



Produção de Protease por *Aspergillus niger* (SIS 18) em Meios Contendo Resíduos Agroindustriais Utilizando Planejamento Fatorial

Protease production by *Aspergillus niger* (SIS 18) in medium containing agroindustrial residues using the factorial designer

Felipe André Pereira da Cunha Amaral¹

Tainã Crisia de Souza Fonseca²

Paloma Santa Cruz de Sales³

Carlos Alberto Alves da Silva⁴

Resumo: A utilização de enzimas microbianas movimenta o mercado mundial industrial e ambiental, pelo interesse nos processos que envolvem baixo custo energético e pela eficácia das enzimas. As proteases constituem um grande grupo de enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de proteínas e possuem diversas aplicações industriais. O gênero *Aspergillus* se apresenta como um excelente produtor de biomoléculas em processos fermentativos. A utilização de resíduos provenientes das indústrias de alimentos surge como uma excelente alternativa para formulação de novos meios produtivos em processos de fermentação, por apresentarem elevados índices de nutrientes em sua composição. Foram realizados ensaios de produção de protease através de planejamento fatorial 2² utilizando soro de leite e resíduo de sorvete. Os ensaios ocorreram durante 144 horas, 37C°, 150 rpm. Os resultados obtidos indicaram que ambos os meios contendo os resíduos da indústria de alimentos obtiveram atividade proteolítica de 0,118U/mL para o soro de leite e de 0,093U/mL para o resíduo de sorvete, respectivamente. A utilização de resíduos na formulação de meios alternativos tem surgido como uma opção viável na produção de moléculas bioativas, pois reduzem os custos de produção enzimática.

Palavras-chave: formulação meios; protease fúngica; produção enzimática.

¹ UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

² UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

³ UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

⁴ UNICAP – Universidade Católica de Pernambuco

Abstract: The use of microbial enzymes has moved the world industrial and / or environmental market, due to the interest in the processes that involve low energy costs and the efficiency of the enzymes. Proteases are a large group of hydrolytic enzymes that catalyze the hydrolysis of proteins and have many industrial applications. The *Aspergillus* genus presents itself as an excellent producer of biomolecules in fermentative process. The use of residues from the food industry has emerged as an excellent alternative for the formulation of media of production in fermentative processes, because they present high nutrient contents in their composition. Protease production tests were performed through factorial design 2^2 using milk serum and ice cream residues. Assays occurred for 144 hours, 37 °C and 150 rpm. The results indicated that both media containing the food industry residues obtained proteolytic activity of 0.118U / mL for milk serum and 0.093U / mL for the ice cream residue, respectively. The use of residues in the formulation of alternative media has emerged as a viable option in the production of bioactive molecules because they reduce the costs of enzymatic production.

Keywords: media formulation; fungal protease; enzymatic production.

1. Introdução

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos, possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos (Gonzalez e Irineo, 2010; Orlandelli *et al.*, 2012; Tavares, 2013; Adrio e Demaino, 2014; Lima *et al.*, 2014;).

Apresentam a função de catalisar as reações bioquímicas nos organismos vivos (Santos *et al.*, 2013; Thadathil e Velappan, 2014; Carvalho *et al.*, 2016). O mercado mundial de produção enzimática movimentava anualmente bilhões de dólares. Esses investimentos são justificados pelo interesse nos processos que envolvem tecnologia de baixo custo energético, que causam um menor impacto ambiental e utilizam matérias-primas renováveis, através da utilização e reaproveitamento de diversos subprodutos oriundos da agroindústria (Pandey *et al.*, 2010; Sarrouh *et al.*, 2012).

Diversos gêneros microbianos são utilizados para a produção de inúmeros compostos bioativos. Entre estes compostos estão as proteases **microbianas, que são compostos extracelulares secretados no meio de cultura. Sua produção** é um evento necessário nos diversos setores industriais, devido às suas elevadas performances sob uma ampla gama de condições físicas e químicas (Zhu *et al.*, 2013; Adrio e Demaino, 2014; Muniz *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2014; Rocha e Silveira, 2015; Reis *et al.*, 2015; Tavares *et al.*, 2014; Satyanarayana e Joshi, 2015).

Aspergillus niger é uma das espécies mais comuns do gênero destaca-se pelo grande potencial biotecnológico e aplicabilidade na indústria, na produção de ácidos orgânicos, em especial o ácido cítrico, aplicado extensivamente nas indústrias alimentícia e farmacêutica e na produção de diversas enzimas como a protease (Andersen *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010; Luna, 2013).

As proteases constituem um grande grupo de enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de proteínas e degradam-nas em pequenos peptídeos e aminoácidos, apresentam uma vasta gama de aplicações industriais: detergentes, processamento de couros, produção de alimentos e medicamentos, tratamento de efluentes etc (Germano *et al.*, 2003; Cabral *et al.*, 2004; Nagaraju e Divakar, 2011; Kuddus e Ramteke, 2012; Abidia *et al.*, 2014; Jenitta *et al.*, 2015; Muslim *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2015).

