



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

AMANDA BORDIGNON PAES

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus*  
*welwitschiae***

---

Londrina  
2023

AMANDA BORDIGNON PAES

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus*  
*welwitschiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Daniele Sartori  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cristiani Baldo da Rocha.

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

P126p Paes, Amanda Bordignon.  
Produção de proteases por *Aspergillus welwitschiae* / Amanda Bordignon Paes. - Londrina, 2023.  
53 f. : il.

Orientador: Daniele Sartori.  
Coorientador: Cristiane Baldo da Rocha.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.  
Inclui bibliografia.

1. Proteases - Tese. 2. *Aspergillus welwitschiae* - Tese. 3. Fermentação em estado sólido - Tese. 4. Resíduo de malte - Tese. I. Sartori, Daniele . II. Rocha, Cristiane Baldo da. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

AMANDA BORDIGNON PAES

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus  
welwitschiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Daniele Sartori  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cristiani Baldo da Rocha.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Daniele Sartori  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Nicole Caldas Pan  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>o</sup> Dr. Marcelo Rodrigues de Melo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 31 de março de 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e por ser minha fonte de alegria em tempos bons e refúgio nos tempos difíceis.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Sartori pela engrandecedora orientação e especialmente pelo apoio nos momentos que mais precisei.

A Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

A banca examinadora, pela disposição.

Aos meus pais Sidnei Paes e Marcia Regina Bordignon Paes, pela educação, pelo exemplo e por me criarem com tanto amor e carinho.

Aos meus colegas de laboratório que tanto ajudaram durante todo o processo, especialmente a Dâmaris Cristine Landgraf, com quem pude aprender muito, por sua paciência e disposição.

Por fim, agradeço ao meu noivo Thales Renan Scalassara, por ter me incentivado a fazer o mestrado e especialmente por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis.

PAES, Amanda Bordignon. **Produção de proteases por *Aspergillus welwitschiae***. 53 f. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

## Resumo

As proteases apresentam grande interesse comercial, com aplicações na indústria farmacêutica, de cosméticos, têxtil, alimentícia, como aditivos para detergentes, entre outros. Os fungos do gênero *Aspergillus* tem grande potencial biotecnológico por serem bons produtores de enzimas em substratos de custo reduzido, como os resíduos agroindustriais. O resíduo de malte é muito abundante e possui quantidade considerável de proteínas, adequado como fonte nutricional para a produção de proteases por microrganismos. A produção de proteases pode ser obtida a partir de linhagens selecionadas de microrganismos associadas aos parâmetros abióticos padronizados. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar parâmetros abióticos para a produção de proteases por *Aspergillus welwitschiae* UELAs 15.262 a partir do resíduo de malte. Foi avaliado a produção de proteases sob os parâmetros de temperatura, com variação de 28 °C até 42 °C e pH variando de 4,2 até 9,8. As maiores quantidade de proteases produzidas foram  $95,95 \pm 1,08$  U/mL (35 °C, pH 9,8),  $94,72 \pm 3,27$  U/mL (35 °C, pH 7,0),  $91,65 \pm 4,10$  U/mL (30 °C, pH 9,0),  $91,05 \pm 5,71$  U/mL (35 °C, pH 4,2) e  $87,72 \pm 1,57$  U/mL (30°C, pH 5,0). Dentre as condições que mais produziram proteases, quatro foram selecionadas para avaliar o tempo de produção enzimática. A 35 °C, pH 4,2, a maior quantidade de proteases foi obtida no terceiro dia de fermentação, enquanto nas demais condições a maior quantidade de proteases foi obtida no quarto dia de fermentação. O Extrato Bruto Enzimático (EBE) obtido no terceiro dia de fermentação nas condições 35 °C, pH 4,2 e 9,8, foram submetidos a avaliação de atividade de proteases em meio contendo leite em pó como substrato, a 25 °C e 37 °C. Em ambas as temperaturas as proteases permaneceram ativas por até 24 horas, contudo, a melhor atividade de proteases foi obtida a 37 °C. Esses resultados indicaram que *A. welwitschiae* UELAs 15.262 produziu proteases em resíduo de malte e que a temperatura tem influência na produção dessas enzimas. A avaliação de parâmetros abióticos associados à linhagem UELAs 15.262 é de grande importância para maior produção de proteases usando resíduos de baixo custo.

**Palavras-Chave:** Proteases, resíduo de malte, fermentação em estado sólido, *Aspergillus welwitschiae*.

PAES, Amanda Bordignon. **Production of proteases by *Aspergillus welwitschiae***. 53 pp. 2023. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

### **Abstract**

Proteases are a group of enzymes of great commercial interest, with applications in the pharmaceutical, cosmetics, textile, food, as additives for detergents, among others. Fungi of the genus *Aspergillus* have great biotechnological potential for being good producers of enzymes in low-cost substrates, such as agro-industrial residues. The malt residue is very abundant and has a considerable amount of protein, being suitable as a nutritional source to produce proteases by microorganisms. High production of proteases can be obtained from selected strains of microorganisms associated with suitable abiotic parameters. In this context, the objective of this work was to select abiotic parameters to produce proteases by *Aspergillus welwitschiae* UELAs 15.262 from brewer's spent grain. Protease production was evaluated under the temperature parameters, ranging from 28 °C to 42 °C and pH ranging from 4.2 to 9.8. The highest amounts of proteases produced were  $95.95 \pm 1.08$  U/mL (35 °C, pH 9.8),  $94.72 \pm 3.27$  U/mL (35 °C, pH 7.0),  $91.65 \pm 4.10$  U/mL (30 °C, pH 9.0),  $91.05 \pm 5.71$  U/mL (35 °C, pH 4.2) and  $87.72 \pm 1.57$  U/mL (30°C, pH 5.0). Among the conditions that most produced proteases, four were selected to evaluate the enzyme production time. For the assay, the largest amount of proteases was harvested at 35 °C, pH 4.2 on the third day of fermentation, while in the other conditions the largest amount of proteases was harvested on the fourth day. The Enzyme Crude Extract (EBE) obtained on the third day of fermentation under the conditions 35 °C, pH 4.2 and 9.8, confirmed the evaluation of protease activity in medium containing powdered milk as substrates, at 25 °C and 37°C. At both temperatures the proteases remained active for up to 24 hours. However, the best protease activity was tolerated at 37 °C, demonstrating that higher temperatures positively influenced the activity of these enzymes. These results indicated that *A. welwitschiae* UELAs 15.262 produced proteases in malt residue and that temperature influences the production of these enzymes. The evaluation of abiotic parameters associated with the UELAs 15.262 strain is of great importance for greater production of proteases using low-cost residues.

**Keywords:** Protease, brewer's spent grain, solid state fermentation, *Aspergillus welwitschiae*.

## Lista de figuras

- Figura 1** - Representação do local de ação de endopeptidases e exopeptidases. ... 15
- Figura 2** –Superfície de resposta para a atividade de proteases (U/mL), produzidas por *A. welwitschiae*, mostrando a interação dos efeitos pH ( $X_1$ ) e temperatura ( $X_2$ ). 30
- Figura 3** - Cinética de produção de proteases produzidas por *A. welwitschiae* UELAs 15.262 em resíduo de malte durante 4 dias de fermentação em estado sólido. .... 33
- Figura 4** - Halo de degradação de proteases produzidas por *A. welwitschiae* UEL 15.262. As proteases (6,5 U/mL) foram obtidas a pH 4,2 a 35 °C (Amostra 1). ..... 35
- Figura 5** - Halo de degradação de proteases produzidas por *A. welwitschiae* UEL 15.262. As proteases (6,5 U/mL) foram obtidas a pH 9,8 a 35 °C (amostra 2). ..... 35
- Figura 6** – Áreas de degradação por proteases (mm<sup>2</sup>) por tempo de incubação (horas). (a) Halos de degradação da amostra 1 em 37 °C. (b) Halos de degradação da amostra 2 em 37 °C. (c) Halos de degradação da amostra 1 em 25 °C. (d) Resultados da amostra 2 em 25 °C. .... 37

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Produção de proteases por diferentes espécies de <i>Aspergillus</i> a partir de fermentação submersa.....	18
<b>Tabela 2</b> - Produção de proteases por fungos do gênero <i>Aspergillus</i> em fermentação em estado sólido. ....	20
<b>Tabela 3</b> - Níveis codificados dos fatores avaliados no planejamento composto central rotacional.....	24
<b>Tabela 4</b> – Atividade de <i>proteases</i> por <i>A. welwitschiae</i> UELAs 15.262, conforme parâmetros abióticos estabelecidos pelo Planejamento Composto Central Rotacional. ....	29
<b>Tabela 5</b> - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de proteases por <i>A. welwitschiae</i> UELAs 15.262.....	30
<b>Tabela 6</b> – Cinética da produção de proteases por <i>A. welwitschiae</i> UELAs 15.262 em resíduo de malte.....	33
<b>Tabela 7</b> - Halos de degradação por proteases produzidas por <i>A. welwitschiae</i> UEL 15.262 em meio de cultura contendo leite em pó como substrato. ....	36

## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>14</b>
3.1. PROPRIEDADES GERAIS DAS PROTEASES .....	14
3.1.1. Fontes de obtenção de proteases .....	15
3.2. PARÂMETROS ABIÓTICOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES .....	16
3.2.1. Temperatura e pH para produção de proteases .....	16
3.3. OBTENÇÃO DE PROTEASES POR FERMENTAÇÃO .....	17
3.4. RESÍDUO DE MALTE COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES .....	21
3.5. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE <i>ASPERGILLUS WELWITSCHIAE</i> . .....	22
<b>4 Materiais e Métodos</b> .....	<b>24</b>
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	24
4.2. RESÍDUO DE MALTE .....	24
4.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ABIÓTICOS .....	24
4.4. PRODUÇÃO DE PROTEASES POR <i>A. WELWITSCHIAE</i> SOB FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	25
4.5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASES .....	25
4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES .....	25
4.7. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PROTEASES .....	26
4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO EM MEIO SÓLIDO .....	26
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
<b>5 Resultados e discussão</b> .....	<b>28</b>
5.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ABIÓTICOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES .....	28
5.2. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PROTEASES POR <i>A. WELWITSCHIAE</i> UELAs 15.262 .....	32
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO OBTIDO POR <i>A. WELWITSCHIAE</i> UELAs 15.262 .....	34

<b>6 Conclusões .....</b>	<b>39</b>
<b>7 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas hidrolíticas que atuam clivando cadeias peptídicas. Podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana, no entanto, devido a sua fácil manipulação e grande produtividade, as proteases de origem microbiana tem se destacado no meio industrial. Suas aplicações vão desde a indústria farmacêutica e de cosméticos até no gerenciamento de resíduos, podendo atuar na indústria têxtil, no processamento do couro, na indústria alimentícia como aditivos nutricionais, no processamento de alimentos, na indústria de produtos de limpeza como aditivos em detergentes para remoção de manchas e na indústria química.

Por apresentarem vários mecanismos de ação, as proteases podem atuar em várias faixas de temperatura e pH, sendo o estudo desses parâmetros na produção de proteases de grande importância biotecnológica.

As proteases são tradicionalmente produzidas por fermentação submersa. Contudo, a fermentação em estado sólido tem sido cada vez mais estudada como alternativa sustentável para a produção de enzimas, por apresentar maior rendimento e produtividade e menor consumo de energia, o que gera menor custo de produção.

Dentre os principais gêneros de microrganismos utilizados para produção de proteases encontram-se os do gênero *Aspergillus*, sendo um de seus maiores representantes na área industrial, a espécie *Aspergillus niger*. Embora linhagens dessa espécie possam ser produtoras de micotoxinas como a Ocratoxina A e Fumonisina B2, é possível identificar espécies e até mesmo linhagens que são incapazes de produzir estas micotoxinas, o que é comprovado avaliando-se a presença de genes produtores dessas micotoxinas em seu genoma.

