



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

IAGO HUDSON DA SILVA SOUZA

ESTUDO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASE MICROBIANA

IMPERATRIZ – MA

2017

IAGO HUDSON DA SILVA SOUZA

ESTUDO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASE MICROBIANA

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

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

IMPERATRIZ – MA

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Souza, Iago Hudson da Silva.

Estudo da estabilidade enzimática de protease
microbiana / Iago Hudson da Silva Souza. - 2017.

19 p.

Orientador(a): Adriana Crispim Freitas.

Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal
do Maranhão, Imperatriz, 2017.

1. *Aspergillus oryzae*. 2. Canola. 3. Fermentação em
estado sólido. I. Freitas, Adriana Crispim. II. Título.

IAGO HUDSON DA SILVA SOUZA

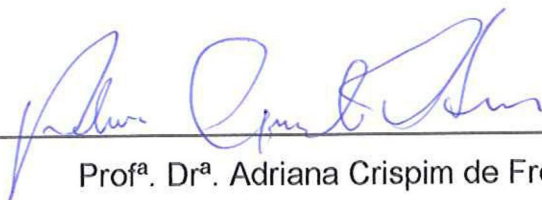
ESTUDO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASE MICROBIANA

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

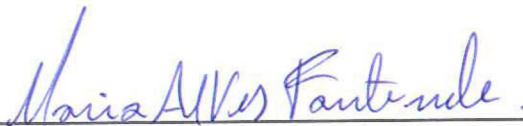
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Crispim de Freitas

Aprovada em 29/03/2017

BANCA EXAMINADORA



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



Prof.^a Dr.^a Maria Alves Fontenele (membro)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Prof.^a Dr.^a Virlane Kelly Lima Hunaldo (membro)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

*“Aos meus pais, Isair,
Francisco e Leôncio (in memorium),
por todos os ensinamentos e modelo de
vida e por ter proporcionado toda
felicidade que só se encontra em
família”.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida e pela sabedoria.

Agradeço, especialmente, aos meus pais, Leôncio Nunes da Cruz (in memorium), Francisco Luiz de Souza, Isanir Pereira da Silva (mãe chefe), por todas as vezes que me incentivava a estudar pra deixá-la rica. Mas, sobretudo pela educação honrosa que me proporcionaram. Pelos exemplos de vida, pela determinação.

Ao meu irmão, Aigo Allison sempre disposto a me perturbar.

A todos os meus parentes, especialmente minha tia Maria Divina por ter me aturado 9 anos em sua casa e que sempre contribuíram, direta ou indiretamente, para que eu alcançasse meus objetivos.

À todos os colegas da Universidade que são tantos. Especialmente a minha irmã de laboratório Bibiane me aturando aos domingos com "I look to you", Vanessinha (cateroba), Thabata, Maria Rica (Pretinha), Rafael (Cobrinha), Ludimila (tantas vezes fazendo meus experimentos), Cristian, Gustavo, Catarina, Francielle, Andresa e todos os colegas de laboratório que sempre me ajudaram e apoiaram muito nesta caminhada. Que sempre me "puxaram a orelha" e foram companheiros especiais, contribuindo para esta vitória.

À minha digníssima orientadora, Dr^a. Adriana Crispim, pela orientação neste trabalho, com toda paciência e dedicação que se poderia ter, conquistando admiração porque amizade já tem.

Ao meu digníssimo orientador (1^o) Dr^o. José Ribamar por todas as vezes que ficava no mínimo duas horas me orientando sobre todos os tipos de assuntos.

A Francisca Célia (Chiquinha) e Marcus que foram essenciais para os resultados.

À todos os amigos que sempre contribuíram, mesmo que indiretamente, para meu crescimento intelectual.

Aos meus chefinhos Elaine, Gabriel e Lucivânia da assistência pedagógica

À todos os colegas e professores do curso de Engenharia de alimentos da UFMA, pelo convívio "harmonioso" e amizade adquirida.