Atualmente várias pesquisas têm sido realizadas no sentido de se buscar alternativas que valorizem os resíduos agroindustriais, através do seu reaproveitamento em diversas atividades, principalmente na formulação de meios de produção, diminuindo assim a poluição ambiental. O desenvolvimento de tecnologia por reaproveitamento de resíduos na produção de enzimas favorece o desenvolvimento sustentável, fundamental na preservação do meio ambiente

(Fernandes et al.;2008; Menezes et al., 2012 ;Lopes et al., 2013 ; Lima et al. , 2014; Sethi et al., 2017). Diversos resíduos agroindustriais vêm sendo usados como substratos para a produção de vários metabolitos, devido à sua grande disponibilidade e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial entre esses resíduos encontra-se o soro de leite e o resíduo de sorvete (Lima et al., 2014).

O soro lácteo ou soro do leite bovino é um líquido que contém de 4 a 6 g de proteínas por litro. É a porção aquosa liberada do coágulo durante a fabricação convencional de queijos. Considerado um efluente residual que pode acarretar graves problemas ambientais associados ao seu alto teor de matéria orgânica. Contém, em média, 93 % de água, 5% de lactose, 0,9 a 0,7% de proteínas, 0,5 a 0,3 % de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas. A fração proteica contém, aproximadamente, 50 % de b- lactoglobulina, 25% de a-lactoalbumina e 25% de outras frações proteicas, incluindo imunoglobulinas (Fitzsimons et al. , 2006 ; Oliveira et al. , 2012; Bitello *et al.* ,2013; Poppi et al., 2014).

O sorvete é uma excelente fonte de energia, devido principalmente ao seu alto conteúdo de carboidratos e gordura. Contém basicamente uma composição bastante variada, normalmente apresentando de 8 a 20% de gordura, 8 a 15% de sólidos não gordurosos do leite, 13 a 20% de açúcar e 0 a 0,7% de emulsificante-estabilizante. Após a produção do sorvete, encontra-se em seu descarte sólidos lácteos não gordurosos representados principalmente por proteína, sais minerais e lactose, alginatos, carboximetilcelulos (Thadathil e Velappan, 2015).

O uso de métodos matemáticos, como os planejamentos fatoriais nos processos fermentativos, diminuído a quantidade de experimentos realizados, pois os resultados obtidos podem selecionar as melhores condições de produção, através da influência das variáveis estudadas (Park et al. ,2002 ; Velloorvalappil et al ,2011; Ayeni et al.,2013;Melo et al. ,2014).

2. Material e métodos

2.1. Micro-organismo

Foi utilizada a amostra de *Aspergillus niger* SIS 18, isolada do solo da Caatinga do Estado de Pernambuco, catalogadas no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco-Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB). A cultura fora mantida em meio de aclimatação composto por: Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), com a seguinte composição: dextrose (40g/L), peptona (10g/L), Agar (20g/L), água destilada 1000 mL pH 7,0 e suplementado com gelatina.

2.1. Meios alternativos de produção

Os meios alternativos foram elaborados utilizando resíduos de soro de leite e resíduo de

sorvete, como fontes variáveis de nitrogênio e carbono. A formulação do meio alternativo ocorreu com a supressão da gelatina da peptona e do extrato de levedura e o acréscimo de soro de leite e de resíduo de sorvete. Os ensaios foram realizados em cultivos submersos a 150 rpm, durante 144 horas à 37°C. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL, com volume útil de 250 mL (%p:v). Alíquotas de 25 mL de pré-inóculo foram adicionadas em meio de cultura contendo, Glicose, 10; NaCl, 0,5; CaCl₂.2H₂O, 0,1; K₂HPO₄, 0,3; KH₂PO₄, 0,4; MgSO₄.7H₂O, 0,1; e gelatina (1%).

2.2. Planejamento fatorial 2² (soro de leite)

Foi realizado um planejamento fatorial 2² (Tabela 1) para analisar os principais efeitos e interações das variáveis, concentrações: Soro de leite e Glicose. Com 4 pontos centrais e níveis + 1 e - 1, com apoio de um Software Statistica 7.0 da Stat Soft.

Tabela 1 - Matriz Codificada utilizada no Planejamento Fatorial 2² com soro de leite

Variável	-1	0	1
Soro de Leite (mL)	12	15	18
Glicose(g)	4	6	8

2.3. Planejamento fatorial 2² (resíduo de sorvete)

Foi realizado um planejamento fatorial 2² (Tabela 2) para analisar os principais efeitos e interações das variáveis, concentrações: Resíduo de Sorvete, Glicose. Com 4 pontos centrais e níveis + 1 e - 1 com apoio de um Software Statistica 7.0 da Stat Soft.

