



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

AMANDA LUCENA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus ochraceus* URM 604
OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
FARELO DE TRIGO E RESÍDUO DE CAFÉ COMO SUBSTRATO**

RECIFE – PE
2021

AMANDA LUCENA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus ochraceus* URM 604
OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
FARELO DE TRIGO E RESÍDUO DE CAFÉ COMO SUBSTRATO**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadora: MSc. Kethylen Barbara Barbosa Cardoso

RECIFE – PE
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S237p Santos, Amanda Lucena dos
Produção de proteases por *Aspergillus ochraceus* URM 604 obtidas por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo e resíduo de café como substrato / Amanda Lucena dos Santos. - 2021.
50 f. : il.
- Orientador: Ana Lucia Figueiredo Porto.
Coorientador: Kethylen Barbara Barbosa Cardoso.
Inclui referências e anexo(s).
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2021.
1. Biotecnologia. 2. Fungos Filamentosos. 3. Resíduo Agroindustrial. I. Porto, Ana Lucia Figueiredo,
orient. II. Cardoso, Kethylen Barbara Barbosa, coorient. III. Título

CDD 574

AMANDA LUCENA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus ochraceus* URM 604
OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
FARELO DE TRIGO E RESÍDUO DE CAFÉ COMO SUBSTRATO**

Comissão de Avaliação:

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto – UFRPE
(1^o Titular: Orientadora)

Dr^a. Márcia Nieves Carneiro da Cunha – UFRPE
(2^o Titular)

Dr. Thiago Pajeú Nascimento – UFRPE
(3^o Titular)

Dr^a. Juanize Matias da Silva Batista – UFRPE
(Suplente)

RECIFE – PE
2021

Dedico este trabalho ao meu amigo, esposo e parceiro, Gustavo Santos, que me apoiou em todos os sentidos e sem ele eu talvez nem tivesse chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a vida que me trouxe até aqui. Sabe aquele sentimento de estar no lugar certo? Foi eu durante o curso todo. Mesmo nos dias difíceis, quando não enxerguei muitas perspectivas sobre a profissão, agradei, pois independentemente de qualquer coisa, fiz o curso dos meus sonhos. Sim, sonhei em um dia ser Bióloga e cá estou, perto de realizar. Por isso, serei eternamente grata!

E eu não teria chegado até aqui sem a minha base, minha família. Obrigada por todos os ensinamentos, pelo carinho e compreensão. Agradeço especialmente ao meu marido, Gustavo, que me apoiou demais em todos os sentidos. Que sempre acreditou em mim. Que teve a paciência de ouvir os seminários que eu iria apresentar, pra que eu me sentisse mais confiante. Que aturou meus dias de insegurança, de choro e também de alegrias. Você foi/é incrível!

Agradeço imensamente aos amigos que fiz na ruralinda. A caminhada sem vocês teria sido praticamente insuportável. Nem consigo imaginar essa graduação sem vocês: Andreza, Babi, Dani, Dudu, Kayke, Lucca, Matheus, Sybel, Ste, Victor, e tantas outras pessoas maravilhosas que a biologia me apresentou. Graças a vocês o sentimento de pertencimento foi maior. Obrigada pelo apoio nos estudos, pelas vezes que ficamos jogados na frente do DB, pelas risadas, pela companhia especial nas aulas de campo, pelas vídeo chamadas e sessões de filmes durante a pandemia (mesmo nesses momentos difíceis vocês estavam lá!). Obrigada por tanto!

Agradeço a professora Ana Porto, pela sua orientação e por ser exemplo de cuidado com as pessoas, trabalho duro e dedicação. Logo após entrar para o LABTECBIO tivemos que enfrentar a pandemia e lembro o quanto a senhora se esforçou para nos mantermos engajados, promovendo encontros virtuais e estimulando o nosso aperfeiçoamento. Significou muito pra mim!

Meu muito obrigada a todos os integrantes do LABTECBIO, especialmente a Kethylen, Ju (Juanize) e o professor Romero, por terem me acompanhado desde o começo, pela confiança, pelos ensinamentos, pelas

oportunidades. Aprendi demais com todos desse laboratório! Vocês são fantásticos e admiro muito!

Agradeço a UFRPE como um todo. Hoje entendo porque ex-alunos brilham os olhos ao falar dessa instituição. Eternamente minha ruralinda! Gratidão pelo acolhimento e toda assistência. Agradeço especialmente a todos os professores e professoras dessa universidade, que me ensinaram tanto. Vocês são inspiração.

RESUMO

Proteases são enzimas de grande interesse comercial, tendo aplicações em diferentes segmentos industriais, como o farmacêutico, de alimentos, bebidas e produtos de limpeza. Dentre os organismos capazes de produzir essas enzimas estão os fungos filamentosos, os quais apresentam como vantagens a possibilidade de secretarem enzimas de forma extracelular e de crescerem em substratos de baixo custo. A Fermentação em Estado Sólido (FES) é uma das técnicas preconizadas no cultivo desses organismos, especialmente por simular o habitat natural dos fungos, favorecendo o seu crescimento. Tendo em vista a importância das proteases e a crescente demanda do mercado global, faz-se necessário a busca por novas fontes e métodos de produção. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi produzir proteases sob FES pelo fungo *Aspergillus ochraceus* URM 604 utilizando substratos derivados da agroindústria. Foi estudado através de um planejamento fatorial 2^3 a influência do tipo de substrato (resíduo de café, farelo de trigo e 1:1 café + farelo de trigo), quantidade de substrato (3g, 5g e 7g) e umidade (20, 40 e 60%) condições essenciais para a produção de proteases. A fermentação ocorreu por 7 dias a 30°C e o extrato metabólico foi utilizado para posteriores análises. Nas análises bioquímicas e físicas foram determinadas a atividade proteásica, proteínas totais, temperatura e pH ótimo das enzimas obtidas. Ao analisar a influência das variáveis adotadas no planejamento fatorial 2^3 foi constatado que somente o tipo de substrato foi significativo. O melhor substrato foi o farelo de trigo que apresentou atividade enzimática específica de 218.27 U/mg sob as condições de 3g de substrato e 60% de umidade. As demais condições também apresentaram resultados elevados quando comparado a literatura. A temperatura ótima da enzima produzida foi de 50°C e o pH ótimo foi pH 8-9 (protease alcalina). Dessa forma, o presente trabalho demonstra que o fungo *A. ochraceus* URM 604 tem potencial biotecnológico para produção de protease sob FES utilizando substratos de baixo custo como resíduo de café e farelo de trigo, sendo este o primeiro relato para a espécie.

Palavras-chave: Biotecnologia; Fungos Filamentosos; Resíduo Agroindustrial.

ABSTRACT

Proteases are enzymes of great commercial interest, since it has several industrial applications, such as the pharmaceutical, food, beverages and cleaning products. Among the organisms capable of producing these enzymes are filamentous fungi, having as advantages the possibility of secreting enzymes in the extracellular medium and growing on low-cost substrates. The Solid State Fermentation (SSF) is one of the recommended techniques in the cultivation of filamentous fungi, especially because it simulates its natural habitat, favoring their growth. Aiming the importance of proteases and the growing demand of the global market needs, it is necessary to search for new sources and better production methods. Thus, the objective of this research was to produce proteases by the filamentous fungus *Aspergillus ochraceus* URM 604 under SSF using substrates derived from the agribusiness, in 2^3 factorial design. It was investigated the influence of the type of substrate (coffee residue, wheat bran and 1: 1 coffee + wheat bran), amount of substrate (3g, 5g and 7g) and humidity (20, 40 and 60%) to determine the ideal conditions for protease production. Fermentation took place for 7 days at 30 °C and the metabolic extract was used for further analysis. For biochemical and physical analysis the protein activity, total proteins, temperature and optimal pH of the obtained enzyme were determined. When analyzing the influence of the variables adopted in the 2^3 factorial design, only the type of substrate was a significant parameter. The best substrate was wheat bran, which showed a specific enzymatic activity of 218.27 U / mg under 3g of substrate and 60% humidity. The other conditions also showed high results when compared to the literature. The optimum temperature of the enzyme produced was 50°C and the optimum pH was pH 8-9 (alkaline protease). Thus, this research shows that the fungus *A. ochraceus* URM 604 has biotechnological potential for protease production under SSF using low-cost substrates such as coffee grounds and wheat bran, this being the first report for the species.