ESTUDO DA ESTABILIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASE MICROBIANA

Iago Hudson S. Souza,¹Adriana C. Freitas²

¹Discente do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão, Avenida da Universidade, S/N, Dom Afonso Felipe Gregory, 65915-240, Imperatriz, MA, Brasil

²Docentado Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão, Avenida da Universidade, S/N, Dom Afonso Felipe Gregory, 65915-240, Imperatriz, MA, Brasil

Resumo

O mercado global de enzimas em 2015 foi de US\$ 8,18 bilhões. As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais representando aproximadamente um total de 65% no mercado mundial. O presente estudo objetivou avaliar a estabilidade da protease microbiana do fungo *Aspergillus oryzae* NRRL 1911 utilizando como substrato a torta de canola por fermentação em estado sólido. Para o estudo da estabilidade a enzima foi submetida a variações de temperaturas de 30 a 80°C com intervalos de 5°C e em diferentes tampões nos intervalos de pH 3,0 a 10 com intervalos de 0,5. Com detecção de atividade enzimática por espectrofotometria. A enzima apresentou aumento de 71,99% em atividade ao se trabalhar em condições ótimas de temperatura 50°C e pH 7,0 com 399,92 U.g-1. A enzima apresentou também estabilidade em temperaturas de 30°C a 45°C devido a essas temperaturas estarem abaixo da temperatura ótima de 50°C. A enzima mostrou ser estável numa gama de pH com maiores atividades em pH 4,5; 7,0 e 8,5 com atividade de 49,79%, 64,14% e 49,1%, respectivamente. Portanto, sendo uma enzima com potencial para aplicação industrial.

1. Introdução

O mercado global de enzimas em 2015 foi de US\$ 8,18 bilhões. Onde esperam-se um crescimento significativo nos próximos oito anos por conta da crescente aplicação em detergentes, produtos farmacêuticos,

alimentos e bebidas. Com destaque para os diversos setores de aplicações de enzimas como pré-digestão da comida para bebês, clarificação de sucos, amaciamento de carnes, fabricação de queijos, conversão de amido em glicose. Além disso, as políticas governamentais favoráveis dos Estados Unidos, Áustria, Alemanha, França, Itália e Suécia a produção de biodiesel aumentarão a demanda até 2024 [1].

Biocatalisadores apresentam elevada seletividade e especificidade de atuação sobre substratos frente aos catalisadores químicos [3]. Esta característica favorece a utilização de enzimas em processos biotecnológicos e industriais com maior expressividade no mercado mundial, principalmente as proteases, carboidrases, lipases e fitases [4].

As proteases constituem um grupo importantes de enzimas industriais representando aproximadamente um total de 65% no mercado mundial [5].

A produção de enzimas proteolíticas pelos microrganismos se tornou uma alternativa atraente para aplicações específicas do ponto de vista industrial, sendo utilizadas em diversas atividades como no processamento de alimentos, bebidas, formulação de detergentes, processamento de couro e pele, amaciamento de carnes, formulação de medicamentos, indústria têxtil, entre outros, devido às melhorias nas técnicas de produção e purificação [6].

Entretanto, a produção industrial de enzimas é limitada devido aos custos com substratos representando de 30 a 40% do custo envolvido na produção de proteases, sendo sua otimização de grande importância para redução de custos produtivos dos processos fermentativos enzimáticos [7]. O uso de substrato de baixo custo como os resíduos agroindustriais representam uma alternativa para reduzir esses custos [8].

Muitos substratos têm sido utilizados para produção de enzimas como farelo de trigo [9], água de maceração de milho [10], pectina [11], farelo de soja e de arroz [12] e torta de canola [13].

A canola ocupa o terceiro lugar entre as oleaginosas produzidas no mundo. No Brasil a expansão da cultura obteve notoriedade nas duas últimas safras. Um levantamento mostra que foram colhidas 71,9 mil toneladas na safra 2016, que representou um aumento de 31% em relação à safra anterior [14].

A canola apresenta teor de óleo entre 34 a 40%, possui teores de proteínas em torno de 34 a 38%, possui menores teores de ácidos graxos saturados de todos os óleos vegetais e seu ciclo de produção de 100 a 130 dias. Devido ao teor de proteína de 34 a 38% após a extração de óleo, a torta de canola é usada na produção de ração [15].

A torta, subproduto proveniente do processo de extração do óleo, apresenta-se como matriz suporte para vários processos biotecnológicos, como fonte rica em nutrientes e um excelente substrato para crescimento de microrganismos, podendo ser utilizada na produção de enzimas, antibióticos e um excelente suplemento protéico na formulação de rações [13].

A crescente geração de resíduos nas atividades agroindustriais no país e no mundo levou à preocupação acerca de métodos que podem ser criados para o aproveitamento desses resíduos de forma a diminuir o impacto ambiental causado pelas atividades industriais.

