



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

NATHÁLIA MIRANDA DE MEDEIROS

**PRODUÇÃO DE PROTEASES USANDO *Penicillium* sp. FSDE15 EM
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

JOÃO PESSOA – PB

Novembro de 2019

NATHÁLIA MIRANDA DE MEDEIROS

**PRODUÇÃO DE PROTEASES USANDO *Penicillium* sp. FSDE15 EM
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho Final de Curso, apresentado como exigência do curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

JOÃO PESSOA – PB

Novembro de 2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M 488p Medeiros, Nathalia Miranda de.
PRODUÇÃO DE PROTEASES USANDO *Penicillium* sp. FSDE15 EM
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS / Nathalia Miranda de
Medeiros. - João Pessoa, 2019.
50 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos Santos.
Monografia (Graduação) - UFPB/Tecnologia.

1. enzimas, proteases, aplicação industrial. I. Santos,
Sharline Florentino de Melo Santos. II. Título.

UFPB/BC

NATHÁLIA MIRANDA DE MEDEIROS

**PRODUÇÃO DE PROTEASES USANDO *Penicillium* sp. FSDE15 EM
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho Final de Curso, apresentado
como exigência do curso de Engenharia
Química da Universidade Federal da
Paraíba como requisito para obtenção do
título de bacharel em Engenharia
Química.

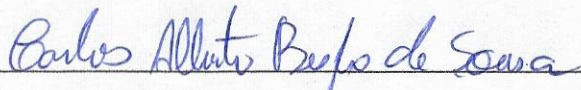
Data de aprovação: 22/11/2019

Banca Examinadora



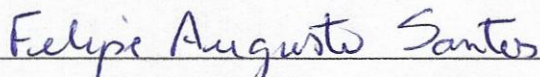
Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos – DEQ/CT/UFPB

(Orientadora)



Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa – DEQ/CT/UFPB

(Avaliador)



Engenheiro Felipe Augusto Santos

(Avaliador)

“Não andem ansiosos por coisa alguma, mas em tudo, pela oração e súplicas, e com ação de graças, apresentem seus pedidos a Deus. E a paz de Deus, que excede todo o entendimento, guardará os seus corações e as suas mentes em Cristo Jesus.”

Filipenses 4,6-7

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de finalizar esta graduação, pela proteção e pelas bênçãos derramadas, sobretudo nos últimos 5 anos.

Aos meus pais, Junior e Christiane, essenciais na construção da pessoa que tenho me tornado.

A toda minha família, sobretudo ao meu irmão Pedro, vovó Penha, vovô João (*in memoriam*) e titia Lydi, que desde sempre acreditaram e seguem acreditando em mim.

Ao meu namorado e companheiro, Joanderson, por todo amor, cuidado, atenção e por sempre se fazer presente.

A todos os meus amigos de coração, que estiveram comigo durante este percurso.

Aos colegas de universidade, importantes no meu desenvolvimento pessoal e profissional ao longo do curso.

À minha eterna professora e orientadora, Sharline, a quem devo boa parte dos ensinamentos que tive na UFPB, por ter me apresentado a pesquisa e por todo apoio na construção deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Bioengenharia, sobretudo Débora, Felipe, Amanda e Carol, que tornaram as manhãs, tardes e até noites de experimentos mais leves, e não hesitaram em me ajudar quando precisei.

E, por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para finalização desta graduação.

RESUMO

O mercado de enzimas vem ganhando cada vez mais espaço, sobretudo devido a diversidade de aplicações nos mais variados setores industriais. A busca pela produção dessas moléculas com alto grau de especificidade e estabilidade ao pH, temperatura e agentes químicos, atrelados ao baixo custo, está em constante pesquisa. Diante disso, este estudo teve por objetivo avaliar a produção de proteases pelo fungo *Penicillium* sp. FSDE15 por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais. O cultivo realizado para obtenção da cinética proteolítica utilizou farelo de trigo e bagaço de malte, visando analisar qual o melhor substrato para esse processo. Além disso, foi também realizada a quantificação de atividades celulolíticas e amilolíticas para verificar a produção destas enzimas nas condições estudadas. A fermentação se deu por 7 dias e foram realizadas extrações enzimáticas durante 3 horas em agitação contínua utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 para análise de protease e tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 para análise de celulase e amilase. Os máximos valores de atividade proteolítica e celulolítica de $26,42 \pm 1,20$ U/mL e $0,141 \pm 0,001$ U/mL, respectivamente, foram obtidos através da extração enzimática realizada com o meio fermentado às 168 horas de experimento após secagem em estufa a 40 °C por 48 horas. Para as amilases, a máxima produção de $3,080 \pm 0,103$ U/mL ocorreu às 168 horas de cultivo, não sendo observadas atividades superiores para o extrato do meio seco. Esses resultados evidenciam as enzimas produzidas pelo *Penicillium* sp. FSDE15 como potenciais aditivos para ração animal e integrantes na formulação de detergentes enzimáticos.

Palavras-chaves: enzimas, proteases, celulasas e amilases, aplicação industrial.

ABSTRACT

The enzyme market has been growing especially because the huge diversity among industrial fields. The production of these molecules with high specificity and stability at pH, temperature and chemicals linked to low cost substrates has been constantly researched. Therefore, the aim of this study was to evaluate the production of proteases from the fungus *Penicillium* sp. FSDE15 by solid-state fermentation with agroindustrial residues. The experiment performed to obtain proteolytic kinetics used wheat bran and malt bagasse to find out the most successful substrate for this process. It was also realized the quantification of cellulolytic and amylolytic activities to verify the performance of these enzymes under the related conditions. The fermentation has lasted 7 days, and enzymatic extractions were performed using sodium phosphate buffer 50 mM, pH 7.4 for proteases analysis and sodium citrate buffer 50 mM, pH 4.8 for cellulases e amylases analysis for 3 hours under continuous stirring. Through the fermentative tests it was possible to reach a maximum production of proteases and cellulase of 26.42 ± 1.20 U/mL and 0.141 ± 0.001 U/mL, respectively, using extract from dried growth at 40 °C for 48 hours. The maximum production of amylases of 3.080 ± 0.103 U/mL occurred at 168 hours of experiment and it was not verified higher values using extract produced through dried growth. These results show the enzymes produced by *Penicillium* sp. FSDE15 as potential additives for animal feed and as components of enzymatic detergents.

Keywords: enzymes, proteases, cellulases and amylases, industrial application.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Partes do grão de trigo.....	16
Figura 2 – Esquema geral da obtenção do bagaço de malte.....	17
Figura 3 - Biomassas de farelo de trigo (a) e bagaço de malte (b).	27
Figura 4 - Placa do <i>Penicillium</i> sp. FSDE15.....	28
Figura 5 – Microplaca de 96 poços de fundo chato utilizada para quantificação da atividade proteolítica.....	33
Figura 6 – Valores de pH durante os cultivos do <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte.	37
Figura 7 – Cinética da produção de protease por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 para os cultivos realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte.	38
Figura 8 – Cultivo do <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 utilizando farelo de trigo (a), bagaço de malte (b) e farelo de trigo (50%) + bagaço de balte (50%) (c) ao final das 168 horas após secagem e trituração.....	39
Figura 9 – Comparação da produção de protease por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 para os cultivos realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte em 168 horas e 168 horas após secagem.	39
Figura 10 – Produção de FPase por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 para os cultivos realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte.	41
Figura 11 – Produção de amilase por <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 para os cultivos realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos quatro tipos de endopeptidases.	20
Tabela 2 – Parâmetros da caracterização físico-química do bagaço de malte e do farelo de trigo.	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	14
2.1 GERAL.....	14
2.2 ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	15
3.1.1 Farelo de Trigo	15
3.1.2 Bagaço de Malte	16
3.2 OBTENÇÃO DE ENZIMAS.....	18
3.2.1 Proteases	18
3.3 APLICAÇÃO INDUSTRIAL.....	21
3.3.1 Indústria de detergentes	21
3.3.2 Indústria de alimentos.....	22
3.3.3 Indústrias farmacêutica e de cosméticos.....	23
3.3.4 Utilização em alimentação animal.....	24
4 METODOLOGIA	27
4.1 PREPARO DAS BIOMASSAS.....	27
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	27
4.2.1 pH	27
4.2.2 Umidade.....	28
4.3 MICRORGANISMO.....	28
4.4 PREPARO DO INÓCULO.....	29
4.5 ENSAIOS FERMENTATIVOS	29
4.6 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS	30

4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	30
4.7.1 FPase.....	31
4.7.2 Amilase	32
4.7.3 Protease.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	35
5.2 PRODUÇÃO DE PROTEASE	36
5.3 PRODUÇÃO DE CELULASE E AMILASE	40
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

O elevado emprego industrial das enzimas, em especial as proteolíticas, aumenta cada vez mais a busca por novas formas de obtenção dessas moléculas, sobretudo atreladas ao baixo custo (AISSAOUI et al., 2014). A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono em processos biotecnológicos, a exemplo da produção de enzimas, proteínas e aminoácidos, possibilita a reintrodução desses no mercado, além de reduzir os custos do processo.

As proteases são enzimas que atuam hidrolisando proteínas em peptídeos e aminoácidos livres, e possuem aplicação em diversos setores como o de alimentos, laticínios, detergentes, couro, ração animal e medicamentos (PANT et al., 2015; MARATHE et al., 2018). Dentre eles, a indústria de detergentes apresenta-se como uma das áreas mais promissoras. A utilização de proteases na confecção de detergentes enzimáticos pode diminuir o uso de substâncias tóxicas, prejudiciais ao meio ambiente, presentes nas formulações usualmente empregadas (GÜDER, 2014).

Essas moléculas podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos (RAO et al., 1998). Neste cenário, a fermentação microbiana torna-se um interessante meio de produção desses compostos, já que sua obtenção através de animais e vegetais muitas vezes não atende à demanda mundial, além de que algumas enzimas são apenas produzidas durante este processo (CAPRARA, 2015).

Os fungos apresentam algumas vantagens em relação às bactérias para obtenção dessas substâncias, sobretudo pelo fato de que a maior parte das enzimas secretadas por eles são extracelulares e pela facilidade de remoção do micélio após o cultivo, influenciando diretamente nos processos de recuperação e purificação enzimática (AISSAOUI et al., 2014; SAVITHA et al., 2011). Com relação a operação de fermentação preferida, a que ocorre em estado sólido destaca-se por apresentar um meio de cultura simples e similar ao habitat natural do fungo (SILVA, et al., 2005).

