

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DIVA BRITO DE ANDRADE

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *ASPERGILLUS ORYZAE* EM FERMENTAÇÃO
SEMI- SÓLIDA UTILIZANDO FARELO DE TRIGO E CANOLA**

**IMPERATRIZ-MA
2013**

DIVA BRITO DE ANDRADE

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *ASPERGILLUS ORYZAE* EM FERMENTAÇÃO
SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO FARELO DE TRIGO E CANOLA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Crispim de Freitas

**IMPERATRIZ-MA
2013**

Jousiane Leite Lima
Bibliotecária CRB 13/700

Andrade, Diva Brito de

Produção de proteases por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando farelo de trigo e canola / Diva Brito de Andrade. - Imperatriz, 2013.

51 f.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriana Crispim de Freitas.

Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos, Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia de Imperatriz Maranhão (CCSST) / Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 2013.

1. Fermentação semi-sólida. 2. Proteases. 3. *Aspergillus oryzae*. I. Título.

CDU 633.15
A553p

DIVA BRITO DE ANDRADE

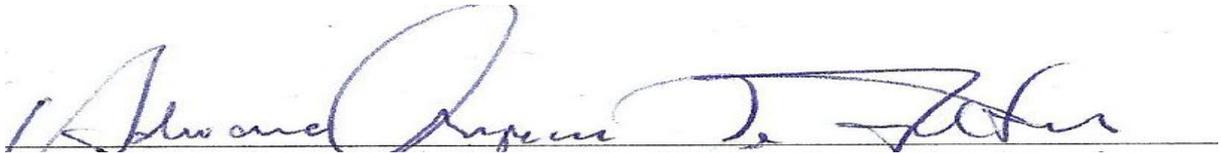
PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *ASPERGILLUS ORYZAE* EM FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO FARELO DE TRIGO E CANOLA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

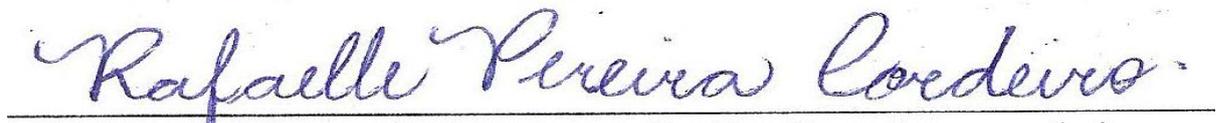
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Crispim de Freitas

Aprovada em 02/12/2013

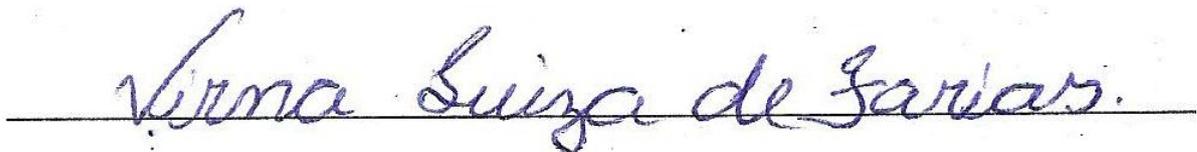
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Adriana Crispim de Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Prof.^a Msc. Rafaelle Pereira Cordeiro
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Prof.^a Dr.^a Virna Luiza de Farias
Instituto Federal do Ceará (IFCE)- Limoeiro do Norte

A minha mãe Raimunda, pelo incentivo,
confiança e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem sua presença jamais conseguiria cumprir esta etapa.

A minha mãe por seu exemplo de força, coragem, amor e dedicação, meu porto seguro, e dando suporte para que eu continuasse em frente, razão maior da minha conquista.

Aos meus irmãos em especial a Joelvan pela dedicação e cuidado, Joelma, Divina e Cristina pela força e incentivo todos esses anos.

Ao meu namorado Dimas Ribeiro por acreditar nos meus sonhos e fazer parte deles, além do amor paciência e dedicação todos esses anos.

Aos meus amigos, Jamile, Thaise Karoline, Lucy, Maiko, mesmo distantes estiveram sempre presentes na minha mente e em meu coração.

Aos amigos e colegas desta caminhada, por sempre me acalmar nos momentos difíceis, pelas noites de estudo e momentos divertidos. Em especial Fernando, Jakeline, Erivânia e Kássia.

A todos do grupo de pesquisa NUPFARQ do qual faço parte. Em especial ao professor doutor Paulo Roberto, que me orientou por três anos em projetos de iniciação científica. A Francisca Célia pela compreensão e ajuda nos momentos que mais precisei, além do exemplo de força e coragem e pelas brincadeiras nos momentos de estresse. A FAPEMA pelo apoio financeiro.

Aos técnicos de laboratório, Carlos e Elizabete, pela ajuda e apoio no laboratório.

A minha orientadora professora doutora, Adriana Crispim, pela orientação neste trabalho, apoio, paciência, amizade e pela maneira como orientou meus passos, contribuindo para o meu crescimento pessoal e intelectual.

A todos os professores da UFMA pelo convívio e todo conhecimento e ensinamentos transmitidos

A Embrapa Agroindústria Tropical, por enviar as linhagens de fungos e a torta de canola.

“Não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou que desistem deles”. (Augusto Cury)

RESUMO

As proteases são uma das enzimas mais importantes industrialmente. Estas são responsáveis pela digestão de proteínas, são biocatalisadores proteolíticos, têm sido utilizadas por muitos séculos em diversos ramos industriais como laticínios, panificação e detergentes. A fermentação semi-sólida desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, além de agregar elevado valor aos produtos. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o uso do farelo de trigo e torta de canola em cultivo semi-sólido com diferentes estirpes de *Aspergillus oryzae* para produção de proteases. As linhagens estudadas foram *Aspergillus oryzae* IV CCBP001, *A.oryzae* NRRL 2217, *A.oryzae* NRRL 2220, *A.oryzae* NRRL 1694, *A.oryzae* NRRL 5590. Para o meio com torta de canola a umidificação foi realizada com a adição de 40 mL de água para 100 g de farelo, já para o meio contendo farelo de trigo a proporção de água foi de 125 mL para 100g de torta. Foram transferidos 40 g do meio para erlenmeyer de 500 mL e autoclavados a 121°C por 15 minutos. A umidade dos meios foi determinada utilizando balança de determinação de umidade modelo RADWAG MAC 210. Os meios foram inoculados com suspensão de esporos, utilizando volume de 1mL e incubados em estufa a 30 °C durante 96 horas, sendo que as amostras foram retiradas a cada 24 horas. A atividade de protease foi realizada conforme descrita por Charney e Tomarelli (1947). O meio contendo farelo de trigo apresentou uma umidade de 57,47 %, já o meio com torta de canola a umidade foi de 34,43%. Todas as linhagens produziram proteases, a maior produção foi identificada quando utilizou-se a torta de canola com atividade de 135 U.g⁻¹ com o *A. oryzae* NRRL 1911, e a produtividade de 2,76 U.g⁻¹.h⁻¹ em 48 horas. No meio com farelo de trigo detectou-se atividade máxima de 121 U.g⁻¹ em 48 horas, e produtividade de 2,52 U.g⁻¹.h⁻¹ com a linhagem de *A. oryzae* 2220. Dessa forma, o cultivo semi-sólido é um potencial para a produção de proteases empregando torta de canola e farelo de trigo como substrato. Em termos de produtividade a linhagem NRRL 2220 obteve os melhores resultados em 48 horas e 24 horas fermentação em farelo de trigo e torta de canola respectivamente, quanto a atividade de protease a linhagem NRRL 1911 foi a maior produtora com 72 horas de fermentação em torta de canola.

Palavras- chave: Fermentação semi-sólida. Proteases. *Aspergillus oryzae*.

ABSTRACT

Proteases are most industrially important enzymes. These are responsible for the digestion of proteins and proteolytic biocatalysts have been used for centuries in various industries such as dairy, bakery and detergents. The semi-solid fermentation plays a prominent role in the use of solid waste, since by virtue of microbial growth, occurs to the synthesis of various compounds, besides adding high value to products. In this context, this study aimed to evaluate the use of wheat bran and canola pie in semi-solid with different strains of *Aspergillus oryzae* for production of proteases. The strains studied were *Aspergillus oryzae* IV CCBP001, *A.oryzae* NRRL2217, *A.oryzae* NRRL2220, *A. oryzae* NRRL1694, *A.oryzae* NRRL 5590. Means for canola meal humidification was performed by adding 40 ml of water to 100 g of bran, as for the wheat bran medium containing the ratio of water was 125 mL per 100g of pie. 40 g of the medium were transferred to a 500 mL Erlenmeyer flask and autoclaved at 121 °C for 15 minutes. Moisture was determined using the means of determining moisture balance model RADWAG MAC 210. The media were inoculated with the spore suspension using a 1 mL volume and incubated at 30 °C for 96 hours, samples were taken every 24 hours. Protease activity was performed as described by Charney and Tomarelli (1947). The media containing wheat bran had a moisture content of 57.47% since the moisture of canola meal was 34.43%. All strains produced proteases, the highest production was identified when used canola meal with activity of 135 U_g⁻¹ with *A. oryzae* NRRL 1911, since the yield was 2.76 U_g⁻¹·h⁻¹ in 48 hours. In medium with wheat bran was detected maximum activity of 121 U_g⁻¹ in 48 hours with productivity of 2.52 U_g⁻¹·h⁻¹ with the strain of *A. oryzae* 2220. Thus, the semi-solid cultivation is a potential for protease production employing canola pie and wheat bran as substrate. In terms of productivity the NRRL 2220 had the best results from 48 and 24 hours fermented wheat bran pie and canola respectively, and the activity of the protease NRRL 1911 strain was the largest producer in 72 hours of fermentation from canola pie

Keywords: Semi-solid fermentation. Protease. *Aspergillus oryzae*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Geral.....	14
2.2	Específicos.....	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Fermentação Semi-sólida	15
3.2	Fatores que influenciam na fermentação semi-sólida.....	16
3.2.1	Seleção do Substrato.....	17
3.2.2	Seleção do micro-organismo	18
3.2.3	Umidade e Atividade de água.....	18
3.2.4	Temperatura	19
3.2.5	pH.....	20
3.3	Fungos filamentosos.....	21
3.3.1	<i>Aspergillus oryzae</i>	22
3.4	Enzimas	24
3.4.1	Proteases.....	25
3.5	Torta de canola	27
3.6	Farelo de Trigo	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Matéria-Prima	30
4.2	Meios de fermentação.....	30
4.2.1	Determinação de umidade dos substratos	30
4.3	Micro-organismos	30
4.3.1	Manutenção das culturas	31
4.3.2	Ativação das culturas	31
4.3.3	Produção do Inoculo.....	32
4.4	Fermentação semi-sólida em frasco Erlenmeyer	33
4.5	Obtenção dos Extratos Enzimáticos	34
4.6	Atividade enzimática de protease.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
5.1	Umidade dos substratos.....	36
5.2	Produção de proteases.....	37

6	CONCLUSÃO.....	44
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	45
	REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de ativação das linhagens de fungos.....	32
Figura 2- Procedimento para produzir a suspensão de esporos	33
Figura 3- Fermentação dos meios em estufa.....	34
Figura 4- Preparo para obtenção do extrato enzimático.....	34
Figura 5- Procedimento para determinação da atividade enzimática de protease	35
Figura 6- Atividade de protease para diferentes linhagens de <i>Aspergillus oryzae</i> em torta de canola.....	38
Figura 7- Produtividade de proteases pelas diversas linhagens de <i>Aspergillus oryzae</i> em torta de canola.....	39
Figura 8- Atividade de protease para diferentes linhagens de <i>Aspergillus oryzae</i> em farelo de trigo.....	41
Figura 9- Produtividade de proteases pelas diversas linhagens de <i>Aspergillus oryzae</i> em farelo de trigo.....	42

1 INTRODUÇÃO

Os setores agro-industriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. Comprovou-se que esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrário do que acontecia no passado, quando resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo, atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agro-industriais (ROCHA, 2010).

A preocupação com a crescente geração de resíduos nas atividades agroindustriais no país e no mundo levou a pesquisa à reflexão acerca de métodos que podem ser criados visando o aproveitamento desses resíduos de forma a diminuir o impacto ambiental causado pelas atividades industriais. Atualmente os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir do reaproveitamento de recursos naturais e de resíduos da agroindústria que podem ser encontrados em abundância no Brasil, contribuindo assim, para a redução de problemas ambientais (MACIEL, 2006).