Keywords: Agroindustrial waste; Biotechnology; Filamentous Fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas morfológicas envolvidas na reprodução assexuada de <i>Aspergillus ochraceus</i>	19
Figura 2. Fermentação em Estado Sólido (FES) do fungo filamentoso <i>Aspergillus ochraceus</i> URM 604 com diferentes substratos. [A] FES com Farelo de trigo; [B] FES com resíduo de café; [C] FES com 50% de resíduo de café e 50% de farelo de trigo.....	21
Figura 3. Gráfico de Pareto relacionando as variáveis e suas interações.....	34
Figura 4. Efeito simultâneo do tipo e quantidade do substrato na produção de proteases por <i>A. ochraceus</i> em planejamento fatorial 2^3	35
Figura 5. Temperatura ótima [A] e pH ótimo [B] da protease presente no extrato bruto.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^331

Tabela 2. Resultados da produção de protease por *Aspergillus ochraceus* utilizando planejamento fatorial 2^335

LISTA DE ABREVIATURAS

BCA: Ácido Bicinconínico

BDA: Ágar Batata Dextrose

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FES: Fermentação em Estado Sólido

FS: Fermentação Submersa

HCl: Ácido Clorídrico

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NaCl: Cloreto de Sódio

OMS: Organização Mundial de Saúde

TCA: Ácido Tricloroacético

URM: Universidade Recife Micologia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1. PROTEASES.....	16
3.2. FUNGOS FILAMENTOSOS.....	17
3.3. FILO ASCOMCOTA E O GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i>	19
3.4. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	21
3.5. FATORES QUE AFETAM A FES.....	23
3.6. SUBSTRATOS UTILIZADOS NA FES.....	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1. MICRORGANISMOS.....	31
5.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	31
5.3. EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA.....	31
5.4. DOSAGEM PROTEICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM AZOCASEÍNA.....	32
5.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA.....	32
5.6. ANÁLISE DE DADOS.....	33
6. RESULTADOS.....	34
7. DISCUSSÃO.....	38
8. CONCLUSÃO.....	42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
10. ANEXOS.....	47

1. INTRODUÇÃO

A Fermentação em Estado Sólido (FES) tem sido apontada como uma alternativa viável para a produção de diversos produtos de alto valor agregado, como enzimas e ácidos orgânicos, a partir do uso de substratos de baixo custo, incluindo resíduos e co-produtos da atividade agroindustrial, como farelo de trigo, farelo de arroz, cascas de frutas e resíduos de café (SOCCOL et al., 2017). O Brasil, sendo um país de economia substancialmente agrícola, gera grandes volumes de resíduos oriundos desse tipo de produção, e muitos deles conservam elevadas quantidades de nutrientes que poderiam ser utilizados em processos biotecnológicos (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

As proteases estão entre as enzimas que podem ser produzidas pela FES. Essas enzimas apresentam uma alta demanda comercial, uma vez que podem ser aplicadas em diferentes setores industriais, incluindo o de produtos de limpeza, alimentos, bebidas, farmacêutico e de biocombustíveis (GURUMALESH et al., 2019). É estimado que a demanda global por enzimas irá aumentar nos próximos anos, com crescimento para as de origem microbiana (FIORMARKETS, 2019). Dentre as vantagens no uso de microrganismos como produtores de proteases estão o rápido crescimento, a não necessidade de grandes áreas de cultivo e alta eficiência (AGUILAR e SATO, 2018). Contudo, no âmbito da FES, os fungos filamentosos ganham destaque, uma vez que naturalmente são adaptados para crescer em substratos sólidos com pouca ou ausência de água livre (SOCCOL et al., 2017). Além disso, a separação da biomassa é mais fácil do que se fossem utilizados microrganismos unicelulares (FERREIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2015) e são reconhecidos por secretar enzimas no meio extracelular (BATISTA et al., 2020; CHANGYOU-SHI et al., 2016), eliminando etapas nos processos de recuperação e purificação do produto (PESSOA-JR et al., 2020).

Apesar do gênero *Aspergillus* ser um dos mais investigados, ainda existem muitas espécies a serem avaliadas, como *Aspergillus ochraceus*, que não há relatos sobre a produção de proteases por essa espécie sob FES. Tendo em vista as inúmeras aplicações e o crescente mercado das proteases, é fundamental estudos envolvendo novas fontes e condições ideais de

fermentação, com o objetivo de tornar o processo produtivo mais eficiente e reduzir os custos envolvidos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de proteases do fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* URM604 por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo e resíduo de café como substratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar o melhor substrato para a produção de proteases;
- Analisar a influência das variáveis: quantidade de substrato, umidade e tipo de substrato sobre a produção de proteases, utilizando um planejamento fatorial 2³.
- Caracterizar a enzima proteolítica presente no extrato bruto quanto ao pH ótimo e temperatura ótima.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PROTEASES

As proteases são enzimas da classe das hidrolases capazes de promover a clivagem de ligações peptídicas, convertendo proteínas em peptídeos ou aminoácidos livres. Com base no modo de ação, as proteases podem ser classificadas em endopeptidases e exopeptidases, quando clivam ligações peptídicas no interior ou nas extremidades da cadeia polipeptídica, respectivamente. A depender da estrutura química do centro ativo, elas ainda são classificadas em serino proteases, proteases aspárticas, cisteína proteases, glutâmico proteases, metaloproteases e treonina proteases. As proteases também podem ser classificadas com base em sua atividade em um pH ótimo, sendo categorizadas como proteases ácidas, neutras e alcalinas (SOUZA et al., 2015; TAVANO, 2017).

A hidrólise de proteínas pode ser realizada por processos químicos, incluindo hidrólise alcalina e ácida, contudo esses processos tendem a ser difíceis de controlar. Na hidrólise enzimática, por outro lado, as reações acontecem em condições mais amenas de pH e temperatura, o que acaba reduzindo o consumo de água e energia no processo, sendo, portanto, uma alternativa ecologicamente mais sustentável (NOVOZYMES, 2013; TAVANO, 2017). As enzimas também ocupam menor espaço de armazenamento e tem alta especificidade pelo substrato, o que permite o desenvolvimento de proteínas hidrolisadas com resultados mais definidos (TAVANO, 2013). De forma geral, todas as enzimas apresentam as características mencionadas anteriormente, contudo, as hidrolíticas são as que ganham maior interesse em processos industriais, por apresentarem inúmeras aplicações (NOVOZYMES, 2013).

As proteases têm um papel fundamental na atividade catalítica de vários processos metabólicos dos seres vivos, tendo entre suas funções a digestão de proteínas, participação na cascata de coagulação sanguínea e apoptose celular (GURUMALLESH et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2015; SOUZA et al., 2015). Devido a sua importância biológica, a ocorrência de proteases é relatada em uma ampla diversidade de organismos, podendo ser produzidas por animais, plantas, fungos e procariontes (AGUILAR e SATO, 2018). Contudo, os microrganismos representam a principal fonte de proteases de aplicação

industrial, pois sua produção é favorecida pela facilidade de manipulação genética, rápido crescimento, espaço reduzido para cultivo, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais e ausência de efeitos provocados pela sazonalidade, pois crescem em condições controladas de cultivo (SAWANT e NAGENDRAN, 2014; AGUILAR e SATO, 2018).

As enzimas proteolíticas são extremamente importantes do ponto de vista comercial, chegando a englobar uma grande proporção do mercado global das enzimas (SAWANT e NAGENDRAN, 2014). A forte demanda de proteases é atribuída às suas inúmeras aplicações, sendo amplamente utilizadas nos setores de processamento de alimentos e bebidas, papel, couro, biocombustíveis, produtos de limpeza, indústria farmacêutica e setores de biologia molecular (BANERJEE e RAY, 2017; GURUMALLESH et al., 2019). Exemplo de proteases de grande interesse comercial são as proteases alcalinas, bastante utilizadas na formulação de produtos de limpeza doméstica, principal setor onde as enzimas são aplicadas (NOVOZYMES, 2019), para remoção de manchas contendo peptídeos e proteínas (VOJCIC et al., 2010). Já na indústria farmacêutica, duas proteases com vastas aplicações terapêuticas são as colagenases e enzimas fibrinolíticas, que atuam degradando a tripla hélice do colágeno e a fibrina presente nos coágulos sanguíneos, respectivamente (ALIPOUR et al., 2016; PENG et al., 2005). Outro setor onde as proteases são amplamente utilizadas é na indústria alimentícia, como a termolisina, utilizada na produção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante (TAVANO, 2017) e a papaína, aplicada no amaciamento de carnes (FERNANDÉZ-LUCAS et al., 2017).

Tendo em vista suas inúmeras aplicações é estimado um aumento na demanda pelas proteases. Segundo relatório da FiorMarkets (2019) é esperado que o mercado global de enzimas cresça de US\$ 8,18 bilhões em 2018 para US\$ 13,79 bilhões até 2026, com previsão de alta de 8,83% para o segmento de microrganismos.

3.2 FUNGOS FILAMENTOSOS

Cerca de 80% dos fungos descritos na literatura apresentam o modo de crescimento filamentoso (HEITMAN, 2011), formando um grupo bastante variado em termos de ecologia, morfologia, fisiologia e genética. Uma característica que os unem é o fato de serem seres heterotróficos, nutrindo-se por meio de sistema

que utiliza enzimas extracelulares para degradação de moléculas e absorção (GONÇALVES et al., 2018). Podem ser encontrados nos mais diversos habitats, mesmo em ambientes com características consideradas inóspitas para outros microrganismos, como baixa umidade e substratos sólidos, tais como rochas, troncos de árvores e em abundância no solo (KJOLLER e STRUWE, 1982; BILLS et al., 2004). Os fungos são os principais controladores de insetos, incluindo os considerados pragas agrícolas, promovendo, portanto, um controle biológico dessas populações (WANG et al., 2016). Também protegem as plantas contra o ataque de fitopatógenos (RODRIGUEZ et al., 2009), além da função primordial na decomposição de matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes (BERRIN et al., 2012; FUKASAWA et al., 2011).