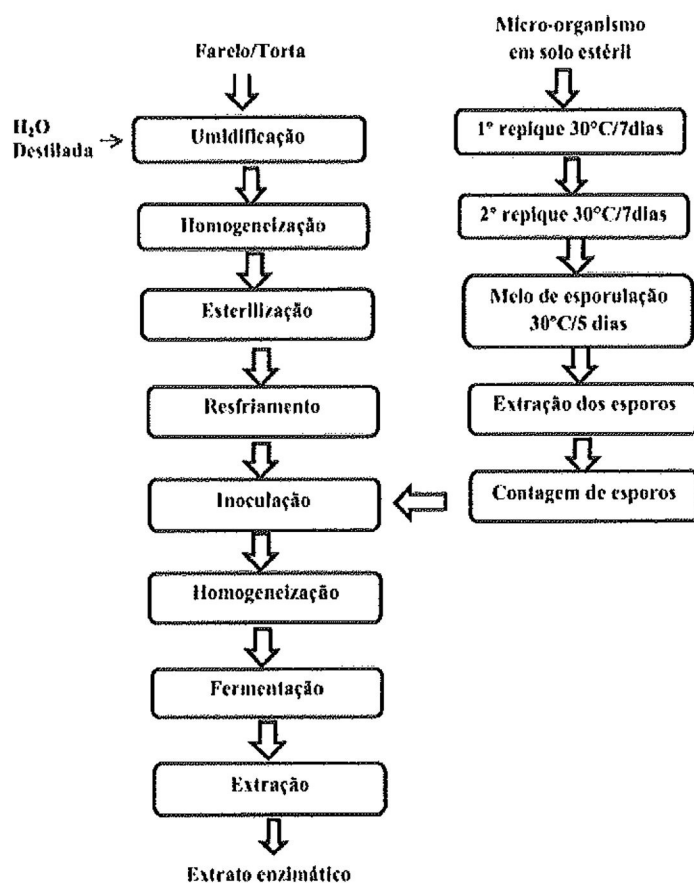
Os processos biotecnológicos vêm se destacando no cenário mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais no aproveitamento dos subprodutos agroindustriais.

A fermentação em estado sólido apresenta um papel de destaque no aproveitamento de subprodutos agroindustriais. É um bioprocessamento que oferece a possibilidade de se utilizar resíduos, os quais podem ser favoráveis ao crescimento de microrganismos pela similaridade com ambientes naturais, contribuindo para a economia do processo. Além disso, a produtividade é geralmente maior quando comparado com outros processos [16].

Nesse contexto, o presente estudo objetiva avaliar a estabilidade da protease microbiana do fungo *Aspergillus oryzae* NRRL 1911 utilizando como substrato a torta de canola.

2. Material e métodos

A Figura 2.1 apresenta o fluxograma de obtenção do extrato enzimático de protease nos experimentos.



Fonte: Freitas et al., 2015.

2.1 Matéria-prima

A torta de canola utilizada foi cedida gentilmente pela empresa Celena Alimentos S/A, localizada em Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul.

Farelo de trigo utilizado para a obtenção do inóculo foi obtido no comércio da cidade de Imperatriz, Maranhão.

2.2 Meios de fermentação

Para a umidificação da torta de canola utilizou-se uma proporção de 100 g de farelo para 40 mL de água destilada. Para umidificação do farelo de trigo utilizou-se proporção de 100 g para 125 mL de água destilada.

2.3 Microrganismo

A linhagem do fungo filamentosos utilizado foi *Aspergillus oryzae* NRRL 1911 doado pela Coleção de Culturas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e Serviço de Pesquisa Agrícola

2.3.1 Manutenção da cultura

Esporos da linhagem *Aspergillus oryzae* NRRL 1911 foram assepticamente transferidos para tubos de ensaio, contendo solo estéril e estocados a -18°C. Os esporos foram reativados em três etapas descritas a seguir.

2.3.2 Ativação da cultura

Na primeira etapa realizou-se a transferência das linhagens do fungo para ágar batata dextrose inclinado, previamente esterilizado a 121°C por 15 min, depois de inoculado foram incubados a 30°C por 7 dias em estufa e posteriormente conservados a 4°C por 3 meses.

A segunda etapa consistiu na transferência dos esporos da primeira etapa para novo ágar batata dextrose inclinado com mesma composição, depois de inoculados foram incubados a 30°C por 7 dias em estufa.

A última etapa de ativação visou à produção de esporos utilizados na inoculação do meio de fermentação. Para tal preparou-se um meio constituído de 10,0 g de farelo de trigo e 4mL de uma solução 1,7% (m/v) NaPO₄ e 2,0% (m/v) de (NH₄)₂SO₄. O meio foi esterilizado a 1atm a 121°C por 15 minutos.

