

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/03/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PROTEASES FÚNGICAS: PRODUÇÃO UTILIZANDO FARELO DE SOJA E FARINHAS DE BANANA, CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO EM FARINHA DE GRILO

MELIANE AKEMI KOIKE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração *Bioprocessos*.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Luciana Francisco Fleuri

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Marcela Pavan Bagagli

BOTUCATU - SP
2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PROTEASES FÚNGICAS: PRODUÇÃO UTILIZANDO FARELO DE SOJA E FARINHAS
DE BANANA, CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO EM FARINHA DE
GRILO**

MELIANE AKEMI KOIKE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração *Bioprocessos*.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Luciana Francisco Fleuri

Co-orientadora: Prof^ª Dr^a Marcela Pavan Bagagli

BOTUCATU - SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Koike, Meliane Akemi.

Proteases fúngicas : produção utilizando farelo de soja e farinhas de banana, caracterização enzimática e aplicação em farinha de grilo / Meliane Akemi Koike. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Luciana Francisco Fleuri
Coorientador: Marcela Pavan Bagagli
Capes: 20800002

1. Resíduos orgânicos - Reaproveitamento. 2. Fermentação em estado sólido. 3. Enzimas proteolíticas. 4. Hidrólise. 5. Antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidante; Farinha de grilo; Fermentação em estado sólido; Hidrólise; Proteases fúngicas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Luzia, meu irmão Akio e sua esposa Milena, e aos meus sobrinhos Yuji e Eiji, os quais me proporcionaram muitas alegrias, que me ajudaram em todos os sentidos a ser uma pessoa melhor a cada dia, e a chegar até esta etapa da minha vida.

Ao meu mestre da vida Dr. Daisaku Ikeda por sempre nos incentivar a nunca desistir, ter esperança e seguir sempre em frente, sem arrependimentos.

Ao meu querido companheiro Bressan, que me apoiou, com muito amor, todo esse tempo, sempre confiante e cuidadoso em todos os momentos.

À minha talentosa orientadora Prof^ª Dr^a Luciana Francisco Fleuri, uma pessoa que sempre vou me lembrar, por ser tão guerreira, mesmo nos momentos mais difíceis. Gratidão Lu, com muito carinho, por todo aprendizado e oportunidades!!

À minha co-orientadora Prof^ª Dr^a Marcela Pavan Bagagli, por me proporcionar todo aprendizado e desenvolvimento profissional que tive ao longo de todo esse período. Sou muito grata, de coração, a todo esforço que fez, sempre buscando o melhor. Uma profissional extremamente competente e inteligente que abracei para ser minha mentora.

Aos meus colegas e amigos da pós-graduação da Biotecnologia, e do Laboratório de Bioprocessos, que, mesmo de longe, me “salvaram” de apuros e me fizeram companhia quando estava em Botucatu. Em especial, Mirella, Milene, Dafne, Débora, Clarissa, Andressa, Mariana, Joseana, Ana Livia, Paula, “Gaz”, Martin, Luiz (“Valentim”), Paulo e João.

Nestas viagens para Botucatu, conheci uma pessoa que, logo na primeira vez que a vi, senti algo muito bom. Nossa amizade nasceu, porque era para ser, ela me ajudou muito, ofereceu sua casa, comida, até lençol lavado!! Me levou para o hospital, para fazer compras e foi companhia até no bar! A você Geyssane, meu agradecimento, por ser essa linda amiga e companheira! Amizade eterna! Do “kokoro”!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Campus Botucatu), ao Instituto de Biociências (IBB) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Aos docentes, técnicos e terceiros que compõe esta instituição, meu muito obrigado!

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré, por me dar condições para a realização deste trabalho. Em especial às professoras Gabi e Dani que realizaram e realizam muitos esforços para o crescimento do nosso campus. E não menos importante, à minha ex-chefe Mari e ao meu diretor “Seba” que tornou minha vida mais leve me autorizando para realizar este objetivo. Ao casal Hugo e Adria por compartilhar aprendizado, software e sentimentos. Gratidão também aos companheiros da sala dos técnicos de laboratório: Gustavo, Zé, Danilo e Luis (“Cirilo”) por toda ajuda, atenção dispensada e, principalmente, pela amizade e as risadas.

Aos meus amigos e amigas desta vida que me acolheram nos momentos que mais precisei, Márcia, Leila, Martinha, Midori Sato, Analía e Toledinho.

Gratidão também por conseguir, de forma inédita para mim, defender o Mestrado por vídeo-conferência, em função do isolamento por conta da pandemia do COVID-19. Me sinto vitoriosa por enfrentar mais esta etapa na minha vida.

“Sofra o que tiver que sofrer, desfrute o que existe para ser desfrutado. Considere tanto o sofrimento quanto a alegria como fatos da vida e continue recitando Nam-myoho-renge-kyo, independentemente do que aconteça”
(CEND, v. I, p. 713)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	16
RESUMO GRÁFICO	17
1. Introdução e Justificativa	18
2. Revisão Bibliográfica.....	20
2.1 Proteases: aspectos gerais, caracterização bioquímica e aplicação	20
2.2 Fermentação como bioprocesso para a obtenção de proteases: aspectos gerais, resíduos como substrato e planejamento de misturas.	26
3. Objetivos	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. Materiais e métodos.....	34
4.1 Culturas fúngicas e substratos da FES	34
4.2 Pré-inóculo	35
4.3 Estudo da Composição do Meio de Cultivo.....	35
4.4 Extração das enzimas extracelulares.....	37
4.5 Determinação da atividade enzimática de protease.....	37
4.6 Determinação da concentração de proteínas.....	38
4.7 Cinética de produção da protease.....	38
4.8 Caracterização bioquímica enzimática.....	38
4.8.1 Influência do pH e temperatura na atividade enzimática.....	38
4.8.2 Efeito de íons metálicos e L-cisteína na atividade proteolítica	38
4.9 Hidrólise da farinha de grilo	39
4.9.1 Purificação parcial e concentração do EEB.....	39
4.9.2 Hidrólise da farinha de grilo	39
4.9.3 Fator de hidrólise da farinha de grilo	40