Nesse contexto, a fermentação semissólida desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, é um bioprocessos que oferece a possibilidade de se utilizar os mais diversos tipos de resíduos, os quais podem ser favoráveis ao crescimento de micro-organismos pela similaridade com ambientes naturais, contribuindo, também para a economia do processo. Além disso, a produtividade é geralmente maior quando comparado com outros processos (ROCHA, 2010).

A fermentação semi-sólida (FSS) consiste em uma técnica de crescimento de micro-organismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida) na qual o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz (PALMA,2003).

Dentre os principais produtos da fermentação semissólida figuram as enzimas, as quais são produzidas comercialmente principalmente a partir de micro-organismos, devido em grande parte à diversidade dos mesmos, facilidade e controle operacional e maior rendimento em relação aos processos extrativos de tecidos animais e vegetais. Os fungos filamentosos destacam-se na produção enzimática, pois são mais adaptáveis a ao processo semi-sólido, além de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (MACIEL,2006).

Vários grupos de micro-organismos são capazes de produzir proteases por processos de fermentação devido ao seu crescimento rápido. As proteases microbianas são importantes porque elas atuam sobre diversos substratos específicos, podendo ser usadas em diversas áreas de bioquímica e biotecnologia. As proteases são enzimas que ocupam uma posição central com respeito às suas aplicações, constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, sendo utilizada nas indústrias de detergente, carne e de laticínios, representando aproximadamente 60% do mercado total de enzimas (KUMAR et al., 2005).

Neste contexto, este trabalho propõe a utilização da torta de canola e farelo de trigo como substrato para produção de proteases por fermentação semi-sólida assim como selecionar a linhagem de fungos do gênero *Aspergillus* que apresente maior produção de protease nas condições determinadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o uso do farelo de trigo e a torta de canola na produção de proteases por fermentação semi-sólida utilizando diferentes linhagens de *Aspergillus oryzae*.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar uma linhagem de *Aspergillus oryzae* dentre as seis linhagens estudada potencialmente produtora de proteases.
- Avaliar qual substrato é mais eficiente para produção de proteases.
- Determinar o melhor tempo de fermentação para cada linhagem de *A. oryzae*

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fermentação Simi-sólida

A utilização da fermentação semissólida (FSS) e seus princípios para a produção de alimentos está relatada desde o ano 1000 a. C., na China, onde se produzia molho de soja. No ano 500 a.C., os chineses, iniciaram a produção de “Chiang”, que é obtido a partir da FSS e no Japão e sudoeste da Ásia, desde 1000 a.C esse tipo de fermentação já era utilizada (ARAÚJO, 2004).

O termo fermentação semi-sólida, ou fermentação em estado sólido (FSS), ou fermentação em meio semi-sólido é definido como o processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre no meio. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003).

Segundo Palma (2003), a fermentação semi-sólida consiste em uma técnica de crescimento de micro-organismos sobre partículas porosas úmidas. O interior dessas partículas funcionam como suporte ou matriz sólida na qual o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz.

Para Pandey (2003) na fermentação semissólida o substrato não fornece apenas os nutrientes para os micro-organismos, ele age também como suporte para o crescimento celular. Os substratos para FSS são, em geral, resíduos ou subprodutos agroindustriais. São recursos naturais produzidos em grandes quantidades, e se não forem reaproveitados podem tornar-se problemas ambientais. A estrutura desses materiais tem como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, e que servem como fonte de carbono para o crescimento dos micro-organismos.

O Brasil apresenta um grande potencial para a produção agrícola. Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos ou subprodutos tanto líquidos como sólidos. Esses resíduos são potenciais poluentes, ao descartar esses resíduos, há perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Dessa forma, a fermentação semi-sólidas e apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como de agregar valor a essas

matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, ácidos orgânicos, aromas, pigmentos e agentes de controle biológico de pragas, entre outros, e com isso contribuir para uma maior diversificação do agronegócio nacional (SANTANA,2012).

No Brasil desde 1986, uma série de projetos de pesquisa estão sendo realizados para a agregação de valor a produtos agrícolas tropicais e subprodutos por fermentação semi-sólida, estas pesquisas estão sendo desenvolvidas devido às grandes quantidades de resíduos gerados nos setores agro-industriais e de alimentos por este país (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A técnica de fermentação semissólida tem sido extensamente explorada devido às vantagens oferecidas no cultivo de fungos filamentosos. O grande potencial para o reaproveitamento desses resíduos é principalmente a produção de enzimas através de fungos filamentosos, os quais têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam capacidade de crescimento em baixos níveis de água e as condições de cultivo se assemelham com o habitat natural dos fungos. A matéria orgânica presente nos resíduos é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (GRAMINHA *et al.*, 2008; HASAN, 2002).

O processo semi-sólido apresenta algumas limitações, que devem ser consideradas. Sendo este um processo exotérmico, há dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano. Além disto, a heterogeneidade da mistura na FSS dificulta o controle do crescimento celular e de parâmetros como temperatura, pH, agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos (PALMA, 2003).

3.2 Fatores que influenciam na fermentação semi-sólida

Há aspectos importantes que devem ser considerados no desenvolvimento geral de um bioprocessos quando se utiliza fermentação semi-sólida. Esses fatores incluem seleção de micro-organismos e substratos adequados, otimização dos parâmetros de processo, isolamento e purificação do produto. Além disso, a umidade do meio, a temperatura e o pH são fatores que determinam o rendimento e a qualidade do produto final (MACEDO, 2008).

Segundo Pandey (2002), o controle de determinadas variáveis se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes. Nesse contexto, a observação desses fatores e o controle em relação a cada um deles oferece um melhor resultado no processo de fermentação semi-sólido.

3.2.1 Seleção do Substrato

Os substratos utilizados no processo de fermentação semi-sólida são simples, são usados geralmente resíduos agroindustriais ricos de carboidratos ou proteínas. Quando há necessidade é adicionado água ao meio, ou nutrientes para fornecer carbono e nitrogênio ou minerais (PANDEY, 2003).

A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Selecionar e definir a natureza do substrato sólido empregado na FSS depende de vários fatores, principalmente aqueles relacionados ao seu custo e eficiência. Neste contexto, a utilização de subprodutos agroindustriais torna-se um atrativo para este processo. A aplicação destes materiais em bioprocessos tornou-se importante sob o ponto de vista ambiental, reduzindo problemas relacionados ao seu manejo inadequado e consequentes danos ambientais. Além disso, seu baixo custo e grande disponibilidade fazem dos mesmos excelentes matérias-primas alternativas para vários processos industriais. (SILVA *et al.*, 2005).

As investigações sobre a seleção de um substrato adequado, na fermentação semissólida concentram-se principalmente em torno de culturas e resíduos agroindustriais tropicais. Os substratos sólidos utilizados são constituídos basicamente, de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares. Dentre estes estão as culturas como a mandioca, soja, beterraba, batata doce e sorgo. Nesse contexto, farelos, cascas, bagaços e outros são materiais também são considerados viáveis para a bio-transformação. São recursos naturais renováveis e produzidos em grandes quantidades, algumas vezes, faz com que se tornem um problema ambiental (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto à escolha do micro-organismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do micro-organismo favorece a formação dessas enzimas. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam entre os diferentes micro-organismos, assim como para diferentes enzimas (BRAVO *et al.*, 2000).

3.2.2 Seleção do micro-organismo

A seleção adequada do micro-organismo é um dos fatores mais importantes quando se trata de FSS. Pois estes devem possuir alta eficiência na conversão do substrato em produto, além de permitir a liberação rápida para o meio. Além disso, não devem produzir substâncias incompatíveis com o produto (PANDEY, 1992).

Segundo Costa (1996) os micro-organismos mais usados em FSS são os fungos filamentosos, por possuírem grande capacidade de crescer na ausência de água livre, versatilidade nas aplicações e facilidade de adaptação e manipulação.

Fungos filamentosos tais como *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais importantes utilizados na FSS, pois crescem naturalmente em frutas e grãos ou sobre resíduos agrícolas lignocelulósicos e amiláceos (NIGAM; SINGH, 1994).

3.2.3 Umidade e Atividade de água

Na FSS, a água está relacionada a dois parâmetros que são a atividade de água (a_w) e a umidade. A a_w é um parâmetro termodinâmico relacionado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato. Já a umidade, diz respeito à porcentagem de água na massa total do meio. Para o entendimento da FSS, a umidade tem se mostrado menos elucidativa que a atividade de água, pois esta última afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO *et al.*, 2005).

A água representa um papel primordial na FSS, pois é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. A umidade do meio e a atividade de água influenciam no processo semi-sólido, pois o micro-organismo possui um limite de água para desenvolver suas atividades metabólicas e seu crescimento. Uma pequena variação nos valores ótimos causa um grande distúrbio no crescimento e no metabolismo dos micro-organismos (PANDEY, 2003).

Na FSS a quantidade de água presente no meio é função da capacidade de retenção da fase sólida, esta quantidade deve ser suficiente para os micro-organismos se desenvolverem sem destruir a estrutura sólida ou reduzir a porosidade do substrato ou do suporte. O teor de água ideal para o crescimento celular deve formar uma película de água na superfície, facilitando assim a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio do meio

para o micro-organismo. Porém, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a aeração do meio e a dissipação de calor (GERVAIS; MOLIN, 2003).

O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o processo e varia de acordo com a natureza do substrato, tipo de produto final e necessidade do micro-organismo. A umidade representa a porcentagem de água na massa total de meio. O teor de umidade do substrato deve variar entre 12% até cerca de 80%. Abaixo do limite mínimo, os micro-organismos não se desenvolvem (SANTOS 2007).

Dessa forma, atividade de água a_w é um dos fatores que determina o micro-organismo a ser utilizado na fermentação semi-sólida. Os valores de a_w na ordem de 0,95 – 0,98 podem ser considerados típicos para os meios das fermentações semi-sólida. Este nível de a_w é ideal para o crescimento de fungos, especialmente os filamentosos (MITCHELL; KRIEGER; STUART, 2000).

Altos valores de umidade podem causar aglomeração das partículas sólidas, reduzindo a porosidade do meio e restringindo a difusão de gases. Os baixos valores de umidade permitem que substâncias alcancem concentrações inibitórias no meio, limitando o crescimento dos micro-organismos (MITCHELL;BEROVIC;KRIEGER, 2002).

3.2.4 Temperatura

A FSS é caracterizada por ser um processo exotérmico, pois grandes quantidades de calor são liberadas, dessa forma, a temperatura é diretamente proporcional à atividade metabólica do micro-organismo. Para os fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente na germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos. A temperatura é um fator crítico, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, nesse contexto, o calor gerado deve ser dissipado. Já que altas temperaturas não são favoráveis para o crescimento dos micro-organismos e para a formação do produto (PINTO *et al.*, 2006).

Em fermentação semissólida é essencial o controle da temperatura do sistema, na faixa propícia ao crescimento do micro-organismo, para possibilitar a eficiência do processo. As temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento dos micro-organismos e a outras reações bioquímicas. Já às temperaturas elevadas afetam a esporulação e o crescimento celular (HASAN *et al.*, 1998).

A maioria dos micro-organismos utilizados no processo semi-sólido são mesófilos, com uma temperatura ótima de crescimento em torno de 30°C. Nesse contexto, elevadas temperaturas do meio levam a uma redução no crescimento microbiano, ou até a

interrupção na produção de substâncias de interesse. A secagem do meio sólido é outro problema ocasionado por aumentos na temperatura, com diminuição dos níveis de umidade do meio. Isso pode conduzir à diminuição nos valores de a_w , tornando-os inibitórios ao crescimento celular. Dessa forma, o controle da temperatura durante o processo fermentativo precisa ser rigoroso, é o maior problema encontrado na FSS. Para tanto, a escolha de biorreatores e condições operacionais adequados é fundamental para a boa condução do processo (RODRIGUES, 2005).

A produção de enzimas depende da temperatura, mas nem sempre a temperatura ótima da síntese de uma determinada enzima coincide com a temperatura ótima de crescimento de micro-organismo. É preciso considerar que a temperatura ótima da atividade de uma enzima para um substrato pode diferir da temperatura ótima de crescimento e daquela da síntese enzimática (FEDATTO, 2004).