*Aspergillus welwitschiae*, uma espécie muito semelhante a *A. niger*, também apresenta grande potencial biotecnológico como produtora de ácidos orgânicos e algumas enzimas, entretanto, não existem relatos da sua utilização na produção de proteases. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a linhagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 quanto à produção de proteases e estabelecer as melhores condições para a produção dessas enzimas usando resíduo de malte.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Otimizar a produção de proteases por *A. welwitschiae* UELAs 15.262 em resíduo de malte.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar parâmetros de temperatura e pH para a maior produção de proteases;

- Selecionar o melhor tempo de produção de proteases por *A. welwitschiae* sob fermentação em estado sólido;

- Validar a atividade enzimática das proteases no extrato bruto liofilizado.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

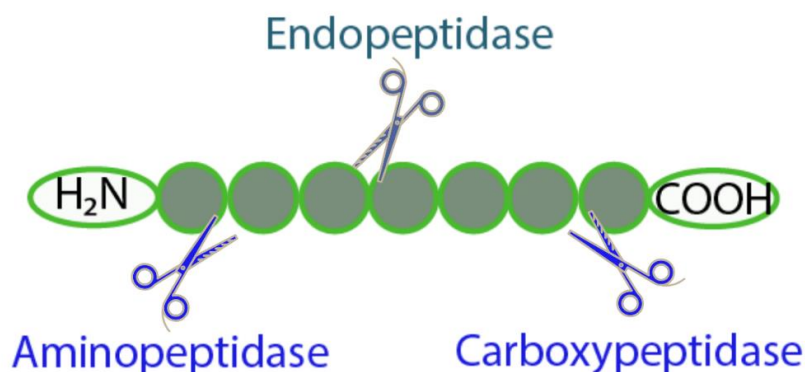
#### 3.1. PROPRIEDADES GERAIS DAS PROTEASES

As proteases são enzimas envolvidas em muitos processos biológicos incluindo digestão de proteínas de origem alimentar, reciclagem de proteínas intracelulares, entre outros processos (MAITIG et al., 2018; SABOTIČ; KOS, 2012). Essas enzimas também são de grande interesse no setor industrial, principalmente as que apresentam estabilidade térmica, quando associadas a detergentes (CHIMBEKUJWO; JA'AFARU; ADEYEMO, 2020; MORYA; YADAV, 2016; SINGH et al., 2016).

As proteases (EC 3.4) catalisam a clivagem de ligações peptídicas (CO-NH) (SOUZA et al., 2015; BRIX; STÖCKER, 2013). Elas constituem um grande grupo de enzimas que incluem as proteinases, as peptidases e as amidases. As proteases podem ainda ser classificadas como neutras, alcalinas e ácidas baseadas em seu pH de ação (GURUMALLESH et al., 2019; ALLADIN et al., 2018).

Quanto ao substrato, as proteases podem também ser classificadas em exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99) (GURUMALLESHI et al., 2019; SOUZA et al., 2015) (Figura 01). As exopeptidases atuam clivando as ligações adjacentes aos grupos carboxil ou amino terminais do substrato e são subdivididas em dois grupos, as aminopeptidases e as carboxipeptidases. As endopeptidases atuam clivando as ligações peptídicas mais internas da cadeia de aminoácidos, sendo subdivididas em categorias, dentre elas serino-proteases, aspártico-proteases, cisteíno-protease e metaloproteases (NAVEED et al., 2020; SOUZA et al., 2015; SABOTIČ; KOS, 2012).

**Figura 1** - Representação do local de ação de endopeptidases e exopeptidases.



Fonte: Martin et al. (2020).

### 3.1.1. Fontes de obtenção de proteases

O mercado global de proteases atingiu o valor de 2,76 bilhões de dólares em 2019, com prospecção de atingir o valor de 5 bilhões de dólares até o ano de 2028 (GLOBAL..., 2022). As proteases obtidas de fontes microbianas compreendem 60 % do mercado de enzimas (SHARMA et al., 2019). Proteases de origem microbiana são atrativas por apresentarem alto índice de produtividade, ampla diversidade bioquímica, fácil manipulação e não requer um espaço muito grande para o seu cultivo quando comparados com enzimas de origens vegetal e animal (OSMOLOVSKIY et al., 2021; SOUZA et al., 2017; SINGHAL et al., 2012).

As proteases de origem microbiana podem ser produzidas por fungos filamentosos, leveduras e bactérias (LARIO et al., 2020; ZHANG et al., 2020; BELMESSIKH et al., 2013; MORYA, 2012). Aquelas de origem fúngica têm grande demanda, devido à sua grande variedade de especificidade por diferentes substratos e pelo fato destes microrganismos secretarem grandes quantidades destas enzimas no meio de cultura (EL-KHONEZY et al., 2021; MAITIG et al., 2018). Além disso, tem-se a vantagem de que os fungos produzem em sua grande maioria proteases extracelulares, facilitando a posterior recuperação destas enzimas (EL-KHONEZY et al., 2021). Dentre os fungos filamentosos, as proteases produzidas por *Aspergillus* spp. são de grande interesse industrial, uma vez que apresentam atividade catalítica em ampla faixa de pH e temperatura (SATTAR et al., 2019; SETHI et al., 2016; MELIKOGLU; LIN; WEBB, 2013; PARANTHAMAN, et al., 2009).

O pH ideal de ação de proteases pode variar de ácido à alcalino, dependendo do microrganismo produtor e de como ele se adapta ao ambiente que está inserido. As proteases alcalinas geralmente são constituídas pelas serino proteases, que apresentam um centro catalítico contendo a tríade Asp-His-Ser ou pelas metalo proteases que requerem um íon metálico para manter sua ação catalítica (MATKAWALA et al., 2020; GURUMALLESH et al., 2019). Dentre as proteases ácidas, estão as proteases aspárticas, cujo centro ativo apresenta um par de aspartato, que proporciona em sua maioria atividade ótima entre pH 3 e 4 (USMAN; MOHAMMED; MAMO, 2021).

### 3.2. PARÂMETROS ABIÓTICOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES

#### 3.2.1. Temperatura e pH para produção de proteases

A produção de proteases por fungos filamentosos é diretamente influenciada por fatores abióticos, como temperatura, pH, tempo de fermentação, tipo de nutriente, entre outros parâmetros (DE CASTRO; SATO, 2014). Dentre os principais fatores envolvidos na produção de proteases por fungos filamentosos estão a temperatura e o pH. A temperatura de fermentação é um parâmetro muito importante, uma vez que influencia o crescimento do microrganismo, afetando a produção enzimática (VEERABHADRAPPA; SHIVAKUMAR; DEVAPPA, 2014). O pH do meio de cultivo tem papel no transporte de vários componentes através da membrana celular, afetando vários processos enzimáticos (SANDHYA et al., 2005).

O estudo de Kamath et al. (2010) avaliou a produção de proteases por *A. niger*, com variação da temperatura entre 20 °C até 40 °C. A maior produção de proteases foi 62,5 U/g, obtida a 28°C com 120 horas de cultivo. Em outro estudo usando *Aspergillus versicolor* CJS-98 como produtor de proteases, foi obtido 2.187,25 U/g de atividade de proteases a 25 °C (VEERABHADRAPPA; SHIVAKUMAR; DEVAPPA, 2014). Agrawal et al. (2004) avaliaram a produção de proteases produzidas por *Penicillium* spp. em temperaturas que variaram de 24 °C a 40 °C. A maior produção de proteases, 11.000 U/g foi obtida a 28 °C. Utilizando *Aspergillus oryzae* QM-6 em cocultivo com *A. niger* QH-3, Tang et al. (2020) avaliaram temperaturas de incubação variando de 24 °C até 36 °C. Os autores observaram maior produção de proteases neutras e ácidas a 33 °C (1.582,9 U/g e 605,2 U/g, respectivamente). Em 2011,

Kamura et al., estimaram a produção de proteases em variadas temperaturas e pHs. Foi constatado *Aspergillus oryzae* como o melhor produtor de proteases em pH 6,0 a 25 °C (15,2 U/mL), em fermentação submersa.

Chutmanop et al. (2008) avaliaram a influência do pH variando de 5,5 até 7,5 a 30 °C, quanto à produção de proteases. A maior produção de proteases foi obtida em pH 7,5 (1.000 U/g) por *A. oryzae*. O estudo de Sandhya et al. (2005) avaliou o pH inicial do meio de cultivo na produção de proteases por *A. oryzae* NRRL 1808. Durante a fermentação, o pH variou de 5,5 até 8,0, sendo em 7,5 o pH cujo *A. oryzae* NRRL 1808 apresentou a maior produção de proteases (8,2 U/g). No trabalho realizado por Siala et al. (2012) também foi avaliado a influência do pH na produção de proteases por *A. niger* I1. A maior produção destas enzimas, 183,13 U/mL, avaliada entre os pHs de 5,0 a 8,0, foi obtida em pH 5,0 e 30 °C. O valor máximo de atividade de proteases produzidas por *Penicillium* spp. LEMI A8221 encontrado no estudo de Cunha et al. (2016) foi de 147,0 U/mg em pH 6,0. Hajji et al. (2008) detectaram maior atividade de proteases, 788 U/mL por *Aspergillus clavatus* ES1 em pH 8,0.

### 3.3. OBTENÇÃO DE PROTEASES POR FERMENTAÇÃO

As *proteases* de origem microbiana podem ser obtidas por de fermentação submersa ou fermentação em estado sólido. A fermentação submersa consiste no crescimento do microrganismo em um meio onde há predominância de água, sendo as fontes de nutrientes solúveis (FARINAS, 2015; SOUZA et al., 2015; SUN; XU, 2009). Em torno de 90 % das enzimas são produzidas a partir de fermentação submersa, por ser um meio de produção em que o controle de parâmetros físico-químicos é eficiente, além de já possuir tecnologias bem estabelecidas na indústria (SANKAR et al., 2023; LIU et al., 2020; M. et al., 2016). Parâmetros como temperatura, pH, aeração, concentração de substrato, podem ser facilmente controlados (SOCCOL et al., 2017; BARRIOS-GONZÁLES, 2012; ORLANDELLI et al., 2012).

A Tabela 1 apresenta alguns estudos realizados para a produção de proteases em fermentação submersa por espécies do gênero *Aspergillus*, utilizando diferentes condições abióticas. As maiores quantidades de proteases nesses estudos foram produzidas em condições de pH variando de 5,0 até 8,0, em temperaturas que variaram de 28°C até 35°C e entre 3 e 7 dias de cultivo. Os estudos de Belmessikh et al. (2013) e Sattar et al. (2019) apresentaram as maiores quantidades de proteases

obtidas por fermentação submersa, 2.343,5 U/g e 477 U/g respectivamente.

**Tabela 1** - Produção de proteases por diferentes espécies de *Aspergillus* a partir de fermentação submersa.

Microorganismo	Atividade		Meio de cultura	Referência
	Enzimática	Condições de Cultivo		
<i>A. oryzae</i> NRRL 2220	2.343,5 U/g	pH 6,8 / 30°C / 4 dias	Bagaço de tomate, farelo de trigo e NaCl	(BELMESSIKH et al., 2013)
<i>A. ochraceus</i> BT2	3,64 U/g	pH 8,0 / 35°C / 6 dias	Dextrina 30 g/L, peptona 2 g/L, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g/L, MgSO <sub>4</sub> 0,5 g/L, FeSO <sub>4</sub> 0,01 g/L.	(EL-KHONEZY et al., 2021)
<i>A. niger</i> KIBGE-IB36	477 U/g	pH 6,0 / 30°C / 5 dias	Peptona 20 g/L, Extrato de levedura 0,5 g/L, CaCl <sub>2</sub> 0,1 g/L, MgSO <sub>4</sub> 0,1 g/L e K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,3 g/L	(SATTAR et al., 2019)
<i>A. foetidus</i>	29,7 U/mL	pH 7,0 / 28°C / 7 dias	Caldo de Sabouraud 3 %, peptona 2 %, caseína 2 % e extrato de levedura 1 %.	(SOUZA et al., 2017)
<i>A. parasiticus</i>	48,63 U/mg	- / 30°C / 3 dias	Queratina 5 g/L	(ANITHA; PALANIVELU, 2013)
<i>A. niger</i> 9D40	57,0 U/mL	pH 5,0 / 32°C / 7 dias	3,5 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1,0 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g/L MgSO <sub>4</sub> , 0,1 KCl, 5 mg/L ZnSO <sub>4</sub> e penas de galinha	(MAZZOTTO et al., 2013)

Fonte: O próprio autor.