Em seguida os esporos da segunda etapa de ativação foram suspensos mediante a adição de 5 mL de água estéril nos tubos de ensaio. O volume de 1 mL da suspensão de esporos foi utilizado como inóculo no meio com farelo de trigo em frascos Erlenmeyers de 125 mL, o meio inoculado foi incubado a 30°C por 5 dias em estufa. Após a esporulação em farelo de trigo, o inóculo foi conservado a 4°C, para ser utilizado nas fermentações.

2.3.3 Produção do inóculo

Para produzir o inóculo adicionou-se 40 mL de água estéril no meio com farelo de trigo da terceira etapa, em seguida realizou-se agitação manual com bastão de vidro por 5 minutos para que os esporos fossem transferidos para a água. Posteriormente realizou-se filtração em gaze estéril e 1 mL da suspensão de esporos foi adicionado aos meios para iniciar o processo fermentativo.

2.4 Fermentação em estado sólido

A massa do substrato foi colocada em um béquer de polipropileno, adicionou-se lentamente água destilada aos substratos nas proporções citadas no item 2.2. Posteriormente, foram transferidos 40 g do meio umidificado para Erlenmyer de 500 mL, diâmetro interno de boca 50 mm, e levado à autoclave a 121°C por 15 minutos. Os meios foram inoculados com suspensão de esporos, com o volume de 1 mL e incubados em estufa a 30°C durante 72 horas.

2.5 Obtenção dos extratos enzimáticos

A enzima foi extraída do meio fermentado pela adição de 100 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e homogeneização manual por 5 minutos. Após a homogeneização os Erlenmeyers foram novamente incubados em estufa a 30°C por 1 hora. Em seguida foi realizada uma filtração a vácuo utilizando papel de filtro qualitativo e o sobrenadante utilizado na determinação da atividade enzimática.

2.6 Atividade enzimática de protease

A atividade de protease foi realizada conforme metodologia descrita no trabalho método colorimétrico para determinação de atividade proteolítica [17], com adaptação no estudo de produção de enzima proteolítica[13]. As análises foram realizadas em triplicata. A mistura de reações constitui de 1mL de solução 0,5% (m/v) de azocaseína em tampão fosfato 100 mM e pH 7,0 e 1 mL de extrato enzimático, sendo feita uma diluição de 1 mL extrato enzimático para 100 mL de água destilada.

A mistura reacional foi incubada a 50°C durante 40 minutos. Após esse tempo, a reação foi parada com adição de 1mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v).

Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Transferiu-se 2mL do sobrenadante contendo aminoácidos e oligopeptídeos de baixo peso molecular para um tubo de ensaio, e adicionou-se 2 mL de KOH 5N, formando um composto com cor característica que foi quantificado por espectrofotômetro com comprimento de onda de 428 nm,

contra um branco preparado em condições idênticas com modificação na ordem da adição de TCA e somente depois o extrato.

2.7 Estabilidade da enzima em diferentes temperaturas

Inicialmente foram adicionados 10 mL de extrato bruto dentro de um Erlenmeyer (250 mL) de forma triplicata e submetido à determinada temperatura que foi de 30°C a 80°C, com intervalos de 5°C, em agitador orbital até que completasse 2:30 h.

Foram coletados 1 mL de extrato de cada Erlenmeyer nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 min e transferido para Erlenmeyers previamente identificados com o número correspondente da triplicata e o tempo descrito acima, e conservados sob refrigeração até completar todo o tempo da análise.

Em seguida foram adicionados 99 mL de água destilada aos Erlenmeyers contendo 1 mL do extrato bruto. O processo de mistura reacional e a determinação da atividade enzimática residual foi realizada de acordo com a descrição do item 2.7.

2.8 Estabilidade da enzima em diferentes pH

Inicialmente foram preparados soluções tampão com diferentes pH. Para pH entre 3-6 foram usados tampão acetato, pH 6,5 a 8,0 utilizou-se tampão fosfato e para a faixa de pH 8,5 a 10 foram preparados com tampão borato.

Os experimentos foram realizados para pH variando de 3 a 10, com intervalo de 0,5 unidade, totalizando quinze experimentos. A avaliação do efeito do pH foi realizada através da adição de 1 mL de extrato bruto em 99 mL do tampão correspondente ao pH e agitado em Shaker orbital durante duas horas a 30°C.