3.2.5 pH

O pH durante o processo semi-sólido é um dos parâmetros mais críticos, no entanto dificilmente se conseguirá controlá-lo devido a heterogeneidade e a consistência do material (DEL BIANCHI, 1990).

É um dos parâmetros que deve ser avaliado para a escolha do micro-organismo a ser utilizado, já que existem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada micro-organismo. Geralmente os fungos preferem pH baixo (4,5 – 6,0) e as bactérias pH próximos à neutralidade (6,5 – 7,0). O pH do meio afeta o metabolismo dos micro-organismos por alterar sua produção enzimática. Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos semi-sólidos o controle e monitoramento deste parâmetro durante a FSS, não é fácil de ser realizado (PERAZZO NETO, 1999; PANDEY, 2003).

No entanto, muitos meios de cultivo utilizados em FSS apresentam uma boa capacidade tamponante, diminuindo a necessidade de controle desta variável (PALMA, 2003). Lonsane *et al.*(1985) mencionam que em cultivos em estado sólido, o monitoramento e o controle desta variável geralmente não são feitos, devido as dificuldades técnicas, e este problema muitas vezes é evitado com o uso de substratos com elevada capacidade tamponante.

3.3 Fungos filamentosos

Os fungos se apresentam em grande variedade de formas e tamanhos. Os cogumelos, o fermento biológico usado na culinária e o bolor de pão são alguns fungos bem conhecidos no cotidiano. Estima-se que existam em torno de 1,5 milhões de espécies de fungos, mas apenas cerca de 72 mil já foram descritas. Os fungos vivem em praticamente todos os ambientes, mas principalmente onde há matéria orgânica em abundância, já que, diferentemente das plantas precisam de uma fonte externa de alimento. Nas florestas tropicais, uma simples folha está sujeita à invasão de milhares de esporos de fungos, e estes podem se desenvolver na superfície dos órgãos das plantas ou penetrar nos tecidos (OKI; FERNANDES, 2008).

Representam o grupo mais importante de micro-organismos utilizados em processo semi-sólido devido suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. Apresentam crescimento com formação de hifas que favorece a colonização do meio, apresentam tolerância à baixa atividade de água e altas pressões osmóticas (RAIMBAULT, 1998; DEL BIANCHI, 1990).

Em substratos sólidos podem crescer diferentes tipos de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A facilidade de crescimento em meios com baixos valores de pH e pequena quantidade de água, além de possuírem a capacidade de produzir esporos, o que facilita o preparo do inóculo e a estocagem das células na forma vegetativa por longos períodos de tempo, são características que fazem com que os fungos filamentosos sejam mais atrativos para utilização na fermentação semissólida (MITCHELL *et al.*, 2000; DURAND, 2003).

A produção de enzimas por fungos filamentosos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular da umidade do meio de cultura, tipo de fonte de nutrientes, temperatura de cultivo, além de outros fatores (COUTO, 2006). Espécies do gênero *Aspergillus* produzem grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas na biotecnologia (KNUF; NIELSEN, 2012).

Na fermentação semi-sólida, os fungos representam os micro-organismos mais promissores, pela variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento na forma de hifas que permite a eles maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima, sendo a espécie de *Aspergillus Níger* de grande destaque (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Mais de 200 espécies de fungos do gênero *Aspergillus* podem ser encontradas na natureza. São fungos aeróbicos, amplamente utilizados na produção de alimentos e produtos como ácidos glucônico, cítrico e gálico (LIMA, 2012).

3.3.1 *Aspergillus oryzae*

O *Aspergillus oryzae* é um fungo filamentosos utilizado na culinária e na produção de bebidas alcoólicas (LIMA, 2013). Não produz aflatoxinas e sua longa história de uso na indústria alimentar provou sua segurança. O *A. oryzae* tem genes envolvidos no metabolismo, particularmente aqueles para a síntese secundária dos metabólitos. O *Aspergillus oryzae* tem a maior extensão de genes hidrolíticos, codificados como proteases alcalinas, ácidas e neutras (MACHIDA *et al.*, 2005).

O *Aspergillus oryzae* produz proteases ácidas, neutras e alcalinas. As proteases fúngicas são ativas numa faixa ampla de pH que vai de 4 a 11 e exibem ampla especificidade para o substrato, no entanto possuem baixa tolerância ao calor (RAO *et al.*, 1998).

Estirpes de *Aspergillus oryzae* são conhecidas na literatura por se desenvolver em culturas em estado sólido, em especial relacionadas à culinária japonesa. Além disso, a espécie é descrita como sendo capaz de produzir e secretar grande número de proteínas, em especial enzimas, fato também apontado pela análise do genoma do micro-organismo. Além disso, sabe-se que o *A. Oryzae* secreta um número maior de proteínas quando crescido em estado sólido quando comparado ao crescimento em estado líquido (MACHIDA *et al.*, 2008).

O genoma de *A. oryzae* foi completamente sequenciado por Machida (2005) e colaboradores. Quando comparado com o genoma de duas outras espécies do gênero *Aspergillus*, *A. nidulans* e *A. fumigatus*, foi constatado que o genoma de *A. oryzae* é de 25 a 30% maior do que das outras duas espécies citadas. Este aumento é notado principalmente em COGs (*cluster of orthologous group*) relacionados ao metabolismo, em especial ao metabolismo secundário.

Estudos realizados por Chutmanop (2008) e colaboradores estudaram a produção de proteases por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando farelo de arroz tailandês, verificou-se que o teor de umidade inicial teve um efeito mais forte sobre a produção de proteases do que pH inicial. A maior atividade de protease foi de 1200U.g⁻¹ alcançada dentro de 4 dias de fermentação, com uma proporção de 0,33 de farelo de trigo e teor de umidade de 50%, o pH inicial de 7,5 e a temperatura de incubação de 30 °C. A adição

de farelo de trigo foi necessária devido a porosidade do farelo de arroz tailandês ser insuficiente.

A produção de proteases e amilases foi investigada, utilizando o *Aspergillus oryzae* o koji como substrato, contendo 60% de soja e farelo de trigo, com o objetivo de aplicar esse substrato para acelerar a produção de molho de peixe que dura em torno de 2 anos. Verificou-se que atividades de proteases neutras e alcalinas de koji aumentou rapidamente após 24 horas de fermentação. Após 48 horas de fermentação, o koji de soja apresentou a maior atividade protease neutra a 84,38 U/g de peso seco. No entanto, a atividade da protease alcalina foi levemente aumentada e a atividade foi menor do que protease neutra. A maior atividade protease alcalina foi encontrada no final da fermentação período em 41,35 U/g de peso seco. Dessa forma os autores concluíram que o koji de soja fermentado a 48 horas pode ser utilizado como uma fonte de enzima ativada para acelerar a fermentação molho de peixe (CHANCHAROONPONGA;SHEUB;HSIEHB, 2012).

Castro, Freitas e Pinto (2009) investigaram a produção de protease por *Aspergillus oryzae* IV em fermentação semissólida utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato (torta de canola, torta de girassol, farelo de trigo, película da casca da castanha de caju, farelo de soja e farelo de algodão) e avaliaram o efeito da adição de diferentes volumes de água sobre a síntese da enzima. Os autores verificaram que dentre os resíduos avaliados, o farelo de algodão permitiu uma maior síntese enzimática, alcançando 290,9 U.g⁻¹ de protease em 48 horas de fermentação, e o meio formulado continha 25mL de água para 100g de resíduo. Eles concluíram também que a adição de volumes maiores de água aos substratos prejudicou a produção da enzima pelo micro-organismo com exceção do farelo de trigo que aumentou a síntese da enzima com maiores volumes de água.

Sabe-se que para a produção de proteases, a presença de um alto teor de proteínas no meio de cultivo, pode servir como indutor para a produção dessa enzima pelo micro-organismo. Dessa forma Castro e Pinto (2009) estudaram a influência da composição do substrato utilizado. O estudo foi realizado com o micro-organismo *A. Oryzae* IV e como substrato tortas de girassol: uma com alto teor de lipídeos e a outra submetida a um processo de deslipidificação parcial. Os resultados que foram encontrados mostraram que a síntese de proteases por *A. oryzae* IV em fermentação semi-sólida foi influenciada pela composição físico-química dos resíduos, onde a torta de girassol submetida ao processo de deslipidificação mostrou-se mais adequada para a síntese de proteases, alcançando produção máxima de 270 U.g⁻¹ em 48 horas de fermentação.

3.4 Enzimas

Quimicamente, as enzimas são proteínas com uma estrutura química especial, contendo um centro ativo, denominado apoenzima, e um grupo não protéico, denominado coenzima. As enzimas são substâncias coloidais termolábeis de peso molecular relativamente elevado, formadas por moléculas de proteínas composta de cadeias entrelaçadas de aminoácidos. Enzimas são, portanto, biocatalisadores das reações orgânicas. A velocidade da reação catalisada é proporcional à concentração de enzimas. As enzimas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes setores industriais, destacando-se as indústrias de alimentos e bebidas, têxtil, papelreira e farmacêutica, devendo-se isto, principalmente, a algumas vantagens operacionais como especificidade de reação e alta eficiência de conversão, com pouca formação de metabólitos secundários. Destaca-se, ainda, que as reações enzimáticas, via de regra, acontecem em condições brandas de temperatura e pH, o que significa, para as indústrias, uma redução nos custos operacionais (PALMA, 2003).

A produção mundial de enzimas é um crescente domínio da biotecnologia, com vendas anuais de aproximadamente 2 bilhões de dólares. Nos últimos 40 a 50 anos o uso de fungos filamentosos para produção industrial de enzimas cresceu rapidamente. Entre esses, os fungos do gênero *Aspergillus* são os mais empregados na produção de enzimas extracelulares (LIMA, 2012).

A aplicação industrial de enzimas é determinada pela sua atividade, especificidade, estabilidade de armazenamento, disponibilidade e custos. A atividade de uma enzima é influenciada pela sua concentração e do substrato, concentração de cofatores, presença e concentração de inibidores, potencial iônico, pH, temperatura e tempo de reação (FREITAS, 2009).

Uma das características notáveis das enzimas quando comparadas com catalisadores químicos são a especificidade pelo substrato e a especificidade em promover somente uma reação bioquímica com seu substrato, em condições brandas de reação e menores problemas ambientais e toxicológicos. Elas são divididas em seis grandes classes, baseadas no tipo de reação que elas catalisam. As seis classes representativas das enzimas industriais são: Oxireduases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (SANTOS, 2007).

O desenvolvimento do processo de produção de enzimas, em escala industrial, de qualidade satisfatória e custos que permitam sua comercialização, requer um trabalho

laborioso, caro e interdisciplinar. Faz-se necessário o conhecimento técnico-econômico da relação entre linhagem, o meio de produção, o processo de fermentação, os métodos de recuperação e a demanda de mercado (ROCHA,2010).

A produção de enzimas por processos fermentativos é um vasto campo da biotecnologia no qual ainda tem muito para se conhecer e explorar. Estes processos viabilizam economicamente a produção de enzimas em quantidades industriais. Sistemas de fermentação semi-sólida (FES) e líquida ou submersa (FSM) têm sido utilizados para produção de proteases (SANDHYA *et al.*, 2005)

3.4.1 Proteases

Dentro da classe das Hidrolases, encontra-se a subclasse das enzimas proteolíticas ou proteases, enzimas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas e peptídeos(RAO *et al.*, 1998). Possuem um importante papel em todos os processos fisiológicos, indo da quebra geral de proteína para nutriente à regulação da morte celular programada (POZA *et al.*, 2001).

As proteases podem ser empregadas em vários ramos industriais, dentre eles pode-se citar: Panificação para hidrolisar o glúten, indústria de carne no processo de amaciamento, indústria de queijos no desenvolvimento de sabor, aroma e textura dos mesmos. Além disso, podem ser usadas em formulações para uso hospitalar para digerir e dissolver resíduos orgânicos. Na panificação, também são utilizadas para hidrolisar o glúten para a obtenção da maciez da massa (ROCHA, 2010).

A maior aplicação de proteases ocorre na indústria de detergentes, processamento de carne e queijo, recuperação de prata em filme fotográfico, produção de medicamentos, processamento de resíduos proteínicos e síntese de peptídeos (ANDRADE *et al.*, 2002).

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, sendo utilizadas em diversos segmentos da indústria e representam aproximadamente 60% do mercado total de enzimas (KUMAR *et al.*, 2005).