A fermentação em estado sólido ocorre em ambientes em que o microrganismo se desenvolve sem ou com pouco conteúdo de água livre (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). O meio sólido pode tanto servir como fonte nutricional para o crescimento do microrganismo ou apenas como suporte para que ele se desenvolva e produza metabólitos de interesse (SOCCOL et al., 2017; YAZID et al.2017; FARINAS, 2015).

A fermentação em estado sólido tem sido muito utilizada como uma alternativa sustentável para a produção de enzimas e outras substâncias, uma vez que apresenta maior produtividade, baixo consumo de energia, além de contribuir com a redução de resíduos industriais (YAZID et al., 2017; BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; CHEN; HE, 2012).

Os fungos filamentosos como aqueles do gênero *Aspergillus* sob fermentação em estado sólido apresentam vantagens quanto à produção de enzimas, como as proteases, por se assemelharem a sua forma natural de crescimento (OOI; RASIT; ABDULLAH, 2021; BELMESSIKH et al., 2013; DE CASTRO et al., 2015; SINGHANIA et al., 2010). A Tabela 2 apresenta alguns relatos quanto à produção de proteases por espécies do gênero *Aspergillus* sob fermentação em estado sólido, utilizando diferentes condições abióticas.

De acordo com os estudos da Tabela 2 é possível verificar que para a fermentação em estado sólido, os parâmetros temperatura e tempo de fermentação são os mais avaliados quanto a produção de proteases. Entretanto, dentre os estudos que avaliaram os melhores pHs do meio de cultivo para produção de proteases por fermentação em estado sólido, a variação dos pHs foi de 5,0 até 7,5. Para temperatura, a maior quantidade de proteases foi obtida entre 23 °C e 35 °C em fermentações que obtidas entre 2 até 7 dias. Os estudos de Belmessikh et al. (2013) e Purushothaman et al. (2019) apresentaram as maiores quantidades de proteases obtidas por fermentação em estado sólido, 21.309 U/g e 3.685 U/g respectivamente. Comparando os estudos das Tabelas 1 e 2, observa-se que a produção de proteases se deu em temperaturas, pHs e tempos de fermentação similares para microrganismos do gênero *Aspergillus*.

**Tabela 2** - Produção de proteases por fungos do gênero *Aspergillus* em fermentação em estado sólido.

Microrganismo	Atividade Enzimática	Condições de Cultivo	Meio de cultura	Referência
<i>A. niger</i>	3.685 U/g	- / 30° C / 7 dias	Farelo de trigo	(PURUSHOTHAMAN et al., 2019)
<i>A. niger</i>	67,7 U/g	pH 7,0 / 35° C / 3 dias	Farelo de arroz	(PARANTHAMAN, et al., 2009)
<i>A. awamori</i>	63,7 U/g	- / 30 ° C / 7 dias	Resíduo de pão	(MELIKOGLU; LIN; WEBB, 2013)
<i>A. awamori</i> IOC-3914	17,2 U/g	- / 30 °C / 4 dias	Resíduo de malte	(COSTA et al., 2021)
<i>A. niger</i>	3,7 U/mg	- / 35 °C / 5 dias	Cascas de camarão	(OOI; RASIT; ABDULLAH, 2021)
<i>A. niger</i>	262,78 U/g	- / 30 °C / 2 dias	Farelo de trigo e Farinha de soja (1:1)	(DE CASTRO et al., 2015)
<i>A. oryzae</i>	1200 U/g	pH 7,5 / 30 °C / 5 dias	Farelo de arroz e trigo (2:1)	(CHUTMANOP et al., 2008)
<i>A. oryzae</i> NRRL 2220	21309 U/g	pH 6,8 / 30 °C / 4 dias	Bagaço de tomate, caseína e NaCl	(BELMESSIKH et al., 2013)
<i>A. brasilienses</i>	2382 U/mL	- / 28 °C / 3 dias	Bagaço de malte, células vermelhas de suínos	(WERLANG SCHUSTER et al., 2019)
<i>A. niger</i> FFB1	870 U/g	pH 4,0 / 30 °C / 3 dias	Leite coagulado	(BENSMAIL et al., 2013)
<i>A. niger</i> 3T5B8	172,7 U/mL	pH 5,0 / 32 °C / 7 dias	Penas de galinha e farelo de trigo	(MAZZOTTO et al., 2013)

Fonte: O próprio autor.

O estudo de Belmessikh et al. (2013) comparou a produção de proteases produzidas por *A. oryzae* NRRL 2220 sob fermentação submersa e fermentação em estado sólido. O estudo demonstrou que a produção de proteases por fermentação em estado sólido foi aproximadamente 10 vezes maior que a produção obtida sob fermentação submersa.

#### 3.4. RESÍDUO DE MALTE COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES

O resíduo de malte é originário da indústria cervejeira, mais especificamente após o processo de maltagem da cevada, cereal geralmente usado na produção da bebida. Na maltagem, o grão de cevada passa por três processos: molha, germinação e secagem (MARTINS; RODRIGUES, 2015). O processo de maltagem do grão dura em torno de 6 a 7 dias e dá origem ao que se chama de grão maltado (grão de cevada germinado), que então é desbastado mecanicamente por meio de fresa (fresado) e seco a fim de estabilizar o grão. Esse processo é importante na produção da cerveja, pois permite que várias enzimas sejam produzidas ao mesmo tempo em que ocorre a liberação de amido, que servirá como nutriente para as leveduras durante o processo de fermentação para a produção do produto alcóolico (OLIVARES-GALVÁN; MARINA; GARCÍA, 2022; MARTINS; RODRIGUES, 2015).

Quatro resíduos são produzidos durante o processo de produção da cerveja: ratículas de cevada maltada, resíduos do grão gasto, resíduo de lúpulo e resíduo de fermento, sendo o resíduo do grão gasto o mais abundante, compreendendo em torno de 85 % do total de resíduos gerados durante a produção da cerveja (OLIVARES-GALVÁN; MARINA; GARCÍA, 2022). Em torno de 0,2 Kg de resíduo de grão gasto de malte é gerado por litro de cerveja produzida (PARCHAMI; FERREIRA; TAHERZADEH, 2021). O resíduo do grão gasto é obtido após a filtragem do malte misturado com água e é composto basicamente de cascas de cevada, restos de grânulos de amido do endosperma, entre outros materiais. É um material rico em fibras e lignocelulose presente na parede celular vegetal (em torno de 70 % do conteúdo do material), proteínas (15 % a 25 %) e compostos fenólicos, sendo pobre em vitaminas e minerais (MARCIAS-GARBETT et al., 2021; OLIVARES-GALVÁN; MARINA; GARCÍA, 2022; IKRAM et al., 2017).

Até o momento, poucos trabalhos exploraram o uso de microrganismos do gênero *Aspergillus* para produção de proteases a partir de resíduos de malte. Costa

et al. (2021) apresentaram estudo quantificando a produção de proteases em resíduo de malte por *Aspergillus awamori*. Além do resíduo de malte, os autores estudaram casca de semente de cacau e farelo de trigo como substrato para produção de proteases, sendo a maior produção, 17,2 U/g, obtida a partir do resíduo de malte após 72 horas de fermentação. Já o estudo de Werlang Schuster et al. (2019) obteve maior produção de proteases (1.785 U/mL) usando resíduo de malte enriquecido com células vermelhas de sangue de suínos após 3 dias de fermentação em estado sólido. O estudo de Leite, Belo e Salgado (2021) avaliou diversos resíduos agroindustriais, entretanto apenas na produção de *celulases*, *xilanases* e  $\beta$ -*glucosidases* e obteve maior produção dessas enzimas por *A. niger* usando resíduo de malte como substrato.

Contudo, diversos são os relatos utilizando outros resíduos como substrato para a produção de proteases. Tang et al. (2020), avaliaram o desempenho de *A. niger* e *A. oryzae* na produção de proteases por fermentação em estado sólido, com meio de cultivo contendo uma mistura de farelo de trigo com grão de soja macerada (4:1) e grão de feijão largo inteiro. Essa combinação de microrganismos produziu 605,2 U/g de proteases ácidas e 1.582,9 U/g de proteases neutras a 33 °C com 5 dias de fermentação. Purushothaman et al. (2019) cultivaram *A. niger* em farelo de trigo a 30 °C por 7 dias e obtiveram 3.685 U/g de proteases aspárticas. Paranthaman, Alagusundaram e Indhumathi (2009) avaliaram resíduo de arroz quebrado como meio de cultura para produção de proteases por *A. niger* MTCC 281. A maior quantidade de proteases foi de 67,7 U/g, nas condições de incubação a 35 °C, pH 7,0 em fermentação em estado sólido por período de 96 horas.

As condições ótimas para a produção de proteases por *A. niger*, em estudo realizado por Ooi, Rasit e Adbullah (2021) foram a 35 °C com umidade inicial de 60 % usando cascas de camarão como substrato em fermentação em estado sólido. A produção máxima de proteases foi de 3,7 U/mg. Usando a cepa *A. awamori* 2B. 361 U2/1 em resíduo de pão, Melikoglu, Lin e Webb (2013) produziram 63,7 U/g de atividade de proteases. Os resultados foram obtidos a partir de fermentação em estado sólido a 30 °C com incubação de 7 dias.

### 3.5. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE *Aspergillus welwitschiae*.

Os fungos filamentosos são usados em processos industriais para a produção de metabólitos e enzimas (Souza, et al., 2015). A maioria dos fungos filamentosos,

como os do gênero *Aspergillus*, se reproduzem de forma assexuada através da produção de conídios (SUGIHARTO, 2019; MADIGAN et al., 2009). Os conídios são produzidos em estruturas microscópicas chamadas de conidióforos que possuem em sua extremidade uma vesícula rodeada de fiáides (ROMERO; GIUDICESSI; VITALE, 2021). Macroscopicamente, os conídios podem apresentar diferentes colorações, como amarelo, branco, marrom, cinza, verde e preto, e texturas tipo aveludada, por exemplo (ROMERO; GIUDICESSI; VITALE, 2021; PARK et al., 2017; SAMSON et al., 2014).

*Aspergillus* pertencem à classe dos hifomicetos, filo *Ascomycota*, ordem *Eurotiales*, família *Trichocomaceae* (KLICH, 2002). A atual classificação do gênero é constituída por seis subgêneros: *Aspergillus*, *Fumigati*, *Nidulante*, *Cremeri*, *Polypaecilum* e *Circumdati* e 27 seções, sendo a seção *Nigri* parte do subgênero *Circumdati* (HOUBRAKEN et al., 2020; GAUTIER; NORMAND; RANQUE, 2016). Essa seção é composta de 10 espécies, conhecidas como “agregado *niger*”, com características muito semelhantes entre si, não sendo distinguíveis morfológicamente (D’HOOGE et al., 2019; SUSCA et al., 2016). A espécie *A. awamori* foi renomeada por Hong et al. (2013) a *A. welwitschiae* e pertencente ao “agregado *niger*”, assim como *A. niger*.