Devido a sua capacidade de produzir diferentes micro e macromoléculas, os fungos filamentosos são microrganismos de grande importância biotecnológica, cuja utilização na produção de proteases é constantemente relatada na literatura. Nascimento et al. (2015) reportaram a produção de proteases com atuação trombolítica, as proteases fibrinolíticas, usando o fungo filamentoso *Mucor subullissimus*. Wanderley et al. (2017) examinaram a utilização de fungos para produção de colagenases, destacando o potencial do fungo filamentoso *Penicillium aurantiogriseum*. Outros trabalhos também enfatizaram o potencial dos fungos filamentosos como produtores de proteases. Silva et al. (2016) avaliaram trinta e quatro linhagens do gênero *Aspergillus* e todas apresentaram atividade proteásica. Alhelli et al. (2016) produziram e purificaram uma protease de *Penicillium candidum*, estes autores apontaram sua possibilidade de utilização na indústria de laticínios.

Dentre as vantagens no uso de fungos filamentosos na produção de proteases é o fato destes serem capazes de crescer em substratos de baixo custo e cuja separação da biomassa é mais fácil do que se fossem utilizados microrganismos unicelulares (FERREIRA et al., 2016; SOUZA et al., 2015). Outra vantagem é que eles são reconhecidos por secretar enzimas no meio extracelular, facilitando a extração e purificação uma vez que não há necessidade de lise celular (BATISTA et al., 2020; CHANGYOU-SHI et al., 2016). Ao romper a célula, além da molécula alvo, são eliminadas uma diversidade de outras moléculas, tornando o meio muito mais complexo de purificar. Outro inconveniente é que esse rompimento acaba aumentando a viscosidade, devido

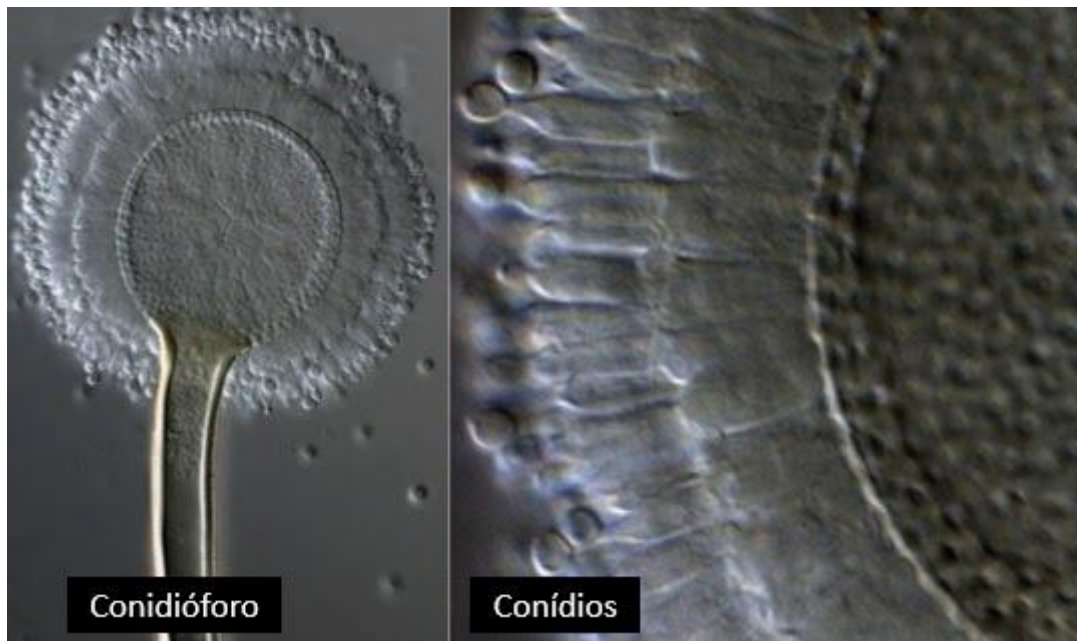
a liberação dos ácidos nucléicos, o que também irá dificultar o processo de purificação, por exemplo por tornar necessário o uso de filtros específicos (PESSOA-JR et al., 2020). Todas essas características acabam por despertar o interesse em utilizar fontes produtoras de produtos biotecnológicos, como as proteases, de forma extracelular.

Apesar das vantagens, e levando em consideração a diversidade de fungos filamentosos encontrados na natureza, poucas espécies são exploradas comercialmente. Dentre os fungos filamentosos, os pertencentes ao gênero *Aspergillus* se destacam, uma vez que apresentam distribuição cosmopolita e são capazes de secretar uma gama de enzimas de interesse biotecnológico (SANTOS et al., 2020; CHANGYOU-SHI et al., 2016), fazendo deste um dos gêneros mais estudados (SANTOS et al., 2018).

3.3 FILO ASCOMYCOTA E O GÊNERO *ASPERGILLUS*

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem ao filo Ascomycota, que é o maior em número de espécies fúngicas conhecidas, tendo cerca de 64% das espécies descritas (GONÇALVES et al., 2018). Os fungos desse filo formam hifas septadas, mas também incluem algumas leveduras (TORTORA et al., 2017). Durante a produção de esporos de origem sexuada, podem formar uma estrutura chamada asco, que dá nome ao filo. Já os esporos de origem assexuada, portanto semelhantes ao fungo parental, são gerados através de mitoses em hifas especializadas, que podem formar estruturas conhecidas como conidióforos, onde serão produzidos os conídios, esporos que são facilmente liberados (GONÇALVES et al., 2018). Muitos fungos do gênero *Aspergillus* perderam a capacidade de se reproduzir de forma sexuada, sendo conhecidos como fungos anamorfos (SAMSON et al., 2014). Neste caso, os conídios e conidióforos estão entre as características fenotípicas utilizadas na identificação dessas espécies. A figura 1 ilustra essas estruturas observadas no fungo *Aspergillus ochraceus*.

Figura 1. Estruturas morfológicas envolvidas na reprodução assexuada de *Aspergillus ochraceus*.



Fonte: Samson et al. (2014) modificada.

Segundo Samson et al. (2014) já foram descritas 339 espécies do gênero *Aspergillus*, que além da importância ecológica, mencionada anteriormente, também incluem espécies de interesse econômico, tanto por apresentarem impactos nocivos à saúde pública, através da contaminação de alimentos e secreção de toxinas por exemplo (GONÇALVES et al., 2018), quanto pela possibilidade de produzirem inúmeros produtos de alto valor agregado, como enzimas e ácidos orgânicos (FERREIRA et al., 2016). Ascomicetos filamentosos, tais como *Aspergillus* spp., são capazes de produzir diferentes enzimas, incluindo amilase, protease, lipase, fitase, celulase e xilanase, além de estarem entre os principais produtores de ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico e glucônico (FERREIRA et al., 2016). Essa versatilidade está diretamente ligada à capacidade desses organismos conseguirem se desenvolver em diferentes substratos, muitos de baixo custo, tais como farelo de trigo, milho, bagaço de cana ou espiga de milho, o que permite aplicações biotecnológicas na valorização de resíduos e co-produtos da agroindústria, que podem tornar o processo produtivo menos oneroso (SOCCOL et al., 2017).

Levando em consideração a diversidade de espécies de *Aspergillus* spp. e sua natureza multifária em relação à produção de enzimas, considera-se que poucos microrganismos são explorados atualmente, abrindo espaço para produções na área. Dentre as espécies mais estudadas encontra-se *Aspergillus*

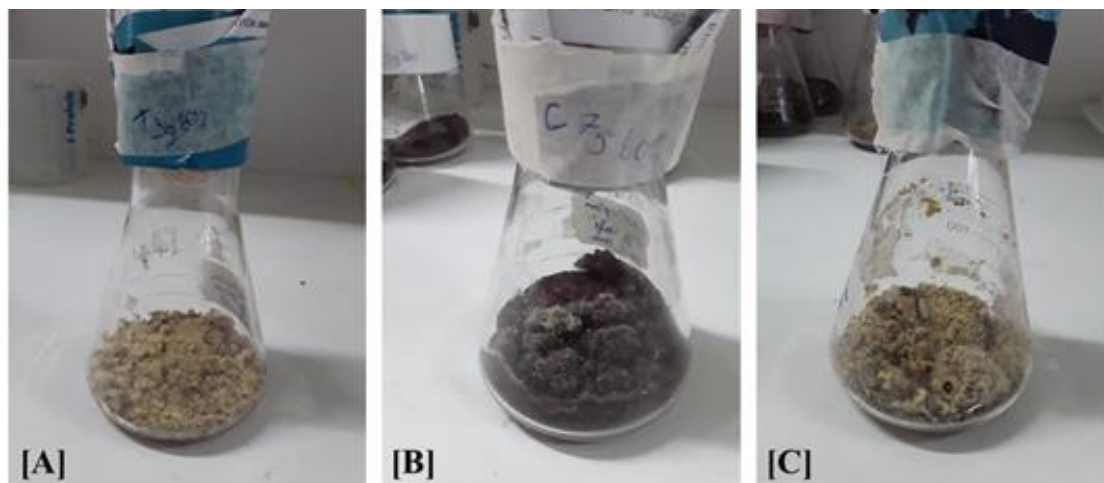
oryzae e *Aspergillus niger*, as demais espécies carecem de estudos mais profundos, principalmente do ponto de vista da Fermentação em Estado Sólido (FES) (SOCCOL et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

Em relação ao fungo *Aspergillus ochraceus* estudos anteriores têm apontado sua capacidade de produzir hidrolases a partir de Fermentação Submersa (FS) (BISWAS et al., 1988; OSMOLOVSKIY et al., 2016; OSMOLOVSKIY et al., 2017), embora nenhum estudo tenha sido conduzido avaliando o potencial biotecnológico da espécie para produção de proteases sob FES, utilizando substratos alternativos.