As proteases constituem um grupo muito grande e complexo de enzimas, que diferem em propriedades, tais como especificidade de substrato, sítio ativo e mecanismo catalítico, pH e temperatura ótima perfil de estabilidade. A especificidade da enzima proteolítica é regulada pela natureza do aminoácido e outros grupos funcionais a ser hidrolisado. As proteases são presente em todos os seres vivos e desempenham um papel importante em condições fisiológicas normais e anormais, catalisando várias reações metabólicas. Este grupo é significativa a medida que não só governa reações proteolíticas,

mas também regula várias cascatas enzimáticas, o que acaba levar a todas as reações metabólicas envolvendo a desagregação de gorduras e hidratos de carbono (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

As proteases podem ser de origem animal, microbiana e vegetal, as primeiras são aquelas preparadas em grandes quantidades. Sua produção geralmente depende da disponibilidade de gado para o abate. As principais proteases de origem animal são tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e quimosina (RAO *et al.*, 1998).

As proteases de origem vegetal são dependentes de alguns fatores, como a disponibilidade de uma grande área para o cultivo e as condições climáticas para o ótimo crescimento. As proteases vegetais mais conhecidas são a papaína e a bromelina, das quais a papaína tem longa história de uso. São ativas em pH 5,0 a 9,0 e estáveis às temperaturas de 80°C a 90°C (RAO *et al.*, 1998).

As proteases de origem microbiana representam a principal fonte de proteases comercializadas, devido à sua ampla diversidade bioquímica. De maneira geral, os micro-organismos são preferidos frente a outras fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento, ao pequeno espaço requerido para seu cultivo e à grande variedade de atividades catalíticas que dispõem (RAO *et al.*, 1998). As proteases microbianas são importantes porque elas atuam sobre diversos substratos específicos, podendo ser usadas em diversas áreas de bioquímica e biotecnologia (BARATA *et al.*, 2002).

A produção de enzimas proteolíticas microbianas por processo fermentativo geralmente são extracelulares, que podem ser produzido tanto por fermentação submersa e fermentação semi-sólida. São a única classe de enzimas que ocupam uma posição central devido às suas aplicações fisiológicas e comercial. Sua grande diversidade, e especificidade e sua faixa de ação têm atraído a atenção de biotecnologistas no mundo (POZA *et al.*, 2001).

Existe um grande grupo de micro-organismos que sintetizam proteases durante a fermentação devido ao seu crescimento rápido, com aplicação em diversos campos industriais. Micro-organismos também são preferidos em relação a plantas e animais, devido à sua facilidade de manipulação genética, gerando novas enzimas com uma característica específica ou simplesmente para superprodução da enzima (POZA *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 1998).

3.5 Torta de canola

A canola (*Brassic napus L. e Brassica campestris L.*) é uma oleaginosa pertencente a família das crucíferas e ao gênero *Brassica*. O nome vem de CANadianOil, LowAcid (canola) e encontra-se oficialmente definida nas normas canadenses de alimentos e sementes (TOMM, 2007).

Em 1980, os direitos de registro da marca foram transferidos para o *Canola Council of Canadá* e, em setembro de 1986, foi definido que os requisitos para o uso da marca exigiam que o óleo tivesse menos de 2% de ácido erúico e os componentes sólidos da semente deviam conter menos de 30 μ moles de glucosinato por grama (ALBUQUERQUE, 2006).

A canola é uma oleaginosa de inverno, originada do melhoramento genético da colza, e que contém baixos níveis dos fatores tóxicos, ácido erúico e glucosinatos. É indicada para rotação de culturas, paradiiversificação agrícola e como cobertura vegetal para proteger o solo durante o inverno. Dela se extrai o óleo de canola, que vem a ser o produto mais saudável para esta categoria pelos baixos teores de gordura saturada (BERTOL; MAZZUCO, 1998).

A canola vem sendo cultivada no Brasil desde 1974, as regiões de destaque na produção de canola são: Sul e Centro-Oeste. A espécie cultivada no país é uma seleção geneticamente modificada da colza (*Brassic napus*). É uma oleaginosa da família crucífera que possui de 40-46% de óleo no grão, e de 34-38% de proteína no farelo. Além do alto teor de óleo, apresenta excelente qualidade pela composição em ácidos graxos. O interesse dos produtores no plantio de canola tem crescido em função da garantia de compra e preço pago, constituindo-se alternativa de cultura de inverno (TOMM, 2007).

As plantações brasileiras de canola concentram-se, principalmente, no Rio Grande do Sul e Paraná, mas também com algumas lavouras no Mato Grosso do Sul e Santa Catarina. A cultura vem apresentando um leve aumento de área e produção para a safra de 2014. O aumento de área e produção, principalmente no Rio Grande do Sul, foi motivada por um clima mais favorável na época do plantio. No “Oitavo Levantamento de Safra”, realizado pela Conab, em maio de 2013, estimou-se uma produção para a safra 2012/2013 em torno de 60,5 mil toneladas, devendo provavelmente ficar em 16,3% maior que a safra de 2012, com área estimada em 43,8 mil hectares aumento de 3,3%. Quanto à produtividade é previsto 1.381 Kg/ha, com aumento de 12,6%, se comparada com a da safra 2011/2012 (CONAB, 2013).

Segundo a EMBRAPA Trigo (2007), a Europa é onde se concentra a principal e maior produção de canola mundial, com destaque para a Alemanha, que é a principal produtora de biodiesel. Com base na canola (*rape seed*), os alemães estruturaram um importante programa de produção de óleo diesel vegetal que, em 2007, foi responsável por gerar um milhão de toneladas do combustível. A canola é a terceira oleaginosa mais importante no agronegócio mundial. Desta forma, ela é cultivada extensivamente na Europa, Canadá, Ásia, Austrália e Estados Unidos. Duas espécies dominam a produção: *Brassicinapus* e *Le Brassica rapa L.*

A torta de canola é um subproduto do processo de extração do óleo de canola, apresentando como uma excelente fonte de proteína, 34 a 38%, e constituindo um excelente suplemento proteico na formulação de rações para bovinos, suínos, ovinos e aves (OLIVEIRA; FURTADO, 2001).

As características físicas e químicas da torta de canola durante o processo de FSS, para síntese de proteases foram determinadas por Freitas (2009) e colaboradores. Houve uma redução no teor de proteína durante o processo, no início do processo apresentou valor de 49,05% e em 96 h de 42,08% sendo utilizado pelo micro-organismo para crescimento e formação da enzima. Houve uma diminuição da umidade, no início encontrava-se em torno de 38% e ao final obteve-se uma umidade de 35%, este fato ocorreu devido ao ressecamento do meio durante o período fermentativo. Os valores de atividade de água também decresceram ao longo do período fermentativo. A concentração de amido também foi diminuída durante o processo fermentativo, segundo os autores este componente foi utilizado para formação da biomassa microbiana. O pH do meio sofreu um aumento durante a fermentação, apresentou valor de 5,93 em 0 h e 7,0 em 96 horas, este aumento relatado pelos autores pode estar relacionado as características da enzima sintetizada pelo fungo em estudo.

A Torta de canola foi usado como substrato para síntese de proteases por Freitas (2009), no estudo foi testado às linhagens de *Aspergillus Níger* e *Aspergillus oryzae* IV. Todas as linhagens estudadas produziram proteases. A maior atividade foi obtida em 48 horas com *Aspergillus oryzae* IV, sendo de aproximadamente 60 U.g⁻¹ durante todo o processo fermentativo. Quanto a adição de água a melhor produção foi obtida nos meios com proporção de 40 mL de água para 100 g de torta na temperatura de incubação de 20°C.

3.6 Farelo de Trigo

O trigo ocupa o primeiro lugar em volume de produção mundial, sendo aplicado a uma enorme diversidade de produtos. Devido à importância mercadológica e à vasta aplicabilidade do trigo, pesquisas são cada vez mais incentivadas, com o propósito de implementar melhorias focadas em determinadas áreas de atuação, como nutrição e saúde, pesquisa e desenvolvimento de novos produtos e ciência e tecnologia (SCHEUER *et al.* 2011).

A palavra trigo provém do vocábulo latino *triticum*, que significa quebrado, triturado, numa referência à atividade que se deve realizar para separar o grão de trigo da camada que o reveste. O termo trigo destina-se tanto à planta como às sementes comestíveis dela originadas (LÉON, 2007).

O farelo de trigo é o principal e mais abundante subproduto da moenda de grãos e consiste em um recurso alimentar renovável e pouco explorado (YUAN; WANG; YAO, 2008). O farelo de trigo é retirado do grão no processo de refinamento industrial, não se caracteriza como fonte de lipídios porque esses se encontram fortemente concentrados no gérmen, que é separado durante o processo de beneficiamento do cereal. Entretanto, apresenta em sua composição 14% de proteínas, 6% de cinzas, 60% de carboidratos, além de fibras e compostos funcionais (SILVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2007).

O farelo de trigo é constituído de tecidos botânicos distintos, exteriores ao núcleo do trigo, o qual é representado pelo pericarpo e as camadas superficiais da aleurona. A parte mais externa é o pericarpo, que recobre toda a semente e é composta por 6 camadas que são a epiderme, hipoderme, remanescentes da parede celular ou células finas, células intermediárias, células cruzadas e células tubulares). O pericarpo é rico em fibras e minerais (ABITRIGO, 2008). A composição físico-química do farelo de trigo é apresentada na Tabela 1.

Tabela1- Composição físico-química do farelo de trigo

Composição (g/100g)	Conteúdo (%)
Umidade	9,00
Cinzas	6,81
Proteínas	14,48
Lipídios	4,26
Fibra Alimentar	45,24

Fonte: Sant'Ana *et al* (2000)

Segundo Cho, Clark e Uribe-Saucedo (2004), o farelo de trigo comercial geralmente contém uma fração do embrião do trigo e uma pequena quantidade de endosperma, visto que é difícil realizar uma separação limpa, ou seja, com 100 % de eficiência. O farelo representa em torno de 12 a 15% do grão de trigo e é composto de cerca de 45 a 50% de fibra alimentar, sendo por volta de 95% desta, insolúvel.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-Prima

A torta de canola foi cedida gentilmente pela Embrapa Agroindústria Tropical. O farelo de trigo foi adquirido no comércio local.

4.2 Meios de fermentação

Para a umidificação da torta de canola utilizou-se uma proporção de 100 g de farelo para 40 mL de água destilada. Já para o farelo de trigo por ser muito higroscópico utilizou-se a proporção de 100g de farelo para 125 mL de água destilada. Utilizou-se estas proporções devido a estudos realizados por Freitas (2013).

4.2.1 Determinação de umidade dos substratos

A umidade do farelo de trigo e torta de canola foi determinada utilizando a balança de determinação de umidade por infravermelho RADWAG MAC (2010). A umidade dos meios foi determinada após esterilização, que corresponde ao tempo zero de fermentação.

4.3 Micro-organismos

Inicialmente, realizou-se seleção de linhagens de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, de modo a definir a melhor produção de proteases entre as existentes na coleção de trabalho do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical e na Coleção de Culturas ARS (Serviço de Pesquisa Agrícola) dos Estados Unidos.

Tabela 2- Linhagem dos fungos do gênero *Aspergillus*

Código	Espécie	Origem	Instituição
IV CCPB001	<i>Aspergillus oryzae</i>	Desconhecida	Embrapa Agroindústria Tropical
NRRL2220	<i>Aspergillus oryzae</i>	Coleções de culturas ARS	Embrapa Agroindústria Tropical
NRRL5590	<i>Aspergillus oryzae</i>	Coleções de culturas ARS	Embrapa Agroindústria Tropical
NRRL1911	<i>Aspergillus oryzae</i>	Coleções de culturas ARS	Embrapa Agroindústria Tropical
NRRL 2217	<i>Aspergillus oryzae</i>	Coleções de culturas ARS	Embrapa Agroindústria Tropical
NRRL1694	<i>Aspergillus oryzae</i>	Coleções de culturas ARS	Embrapa Agroindústria Tropical

CCPB-Coleções de culturas agroindustriais NRRL- Laboratório de Pesquisa Regional do Norte (USDA)

4.3.1 Manutenção das culturas

Esporos de cada linhagem foram assepticamente transferidos para tubos (10×120 mm) com rosca, contendo solo estéril e estocados a -18°C. Os esporos de *Aspergillus* armazenados em solo estéril e sob condições de congelamento (-18°C) foram reativados em três etapas.