Tabela 2 - Matriz Codificada utilizada no Planejamento Fatorial 2² com resíduo de sorvete

Variável	-1	0	1
Resíduo de Sorvete (mL)	6	8	10
Glicose(g)	2	4	6

2.4. Determinação da atividade proteolítica

Foi realizada através da metodologia descrita pelo método de Leogton et al.(1973) reação composta de 250 µL da solução azocaseína, 150 µL da amostra centrifugada produzida nos meios controle e alternativos.

A temperatura foi mantida em 40 °C em banho-maria por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético. Em seguida, a solução com as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8.000 rpm à 4 °C. As enzimas proteolíticas livres

presente na mistura, foram identificadas na solução de 500 µL da solução resultante, adicionada de hidróxido de sódio (1:1). A leitura foi realizada ao término da reação, em espectrofotômetro Biochrom S21, a um comprimento de onda de 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença de 0,01 na absorbância entre o branco e a amostra, por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática dos meios controle e alternativos foi calculada através da seguinte equação:

$$AE \text{ (U/mL)} = [ABS_{am} * (V_{am} * fd / t)]$$

AE= atividade proteásica U/mL;

ABS_{am} = Absorbância da amostra;

V_{am}= volume da amostra (mL);

fd = Fator de diluição; t = o tempo de reação em minutos

2.5. Determinação das proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas pela metodologia de descrita por Bradford (1976). Para a preparação do reagente, foram dissolvidos 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50mL de etanol a 95% e, em seguida, adicionou-se 100 mL de ácido fosfórico a 85%. A solução foi completada para 1L com água destilada.

2.6. Determinação do pH.

Foi realizada por potenciometria em todas as amostras coletadas.

2.7. Determinação da curva de crescimento

O crescimento ocorreu em agitador orbital, em 150 rpm, a 37°C, por 144 h, em triplicata, com amostras coletadas a cada 24 horas.

3. Resultados e discussão

3.1. Produção de protease através de planejamentos fatoriais completos

Segundo Melo *et al.* (2015) proteases constituem o maior grupo de enzimas utilizadas industrialmente no mundo todo, movimentando a economia deste setor ativamente, apresentam uma alta especificidade catalítica, pois atuam principalmente na hidrólise de proteínas e de aminoácidos, sendo produzidas principalmente por diversos gêneros de micro-organismos Gupta *et al.* (2002) , descrevem as proteases microbianas como uma das mais importante enzima hidrolítica.

Ladeira *et al.* (2010) descrevem que as proteases podem ser extraídas de diversos organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, tecidos de mamíferos e de plantas. Contudo, não foi definido um meio de cultura ideal que propicie uma máxima produção de protease microbiana, porque cada micro-organismo apresenta condições diferentes de cultivo para uma produção ótima da protease.

Os resultados apresentados na tabela 3 e na tabela 4 mostram que a cultura de *Aspergillus niger* (SIS18) obteve uma atividade proteolítica em todas as condições testadas em ambos os planejamentos fatoriais. A maior atividade proteolítica foi de 0,118 U/mL em 144 h de cultivo submerso, utilizando o Soro de leite como o indutor enzimático.

Foram realizados dois planejamentos fatoriais 2^2 o primeiro com o soro de leite e o segundo com o resíduo de sorvete. Na tabela 3 encontra-se a matriz codificada do planejamento fatorial, composto pelas variáveis resíduo de sorvete, glicose e a atividade proteolítica. Observou-se que a máxima atividade proteolítica foi evidenciada no ensaio denominado 2, que apresentou um valor inicial de resíduo de sorvete 10 (g/L), glicose 2(g/L), obtendo uma atividade proteolítica de 0,093 U/mL maior atividade obtida nos oito ensaios. Na tabela 4 encontra-se a matriz decodificada com as variáveis glicose e soro de leite e as determinações proteolíticas realizadas, observa-se que a máxima atividade proteolítica evidenciada ocorreu no ensaio 2, apresentando um valor inicial de glicose (4g/L), soro de leite (18,0 g/L), produzindo assim uma atividade proteolítica de 0,118 U/mL.

O ensaio 2 foi a melhor condição obtida na produção de protease utilizando o soro de leite como indutor protéico. Malathi e Chakraborty (1991) em seu trabalho utilizando resíduos agroindustriais obtiveram uma atividade máxima da protease entorno de 0,104 U/mL próxima a obtida neste trabalho.

Tabela 3 – Matriz do planejamento 2^2 , atividade proteolítica para as concentrações de resíduo de sorvete glicose no melhor tempo de 144 horas de cultivo a 37°C a 150rpm

Ensaio	1	*2	3	4	5	6	7	8
Resíduo de Sorvete (mL)	6,0	10	6,0	10	8,0	8,0	8,0	8,0
Glicose	2,0	6,0	6,0	6,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Proteínas Totais	0,225	1.134	0,267	0,565	0,509	0,456	0.564	0,653
Protease (U/mL)	0,026	0,093	0,059	0,054	0,051	0,056	0,049	0,045

* Melhor condição do Planejamento Fatorial

Tabela 4 – Matriz do planejamento 2², atividade proteolítica para as concentrações de soro de leite e glicose no melhor tempo a 144 horas de cultivo a 37C° e 150rpm