3.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Um aspecto fundamental a ser considerado na produção de proteases por microrganismos é o tipo de fermentação adotada. Embora a maior parte das enzimas produzidas comercialmente seja através da Fermentação Submersa (FS), essas enzimas também podem ser produzidas por Fermentação em Estado Sólido (FES) (Figura 2). A principal diferença entre elas é a quantidade de água livre presente, onde na FS os microrganismos crescem em meios líquidos, enquanto na FES crescem em substratos sólidos com umidade suficiente somente para suportar o crescimento desses organismos, principalmente dos fungos filamentosos (SINGHANIA et al., 2009; SOCCOL et al., 2017; SANTOS et al., 2018). Dessa forma, a maior quantidade de água na FS deixa os metabólitos mais diluídos, tornando o processo de downstream (recuperação e purificação do produto) mais demorado e caro (TAVANO, 2017). O custo para desidratação nas etapas finais do processo pode ser reduzido na FES, além da redução no consumo de energia para esterilização, uma vez que será necessário menos energia para alcançar a temperatura utilizada para esterilização (SOCCOL et al., 2017).

Figura 2. Fermentação em Estado Sólido (FES) do fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* URM 604 com diferentes substratos. [A] FES com Farelo de trigo; [B] FES com resíduo de café; [C] FES com 50% de resíduo de café e 50% de farelo de trigo.



Fonte: Autoral.

Além da produção de enzimas de forma mais concentrada, a FES também apresenta outras vantagens, como redução da possibilidade de contaminação bacteriana, pois a maioria das bactérias não conseguem colonizar substratos com baixo teor de umidade, permite também a utilização de substratos de menor custo, como resíduos e co-produtos da agroindústria, além de ser uma alternativa bastante recomendada para fungos filamentosos, pois se assemelha às condições do habitat natural desses organismos, favorecendo o seu crescimento (MANAN e WEBB, 2017; SOCCOL et al., 2017). Diversos trabalhos demonstraram que fungos filamentosos são melhores produtores de proteases sob FES do que em FS. Um exemplo disso pode ser visto no estudo de Belmessikh et al. (2013), no qual foi utilizado o fungo *Aspergillus oryzae* e um substrato a base de bagaço de tomate, tendo obtido uma atividade de 21309 U/g na FES e 2343,5 U/g na FS, ou seja, a FES se mostrou cerca de 9 vezes mais eficiente do que a FS. Outro estudo que apontou a eficiência da FES foi o realizado por Sandhya et al. (2005), que apresentaram uma produção de proteases 3,5 vezes superior sob FES em comparação a FS, também utilizando o fungo filamentoso *A. oryzae*.

Um dos principais desafios na adoção da FES como técnica para produção de produtos biotecnológicos em grande escala é a construção de biorreatores, principalmente devido a intensa geração de calor (SINGHANIA et al., 2009; SOCCOL et al., 2017). De toda forma, já existem aplicações industriais da FES, principalmente no processamentos de alimentos e bebidas em países orientais, como China e Japão (COUTO e SANROMÁN, 2006; MANAN e WEBB,

2017). Além disso, nos últimos anos o número de patentes envolvendo fermentação em estado sólido e biorreatores têm aumentado, sendo esse um indício de que essa tecnologia segue sendo aprimorada para aplicação industrial (SOCCOL et al., 2017). Esse cenário acaba impulsionando a busca por condições ótimas de produção de enzimas e outros produtos biotecnológicos utilizando essa técnica que apresenta tantas vantagens.

3.5 FATORES QUE AFETAM A FES

Para que a FES seja eficiente, além do biorreator adotado, existem outros fatores que podem influenciar o desempenho do processo, podendo ser divididos em três categorias principais: fatores biológicos, físico-químicos e mecânicos (MANAN e WEBB, 2017). Dentre essas variáveis estão o tipo e quantidade de substrato, espécie utilizada, grau de umidade, suplementação nutricional, temperatura, concentração de microrganismos e agitação (MAMO et al., 2020; ESPARZA et al., 2011; SETHI et al., 2016; CHIMBEKUJWO et al., 2020; SILVA et al., 2016; MANAN e WEBB, 2017). Nascimento et al. (2015), por exemplo, realizaram um planejamento fatorial 2^3 para avaliar as melhores condições de fermentação de *Mucor subtilissimus*, tendo investigado o tipo e quantidade de substrato, umidade e temperatura.

Segundo Manan e Webb (2017) o fator físico mais importante é o tamanho do substrato, pois terá influência no crescimento microbiano. Partículas menores irão fornecer uma maior área superficial para o microrganismo, permitindo maior contato com os nutrientes, embora afete a difusão de gases, enquanto partículas maiores fornecem menor área, logo menor contato com os nutrientes, mas uma melhor aeração. Dessa forma, é importante levar esses fatores em consideração ao determinar o método ideal de produção de acordo com a espécie estudada (DELABONA et al., 2013).

3.6 SUBSTRATOS UTILIZADOS NA FES

O tipo de substrato é um dos aspectos críticos numa fermentação, seja ela submersa ou em estado sólido, tendo em vista que esse insumo pode representar até 40% do custo de produção de um produto biotecnológico como as enzimas (JOO et al., 2002). Nesse sentido, a FES apresenta como importante vantagem a possibilidade de utilizar substratos de baixo valor agregado,

incluindo resíduos orgânicos, como cascas de frutas (CHIMBEKUJWO et al., 2020), resíduos de café (MURTHY et al., 2019) e espigas de milho (ABU-TAHON et al., 2020; YADAV et al., 2011).

O Brasil é caracterizado por ter uma economia fortemente atrelada à agricultura, sendo um dos maiores produtores mundiais de café, cana de açúcar, soja, trigo, dentre outros produtos. Conseqüentemente, é gerado uma grande quantidade de resíduos e co-produtos oriundos dessa atividade. Somente em 2019, foram produzidas cerca de 3 milhões de toneladas de café e 5,2 milhões de toneladas de trigo, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019). De acordo com relatório realizado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2019), aproximadamente 14% dos alimentos são perdidos ou desperdiçados antes mesmo de chegar ao consumidor final, e cereais e leguminosas são os principais.

A aplicação de bioprocessos, tais como a FES, tem se mostrado uma alternativa viável no aproveitamento desses materiais, que além de servirem como substratos alternativos, também acabam ajudando a resolver problemas de poluição (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003), dando uma destinação final mais nobre para esses materiais que muitas vezes iriam parar em aterros sanitários ou lixões.

O farelo de trigo é um exemplo de substrato que pode ser utilizado de forma biotecnológica (SANTOS et al., 2018). Como material de consumo, é pouco utilizado devido suas características impalatáveis (SILVEIRA e FURLONG, 2007). Todavia, possui rica carga de nutrientes, apresentando alta concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas (40%, 15,2% e 5,5%, respectivamente) (BABU, 2018), viabilizando-os como matéria-prima promissora em bioprocessos fermentativos (NASCIMENTO et al., 2015). Atualmente encontra-se como um dos substratos mais utilizados na FES.

Outro substrato com perfil promissor é o proveniente da indústria cafeeira (PANDEY et al., 2000). O café é um dos itens mais comercializados no mundo, e proporcionalmente, há o descarte de seu processamento. O maior problema ocasionado pelos resíduos do café é sua capacidade mutagênica devido seus componentes, um agravo que pode ser repassado ao meio ambiente (FERNANDES et al., 2017). De acordo com Zainol et al. (2020), o resíduo agroindustrial de café contém quantidades consideráveis de compostos

bioativos, sendo possível encontrar 6.22% de carboidratos, 5.15% de proteínas e 1.38% de lipídeos em grãos usados de *Coffea arabica*, e 6.76% de carboidratos, 6.55% de proteínas e 1.67% de lipídeos em *Coffea robusta*, as variações mais consumidas de café.