4.3.2 Ativação das culturas

O primeiro repique que consistiu na transferência dos esporos armazenados em solo estéril a -18 °C para um ágar batata dextrose inclinado. No segundo repique, os fungos do primeiro repique foram transferidos para um novo ágar batata dextrose inclinado. Para o terceiro repique os fungos do segundo repique foram transferidos para um meio com farelo de trigo

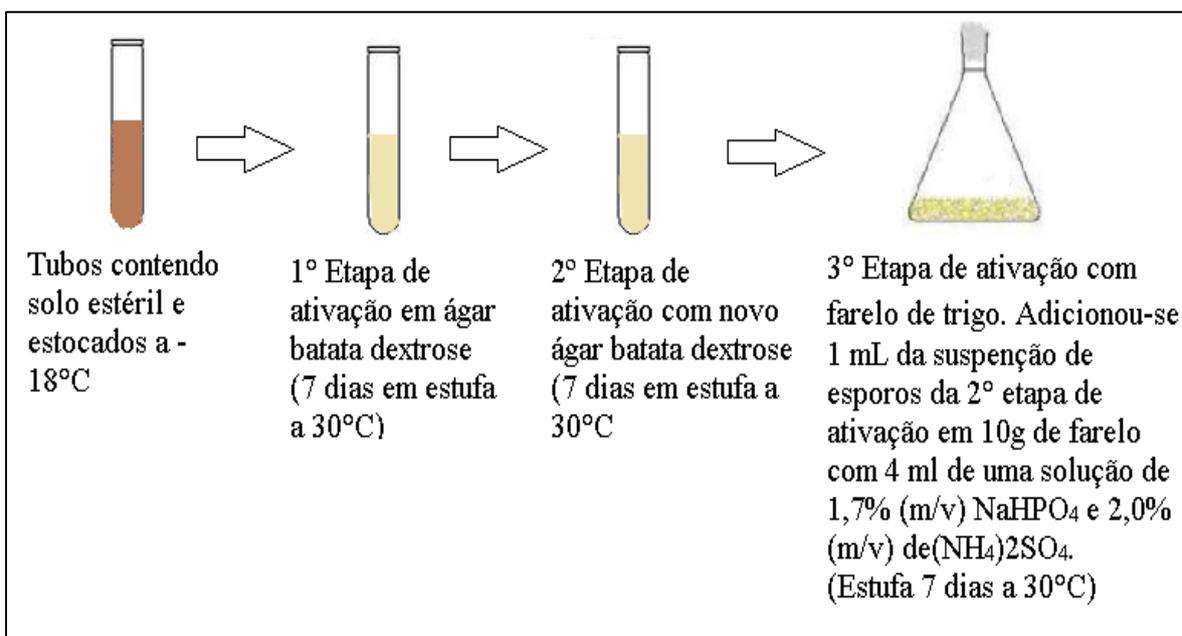
Para a primeira etapa de ativação (primeiro repique), preparou-se o meio de cultura com ágar batata dextrose, este meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos, em seguida foi transferiu-se o ágar para tubos de ensaio que foram inclinados para obter maior

área de crescimento dos fungos. Posteriormente as linhagens foram inoculadas e incubadas a 30°C por 7 dias em estufa, após este período foram conservados a 4°C por até 3 meses.

Na segunda etapa de ativação (segundo repique), as linhagens da primeira etapa de ativação foram transferidas para um novo ágar batata dextrose inclinado e incubadas a 30°C por 7 dias em estufa.

A última etapa de ativação (terceiro repique) visou à produção dos esporos utilizados na inoculação do meio de fermentação. Para tanto preparou-se um meio constituído de 10,0 g de farelo de trigo e 4 mL de uma solução 1,7% (m/v) NaHPO_4 e 2,0% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O meio foi esterilizado a 1 atm a 121°C por 15 minutos. Em seguida os esporos da segunda etapa de ativação foram suspensos mediante a adição de 5 mL de água estéril nos tubos de ensaio. O volume de 1 mL da suspensão de esporos foi utilizado como inoculo no meio com farelo de trigo em frascos Erlenmeyers de 125 mL, o meio inoculado foi incubado a 30 °C por 7 dias. Após a esporulação em farelo de trigo, o inoculo foi conservado a 4°C, para ser utilizado nas fermentações. A Figura 1 representa as três etapas de ativação dos fungos.

Figura1- Esquema de ativação das linhagens de fungos

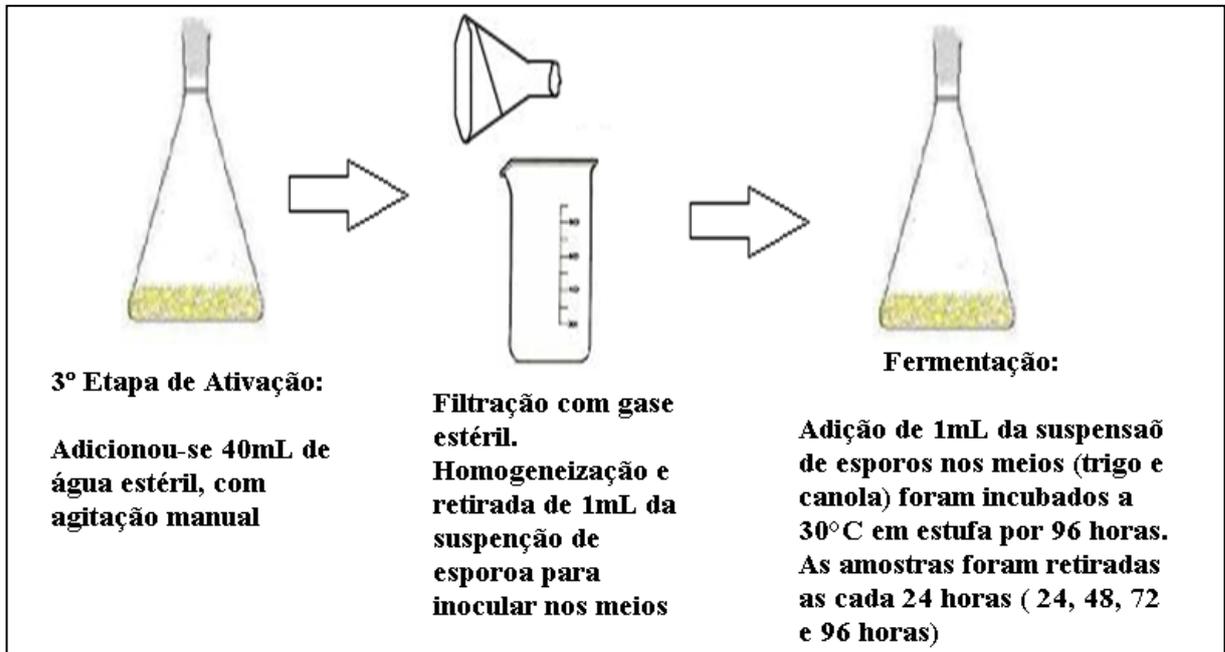


4.3.3 Produção do Inoculo

Para produzir o inoculo adicionou-se 40 mL de água estéril no meio com farelo de trigo (3º etapa de ativação), em seguida realizou-se uma agitação manual com bastão de vidro

por 5 minutos para que os esporos fossem transferidos para a água. Posteriormente realizou-se uma filtração com gase estéril e 1 mL da suspensão de esporos foi adicionado aos meios para iniciar o processo fermentativo. A Figura 2 apresenta as etapas para produção de inoculo.

Figura 2- Procedimento para produzir a suspensão de esporos



4.4 Fermentação semi-sólida em frasco Erlenmeyer

A massa de substrato foi colocada em um béquer de polipropileno, adicionou-se lentamente água destilada aos substratos nas proporções citadas no item 4.2. Posteriormente, foram transferidos 40 g do meio umidificado para Erlenmeyer de 500 mL, diâmetro interno de boca de 50 mm, e levado à autoclave a 121 °C por 15 minutos. Foram reparados quatro Erlenmeyers para os tempos de fermentação de 24, 48, 72 e 96 horas. Os meios foram inoculados com suspensão de esporos, com o volume de 1mL e incubados em estufa a 30 °C durante 96 horas como mostra a Figura 3. Amostras foram retiradas a cada 24 horas.

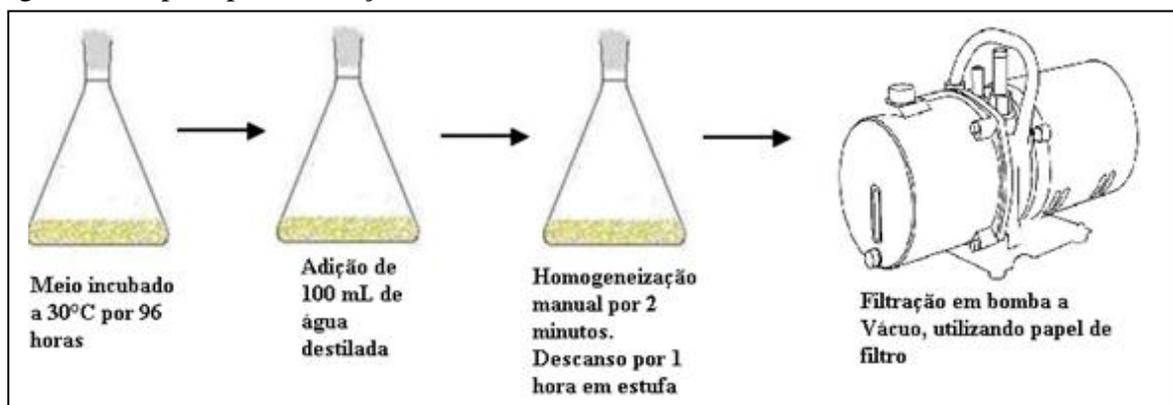
Figura 3- Fermentação dos meios em estufa



4.5 Obtenção dos Extratos Enzimáticos

A enzima foi extraída do meio fermentado, pela adição 100 mL de água destilada e homogeneização manual por 2 minutos. Logo após a homogeneização os erlenmeyers foram novamente incubados em estufa a 30 °C por um período de 1 hora. Em seguida foi realizada uma filtração a vácuo utilizando papel de filtro qualitativo e o sobrenadante utilizado na determinação da atividade enzimática. A Figura 4 apresenta um esquema ilustrativo da extração enzimática.