4.9.4 Atividade Antioxidante	41
4.9.5 Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas das frações sólida e sobrenadantes após 3 h de hidrólise.....	42
4.10 Cálculos e Estatísticas	43
5. Resultados e Discussões	44
5.1 Estudo da Composição do Meio de Cultivo para Produção de Proteases	44
5.2 Cinética de produção de protease.....	48
5.3 Caracterização Bioquímica.....	50
5.4 Hidrólise da farinha de grilo, fator de hidrólise e atividade antioxidante.	56
5.4.1 Fator de hidrólise.	56
5.4.2 Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas das frações sólidas e sobrenadantes após 3 h de hidrólise da farinha de grilo.	59
6. Conclusões	62
7. Sugestões para trabalhos futuros e considerações finais.	63
8. Referências Bibliográficas	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AOXC	Extrato de compostos antioxidantes da farinha tratada do controle (sem enzima) após 3h de hidrólise
AOXA	Extrato de compostos antioxidantes da farinha hidrolisada com enzima após 3h de hidrólise
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata Dextrose Ágar
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
E1	Ensaio com farelo de soja
E2	Ensaio com farinha de casca de banana madura
E3	Ensaio com farinha de banana verde
E4	Ensaio com 50 % de farelo de soja e 50 % de farinha de casca de banana madura
E5	Ensaio com 50 % de farelo de soja e 50 % de farinha banana verde
E6	Ensaio com 50 % de farinha de casca de banana madura e 50 % de farinha de banana verde
E7	Ensaio com 1/3 de farelo de soja, 1/3 de farinha de casca de banana madura e 1/3 de farinha de banana verde
EEB	Extrato Enzimático Bruto
FBV	Farinha de Banana Verde
FCBM	Farinha de Casca de Banana Madura
FAO	Food and Agriculture Organization
FES	Fermentação em estado sólido
FL	Fermentação líquida
FS	Farelo de Soja
FTC	Fração sólida da farinha de grilo tratada do controle (sem enzima) após 3h de hidrólise

FHA	Fração sólida da farinha de grilo hidrolisada com enzima após 3h de hidrólise
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
TCA	Ácido tricloroacético
TNBS	Ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico
SA	Amostras do sobrenadante da hidrólise com enzima
SC	Amostras do sobrenadante da hidrólise do controle
SA0	Amostras com enzima do sobrenadante da hidrólise no tempo zero
SA1	Amostras com enzima do sobrenadante após 1h de hidrólise
SA2	Amostras com enzima do sobrenadante após 2h de hidrólise
SA3	Amostras com enzima do sobrenadante após 3h de hidrólise
SC0	Amostras do sobrenadante do controle (sem enzima) da hidrólise no tempo zero
SC1	Amostras do sobrenadante do controle (sem enzima) após 1h de hidrólise
SC2	Amostras do sobrenadante do controle (sem enzima) após 2h de hidrólise
SC3	Amostras do sobrenadante do controle (sem enzima) após 3h de hidrólise

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Processo de Fermentação em Estado Sólido (FES).*

Figura 2. *Fermentação em estado sólido contempla alguns objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU.*

Figura 3. *Representação das curvas de nível da superfície de resposta do delineamento experimental com 7 ensaios (E1 a E7) utilizando 3 substratos, FS (farelo de soja), FCBM (farinha de casca de banana madura) e FBV (farinha de banana verde).*

Figura 4. *Procedimento de hidrólise da farinha de grilo por proteases fúngicas, frações obtidas e análises bioquímica realizadas.*

Figuras 5a e 5b. *Atividade de protease dos 7 ensaios (E1 a E7) do planejamento de misturas para os dois fungos filamentosos, Trichoderma koningii (INCQS 40331) e Aspergillus oryzae (ATCC 1003 / INCQS 40068).*

Figura 6. *Curva de contorno da atividade de protease do A. oryzae (ATCC 1003 / INCQS 40068) presente no extrato enzimático bruto da fermentação em estado sólido de meio de cultivo composto por diferentes proporções de farelo de soja (FS), farinha banana verde (FBV) e farinha de casca de banana madura (FCBM).*

Figura 7. *Cinética de produção de protease por Trichoderma koningii (INCQS 40331) sob fermentação em estado sólido utilizando como substrato farinha de casca de banana madura e farelo de soja.*

Figura 8. *Cinética de produção de protease por Aspergillus oryzae (ATCC 1003 / INCQS 40068) sob fermentação em estado sólido utilizando como substrato farinha de casca de banana madura e farelo de soja.*

Figura 9. *Estudo da influência do pH na atividade de proteases obtidas de T. koningii (INCQS 40331) e A. oryzae (ATCC 1003 / INCQS 40068) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato farelo de soja e farinha de casca de banana madura.*

Figura 10. *Estudo da influência da temperatura na atividade de proteases obtidas de T. koningii (INCQS 40331) e A. oryzae (ATCC 1003 / INCQS 40068) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato farelo de soja e farinha de casca de banana madura.*

Figura 11. *Estudo da influência de sais e L-cisteína na protease obtida de T. koningii (INCQS 40331) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato farelo de soja e farinha de casca de banana madura.*

Figura 12. *Estudo da influência de sais e L-cisteína na protease obtida de A. oryzae (ATCC 1003 / INCQS 40068) por fermentação em estado sólido utilizando como substrato o farelo de soja e farinha de casca de banana madura.*

Figura 13. Atividade antioxidante dos sobrenadantes (expressos em μM de Trolox Equivalente) ao longo de 3 h de hidrólise da farinha de grilo pela protease de *T. koningii* (INCQS 40331) e *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).