Além das proteases, que apresentam grande relevância por ocuparem uma importante posição em relação à sua aplicação industrial (CAPRARA, 2015), as celulasas e amilases constituem também importantes enzimas que atuam na produção de sucos, vinhos, açúcar, álcool e bebidas fermentadas (CASTRO, PEREIRA, 2010; LÉVÊQUE et al., 2000; GOMES et al., 2003), além de sua massiva utilização na forma de aditivos multienzimáticos em rações, proporcionando um aproveitamento mais efetivo dos

nutrientes presentes nas dietas e atuando na degradação de polissacarídeos não amiláceos (MARQUARDT et al., 1996; MATHLOUTHI et al., 2003).

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Avaliar a produção de proteases pelo fungo *Penicillium* sp. FSDE15 por fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química do farelo de trigo e do bagaço de malte in natura;
- Obter a cinética de produção de proteases nos resíduos avaliados;
- Quantificar a atividade enzimática de celulasas, amilases e proteases produzidas pelo fungo *Penicillium* sp. FSDE15 através de fermentação em estado sólido.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Diversos países europeus têm transformado o conceito de resíduo de forma a reintroduzi-lo no mercado, seguindo as propostas da Economia Circular (LEITÃO, 2015). Esse modelo orienta a criação de produtos inovadores, utilizando matérias-primas renováveis e enfatizando os benefícios da reciclagem de subprodutos (SWINNEN; RIERA, 2013). Diante disso, a Comissão Europeia apresentou propostas para aumentar a reutilização de resíduos urbanos para 70% até 2030 (COMISSÃO EUROPEIA, 2015).

No Brasil, para resíduos como plástico, metal, vidro e papel há uma mínima sensibilização às questões ambientais, ainda que muito aquém do necessário. Em contrapartida, milhões de toneladas de vestígios orgânicos são dispostos de maneira inadequada, sobretudo devido ao desconhecimento em relação ao seu potencial econômico, ambiental e social (ZAGO, BARROS, 2019).

A indústria de alimentos no Brasil é responsável por 15% do faturamento industrial no país e gera cerca de 70 a 80% de resíduos agroindustriais desde a etapa da colheita, beneficiamento até a comercialização final dos produtos (NASCIMENTO, FRANCO, 2015). Esses compostos apresentam grande potencial como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos e de maior valor agregado como enzimas, proteínas, aminoácidos e ingredientes para a formulação de rações animais (NUNES, 1993).

3.1.1 Farelo de Trigo

O trigo (*Triticum spp.*) é uma gramínea originária do Oriente Médio e é o segundo cereal mais cultivado no mundo após o milho (SEAE, 2015). No Brasil, a produção nacional de trigo na safra 2018/2019 ficou em torno de 5,4 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

Durante o processamento industrial dos grãos, cerca de 70 a 75% da massa total é convertida em farinha de trigo para consumo humano, sendo que os 30 a 25% restantes resultam em subprodutos, a exemplo do farelo (SANTOS, 2004 *apud* PEREIRA, 2005). As partes do grão de trigo estão indicadas na Figura 1.

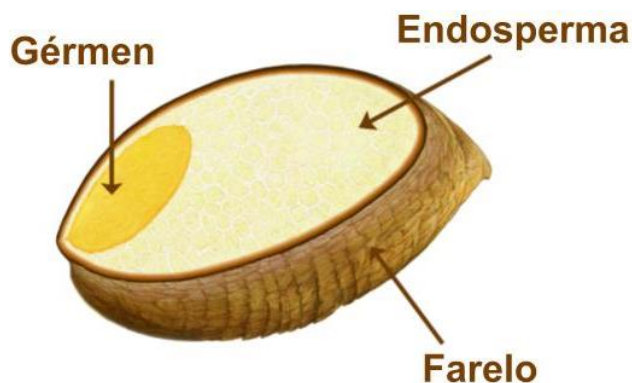


Figura 1 – Partes do grão de trigo.

Fonte: Cozinha técnica, 2019.

O farelo de trigo é comumente empregado na produção de enzimas (DE PARIS, 2008), pois apresenta em sua composição 18% de proteínas, além de uma porosidade que facilita a dispersão micelial (SINGH; BATRA; SOBTI, 2001).

Silva (2011) utilizou o farelo de trigo sem suplementação proteica e verificou ótimos valores de atividade proteolítica pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Já Bittencourt (2014) analisou a produção de proteases para cepas de *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* utilizando resíduos agroindustriais tais como casca de soja, resíduo de soja, engaço de bananeira e farelo de trigo. Dentre os citados, o farelo de trigo apresentou melhores resultados para ambos os fungos.

Almeida (2012) também relatou o farelo de trigo como melhor substrato para produção de celulase por *Penicillium variabile*. Freitas et al. (2014) obtiveram α -amilases pelo fungo *Syncephalastrum racemosum*, isolado do solo, utilizando este mesmo resíduo como fonte de carbono.

3.1.2 Bagaço de Malte

Cerca de 90% da cevada da variedade BR- 2 cultivada no Brasil é usada pela indústria cervejeira, a qual emprega 1,7 milhões de pessoas em atividades diretas e indiretas (BATISTA, 2014). O bagaço de malte está entre o principal resíduo sólido produzido neste processo, com valores de aproximadamente 15,4 milhões de toneladas por ano segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

O bagaço de malte varia quanto à sua composição, dependendo da mistura de cereais, do pré-tratamento dos grãos, das condições do processo de malteação, do tipo de malte e das variedades de plantas selecionadas, sempre apresentando celulose,

hemicelulose, lignina, proteína, cinzas, carboidratos, fibras e lipídeos em sua estrutura (BATISTA, 2014).

Este resíduo é formado após a germinação do malte e a brassagem, na etapa de filtração do mosto, conforme apresentado na Figura 2. A cada 100 litros de cerveja são gerados de 14 a 20 kg do bagaço (SANTOS; RIBEIRO, 2005). O destino desse material varia de acordo com a região e pode ser direcionado para diversas aplicações como: alimentação animal, alimentação humana, produção de energia (carvão vegetal, biogás e combustão direta), emprego em processos biotecnológicos para produção de enzimas, dentre outros (MUSSATO; DRAGONE; ROBERTO, 2006).

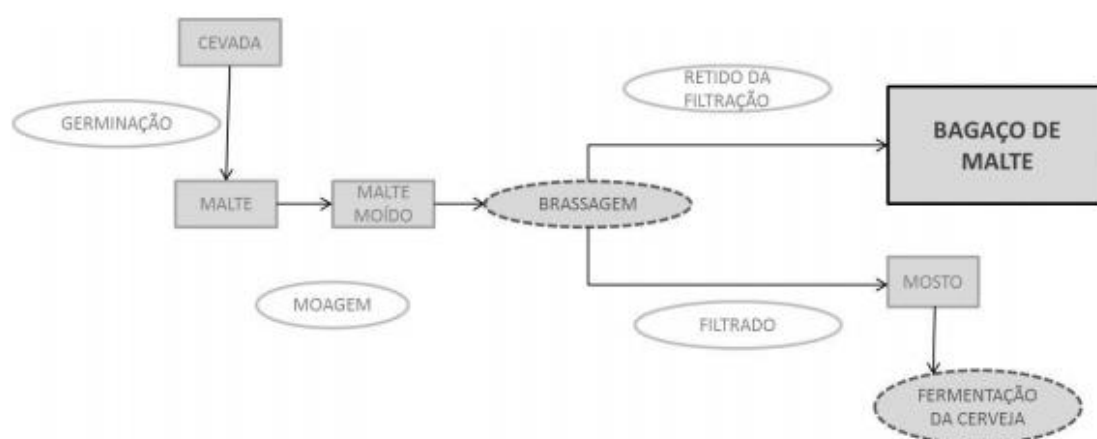


Figura 2 – Esquema geral da obtenção do bagaço de malte.

Fonte: BATISTA, 2014.

Quando direcionado para alimentação animal, passa por um processo de secagem para concentrar os nutrientes por unidade de matéria seca, aumentar a vida útil devido a diminuição da ação microbiana e, sobretudo, viabilizar as etapas de estocagem e transporte (BOURSCHEIDT; OLIVEIRA; SILVA, 2010).

Com relação à obtenção de produtos biotecnológicos, Francis e colaboradores (2002) produziram α -amilases por *Aspergillus oryzae* utilizando bagaço de malte como substrato. Wisniewski et al. (2010) também utilizaram o bagaço de malte para obter enzimas amilolíticas com uma cepa de *Macrocybe titans*.

3.2 OBTENÇÃO DE ENZIMAS

A produção de enzimas é uma área da biotecnologia em expansão, que movimenta bilhões de dólares anualmente (VINIEGRA-GONZÁLEZ; FAVELATORRES; AGUILAR, 2003). Dentre as enzimas industriais mais abundantes no mercado mundial destacam-se as proteases, carboidrases (amilases, celulasas e xilanases), lipases e fitases (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Embora existam diversas fontes para a obtenção dessas moléculas como células vegetais, animais e algas, as enzimas de origem microbiana possuem alta especificidade, facilidade de purificação e não apresentam sazonalidade de fabricação (WANDERLEY, NEVES, ANDRADE, 2011).

Os tipos de fermentação utilizados para produção de enzimas são a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES) (FERNANDES, 2007). A FS é caracterizada por apresentar grande facilidade de crescimento dos microrganismos devido às condições controladas de temperatura e pH, além da simplicidade nos processos de recuperação das enzimas extracelulares (FEITOSA, 2009). Já na FES, o meio de cultura é composto de substratos sólidos que atuam como fonte de carbono e energia e simulam o habitat natural do fungo (SILVA et al., 2005). Esses substratos são geralmente resíduos da agroindústria e acabam por reduzir os custos de produção. Algumas vantagens da utilização da FES frente a FS são: meio de cultura simples, diminuição do risco de contaminação, menor exigência de água e condições de cultura próximas a dos meios naturais. Entretanto, esse mesmo tipo de fermentação apresenta difícil regulação dos parâmetros pH e umidade, além de alta taxa de inoculação microbiana (SPIER, 2005).

3.2.1 Proteases

As proteases (peptidases ou peptídeo hidrolases) constituem a maior família de enzimas, sobretudo por serem encontradas em todos os organismos e por ocuparem uma importante posição em relação à sua aplicação nos campos comercial e fisiológico. Essas enzimas catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas dando origem a peptídeos e aminoácidos livres (CAPRARA, 2015).