Algumas espécies da seção *Nigri* podem produzir micotoxinas como ocratoxinas e fumonisinas (MINCUZZI et al., 2020; SANZANI; REVERBERI; GEISEN, 2016; KOSTARELOU et al., 2014; SUSCA et al., 2010). Os estudos de Massi et al. (2016) e Vanzela et al. (2020) demonstraram que ambas as espécies da seção *Nigri*, *A. niger* e *A. welwitschiae* possuem genes associados às vias metabólicas de produção de ocratoxina A e/ou fumonisina B2. Contudo, as linhagens de *A. welwitschiae* estudadas por Bossa (2020) e Fernandes (2021), foram avaliadas por Vanzela et al (2020) como seguras quanto ao potencial de produção de ambas micotoxinas, uma vez que não apresentaram os genes associados à produção de ocratoxina A e fumonisina B2. A linhagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 foi avaliada como produtora de ácido cítrico por Landgraf (2021) e como produtora de amilases por Ribeiro et al. (2021), porém seu potencial para a produção de proteases ainda não foi avaliado. Sendo assim, o seu uso para a produção de proteases pode ser avaliado.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para a realização desse trabalho utilizou-se a linhagem selvagem de *A. welwitschiae* UELAs 15.262, isolada de bulbos de alho comercializados no Brasil. A linhagem foi caracterizada por Vanzela et al. (2020) quanto à ausência de genes para produção de ocratoxina A e fumonisina B2. A linhagem foi ativada em placas de Petri, contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e incubada por 96 horas a 28 °C.

### 4.2. RESÍDUO DE MALTE

O resíduo de malte foi coletado na INBEB (Industrial Norte Paranaense de Bebidas) na cidade de Londrina, sendo imediatamente transportado a 25 °C. Foi então distribuído em bandejas com dimensão de 50 cm x 30 cm x 5 cm e após ser coberto com papel alumínio foi seco a 50 °C por 72 horas, sendo homogeneizado periodicamente.

### 4.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ABIÓTICOS

A avaliação da temperatura e do pH ideal para produção de proteases foi conduzida de acordo com o planejamento Composto Central Rotacional (CCR), como demonstrado na Tabela 3. As temperaturas selecionadas foram 28 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 42 °C e os pHs selecionados foram 4,2, 5,0, 7,0, 9,0 e 9,8. Todas as avaliações foram feitas em triplicata experimental.

**Tabela 3** - Níveis codificados dos fatores avaliados no planejamento composto central rotacional.

Fatores	Símbolo	Níveis codificados				
		-1,414	-1	0	+1	+1,414
Temperatura (°C)	X <sub>1</sub>	28	30	35	40	42
pH	X <sub>2</sub>	4,2	5,0	7,0	9,0	9,8

**Fonte:** O próprio autor.

#### 4.4. PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *A. welwitschiae* SOB FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A linhagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 foi submetida a fermentação em estado sólido usando como substrato resíduo de malte. Um total de 1,4 g do resíduo de malte seco foi adicionado a frascos Erlenmeyer de 50 mL. Cada frasco foi umedecido com tampão fosfato-salino (PBS) 0,015 M (NaCl 5 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L) com pH corrigido para o valor pré-determinado pelo CCR, e inoculado com 10<sup>7</sup> conídios da linhagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 (VANZELA et al., 2020). Os frascos foram incubados por 4 dias em temperaturas distintas, de acordo com o CCR.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASES

As avaliações da produção de proteases por *A. welwitschiae* UELAs 15.262 foram analisadas no dia 0 (sem incubação – controle) e no quarto dia de fermentação. Foram retiradas triplicatas para avaliação da influência dos parâmetros na produção de proteases por *A. welwitschiae* UELAs 15.262. O extrato bruto enzimático (EBE) foi obtido pela adição de 30 mL de água destilada em cada frasco Erlenmeyer contendo o material fermentado. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 60 minutos. O material foi então filtrado com papel Whatman n°1, acoplado a um sistema de filtração a vácuo. O EBE foi armazenado em -20 °C até a etapa de quantificação da atividade de proteases.

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES

A atividade de proteases foi determinada de acordo com o método descrito por Charney e Tomarelli (1947), com algumas modificações. A mistura reacional foi composta de 500 µL do EBE e 500 µL de solução de azocaseína (0,5 %) (Sigma Aldrich) diluída em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. Esta mistura foi incubada por 40 minutos em banho Maria à 37 °C. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) (10 %) e centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. Então, 1 mL do sobrenadante, foi transferido para novo tubo de ensaio e 1 mL de KOH 5,0 M foi adicionado ao produto da reação. A absorbância das amostras foi obtida a 430 nm. Uma unidade de atividade de proteases (U) foi

determinada como a variação de 0,01 na absorbância por mL de extrato bruto, de acordo com a fórmula a seguir.

$$U/mL = \frac{Abs \times 2}{0,01}$$

U/mL = Unidade de Atividade Enzimática por mL de EBE

Abs = Absorbância em 430 nm

#### 4.7. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PROTEASES

A cinética de produção de proteases foi avaliada a partir de parâmetros abióticos descrito no Item 4.3 que apresentaram produção significativa de proteases, com o intuito de determinar o tempo para a maior produção destas enzimas por *A. welwitschiae* UELAs 15.262.

Para isso, foram realizadas fermentações conforme a metodologia descrita no Item 4.4. A cinética da produção de proteases foi analisada do dia 0 (sem incubação – controle) até o quarto dia, sendo retiradas triplicatas a cada 24 horas para a extração do EBE, coletado como descrito no Item 4.5. Cada um dos EBEs foi submetido a avaliação da atividade de proteases. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO EM MEIO SÓLIDO

A partir dos resultados obtidos nas etapas anteriores, as melhores condições de produção de proteases foram selecionadas a fim de avaliar a atividade de proteases do EBE em meio ágar-leite.

O EBE foi liofilizado e diluído em 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS) 0,015 M. A atividade de proteases do EBE foi realizada de acordo com o método descrito por Charney e Tomarelli (1947), citado no Item 4.7.

A avaliação da atividade de proteases do EBE liofilizado foi realizada em meio ágar contendo 1 % de leite em pó. Para a obtenção do meio foi preparado 160 mL de solução de ágar 1,8 %, diluído em tampão citrato 50 mM, pH 5,0, que foi aquecido até a total dissolução do ágar. Em seguida, o ágar ainda líquido foi misturado com 20 mL

de solução de leite em pó 10 % levemente aquecido.

Em placas de Petri contendo meio de cultura descrito acima, foram feitos três poços com 5 mm de diâmetro. Os poços foram preenchidos com 6,5 U/mL/poço do EBE. Em seguida as placas foram incubadas a 25 °C e 37 °C por 24 h. Nos tempos de 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h de incubação, foram feitas avaliações em milímetros (mm) do diâmetro do halo de degradação por proteases. Cada condição de tempo e temperatura foi avaliada em duplicata.

#### 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o Software R (R CORE TEAM, 2021). Para os modelos apresentados a partir do planejamento composto central rotacional, a qualidade de ajuste da equação foi expressa pelo coeficiente de determinação ajustado  $R_{ajustado}^2$  e sua significância estatística foi avaliada pelo teste F. Os pressupostos dos modelos, normalidade e homogeneidade de variância dos resíduos, foram validados, ao nível de significância de 5 %, pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965), teste de Breusch-Pagan (BREUSCH; PAGAN, 1979) e análise gráfica, respectivamente.

As variáveis respostas do planejamento composto central rotacional foi descrita conforme função polinomial de segunda ordem (Equação 1):

$$y_{ij} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon_{ij} \quad (\text{Equação 1})$$

onde,  $y_{ij}$  é a resposta predita,  $\beta$  são os parâmetros cujos valores devem ser determinados,  $i$  e  $j$  variam de 1 a  $k$  variáveis,  $x_i$  e  $x_j$  são as variáveis independentes definidas em escala codificada de -1 a +1, e  $\epsilon_{ij}$  é o termo de erro aleatório. As estimativas dos parâmetros neste modelo de regressão estão relacionadas com as estimativas de efeito (MONTGOMERY, 2013). A significância dos parâmetros e suas interações foram testadas pela análise de variância (ANOVA).

Para comparações de médias foi utilizado o teste de Tukey ao nível de significância de 5 %.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ABIÓTICOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES

A otimização da produção de proteases produzida a partir de microrganismos por fermentação em estado sólido pode ser obtida avaliando parâmetros como temperatura, pH do meio de cultivo, tipo de nutriente e tempo de fermentação. Essa avaliação é de grande importância uma vez que a produção de enzimas com meios otimizados e de menor custo tem sido de grande interesse na indústria (FERNANDES, et al., 2021; MUTHULAKSHMI et al., 2020). A utilização de resíduos agroindustriais ricos em proteínas, pode ser explorado como fonte de nutrientes de menor custo para a produção de proteases. O resíduo de malte, abundante rejeito da indústria cervejeira, se enquadra nesse padrão, uma vez que possui entre 15 % e 25 % de proteínas em sua composição (OLIVARES-GALVÁN; MARINA; GARCÍA, 2022; IKRAM et al., 2017).

Entre as espécies/linhagens utilizadas como produtoras de proteases encontra-se *A. niger* (WERLANG SCHUSTER et al., 2019; BENSMAIL; MECHAKRA; FAZOUANE-NAIMI, 2015; DE CASTRO; NISHIDE; SATO, 2014). *A. welwitschiae*, renomeado por Hong et al. (2013) exibe características morfológicamente indistinguíveis de *A. niger*. Ambas as espécies são descritas como produtoras de micotoxinas como Ocratoxina A e/ou Fumonisina B<sub>2</sub> (SANZANI et al., 2016; KOSTARELOU et al., 2014; SUSCA et al., 2010). Não obstante, o estudo de Massi et al. (2016) apresenta que é inteiramente aplicável a associação entre potencial para produção de micotoxinas e genótipo negativo para *A. welwitschiae*.

Nesse sentido, dentre as linhagens de *A. welwitschiae* identificadas por Vanzela et al. (2020) que não apresentaram genes associados a produção de tais micotoxinas, *A. welwitschiae* UELAs 15.262 foi avaliada por Ribeiro et al. (2021) como boa produtora de amilases. Sendo assim, neste trabalho foi avaliada a produção de proteases pela linhagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 usando resíduo de malte como fonte nutricional de baixo custo.

A produção de proteases por *A. welwitschiae* UELAs 15.262 utilizando resíduo de malte como fonte nutricional foi avaliada após 4 dias de cultivo por fermentação em estado sólido em diferentes condições de temperatura e pH, estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Atividade de *proteases* por *A. welwitschiae* UELAs 15.262, conforme parâmetros abióticos estabelecidos pelo Planejamento Composto Central Rotacional.

Ensaio	Níveis dos Fatores		Atividade de proteases (U/mL)
	Temperatura (X <sub>1</sub> )	pH (X <sub>2</sub> )	
1	35 °C	9,8	95,95 ± 1,08
2	28 °C	7,0	70,81 ± 12,28
3	42 °C	7,0	48,85 ± 1,56
4	35 °C	7,0	94,72 ± 3,27
5	30 °C	9,0	91,65 ± 4,10
6	40 °C	5,0	58,52 ± 3,35
7	35 °C	4,2	91,05 ± 5,71
8	40 °C	9,0	60,70 ± 1,66
9	30 °C	5,0	87,72 ± 1,57

Cada valor representa a média das triplicatas ± desvio padrão.