Ensaio	1	*2	3	4	5	6	7	8
Soro de Leite (mL)	12	18	12	18	15	15	15	15
Glicose	4,0	4,0	8,0	8,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Proteínas Totais	0,525	1,232	0,237	0,765	0,609	0,856	0,457	0,479
Protease (U/mL)	0,0435	0,118	0,0294	0,0525	0,0484	0,0564	0,0546	0,0688

* Melhor condição do Planejamento Fatorial

3.2 . Influência de resíduos agroindustriais na produção enzimática

Os resultados demonstrados nos Diagramas de Pareto (Figura 1) e (Figura 2) apresentam a significância dos resultados, com 95% de confiança, representado pela linha tracejada vermelha, correspondente ao valor de $p = 0,05$. As seguintes variáveis independentes: soro de leite, glicose e resíduo de sorvete influenciaram diretamente para a produção proteolítica. Contudo foi comprovado que o resíduo de sorvete e o Soro de Leite foram as variáveis independentes, nos seus respectivos planejamentos, com maior relevância para a produção enzimática.

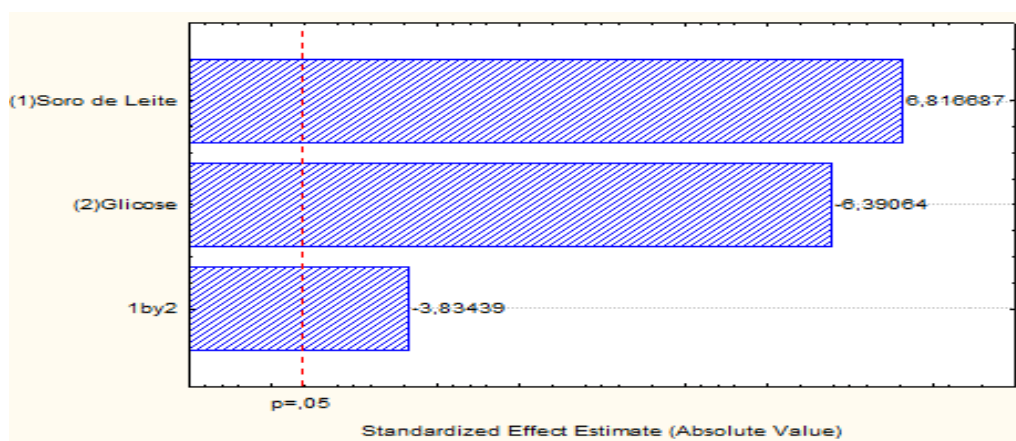


Figura 1. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais e alterações das variáveis independentes no processo de produção de Protease por *Aspergillus niger* a 144 horas de fermentação a 37C°. (1) Glicose e(2) Soro de Leite

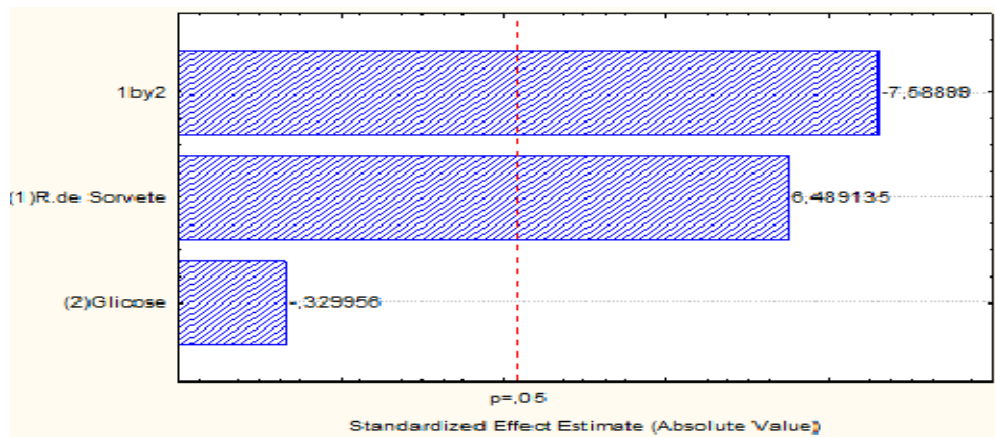


Figura 2: Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais e alterações das variáveis independentes no processo de produção de protease por *Aspergillus niger* a 144 horas de fermentação a 37°C. (1) Resíduo de Sorvete e (2) Glicose.

O fungo *Aspergillus niger* (SIS 18) apresentou uma elevada taxa de crescimento e uma grande produção proteolítica em todos os meios contendo os resíduos agroindustriais industriais investigados. Ladeira *et al* (2010) relatam a produção de proteases utilizando uma diversidade de fontes de carbono e nitrogênio. O soro lácteo ou soro do leite bovino é um líquido que contém de 4 a 6 g de proteínas por litro o que o torna uma excelente indutor protéico.

