou seja, a quantidade de proteína não se altera nos sobrenadantes da hidrólise. Já para o extrato enzimático de *A. oryzae*, observou-se diferença significativa no tempo de reação de 3 h ($6,19 \pm 0,69$ mg proteína/mL) em relação ao início da reação ($3,42 \pm 0,34$ mg proteína/mL). Analisando estes resultados tem-se um indicativo de que não ocorreu hidrólise pelas proteases do *T. koningii*, no entanto, para *A. oryzae* na terceira hora pode ter ocorrido hidrólise, pois foi observado aumento de concentração proteica, conseqüente da quebra de proteínas (Tabela 5).

Tabela 5: Fator de hidrólise referente à ação de proteases de *T. koningii* (INCQS 40331) e *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) sobre a farinha de grilo – análise dos sobrenadantes. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$.

Tempo de hidrólise (h)	FH – <i>T. koningii</i>	FH – <i>A. oryzae</i>
0	$0,77 \pm 0,28^A$	$3,48 \pm 0,34^b$
1	$0,81 \pm 0,64^A$	$4,54 \pm 0,56^{a,b}$
2	$0,93 \pm 0,51^A$	$4,14 \pm 1,50^{a,b}$
3	$0,45 \pm 0,39^A$	$6,19 \pm 0,69^a$

É importante ressaltar alguns detalhes que podem ter interferido no processo de hidrólise. A farinha de grilo, por exemplo, não é solúvel no meio reacional. Embora teve-se o cuidado de manter até 70 % do volume reacional inicial ao final da hidrólise, com as retiradas de alíquotas, outras formas de realizar a retirada de amostras podem ser realizadas para não interferir na concentração dos constituintes da hidrólise. Uma sugestão também, seria avaliar a estabilidade da enzima na temperatura utilizada e, com isso, estudar a possibilidade de aumentar o tempo de hidrólise.

5.4.2 Atividade antioxidante

Amplamente utilizado para testar a capacidade de compostos atuarem como eliminadores de radicais livres ou doadores de hidrogênio (BAH *et al.*, 2015), a

atividade antioxidante em μM Trolox equivalente (TE) dos hidrolisados (sobrenadantes) de farinha de grilo foram estudados e estão ilustrados na Figura 13.

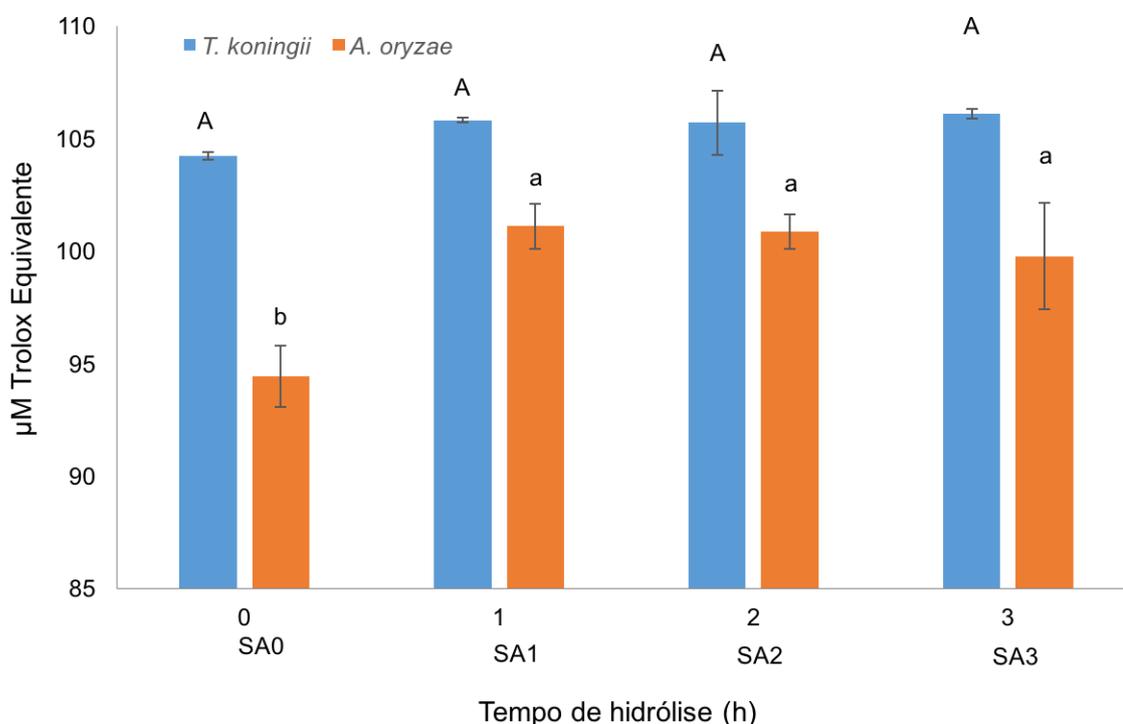


Figura 13. Atividade antioxidante dos sobrenadantes (expressos em μM de Trolox Equivalente) ao longo de 3 h de hidrólise da farinha de grilo pela protease de *T. koningii* (INCQS 40331) e *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068). SA0 a SA3, correspondem as amostras retiradas nos tempos de 0 a 3 h. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$. Letras maiúsculas comparam médias do *T. koningii*, minúsculas do *A. oryzae*.