**Fonte:** O próprio autor.

O modelo codificado proposto (Equação 2) explicou 88 % da variabilidade dos dados.

$$y = 93,013 - 11,401x_1 + 1,609x_2 - 17,182x_1^2 \quad (\text{Equação 2})$$

Os pressupostos do modelo, normalidade (Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ) e homogeneidade de variância (Breusch-Pagan,  $p > 0,05$ ) dos resíduos foram atendidos e a falta de ajuste não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Apenas a temperatura apresentou efeito significativo para os termos linear e quadrático para a atividade de proteases (Tabela 5). O pH não foi significativo, sendo mantido o termo linear para o ajuste do modelo.

Os gráficos de superfície de resposta foram desenvolvidos mapeando a atividade de proteases em contraste com os parâmetros temperatura e pH. Conforme exibido da Figura 2, obteve-se uma região ótima de produção de protease entre 30 °C e 35 °C. Entretanto, quando se avalia a variação do pH, a natureza linear observada no gráfico para esse parâmetro demonstra que nas condições avaliadas o parâmetro não foi significativo.

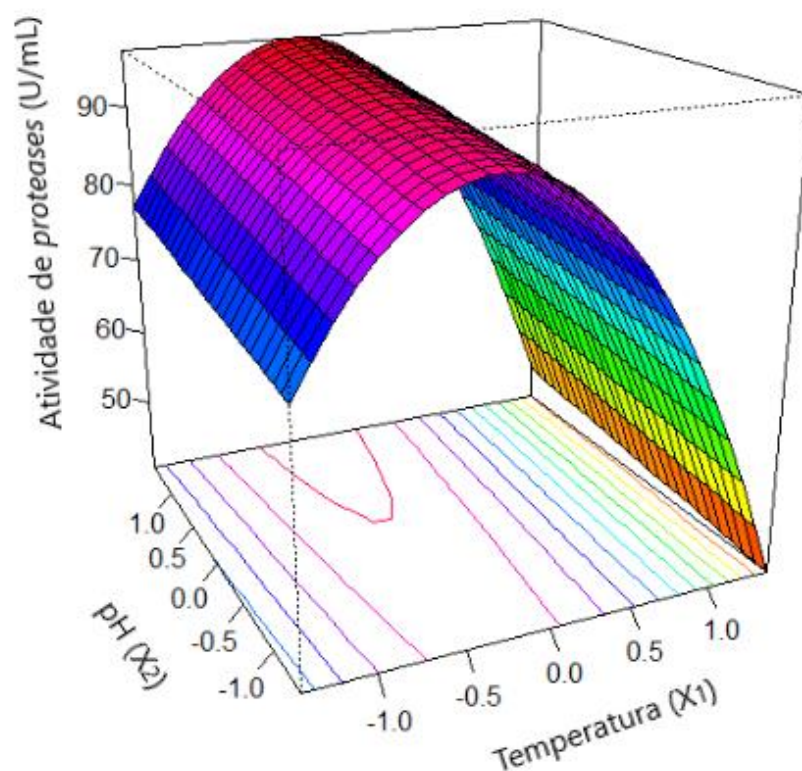
**Tabela 5** - Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de proteases por *A. welwitschiae* UELAs 15.262.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P-valor
Temperatura (L)	3119,4	1	3119,4	83,846	< 0,001
pH (L)	7,5	1	7,5	0,202	0,6575
Temperatura (Q)	4064,9	1	4064,9	109,261	<0,001
Erro	818,5	22	37,2		
Total SS	8016	25			

\*Significativos para valores de  $p < 0,05$ ; L=linear; Q=quadrático

Fonte: O próprio autor.

**Figura 2** –Superfície de resposta para a atividade de proteases (U/mL), produzidas por *A. welwitschiae*, mostrando a interação dos efeitos pH ( $X_1$ ) e temperatura ( $X_2$ ).



Fonte: O próprio autor.

A linhagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 apresentou produção de proteases

em todas as condições avaliadas pelo planejamento composto central rotacional, com variação de  $48,85 \pm 1,56$  U/mL obtida a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0 até  $95,95 \pm 1,08$  U/mL, a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  em pH 9,8. Entretanto, as condições que apresentaram produção de proteases próxima à região ótima foram  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 9,8 ( $95,95 \pm 1,08$  U/mL),  $94,72 \pm 3,27$  U/mL ( $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0),  $91,65 \pm 4,10$  U/mL ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 9,0),  $91,05 \pm 5,71$  U/mL ( $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 4,2) e  $87,72 \pm 1,57$  U/mL ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 5,0). Resultados semelhantes foram encontrados por Bensmail, Mechakra e Fazouane-Naime (2015) ao avaliarem a produção de proteases por *A. niger*, em meio de leite coagulado, cuja maior produção de proteases sob fermentação em estado sólido foi obtida a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na mesma condição, Costa et al. (2021) também detectaram maior produção de proteases por *A. awamori* IOC-3914 em 4 dias de fermentação em estado sólido em resíduo de malte. No estudo de Melikoglu et al. (2013) usando resíduo de pão sob fermentação em estado sólido, também foi detectada maior produção de proteases a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por *A. awamori*. A produção de proteases usando cascas de camarão como meio de cultivo em fermentação em estado sólido, resultou na maior produção de proteases a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Ooi et al., 2021).

A fermentação em estado sólido tem sido muito utilizada para a produção de proteases, pois pode apresentar baixo consumo de energia quando não utiliza biorreatores e apresenta maior facilidade de usar resíduos agroindustriais como fonte nutricional, o que pode acarretar num menor custo do processo (YAZID et al., 2017; CHEN; HE, 2012). Por outro lado, esse tipo de fermentação apresenta desvantagem quanto a maior dificuldade de controle dos parâmetros abióticos durante o processo fermentativo, dentre eles o pH (SOCCOL et al., 2017; BARRIOS-GONZÁLES, 2012). Muthulakshmi et al. (2011) usaram *A. flavus* para produzir proteases por fermentação em estado sólido em pH inicial 7,0 e obtiveram maior produção de proteases no sétimo dia de fermentação. O estudo de Paranthaman et al., (2009) avaliou o pH inicial do meio de cultivo em fermentação em estado sólido usando resíduos de arroz para a produção de proteases por *A. niger* e obteve maior produção em condições de temperatura a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 7,0 em 4 dias de fermentação.

Conforme os dados obtidos pelo planejamento CCR, as temperaturas de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foram selecionadas para a avaliação do tempo de produção de proteases, com auxílio de uma cinética de produção destas enzimas. Apesar do pH não apresentar influência significativa na produção de proteases nesse estudo, foi mantida a

avaliação da produção de proteases sob pHs ácido e básico, a fim de verificar se há diferença entre o grupo de proteases produzidas nessas condições. Sendo assim, as condições selecionadas foram: 35 °C em pH 9,8, 30 °C em pH 9,0, 35 °C em pH 4,2 e 30 °C em pH 5,0.

## 5.2. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *A. welwitschiae* UELAs 15.262

A partir dos resultados obtidos do planejamento composto central rotacional, foi possível selecionar as melhores condições de cultivo para produção de proteases. Essas condições foram novamente utilizadas para uma nova fermentação em resíduo de malte no tempo de quatro dias, onde observou-se a maior produção dessas enzimas.

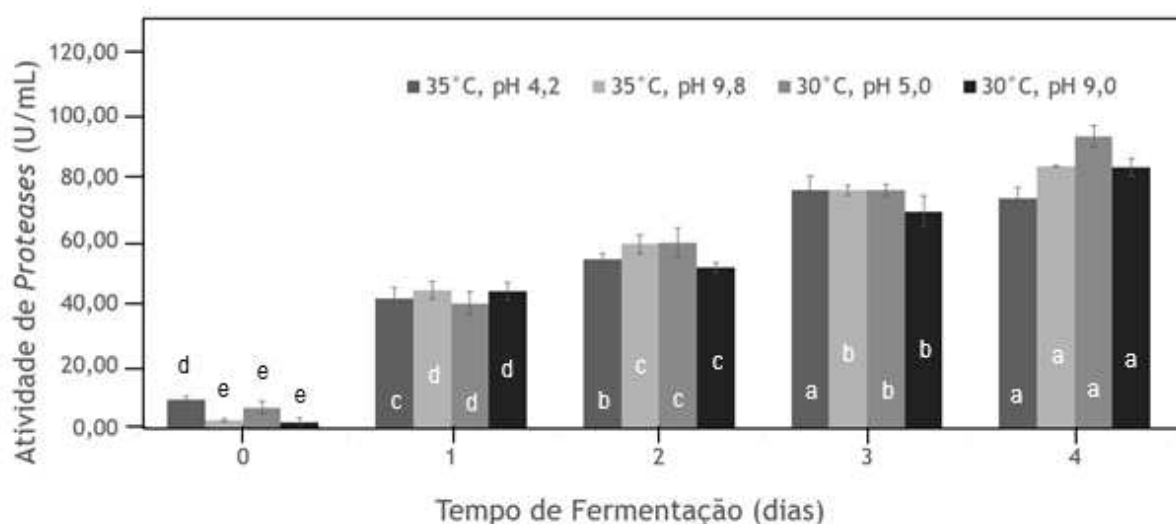
A avaliação dos extratos brutos coletados a cada 24 horas permitiu verificar que a linhagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 produziu proteases a partir do primeiro dia de fermentação. A produção de proteases aumentou significativamente de maneira tempo dependente a partir do primeiro até o quarto dia de fermentação, conforme demonstrado na Figura 3 e Tabela 6. Apenas a condição de produção 35 °C pH 4,2, apresentou pequena diminuição da atividade de proteases no quarto dia de fermentação, entretanto essa diferença não foi significativa.

Os estudos de Paranthaman et al. (2009) e de Costa et al. (2021), corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, onde os autores também detectaram maior produção destas enzimas no quarto dia de fermentação. O estudo de De Castro et al. (2015) avaliou a produção de proteases por *A. niger* utilizando farelo de algodão e farelo de trigo, resíduos com porcentagem de proteínas similares ao resíduo de malte. Em ambos os resíduos, a maior produção de proteases foi obtida no quarto dia de fermentação. Em contraste, a maior produção de proteases foi obtida no terceiro dia de fermentação no estudo de Bensmail et al. (2015), a partir de fermentação em estado sólido por *A. niger* usando resíduo de leite coagulado.

Ambas as temperaturas 30 °C e 35 °C foram eficazes quanto a produção de proteases por *A. welwitschiae* UELAs 15.262 a partir do resíduo de malte, nos quatro dias de fermentação. Conforme a Tabela 6, a maior produção de proteases para a condição a 35 °C, pH 4,2, foi obtida no terceiro dia de fermentação,  $76,27 \pm 4,36$  U/mL, não apresentando diferença significativa entre o resultado do terceiro e quarto dia. Entretanto, para todos os outros parâmetros abióticos selecionados, a 30 °C, pH 5,0,

a 35 °C, pH 9,8 e a 30 °C, pH 9,0, a maior produção de proteases ocorreu no quarto dia de fermentação, obtendo  $93,27 \pm 3,55$  U/mL,  $83,67 \pm 0,27$  U/mL,  $83,47 \pm 2,83$  U/mL, respectivamente.

**Figura 3** - Cinética de produção de proteases produzidas por *A. welwitschiae* UELAs 15.262 em resíduo de malte durante 4 dias de fermentação em estado sólido.



Letras diferentes em cada condição (35 °C, pH 9,8 / 30 °C, pH 9,0 / 35 °C, pH 4,2 / 30 °C, pH 5,0) indicam diferença significativa na atividade de proteases (ANOVA seguida de teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Fonte:** O próprio autor.