Figura 4- Preparo para obtenção do extrato enzimático

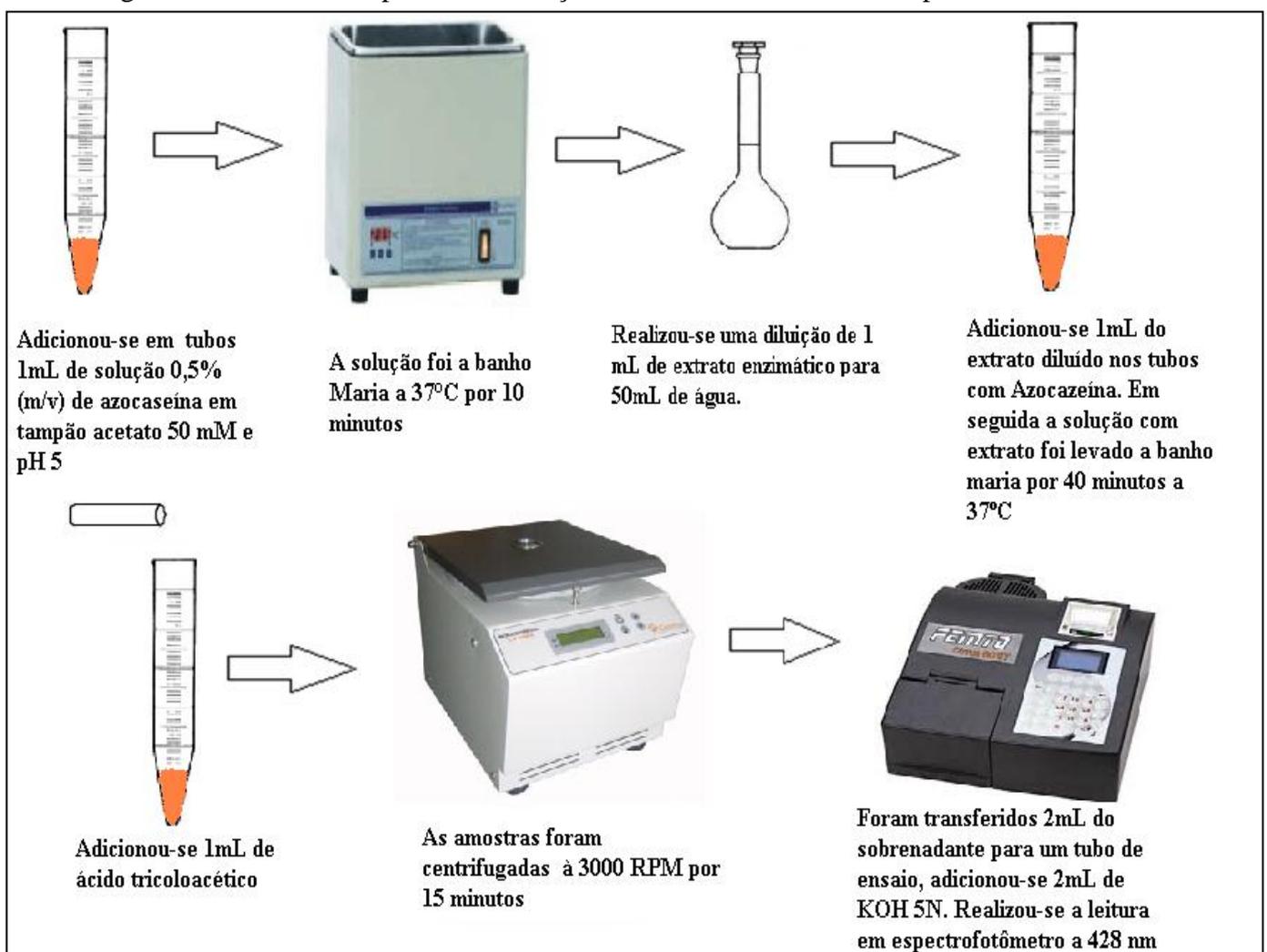


4.6 Atividade enzimática de protease

A atividade de protease foi realizada conforme Charney e Tomarelli (1947), as análises foram realizadas em duplicata. A mistura de reação constituiu de 1mL de solução

0,5% (m/v) de azocaseína em tampão acetato 50 mM e pH 5,0 e 1 mL do extrato enzimático, sendo que foi realizada uma diluição de 1 mL extrato enzimático para 50 mL de água destilada. A mistura reacional foi incubada a 37 °C durante 40 minutos. Após este tempo, a reação foi parada com adição de 1mL de solução de ácido tricloroacético 10% (m/v), objetivando a precipitação do substrato não digerido pelas enzimas proteolíticas. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. Transferiu-se 2mL do sobrenadante contendo aminoácidos e oligopeptídeos de baixo peso molecular para um tubo de ensaio, e adicionou-se 2 mL de KOH 5 N, formando um composto com cor característica que foi quantificado por espectrofotômetro com comprimento de onda de 428 nm, contra um branco preparado em condições idênticas, mas utilizando 1mL de água destilada em substituição à amostra. A Figura 5 representa as etapas para determinação de atividade de protease.

Figura 5- Procedimento para determinação da atividade enzimática de protease



Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorbância entre o branco e a amostra, por minuto, nas condições de reação estabelecidas. A atividade enzimática foi determinada de acordo com a equação:

$$A = \frac{((Média_{abs} - Branco_{enz}) * Diluição) / U_t}{t} \quad (1)$$

Onde:

A = atividade em U/g de substrato

Média Abs = média das Absorbâncias

Branco enz = branco enzimático (substituição do extrato enzimático por água destilada)

Diluição = diluição do extrato enzimático

U_t = 0,01 unidade de absorbância

t = tempo de reação em minutos

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Umidade dos substratos

A umidade dos substratos foi determinada no tempo zero de fermentação, após o processo de esterilização do meio.

A umidade do meio com torta de canola foi de 34,43%, Freitas (2009) e colaboradores ao realizarem a caracterização da torta de canola durante o processo fermentativo para produção de proteases, encontraram no tempo zero, no início do processo fermentativo uma umidade de 38,07%. Todavia a diferença nas umidades é em decorrência da umidade do próprio farelo, pois dependendo das condições de armazenamento este pode absorver o perder água para o ambiente.

Para o meio com farelo de trigo determinou-se uma umidade de 54,47%, a umidade deste meio foi mais alta devido a proporção de água ser maior, 125 mL para 100 g de farelo. Utilizou-se esta proporção de água no farelo de trigo através de estudo realizado por Castro *et al.*, (2009, na avaliação do efeito da adição de diferentes volumes de água sobre a síntese da protease, o farelo de trigo, manteve uma produção crescente à medida que as

porções de água eram adicionadas, alcançando máxima produção em 24h de fermentação com $211,2 \text{ U.g}^{-1}$ de protease quando o meio formulado continha 125mL de água para cada 100g de farelo com *A. Oryzae* IV.

O farelo de trigo foi empregado como substrato por Chutmanop (2008) e colaboradores para a produção de proteases por *Aspergillus oryzae* (Ozykat-1) em fermentação semi-sólida utilizando farelo de arroz tailandês, verificou-se que o teor de umidade inicial teve um efeito mais forte sobre a produção de proteases do que pH inicial. A maior atividade de protease de 1200 U.g^{-1} alcançada dentro de 4 dias de fermentação, com uma proporção de 0,33 de farelo de trigo e teor de umidade de 50%, o pH inicial de 7,5, e a temperatura de incubação de 30 °C. A adição de farelo de trigo foi necessária devido a porosidade do farelo de arroz Tailandês ser insuficiente.

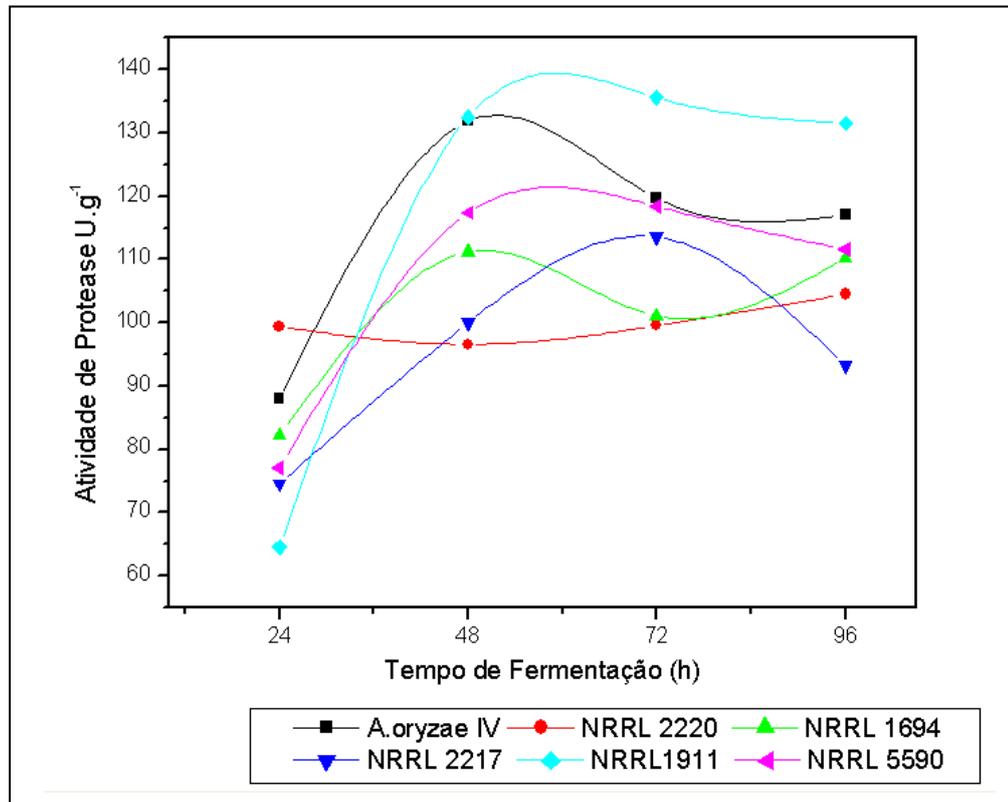
A umidade de 60% em farelo de trigo foi determinada por Vishwanatha *et al.*, (2010) para a produção de proteases em cultivo semi-sólido utilizando *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 e obteve-se uma atividade de protease de $8.64 \cdot 10^5 \text{ U.g}^{-1}$ em 120 horas de fermentação.

5.2 Produção de proteases

Todas as linhagens de *Aspergillus oryzae* estudadas produziram proteases em torta de canola. A Figura 6 apresenta os resultados da produção de proteases nos processos fermentativos. A maior atividade de protease ocorreu em 72 horas, sendo uma produção aproximada de 136 U.g^{-1} , com o *Aspergillus oryzae* NRRL1911. A maior produtividade para esta linhagem ocorreu em 48 horas de fermentação com uma produtividade equivalente a $2,7 \text{ U. g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figura 7) onde detectou-se uma atividade de $132,5 \text{ U.g}^{-1}$. A produtividade de protease está relacionada com a quantidade de protease que foi produzida em cada tempo de fermentação.

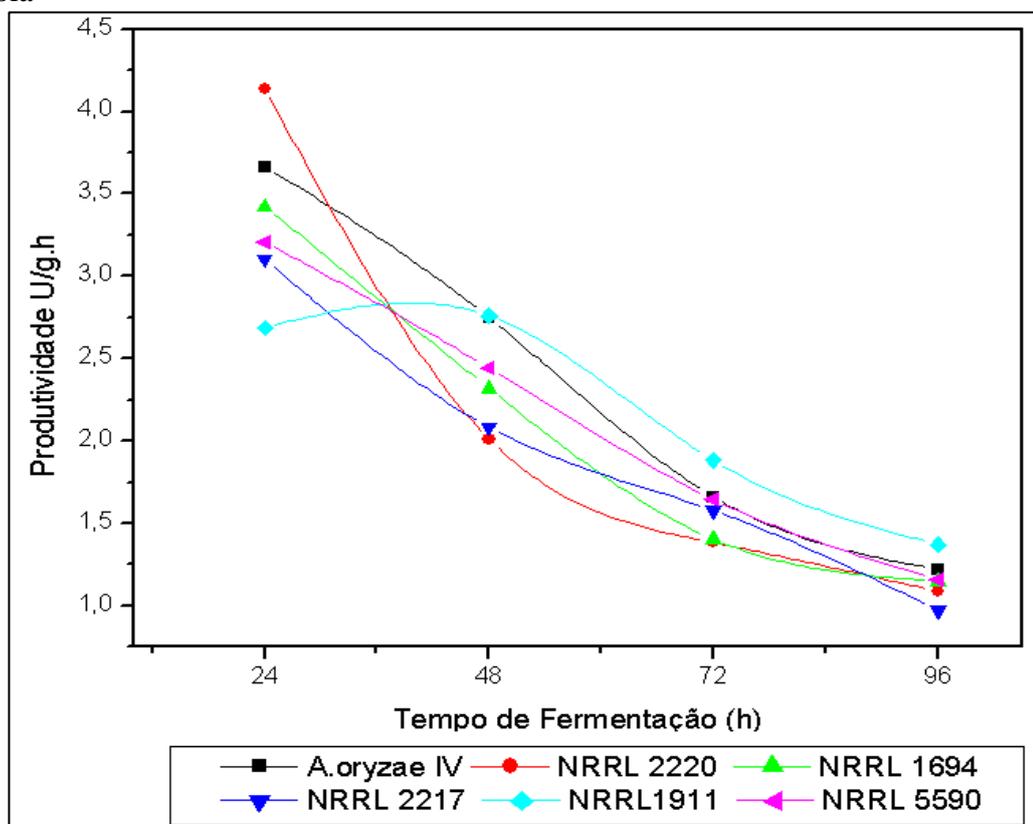
Observa-se que a atividade de proteases de 132 U.g^{-1} em 48 horas da estirpe de *Aspergillus Oryzae* IV e NRRL 1911 são equivalentes, no entanto, a produção do primeiro decresce ao longo do processo fermentativo.