Nascimento *et al.*(2015) descrevem o fungo *Aspergillus niger* como um bom produtor de diversas enzimas, incluindo as proteases. Segundo descrito pelos autores, os melhores resultados foram determinados em diferentes meios de cultura alternativos contendo resíduos agroindustriais obtendo atividades proteolíticas de 0,386 U/mL e 0,253 U/mL. O fungo *Aspergillus niger* (SIS 18) utilizado neste trabalho obteve um produção de 0,118 U/mL com soro de leite e 0,093 U/mL com resíduo de sorvete comprovando a atividade proteolítica na presença de resíduos agroindustriais com alto teor protéico.

A atividade máxima da enzima com o soro de leite equivalente a 0,118 U/mL e com resíduo de sorvete equivalente a 0,093 U/mL descritas nas tabela 3 e tabela 4 foi alcançada após 96h de cultivo submerso do fungo *Aspergillus niger* (SIS 18). Ward (1985) descreve que os micro-organismos geralmente produzem maior quantidade de protease ao final da fase exponencial de crescimento.

Oliveira e Gomes (2015) verificaram que a melhor condição para produção da protease de modo geral se deu em 72 h de fermentação. Radha *et al.* (2011) em seu estudo envolvendo a produção de proteases ácidas por *Aspergillus spp.* reportaram uma melhor produção em um tempo superior, 120 h, ao obtido no presente estudo.

Nascimento *et al.*(2015) reportam a máxima atividade da protease com *Aspergillus niger* com 96 horas de cultivo idêntica ao obtido neste estudo. Castro *et al.* (2014) estudando o gênero *Aspergillus spp.* em meios com resíduos agroindustriais obtiveram uma maior produção em 96

horas, o que segundo Gupta et al., (2002), pode ser explicado em função da variação dos nutrientes empregados. Portanto a máxima produção proteolítica obtida com 96 horas de cultivo como descrita por Nascimento et al. (2015) e Castro et al. (2014), corroboram com os valores da produção proteolítica, obtidos nesse estudo.

3.3. Influência da glicose na produção enzimática

Nas figuras 1 e 2 são observadas a influência da variável independente glicose. Embora não seja um indutor proteolítico sua interação com as outras variáveis na produção enzimática, apresenta significância de 95% de confiança, representado pela linha tracejada vermelha no diagrama de Pareto, correspondente ao valor de $p = 0,05$. De fato, a influência das fontes de carbono e suas concentrações na produção de protease têm sido discutidas na literatura.

Jenitta e Priva (2015) descreveram a influência de diferentes fontes de carbono na produção de protease por *Penicillium griseofulvum* LCJ231, em seu estudo observaram que, suplementando o meio com glicose variando sua concentração entre 5 a 30 g obtiveram uma produção enzimática de 110,27 U/mL. Wang e Lee (1996) também descrevem que a máxima produção de protease foi observada quando o meio foi suplementado com glicose para o fungo *Aspergillus niger*. Similarmente Chellapandi (2010) relatou que a frutose e a glicose provaram ser as melhores fontes de carbono que influenciam na atividade proteolítica

3.4. Influência do pH na Produção Enzimática

A atividade enzimática é amplamente influenciada pelo pH, uma vez que os sítios ativos das enzimas são muitas vezes compostos por grupos iônicos cuja conformação deve ser mantida, para permitir com sucesso a ligação do substrato, por isso é de extrema importância conhecer o pH ótimo de cada enzima proporcionando uma otimização na reação (Silva, 2013).

A variação da faixa do pH, durante os ensaios, a 144 horas de cultivo ficou na faixa de 6,0 a 7,0 descrita na tabela 5. Nos ensaios contendo o soro de leite e resíduo de sorvete como indutor enzimático a atividade proteolítica máxima foi de 0,118 U/mL para o soro de leite e 0,093 U/mL para o resíduo de sorvete, com o pH tendendo a 7,0 caracterizando a enzima produzida como uma protease neutra.

Tabela 5 - Valores do pH finais nos planejamentos fatoriais utilizando resíduos agroindustriais

	pH final							
Soro de Leite	6,2	7,3	5,5	6,3	6,0	7,0	6,8	6,3
Resíduo de Sorvete	6,5	7,1	5,2	6,5	6	6,9	6,6	6,5

a 144 horas de cultivo a 37°C e 150rpm

No estudo realizado por Freitas (2013), as proteases produzidas pelo fungo *A. oryzae* também obtiveram maior atividade em pH neutro. Silva (2013) descreve o *Aspergillus oryzae* como a principal fonte de protease neutra fúngica. O fungo *Aspergillus niger* (SIS 18) deste trabalho apresentou uma estabilidade considerável na faixa de pH entre 6,0 e 7,0, com a caracterização de proteases neutras estáveis em pH 7,0. Ahmed *et al.* (2011) obtiveram uma faixa de estabilidade enzimática para as proteases de *Aspergillus niger* entre os pHs 5,0 e 8,0, com a maior atividade em pH 7,0. No estudo de Cunha *et al.* (2016), foi produzida a enzima protease a partir do fungo *Aspergillus niger* em uma faixa neutra de pH. Estas literaturas comprovam a ampla capacidade do *Aspergillus niger* na produção enzimática em diversas faixas de pH.