**Tabela 6** – Cinética da produção de proteases por *A. welwitschiae* UELAs 15.262 em resíduo de malte.

Tempo de Fermentação (dias)	Atividade de proteases (U/mL)			
	35 °C, pH 4,2	35 °C, pH 9,8	30 °C, pH 5,0	30 °C, pH 9,0
0 (controle)	$9,23 \pm 1,12$ <sup>d</sup>	$2,62 \pm 0,49$ <sup>e</sup>	$7,90 \pm 0,28$ <sup>e</sup>	$3,25 \pm 0,92$ <sup>e</sup>
1	$41,43 \pm 3,52$ <sup>c</sup>	$44,15 \pm 2,66$ <sup>d</sup>	$40,00 \pm 3,50$ <sup>d</sup>	$43,77 \pm 2,74$ <sup>d</sup>
2	$54,07 \pm 1,75$ <sup>b</sup>	$58,85 \pm 2,92$ <sup>c</sup>	$59,40 \pm 4,82$ <sup>c</sup>	$51,55 \pm 1,48$ <sup>c</sup>
3	$76,27 \pm 4,36$ <sup>a</sup>	$76,09 \pm 1,67$ <sup>b</sup>	$76,13 \pm 1,66$ <sup>b</sup>	$69,33 \pm 4,82$ <sup>b</sup>
4	$73,34 \pm 3,48$ <sup>a</sup>	$83,67 \pm 0,27$ <sup>a</sup>	$93,27 \pm 3,55$ <sup>a</sup>	$83,47 \pm 2,83$ <sup>a*</sup>

\*Cada valor representa a média das triplicatas  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa na atividade de proteases (ANOVA seguida de teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Fonte:** O próprio autor.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO OBTIDO POR *A. welwitschiae* UELAs 15.262

Biocatalizadores enzimáticos como “tecnologia verde” tem se tornado uma solução adequada para substituir os catalizadores químicos na indústria (MORELLON-STERLIN, 2020; VERMA et al., 2016).

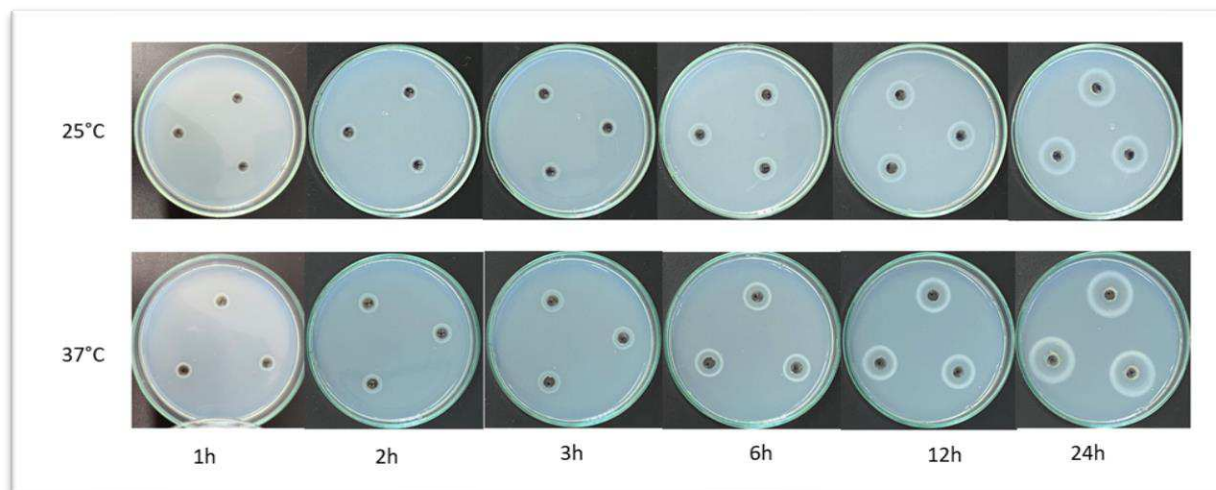
O uso de proteases como biocatalizadores enzimáticos é de grande importância biotecnológica, uma vez que tais enzimas podem ser aplicadas em diversas áreas da indústria, entre elas na indústria farmacêutica, de cosméticos, têxtil, alimentícia ou na produção de detergentes enzimáticos (NAVEED et al., 2020; SOUZA et al., 2015). Na indústria alimentícia as proteases têm sido aplicadas no processamento de alimentos, como na moagem de cereais, fabricação da cerveja, na produção de hidrolisados de proteína, na mudança das características viscoelásticas de massas, entre outras (TAVANO, 2013; WARD, 2011). Na indústria de laticínios, as proteases têm grande aplicação na produção de queijo, principalmente na etapa da coagulação, hidrolisando ligações peptídicas específicas gerando macro peptídeos (MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2016; SOUZA, et al., 2015). Outro uso de proteases na indústria de laticínios é a sua associação com detergentes para a limpeza de superfícies que sofrem com o depósito de sujeira durante o tratamento térmico do leite (BOYCE; WALSH, 2012).

A atividade das proteases pode ser avaliada de forma mais barata e rápida usando meio sólido contendo uma fonte proteica como substrato. Várias fontes proteicas são utilizadas para avaliar a atividade de proteases, desde gelatina ou leite em pó até fontes como plasma e células vermelhas de sangue de suínos (USMAN; MOHAMMED; MAMO, 2021; BELLAOUCHI et al., 2021; BAGGIO et al., 2019; WERLANG SCHUSTER et al., 2019). Neste sentido, para avaliar o desempenho do EBE liofilizado contendo as proteases na degradação de proteínas, foi realizado a avaliação de atividade de proteases em meio de cultura contendo leite em pó como substrato.

Para isso, os EBEs obtidos do quarto dia de fermentação a 35 °C pHs 4,2 e 9,8 foram liofilizados e então utilizados na avaliação da atividade das proteases em meio de cultura contendo leite em pó a 1 %. O EBE obtido em 35 °C, pH 4,2 foi nomeado como amostra 1 e o EBE obtido em 35 °C, pH 9,8 foi chamado de amostra 2. Nas figuras 4 e 5, foi possível observar a formação dos halos de degradação por proteases

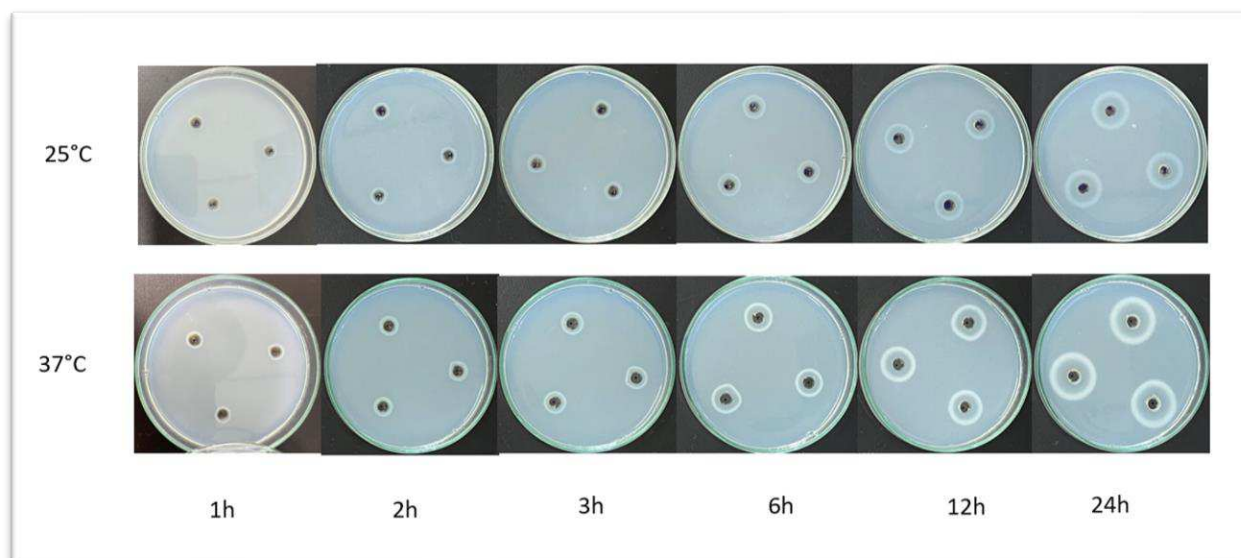
avaliados a 25 °C e 37 °C, nos períodos de tempos de 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h.

**Figura 4** - Halo de degradação de proteases produzidas por *A. welwitschiae* UEL 15.262. As proteases (6,5 U/mL) foram obtidas a pH 4,2 a 35 °C (Amostra 1).



Fonte: O próprio autor.

**Figura 5** - Halo de degradação de proteases produzidas por *A. welwitschiae* UEL 15.262. As proteases (6,5 U/mL) foram obtidas a pH 9,8 a 35 °C (amostra 2).



Fonte: O próprio autor.

As médias das áreas dos halos de degradação de proteases em meio leite em pó, estão apresentadas na Tabela 7. Os resultados mostram que a partir entre 1 hora

e 24 horas houve aumento da área do halo de degradação de proteases em ambas as temperaturas analisadas, indicando que as enzimas permaneceram ativas.

**Tabela 7** - Halos de degradação por proteases produzidas por *A. welwitschiae* UEL 15.262 em meio de cultura contendo leite em pó como substrato.

Temperatura	Amostra	Áreas de degradação por proteases (mm <sup>2</sup> )					
		1 h	2 h	3 h	6 h	12 h	24 h
37 °C	1	17,18 <sup>e</sup> ± 0,92	30,99 <sup>de</sup> ± 0,75	45,70 <sup>d</sup> ± 3,58	82,11 <sup>c</sup> ± 3,77	129,78 <sup>b</sup> ± 5,82	226,44 <sup>a</sup> ± 7,06
	2	20,05 <sup>e</sup> ± 1,20	34,38 <sup>de</sup> ± 2,03	45,93 <sup>d</sup> ± 2,53	83,40 <sup>c</sup> ± 4,78	145,83 <sup>b</sup> ± 4,30	247,73 <sup>a</sup> ± 11,23
25 °C	1	10,24 <sup>f</sup> ± 0,37	21,50 <sup>e</sup> ± 2,15	31,81 <sup>d</sup> ± 0,42	57,86 <sup>c</sup> ± 1,73	99,41 <sup>b</sup> ± 3,75	164,85 <sup>a</sup> ± 1,75
	2	9,80 <sup>f</sup> ± 0,22	19,05 <sup>e</sup> ± 0,82	32,50 <sup>d</sup> ± 1,15	53,65 <sup>c</sup> ± 1,88	95,36 <sup>b</sup> ± 3,26	152,03 <sup>a</sup> ± 2,59