As proteases podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que apresentam maior atividade: ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,1-8,0) e alcalinas (pH 8,1-13,0) (FÉLIX; NORONHA; DE MARCO, 2004).

De acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada, as proteases podem ainda ser classificadas em endopeptidases e exopeptidases. As exopeptidases clivam a ligação peptídica próxima ao C ou N terminal do substrato, podendo ser denominadas carboxipeptidases ou aminopeptidases, com base em seu local de ação. Já as endopeptidases clivam as ligações peptídicas distantes dos terminais do substrato. A presença do grupo amina ou carboxila livre possui uma influência negativa sobre a atividade dessas enzimas. As endopeptidases são divididas em quatro subgrupos com base no seu mecanismo catalítico: aspártico proteases, cisteíno proteases, metalo proteases e serina proteases (RAO et al., 1998). A Tabela 1 apresenta as características destas quatro classes de proteases.

A relevância deste grupo de enzimas, rica em diversidade estrutural e mecanismos de ação, se reflete na importância da sua aplicação em processos industriais, podendo ser utilizada em diversos ramos como o de alimentos, de detergentes, de couros e de medicamentos (CAPRARA, 2015). Sendo assim, a procura industrial de enzimas proteolíticas com adequada especificidade e estabilidade ao pH, temperatura e agentes químicos, atrelados ao baixo custo, continua motivando a busca por novos meios de obtenção (AISSAOUI et al., 2014).

Tabela 1 - Características gerais dos quatro tipos de endopeptidases.

Tipo de protease	Aspártico	Cisteína	Metalo	Serina
Peso molecular (kDa)	30-45	34-35	19-37	18-35
pH ótimo	3-5	2-7	5-7	6-11
Temperatura ótima (°C)	40-55	40-45	65-85	50-70
Resíduo do sítio ativo	Ácido Aspártico	Aspartato ou cisteína	Fenilalanina ou Leucina	Serina, histidina e aspartato
Principais inibidores	Pepstatina	Iodoacetamida, p-CMB	Agentes quelantes, como EDTA	Fenilmetilsulfonil fluoreto, EDTA, inibidor de tripsina, tampão fosfato, fenóis, ácido acético triamino
Principais fontes	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , tecido animal (estômago)	<i>Aspergillus</i> , casca de abacaxi, papáia, <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , tecido animal (intestino), <i>Tritirachium</i>

Fonte: VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2009.

As proteases podem ser encontradas em várias fontes como plantas, animais e microrganismos (RAO et al., 1998). Devido ao fato de a produção de proteases de origem animal e vegetal não atender a demanda mundial, cresce cada vez mais o interesse na obtenção desta enzima através da fermentação microbiana (CAPRARA, 2015). Este

último método contempla cerca de 40% das proteases vendidas em todo o mundo (CHANALIA et al., 2011).

Os microrganismos são também a fonte preferida para produção destas enzimas, pois a maior parte das proteases microbianas são extracelulares, secretadas diretamente no caldo fermentativo, o que facilita o processo de recuperação e purificação, em comparação com as obtidas a partir de plantas e animais (SAVITHA et al., 2011).

As proteases de origem fúngica apresentam algumas vantagens em relação às proteases de origem bacteriana, principalmente porque os fungos possuem capacidade de crescer em ambientes sob as mais variadas condições de temperatura, pH e variedade de nutrientes do meio (CAPRARA, 2015).

Dentre os fungos mais utilizados na produção de proteases destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Conidiobolus*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Rhizopus* (CAPRARA, 2015).

A literatura relata que espécies de fungos do gênero *Penicillium* possuem grande potencial para a produção biotecnológica de proteases e outras enzimas. Germano et al. (2003) produziram proteases neutras por *Penicillium* sp. Bittencourt (2014) obteve resultados satisfatórios de atividade proteolítica utilizando os fungos *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum*. Daronch et al. (2015) relataram a produção de celulase por *Penicillium* sp. utilizando casca de soja como substrato.

3.3 APLICAÇÃO INDUSTRIAL

3.3.1 Indústria de detergentes

O uso de enzimas como aditivos na indústria de detergentes corresponde a aproximadamente 25% do total das vendas mundiais (SILVA, SOUZA, 2010). Atualmente, muitos detergentes possuem um conjunto de enzimas incluindo proteases, amilases, celulasas e lipases com a finalidade de retirar as manchas mais difíceis (CAPRARA, 2015). As proteases destacam-se por possuírem a capacidade de remover resíduos proteicos derivados de sangue, carne, leite, ovos, além de serem biodegradáveis e reduzirem o custo do processo (SILVA, SOUZA, 2010).

O emprego de enzimas na formulação de detergentes permite ainda diminuir o uso de produtos químicos, como solventes e substâncias cáusticas, tornando-os menos

agressivos ao usuário e ao meio ambiente. Além disso, as proteases alcalinas, por exemplo, ampliam o potencial de limpeza a 40% (MOREIRA et al., 2002).

As proteases consideradas ideais para utilização em detergentes devem possuir uma ampla atuação em diversos substratos, facilitando a remoção das mais variadas manchas de alimentos, sangue e outras secreções corporais (RAY, 2012). Estes produtos necessitam também de proteases com atividade em condições de alcalinidade (pH 8,0-12,0) e estabilidade em temperaturas entre 50 e 70 °C. A compatibilidade das enzimas com os componentes do detergente (surfactantes, perfumes e branqueadores), a eficiência na remoção das manchas, estabilidade em tempo de prateleira e atividade na temperatura de lavagem a quente devem ser consideradas na seleção de proteases para esta aplicação industrial (SANTOS et al., 2016).

O parâmetro chave para o melhor desempenho de uma protease em um detergente é seu ponto isoelétrico, pois quanto mais próximo este for em relação ao pH do meio, maior será a atuação da enzima (RAO et al., 1998). O ponto isoelétrico (PI) é o valor de pH em que uma molécula (aminoácido e/ou proteína) apresenta carga elétrica líquida igual a zero. Neste ponto, há um equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos, ou seja, as interações dos grupos tornam-se fracas e a solubilidade da molécula alcança o valor mínimo. Segundo Gupta et al. (2002), a maioria das proteases alcalinas tem seu ponto isoelétrico próximo ao pH ótimo, em torno de 8-12 e são mais ativas em temperaturas entre 50 e 70 °C.

Ghorbel et al. (2014) isolaram e caracterizaram proteases da bactéria *Streptomyces flavogriseus* HS1 com atividade ótima em pH 7,0, a 50 °C e estável a agentes oxidantes podendo, portanto, ser utilizadas como aditivos em detergentes.

3.3.2 Indústria de alimentos

Na indústria alimentícia, as enzimas possuem destaque na fabricação de laticínios, pães e bebidas, no amaciamento de carnes e na produção de hidrolisados proteicos (CAPRARA, 2015).

Na produção de queijos, as proteases são empregadas na coagulação do leite através da hidrólise da ligação peptídica. Entre as proteases utilizadas neste processo, destaca-se a quimosina (renina), devido à alta especificidade pela k-caseína (RAO et al., 1998).

Dini (2010) isolou e purificou uma protease aspártica produzida pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 utilizando farelo de trigo no processo fermentativo. O queijo tipo prato produzido com o coagulante do fungo apresentou composição característica deste tipo de queijo, sugerindo que a protease do *T. indicae-seudaticae* N31 atua no processo de maturação de forma semelhante ao coagulante comercial.

Na panificação, as enzimas proteolíticas podem ser empregadas como aditivos no preparo de massas, a exemplo das proteases de *Aspergillus oryzae*, cuja ação sobre o glúten da farinha de trigo altera a elasticidade e a textura da massa, além de contribuir para redução do tempo de mistura e, conseqüentemente, do custo de produção (SILVA, 2011).

Já na indústria de bebidas, as celulases são utilizadas tanto para produção de sucos de frutas como nos processos de vinificação. Essas enzimas facilitam a extração do suco e a maceração para produção de néctares de frutas, por romperem a rede de celulose que ajuda a reter o líquido nas células vegetais. Na produção de vinhos, as β -glicosidasases atuam na extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na casca da uva, degradando compostos de sabor desagradável, liberando substâncias flavorizantes e melhorando o aroma e o sabor do vinho (CASTRO, PEREIRA, 2010).

A maior aplicação das α -amilases no ramo alimentício está associada à produção de açúcar, álcool e bebidas fermentadas, atuando no processo inicial de hidrólise do amido. Nesta etapa, nomeada liquefação, o amido é disperso em solução aquosa e hidrolisado de forma parcial e irreversível pela α -amilase, convertendo cerca de 30 a 40% do amido em dextrinas solúveis com diferentes graus de polimerização, gerando uma solução de maltodextrina, que será fracionada em moléculas de glicose e maltose (LÉVÊQUE et al., 2000; GOMES et al., 2003).

3.3.3 Indústrias farmacêutica e de cosméticos

A aplicação de proteases nas indústrias farmacêutica e de cosméticos cresce a cada ano em função de novas pesquisas e da descoberta de diferentes fontes produtoras. Dentre as proteases utilizadas para este fim, destacam-se as collagenases, queratinases, elastases, papaínas e bromelinas (NETO; ABOU, 2012).

Proteases queratinolíticas, com atividade sobre proteínas fibrosas e insolúveis (queratinas), estão sendo estudadas para a remoção de calosidade humana e da queratina no tratamento da acne, para o tratamento da psoríase e de micoses causadas por fungos dermatófitos (BON; VERMELHO, 2004). Já as collagenases agem sobre fibras de colágeno, podendo gerar peptídeos que apresentam atividades biológicas de interesse industrial como agentes imunoterapêuticos, remoção de manchas e queloides, tratamentos de queimaduras e úlceras (NETO; ABOU, 2012).

Na produção de cosméticos, as proteases que hidrolisam ligações peptídicas de queratina e colágeno da pele possuem grande importância. Proteases como papaína e bromelina são utilizadas na realização de “peeling” e alisamento da pele, removendo as células mortas, proporcionando, com isso, um aspecto mais jovem (LODS et al., 2000).

Esta classe de enzimas pode atuar também no tratamento da doença celíaca, através da ingestão de proteases capazes de hidrolisar a ligação peptídica da molécula de gliadina, presente no glúten do trigo. As prolil endopeptidases ou prolil oligopeptidases, pertencentes ao grupo das serino proteases, possuem esta habilidade e estão presentes em bactérias, fungos, animais e plantas (SHAN et al., 2004).