A concentração de Trolox Equivalente (TE) para hidrolisados obtidos pela ação dos extratos de protease, semi-purificados e concentrados de *T. koningii* não apresentou diferença significativa ao longo das 3 h de reação de hidrólise ($p < 0,05$) (SA0, SA1, SA2 e SA3). Em relação aos extratos de *A. oryzae* não houve diferença significativa na concentração de TE dos hidrolisados proteolíticos obtidos em 1, 2 e 3 h (SA1, SA2 e SA3) de reação, mas em relação ao tempo inicial são estatisticamente diferentes. Os maiores valores de TE encontrados para os sobrenadantes da hidrólise por proteases de *T. koningii* ocorreram após 3 h de reação e para o *A. oryzae* após 1 h, sendo os valores obtidos de $106,09 \pm 0,19 \mu\text{M}$ de TE e $101,09 \pm 1,00 \mu\text{M}$ de TE, respectivamente.

Os valores encontrados de potenciais antioxidantes foram inferiores aos obtidos por Zanutto-Elgui (2019) no estudo de hidrolisados de leite bovino e caprino, por enzimas produzidas pela mesma linhagem do *A. oryzae*, a saber: peptídeo derivado de leite bovino por reação com protease semi-purificada por relargagem a 80 % (52,5 $\mu\text{mol}/\mu\text{LTE}$); peptídeo derivado de leite caprino por reação com protease semi-purificada por relargagem a 40 % (51,2 $\mu\text{mol}/\mu\text{L TE}$); e peptídeo derivado de leite bovino por reação com protease semi-purificada por relargagem a 40 % (43,3 $\mu\text{mol}/\mu\text{L TE}$). Nesse sentido, é importante o entendimento que a farinha de grilo é um substrato com partículas maiores em relação ao hidrolisado de leite bovino e caprino. Além disso, a quitina que é um carboidrato estrutural de insetos (Józefiak *et al.*, 2016) e que está presente, portanto, na farinha de grilo. Sendo assim, quitina e outras moléculas podem ter dificultado a ação das proteases em gerar maior quantidade de peptídeos antioxidantes. Pode ser também que o potencial antioxidante dos peptídeos gerados seja inferior comparativamente aos peptídeos obtidos por outros pesquisadores.

Os dados da Figura 14 nos mostram a atividade antioxidante pela redução do radical DPPH, representado em μM Trolox equivalente (TE), nas amostras sólidas de farinhas tratadas sem enzima (AOXC) e farinhas hidrolisadas (AOXA) por proteases do *T. koningii* e *A. oryzae*.