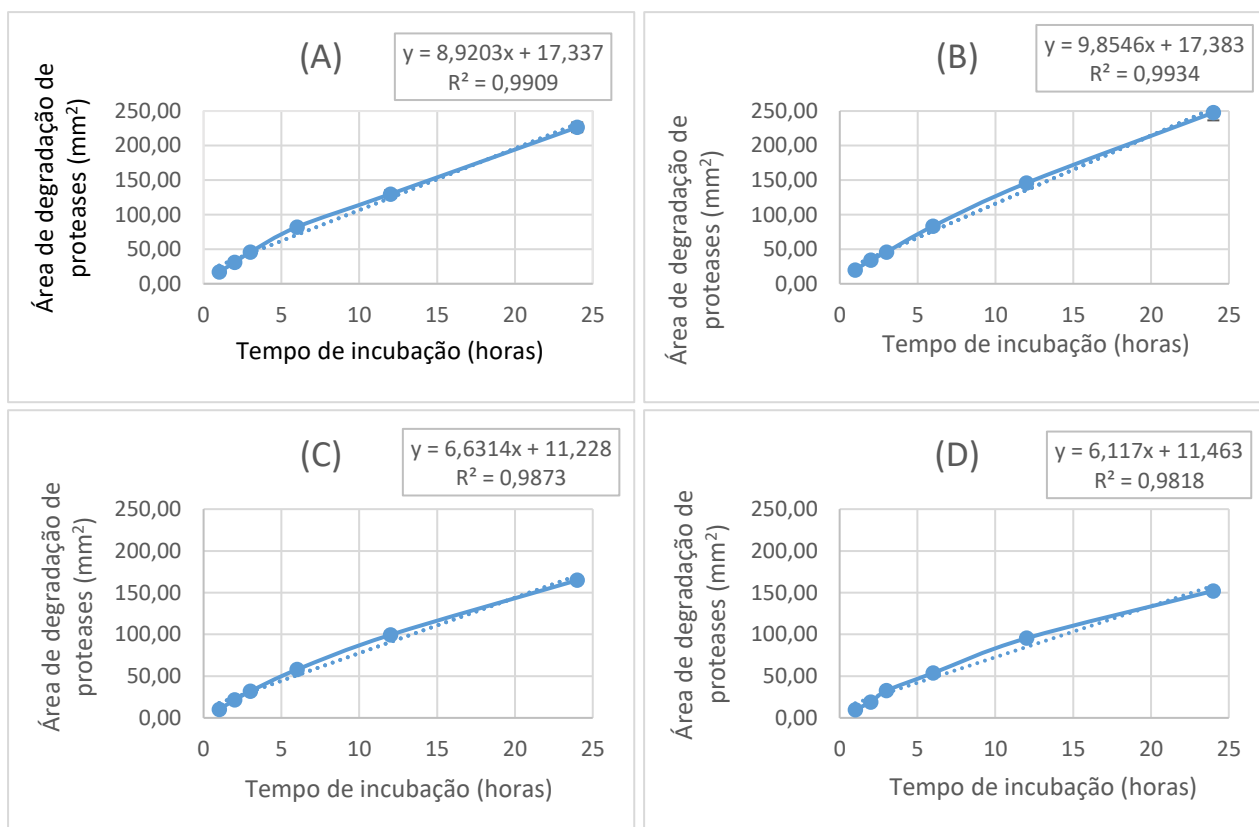
Cada valor representa a média das triplicatas ± desvio padrão. Letras diferentes em cada linha indicam diferença significativa na atividade de proteases (ANOVA seguida de teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Fonte:** O próprio autor.

O aumento da área do halo de degradação das proteases para ambas as amostras incubadas a 37 °C foi muito similar até o período de 24 horas. Houve aumento de aproximadamente 15 mm<sup>2</sup>/hora na área do halo de degradação de proteases nas primeiras três horas de incubação. A partir de 3 horas a taxa de degradação do substrato, reduziu para 12 mm<sup>2</sup>/hora, atingindo 8 mm<sup>2</sup>/hora entre 6 e 24 horas de incubação. Esse padrão pode ser observado na Figura 06 (A e B).

Nas avaliações realizadas a 25 °C, observou-se o mesmo padrão de gradativa queda da taxa de degradação pelas proteases a partir de 3 horas de incubação. No entanto, a área de degradação foi menor do que o observado a 37 °C. Entre 1 hora e 3 horas de incubação com EBE a 25 °C houve aumento de 10 mm<sup>2</sup>/hora do halo de degradação de proteases. Entre 3 horas até 12 horas de incubação com as proteases, houve redução média do halo de 7 mm<sup>2</sup>/hora, atingindo 5 mm<sup>2</sup>/hora nas últimas 12 horas de incubação com as proteases (Figura 06, C e D).

**Figura 6** – Áreas de degradação por proteases (mm<sup>2</sup>) por tempo de incubação (horas). (a) Halos de degradação da amostra 1 em 37 °C. (b) Halos de degradação da amostra 2 em 37 °C. (c) Halos de degradação da amostra 1 em 25 °C. (d) Resultados da amostra 2 em 25 °C.



**Fonte:** O próprio autor.

Comparando os resultados obtidos para cada amostra nas temperaturas avaliadas, observou-se que a 25 °C o halo de degradação por proteases foi reduzido cerca de 30 % em relação à avaliação dos halos de degradação a 37 °C. Estes dados indicam que entre as temperaturas avaliadas, o grupo de proteases produzidas por *A. welwitschiae* UELAs 15.262 apresentou maior atividade a 37 °C.

No estudo de Li et al. (2014), ao avaliar a ação de proteases purificadas sob temperaturas de 35 °C a 65 °C, os autores verificaram maior atividade catalítica a 40 °C. Chimbekujwo et al. (2020) detectaram maior atividade de proteases purificadas, produzidas por *A. brasilienses*, em temperaturas de 40 °C notando um aumento gradual de atividade catalítica a partir de 30 °C até atingir máxima catálise a 40 °C. Melikoglu et al. (2013) ao avaliarem a ação de proteases purificadas obtidas a partir de *A. awamori* em temperaturas entre 30 °C até 100 °C, os autores observaram

aumento gradual da atividade de proteases entre temperaturas de 30 °C até 50 °C.

Neste estudo, a avaliação da atividade de proteases do EBE utilizando leite em pó como substrato foi eficaz quanto a ação catalítica de proteases em tais condições. Apesar dos estudos avaliando a atividade de proteases trabalharem com as enzimas purificadas foi possível observar que mesmo não purificadas, as proteases produzidas pela linhagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 demonstraram melhor desempenho em temperatura mais elevada.

## 6 CONCLUSÕES

A linhagem de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 utilizada neste estudo, apresentou produção de proteases a partir de resíduo de malte. Dentre os parâmetros abióticos avaliados, apenas a temperatura apresentou influência na produção de proteases.

Dentre as temperaturas avaliadas quanto à maior produção de proteases por *A. welwitschiae* UELAs 15.262, 30 °C e 35 °C foram significativas e sob tais condições a maior quantidade de proteases obtida foi  $95,95 \pm 1,08$  U/mL, a 35 °C em pH 9,8. A partir da cinética de produção de proteases foi possível identificar maior atividade de proteases foi obtida no quarto dia.

A ação catalítica das proteases contidas no EBE foi mais eficiente a 37 °C, com a enzima mantendo-se ativa por 24 horas. Dessa forma, conclui-se que a seleção de parâmetros abióticos associados à linhagem UELAs 15.262 é de grande importância para maior produção de proteases usando resíduos de baixo custo, como o resíduo de malte.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL WAHAB, W. A.; AHMED, S. A. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 447–458, ago. 2018.

AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. Under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 977–981, abr. 2004.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, n. 2, p. 214–220, abr. 2013.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175–185, fev. 2012.

BAGGIO, L. M.; PANAGIO, L.A.; GASPARIN, F. G. M.; SARTORI, D.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BALDO, C. Production of fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes by a strain of *Penicillium* sp. Isolated from contaminated soil with industrial effluent. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 41, n. 1, p. 40606, 22 maio 2019.

BELLAOUCHI, R.; ABOULOIFA, H.; ROKNI, Y.; HASNAOUI, A.; GHABBOUR, N.; HAKKOU, A.; BECHCHARI, A.; ASEHRAOU, A. Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 31 mar. 2021.

BELMESSIKH, A.; BOUKHALFA, H.; MECHAKRA-MAZA, A., GHERIBI-AOULMI, Z., AMRANE, A. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged

fermentations on tomato pomace. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 3, p. 377–385, maio 2013.

BENSMAIL, S.; MECHAKRA, A.; FAZOUANE-NAIMI, F. Optimization of milk-clotting *protease* production by a local isolate of *Aspergillus niger* ffb1 in solid-state fermentation. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 04, n. 05, p. 467–472, 1 abr. 2015.

BOSSA, L. F. **Produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus welwitschiae***. 2020. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, 171(2), 501-505, 1947.

CHEN, H.; HE, Q. Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 12, p. 1619–1625, 28 ago. 2012.

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, jul. 2020.

CHIN, Y. L.; CHAI, K. F.; CHEN, W. N. Upcycling of brewers' spent grains via solid-state fermentation for the production of protein hydrolysates with antioxidant and techno-functional properties. **Food Chemistry: X**, v. 13, p. 100184, 30 mar. 2022.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, Y. C., SRINOPHAKUN, P. *Protease* production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 7, p. 1012–1018, 2008.

COSTA, R. S.; DE ALMEIDA, S. S.; CAVALCANTI, E. D. C.; FREIRE, D. M. G.; MOURA-NUNES, N.; MONTEIRO, M.; PERRONE, D. Enzymes produced by solid

state fermentation of agro-industrial by-products release ferulic acid in bioprocessed whole-wheat breads. **Food Research International**, v. 140, p. 109843, 1 fev. 2021.

CUNHA, J. R. B.; DOS SANTOS, F. C. P.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de *celulase*, *protease* e amilase. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p. 597–604, out. 2016.

D'HOOGE, E.; BECKER, P.; STUBBE, D.; NORMAND, A.; PIARROUX, R.; HENDRICKX, M. Black aspergilli: A remaining challenge in fungal taxonomy? **Medical Mycology**, v. 57, n. 6, p. 773–780, 1 ago. 2019.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of *protease* from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 20–25, jul. 2014.

DE CASTRO, R. J. S.; NISHIDE, T. G.; SATO, H. H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 236–245, out. 2014.

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

EL-KHONEZY, M. I.; ELGAMMAL, E. W.; AHMED, E. F.; ABD-ELAZIZ, A. M. Detergent stable thiol-dependant alkaline *protease* produced from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21: Purification and kinetics. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 102046, ago. 2021.

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

FERNANDES, T. A. B. **Potencial de produção de ácido cítrico por *Aspergillus welwitschiae* em resíduos de laranja**. 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

FERNANDES, H.; MOYANO, F.; CASTRO, C.; SALGADO, J.; MARTÍNEZ, F.; AZNAR, M.; FERNANDES, N.; FERREIRA, P.; GONÇALVES, M.; BELO, I.; OLIVATELES, A.; PERES, H. Solid-state fermented brewer's spent grain enzymatic extract increases *in vitro* and *in vivo* feed digestibility in European seabass. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 22946, 25 nov. 2021.

GAUTIER, M.; NORMAND, A.-C.; RANQUE, S. Previously unknown species of *Aspergillus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 662–669, ago. 2016.

GLOBAL *protease* market size, share & industry trends analysis report by application, by source, by regional outlook and forecast, 2022 – 2028. KBV Research, set. 2022. Disponível em: [https://www.reportlinker.com/p06352766/Global-Protease-Market-Size-Share-Industry-Trends-Analysis-Report-By-Application-By-Source-By-Regional-Outlook-and-Forecast-.html?utm\\_source=GNW](https://www.reportlinker.com/p06352766/Global-Protease-Market-Size-Share-Industry-Trends-Analysis-Report-By-Application-By-Source-By-Regional-Outlook-and-Forecast-.html?utm_source=GNW). Acesso em: 9 novembro 2022.

GURUMALLESH, P.; ALAGU, K.; RAMAKRISHNAN, B.; MUTHUSAMY, S. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, maio 2019.

HAJJI, M.; REBAI, A.; GHARSALLAH, N.; NASRI, M. Optimization of alkaline *protease* production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 6, jul. 2008.

HONG, S. B.; LEE, M.; KIM, D. H.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; GOMI, K.; YAMADA, O.; MACHIDA, M.; HOUBRAKEN.; SAMSON, R. A. *Aspergillus*

*luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in east Asia. **Public Library of Science**, v. 8, n. 5, p e63769, 2013.

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S.; WANG, X.-C.; MEIJER, M.; KRAAK, B.; HUBKA, V.; BENSCH, K.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, v. 95, p. 5–169, mar. 2020.

IKRAM, S.; HUANG, L.; ZHANG, H.; WANG, J.; YIN, M. Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 10, p. 2232–2242, 1 out. 2017.

KAMATH, P.; SUBRAHMANYAM, V.; RAO, J. V.; RAJ, P. V. Optimization of cultural conditions for *protease* production by a fungal species. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 2, p. 161, 2010.