Outra possível aplicação é no tratamento antitumoral, em que as proteases poderiam agir diminuindo a progressão do câncer e na alteração óssea que estabelece metástases (WILSON; SINGH, 2008).

A protease alcalina produzida por *Aspergillus niger* LCF9 hidrolizou vários tipos de colágeno com a liberação de peptídeos de baixo peso molecular (KUMAR; TAKAGI, 1999). Das proteases terapêuticas existentes no mercado, a maior parte são do tipo serina (LI et al., 2012), as quais estão envolvidas nos processos de coagulação sanguínea e fibrinólise (OVAERE et al., 2009).

3.3.4 Utilização em alimentação animal

Visto que a alimentação constitui o item de maior custo na produção animal (STRADA et al., 2005 *apud* ARAÚJO; SILVA; AMÂNCIO, 2007), a utilização de aditivos enzimáticos nas dietas possibilita a inclusão de matérias-primas de menor qualidade e, portanto, de menor valor agregado. Isso é possível porque as enzimas aumentam a digestibilidade dos nutrientes presentes em fontes alternativas de energia,

como centeio, trigo, cevada e aveia, além de inibir a ação de possíveis fatores antinutricionais presentes nestes alimentos (ARAÚJO et al., 2007).

A tecnologia das fermentações com a ajuda de bactérias e fungos tem possibilitado a produção de enzimas que degradam uma variedade de amidos, açúcares, proteínas e celulose, além de aumentar a disponibilidade de nutrientes como fósforo, nitrogênio, cálcio, cobre e zinco. Dessa forma, há uma absorção mais rápida e eficiente desses nutrientes no trato digestivo dos animais (COSTA et al., 2007) e uma menor eliminação através das fezes, diminuindo, assim, a poluição ambiental (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

As enzimas utilizadas como aditivos em rações podem compreender aquelas não sintetizadas ou sintetizadas em pequenas quantidades pelos animais como as celulasas, pentosanas e α -galactosidases; ou podem atuar completando quantitativamente as próprias enzimas digestórias, a exemplo de proteases, amilases e fitases (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

Como as enzimas são específicas em suas reações, aditivos na forma de complexos multienzimáticos são preferidos por conterem uma variedade dessas substâncias sendo, portanto, mais efetivos no aproveitamento dos nutrientes. Entretanto, é fundamental uma correta avaliação nutricional dos ingredientes juntamente com a viabilidade econômica do uso dessa tecnologia (MURAKAMI et al., 2007).

O farelo de soja, por exemplo, contribui com mais de 70% da proteína em dietas avícolas e possui grande quantidade de polissacarídeos não amiláceos (PNA's), não digeríveis pelos animais, além de fatores antinutricionais, como inibidores de proteases e lectinas. Os fatores antinutricionais são gerados nos alimentos in natura pelo metabolismo normal da espécie da qual o material se origina e, por mecanismos diferentes como decomposição ou inativação de alguns nutrientes e diminuição digestiva ou metabólica do alimento, exercem efeito prejudicial aos animais. Apesar de não serem tóxicos, sua presença nos alimentos prejudica o crescimento, piora a conversão alimentar, provoca alterações hormonais e esporádicas lesões nos órgãos (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

Para degradação dos polissacarídeos não amiláceos, enzimas como xilanases, celulasas e β -glucanases são indicadas para animais não-ruminantes com dietas a base de trigo, arroz, cevada, aveia, milho e soja (MARQUARDT et al., 1996; MATHLOUTHI et al., 2003). As aves, por exemplo, produzem certas enzimas digestivas como a amilase para digerir amido, e as proteases para degradar proteínas, entretanto, necessitam de

suplementação para um maior aproveitamento dos PNA's como fonte de energia e redução de suas propriedades antinutricionais (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARO DAS BIOMASSAS

O cultivo realizado para obtenção das enzimas protease, celulase e amilase utilizou farelo de trigo e bagaço de malte como substratos, ambos resíduos da agroindústria. O farelo de trigo foi adquirido no comércio local da cidade de João Pessoa – PB, seco e em pó, pronto para ser utilizado. Já o bagaço de malte foi obtido da produção de cerveja artesanal turmalina tipo Blond Ale e contém 95% de malte e 5% de farelo de trigo. O resíduo foi seco em estufa com circulação de ar a 60 °C durante 24 horas.

As biomassas foram armazenadas em recipientes fechados a temperatura ambiente. A Figura 3 mostra o aspecto do farelo de trigo e do bagaço de malte da forma em que foram utilizados.

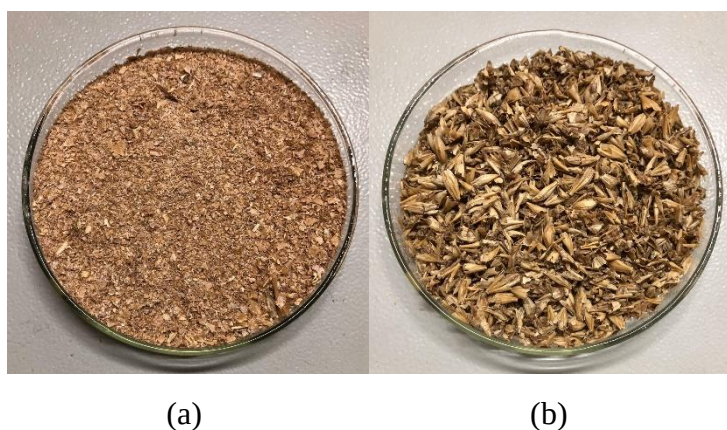


Figura 3 - Biomassas de farelo de trigo (a) e bagaço de malte (b).

Fonte: Autor, 2019.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Foi realizada a caracterização físico-química do farelo de trigo e do bagaço de malte quanto à umidade e ao pH. Ambas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.1 pH

Para o pH, seguiu-se a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 grama da amostra. Após

homogeneização, a suspensão foi deixada em repouso por um período de aproximadamente 20 minutos. O pH foi mensurado em pHmetro digital previamente calibrado com as soluções padrões (pH = 4,0 e pH = 7,0).

4.2.2 Umidade

A umidade das amostras foi determinada seguindo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para isso, pesou-se 2 gramas da amostra em placa de alumínio previamente tarada e, em seguida, levou-se para estufa a 105 °C por 24 horas. As placas foram resfriadas em dessecador e pesadas. A umidade das amostras foi determinada utilizando a Equação 1 a seguir:

$$U (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} * 100 \quad (1)$$

Onde: U = Umidade;

m_i = Massa inicial da amostra;

m_f = Massa final da amostra;

4.3 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o fungo *Penicillium* sp. FSDE15 cedido pela Profa. Dra. Laís Campos Teixeira de Carvalho - CTDR/UFPB. O microrganismo foi conservado sob refrigeração, em meio ágar-batata-dextrose (BDA), conforme Figura 4. Foi realizado repique a cada 90 dias a fim de manter a viabilidade celular.



Figura 4 - Placa do *Penicillium* sp. FSDE15.

Fonte: Autor, 2019.

4.4 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo foi feita uma suspensão dos esporos presentes na placa utilizando água destilada estéril suficiente para cobri-la. Os esporos foram suspensos com auxílio de alça de platina e a suspensão foi acondicionada em tubo estéril.

A quantificação da suspensão obtida foi feita através da contagem dos esporos em câmara de Neubauer espelhada, com auxílio do microscópio. Todo o processo foi feito próximo ao bico de Bunsen, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação.

O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se uma concentração de 10^6 esporos por grama de substrato sólido. Para o cálculo do volume de inóculo foram utilizadas as Equações 2 e 3.

$$\text{Concentração} \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) = \sum_{i=1}^{N=5} X_i * 5 * 10^4 * FD \quad (2)$$

Onde: X_i = Quantidade de esporos em um dado quadrante;

5 = Fator de expansão dos quadrantes contados para o total de quadrantes;

10^4 = Fator de conversão de mm^3 para cm^3 ;

FD = Fator de diluição.

$$\text{Volume (inóculo)} = \frac{\text{concentração (esporos/grama)} * \text{massa do meio (g)}}{\text{concentração (esporos/mL)}} \quad (3)$$

4.5 ENSAIOS FERMENTATIVOS

Para obtenção das enzimas, foi realizado um cultivo em duplicata utilizando três diferentes meios: farelo de trigo puro, bagaço de malte puro e a combinação de ambos na proporção de 50%. Todos os meios foram dispostos em erlenmeyers de 1 L, umidade de 60%, totalizando em 100 gramas de substrato com uma concentração de esporos de 10^6 esporos por grama. A temperatura média do experimento foi de 27°C .

Os meios de cultura foram umedecidos com água, sendo o volume a ser adicionado calculado de acordo com a umidade de cada resíduo, obtida na etapa de caracterização físico-química. A Equação 4 foi usada para o cálculo da quantidade de água.

$$m_{H_2O} = \frac{\text{massa do resíduo} * (\text{umidade ideal} - \text{umidade do resíduo})}{1 - \text{umidade ideal}} \quad (4)$$

Após umedecidos, os resíduos foram dispostos nos erlenmeyers de 1 L e esterilizados em autoclave por 15 minutos e temperatura de 121 °C. Após o processo de esterilização, os erlenmeyers com os meios de cultivo foram deixados em temperatura ambiente para resfriar.

Com os meios de cultivo resfriados, foi realizada a inoculação dos esporos previamente suspensos. O volume da suspensão de esporos adicionado aos meios de fermentação foi ajustado para se obter uma concentração de 10^6 esporos por grama de substrato sólido. Os meios inoculados foram homogeneizados e incubados durante 7 dias.

4.6 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

Ao longo dos 7 dias de experimento, foi realizada extração enzimática para quantificação da atividade proteolítica em intervalos de 24, 72, 120, 144 e 168 horas utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 na proporção de 10 mL por grama de sólido durante 3 horas em agitador mecânico. O produto sólido obtido ao final das 168 horas de cultivo foi seco em estufa a 40 °C por 48 horas, triturado em processador e submetido também a extração, visando avaliar o comportamento da atividade enzimática após esse processo.

Além disso, foi realizada extração utilizando tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 para análise das atividades celulolítica e amilolítica também na proporção de 10 mL por grama de sólido para 144 e 168 horas de cultivo e para 168 horas de cultivo após secagem. A extração se deu por 3 horas em agitador do tipo shaker a 180 rpm e 30 °C.