Apesar de promissor, o uso de resíduos agroindustriais, especialmente de café, ainda é limitado quanto a FES de fungos filamentosos. Tendo em vista essa problemática, é urgente novas investigações que possam reutilizá-los de modo consciente e sustentável, tornando-os matéria-prima biotecnológica para processos fermentativos, como a FES (PANDEY et al., 2000), principalmente para a produção de enzimas de interesse do mercado de proteínas, como as proteases.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-TAHON, M. A.; ARAFAT, H. H.; ISAAC, G. S. Laundry detergent compatibility and dehairing efficiency of alkaline thermostable protease produced from *Aspergillus terreus* under solid-state fermentation. **Journal of Oleo Science**, v. 69, n. 3, p. 241–254, 2020.

AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.

ALHELLI, A. M. et al. Response surface methodology modelling of an aqueous two-phase system for purification of protease from *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031) under solid state fermentation and its biochemical characterization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1–23, 2016.

ALIPOUR, H. et al. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. **Asian Pac J Trop Biomed**, 6(11): 975–981, 2016.

BABU, C.R. et al. Wheat Bran-Composition and Nutritional Quality: A Review. **Advances in Biotechnology and Microbiology**. V.9 (1), 2018.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, p. 119-143, 2017.

BATISTA, J. M. S. et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase - rich extract produced by *Aspergillus tamaritii* Kita UCP1279. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, 2020.

BELMESSIKH, A. et al. 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, Issue 3, p.377-385, 2013.

BERRIN, G. et al. Exploring the Natural Fungal Biodiversity of Tropical and Temperate Forests toward Improvement of Biomass Conversion. **Applied and Environmental Microbiology**. 78(18):6483–649, 2012.

BILLS, G. F. et al. Saprobic soil fungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS, eds. **Biodiversity of Fungi - Inventory and Monitoring Methods**. Elsevier Academic Press; 2004

BISWAS, S. R.; MISHRA, A. K.; NANDA, G. Induction of Xylanase in *Aspergillus ochraceus*, **Folia Microbiol.** 33, 355—359, 1988.

CHANGYOU-SHI, J. H. et al. Physicochemical Properties Analysis and Secretome of *Aspergillus niger* in Fermented Rapeseed Meal. **Plos One**, Apr 6;11(4), 2016.

CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. **Scientific African**, v. 8, p. e00398, 2020.

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

DELABONA, P. S. et al. Effect of Initial Moisture Content on Two Amazon Rainforest *Aspergillus* Strains Cultivated on Agro-Industrial Residues: Biomass-Degrading Enzymes Production and Characterization. **Industrial Crops and Products**, 42, 236-242, 2013.

ESPARZA, A. H. Y. et al. Optimization of process conditions for the production of a prolylendopeptidase by *Aspergillus niger* ATCC 11414 in solid state fermentation. **Food Sci. Biotechnol.** v. 20(5), p. 1323-1330, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **State of Food Agriculture**. Disponível em: <<http://www.fao.org/state-of-food-agriculture/en/>>. Acesso em 19 mai. 2020.

FERNANDES, A. S. et al. Impacts of discarded coffee waste on human and environmental health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 30–36, 2017.

FERNANDEZ-LUCAS, J. et al. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 68, 91-101, 2017.

FERREIRA, J. A. et al. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, p. 334–345, 2016.

FIORMARKETS. **Enzymes Market by Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, Others), Source, Application, Regions, Global Industry Analysis, Market Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2019 to 2026**. Report ID: 396080, 2019, 250p.

FUKASAWA, Y.; OSONO, T.; TAKEDA, H. Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood. **Mycologia**. 103(3):474–482, 2011.

GONÇALVES, V. N. et al. Biologia e Biotecnologia de Fungos. In. **Microbiologia Industrial**. Vol. 1, cap. 3, 2018.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.

HEITMAN, J. Microbial pathogens in the fungal kingdom. **Fungal Biology Reviews**, v.25, p.48-60, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: estatística da produção agrícola**. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72415>>. Acesso em 22 de jul. 2020.

JOO, H. S. et al. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**. 38, 155/159, 2002.

KJOLLER, A.; STRUWE, S. Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil. **Oikos**. 39(3):389–422, 1982.

MAMO, J. et al. Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v.4, Issue 1, 2017.

MURTHY, P. S. et al. Modulation of coffee flavor precursors by *Aspergillus oryzae* serine carboxypeptidases. **Lwt**, v. 113, n. June, p. 108312, 2019.

NASCIMENTO, T. P. et al. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtillissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, vol. 03, no. 03, p. 81–91, 2015.

NOVOZYMES. **Enzymes at work**. 4th edição, 2013.

NOVOZYMES. **The novozymes report 2019**. Disponível em: < <https://investors.novozymes.com/investors/financial-reports/annual-reports/default.aspx>>. Acesso em 05 de dezembro de 2020.

OSMOLOVSKIY, A. A. et al. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 71, p. 62–66, 2016.

OSMOLOVSKIY, A. A. et al. Production of Proteinases with Fibrinolytic and Fibrinogenolytic Activity by a Micromycete *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, Vol. 86, No. 4, pp. 512–516, 2017.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153–162, 2000.

PENG, Y. et al. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Appl Microbiol Biotechnol**, 69: 126–132, 2005.

PESSOA-JR, A. et al. Rompimento celular. In. KILIKIAN, B. V. ; PESSOA-JR, A. (Coord.). **Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial**. 2^a ed. São Paulo: BLUCHER, p.67-103, 2020.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**. 182(2):314–330, 2009.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **STUDIES IN MYCOLOGY**, v.78, p.141–173, 2014.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, Issue 8, p.2689-2694, 2005.

SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 0181–0188, 2018.

SANTOS, A. F. A. et al. Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamaritii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 25663-25676, 2020.

SAWANT, R.; NAGENDRAN, R. Protease: An Enzyme with multiple industrial applications. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 568-579, 2014.

SETHI, B. K. et al. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels . **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 4, p. 571–583, 2016.

SILVA, O. S. et al. Novel Protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: Production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 4, n. 4, p. 125–143, 2016.

SILVA, O. S. et al. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaritii* URM4634. [s.l.] **Elsevier B.V**, v. 117, 2018.

SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 805-811. 2007.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 44, p.13–18, 2009.

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

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52–71, 2017.

SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Braz. J. Microbiol.** vol.46 no.2, 2015.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 90, 1–11, 2013.

TAVANO, O. L. Proteases. In: **Microbial Enzyme Technology in Food Applications**. Cap.9. CRC Press, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Eucariotos: fungos, algas, protozoários e helmintos. In. **Microbiologia**. Cap. 12. Porto Alegre: Artmed, 12^a edição, 2017.

VOJCIC, L. et al. Advances in protease engineering for laundry detergents. **New Biotechnology**, 2010.

WANDERLEY, M. C. A. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.3–24, 2017.

WANG, J. B. et al. Advances in Genomics of Entomopathogenic Fungi. In: Lovett B, Leger RJSt, eds. **Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi**. Elsevier Inc; 2016.

YADAV, S. K. et al. Oxidant and solvent stable alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its characterization. **African Journal of Biotechnology**, v. 10 No. 43, 2011.

ZAINOL, K.; AHMAD, F.; ZIN, Z. M.; MAMAT, H. Antioxidative properties and proximate analysis of spent coffee ground (SCG) extracted using ultrasonic-methanol assisted technique as a potential functional food ingredient. **Food Research**, 4 (3) : 636 644, 2020.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MICRORGANISMOS

O fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* foi isolado na Estação Ecológica de Tapacurá (UFRPE) e encontra-se depositado na Micoteca URM 604, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. O meio utilizado para a manutenção foi o Ágar Batata Dextrose (BDA) previamente autoclavado a 121°C por 20min.

5.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Para a produção das proteases foi realizado um planejamento fatorial 2³ (Tabela 1) para análise das melhores condições de produção, onde foram avaliados: tipo de substrato (café, trigo, e café + trigo em uma mistura de 1:1), concentração de substrato (3g, 5g e 7g) e umidade (20%, 40% e 60%). Os resíduos de café adotado foram cedidos pela Cafeteria Delta Espresso contendo resíduos dos grãos de *Coffea arábica* e *Coffea robusta*. A princípio foi realizado tratamento dos substratos utilizados, onde o resíduo de café foi seco em estufa a 100°C até completa desidratação e o farelo de trigo passou por peneira granulométrica (0,6 a 2,0mm). Então, ambos os substratos foram autoclavados a 121°C por 20min, em frascos de erlenmeyer de 125 mL. Posteriormente foram depositados nestes frascos os esporos do fungo *Aspergillus ochraceus* URM604 na concentração 10⁷ esporos/mL, ressuspensos em solução de caldo glicosado (1% Glicose 0,2% extrato de carne e 3% peptona) e tween 80 (p/v). A fermentação ocorreu por 7 dias em estufa a 30°C, de acordo com Osmolovskiy (2016).