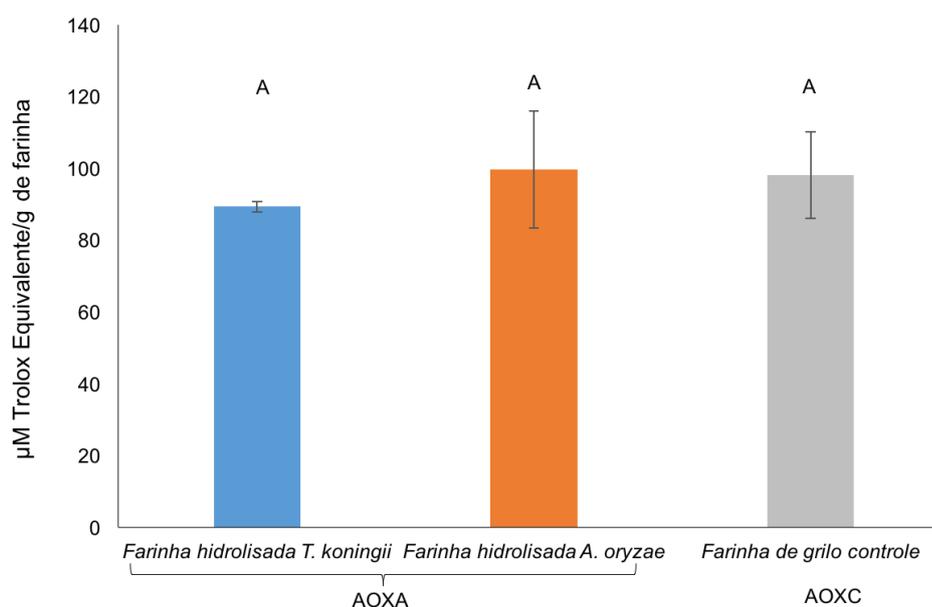
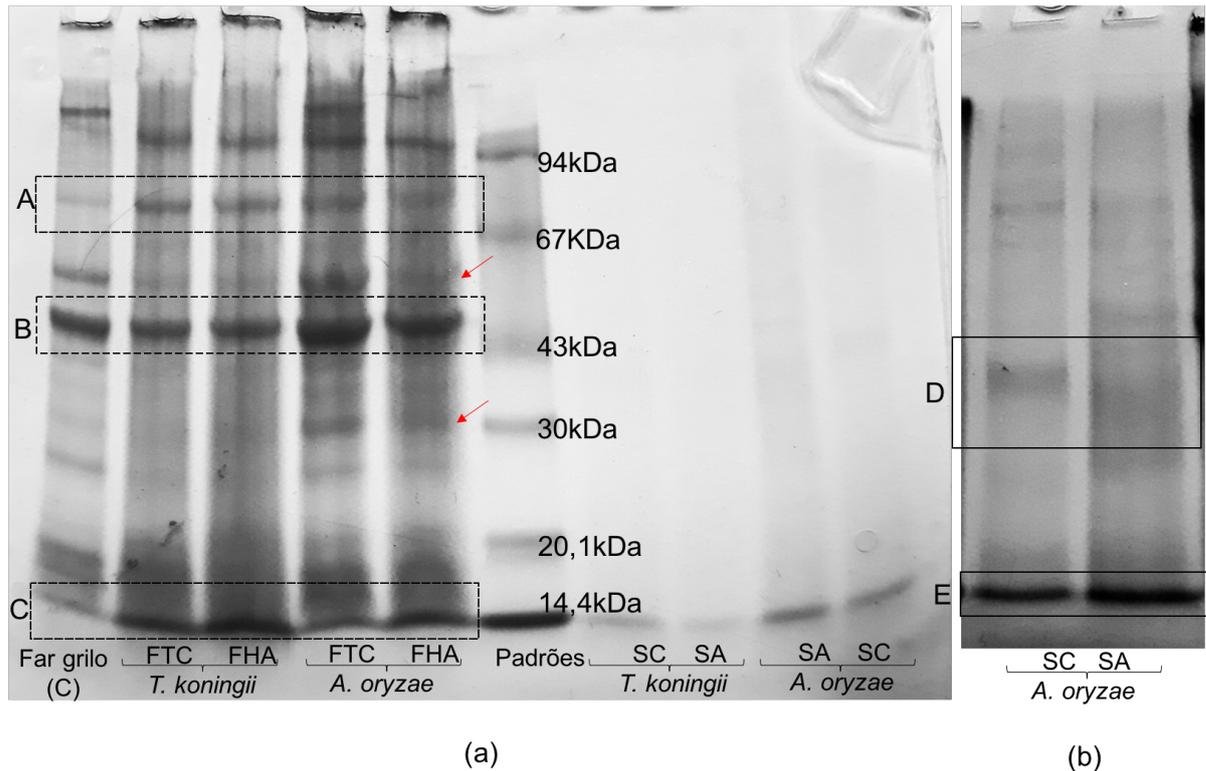


Figura 14. Atividade antioxidante (expressos em μM de Trolox Equivalente) das farinhas de grilo (C) e das hidrolisadas com proteases (AOXA) de *T. koningii* (INCQS 40331) e de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068). Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$.

Vale lembrar que alguns aminoácidos encontrados na farinha de grilo por Józefiak *et al.* (2016) estão relacionados à atividade antioxidante. Após 3 h de hidrólise, o extrato com compostos antioxidantes da farinha hidrolisada (AOXA) de *T. koningii* apresentou potencial antioxidante de $89,40 \pm 1,45 \mu\text{M}$ de TE/g de farinha; e do *A. oryzae* de $99,73 \pm 16,27 \mu\text{M}$ de TE/g de farinha. Já a farinha tratada sem enzima (AOXC) apresentou potencial antioxidante de $98,23 \pm 12,02 \mu\text{M}$ de TE/g de farinha. Estes resultados não diferem significativamente entre si, mas analisando em conjunto os resultados da Figura 15, tem-se um indicativo de que os compostos antioxidantes das amostras de farinha tratada com protease do *T. koningii* podem ter sido solubilizados nos sobrenadantes. O mesmo pode ter ocorrido para as amostras tratadas com protease do *A. oryzae*, entretanto, os dados podem corroborar com a possibilidade de ter havido hidrólise. A capacidade antioxidante foi medida também nos extratos enzimáticos liofilizados, sendo que o *A. oryzae* foi de $3,177 \mu\text{mol}$ de TE/mL volume reacional e de *T. koningii* $6,473 \mu\text{mol}$ de TE/mL volume reacional.