3.5. Produção proteolítica do *Aspergillus niger* nas melhores condições obtidas nos planejamentos fatoriais

Após a seleção das melhores condições de produção de protease encontradas nos ensaios 2 através da utilização do planejamento fatorial, foram elaborados os meios alternativos contendo os resíduos agroindustriais previamente selecionados. A influência da utilização dos substratos contendo resíduos agroindustriais na produção da enzima protease está descrita na tabela 6.

Tabela 6 - Produção de biomassa, pH e atividade proteolítica na melhor condição do planejamento com diferentes resíduos em 96 horas de cultivo a 37°C a 150 rpm.

Resíduos	Biomassa(g/L)	pH	Protease U/mL
Soro de Leite	0,736	7,3	0,134
Resíduo de Sorvete	0,712	6,8	0,113
Controle	0,874	6,2	0,120

Nos ensaios com as melhores condições dos planejamentos fatoriais foi comprovada a atividade proteolíticas em ambos os resíduos o soro de leite apresentou uma atividade proteolítica de 0,134 U/mL, pH 7,3 em 96 h de cultivo, já o resíduo de sorvete teve uma atividade proteolítica de 0,113U/mL, pH 6,6 em 96 h de cultivo. A figura 3 mostra a produção enzimática em 144 horas de fermentação, demonstrando uma melhor produção em 96 h e que ambos os resíduos apresentaram atividade proteolítica nos ensaios testados.

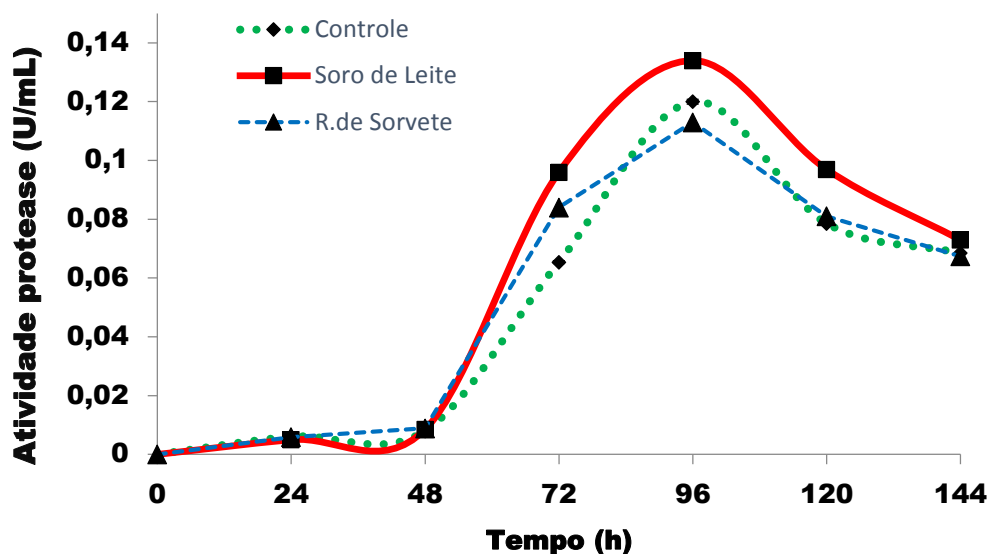


Figura 3: Comparação da atividade enzimática pelo fungo *Aspergillus niger* nos melhores ensaios dos planejamentos fatoriais a 150 rpm, 37° C por 144h

Proteases são enzimas que catalisam a reação da hidrólise de proteínas, peptídeos ou aminoácidos livres. Compõe a classe das mais importantes enzimas comerciais, extracelulares. Desempenham um papel importante em diversos processos biotecnológicos. Apresentam uma ampla aplicação nas indústrias de processamento de alimentos, laticínios e farmacêutica (Ladeira *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2016).

O *Aspergillus niger* é descrito por Nascimento *et al.* (2015) como um dos fungos filamentosos mais utilizados em processos fermentativos, uma vez que é considerado “geralmente seguro” pelo FDA (“United States Food and Drug Administration”). Muitas das enzimas produzidas por este organismo têm aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, bebidas, têxtil, agricultura, polpa e papel. Cunha *et al.* (2016) descreve a importância do uso de resíduos Agroindustriais como uma alternativa, pois representam uma das mais importantes fontes renováveis de energia disponíveis no planeta e, quando indevidamente descartados ou utilizados, tornam-se fontes adicionais de poluição ambiental.