Em seguida foi retirado 1 mL do extrato diluído em Erlenmeyer e transferido para tubos centrifuga contendo 1 mL de azocaseína previamente ambientado em banho Maria a 50°C, em triplicata.

Para determinação da atividade enzimática em diferentes pH, seguindo as mesmas etapas descritas no item 2.7 na temperatura reacional, que foi 50°C para todas as amostras [17].

3. Resultados e discussões

3.1 Estabilidade em temperatura

Os resultados dos ensaios de estabilidade frente a diferentes condições de temperaturas do extrato bruto de protease produzido por *Aspergillus oryzae* NRRL 1911 por fermentação em estado sólido em torta de canola são apresentados na figura abaixo. Foram consideradas as atividades residuais de protease verificadas a cada 30 minutos, no intervalo de 0–150 minutos.

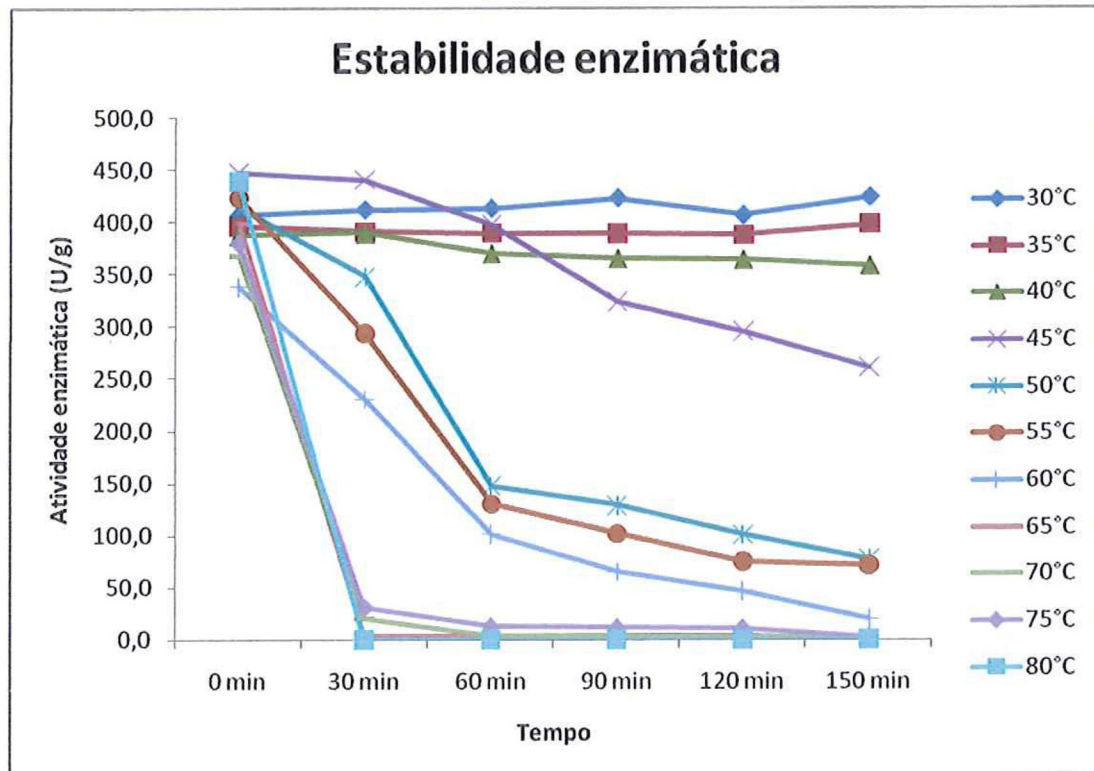


Figura. 1. Efeito da aplicação de diferentes temperaturas na estabilidade enzimática em intervalo de tempo de 150 minutos

Fazendo uma média dos valores obtidos no tempo 0 min para os 11 ensaios, a atividade encontrada foi de $399,92 \text{ U.g}^{-1}$, com aumento em 71,99% de atividade comparado a literatura modelo que obteve atividade enzimática de $234,32 \text{ U.g}^{-1}$ de protease obtida de *Aspergillus oryzae* por fermentação em estado sólido de torta de canola sem a utilização das condições ótimas de pH e

temperatura [18]. Podendo ser justificado que desde a extração e caracterização, a temperatura e o pH utilizado foram os ideais da enzima, dessa forma evitando alterações na atividade enzimática.