Figura 14. Atividade antioxidante (expressos em μM de Trolox Equivalente) das farinhas de grilo (C) e das hidrolisadas com proteases (AOXA) de *T. koningii* (INCQS 40331) e de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).

Figuras 15a e 15b. Perfil eletroforético das amostras sólidas: farinha de grilo (C), farinha tratada sem enzima (FTC) e das farinhas hidrolisadas (FHA) com proteases de *T. koningii* (INCQS 40331) e de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) e sobrenadantes da 3 h de hidrólise: controle sem enzima (SC) e hidrolisados (SA) dos dois micro-organismos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Hidrolisados proteicos de diferentes fontes de proteínas utilizando proteases comerciais e microbianas.

Tabela 2. Matriz do delineamento experimental dos substratos para os dois fungos estudados.

Tabela 3. Coeficientes de regressão obtidos a partir do modelo quadrático ajustado do delineamento de misturas para atividade proteolítica de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático ajustado do delineamento de misturas para atividade proteolítica de *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068).

Tabela 5. Fator de hidrólise referente à ação de proteases de *T. koningii* (INCQS 40331) e *A. oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068) sobre a farinha de grilo – análise dos sobrenadantes. Médias com as mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey com $p < 0,05$.

RESUMO

Resíduos e subprodutos agroindustriais são extensivamente estudados a fim de se reaproveitar seu potencial biológico e agregar valor. A fermentação em estado sólido (FES) é uma das formas de utilizar estes resíduos e subprodutos para obtenção de enzimas, como as proteases. Este trabalho objetivou estudar a produção de proteases fúngicas por FES utilizando farelo de soja e farinhas de banana, caracterizar bioquimicamente as proteases mais promissoras e, por fim, aplicar na hidrólise da farinha de grilo (*Gryllus assimilis*), avaliando os produtos de hidrólise. O estudo da composição do meio de cultivo foi conduzido através de um delineamento experimental, o planejamento de misturas, para definir a proporção ótima de parte sólida dos substratos de fermentação. Posteriormente, realizou-se a cinética de produção de protease por FES, a caracterização bioquímica das proteases mais promissoras quanto ao pH e temperatura ótimos de atuação, bem como a influência de íons metálicos e L-cisteína em diferentes concentrações. Por meio de relargagem (*salting-out*), fez-se a purificação parcial das enzimas, seguida de diálise e liofilização, para então serem aplicadas na hidrólise da farinha de grilo. O fator de hidrólise, a atividade antioxidante e o perfil eletroforético dos produtos de hidrólise foram avaliados. O planejamento de misturas resultou em duas proporções com altas atividades proteolíticas, 50 % de farelo de soja (FS) e 50 % de farinha de casca de banana madura (FCBM) e um terço de cada componente estudado (farelo de soja, farinha de casca de banana madura e farinha de banana verde) para os dois micro-organismos estudados: *Trichoderma koningii* (INCQS 40331) e *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068). Foi possível obter um modelo quadrático apenas para o *A. oryzae*, com $p < 0,15$. A cinética de produção enzimática em 168 h revelou que em 48 h a atividade proteolítica atingiu o seu máximo, na mistura de substratos contendo 50 % de FS e 50 % de FCBM. Por meio da caracterização bioquímica foram definidos temperatura ótima das proteases de 40°C produzidas por ambos micro-organismos e pH ótimo de 6,0 para protease de *T. koningii* e pH 7,0 para protease de *A. oryzae*. Os íons metálicos e L-cisteína não resultaram em efeito positivo na atividade proteolítica. A análise dos sobrenadantes dos hidrolisados obtidos por ação das proteases de ambos fungos revelaram potencial antioxidante, com destaque para os hidrolisados da protease de *A. oryzae*, correspondente a 101,09 μM de TE. A eletroforese em gel dos hidrolisados indicou proteínas menores

que 14,4 kDa, corroborando a ação hidrolítica das proteases do *A. oryzae* na farinha de grilo.