Na figura 3 fica evidenciado uma maior atividade proteolítica com o soro de leite obtendo uma atividade proteolítica de 0,134 U/mL, em 96 h de cultivo. Os resultados obtidos corroboram com dados descritos na literatura. Malathia e Chakraborty (1991) em seu trabalho obteve uma boa produção de protease por fungo filamentoso ao utilizar um meio de produção contendo resíduos agroindustriais, obtendo uma atividade proteolítica de 0,107 U/mL. Wu *et al.* (2016) utilizando o fungo *Aspergillus terreus* em meio contendo resíduo de óleo de palma, observaram máxima atividade proteolítica de 0,129 U/mL em 96 h de cultivo.

Oliveira et al.(2015) e Nascimento *et al.*(2015) mostraram que, para os diferentes meios de cultura utilizados, ocorreu um efeito significativo na atividade da protease em relação ao controle. *Aspergillus niger* é considerado um bom produtor de várias enzimas, incluindo proteases. Resultados para as atividades de coagulação do leite e de protease das enzimas produzidas por *A. niger* apresentaram atividade proteolítica superior às demais preparações avaliadas, como também diferentes valores em resposta a cada resíduo utilizado para a produção.

Também foi analisada a variação do pH a 96 h de fermentação nas melhores condições obtidas nos planejamentos fatoriais. Foi demonstrado que tanto para o soro de leite como o resíduo de sorvete os pH variaram entre 6,5 e 7,5. Esses resultados corroboram com a literatura que relata uma diminuição da atividade enzimática conforme ocorra o aumento do pH, esse comportamento é esperado já que a grande maioria das enzimas produzidas por fungos tem uma melhor resposta em pH baixos. Resultados semelhantes ao presente estudo também foram observados nos trabalhos de Preetha e Boopath (1997) utilizando o *Rhizomucor miehei*, Kumar *et al.*(2005) a partir do *Rhizopus oryzae*; Merheb-Dini *et al.*(2010), os quais utilizaram o *Thermoascus aurantiacus* e El-backy *et al.*(2011) com o basidiomiceto *Piptoporus soloniensis*. Em ambos os trabalhos citados, conforme houve o aumento do pH, a atividade enzimática era reduzida.

Os estudos relacionados à morfologia dos fungos filamentosos tornaram-se ferramentas importantes, para a produção enzimática, pois a ampla variação morfológica dos fungos filamentosos os credenciam a participar de diversos processos industriais, para produção enzimática, com diferentes condições de pH, temperatura, luminosidade, concentração de oxigênio, etc (Krull et al., 2002).

Neste experimento, foi observado, na figura 4, a comparação do crescimento do *Aspergillus niger*, utilizando como indutores proteolíticos o resíduos de sorvete e soro de leite através de fermentação submersa com as melhores condições encontradas nos planejamentos fatoriais obtendo uma máxima atividade proteolítica, no tempo de 96 h, para as amostras trabalhadas. Sendo assim a figura 4 comprova que a máxima atividade proteolítica obtida neste estudo é diretamente proporcional ao crescimento fúngico.

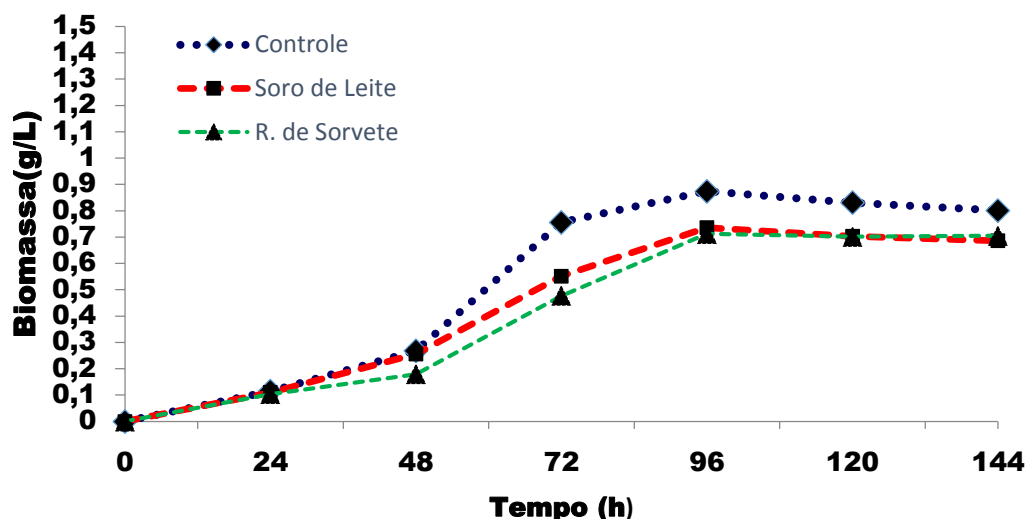


Figura 4 Crescimento do fungo *Aspergillus niger* nos melhores ensaios dos planejamentos fatoriais a 150 rpm, 37° C por 144 h.

4. Conclusões

O uso de resíduos agroindustriais para o produzir biomoléculas de alto valor agregado, através da formulação de meios de baixos custos tem surgido como uma alternativa para reduzir os custos de produção e também o descarte de forma incorreta de uma grande maioria de resíduos com elevado potencial nutritivo. O meio contendo o soro de leite apresentou maior atividade proteolítica, quando comparado aos demais meios testados. Verificou-se que os meios alternativos contendo o soro de leite teve uma atividade proteolítica superior ao denominado meio controle.