5.4.2 Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas das frações sólidas e sobrenadantes após 3 h de hidrólise da farinha de grilo.

As amostras utilizadas na eletroforese foram somente aquelas do final da hidrólise (após 3 h de incubação). Dentre as amostras líquidas, analisou-se os sobrenadantes sem enzima (SC3) e com enzima (SA3), as amostras sólidas de farinha (FTC e FHA) e a farinha de grilo *in natura* (C). As Figuras 15a e 15b ilustram o perfil eletroforético.



Figuras 15a e 15b. Perfil eletroforético das amostras sólidas: farinha de grilo (C), farinha tratada sem enzima (FTC) e das farinhas hidrolisadas (FHA) com proteases de *T. koningii* (INCQS 40331) e de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) e sobrenadantes da 3 h de hidrólise: controle sem enzima (SC) e hidrolisados (SA) dos dois micro-organismos.

Avaliando somente as amostras sólidas, observam-se que as amostras FTC dos dois micro-organismos sofreram uma mudança no perfil eletroforético, algumas bandas apresentaram maior intensidade em relação à farinha de grilo *in natura* (C), tais como, nas regiões A, B (de 43kDa) e C (de 14,4kDa).

Com relação às farinhas hidrolisadas (FHA) também podemos observar uma banda mais intensa na região C (base do gel) em relação tanto a amostra C quanto as amostras FTC. O perfil eletroforético da amostra FHA do *A. oryzae* apresentou mais diferenças nas bandas em relação a FTC, do que o perfil eletroforético da amostra FHA do *T. koningii* em relação à sua FTC. Destaque para a indicação pelas setas vermelhas com arraste de algumas bandas.

Se compararmos as amostras FHA dos dois micro-organismos, podemos notar diferenças na especificidade das proteases, pois apresentaram perfis eletroforéticos distintos. Este fato é confirmado no perfil das amostras dos sobrenadantes (SA), cujas bases no gel têm intensidades diferentes e que condiz com os resultados da Tabela 5, no qual o fator de hidrólise do *A. oryzae* é maior do

que no *T.koningii*. A Figura 15b foi uma outra corrida realizada com os sobrenadantes da reação com proteases do *A. oryzae* e que dá para visualizar outras bandas no sobrenadante. Na região D o arraste da banda da amostra (SA) é maior da que aparece no controle (SC) e na região E maior intensidade da banda na amostra (SA).

Estes resultados indicam mudanças nos perfis eletroforéticos da farinha de grilo *in natura*, seja pelo arraste de algumas bandas de proteínas causadas pela hidrólise ou apenas uma solubilização, ou ainda, pode ser decorrente da presença da enzima. Os dados analisados para os sobrenadantes da hidrólise com proteases do *A. oryzae* também nos dá um indicativo de que houve hidrólise, pela quantidade de proteína de menor peso molecular ter aumentado. No entanto, há necessidade de análise complementar desses perfis de eletroferese.

Não há dados na literatura sobre hidrólise da farinha de grilo *in natura*, entretanto Hall, *et al.* (2017) pré-trataram grilos inteiros (*Gryllodes sigillatus*) com temperatura (90°C por 15 min) e hidróxido de sódio (5M, para ajuste de pH 8), obtendo valores de grau de hidrólise, pelo método de TNBS, entre 26 e 52 %, utilizando diferentes concentrações de Alcalase™ (Protease de *Bacillus licheniformis*, ≥2,4 U/g). Castro (2012) encontrou valores médios de 50 % para grau de hidrólise, cuja metodologia utiliza TCA, de isolado proteico de soja por protease comercial de *A. oryzae* (*Flavourzyme*® 500L).

6. Conclusões

O estudo da composição do meio de cultivo realizado com *T. koningii* e *A. oryzae* revelou duas misturas que forneceram maiores valores de atividades proteolíticas. Um meio composto pela parte sólida de 50 % de farelo de soja e 50 % de farinha de casca de banana madura e outro composto por 1/3 de cada um dos componentes estudados (farelo de soja, farinha de casca de banana madura e farinha de banana verde). Entretanto, somente com o *A. oryzae* foi possível obter um modelo quadrático que relaciona a atividade enzimática e os componentes do meio com $p < 0,15$. Nesse sentido, o desejo de seguir o estudo com formulações próximas para os dois micro-organismos, os melhores resultados para o *T. koningii* ocorrerem próximo ao ensaio 4, e a não obtenção de um modelo estatisticamente válido para este último fungo, optou-se em escolher o ensaio 4 para continuidade dos estudos.

A cinética de produção enzimática para ambos os fungos revelou que em 48 h a atividade enzimática atingiu o máximo, sendo que as proteases do *T. koningii* decaíram aproximadamente 87 % em relação à atividade em 48 h, ao contrário do *A. oryzae*, cujo valor ficou estável até 144 h de fermentação.