A temperatura desempenha um papel importante na produção de enzimas por microrganismos sendo necessário aplicar as condições otimizadas para obtenção de maior rendimento [19].

Conforme observado na Figura 1, a enzima apresentou estabilidade nas temperaturas de 30°C a 45°C durante 150 minutos de incubação. Na temperatura de 45°C houve uma redução de atividade a partir dos 30 min. Obtendo uma atividade de 260,2 U.g⁻¹(±0,14) no tempo final de incubação.

Em estudo da caracterização de protease de *Aspergillus tamarri* a enzima obteve estabilidade a 40°C com atividade residual de 90% [20]. Valor que condiz com esta pesquisa, onde a enzima manteve ao final da incubação com 89,5% de sua atividade.

Já nas temperaturas de 50, 55 e 60°C a enzima apresentou perda de atividade a partir de 30 min, com atividade de 347,9 U.g⁻¹(±0,07), 294,2 U.g⁻¹(±0,05) e 230,6 U.g⁻¹(±0,04) respectivamente. Nos tempos seguintes de incubação resultou em perda de atividade para 19,47%, 17,98% e 0,72% no tempo de 150 minutos de incubação.

Ao investigarem o efeito do período de incubação de lipase em diferentes tempos, autores constataram que a máxima atividade lipolítica ocorreu nos primeiros 30 min, observando uma redução com aumento do tempo de incubação [21]. Resultados que corroboram com o presente estudo.

As temperaturas de 65°C a 80°C na Figura 1, a enzima apresentou perda de atividade também nos primeiros 30 min incubação, devido à desnaturação proteica. Com atividade final de 0,37%, 0,34%, 0,20% e 0,0% para as temperaturas de 65, 70, 75 e 80°C, respectivamente.

O mesmo aconteceu com o estudo da produção de enzimas proteolíticas cultivadas de *Armillaria mellea*, onde temperatura de incubação acima de 60°C a atividade decresceu rapidamente [22].

3.3 Estabilidade em pH

Os resultados dos ensaios de estabilidade frente a variações de pH do extrato bruto de protease produzido por *Aspergillus oryzae* NRRL 1911 por

fermentação em estado sólido em torta de canola são apresentados na Figura 2.

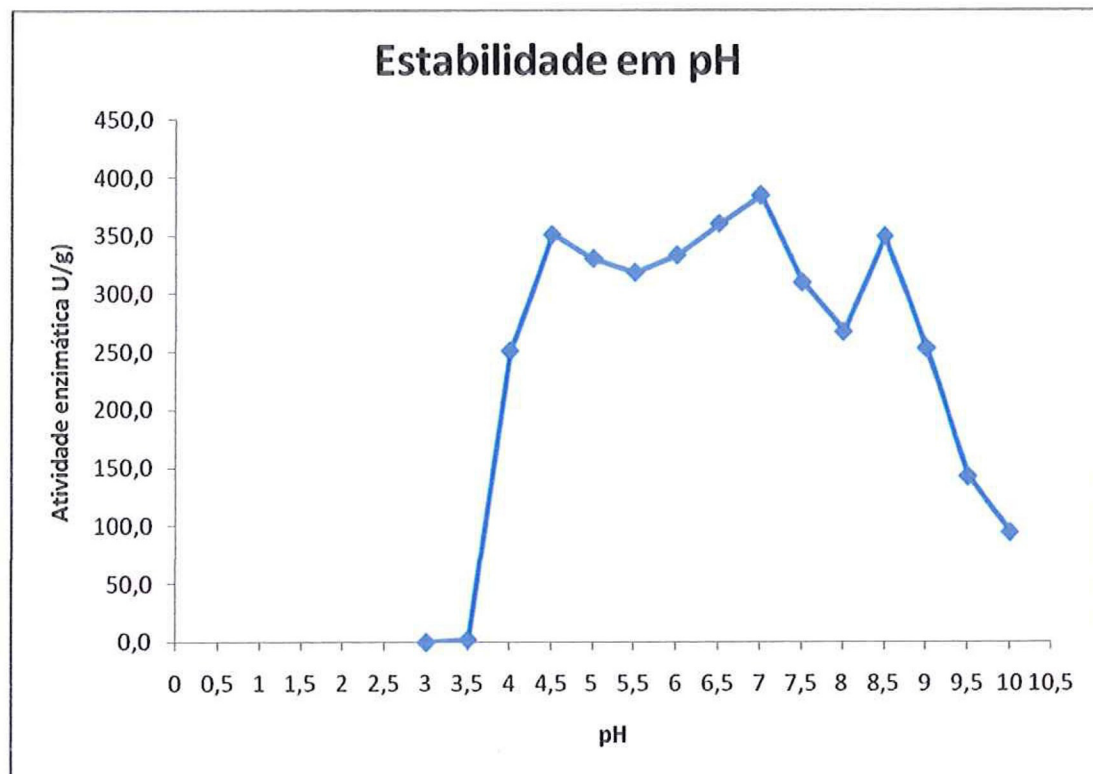


Fig. 2. Efeito da aplicação de diferentes pH na estabilidade enzimática em intervalo de tempo de 2 horas