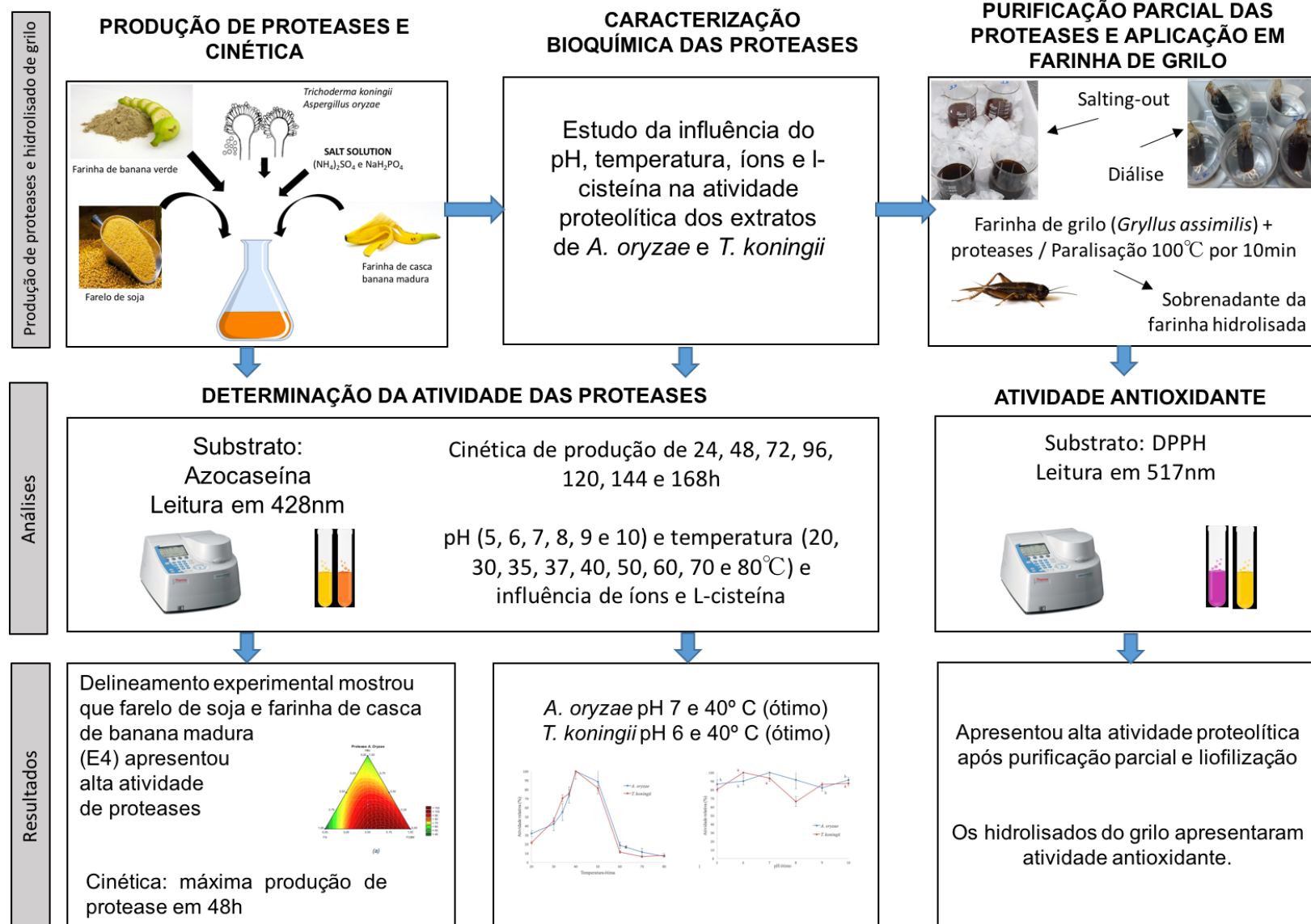
Palavras-chaves: banana, soja, proteases fúngicas, hidrólise, farinha de grilo, antioxidante

ABSTRACT

Agro-industrial waste and by-products are extensively studied aiming to add value and explore their full biological potential. Solid state fermentation (SSF) is a technique that use agro-industrial waste and by-products and may be used to obtain enzymes, such as proteases. This study aimed to produce fungal proteases by SSF using soybean bran and banana flours as substrate, characterize biochemically and apply most promising proteases to hydrolysis of cricket flour (*Gryllus assimilis*), and evaluate the hydrolysis products. The composition of the culture medium was evaluated through an experimental design to define the optimal proportion of solid part of the fermentation substrates. Subsequently, the protease production kinetics were performed by SSF, the most promising proteases were characterized biochemically according to the optimal pH and temperature, as well as according to the influence of metal ions and L-cysteine in different concentrations. Proteases were partially purified by salting-out, followed by dialysis and lyophilization and applied in hydrolysis of the cricket flour. The hydrolysis factor, the antioxidant activity and the electrophoretic profile of the hydrolysis products were evaluated. The mixture design resulted in two combinations with high proteolytic activities, 50% soybean bran (SB) and 50% ripe banana peel flour (RBPF) and one third of each component (soybean bran, ripe banana peel flour and green banana flour) for the microorganisms *Trichoderma koningii* (INCQS 40331) and *Aspergillus oryzae* (ATCC 1003 / INCQS 40068). It was possible to obtain a quadratic model only for *A. oryzae* ($p < 0.15$). The kinetics of proteases showed that after 48 h the proteolytic activity reached its maximum in the mixture of substrates containing 50% of SB and 50% of RBPF. Biochemical characterization showed that the optimum temperature was 40°C for both fungi proteases, as well as pH 6.0 optimum for *T. koningii* protease and pH 7.0 optimum for *A. oryzae* protease. Metal ions and L-cysteine did not result in a positive effect on proteolytic activity. The analysis of hydrolysate supernatants obtained by both fungi proteases showed antioxidant potential, with emphasis on the hydrolysates of *A. oryzae* protease, corresponding to 101.09 μM of TE. Gel electrophoresis of hydrolysates indicated proteins smaller than 14.4 kDa, corroborating the hydrolytic action of *A. oryzae* proteases in cricket flour.

Key words: banana, soy, fungal proteases, hydrolysis, cricket flour, antioxidant

RESUMO GRÁFICO



1. Introdução e Justificativa

Proteases constituem uma classe de enzima comercialmente importante, está presente em diversas indústrias como de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, couro e detergentes (SINGH *et al.*, 2016). Também são utilizadas em biotecnologia para obtenção de peptídeos antioxidantes, através da hidrólise enzimática de diferentes proteínas (ZANUTTO-ELGUI *et al.*, 2019). São produzidas principalmente por micro-organismos, embora possam também ser encontradas em plantas e animais. Respondem por mais de 60 % do mercado global de enzimas e a produção pelos micro-organismos é mais atrativa em função da especificidade do substrato e possibilidade de manipulação genética (CASTRO; SATO, 2013; KALAIYARASI *et al.*, 2017). O estudo das características bioquímicas das enzimas é importante pois definem alguns parâmetros tais como, pH e temperatura ótimos de atuação enzimática, possibilitando, conseqüentemente, melhor escolha na sua aplicação.

O processo pelo qual as proteases são produzidas pelos micro-organismos é a fermentação. Em especial, a fermentação em estado sólido (FES) tem sido estudada amplamente para esse fim, pois seu processo apresenta características interessantes, tais como: obtenção de produtos em alta concentração e estabilidade, menor repressão catabólica, baixo volume de geração de efluentes e pode ser conduzida de forma bem simples e com baixo custo. Apesar disso, ainda são necessários estudos de produção que incluem, dentre vários fatores, a maximização da produção de metabólitos (LIMA *et al.*, 2001; HÖLKER; LENZ, 2005; SINGHANIA *et al.*, 2009; SOCCOL *et al.*, 2017; CASTRO, A. *et al.*, 2018).