Todos os extratos enzimáticos obtidos foram filtrados utilizando papel de filtro qualitativo, estocados em tubos e congelados para posteriores análises de atividade enzimática.

4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foi realizada análise de atividade enzimática para quantificação das proteases, celulasas e amilases presentes nos extratos.

Para determinação de celulase e amilase, os extratos enzimáticos foram previamente centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. As análises foram realizadas em duplicata.

4.7.1 FPase

Para quantificação da atividade de FPase, que representa a celulase total, empregou-se como substrato o papel de filtro Whatman nº1, cortado em tiras de 1x6 cm, conforme metodologia adaptada de Ghose (1987). As tiras de papel de filtro foram adicionadas em tubos de ensaio de forma espiral, juntamente com 1 mL de solução tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) e 0,5 mL de extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50 °C durante 60 minutos e, ao final desse tempo, os tubos foram levados para o banho de gelo. Em seguida, 0,5 mL de cada tubo foram transferidos para novos tubos contendo 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A reação com o ácido dinitrosalicílico possibilitou dosar a quantidade de glicose liberada após fervura por 5 minutos a 100 °C, diluição com 6,5 mL de água destilada e leitura de absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Por fim, utilizou-se o fator da curva padrão para enzimas, e a quantificação da atividade de FPase foi determinada utilizando a Equação 5, em que uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto a partir do substrato utilizado, nas condições do ensaio (CARVALHO, 2007).

$$\text{FPase (U/mL)} = \frac{(A-B) * f * 1,5}{0,18 * 60 * 0,5} \quad (5)$$

Onde: A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra;

f = Fator de conversão da curva padrão para enzimas (mg/mL);

1,5 = Volume total do meio de reação (mL);

0,18 = Fator de conversão de mg para µmol de glicose;

60 = Tempo de reação (min);

0,5 = Volume da enzima no meio de reação (mL).

Para elaboração da curva padrão para enzimas pesou-se 0,36 g de glicose e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com tampão

citrato de sódio (50 mM, pH 4,8). Em seguida, transferiu-se 0,5; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 9,0 mL da solução-mãe para tubos de ensaio e completou-se o volume de cada tubo para 10 mL com tampão citrato. Após isso, 0,5 mL de cada tubo foram transferidos para novos tubos de ensaio que continham 0,5 mL de solução DNS (em triplicata). Esses novos tubos foram aquecidos em banho-maria a 100 °C por 5 minutos e depois resfriados em banho de gelo. Finalmente, 6,5 mL de água destilada foram adicionados a cada tubo de ensaio e, após homogeneizados, foram feitas leituras de absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. O branco foi feito com 0,5 mL de tampão citrato e 0,5 mL de DNS.

4.7.2 Amilase

A atividade de amilase foi determinada conforme metodologia adaptada de Aiyyer (2004). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25 mL de solução de amido solúvel 1% em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) juntamente com 0,25 mL do sobrenadante do extrato enzimático. Os tubos foram colocados em banho térmico a 50 °C durante 10 minutos para ocorrência da reação. Após esse tempo, adicionou-se 0,5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) para que a reação fosse interrompida.

O branco das amostras foi preparado adicionando 0,25 mL de tampão citrato de sódio e 0,25 mL do sobrenadante do extrato enzimático em tubos de ensaio. Da mesma forma, após os 10 minutos, foram adicionados 0,5 mL de reagente DNS. O branco do espectrofotômetro foi preparado com 0,5 mL de tampão citrato de sódio e 0,5 mL de reagente DNS.

Todas as amostras foram agitadas e levadas ao aquecimento em banho-maria por 5 minutos a 100 °C. Passado esse tempo, foram resfriadas em banho de gelo e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 6,5 mL de água destilada.

A atividade enzimática de amilase foi determinada através da Equação 6, em uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto a partir do substrato utilizado, nas condições do ensaio (CARVALHO, 2007).

$$\text{Amilase (U/mL)} = \frac{(A-B) * f * 0,5}{0,18 * 10 * 0,25} \quad (6)$$

Onde: A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra;

f = Fator de conversão da curva padrão para enzimas (mg/mL);

0,5 = Volume total do meio de reação (mL);

0,18 = Fator de conversão de mg para μmol de glicose;

10 = Tempo de reação (min);

0,25 = Volume da enzima no meio de reação (mL).

4.7.3 Protease

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia proposta por Charney e Tomarelli (1947) e adaptações de Caprara (2015). O extrato enzimático (0,25 mL) foi incubado por 40 minutos a 37 °C na presença de 0,25 mL de azocaseína a 0,5% em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4). A reação foi interrompida pela adição de 0,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% para precipitação da caseína não hidrolisada. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos e 0,10 mL do sobrenadante foram transferidos para microplaca de 96 poços, apresentada na Figura 5, onde foram adicionados 0,10 mL de hidróxido de potássio (KOH) 5,0 N. A reação com o hidróxido induz a formação da cor laranja característica dos grupamentos azo em pH alcalino. Por fim, foi realizada leitura em espectrofotômetro de microplacas a 430 nm.

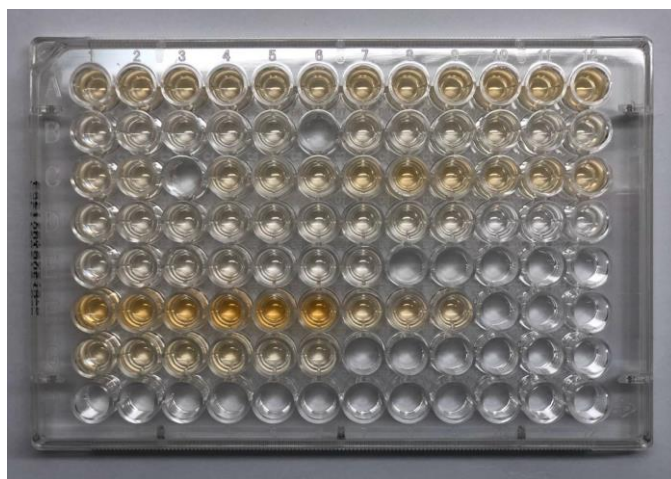


Figura 5 – Microplaca de 96 poços de fundo chato utilizada para quantificação da atividade proteolítica.

Fonte: Autor, 2019.

O branco da reação se deu da mesma forma citada acima, substituindo apenas o extrato enzimático por 0,25 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4). O branco das amostras foi feito adicionando-se TCA antes do extrato enzimático.

A atividade proteolítica foi determinada conforme Equação 7, em que uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001/min.

$$\text{Protease (U/mL)} = \frac{(A-B) * 1000}{40 * 0,25} \quad (7)$$

Onde: A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra;

1000 = Fator de conversão das leituras de absorbância;

40 = Tempo de reação (min);

0,25 = Volume da enzima no meio de reação (mL).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização físico-química quanto ao pH e à umidade do farelo de trigo e do bagaço de malte estão apresentadas na Tabela 2. Os resultados representam a média aritmética das análises, que foram realizadas em triplicata.

Tabela 2 – Parâmetros da caracterização físico-química do bagaço de malte e do farelo de trigo.

Resíduo	pH	Umidade (%)
Bagaço de malte	6,21 ± 0,01	6,1674 ± 0,0365
Farelo de trigo	6,59 ± 0,04	12,2181 ± 0,0364

Fonte: Autor, 2019.

A concentração hidrogeniônica que representa o pH dos alimentos é um fator de importância fundamental na limitação dos tipos de microrganismos capazes de se desenvolverem em um alimento, exercendo influência sobre o crescimento, a sobrevivência ou a destruição destes seres (SILVA, 2000).

Dessa forma, é proposta uma classificação em que os alimentos de baixa acidez, os quais apresentam $\text{pH} > 4,5$ estão mais sujeitos a multiplicação microbiana de espécies patogênicas e/ou deteriorantes. Os alimentos com pH na faixa de 4,0 a 4,5 são considerados ácidos e exibem condições ótimas para o desenvolvimento de bolores e leveduras, além de bactérias lácticas e algumas esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Por fim, nos alimentos muito ácidos ($\text{pH} < 4,0$), o desenvolvimento microbiano fica restrito quase que exclusivamente a bolores e leveduras (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os valores de pH encontrados para o farelo de trigo e para o bagaço de malte foram próximos da neutralidade e, portanto, não estão na faixa ideal para o desenvolvimento de bolores e leveduras, apesar de favorecerem a proliferação de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Por esta razão, os resíduos foram armazenados em recipientes fechados para imediata utilização e, com isso, reforça-se a

necessidade de um cuidadoso processo de esterilização anterior à inoculação do fungo FSDE15 e início do cultivo.

A umidade representa a quantidade de água em uma amostra, sendo um dos parâmetros monitorados em diversos processos. Apesar de não ser um indicador seguro para prever atividade microbiana e reações físico-químicas, a umidade interfere diretamente na atividade de água e conseqüentemente no desenvolvimento de microrganismos no meio. Valores de 10 a 15% deste parâmetro são satisfatórios para manutenção na qualidade da amostra e indicam baixos níveis de contaminação (SILVA, 2008).

Ambos os resíduos estudados apresentaram valores de umidade dentro da faixa mencionada e puderam ser armazenados a temperatura ambiente sem maiores problemas de contaminação.

5.2 PRODUÇÃO DE PROTEASE

A Figura 6 apresenta os valores de pH para os cultivos de *Penicillium* sp. FSDE15 realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo puro e bagaço de malte puro.

Como mostrado, o pH dos meios fermentados não apresentou grandes variações ao longo do tempo, mantendo-se na faixa de 6,35 a 7,27 durante todo o experimento. Para os meios compostos de farelo de trigo (50%) + bagaço de malte (50%) e farelo de trigo puro é possível observar aumentos progressivos para esse parâmetro, atingindo, ao final da fermentação, valores próximos ao do pH utilizado para extração das proteases.

O pH ótimo de atividade enzimática é um valor muito específico de cada enzima, variando entre diferentes proteases produzidas por um mesmo fungo (LI, ZONG, 2010). De acordo com Beg e Gupta (2003), as proteases comerciais de origem microbiana possuem atividade ótima geralmente na faixa de pH que varia de 8,0 a 12,0, o que as torna de grande interesse para utilização em formulações de detergentes, devido ao pH alcalino desses produtos. Como exemplo, pode-se citar a Alcalase®, enzima largamente utilizada para essa finalidade, e que possui pH ótimo de atuação na faixa de 8,0-9,0.