A caracterização bioquímica das proteases mostrou que cada micro-organismo produziu um extrato enzimático bruto com atividade proteolítica diferentes, mesmo este sendo obtido nas mesmas condições de fermentação. O pH ótimo de atividade para o *T. koningii* foi de 6,0 e 10,0 e para *A. oryzae* 7,0, ambos com temperatura ótima de 40°C. Íons metálicos e L-cisteína influenciaram negativamente a atividade proteolítica, nas concentrações testadas.

A hidrólise da farinha de grilo pelas proteases fúngicas obtidas da fermentação em estado sólido utilizando farinha de casca de banana madura e farelo de soja resultou em possível hidrólise das proteínas da farinha de grilo, mas não o suficiente para serem evidenciadas nos experimentos realizados. A farinha de grilo em sua forma natural apresentou atividade antioxidante. O acesso do extrato enzimático bruto às proteínas da farinha de grilo pode ter sido dificultado pela presença de alto teor de lipídeos e quitina presente nesta, além do fato de que as partículas da farinha serem relativamente grandes e não serem solúveis em água.

7. Sugestões para trabalhos futuros e considerações finais.

Este trabalho pode fornecer informações importantes para novas pesquisas, a saber:

As proteases obtidas por fermentação em estado sólido, no presente estudo, podem ser aplicadas em hidrólise de outros substratos.

Baseado nos resultados da cinética de produção sugere-se realizar o planejamento de misturas em 48 h de fermentação.

A purificação das enzimas pode facilitar a caracterização dos tipos de proteases produzidas, embora a utilização no extrato bruto seja economicamente melhor.

Mutagênese e modificação genética podem ser aplicadas para maximizar a produção das proteases do *T. koningii*.

Parâmetros de processo de hidrólise de proteínas também podem ser melhorados, inclusive testando novas enzimas ou até mesmo um coquetel enzimático, considerando que a farinha se encontra em seu estado bruto.

Com a finalidade de se garantir maior segurança e qualidade a respeito da entomofagia, outras bioatividades dos hidrolisados podem ser avaliadas, tais como: citotoxicidade, potencial antimicrobiano, estudos *in vitro*, entre outros.

8. Referências Bibliográficas

- ABDULLAH, R.; NAEEM, N.; AFTAB, M.; KALEEM, A.; IQTEDAR, M.; IFTIKHAR, T.; NAZ, S. Enhanced Production of Alpha Amylase by Exploiting Novel Bacterial Co-Culture Technique Employing Solid State Fermentation. **Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science**, v.42, n.2, p. 305-312, 2018.
- AGUILAR, J. G. dos S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.
- BARROS NETO, B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 4ed. Porto Alegre: Editora Bookman®, 2010, 414 p.
- BELMESSIKH, A., BOUKHALFA, H., MECHAKRA-MAZA, A., GHERIBI-AOULMI Z., AMRANE, A. Statistical Optimization of Culture Medium for Neutral Protease Production by *Aspergillus Oryzae*. Comparative Study between Solid and Submerged Fermentations on Tomato Pomace. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.44, p. 377-385, 2013. DOI: 10.1016/j.jtice.2012.12.011
- BEZERRA, C. V.; AMANTE, E. R.; OLIVEIRA, D. C. de; RODRIGUES, A. M. C.; SILVA, L. H. M. da Green banana (*Musa cavendishii*) flour obtained in spouted bed – Effect of drying on physico-chemical, functional and morphological characteristics of the starch **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 241-249, 2013.
- BAH, C.S.F.; BEKHIT, A.E.A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M.A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**., v.176, p. 54-63, 2015.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state fermentation systems- an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1–30, 2008.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**., v. 72, p. 248-254, 1976.

- CASTRO, R.J.S. **Produção, caracterização bioquímica de proteases de *Aspergillus oryzae* e aplicação na hidrólise de proteínas para obtenção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante.** 2012. 199f. Dissertação (Mestrado na área de Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- CASTRO, R.J.S., SATO, H.H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amilase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v.49, p. 813-821, 2013.
- CASTRO, R.J.S., NISHIDE, T.G., SATO, H.H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, n.4, p. 236-245, 2014. DOI: 10.1016/j.bcab.2014.06.001i.
- CASTRO, R.J.S.; OHARA, A.; NISHIDE, T.G.; BAGAGLI, M.P.; DIAS, F.F.G.; SATO, H.H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, n.2, p. 678-684, 2015.
- CASTRO, R.J.S. **Aplicação da ferramenta de planejamento de experimental de misturas como estratégia para produção de proteases por *Aspergillus niger* e obtenção de hidrolisados proteicos com múltiplas propriedades funcionais e biológicas.** 2015. 297 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- CASTRO, R.J.S.; OHARA, A.; AGUILAR, J.G. dos S.; DOMINGUES, M.A.F. Nutritional, functional and biological properties of insects proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v.76, p. 82-89, 2018. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.006>, acessado em Fevereiro de 2020
- CASTRO, A. M.; SANTOS, A. F.; KACHRIMANIDOU, V.; KOUTINAS, A. A.; FREIRE, D. M. G. Solid-state fermentation for the production of proteases and amylases and their application in nutrient medium production. In: PANDEY, A.;

- LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R. **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Amsterdã: Elsevier, 2018. Cap. 10., p. 185-210.
- CHARNEY, J., TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 170, n. 23, p. 501-505, 1947.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p. 254-262, 2000.
- CORRÊA, A.P.F.; DAROIT, D.J.; COELHO, J.; MEIRA, S.M.M.; LOPES, F.C.; SEGALIN, J.; RISSO, P.H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.2, p. 2247-2254, 2011.
- DAI, C.; MA, H.; LUO, L.; YIN, X. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate. **European Food Research and Technology**, v.236, n.4, p. 681-689, 2013.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja em números (safra 2018/2019). Disponível em <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>, acessado em Novembro de 2019.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Global food loss and food waste. 2011 Disponível em <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/293047/>, acessado em Fevereiro de 2020.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Global food loss and food waste. 2015 Disponível em <http://www.fao.org/edible-insects/en/>, acessado em Setembro de 2019.
- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization (2017) Disponível em: www.fao.org, acessado em Dezembro de 2018.
- FIGUEIRA, J. de A.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H.; FERNANDES, P. Screening of Supports for the Immobilization of β -Glucosidase. **Enzyme Research**, v. 2011, 8 pages, 2011. DOI: 10.4061/2011/642460.
- FLEURI, L. F.; KAWAGUTI, H. Y.; PEDROSA, V. A.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P.; NOVELLI, P. K.; OKINO-DELGADO, C. H. Exploration of microorganisms producing bioactive molecules of industrial interest by solid state fermentation.

- In: Giuseppina Pace Pereira Lima; Fábio Vianello. (Org.). **Food Quality, Safety and Technology**. 1ed. Springer-Verlag Wien, 2013, p. 147-161.
- FLEURI, L. F. **Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas**. 2016. 128 f. Tese (Livre Docência em Bioquímica Geral) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2016.
- FLORENCIO, I. M.; PRATA, A. da S.; CAVALCANTI, M. T.; FLORENTINO, E. R.; PIRES, V. C. F.; ABÍLIO, G. M. F. Caracterização da casca da banana (*Musa sapientum*) madura e de sua respectiva farinha. In: Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 6, 2011, Salvador. **Trabalhos** Salvador, 2011.
- FORSTER-CARNEIRO, T.; BERNI, M. D.; DORILEO, I. L.; ROSTAGNO, M. A. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 77, p. 78–88, 2013.
- GAIDA, A. V., RUDENSKAIA, G. N., STEPANOV, V. M.: Isolation and comparative properties of serine proteinases of the microscopic fungi *Trichoderma lignorum* and *Trichoderma koningii*. **Biokhimiia**, v.46, p. 2064–2073, 1981.
- GUO, H.; CHANG, Y.; LEE, D. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. **Bioresource Technology**, v. 252, p.198-215, 2018.
- HALL, F.G.; JONES, O.G.; O'HAIRE, M.E.; LICEAGA, A.M. Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllodes sigillatus*) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.224, n.1, p. 414-422, 2017.
- HARTLEY, B.S Proteolytic enzymes. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 29, p. 45-72, 1960.
- HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.
- HOU, Y.; WU, Z.; DAI, Z.; WANG, G.; WU, G. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**., v.8, 2017. Disponível em <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-017-0153-9>. Acessado em Setembro 2019.
- JAYANEGARA, A.; YANTINA, N.; NOVANDRI, B. and Laconi E.B., 2017. Evaluation of some insects as potential feed ingredients for ruminants: Chemical