Os substratos utilizados como meio de cultivo para FES podem ser bem variados, sendo os resíduos agroindustriais mais interessantes economicamente, pois são constituídos de diversos componentes orgânicos e inorgânicos que ainda podem ser aproveitados (GUO; CHANG; LEE, 2018). A soja e a banana são duas culturas do agronegócio brasileiro com bastante destaque tanto pela quantidade que são produzidos quanto em relação aos resíduos e/ou subprodutos gerados por meio dessas culturas (FAOSTAT, 2017), os quais podem ser utilizados como substrato de fermentação.

Os fungos filamentosos apresentam facilidade para se desenvolver em FES e habilidade para produzir diversas enzimas extracelulares, as quais podem ser facilmente recuperadas do meio fermentado e aplicadas em diversos ramos (FLEURI *et al.*, 2013). O *Aspergillus oryzae*, por exemplo, é um fungo reconhecido como GRAS (*Generally recognized as safe*) pela *US Food and Drug Administration* (FDA) e bastante estudado, principalmente por sua longa história de utilização na indústria de alimentos por sua alta atividade proteolítica e amilolítica (CASTRO; SATO, 2013). Já o *Trichoderma koningii*, também reconhecido como GRAS, é um fungo conhecido por produzir celulasas, entretanto, segundo Manonmani, Joseph (1993) ele também apresentou habilidade de produção de protease alcalina, inclusive, não há tantas pesquisas na literatura em relação à natureza das proteases deste fungo.

O aumento da produção enzimática pelos fungos, pode se dar por meio de delineamento experimental, a qual é uma ferramenta estatística com grande aplicação no estudo de efeitos sinérgicos ou antagônicos entre os componentes de um meio de cultura. O delineamento de misturas, mais especificamente, avalia as proporções entre os substratos que irão compor o meio de cultivo, bem como a interação entre os mesmos e os efeitos sobre a variável resposta, podendo ser utilizado para aperfeiçoar processos (CASTRO, 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases fúngicas obtidas a partir da FES utilizando farelo de soja e farinhas de banana, estudo da composição do meio de cultivo na produção dessas enzimas por planejamento experimental, caracterização enzimática e aplicação na hidrólise da farinha de grilo, a fim de se obter produtos com atividade antioxidante.

6. Conclusões

O estudo da composição do meio de cultivo realizado com *T. koningii* e *A. oryzae* revelou duas misturas que forneceram maiores valores de atividades proteolíticas. Um meio composto pela parte sólida de 50 % de farelo de soja e 50 % de farinha de casca de banana madura e outro composto por 1/3 de cada um dos componentes estudados (farelo de soja, farinha de casca de banana madura e farinha de banana verde). Entretanto, somente com o *A. oryzae* foi possível obter um modelo quadrático que relaciona a atividade enzimática e os componentes do meio com $p < 0,15$. Nesse sentido, o desejo de seguir o estudo com formulações próximas para os dois micro-organismos, os melhores resultados para o *T. koningii* ocorrerem próximo ao ensaio 4, e a não obtenção de um modelo estatisticamente válido para este último fungo, optou-se em escolher o ensaio 4 para continuidade dos estudos.

A cinética de produção enzimática para ambos os fungos revelou que em 48 h a atividade enzimática atingiu o máximo, sendo que as proteases do *T. koningii* decaíram aproximadamente 87 % em relação à atividade em 48 h, ao contrário do *A. oryzae*, cujo valor ficou estável até 144 h de fermentação.

A caracterização bioquímica das proteases mostrou que cada micro-organismo produziu um extrato enzimático bruto com atividade proteolítica diferentes, mesmo este sendo obtido nas mesmas condições de fermentação. O pH ótimo de atividade para o *T. koningii* foi de 6,0 e 10,0 e para *A. oryzae* 7,0, ambos com temperatura ótima de 40°C. Íons metálicos e L-cisteína influenciaram negativamente a atividade proteolítica, nas concentrações testadas.

A hidrólise da farinha de grilo pelas proteases fúngicas obtidas da fermentação em estado sólido utilizando farinha de casca de banana madura e farelo de soja resultou em possível hidrólise das proteínas da farinha de grilo, mas não o suficiente para serem evidenciadas nos experimentos realizados. A farinha de grilo em sua forma natural apresentou atividade antioxidante. O acesso do extrato enzimático bruto às proteínas da farinha de grilo pode ter sido dificultado pela presença de alto teor de lipídeos e quitina presente nesta, além do fato de que as partículas da farinha serem relativamente grandes e não serem solúveis em água.

7. Sugestões para trabalhos futuros e considerações finais.

Este trabalho pode fornecer informações importantes para novas pesquisas, a saber:

As proteases obtidas por fermentação em estado sólido, no presente estudo, podem ser aplicadas em hidrólise de outros substratos.

Baseado nos resultados da cinética de produção sugere-se realizar o planejamento de misturas em 48 h de fermentação.

A purificação das enzimas pode facilitar a caracterização dos tipos de proteases produzidas, embora a utilização no extrato bruto seja economicamente melhor.

Mutagênese e modificação genética podem ser aplicadas para maximizar a produção das proteases do *T. koningii*.

Parâmetros de processo de hidrólise de proteínas também podem ser melhorados, inclusive testando novas enzimas ou até mesmo um coquetel enzimático, considerando que a farinha se encontra em seu estado bruto.

Com a finalidade de se garantir maior segurança e qualidade a respeito da entomofagia, outras bioatividades dos hidrolisados podem ser avaliadas, tais como: citotoxicidade, potencial antimicrobiano, estudos *in vitro*, entre outros.