KARAM, E. A.; WAHAB, W. A. A.; SALEH, S. A. A.; HASSAN, M. E.; KANSOH, A. L.; ESAWY, M. A. Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 694–703, set. 2017.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, Utrecht, v. 17, n.3, p. 128, 2002.

KOSTARELOU, P.; KANAPITSAS, A.; PYRRI, I.; KAPSANAKI-GOTSI, E.; MARKAKI, P. Aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus* and strains of *Aspergillus* section *Nigri* in currants of Greek origin. **Food Control**, v. 43, p. 121–128, set. 2014.

KUMURA, H.; ISHIDO, T.; SHIMAZAKI, K. Production and partial purification of proteases from *Aspergillus oryzae* grown in a medium based on whey protein as an exclusive nitrogen source. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p. 657–667, fev. 2011.

LANGRAF, Dâmaris Cristine. **Potencial de produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus welwitschiae* a partir de resíduos agroindustriais.**

2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

LARIO, L. D.; PILLACA-PULLO, O. S.; SETTE, L. D.; CONVERTI, A.; CASATI, P.; SPAMPINATO, C.; PESSOA, A. Optimization of *protease* production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00546, dez. 2020.

LEITE, P.; BELO, I.; SALGADO, J. M. Co-management of agro-industrial wastes by solid-state fermentation for the production of bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 113990, nov. 2021.

LI, C.; XU, D.; ZHAO, M.; SUN, L.; WANG, Y. Production optimization, purification, and characterization of a novel acid *protease* from a fusant by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 6, p. 905–917, 6 fev. 2014.

LIU, J.; YANG, J.; WANG, R.; LIU, L.; ZHANG, Y.; BAO, H.; JANG, J. M.; WANG, E.; YUAN, H. Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 288–294, jun. 2020.

M., S.; SINGH, S.; TIWARI, R.; GOEL, R.; NAIN, L. Do cultural conditions induce differential protein expression: Profiling of extracellular proteome of *Aspergillus terreus* CM20. **Microbiological Research**, v. 192, p. 73–83, nov. 2016.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., DUNLAP, P. V. C. Brock Biology of Microorganisms. Twelfth edition. Pearson Education Inc, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, 2009.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V.; VILLA-TANACA, L.; ANDUCHO-REYES, M.; MERCADO-FLORES, Y. Secreted fungal aspartic proteases: A review. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 2, p. 76–82, abr. 2016.

MACIAS-GARBETT, R.; SERNA-HERNÁNDEZ, S. O.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; PARRA-SALDÍVAR, R. Phenolic compounds from brewer's spent grains: Toward green recovery methods and applications in the cosmetic industry. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, 14 jun. 2021.

MARTIN, K.; KROEMER, T.; MENNE, C.; RICHARDSON, A.; HARPER, C.; RUIZ, F. Proteinase K Handbook. *In*: **Gold Biotechnology**. St Louis, EUA, 2020.

MARTINS, V. M. R.; RODRIGUES, M. A. Produção e tecnologia de cereais: processo de maltagem da cevada. **Livro de atas das Jornadas do Lúpulo e da Cerveja: novas oportunidades de negócio**, p. 37–51, 2015.

MASSI, F. P., SARTORI, D.; FERRANTI, L. S.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; VIEIRA, M. L. C; FUNGARO, M. H. P. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 19–28, mar. 2016.

MATKAWALA, F.; NIGHIJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 4, 17 mar. 2021.

MAZOTTO, A. M.; COURI, S.; DAMASO, M. C. T.; VERMELHO, A. B. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 189–195, nov. 2013.

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 76–82, nov. 2013.

MINCUZZI, A.; IPPOLITO, A.; MONTEMURRO, C.; SANZANI, S. M. Characterization of *Penicillium* s.s. and *Aspergillus* sect. *Nigri* causing postharvest rots of pomegranate fruit in Southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 314, p. 108389, fev. 2020.

MAITIG, A. M. A; ALHOOT, M. A. M.; TIWARI, K. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 2059–2067, 30 dez. 2018.

MORELLON-STERLING, R.; EL-SIAR, H.; TAVANO, O. L.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 394–404, nov. 2020.

MORYA, V. K.; YADAV, V. K.; YADAV, S.; YADAV, D. Active site characterization of proteases sequences from different species of *Aspergillus*. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 74, n. 3, p. 327–335, 29 jun. 2016.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, 2011.

NAVEED, M.; NADEEM, F.; MEHMOOD, T.; BILAL, M.; ANWAR, Z.; AMJAD, F. Protease—A versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: An updated review. **Catalysis Letters**, 11 jul. 2020.

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

OLIVARES-GALVÁN, S.; MARINA, M. L.; GARCÍA, M. C. Extraction of valuable compounds from brewing residues: Malt rootlets, spent hops, and spent yeast. **Trends in Food Science & Technology**, v. 127, p. 181–197, set. 2022.

OOI, C.K.; RASIT, N.; ABDULLAH, W. R. W. Optimization of protease from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation utilizing shrimp shell substrate. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 14809–14824, 31 mar. 2021.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S. l.], v. 7, n. 3, 2012.

OSMOLOVSKIY, A. A.; POPOVA, E. A.; KREYER, V. G.; BARANOVA, N. A.; EGOROV, N. S. Vermiculite as a new carrier for extracellular *protease* production by *Aspergillus* spp. Under solid-state fermentation. **Biotechnology Reports**, v. 29, p. e00576, 1 mar. 2021.

PARANTHAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMATHI, J. Production of *Protease* from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 308–312, 2009.

PARCHAMI, M.; FERREIRA, J. A.; TAHERZADEH, M. J. Starch and protein recovery from brewer's spent grain using hydrothermal pretreatment and their conversion to edible filamentous fungi – A brewery biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125409, out. 2021.

PARK, H.-S.; JUN, S. -C.; HAN, K. -H, HONG, S. -H.; YU, J. -H. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. **Advances in Applied Microbiology**, p. 161–202, 2017.

PURUSHOTHAMAN, K.; BHAT, S. K.; SINGH, S. A.; MARATHE, G. K.; RAO, A. R. G. A. Aspartic *protease* from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with *pepstatin A*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 199–212, out. 2019.

- RIBEIRO, M. M.; REZENDE, M. I.; BALDO, C.; SARTORI, D. *Aspergillus welwitschiae*: A Potential amylases Producer. **Current Microbiology**, v. 79, n. 10, 5 set. 2022.
- ROMERO, S. M.; GIUDICESSI, S. L.; VITALE, R. G. Is the fungus *Aspergillus* a threat to cultural heritage? **Journal of Cultural Heritage**, v. 51, p. 107–124, set. 2021.
- SABOTIČ, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1351–1375, 5 jan. 2012.
- SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. -B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUSHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, jun. 2014.
- SANDHYA, C.; ALAGARSAMY, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689–2694, jul. 2005.
- SANKAR, M., MATHEW, R. M.; PUTHIYAMADAM, A.; SREEJA-RAJU, A.; CHRISTOPHER, M.; GOKHALE, D. V.; SUKUMARAN, R. K. Comparison of the solid-state and submerged fermentation derived secretomes of hyper-cellulolytic *Penicillium janthinellum* NCIM 1366 reveals the changes responsible for differences in hydrolytic performance. **Bioresource Technology**, p. 128602, jan. 2023.
- SANZANI, S. M.; REVERBERI, M.; GEISEN, R. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. **Postharvest Biology and Technology**, v. 122, p. 95–105, dez. 2016.

SATTAR, H.; BIBI, Z.; KAMRAN, A.; AMAN, A. Degradation of complex casein polymer: Production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101256, set. 2019.

SETHI, B. K.; JANA, A.; NANDA, P. N.; MOHAPATRA, P. K. D.; SAHOO, S. L. Thermostable acidic *protease* production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 4, p. 571–583, out. 2016.

SHARMA, M.; GAT, Y.; ARYA, S.; KUMAR, V.; PANGHAL, A.; KUMAR, A. A review on microbial alkaline protease: An essential tool for various industrial approaches. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 69–78, abr. 2019.

SIALA, R.; FRIKHA, F.; MHAMDI, S.; NASARI, M.; KAMOUN, A. S. Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* I1 on shrimp peptone using statistical experimental design. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

SILVA-LÓPEZ, R. E. DA. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 19 ago. 2016.

SINGHAL, P.; NIGAM, V.; VIDYARTHI, A. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v.3, n.3, p. 653–669, jun 2012.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial *cellulases*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, jun. 2010.

SOCCOL, C. R.; DA COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. D. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, jan. 2017.

SOUZA, P. M. DE; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M. DE; ALMEIDA, R. P. C. DE.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; JUNIOR, A. P.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, jun. 2015.

SOUZA, P. M.; WERNECK, G.; ALIAKBARIAN, B.; SIQUEIRA, F.; FILHO, E. X. M.; JUNIOR, A. P. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1103–1110, nov. 2017.

SUGIHARTO, S. A review of filamentous fungi in broiler production. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 64, n. 1, p. 1–8, jun. 2019.

SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound “synthetic lipase” specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1336–1342, fev. 2009.

SUSCA, A.; PROCTOR, R. H.; MULÈ, G.; STEA, G.; RITIENI, A.; LOGRIECO, A.; MORETTI, A. Correlation of mycotoxin fumonisin B2 production and presence of the fumonisin biosynthetic gene *fum8* in *Aspergillus niger* from grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9266–9272, 28 jul. 2010.

SUSCA, A.; PROCTOR, R. H.; MORELLI, M.; HAIDUKOWSKI, M.; GALLO, A.; LOGRIECO, A. F.; MORETTI, A. Variation in Fumonisin and Ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origins. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

TANG, J.; CHEN, T. -T.; HU, Q.; LEI, D.; SUN, Q.; ZHANG, S. -M.; ZENG, C. -Y.; ZHANG, Q. Improved protease activity of Pixian broad bean paste with cocultivation of *Aspergillus oryzae* QM-6 and *Aspergillus niger* QH-3. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 44, p. 33–40, mar. 2020.

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

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

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a *protease* from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1553–1558, jun. 2003.

USMAN, A.; MOHAMMED, S.; MAMO, J. Production, optimization, and characterization of an acid protease from a filamentous fungus by solid-state fermentation. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, p. 6685963, 29 abr. 2021.

VANZELA, D. O. A.; MASSI, F. P.; OLIVEIRA, A. L. M. DE; FUNGARO, M. H. P.; SARTORI, D. Isolation and identification of *Aspergillus* section *Nigri*, and genotype associated with ochratoxin A and fumonisin B2 production in garlic marketed in Brazil. **Current Microbiology**, v. 77, p. 1150–1158, 14 fev. 2020.

VEERABHADRAPPA, M. B.; SHIVAKUMAR, S. B.; DEVAPPA, S. Solid-state fermentation of Jatropha seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in Jatropha seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 2, p. 208–214, 1 fev. 2014.

VERMA, A.; SINGH, H.; ANWAR, S.; CHATTOPADHYAY, A.; TIWARI, K. K.; KAUR, S.; DHILON, G. S. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 476–491, 13 jun. 2016.

WAND, O. P. Proteases. In: Moo-Young, M. (Ed.), **Comprehensive Biotechnology**, 2nd ed, p. 571–582, 2011.

WERLANG SCHUSTER, F. P.; MAFFESSIONI, C.; ANGELIS, D. A. DE; GIACHINI, A. J.; CARDOSO, L. S.; MORONI, L. S.; SKORONSKI, E.; KEMPKA, A. P. Screening and evaluation of filamentous fungi potential for *protease* production in swine plasma and red blood cells-based media: qualitative and quantitative methods. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101313, set. 2019.

ZHANG, D.; PALMER, J.; TEH, K. H.; FLINT, S. Identification and selection of heat-stable *protease* and lipase-producing psychrotrophic bacteria from fresh and chilled raw milk during up to five days storage. **LWT**, v. 134, p. 110165, dez. 2020.