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2³

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	Menor (-1)	Central (0)	Maior (+1)
Concentração do substrato (g)	3	5	7
Umidade (%)	20	40	60
Tipo do substrato	Café	Café+trigo	Trigo

5.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A extração da enzima foi realizada utilizando Tampão TRIS-HCl pH 8,0, 0,1M com NaCl a 0,15M (7 mL/g de substrato) de acordo com Nascimento et al. (2015). A filtração para obtenção do líquido metabólico foi realizada em bomba a vácuo, utilizando papel filtro Whatman nº1.

5.4 DOSAGEM PROTEICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM AZOCASEÍNA

A determinação das proteínas totais foi realizada utilizando o método BCA de acordo com Smith (1985). A atividade foi realizada em microplaca, onde foram misturados 25 µL da amostra e 200 µL da solução de BCA, e incubados a 37°C por 30 minutos. A absorbância foi então medida a 562 nm em um leitor de microplaca. Albumina sérica foi usada como controle como determinado pelo fabricante (Pierce, Rockford, IL, EUA). O método para determinação da atividade da protease foi descrito por Ginther (1979) modificado. A mistura de reação conteve 0,25 mL do substrato (azocaseína 1% p/v em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0) e 0,15 mL da amostra. Esta mistura foi incubada por 1 hora em estufa à 30°C sendo a reação interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% p/v. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm. Dos sobrenadantes, foram pipetados 0,8 mL e transferidos para eppendorfs contendo 0,2 mL de hidróxido de sódio 1,8 N. A leitura foi realizada a 420nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produziu um aumento na densidade óptica de 0,1 por hora a 420 nm.

5.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA

O efeito do pH na atividade da protease foi avaliado pela mistura da solução enzimática com o substrato específico, preparados em soluções tampões 0,05 M com diferentes valores de pH: citrato de sódio (pH 5; 6; 7); Tris-HCl (pH 7; 8 e 9) e determinações da atividade proteásica seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

O efeito da temperatura foi determinado utilizando uma mistura de reação contendo o substrato específico e a solução enzimática, incubadas em diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C) por 60 min, para

posterior determinação da atividade enzimática seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

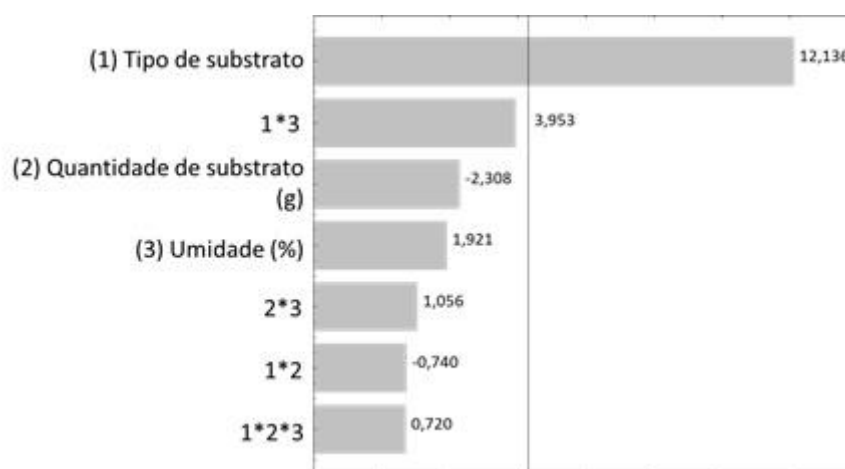
5.6 ANÁLISE DE DADOS

Os efeitos foram avaliados por uma análise de variância com um nível de significância de 95%. A análise estatística foi realizada por meio do software Statistica 8.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos em $p \leq 0,05$ e foi utilizado o software Excel 2013.

6. RESULTADOS

Foram avaliadas variáveis qualitativas (matéria orgânica utilizada como substrato) e quantitativas (quantidade de substrato e umidade). Dentre as variáveis observadas neste trabalho, somente o tipo de substrato apresentou significância, ou seja, influenciou significativamente os resultados, como pode ser observado no gráfico de Pareto disponível na Figura 3. A quantidade de substrato e a umidade, bem como a interação entre as variáveis não afetou os resultados em relação a produção de proteases.

Figura 3. Gráfico de Pareto relacionando as variáveis e suas interações.



Ao analisar a eficiência da produção de protease por *Aspergillus ochraceus* a partir da fermentação em farelo de trigo, café, e uma mistura de 1:1 de ambos substratos (Tabela 2), pode-se observar uma superioridade na atividade específica (218,27 U/mg) utilizando trigo (3g à 60% de umidade) quando comparado ao resíduo de café pura (76,44 U/mg) nas mesmas condições de fermentação, apresentando ser o melhor substrato para obtenção destas enzimas (Figura 4). Também foram realizados testes com ambos os substratos na concentração de 50% como ponto central, nas condições médias de 5g de substrato e 40% de umidade, ainda assim, os resultados obtidos quando utilizado somente o farelo de trigo se mostraram superiores (Tabela 2). Apesar das variações citadas, todos as condições permitiram crescimento microbiano e produção de proteases, evidenciando a eficiência do fungo utilizado. Observa-se nos ensaios realizados utilizando trigo como substrato, que os maiores resultados foram obtidos em alta concentração de umidade (60%),

em contrapartida, o resultado obtido a partir da FES com resíduo de café foi o oposto, as maiores atividades proteásicas apresentam-se com as menores concentrações de umidade (20%).

Figura 4. Efeito simultâneo do tipo e quantidade do substrato na produção de proteases por *A. ochraceus* em planejamento fatorial 2^3

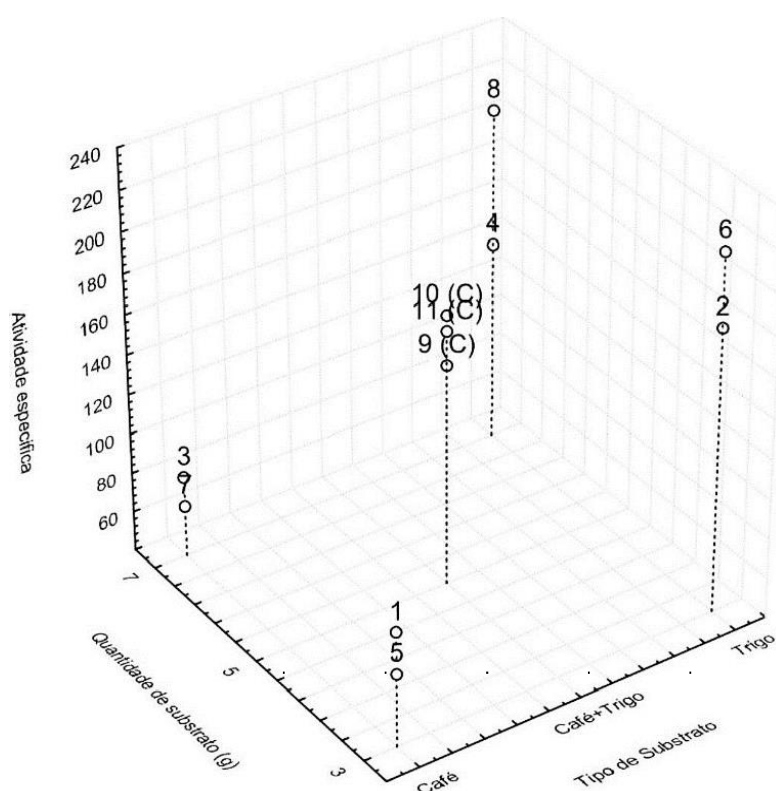


Tabela 2. Resultados da produção de protease por *Aspergillus ochraceus* utilizando planejamento fatorial 2^3 .