Em estudos realizados por Germano et al. (2003), os valores de pH ótimo encontrados para a produção de proteases por *Penicillium* sp. variaram de 6,0 a 8,0. Para Bittencourt (2014), o pH ótimo das proteases produzidas pelo fungo *Penicillium*

fellutanum foi igual a 7,0, sendo obtidas atividades proteolíticas de 48,3 U/mL e de 14,55 U/mL para fermentação em estado líquido em dois diferentes meios de cultivo.

No presente trabalho, a extração e a quantificação das proteases produzidas pelo *Penicillium* sp. FSDE15 foi realizada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4.

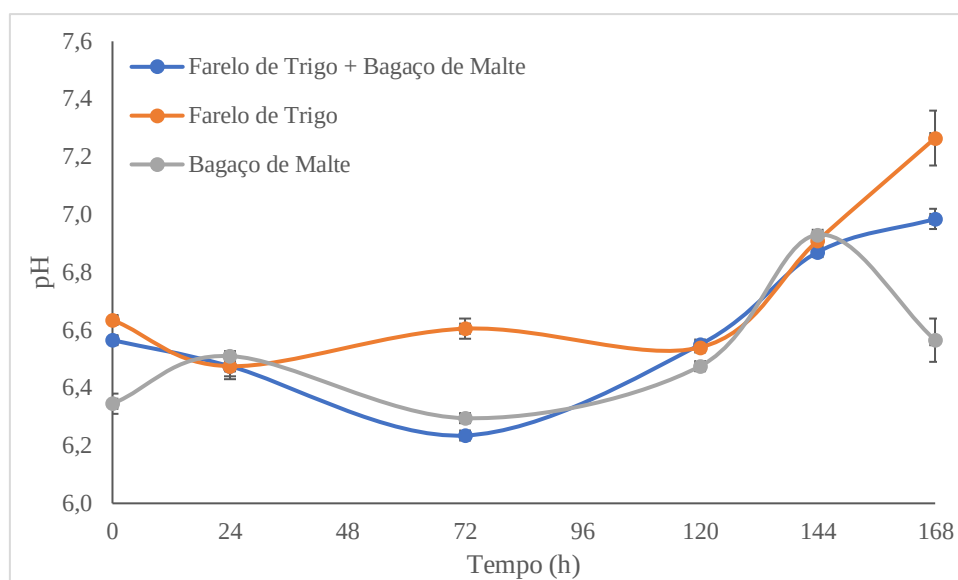


Figura 6 – Valores de pH durante os cultivos do *Penicillium* sp. FSDE15 realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte.

Fonte: Autor, 2019.

A Figura 7 apresenta a cinética de produção de protease para os cultivos realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo puro e bagaço de malte puro.

Pode-se observar que o comportamento cinético da produção de protease para os três ensaios fermentativos foi semelhante. Os maiores valores obtidos foram para o meio composto de farelo de trigo puro, com atividades enzimáticas aproximadamente constantes de $8,80 \pm 0,02$ U/mL, $8,88 \pm 1,80$ U/mL e $9,00 \pm 1,23$ U/mL às 120, 144 e 168 horas, indicando uma estabilidade na produção da enzima.

Bittencourt (2014) analisou a atividade de proteases para cepas de *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* utilizando resíduos agroindustriais, tais como casca de soja, resíduo de soja, engaço de bananeira e farelo de trigo como fontes de carbono em fermentação em estado líquido. Dentre os citados, o farelo de trigo apresentou melhores resultados com atividade proteolítica de 71,91 U/mL para o *P. fellutanum* e 72,98 U/mL

para o *P. restrictum* em comparação com 19,55 U/mL e 13,7 U/mL, respectivamente, em meios sem a presença de farelo de trigo.

Em 2003, Germano et al. utilizaram torta de soja como substrato para produção de proteases neutras por *Penicillium* sp. em fermentação em estado sólido, obtendo uma atividade proteolítica de 43 U/mL.

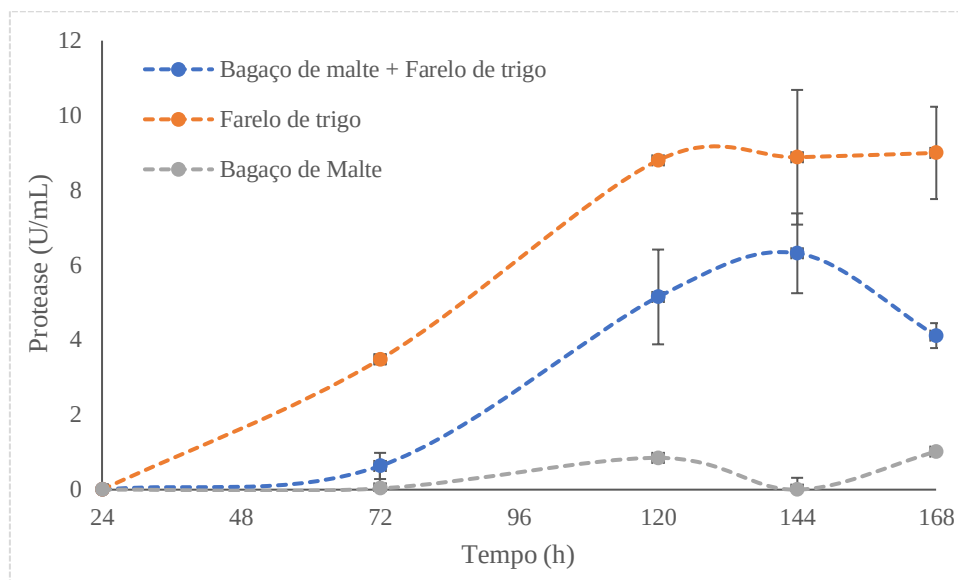


Figura 7 – Cinética da produção de protease por *Penicillium* sp. FSDE15 para os cultivos realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte.

Fonte: Autor, 2019.

Visando avaliar o comportamento da atividade enzimática, o produto sólido obtido ao final das 168 horas de cultivo foi seco em estufa a 40 °C por 48 horas, triturado em processador e submetido também a extração nas mesmas condições anteriores. Os resíduos secos estão apresentados na Figura 8.

A Figura 9 apresenta a atividade proteolítica nos extratos enzimáticos obtidos utilizando o meio fermentado antes e depois de seco a 40 °C em 168 horas de experimento. Pode-se observar que para os três meios estudados, as maiores atividades proteolíticas foram encontradas por meio das extrações realizadas com o meio fermentado após a secagem. Isso ocorreu provavelmente devido ao aumento na concentração das enzimas após retirada da água e consequente diminuição da umidade do meio. Com isso, pôde-se concluir que a temperatura utilizada não ocasionou perda na atividade das proteases produzidas pelo *Penicillium* sp. FSDE15. A máxima produção de proteases foi de 26,42

$\pm 1,20$ U/mL e ocorreu no extrato enzimático obtido com o cultivo seco de farelo de trigo puro às 168 horas de fermentação.

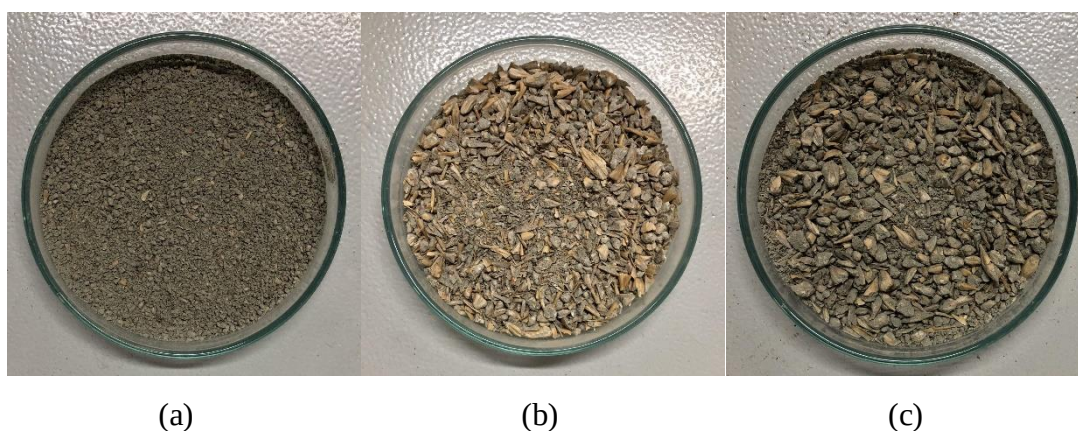


Figura 8 – Cultivo do *Penicillium* sp. FSDE15 utilizando farelo de trigo (a), bagaço de malte (b) e farelo de trigo (50%) + bagaço de malte (50%) (c) ao final das 168 horas após secagem e trituração.

Fonte: Autor, 2019.

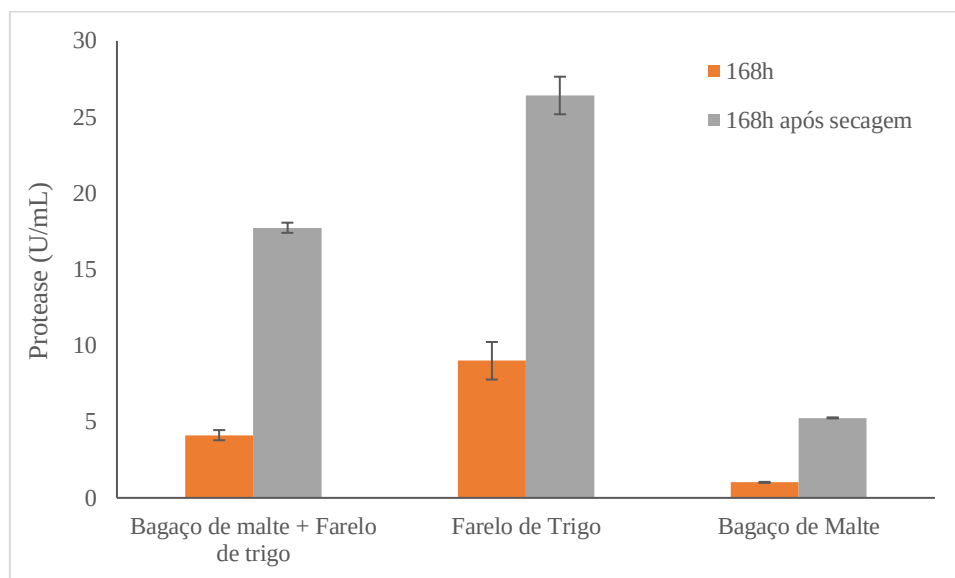


Figura 9 – Comparação da produção de protease por *Penicillium* sp. FSDE15 para os cultivos realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte em 168 horas e 168 horas após secagem.