A enzima mostrou estabilidade em ampla faixa de pH com atividade significativa em 4,5 e pH 8,5 com valores de $350,6 \text{ U.g}^{-1} (\pm 0,01)$ e $349 \text{ U.g}^{-1} (\pm 0,00)$ respectivamente.

Utilizando as condições ótimas de pH 7,0 foi observado no presente estudo que a enzima apresentou um aumento de atividade de 64,14% ($384,2 \text{ U.g}^{-1} \pm 0,01$) em sua atividade. Na literatura utilizada como modelo comparação da atividade proteolítica obtiveram $234,06 \text{ U.g}^{-1}$ de atividade [18]. Demonstrando que com aplicação da condição ótima da enzima há um aumento da atividade. Trabalhar nas condições otimizadas para a enzima, assegura que a integridade do sitio de ação da enzima, através da sua conformação espacial.

Estudo da caracterização proteolítica de *Aspergillus oryzae*, em condições semelhantes a este estudo, mostrou que a enzima apresenta estabilidade em pH próximo a neutralidade. Resultado semelhante foram obtidos por outros autores para o pH 7,0 [24,25].

Os autores de estudos relacionados ainda mencionam que uma das características mais importantes das enzimas, especialmente a enzima industrial, está em ser ativa numa ampla faixa de pH [23].

No estudo da caracterização de protease, com *Aeribacillus pallisus* incubados a 40°C por 2 horas, mostram que a enzima apresentou estabilidade em ampla faixa de pH, que variaram de pH 5,0 a 12,0, com atividade residual acima de 100% nos pH 7,0 e 8,0. Corroborando com o presente trabalho que manteve sua atividade acima de 100% entre pH 7,0 e 8,0 [26].

Na faixa de pH ácido a enzima teve expressiva estabilidade, mesmo sendo considerada neutra devido ao seu ótimo pH de atividade ser 7,0. Tendo maior atividade em pH 4,5 nesta faixa.

Autores ao avaliarem *AMP aminase* de *Aspergillus oryzae* a diferentes pHs para estudo da estabilidade foi obtido estabilidade da enzima nos intervalos de pH entre 4,0 a 6,0 [27]. Sendo observado o mesmo neste trabalho, onde a enzima apresentou estabilidade nessa mesma faixa de pH, com atividade máxima em pH 4,5 dessa faixa. Resultados em condições semelhantes de microrganismos diferentes na mesma faixa de pH foram reportados por outros autores [28,29].

Na zona do pH alcalino observou-se uma queda da atividade nos pH de 7,5 e 8,0, sendo a maior atividade obtida em pH 8,5. Valores superiores de pH a atividade decresce. Em pH 10 a enzima mantém apresentou atividade de 40,25% (94,2 U.g⁻¹ ±0,00) demonstrando parte das enzimas proteolíticas permanecem ativas nesta faixa de pH.

4. Conclusão

A torta de canola apresentou-se como bom indutor na produção de enzima. A enzima foi estável em temperaturas de 30°C a 45°C durante as duas horas e meia de exposição, podendo ser considerada de bom desempenho e podendo ser aplicada em processos industriais com temperatura brandas por período longo. Foi estável nas temperaturas de 50 e 55°C nos primeiros 30 min, podendo também ser aplicada em processos industriais com temperatura médias por um período menor de exposição ao calor.

Quanto ao pH, a enzima mostrou ser estável numa gama de pH como maiores atividades em pH 4,5; 7,0 e 8,5. Com atividade de 49,79%, 64,14% e 49,1%, respectivamente. Portanto sendo uma enzima para aplicação na indústria em condições que utilize pH em torno da neutralidade com as demais biocatalisadores.