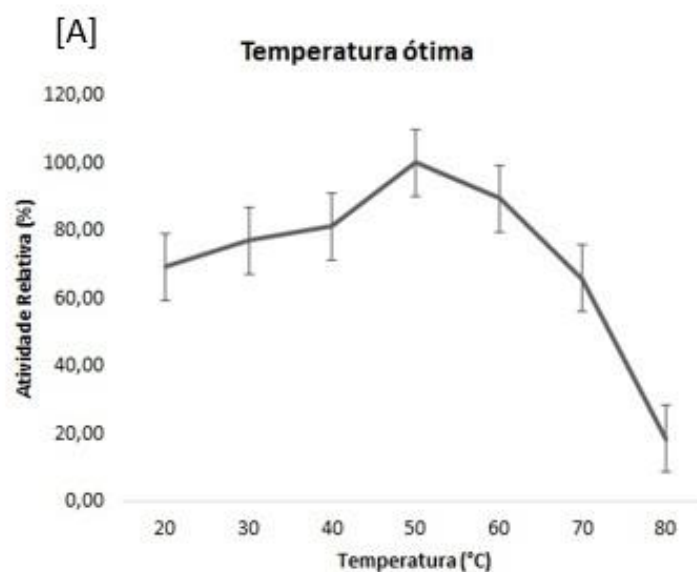
Substrato	Quantidade (g)	Umidade (%)	Ativ. proteásica (U/mL)	Proteína Total (mg/mL)	Ativ. Proteásica Específica (U/mg)
CAFÉ	3	20	651,33	66,95	97,28
CAFÉ	3	60	680,67	89,05	76,44
CAFÉ	7	20	807,33	100,27	80,52
CAFÉ	7	60	705,00	107,50	65,58
TRIGO	3	20	815,33	44,75	182,19

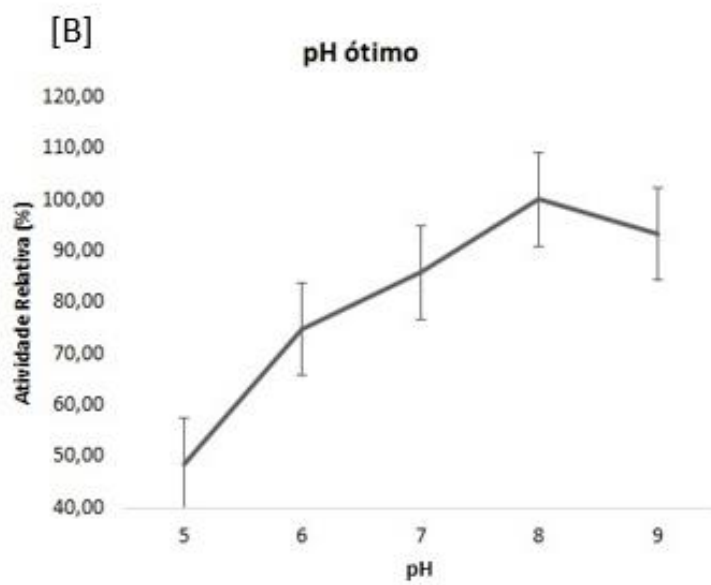
TRIGO	3	60	688,67	31,55	218,27
TRIGO	7	20	589,00	42,16	139,71
TRIGO	7	60	726,33	35,08	207,07
C+T*	5	40	927,33	48,30	191,99
C+T*	5	40	907,33	54,24	167,30
C+T*	5	40	883,33	50,45	175,09
C+T*	5	40	742,00	49,24	150,71

*C+T = 1:1 Resíduo de Café + Farelo de Trigo

A atividade ótima da protease de *A. ochraceus* URM 604 no extrato bruto foi registrada a 50°C e diminuindo acima dessa temperatura, chegando a apresentar atividade residual de somente 20% a 80°C. Em relação ao pH ótimo, foi observado uma atividade maior entre pH 8 e 9 (alcalino) (Figura 5).

Figura 5. Temperatura ótima [A] e pH ótimo [B] da protease presente no extrato bruto.





7. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi demonstrado a capacidade de *A. ochraceus* produzir enzimas proteolíticas a partir de sua fermentação em substratos derivados da atividade agroindustrial, o farelo de trigo e resíduo de café. A seleção de um substrato apropriado é um fator chave para o processo de FES. O farelo de trigo e resíduo de café foram selecionados como substrato para FES devido à sua disponibilidade, baixo custo e rico conteúdo químico, tendo sido observado uma produção máxima de protease quando o farelo de trigo foi usado como substrato, obtendo-se atividade enzimática de 688,67 U/mL e específica de 216,27 U/mg (3g de substrato, 60% de umidade).

Vários trabalhos tem apontado o farelo de trigo como melhor substrato para produção de proteases sob FES por *Aspergillus* spp. (MAMO et al., 2020; ABU-TAHON et al., 2020; PURUSHOTHAMAN et al., 2019; SILVA et al., 2018), *Mucor* (NASCIMENTO et al., 2015), *Rhizomucor* (KHADEMI et al., 2013) e *Pleurotus* (RAVIKUMAR et al., 2012). Os motivos envolvem propriedades físico-químicas e mecânicas. Esse substrato apresenta uma estrutura com ausência de aglomeração de partículas (ARCHANA e SATYANARAYANA, 1997), além de uma estrutura bioquímica que inclui vários açúcares solúveis, como galactose e glicose, que auxiliam no processo inicial de crescimento e replicação microbiana (LEQUART et al., 1999). Nascimento et al. (2015) apresentam farelo de trigo como melhor substrato na produção de proteases com ação fibrinolítica a partir da FES com fungos filamentosos, tendo obtido atividade proteásica de 48 U/mL. Naik et al. (2019) também obtiveram melhores resultados utilizando farelo de trigo, ao comparar com farelo de arroz, bagaço de cana, cascas de laranja, limão e banana, na produção de enzimas por *Aspergillus* sp.

Em relação ao uso dos resíduos do café, apesar de não ter sido responsável pela maior obtenção de proteases neste estudo, pode ainda ser considerado como excelente substrato pois foi observada uma atividade proteásica superior a de outros trabalhos, tendo sido obtida atividade enzimática entre 651-807 U/mL e atividade específica entre 65-97 U/mg, apontando o potencial biotecnológico desse resíduo que pode causar vários problemas socioambientais se descartado de forma inadequada (FERNANDES et al., 2017). Rocha (2018) também apontou o potencial biotecnológico desse resíduo

como substrato na FES do fungo *Aspergillus sydowii*, tendo observado atividade enzimática de 412 U/mL no extrato bruto. Murthy et al. (2019) obtiveram maior atividade proteásica com o fungo *Aspergillus oryzae* utilizando resíduo de café, em comparação a outros substratos agroindustriais, mas optaram em adotar o farelo de trigo em estudos posteriores, por ser mais fácil de obter em grandes volumes. O uso de resíduos de café também tem sido apontado como excelentes meios de cultivo para outros microrganismos. Cerda et al. (2017) relataram a produção de celulases e xilanases a partir da FES com bactérias (*Pseudoxanthomonas taiwanensis* e *Sphingobacterium composti*) e leveduras (*Cyberlindnera jadinii* e *Barnettozyma californica*).

As diferenças observadas na produção de proteases entre os substratos analisados pode estar relacionada ao tamanho das partículas e a composição química dos mesmos. Embora essas variáveis não tenham sido avaliadas no presente estudo, nota-se que o resíduo de café apresenta partículas menores do que o farelo de trigo, o que pode ocasionar maior compactação do meio e conseqüentemente menos difusão de gases, interferindo no crescimento microbiano (MANAN e WEBB, 2017). Em resíduos obtidos a partir do uso comercial de grãos do tipo Arábica (*Coffea arabica*) é possível encontrar 6.22% de carboidratos, 5.15% de proteínas e 1.38% de lipídeos (ZANOIL et al., 2020). Já o farelo de trigo também apresenta alta concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas (40%, 15,2% e 5,5%, respectivamente) (BABU, 2018). Outra razão para adoção do farelo de trigo como substrato em estudos futuros utilizando *A. ochraceus* é que as etapas de purificação provavelmente serão menos complexas do que ao utilizar a resíduo de café, uma vez que a atividade proteásica específica nas condições avaliadas utilizando farelo de trigo foram superiores, sendo esse um indício de que o extrato encontra-se mais puro (BERG et al., 2008) do que os extratos obtidos via fermentação na resíduo de café.

Osmolovskiy et al. (2016) também investigaram o potencial do fungo *Aspergillus ochraceus* na produção de proteases, mas sob Fermentação Submersa (FS), tendo observado atividade proteásica de 94,9 U/mL. Nota-se que essa atividade é cerca de 7 vezes inferior a observada no presente estudo, sob FES (688,67 U/mL utilizando 3g de farelo de trigo e 60% de umidade). Esse resultado corrobora com a literatura, que vem demonstrando a vantagem dessa

técnica fermentativa que possibilita a produção de proteases de forma mais concentrada (BELMESSIKH et al., 2013; SANDHYA et al., 2005), enquanto na FS a elevada quantidade de água livre pode diluir as proteases produzidas, tornando o processo de downstream (recuperação e purificação do produto) mais demorado e caro (TAVANO, 2017).

O tipo de substrato foi a única variável a apresentar significância estatística, as demais, umidade e quantidade de substrato não tiveram efeito. Avaliar a umidade ideal é interessante pois permite estudar a redução no risco de contaminação (NASCIMENTO et al., 2015). O fato dessa variável não ter afetado os resultados pode estar relacionado a versatilidade dos fungos de colonizar diferentes ambientes (GONÇALVES et al., 2018; KJOLLER e STRUWE, 1982). A maior atividade observada sob 60% de umidade com farelo de trigo é uma tendência apontada na literatura, que quanto maior a umidade, maior a produção de enzimas, embora essa tendência possa variar a depender do tipo de substrato e espécie usada (DELABONA et al., 2013). Esse resultado está de acordo com o relatado por Chimbekujwo et al. (2020) para produção de proteases por *Aspergillus brasiliensis* usando cascas de laranja como substrato. Mamo et al. (2020) também mostraram resultados semelhantes, com um valor ótimo de 55% para a produção de protease na FES de *Aspergillus oryzae* usando farelo de trigo. Os resultados observados na FES com resíduo de café apresentaram tendência inversa a FES com farelo de trigo, tendo maior atividade em condições de menor umidade (20%), possivelmente devido ao maior teor de umidade ter reduzido a porosidade do substrato, limitando a transferência de oxigênio (DELABONA et al., 2013). Sathya et al. (2009) também relataram máxima produção de enzimas com teor de umidade de 20% usando *Mucor circinelloides* sob FES, também apontando o fator tipo de substrato e porosidade como determinante na umidade ideal.