Fonte: Autor, 2019.

Em 2014, Bittencourt estudou o efeito da temperatura na estabilidade de proteases produzidas por *Penicillium restrictum*. Foi observado que a 40 °C as proteases

apresentaram somente 64% de atividade proteolítica e a 45 °C mantiveram 62% de sua atividade no intervalo de 1 hora.

Zhu e colaboradores (2009) caracterizaram uma protease purificada expressa por *Penicillium chrysogenum* e encontraram uma temperatura ótima de 35 °C, valor esse 10-15 °C inferior ao que normalmente é utilizado na indústria. Na temperatura de 60 °C a enzima perdeu quase 90% de sua atividade.

Galvao et al. (2013) verificaram a produção de proteases por *Penicillium* e *Aspergillus* e observaram que o gênero *Penicillium* apresentou resultados satisfatórios de atividade enzimática. Já para o gênero *Aspergillus*, apenas uma das espécies degradou a caseína, indicando, assim, que a atividade proteolítica pode variar entre indivíduos da mesma espécie e gêneros.

5.3 PRODUÇÃO DE CELULASE E AMILASE

A Figura 10 apresenta a produção de FPase para os ensaios realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo puro e bagaço de malte puro em 144, 168 horas e 168 horas após secagem do meio fermentado.

Conforme mostrado, a produção de FPase seguiu um comportamento semelhante ao das proteases, sendo as maiores atividades celulolíticas obtidas por meio da extração realizada após a secagem do meio fermentado. O farelo de trigo puro foi o substrato que apresentou a maior produção de $0,141 \pm 0,001$ U/mL.

Comparando as atividades enzimáticas obtidas às 144 horas e às 168 horas de cultivo, a maior produção de $0,092 \pm 0,005$ U/mL ocorreu às 144 horas para o meio composto de farelo de trigo puro. Os ensaios realizados com bagaço de malte (50%) e farelo de trigo (50%) também apresentaram maior atividade em 144 horas em relação às 168 horas. Com isso, estima-se que caso a secagem tivesse sido realizada às 144 horas de experimento, provavelmente teriam sido obtidas maiores atividades celulolíticas.

Daronch et al. (2015) obtiveram uma produção celulolítica de 0,079 U/mL por *Penicillium* sp. em 7 dias de cultivo utilizando casca de soja como substrato e umidade de 70%. Almeida (2012) também produziu a enzima celulase em 7 dias de experimento e umidade de 70% com o *Penicillium variable* em meio com farelo de trigo, e obteve uma atividade celulolítica de 0,107 U/mL.

Dessa forma, as celulases produzidas neste trabalho apresentaram atividade superior frente aos autores mencionados, sobretudo devido à realização da operação de secagem do meio fermentado antes da etapa de extração enzimática.

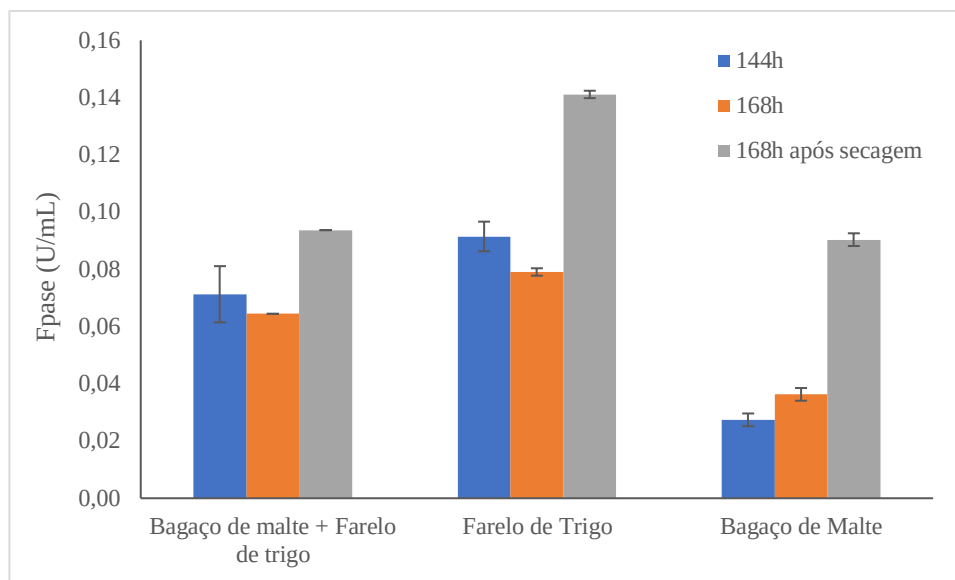


Figura 10 – Produção de FPase por *Penicillium* sp. FSDE15 para os cultivos realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte.

Fonte: Autor, 2019.

A Figura 11 apresenta a produção de amilase para os ensaios realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo puro e bagaço de malte puro em 144, 168 horas e 168 horas após secagem do meio fermentado. Para esta enzima, a maior produção de $3,080 \pm 0,103$ U/mL foi obtida às 168 horas para o meio de fermentação composto por farelo de trigo puro.

Freitas et al. (2014) obtiveram a melhor condição de produção de amilases em farelo de trigo utilizando o fungo *Syncephalastrum racemosum*, isolado do solo. Foi observada uma atividade de 2,98 U/mL, que se manteve aproximadamente constante entre 72 e 192 horas de fermentação. Singh et al. (2010) e Celestino et al. (2014) também relataram o farelo de trigo como melhor substrato para obtenção de amilases por *Aspergillus* 6V4 e *Bacillus cereus*, respectivamente.

Para as amilases produzidas pelo *Penicillium* sp. FSDE15, o único substrato que apresentou resultado superior na comparação das atividades do meio fermentado após

secagem foi o bagaço de malte, com uma atividade de $1,779 \pm 0,190$ U/mL, valor este bem inferior aos obtidos para os demais meios.

Sabe-se que para toda enzima há uma temperatura limite acima da qual observa-se gradativamente sua desnaturação pela ação do calor. A temperatura ótima de atividade enzimática representa o estado em que a molécula apresenta uma conformação ideal para sua máxima eficiência catalítica e é um valor muito específico de cada enzima (LI, ZONG, 2010).

Gonçalves (2006) observou que as amilases produzidas por fermentação em estado sólido apresentaram-se 100% estáveis a 50 °C e perderam 10% de sua atividade a 60 °C. Já Freitas et al. (2014) obtiveram amilases por *Syncephalastrum racemosum* com 91% de estabilidade a 55 °C e 77,8% a 60 °C.

Embora sejam encontrados na literatura dados a respeito da termoestabilidade de amilases produzidas por fungos em temperaturas acima de 40 °C, pode-se estimar a ocorrência da desnaturação das amilases obtidas pelo FSDE15 após submetidas ao processo de secagem, justificando, assim, o declínio na atividade amilolítica.

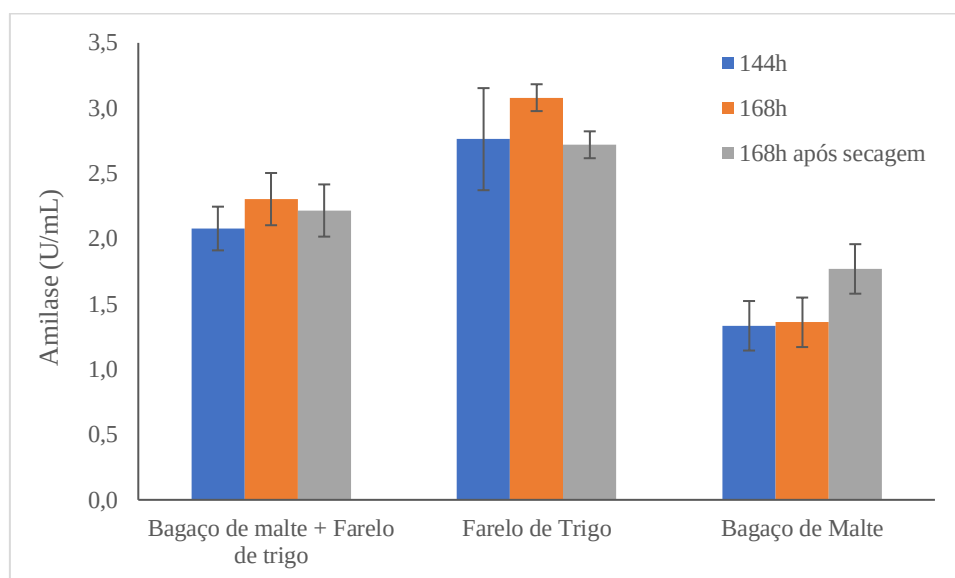


Figura 11 – Produção de amilase por *Penicillium* sp. FSDE15 para os cultivos realizados respectivamente com bagaço de malte e farelo de trigo na proporção de 50%, farelo de trigo e bagaço de malte.

Fonte: Autor, 2019.

6 CONCLUSÃO

As maiores produções enzimáticas foram encontradas no meio constituído de farelo de trigo puro, mostrando-se um resíduo promissor para obtenção das enzimas citadas, conforme apresentado na literatura.

As maiores atividades proteolíticas e celulolíticas foram obtidas com a extração enzimática realizada após a secagem do meio fermentado de $26,42 \pm 1,20$ U/mL e $0,141 \pm 0,001$ U/mL às 168 horas de experimento, respectivamente. Entretanto, observou-se que nas 144 horas de fermentação as celulasas apresentaram resultados superiores em relação às 168 horas, indicando que caso a secagem tivesse sido realizada às 144 horas de cultivo, provavelmente teriam sido obtidos valores superiores de atividade enzimática.

Para as amilases, observou-se uma queda na atividade amilolítica do meio fermentado após o processo de secagem, evidenciando uma possível desnaturação das enzimas. A máxima produção de $3,080 \pm 0,103$ U/mL ocorreu às 168 horas de cultivo.

As enzimas produzidas pelo *Penicillium* sp. FSDE15 no presente trabalho apresentaram atividades similares e até superiores frente aos valores encontrados na literatura, revelando-se como potenciais aditivos para ração animal e integrantes na formulação de detergentes enzimáticos, após a realização de estudos mais aprofundados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISSAOUI, N.; ABIDI, F.; MAHAT, S.; MARZOUKI, M. N. Purification and biochemical characterization of a novel protease from *Penicillium digitatum*—use in bioactive peptides production. **Journal of basic microbiology**. 2014; 54(S1): S178-S89.