Figura 6- Atividade de protease para diferentes linhagens de *Aspergillus Oryzae* em torta de canola



A Figura 7 apresenta a produtividade de proteases ao longo do tempo. A maior produtividade no decorrer do processo fermentativo foi detectada em 24 horas pela linhagem NRRL 2220, sendo esta produção de $4,1 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e atividade equivalente a 99 U.g^{-1} , no entanto, esta linhagem apresentou atividade constante em torno de 100 U.g^{-1} após 24 horas de fermentação. A maior produtividade para todas as linhagens encontra-se em 24 de fermentação e a menor em 96 horas. Esse comportamento só não foi observado para a linhagem NRRL 1911 que teve sua maior produtividade de $2,76 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em 48 horas.

Figura 7- Produtividade de proteases pelas diversas linhagens de *Aspergillus oryzae* em torta de canola



Freitas (2009) realizou um estudo com estirpes de *A. Oryzae* e *A. Nigere* em torta de canola. Verificou-se que a maior atividade foi obtida em 48 horas com *Aspergillus oryzae* IV, sendo de aproximadamente 60 U.g^{-1} durante todo o processo fermentativo. Em 24 horas detectou-se 57 U.g^{-1} obtendo uma produtividade de $2,3 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. No presente estudo, a linhagem *A. oryzae* IV apresentou o segundo melhor desempenho na produção de proteases, com atividade máxima de 132 U.g^{-1} em 48 horas de fermentação como mostra a Figura 7 e sua maior produtividade ($3,66 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ocorreu em 24 horas de fermentação (Figura 6).

Murthy e Naidu (2010) estudaram a fermentação semi-sólida com *Aspergillus oryzae* CFR 305 como potencial para a produção de proteases. Cascas de café de diversos cultivares foram utilizados como substratos. A casca do café cereja com umidade inicial de 50% a 27°C incubada por 5 dias dentre os diferentes substratos mostrou-se a mais eficiente na produção da enzima com atividade de 7.539 U de enzima por grama de substrato fermentado (U/gss). A casca de café mostrou ser um ótimo substrato para o processo semi-sólido utilizando fungos filamentosos em 5 dias de fermentação, assim como a torta de canola

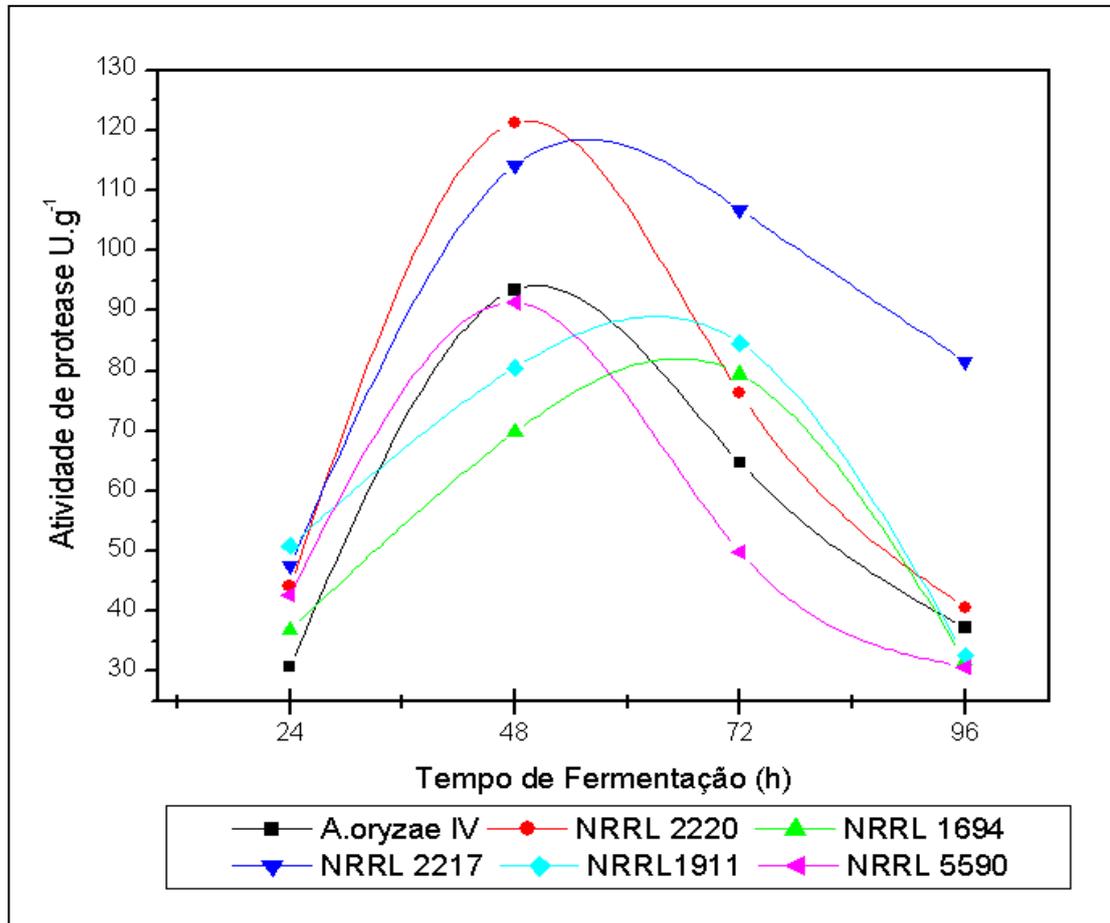
utilizada nesse estudo, porém a maior atividade de proteases (136 U.g^{-1}) em torta de canola foi em 3 dias de fermentação (72 horas).

Sabe-se que diversos fatores influenciam no processo fermentativo, tais como temperatura, pH, umidade, atividade de água, volume de inóculo, dentre outros. As características físicas e químicas da torta de canola durante o processo de FSS com *A. oryzae* IV, para síntese de proteases foram estudadas por Freitas *et al.*, (2009). Os resultados obtidos mostraram que houve uma redução no teor de proteína durante o processo, no início do processo apresentou valor de 49,05% e em 96 h de 42,08% sendo este componente utilizado pelo micro-organismo para crescimento e formação da enzima. Houve uma diminuição da umidade, no início encontrava-se em torno de 38% e ao final obteve-se uma umidade de 35%, este fato ocorreu devido ao ressecamento do meio durante o período fermentativo. Dessa forma, isso explica a queda na atividade de proteases em 96 horas de fermentação, pois há redução de umidade e atividade de água assim como decresce a quantidade de proteínas presente no substrato, já que este componente é utilizado pelo micro-organismo para a formação da enzima.

As atividades de proteases em farelo de trigo são apresentadas na Figura 8. Observa-se que todas as linhagens estudadas produziram proteases, a maior atividade de protease, equivalente a 121 U.g^{-1} , foi detectada em 48 horas com o *A. oryzae* NRRL 2220. Como mostra a Figura 9 a maior produtividade para esta linhagem foi em 48 horas com uma produtividade equivalente a $2,52 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, a produção de protease por esta linhagem apresentou um rápido crescimento em 48 horas mas em 72 e 96 horas de fermentação esta produção sofreu um forte declínio.

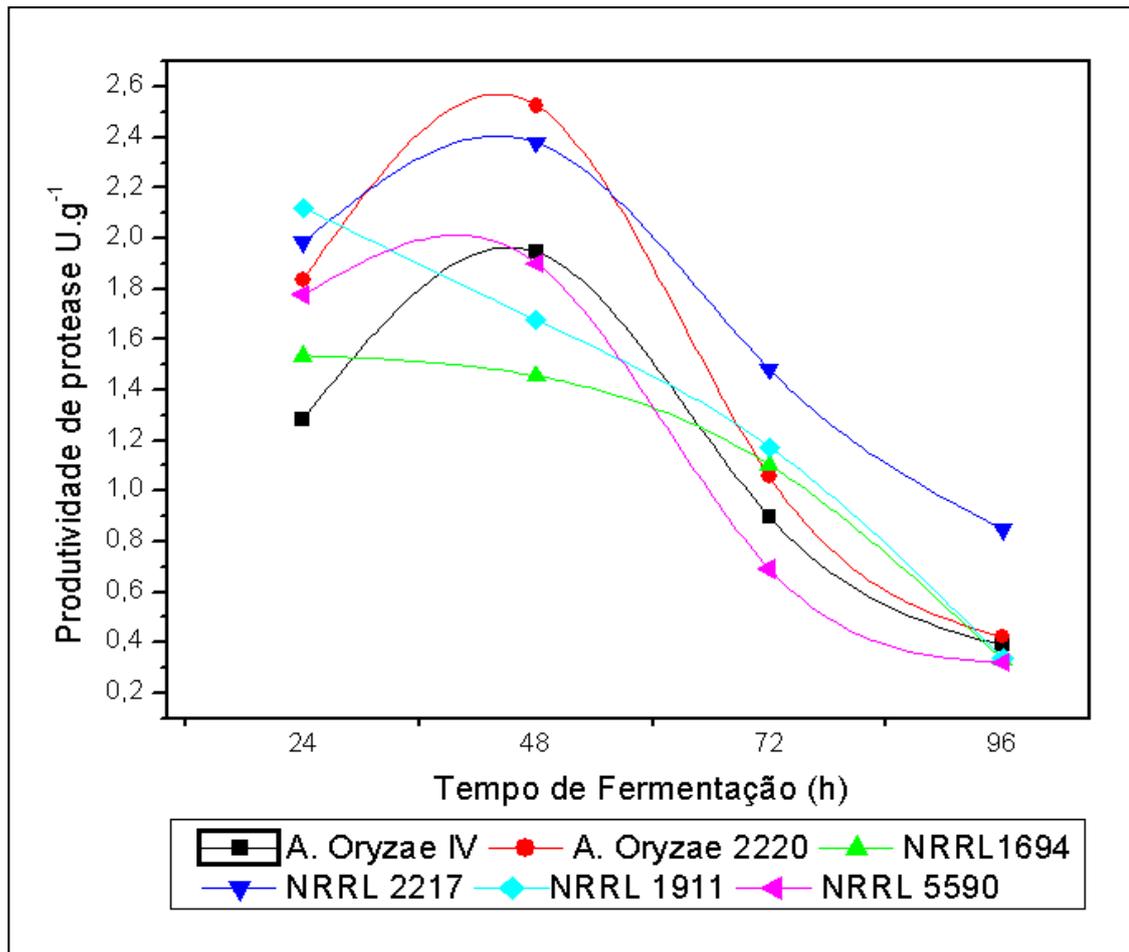
A literatura não relata os motivos do declínio na atividade de protease no decorrer do processo fermentativo. No entanto, acredita-se que esta queda na produção de proteases seja em razão do consumo da enzima pelo fungo, para quebrar as cadeias de aminoácidos que ainda estão presentes no meio para que possam ser usados como nutrientes. Dentre as linhagens estudadas aquela que apresentou uma menor queda na produção de proteases foi a NRRL 2217.

Figura 8- Atividade de protease pelas diferentes linhagens de *Aspergillus Oryzae* em farelo de trigo



A Figura 9 apresenta a produtividade de proteases no decorrer do processo fermentativo em farelo de trigo. A produtividade máxima foi de $2,52 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ com a linhagem de *A. oryzae* 2220 em 48 horas de fermentação e atividade de 121 U.g^{-1} . Esta linhagem foi a que obteve uma maior produtividade de protease para a torta de canola em 24 horas.

Figura 9- Produtividade de proteases pelas diversas linhagens de *Aspergillus oryzae* em farelo de trigo



A atividade máxima de proteases (Figura 8) para a linhagem de *A. oryzae* IV com farelo de trigo foi de 93 U.g⁻¹ em 78 horas de fermentação. No entanto, Freitas (2013) obteve melhores resultados de atividade de protease para o farelo de trigo, em seu estudo sobre a influência da quantidade de água em diversos substratos para produção de proteases (torta de canola, torta de girassol, farelo de trigo, película da casca da castanha de caju, farelo de soja e farelo de algodão) em fermentação semi-sólida com *Aspergillus oryzae* IV. O farelo de trigo manteve uma produção crescente à medida que as porções de água eram adicionadas, alcançando máxima produção em 24 horas de fermentação, com 211,2 U.g⁻¹ de protease quando o meio formulado continha 125 mL de água para cada 100 g de substrato.