A caracterização físico-química da protease é essencial para definir as suas possíveis aplicações biotecnológicas. Dentre as variáveis que influenciam na eficiência da catálise das proteases produzidas por fungos filamentosos estão temperatura e pH ótimo. Para isto foi avaliado o pH ótimo e temperatura ótima das proteases produzidas por *A. ochraceus* URM604 (Figura 5), como pode ser observado, os melhores resultados foram obtidos em atividades com pH alcalino (pH 8 e 9) e temperatura de 50°C. Em relação ao pH ótimo, Amaral et al. (2020)

defendem que proteases com propriedades alcalinas podem ser usadas na fabricação de couro, detergentes e indústria farmacêutica, estes apresentaram resultados similares ao obtidos neste trabalho ao fermentar *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279. Já em relação à temperatura ótima, os resultados obtidos corroboram com a literatura. Em trabalho realizado com *A. oryzae* e *A. flavipes*, atividade proteásica manteve-se alta até 50°C, havendo uma queda substancial da atividade em temperaturas mais altas, similarmente ao presente trabalho (NOVELLI et al., 2016). Souza et al. (2017) também apresentaram resultado semelhante, obtendo protease com atividade proteolítica ótima a 55°C utilizando o fungo *A. foetidus*. O declínio nas atividades observadas neste trabalho e nos acima citados possivelmente ocorre pela desnaturação da enzima frente a altas temperaturas.

8. CONCLUSÃO

Assim, conclui-se que é viável o uso de ambos os substratos para FES por *Aspergillus ochraceus* URM 604, especialmente o farelo de trigo, e que o fungo *A. ochraceus* apresenta potencial biotecnológico para produção de proteases, um grupo de enzimas de alto valor industrial, enfatizando o potencial do gênero *Aspergillus* como produtor dessas enzimas, além de demonstrar que o farelo de trigo e resíduos de café são substratos viáveis para essa produção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-TAHON, M. A.; ARAFAT, H. H.; ISAAC, G. S. Laundry detergent compatibility and dehairing efficiency of alkaline thermostable protease produced from *Aspergillus terreus* under solid-state fermentation. **Journal of Oleo Science**, v. 69, n. 3, p. 241–254, 2020.

AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.

AMARAL, Y. M. S. et al. Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning from *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 0, p. 1 &. 2020.

ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.** 21, 12-17, 1997.

BABU, C.R. et al. Wheat Bran-Composition and Nutritional Quality: A Review. **Advances in Biotechnology and Microbiology**. V.9 (1), 2018.

BATISTA, J. M. S. et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase - rich extract produced by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, 2020.

BELMESSIKH, A. et al. 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, Issue 3, p.377-385, 2013.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. Explorando proteínas e proteomas. In: **Bioquímica**. Cap. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª edição, p. 67-107, 2008.

CERDA, A.; MEJÍAS, L.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. **Bioresource Technology**, v. 243, p.1059–1068, 2017.

CHANGYOU-SHI, J. H. et al. Physicochemical Properties Analysis and Secretome of *Aspergillus niger* in Fermented Rapeseed Meal. **Plos One**, Apr 6;11(4), 2016.

CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. **Scientific African**, v. 8, p. e00398, 2020.

DELABONA, P. S. et al. Effect of Initial Moisture Content on Two Amazon Rainforest *Aspergillus* Strains Cultivated on Agro-Industrial Residues: Biomass-

Degrading Enzymes Production and Characterization. **Industrial Crops and Products**, 42, 236-242, 2013.

FERNANDES, A. S. et al. Impacts of discarded coffee waste on human and environmental health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 30–36, 2017.

FERREIRA, J. A. et al. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, p. 334–345, 2016.

FIORMARKETS. **Enzymes Market by Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, Others), Source, Application, Regions, Global Industry Analysis, Market Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2019 to 2026**. Report ID: 396080, 2019, 250p.

GINTHER, C.L. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephameycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.15, p.522–526, 1979.

GONÇALVES, V. N. et al. Biologia e Biotecnologia de Fungos. In. **Microbiologia Industrial**. Vol. 1, cap. 3, 2018.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.

KHADEMI, F. et al. Optimization of fungal rennet production by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* under solid substrate fermentation system. **IOSR J Pharm Biol Sci**, 5(2):115–121, 2013.

KJOLLER, A.; STRUWE, S. Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil. **Oikos**. 39(3):389–422, 1982.

LEQUART, C. et al. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. **Carbohydr. Res.** 319, 102-111, 1999.

MAMO, J. et al. Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v.4, Issue 1, 2017.

MURTHY, P. S. et al. Modulation of coffee flavor precursors by *Aspergillus oryzae* serine carboxypeptidases. **Lwt**, v. 113, n. June, p. 108312, 2019.

NASCIMENTO, T. P. et al. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, vol. 03, no. 03, p. 81–91, 2015.

NAIK, B. et al. Screening of agro-industrial waste and physical factors for the

optimum production of pullulanase in solid-state fermentation from endophytic *Aspergillus* sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.22, Article 101423, 2019.

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

OSMOLOVSKIY, A. A. et al. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 71, p. 62-66, 2016.

PESSOA-JR, A. et al. Rompimento celular. In. KILIKIAN, B. V. ; PESSOA-JR, A. (Coord.). **Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial**. 2ª ed. São Paulo: BLUCHER, p.67-103, 2020.

PURUSHOTHAMAN, K. et al. Aspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 199–212, 2019.

RAVIKUMAR, G. et al. A Protease from the Medicinal Mushroom *Pleurotus sajor-caju*; Production, Purification and Partial Characterization. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, 2, S411- S417, 2012.

ROCHA, F. T. B. **Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentoso *Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de café como substrato**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2018.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, Issue 8, p.2689-2694, 2005.

SATHYA, R. et al. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. **Biotechnol Bioprocess Eng** 14(6):788–794, 2009.

SILVA, O. S. et al. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaritii* URM4634. [s.l.] **Elsevier B.V**, v. 117, 2018.

SMITH, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p. 76-85. 1985

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

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52–71, 2017.

SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Braz. J. Microbiol.** vol.46 no.2, 2015.

SOUZA, P.M. et al. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. **Food and Chemical Toxicology**, 1-8, 2017.

TAVANO, O. L. Proteases. In: **Microbial Enzyme Technology in Food Applications**. Cap.9. CRC Press, 2017.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. Explorando proteínas e proteomas. In: **Bioquímica**. Cap. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6^a edição, p. 67-107, 2008.

ZAINOL, K.; AHMAD, F.; ZIN, Z. M.; MAMAT, H. Antioxidative properties and proximate analysis of spent coffee ground (SCG) extracted using ultrasonic-methanol assisted technique as a potential functional food ingredient. **Food Research**, 4 (3) : 636 644, 2020.

ANEXOS

TRABALHOS PUBLICADOS OU EM PROCESSO DE PUBLICAÇÃO
DERIVADOS DESTA MONOGRAFIA

VOLUME 1

**PESQUISAS EM TEMAS
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**EDNILSON SERGIO RAMALHO DE SOUZA
(EDITOR)**

CAPÍTULO 5

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus* spp. SOB FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

SANTOS, Amanda Lucena dos.¹
CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa.²
NASCIMENTO, Thiago Pajeú.³
BATISTA, Juanize Matias da Silva.⁴
NEVES, Anna Gabrielly Duarte.⁵
BRANDÃO-COSTA, Romero Marcos Pedrosa.⁶
PORTO, Ana Lúcia Figueiredo.⁷

DOI: 10.46898/rfb.9786599152481.5.



II Secap

Semana Científica do Agreste Pernambucano
2020

Educação, Ciência e Sociedade em tempo de mudanças: perspectivas e desafios

ANAIIS 2020

ANAIIS 2020

ANAIIS 2020

ANAIIS 2020

ISSN 2675-3731

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus* spp.
SOB FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO:
UMA REVISÃO

SANTOS, Amanda Lucena dos.¹
SANTOS, Sybelle Montenegro.²
CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa.³
BATISTA, Juanize Matias da Silva.⁴
NASCIMENTO, Thiago Pajeú.⁵
NEVES, Anna Gabrielly Duarte.⁶
SANTOS, Micheline Thais.⁷
BRANDÃO-COSTA, Romero Marcos Pedrosa.⁸
PORTO, Ana Lúcia Figueiredo.⁹

Páginas 2554 a 2557.