AIYER, P. V. D. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 10, p. 519-522, 2004.

ALMEIDA, M. C. O. **Indução de celulasas e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos**. 2012. 145 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

ARAÚJO, J. A.; SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.3, p.69-77, 2007.

BATISTA, M. C. T. **Produção de dextranases a partir de bagaço de malte: caracterização e avaliação do potencial de aplicação em indústria sucroalcooleira**. 2014. 169 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenis*. **Enzyme and Microbial Technology**. 2003; 32(2): 294-304.

BITTENCOURT, M. L. S. A. **Avaliação do perfil de proteases expressas por *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* isolados do solo do cerrado brasileiro**. 2014. 65 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2008.

BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B. Queratinase. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 291-306, 2004.

BOURSCHEIDT, C. T.; OLIVEIRA, B. H.; SILVA, G. M. C. Avaliação do resíduo do bagaço de malte na alimentação animal. **Anais do II ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica**, 2010.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, Minas Gerais, v. 2, n. 6, p. 259-272, nov.-dez. 2005.

CAPRARA, C. S. C. **Processo de obtenção e caracterização de proteases extracelulares expressas por *Penicillium restrictum***. 2015. 73 f. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

CARVALHO, R.V. **Produção e caracterização de α -amilase por *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2007.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, J R, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CELESTINO, J. R.; DUARTE, A. C.; SILVA, C. M. M.; SENA, H. H.; FERREIRA, M. P. S. B. C. 2014. *Aspergillus* 6V4, a strain isolated from manipueira, produces high amylases levels by using wheat bran as a substrate. **Enzyme Research**, 2014: 1-4.

CHANALIA, P.; GANDHI, D.; JODHA, D.; SINGH, J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. **Reviews in Medical Microbiology**. 2011; 22(4): 96-101.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J biol Chem**. 1947.

COMISSÃO EUROPEIA. (2015) **Assessment of separate collection schemes in the 28 capitals of the EU**. Final Report. Bruxelas: Comissão Europeia. 161 p. Disponível em: <https://ec.europa.eu/environment/waste/studies/pdf/Separate%20collection_Final%20Report.pdf>. Acesso em: 17 set. 2019.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Safra Brasileira de grãos: boletim da safra de grãos: safra 2018/2019: levantamento: setembro 2019**. Brasília, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 17 set. 2019.

COSTA, F. G. P.; BRANDÃO, P. A.; BRANDÃO, J. S.; SILVA, J. H. V. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciênc. Agrotec**. 31: 865-870. 2007.

COZINHA TÉCNICA. **Farinha de trigo – Tipos de farinha de trigo**. Disponível em: <<https://cozinhatecnica.com/2019/01/farinha-de-trigo/>>. Acesso em 04 nov. 2019.

DARONCH, N. A.; ZENI, J.; SALAZAR, L. N.; TONIAZZO, G. Produção de celulase por *Penicillium* sp. utilizando resíduo agroindustrial em fermentação em estado sólido. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 11., 2015, São Paulo, 2015.

DE PARIS, L. D. **Produção de Enzimas Fúngicas por Fermentação em Estado Sólido das Sojas Orgânica, Transgênica e Convencional**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008 (Dissertação de Mestrado).

DINI, C. M. **Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indiciae-seudaticae* n31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, 2010.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa.** 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

FÉLIX, C. R.; NORONHA, E. F.; DE MARCO, J. L. Proteases: características e aplicações industriais. *Enzimas como agentes Biotecnológicos* Ribeirão Preto: Legis summa. 2004: 327-47.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Synthesis of α -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**. n. 42, p. 320–326, 2002.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2005.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 12, n. 4, p. 226-232, out./dez. 2014.

GALVAO, J.; DAVIS, B.; TILLEY, M.; NORMANDO, E. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **FASEB J.** 2013; 28:1317-1330.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**. 2003; 32(2): 246-51.

GHORBEL, S.; KAMMOUN, M.; SOLTANA, H.; NASRI, M.; HMIDET, N. *Streptomyces flavogriseus* HS1: Isolation and Characterization of Extracellular Proteases and Their Compatibility with Laundry Detergents. **BioMed Res Int**, 1-8, 2014.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p. 257-268, 1987.

GOMES, I.; GOMES, J.; STEINER, W. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 207-214, 2003.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de alfa-amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas.** 2006. xiv, 76 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94966>>.

GÜDER, S. **Purification of *Scytalidium thermophilum* xylanase by chromatographic methods and biochemical characterization.** Ms Thesis, Graduate School of Natural and Applied Science, Karamanoğlu Mehmetbey University, Karaman. 2014.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 381–395, 2002

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol Adv.** 1999; 17: 561–594.

LEITÃO, A. (2015) Economia circular: uma nova filosofia de gestão para o séc. XXI. **Portuguese Journal of Finance, Management and Accounting**, v.1, n.2, p. 150-171.

LÉVÊQUE, E.; JANECEK, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 3-14, 2000.

LI, J.; YANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, K. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. **Process Biochem.** 2012; 41: 925–929.

LI, N.; ZONG, M. H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **J Molecular Catalysis B: Enzymatic.** 2010; 66: 43–54.

LODS, L. M.; DRES, C.; JOHNSON, C.; SCHOLZ, D. B.; BROOKS, G. J. The future of enzymes in cosmetics. **Int J Cosmetic Sci**, 22:85-94, 2000.

MARATHE, S. K.; VASHISTHT, M. A.; PRASHANTH, A.; PARVEEN, N.; CHAKRABORTY, S.; NAIR, S. S. Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. **J Genet Eng Biotechnol.** 2018; 16(1):38-46.

MARQUARDT, R. R.; BRENES, A.; ZHANG, Z. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. **Animal Feed Science Technology**, v.60, p.321-330, 1996.

MATHLOUTHI, N.; JUIN, H.; LARBIER, M. Effect of xylanase and α -glucanase supplementation of wheat- or wheat- and barleybased diets on the performance of male turkeys. **British Poultry Science**, v.44, n.2, p.291-298, 2003.

MOREIRA, K. A.; ALBUQUERQUE, B. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L. Application of protease from *Nocardiopsis* sp. as a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 2002; 18(4): 309-15.

MURAKAMI, A. E.; FERNANDES, J. I. M.; SAKAMOTO, I. M. SOUZA, L. M. G. & FURLAN A. C. Efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Acta Sci. Anim. Sci.** 29:165-172. 2007.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Review: Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science.** n. 43, p.1–14, 2006.

NASCIMENTO, W. B; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, Boa Vista, v.7, n.6, p. 1968-1987, nov.-dez. 2015.

NETO, H.; ABOU, Y. A. **Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum***: Universidade de São Paulo; 2012.

NUNES, M. L. **Influência de ligantes naturais na eficiência de rações para a alimentação de camarões *Macrobrachium rosenbergii***. 1993. 112f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP.

OVAERE, P.; LIPPENS, S.; VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. **Trends in Biochem Sci**, 34: 1-9, 2009.

PANT, G.; PRAKASH, A.; PAVANI, J. V. P.; BERA, S.; DEVIRAM, G. V. N. S.; KUMAR, A.; PRASUNA, R. G. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **J Taibah Univ Sci.** 2015; 9(1): 50–55.

PEREIRA, E. M. **Substituição de milho por ingredientes alternativos na dieta de tourinhos confinados na fase de terminação**. 2005. 100 f. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2005.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews.** 1998; 62(3): 597-635.

RAY, A. Protease enzyme-potential industrial scope. **International Journal of Technology**, v. 2, p. 1-4, 2012.

SANTOS, A. F.; GANDRA R. F.; OLIVEIRA S. S. C.; KNEIPP L. F.; D'AVILA-LEVY C. M.; CÁTIA LACERDA SODRÉ C. L.; BRANQUINHA M. H.; SANTOS A. L. S. Peptidases em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria: Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Editora Blücher, v. 1, Cap. 7, 1 ed., 2016.

SANTOS, M. S.; RIBEIRO, F. M. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 2005. 58 p.

SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash

performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 2011; 42(2): 298- 304.

SEAE. **Secretária de Acompanhamento Econômico**. Ministério da fazenda. Panorama do trigo e derivados. Disponível em: <http://seae.fazenda.gov.br/central-de-documentos/panoramas-setoriais/Trigo_Derivados.pdf>. Acesso em: 17 set. 2019.

SHAN, L.; MARTI, T.; SOLLID, L. M.; GRAY, G. M.; KHOSLA, C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. **Biochemical Journal**, v. 383, p. 311-318, 2004.

SILVA, A. M. L. Apostila de aulas práticas de análise físico-química de alimentos. Goiânia: PUC Goiás, 2008.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 8, p. 2885- 2889, jul. 2005.

SILVA, E. T.; DE SOUZA, R. O. **Resíduos do processamento de peixes comerciais como fonte de proteases alcalinas e seu potencial uso biotecnológico**: Universidade Federal de Pernambuco. 2010.

SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.

SILVA, R. R. **Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, 2011.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochem**, 36: 781–785, 2001.

SINGH, R. K.; MISHRA, S. K.; KUMAR, N. 2010. Optimization of α -amylase production on agriculture byproduct by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, 1: 867-876.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SWINNEN, J.; RIERA, O. The global bioeconomy. **Agricultural Economics**, v. 44, n. s1, p. 1-5, 2013.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELATORRES, E.; AGUILAR, C. N. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.13, n. 2, p.157-167, mar. 2003.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**. 2009; 114(2): 402-7.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista Citino**, Curitiba, v.1, n.1, p. 44-50, out.-dez. 2011.

WILSON, T. J.; SINGH, R. K. Proteases as modulators of tumor–stromal interaction: primary tumors to bone metastases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - **Reviews on Cancer**. 2008; 1785(2): 85-95.

WISNIEWSKI, A. C.; ALMEIDA, M. A. L.; PALMA, M. B.; TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 285-293, jul.-set. 2010.

ZAGO, V. C. P.; BARROS, R. T. V. Gestão dos resíduos sólidos orgânicos urbanos no Brasil: do ordenamento jurídico à realidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Belo Horizonte, v.24, n.2, p. 219-228, mar.-abr. 2019.

ZHU, H. Y.; TIAN, Y.; HOU, Y. H.; WANG, T. H. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. **Molecular biology reports**. 2009.