Resultados inferiores de atividade de protease em farelo de trigo foram encontrados por Sandhya *et al.*, (2005). Ao realizarem um estudo comparativo para avaliarem a viabilidade da fermentação submersa (FSM) e da fermentação semi-sólida (FSS) na produção

de uma protease neutra, com fungos de diferentes linhagens de *Aspergillus oryzae* e *Penicillium*, utilizando resíduos agroindustriais (farelo de trigo, casca de arroz, farelo de arroz, torta de óleo de coco, torta dendê, torta de óleo de gergelim e torta de azeite) como substrato para a FSS e FSM. Os autores verificaram que a melhor linhagem testada para a produção de protease neutra foi *A. oryzae* NRRL 1808. Em ambos os sistemas de fermentação, o farelo de trigo foi o melhor substrato. Os melhores resultados para FSS foram obtidos com teor de umidade inicial de 43,6%, quando inoculados com 1mL de suspensão de esporos (10^8 esporos) e incubadas a 30°C por 72 horas, onde obtiveram $31,2 \text{ U.g}^{-1}$ de atividade de protease.

O teor de proteínas de 49,05% na torta de canola foi determinado por Freitas (2009) no início do processo fermentativo. Para o farelo de trigo o teor de proteínas foi determinado por Sant'Ana *et al* (2000) que obteve 14,48% de proteínas em sua composição. Dessa forma, a produção de proteases em torta de canola é superior devido a maior quantidade de proteínas em sua composição, já que este componente é utilizado pelo micro-organismo para crescimento e formação da enzima.

No presente estudo, verificou-se que todas as estirpes estudadas são produtoras de proteases em ambos os substratos, no entanto, as maiores atividades de protease foram determinadas em torta de canola com a linhagem de *A. oryzae* NRRL 1911, apresentando maior atividade em 72 horas de fermentação (136 U.g^{-1}), já a maior produtividade ($4,1 \text{ U.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) foi obtida com a linhagem de *A. oryzae* NRRL 2220 em 24 horas de fermentação. Dessa forma em termos de produção a melhor linhagem foi a linhagem NRRL 1911 e o melhor substrato a torta de canola. Em relação a produtividade a melhor linhagem foi a NRRL 2220 tanto em farelo de trigo como em torta de canola, porém produtividade em torta de canola ($4,1 \text{ U.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) foi superior ao farelo de trigo, que obteve a maior produtividade de $2,52 \text{ U.g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em 48 horas de fermentação.

6 CONCLUSÃO

Todas as linhagens avaliadas produziram proteases em ambos os substratos, torta de canola e farelo de trigo. O torta de canola nas condições estudadas foi o mais eficiente, com atividade máxima de protease equivalente a 135 U.g^{-1} em 72 horas de fermentação com a linhagem de *A. oryzae* NRRL 1911. Para o farelo de trigo a maior produção ocorreu em 48 horas, com a linhagem NRRL 2220 onde detectou-se atividade máxima de 121 U.g^{-1} . Dessa forma, as linhagens estudadas produzem proteases em cultivo semi-sólido empregando torta de canola e farelo de trigo como substrato.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar as condições ótimas de atividade da enzima produzida pelas linhagens estudadas: pH e temperatura;
- Avaliar os efeitos da umidade e temperatura de incubação durante o processo fermentativo;
- Otimização das condições de extração da enzima.

REFERÊNCIAS

- ABITRIGO. Associação Brasileira da Indústria do Trigo. **História do trigo**. O papel do trigo na evolução da humanidade. A triticultura brasileira. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/historia_do_trigo2a.asp> Acesso em: 18 Jan. 2008.
- ALBUQUERQUE, G.A. **Obtenção e caracterização físico-química do biodiesel de canola (*Brassic napus*)**. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2006.
- ANDRADE, R.L.P de; MARTINS, J.F.P. **Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo**. Ciência e Tecnologia de alimentos, 22:3, 2002
- AZEREDO, L. A. I. *et al.* Proteases from actinomycetes interfere in solid media plate assays of hyaluronidase activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 207-212, July 2001.
- ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-sólida**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB. 2004.
- BARATA, R. A. *et al.* Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, n. 4, p. 304-308, Oct. 2002.
- BARRIOS-GONZALEZ, J. *et al.* (1993). Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. **Biotechnology Advances**, 11, 539– 547.
- BERTOL, M.; MAZZUCO, H. **Farelo de canola: Uma alternativa protéica para alimentação de suínos e aves**, 1998 Concórdia: EMBRAPA- CNPSA, 56p. EMBRAPA-CNPSA. Documentos, 55.
- BRAVO, C. E. C. *et al.* Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência Agrotecnológica**, v.24(edição especial), p.137-152, 2000.
- CASTRO (a), R.J.S. *et al.* Efeito da Quantidade Inicial de Água na Síntese de Protease por *Aspergillus oryzae* em Fermentação Semi-sólida utilizando Resíduos Agroindustriais como Substrato. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Natal-RN, 2009.
- CASTRO (b), R.J.S., PINTO, G.A.S. Estudo Comparativo da Produção de Proteases por *Aspergillus oryzae* em Fermentação Semi-sólida. Utilizando Tortas de Girassol. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Natal-RN, 2009
- 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. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2012.

CHANCHAROONPONGA, C. *et al.* Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae*S. on soybean koji fermentation. **APCBEE Procedia** 00-000–000, 2012

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.

CHUTMANOP, J. *et al.* Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 83:1012–1018, 2008.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A Review. **Journal of Food Engineering**. Califórnia, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

COSTA, J. A. V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-sólida de Farelo de Arroz.** Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p.203, 1996.

CHO, S. S. *et al.* Gastrointestinal and other physiological effects of wheat bran. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 49, nº 3, p. 140-143, may-june 2004.

DALSENTER, F.D.H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido.** Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.

DEL BIANCHI, V.L. Produção de enzimas proteolíticas ácidas por fermentação fúngica em meio semi-sólido. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1990

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p.113-125, 2003.

EMBRAPA TRIGO. **Cultivo de Canola.** Sistemas de Produção 3: Versão Eletrônica, 2007. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Canola/CultivodeCanola/index.htm>> Acesso em: 05. Set. 2013.

FAZOUANE-NAIMI, F. *et al.* Characterization and Cheese-Making Properties of Rennet-Like Enzyme Produced by a Local Algerian Isolate of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 258-269, 2010.

FEDATTO, L.M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira.** Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo, 2004.

FREITAS, A.C. **Produção de proteases por *Aspergillus* em fermentação semi-sólida utilizando torta de canola.** Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia - Química da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

FREITAS, A.C. *et al.* Caracterização da Torta de Canola durante o Processo Fermentativo para Produção de Proteases. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Natal-RN, 2009.

FREITAS, A.C. **Produção de extrato enzimático proteolítico por fermentação semi-sólida em reator instrumentado**. Tese (Doutorado)- Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, 2013.

GARCÍA-GÓMEZ, M.J. *et al.* Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. **Food Chemistry**, v.112, pp. 604–608, 2009.

GERVAIS, P., MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13(2-3): 85-101, 2003.

GOMES, C. A. O. **Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semi-sólido por *Aspergillus niger* 3T5B8**. 1995. Dissertação (Mestrado em ciência dealimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1995.

GRAMINHA, E.B.N. *et al.* Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1–22, 2008.

HASAN, S. D. M. *et al.* Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**, v.12, n.10, p.787-791, 1998.

HASAN, S.D.M. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monóceras* obtida pó fermentação semi-sólida**. Tese de Doutorado FEQ – UNICAMP, Campinas, 2002.

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

KNUF, C.; NIELSEN, J. *Aspergilli*: Systems biology and industrial applications. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 9, p. 1147-1155, 2012.

LÉON, A. E. **De tales harinas, tales panes: granos, harinas y productos de panificación em Iberoamérica**. Córdoba: Hugo Báez, 2007. 480p.

LIMA, M.B. **Avaliação do efeito da adição de fontes nitrogenadas e de sais minerais na fermentação semi-sólida para produção de fitase por *aspergillus***. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 2012.

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**. Dissertação (Mestrado)-Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MACEDO, A. C. **Estudo da produção de ácido hialurônico por fermentação de *streptococcuszooepidemicusem* Substrato de caju(*anacardiumoccidentalel*)**. Dissertação de mestrado, Campinas, SP, 2008.

MACHIDA, M. *et al.* Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1157-1161, 2005.

MACHIDA, M. *et al.* Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **DNA Research**.v.15, p.173-183. 2008.

MACCHIONE. M. M. *et al.* Protease Production by Different Thermophilic Fungi. **ApplBiochemBiotechnol**, v. 146, pp. 223–230, 2008.

MENEZES, G. D. G.**Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

MITCHELL, D. A.*et al.* 2000, “New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors”, **Process Biochemistry**, v. 35, pp. 1211-1225.

MITCHELL, D. A. *et al.* 2002, “Overview of solid state bioprocessing”. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, pp. 183-225.

MURTHY, P.S.; NAIDU, M.M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. **World applied sciences journal**, v.8 pp 199-205, 2010.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-State Substrate Fermentation System and their Applications in Biotechnology. **Journal Basic Microbiology**: 34 (6), 405-423, 1994.

OKI, Y. FERNANDES, G.W. Fungos: amigos ou inimigos? **Ciência Hoje**, v. 42, nº 252, p. 64-66, 2008.

PANDEY, A. *et al.* Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, v. 26, n. 6, p. 355-361, 1991.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v.13.p.81-84. 2003.

PANDEY, A. *et al.* **Solid state fermentation in biotechnology**. Nova Deli: Asiatech, 2001. 221p.

PANDEY, A. Solid state fermentation. Biochemical. **Engineering Journal**, v.3636, p.1-4, 2002.

PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. I. Bioprocesses and products. **Process Biochemistry** 35:1153–1169, 2000.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PINTO, G.A.S. *et al.* **Fermentação semi-sólida:** uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado Técnico online Embrapa, ISSN 1679-6535, 2005.

PINTO, G. A. S. *et al.* Fermentação semi-sólida uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Rev. Quím. Ind.**, n.724, p.17-20, 2006.

POZA, M. *et al.* Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 5, p.916- 921, Nov. 2001.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **Washington**, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sept. 1998.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.

RODRIGUES, A. B. C. *et al.* Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus Niger*. In: **IX encontro interno e XIII de iniciação científica da UFU**, 2009.

RODRIGUES, A. D. **Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido.** 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

RUTZ, F. *et al.* Fermentação semi-sólida: a evolução na produção de enzimas. **Revista Aneworld**, Edição 29, 2008.

RAJMOHAN, S. *et al.* Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 205-213, 2002.

ROCHA, N. R. A. F. **Produção de celulase por fermentação submersa empregando resíduos agroindustriais para a produção de etanol.** Dissertação (mestrado)- Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011

ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido.** Dissertação (mestrado)- Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

SANT'ANA, L. F. da R. *et al.* Nutritive value and antinutritional factors of multimixtures used as alternative Foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3, p.129-135, 2000.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação semi-sólida utilizando pedúnculo de caju como substrato.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Natal, RN. 2007.

SHATA, H. M. A.; FODA, M. S. Production of a milk-clotting enzyme by *Aspergillus oryzae* under solid substrate culture conditions. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 101, n. 6, p. 260-265, Jun 2005.

SILVA, D. *et al.* Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v.40, p.285-289, 2005.

SILVA, T.M. *et al.* Potencial application in animal feed of phytase produced from agro-industrial residues by *Aspergillus japonicus*. **Journal of biotechnology**. V.150, p.514, 2010.

SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. **Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.27, n.4, p.805-811, 2007.

SANTANA, R.S.M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação semi-sólida.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. 73p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia de Alimentos – Ciência dos Alimentos).

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

SCHEUER, P.M. *et al.* Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.13, 2011.

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

SUMANTHA, A. *et al.* Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade. Proteases: A Perspective. *Food Technol.* **Biotechnol**, v.44, pp. 211–220, 2006.

TOMM, G. O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007.

TOMM, G. O. **A cultura de colza padrão canola no Brasil.** *Óleos & Grãos*, n. 52, São Bernardo do Campo, 8, p. 26 - 30, 01 jan. 2000.

VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring, p. 5-22. In: ROUSSOUS, S. *et al.* (Eds.) **Advances in solid-state fermentation.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997.

VISHWANATHA, K. S. *et al.* Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 402-407, May 15 2009.

VISHWANATHA, K. S. *et al.* Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 129-138, Feb 2010.

WANG, R. *et al.* Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 217–227, 2005.

YUAN, X.; WANG, J.; YAO, H. Antioxidant activity of feruloylatedoligosaccharides from wheat bran. In: **Revista Brasileira de Zootecnia**. ARAUJO, D. de M. (Ed). Farelo de trigo na alimentação de poedeiras semipesadas na fase de recria , v.37, n.1, p.67-72, 2008.