8. Referências Bibliográficas

- ABDULLAH, R.; NAEEM, N.; AFTAB, M.; KALEEM, A.; IQTEDAR, M.; IFTIKHAR, T.; NAZ, S. Enhanced Production of Alpha Amylase by Exploiting Novel Bacterial Co-Culture Technique Employing Solid State Fermentation. **Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science**, v.42, n.2, p. 305-312, 2018.
- AGUILAR, J. G. dos S.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.
- BARROS NETO, B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 4ed. Porto Alegre: Editora Bookman®, 2010, 414 p.
- BELMESSIKH, A., BOUKHALFA, H., MECHAKRA-MAZA, A., GHERIBI-AOULMI Z., AMRANE, A. Statistical Optimization of Culture Medium for Neutral Protease Production by *Aspergillus Oryzae*. Comparative Study between Solid and Submerged Fermentations on Tomato Pomace. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.44, p. 377-385, 2013. DOI: 10.1016/j.jtice.2012.12.011
- BEZERRA, C. V.; AMANTE, E. R.; OLIVEIRA, D. C. de; RODRIGUES, A. M. C.; SILVA, L. H. M. da Green banana (*Musa cavendishii*) flour obtained in spouted bed – Effect of drying on physico-chemical, functional and morphological characteristics of the starch **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 241-249, 2013.
- BAH, C.S.F.; BEKHIT, A.E.A.; CARNE, A.; MCCONNELL, M.A. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**., v.176, p. 54-63, 2015.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state fermentation systems- an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1–30, 2008.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**., v. 72, p. 248-254, 1976.

- CASTRO, R.J.S. **Produção, caracterização bioquímica de proteases de *Aspergillus oryzae* e aplicação na hidrólise de proteínas para obtenção de hidrolisados proteicos com atividade antioxidante.** 2012. 199f. Dissertação (Mestrado na área de Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- CASTRO, R.J.S., SATO, H.H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amilase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v.49, p. 813-821, 2013.
- CASTRO, R.J.S., NISHIDE, T.G., SATO, H.H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, n.4, p. 236-245, 2014. DOI: 10.1016/j.bcab.2014.06.001i.
- CASTRO, R.J.S.; OHARA, A.; NISHIDE, T.G.; BAGAGLI, M.P.; DIAS, F.F.G.; SATO, H.H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, n.2, p. 678-684, 2015.
- CASTRO, R.J.S. **Aplicação da ferramenta de planejamento de experimental de misturas como estratégia para produção de proteases por *Aspergillus niger* e obtenção de hidrolisados proteicos com múltiplas propriedades funcionais e biológicas.** 2015. 297 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- CASTRO, R.J.S.; OHARA, A.; AGUILAR, J.G. dos S.; DOMINGUES, M.A.F. Nutritional, functional and biological properties of insects proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v.76, p. 82-89, 2018. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.006>, acessado em Fevereiro de 2020
- CASTRO, A. M.; SANTOS, A. F.; KACHRIMANIDOU, V.; KOUTINAS, A. A.; FREIRE, D. M. G. Solid-state fermentation for the production of proteases and amylases and their application in nutrient medium production. In: PANDEY, A.;

- LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R. **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Amsterdã: Elsevier, 2018. Cap. 10., p. 185-210.
- 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.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**., v.11, p. 254-262, 2000.
- CORRÊA, A.P.F.; DAROIT, D.J.; COELHO, J.; MEIRA, S.M.M.; LOPES, F.C.; SEGALIN, J.; RISSO, P.H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**., v.91, n.2, p. 2247-2254, 2011.
- DAI, C.; MA, H.; LUO, L.; YIN, X. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate. **European Food Research and Technology**., v.236, n.4, p. 681-689, 2013.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soja em números (safr 2018/2019). Disponível em <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>, acessado em Novembro de 2019.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Global food loss and food waste. 2011 Disponível em <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/293047/>, acessado em Fevereiro de 2020.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Global food loss and food waste. 2015 Disponível em <http://www.fao.org/edible-insects/en/>, acessado em Setembro de 2019.
- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization (2017) Disponível em: www.fao.org, acessado em Dezembro de 2018.
- FIGUEIRA, J. de A.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H.; FERNANDES, P. Screening of Supports for the Immobilization of β -Glucosidase. **Enzyme Research**, v. 2011, 8 pages, 2011. DOI: 10.4061/2011/642460.
- FLEURI, L. F.; KAWAGUTI, H. Y.; PEDROSA, V. A.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P.; NOVELLI, P. K.; OKINO-DELGADO, C. H. Exploration of microorganisms producing bioactive molecules of industrial interest by solid state fermentation.

- In: Giuseppina Pace Pereira Lima; Fábio Vianello. (Org.). **Food Quality, Safety and Technology**. 1ed. Springer-Verlag Wien, 2013, p. 147-161.
- FLEURI, L. F. **Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas**. 2016. 128 f. Tese (Livre Docência em Bioquímica Geral) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2016.
- FLORENCIO, I. M.; PRATA, A. da S.; CAVALCANTI, M. T.; FLORENTINO, E. R.; PIRES, V. C. F.; ABÍLIO, G. M. F. Caracterização da casca da banana (*Musa sapientum*) madura e de sua respectiva farinha. In: Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 6, 2011, Salvador. **Trabalhos** Salvador, 2011.
- FORSTER-CARNEIRO, T.; BERNI, M. D.; DORILEO, I. L.; ROSTAGNO, M. A. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 77, p. 78–88, 2013.
- GAIDA, A. V., RUDENSKAIA, G. N., STEPANOV, V. M.: Isolation and comparative properties of serine proteinases of the microscopic fungi *Trichoderma lignorum* and *Trichoderma koningii*. **Biokhimiia**, v.46, p. 2064–2073, 1981.
- GUO, H.; CHANG, Y.; LEE, D. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. **Bioresource Technology**, v. 252, p.198-215, 2018.
- HALL, F.G.; JONES, O.G.; O'HAIRE, M.E.; LICEAGA, A.M. Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllodes sigillatus*) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.224, n.1, p. 414-422, 2017.
- HARTLEY, B.S Proteolytic enzymes. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 29, p. 45-72, 1960.
- HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.
- HOU, Y.; WU, Z.; DAI, Z.; WANG, G.; WU, G. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. **Journal of Animal Science and Biotechnology**., v.8, 2017. Disponível em <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-017-0153-9>. Acessado em Setembro 2019.
- JAYANEGARA, A.; YANTINA, N.; NOVANDRI, B. and Laconi E.B., 2017. Evaluation of some insects as potential feed ingredients for ruminants: Chemical