REFERÊNCIAS

- [1] GRAND VIEW RESEARCH. Enzymes market by type (Industrial, Specialty), by product (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), by application (Food & Beverages, Detergents, Animal Feed, Textile, Paper & Pulp, Nutraceutical, Personal Care & Cosmetics, Wastewater, Research & Biotechnology, Diagnostics, Biocatalyst) and segment forecasts to 2024. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>> Acesso em 20 de Novembro de 2016.
- [2] VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3ªed. Artmed.São Paulo, 2006.
- [3] BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- [4] YIN, L. J.; CHOU, Y. H.; JIANG, S. T. **Purification and Characterization of Acidic Protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118**.J. of Mar. Scie. And Tech., v. 21, n. 1, p. 105–110, 2013.
- [5] KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. 1ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2008.
- [6] JOO, H. S.; CHANG, C. S. **Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties**. Process Biochemistry, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.
- [7] BOCCHINI, D. A. et al. **Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation**. ProcessBiochemistry, v. 40, n. 12, p. 3653-3659, 2005.
- [8] SILVA, R. R. **Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *AspergillusfumigatusFresenius***. 2011. 58 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2011.

- [9] BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. **Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design.** *Biores.Technol.*, v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.
- [10] LADEIRA, S. A. **Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por *Bacillus* sp. Smia-2 e propriedades da enzima.** 2009. p. 20. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009.
- [11] MONROY, Y. M. **Avaliação de resíduos agroindustriais para a obtenção de protease por cepas fúngicas através da fermentação em estado sólido Campinas, SP:** [s.n.], 2013.
- [12] FREITAS, A. C.; BALEEIRO, F.C. F.; FONSECA, R. F.; BERTUCCI NETO, V.; PINTO, G.A.S.; FARINAS, C. S. **Bioprocess development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production.** *FoodandBioproductsProcessing*, v. 95, p. 173-182, 2015.
- [13] CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** Quarto levantamento, v. 4, n. 3, p. 9-122, 2016.
- [14] CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Canola.** 2012.
- [15] ROCHA, C.P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido.** Dissertação (mestrado)- Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- [16] CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. **A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 170, n.23, p. 501-505, 1947.
- [17] ARAÚJO, F. S. **Estudo das condições de pH e temperatura para máxima atividade de protease de *Aspergillusoryzae* NRRL 1911.** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Maranhão, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2014.
- [18] KUMAR, A.; DUTT, D.; GAUTAM, A. **Production of crude enzyme from *Aspergillusnidulans* AKB-25 using black gram residue as the substrate and its industrial applications.** *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2016.<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.06.004>
- [19] SILVA, O. S.; LAURENTINO, T. N. S.; OLIVEIRA, R. L.; PORTO, T. S. **Caracterização parcial de proteases por *Aspergillustamaritii* URM4634 por**

fermentação em estado sólido. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

[20] SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. **Characterization of biotechnological lyrelevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10.** Brazilian Journal of Microbiology, v.47, p. 143-149, 2016.

[21] UPADGYAYA, J. et. al. **Enzymatic formation of compound-K from ginsenoside Rb1 by enzyme preparation from cultured mycellia of *Armillaria mellea*.** Journal of Ginseng Research, v. 40, p. 105 – 112, 2016.

[22] SALIHI, A; ASOODEH, A; ALIABADIAN, M. **Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 94, p. 827-835, 2017.

[23] MHAMDI, S.; KTARI, N.; HAJII, S.; NASRI, M.; KAMOUN, A. S. **Alkaline proteases from a newly isolated *Micromonos porachaiyap humensis* S103: Characterization and application as a detergent additive and for chitin extraction from shrimp shell waste.** International Journal of Biological Macromolecules, v.94, p. 415-422, 2017.

[24] BAZARAA, W.; ALIAN, A.; EL-SHIMI, N.; MOHAMED, R. **Purification and characterization of extracellular glutaminase from *Aspergillus oryzae* NRRL 32567.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 6, p. 86-91, 2016.

[25] MECHRI, S. et al. **Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 94, p. 221-232, 2017.

[26] LI, S. et al. **Enzymatic production of 50-inosinic acid by AMP deaminase from a newly isolated *Aspergillus oryzae*.** Food Chemistry, v. 216, p. 275-281, 2017.

[27] MIZUNO, T.; SHIONO, Y.; KOKESI, T. **Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichiapastoris*.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v.118, p. 392-395, 2014.

[28] WATANABE, A.; SUZUKI, M.; UJIIE, S.; GOMI, K. **Purification and enzymatic characterization of a novel β -1,6-glucosidase from *Aspergillus oryzae*.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 3, p. 259-264, 2016.