- composition, *in vitro* rumen fermentation and methane emissions. **Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture**, v.42, n.4, p. 247-254, 2017.
- JÓZEFIAK, D.; JÓZEFIAK, A.; KIERONCZYK, B.; RAWSKI, M.; SWIATKIEWICZ, S.; DLUGOSZ, J.; ENGBERG, R.M. Insects – A Natural Nutrient Source for Poultry – A Review. **Annals of Animal Science**, v.16, n.2, p. 297-313, 2016.
- JUNQUEIRA, C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**, 9ed. Editora Guanabara Koogam, 2012, 338 p.
- KALAIYARASI, M.; VIJAYARAGHAVAN, P.; RAJ, S.R.F.; VICENT, S.G.P. Statistical Approach for the Production of Protease and Cellulase from *Bacillus cereus* KA3. **Bioprocess Engineering**, v.1, n.4, p 93-103, 2017. doi: 10.11648/j.be.20170104.11
- KREDICS, L.; ANTAL, Z.; SZEKERES, A.; HATVANI, L.; MANCZINGER, L.; VÁGVÖLVGYI, C. S.; NAGY, E. Extracellular proteases of *Trichoderma* species. **Acta Microbiologia et Immunologica Hungarica**, v.52, n.2, p. 169-185, 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIAO H.J.; HUNG, C.C. Chemical composition and *in vitro* starch digestibility of green banana (cv. Giant Cavendish) flour and its derived autoclaved/debranched powder. **LWT – Food Science and Technology**, v. 64, n.2, p. 639-644, 2015.
- LIMA, C.A.; CAMPOS, J.F.; FILHO, J.L.L.; CONVERTI, A.; CUNHA, M.G.C., PORTO, A.L.F. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n.7, p. 4459-4466, 2015.
- LIMA, F.A. de **Estudo da biotransformação da farinha de centeio por tratamento enzimático e avaliação da bioacessibilidade de ácidos fenólicos pelo modelo de digestão *in vitro* e de absorção por células intestinais Caco-2**. 2015. 210 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. 1ed. São Paulo: Blocher, 2001, v. 3, 616 p.

- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N. J.; FAIR, A. L.; & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagentes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MA, C.; NI, X.; CHI, Z.; MA, L.; GAO, L. Purification and Characterization of an Alkaline Protease from Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources. **Marine Biotechnology**, v.9, p. 343-351, 2007. DOI: 10.1007/s10126-006-6105-6
- MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, v. 432, p.1157-1161, 2005.
- MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006. 146 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba, 2006.
- MAHAJAN A.; DUA S. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var toria) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 349-355, 1998.
- MANISHA, YADAV, S. K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.245, p.1727-1739, 2017.
- MANONMANI, H.K.; JOSEPH, R. Purification and properties of an extracellular proteinase of *Trichoderma koningii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p. 624-628, 1993.
- MAZOTTO, A.M.; COURI, S.; DAMASO, M.C.T.; VERMELHO, A.B. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 189-195, 2013.
- MEBRATIE, M. A.; WOLDETSADIK, K.; AYALEW, A.; HAJI, J. Influence of Packaged Transportation on Shelf Life and Quality of Banana (*Musa spp*) Fruits **Journal of Postharvest Technology**, v.4, n. 1, p. 6-15, 2016.
- MENDES, W. S.; SILVA I. J.; FONTES, D. O.; RODRIGUEZ, N. M.; MARINHO, P. C.; SILVA, F. O.; AROUCA C. L. C.; SILVA F. C. O. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos

- para suínos em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 207-213, 2004.
- MIENDA, B. S.; IDI, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications. An overview. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 21–26, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1250 p.
- NOVELLI, P. K. **Produção de Fitases e Proteases fúngicas, aplicação em rações e valores digestíveis pela Tilápia-do-Nilo**. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015.
- NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016.
- NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; ARAUJO, E. P.; BOTELHO, R. M.; FLEURI, L. F. ACEITO PARA PUBLICAÇÃO. Enzymes produced by agro-industrial co-products enhance digestible values for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A significant animal feeding alternative. **Aquaculture**, v. 481, n. 1, p. 1-7, 2017. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.08.010.
- OHARA A.; SANTOS J. G.; ANGELOTTI, J. A. F.; BARBOSA, P. P. M.; DIAS, F. F. G.; BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H.; CASTRO, R. J. S. A multicomponent system based on a blend of agroindustrial wastes for the simultaneous production of industrially applicable enzymes by solid-state fermentation. **Food Science and Technology**, v. 38, supl. 1, 2018. DOI: 10.1590/1678-457x.17017.
- OIBIOKPA, F.I.; AKANYA, H.O.; JIGAM, A.A.; SAIDU, A. N. Nutrient and Antinutrient Compositions of Some Edible Insect Species in Northern Nigeria. **Fountain Journal of Natural and Applied Sciences**, v.6, p 9-24, 2017.
- OIBIOKPA, F.I.; AKANYA, H.O.; JIGAM, A.A.; SAIDU, A. N.; EGWIM, E.C. Protein Quality of Four Indigenous Edible Insect Species in Nigeria. **Food Science and Human Wellness**, v.7, n.2, p 175-183, 2018.
- OKINO-DELGADO, C.H.; PRADO, D.Z.; FLEURI, L.F. Brazilian fruit processing, wastes as a source of lipase and other biotechnological products: a review.

- Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2927-2943, 2018.
- ONU – Organização das Nações Unidas. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em : < <https://nacoesunidas.org/pos2015/>>. Acesso em: 24 nov 2019.
- ORTIZ, G. E.; NOSEDA, D. G.; MORA, M. C. P.; RECUPERO, M. N.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E. A Comparative Study of New *Aspergillus* Strains for Proteolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation. **Enzyme Research**, v. 2016, 16 p., 2016. Doi: 10.1155/2016/3016149
- PADAM, B.S., TIN, H.S., CHYE, F.T. Banana by-products: na under-utilized renewablhe food biomass with great potential. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n.12, p. 3527-3545, 2014.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PAPPU, A., PATIL, V., JAIN, S., MAHINDRAKAR, A., HAQUE, R., THAKUR, V. K. Advances in industrial prospective of cellulosic macromolecules enriched banana biofibre resources: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 79, 449–458, 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.013
- PEDERSEN, M. B.; DALSGAARD, S.; ARENT, S.; LORENTSEN, R.; KNUDSEN, K. E. B.; YU, S.; LÆRKE, H. N. Xylanase and protease increase solubilization of non-starch polysaccharides and nutrient release of corn and wheat distillers dried grains with solubles. **Biochemical Engineering Journal**, v.98, p. 99-106, 2015.
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa - comunicado técnico online 102**, 2005.
- PRINCE, L. Investigation on production, purification and characterization of protease and Xylanase from *Trichoderma koningii*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v.10, n. 3, p. 2315, 2016. Disponível em https://link.gale.com/apps/doc/A481650364/AONE?u=unesp_br&sid=AONE&xid=124ca1c9. Acesso em Setembro de 2019.

- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE. M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RAO, P. V., BARAL, S. S. Experimental design of mixture for the anaerobic co-digestion of sewage sludge. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, p. 977-986, 2011.
- REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; CASTILLO-MUÑOZ, N.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flour of banana (*Musa AAA*) peel as a source of antioxidante phenolic compounds. **Food Research International**, v. 55, p. 397-403, 2014.
- RUMPOLD, B.A.; SCHLÜTER, O.K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, p. 802-823, 2013.
- RYDER, K.; BEKHIT, A.E.D.; MCCONNELL, M.; CARNE, A. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using comercial microbial proteases. **Food Chemistry**., v. 208, p. 42-50, 2016.
- REDDY, G.B., BABU, P.R., KOMARAIHAH, P., ROY, K.R.R.M., KOTHARI, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v.38, p.1457-1462, 2003.
- SALIHI, A.; ASOODEH, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.94, part B, p. 827-835, 2017.
- SATHISH, T.; LAKSHMI, G. S.; RAO, Ch. S.; BRAHMAIAH, P.; PRAKASHAM, R. S. Mixture design as first step for improved glutaminase production in solid-state fermentation by isolated *Bacillus sp.* RSP-GLU. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 256-262, 2008.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**. 1ed. São Paulo: Blocher, 2001, v. 2, 554 p.
- SEGURA-CAMPOS, M.R.; SALAZAR-VEJA, I.M.; CHEL-GUERRERO, L.A.; BETANCUR-ANCONA, D.A. Biological potential of chia (*Salvia hispanica L.*)

- protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. **LWT- Food Science and Technology**, v.50, n.2, p. 723-731, 2013.
- SINGH, R.; MITTAL, A.; KUMAR, A.; MEHTA, P.K. Microbial Proteases in Commercial Applications. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v.4, n.4, p. 365-374, Set-Nov, 2016.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.
- SOCCOL, C.R.; COSTA, E.S.F.; LETTI, L.Z.J; KARP, S.G. WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research & Innovation**, v.1, n.1, p. 52-71, 2017.
- STANBURY, P. F. WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 2 ed. Butterworth Heinemann, Elsevier Science, 1995, 367 p.
- 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.
- TRIVENI, R.; SHAMALA, T.R. Clarification of xanthan gum with extracellular enzymes secreted by *Trichoderma koningii*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 49-53, 1999.
- UNIÃO EUROPÉIA. Diretriz 2008/98/CE de 19 de Novembro de 2008. Relativa aos resíduos. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32008L0098>>. Acesso em Maio de 2020.
- VAN HUIS, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. **Annual Review of Entomology**, v.58, p.563-583, 2013.
- VU, H.T.; SCARLETT, C.J.; VUONG, Q.V. Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. **Journal of Functional Foods**, v.40, p-238-248, 2018.
- YANG, Y.; YANG J.; LIU, J; WANG, R.; LIU, L.; WANG, F.; YUAN, H. The composition of accessory enzymes of *Penicillium chrysogenum* P33 revealed by secretome and synergistic effects with commercial cellulase on lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 257, p. 54-61, 2018

- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, n.6, Nov-Dez, 1998.
- ZANUTTO-ELGUI, M.R. **Produção de proteases fúngicas e aplicação para obtenção de peptídeos bioativos**. 2019. 165 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia – Área de concentração Bioprocessos) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.
- ZANUTTO-ELGUI, M. R.; VIEIRA, J.C.S.; PRADO, D.Z.; BUZALAF, M.A.R.; PADILHA, P. de M.; OLIVEIRA, D.E.; FLEURI, L.F. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. **Food Chemistry**, v.278, n. 25, p. 823-831, 2019.