- composition, *in vitro* rumen fermentation and methane emissions. **Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture**, v.42, n.4, p. 247-254, 2017.
- JÓZEFAK, D.; JÓZEFAK, A.; KIERONCZYK, B.; RAWSKI, M.; SWIATKIEWICZ, S.; DLUGOSZ, J.; ENGBERG, R.M. Insects – A Natural Nutrient Source for Poultry – A Review. **Annals of Animal Science**, v.16, n.2, p. 297-313, 2016.
- JUNQUEIRA, C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**, 9ed. Editora Guanabara Koogan, 2012, 338 p.
- KALAIYARASI, M.; VIJAYARAGHAVAN, P.; RAJ, S.R.F.; VICENT, S.G.P. Statistical Approach for the Production of Protease and Cellulase from *Bacillus cereus* KA3. **Bioprocess Engineering**, v.1, n.4, p. 93-103, 2017. doi: 10.11648/j.be.20170104.11
- KREDICS, L.; ANTAL, Z.; SZEKERES, A.; HATVANI, L.; MANCZINGER, L.; VÁGVÖLVGYI, C. S.; NAGY, E. Extracellular proteases of *Trichoderma* species. **Acta Microbiologia et Immunologica Hungarica**, v.52, n.2, p. 169-185, 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIAO H.J.; HUNG, C.C. Chemical composition and *in vitro* starch digestibility of green banana (cv. Giant Cavendish) flour and its derived autoclaved/debranched powder. **LWT – Food Science and Technology**, v. 64, n.2, p. 639-644, 2015.
- LIMA, C.A.; CAMPOS, J.F.; FILHO, J.L.L.; CONVERTI, A.; CUNHA, M.G.C., PORTO, A.L.F. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n.7, p. 4459-4466, 2015.
- LIMA, F.A. de **Estudo da biotransformação da farinha de centeio por tratamento enzimático e avaliação da bioacessibilidade de ácidos fenólicos pelo modelo de digestão *in vitro* e de absorção por células intestinais Caco-2**. 2015. 210 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. 1ed. São Paulo: Blocher, 2001, v. 3, 616 p.

- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N. J.; FAIR, A. L.; & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagentes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MA, C.; NI, X.; CHI, Z.; MA, L.; GAO, L. Purification and Characterization of an Alkaline Protease from Marine Yeast *Aureobasidium pullulans* for Bioactive Peptide Production from Different Sources. **Marine Biotechnology**, v.9, p. 343-351, 2007. DOI: 10.1007/s10126-006-6105-6
- MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, v. 432, p.1157-1161, 2005.
- MACIEL, G.M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006. 146 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curitiba, 2006.
- MAHAJAN A.; DUA S. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var toria) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 349-355, 1998.
- MANISHA, YADAV, S. K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.245, p.1727-1739, 2017.
- MANONMANI, H.K.; JOSEPH, R. Purification and properties of an extracellular proteinase of *Trichoderma koningii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p. 624-628, 1993.
- MAZOTTO, A.M.; COURI, S.; DAMASO, M.C.T.; VERMELHO, A.B. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 189-195, 2013.
- MEBRATIE, M. A.; WOLDETSADIK, K.; AYALEW, A.; HAJI, J. Influence of Packaged Transportation on Shelf Life and Quality of Banana (*Musa spp*) Fruits **Journal of Postharvest Technology**, v.4, n. 1, p. 6-15, 2016.
- MENDES, W. S.; SILVA I. J.; FONTES, D. O.; RODRIGUEZ, N. M.; MARINHO, P. C.; SILVA, F. O.; AROUCA C. L. C.; SILVA F. C. O. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos

- para suínos em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 207-213, 2004.
- MIENDA, B. S.; IDI, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications. An overview. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 21–26, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1250 p.
- NOVELLI, P. K. **Produção de Fitases e Proteases fúngicas, aplicação em rações e valores digestíveis pela Tilápia-do-Nilo**. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015.
- NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016.
- NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; ARAUJO, E. P.; BOTELHO, R. M.; FLEURI, L. F. ACEITO PARA PUBLICAÇÃO. Enzymes produced by agro-industrial co-products enhance digestible values for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A significant animal feeding alternative. **Aquaculture**, v. 481, n. 1, p. 1-7, 2017. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.08.010.
- OHARA A.; SANTOS J. G.; ANGELOTTI, J. A. F.; BARBOSA, P. P. M.; DIAS, F. F. G.; BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H.; CASTRO, R. J. S. A multicomponent system based on a blend of agroindustrial wastes for the simultaneous production of industrially applicable enzymes by solid-state fermentation. **Food Science and Technology**, v. 38, suppl. 1, 2018. DOI: 10.1590/1678-457x.17017.
- OIBIOKPA, F.I.; AKANYA, H.O.; JIGAM, A.A.; SAIDU, A. N. Nutrient and Antinutrient Compositions of Some Edible Insect Species in Northern Nigeria. **Fountain Journal of Natural and Applied Sciences**, v.6, p 9-24, 2017.
- OIBIOKPA, F.I.; AKANYA, H.O.; JIGAM, A.A.; SAIDU, A. N.; EGWIM, E.C. Protein Quality of Four Indigenous Edible Insect Species in Nigeria. **Food Science and Human Wellness**, v.7, n.2, p 175-183, 2018.
- OKINO-DELGADO, C.H.; PRADO, D.Z.; FLEURI, L.F. Brazilian fruit processing, wastes as a source of lipase and other biotechnological products: a review.

- Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2927-2943, 2018.
- ONU – Organização das Nações Unidas. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em : < <https://nacoesunidas.org/pos2015/>>. Acesso em: 24 nov 2019.
- ORTIZ, G. E.; NOSEDA, D. G.; MORA, M. C. P.; RECUPERO, M. N.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E. A Comparative Study of New *Aspergillus* Strains for Proteolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation. **Enzyme Research**, v. 2016, 16 p., 2016. Doi: 10.1155/2016/3016149
- PADAM, B.S., TIN, H.S., CHYE, F.T. Banana by-products: na under-utilized renewablhe food biomass with great potential. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n.12, p. 3527-3545, 2014.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PAPPU, A., PATIL, V., JAIN, S., MAHINDRAKAR, A., HAQUE, R., THAKUR, V. K. Advances in industrial prospective of cellulosic macromolecules enriched banana biofibre resources: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 79, 449–458, 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.013
- PEDERSEN, M. B.; DALSGAARD, S.; ARENT, S.; LORENTSEN, R.; KNUDSEN, K. E. B.; YU, S.; LÆRKE, H. N. Xylanase and protease increase solubilization of non-starch polysaccharides and nutrient release of corn and wheat distillers dried grains with solubles. **Biochemical Engineering Journal**, v.98, p. 99-106, 2015.
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Embrapa - comunicado técnico online 102**, 2005.
- PRINCE, L. Investigation on production, purification and characterization of protease and Xylanase from *Trichoderma koningii*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v.10, n. 3, p. 2315, 2016. Disponível em https://link.gale.com/apps/doc/A481650364/AONE?u=unesp_br&sid=AONE&xid=124ca1c9. Acesso em Setembro de 2019.

- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RAO, P. V., BARAL, S. S. Experimental design of mixture for the anaerobic co-digestion of sewage sludge. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, p. 977-986, 2011.
- REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; CASTILLO-MUÑOZ, N.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flour of banana (*Musa AAA*) peel as a source of antioxidante phenolic compounds. **Food Research International**, v. 55, p. 397-403, 2014.
- RUMPOLD, B.A.; SCHLÜTER, O.K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, p. 802-823, 2013.
- RYDER, K.; BEKHIT, A.E.D.; MCCONNELL, M.; CARNE, A. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using comercial microbial proteases. **Food Chemistry**, v. 208, p. 42-50, 2016.
- REDDY, G.B., BABU, P.R., KOMARAIHAH, P., ROY, K.R.R.M., KOTHARI, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v.38, p.1457-1462, 2003.
- 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, part B, p. 827-835, 2017.
- SATHISH, T.; LAKSHMI, G. S.; RAO, Ch. S.; BRAHMAIAH, P.; PRAKASHAM, R. S. Mixture design as first step for improved glutaminase production in solid-state fermentation by isolated *Bacillus* sp. RSP-GLU. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 256-262, 2008.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. 1ed. São Paulo: Blocher, 2001, v. 2, 554 p.
- SEGURA-CAMPOS, M.R.; SALAZAR-VEJA, I.M.; CHEL-GUERRERO, L.A.; BETANCUR-ANCONA, D.A. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.)

- protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. **LWT- Food Science and Technology**, v.50, n.2, p. 723-731, 2013.
- SINGH, R.; MITTAL, A.; KUMAR, A.; MEHTA, P.K. Microbial Proteases in Commercial Applications. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v.4, n.4, p. 365-374, Set-Nov, 2016.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.
- SOCCOL, C.R.; COSTA, E.S.F.; LETTI, L.Z.J; KARP, S.G. WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research & Innovation**, v.1, n.1, p. 52-71, 2017.
- STANBURY, P. F. WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 2 ed. Butterworth Heinemann, Elsevier Science, 1995, 367 p.
- SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology** v. 44, n. 2, p. 211-220, 2006.
- TRIVENI, R.; SHAMALA, T.R. Clarification of xanthan gum with extracellular enzymes secreted by *Trichoderma koningii*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 49-53, 1999.
- UNIÃO EUROPÉIA. Diretriz 2008/98/CE de 19 de Novembro de 2008. Relativa aos resíduos. Disponível em: < <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32008L0098>>. Acesso em Maio de 2020.
- VAN HUIS, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. **Annual Review of Entomology**, v.58, p.563-583, 2013.
- VU, H.T.; SCARLETT, C.J.; VUONG, Q.V. Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. **Journal of Functional Foods**, v.40, p-238-248, 2018.
- YANG, Y.; YANG J.; LIU, J; WANG, R.; LIU, L.; WANG, F.; YUAN, H. The composition of accessory enzymes of *Penicillium chrysogenum* P33 revealed by secretome and synergistic effects with commercial cellulase on lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 257, p. 54-61, 2018

- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, n.6, Nov-Dez, 1998.
- ZANUTTO-ELGUI, M.R. **Produção de proteases fúngicas e aplicação para obtenção de peptídeos bioativos**. 2019. 165 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia – Área de concentração Bioprocessos) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.
- ZANUTTO-ELGUI, M. R.; VIEIRA, J.C.S.; PRADO, D.Z.; BUZALAF, M.A.R.; PADILHA, P. de M.; OLIVEIRA, D.E.; FLEURI, L.F. Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. **Food Chemistry**, v.278, n. 25, p. 823-831, 2019.