5. Referências

- ABIDIA, F ; AISSAOUL , N ; LAZAR, S ; MARZOUKI, N.M. 2014. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease from *Aspergillus niger*. Use in Antioxidant peptides production. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5, 1490-1499.
- ADRIO, J. L ., DEMAINO A,L. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules* ,4, 117- 139.
- AHMED, I. N. O ; IFTIKHAR, T ; IGBAL, M .N. H .2011. Characterization and detergent compatibility of purified protease produced from *Aspergillus niger* by utilizing agro wastes. *BioResources*, 6, 4505- 4522.
- ANDERSEN ; MIKAEL, R ; JENS ,N.O.2009. Current status of systems biology in *Aspergillus*. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 180-190.

ANDERSEN ,M . R ; NIELSEN, M. L ;NIELSEN, J.2008. Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger* .*Molecular Systems Biology*,4,172-178.

AYENI, A.O , BANERJEE , S , OMOLEYE ,J.A ., HYMORE ,F. K ; GIRI ,B.S, DESHMUKH SC , *et al.* 2013. Optimization of pretreatment conditions using full factorial design and enzymatic convertibility of shea tree sawdust. *Biomass and Bioenergy* ,48, 130-138.

BITELLO, R.A ; FACCIN ,C ; GRÄFF , A . C ; SCHLABITZ ,C ; BURLANI, L.E. 2013. Aproveitamento do soro de ricotta para produção de diferentes biomoléculas utilizando a *Kluyveromyces marxianus*. *Revista destaque Acadêmico*, 5, 209-216.

BOM, E.P ;FERRARA, M.A ; CARMO, M .L.2008. Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicação e mercado. *Interciência* ,1, 3-4.

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 , 248-254.

BURKERT , J.F.M ; MAUGERI, F ; RODRIGUES, M.I.2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum*spp. using factorial design. *Bioresource Technology*, 91,77-84.

CABRAL, C.M ; CHERQUI , A .A ; SIMÕES ,N.2004. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* spp. strain Az29. *Appl Environ Microb*, 7, 3831-3838.

CARVALHO,T ; FILHO, A.G ; BRITO, R.A ; PIRES, V.J.A ; Bonomo, F.C.R ; Franco, M . 2016. Production and Characterization of Cellulolytic Enzymes By *Aspergillus Niger* and *Rhizopus* sp. By Solid State Fermentation of Prickly Pear, *Revista. Caatinga* , 29, 222 – 233.

CASTRO, R .J. S ; NISHIDE, T. G ; SATO; H ; H.2014. Produção e características bioquímica de protease produzidas por *Aspergillus niger* em respostas a diferentes resíduos agroindustriais. In: *XX Congresso Brasileiro de Química*. 2014; Florianópolis: COBEQ, 1-8.

CHELLAPANDI, P .2010. Production and Preliminary Characterization of alkaline protease from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus* . *Journal of Chemistry* , 7, 479-482.

COUTINHO, P.M ; ANDERSEN, M.R ; KOLENOVA, K ; VANKUYK, P . A ; Benoit, I .2009. Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* , 46,161-169.

CUNHA, B. R .J ; SANTOS, P. C. F ; ASSIS, V .G. F ; LEAL, L. P. 2016.Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. *Revista Ceres* , 63,497-504

DRIOUCH, H ; SOMMER ,B ; WITTMANN, C.2010. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol. Bioeng* ,105 , 1058-1068.

EL-BAKY, H. A ; LINKE, D ; NIMTZ, M ; BERGER, R, G.2011. PsoP1, a Milk-Clotting Aspartic Peptidase from the Basidiomycete Fungus *Piptoporus soloniensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 59, 10311-10316.

FERNANDES ,M.L.M ; SAAD, E.B ; MEIRA, J.A ; RAMOS, L. P.P ; MITCHELL, D,A.2008. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,44 , 8-13.

FITZSIMONS, S.M; DANIEL ,M.M ; EDWIN, R.M.2006. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids* , 11,6 2-9.

FREITAS, A. C.2013. *Produção de extrato enzimático proteolítico por Aspergillus oryzae CCBP001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida*. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

GERMANO, S ; ASHOK P ; CLARICE, A.O ; SAUL, N.R ; CARLOS, R.S.2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* spp. Produced by solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol* , 32 , 246-251 .

GONZALEZ, G. R ; IRINEO, P.T.2010 Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI. *Spring Inter Publ* , 1, 5-15.

GUO, Y; ZHENG, P.P ; SUN J.2010. *Aspergillus niger as a potential cellular factory: prior knowledge and key technology*. *Current Opinion in Biotechnology*, 26,1410-1418.

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

HADATHIL, N ; VELAPPAN, S .P.2014. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. *Food chemistry*, 150 , 392-399

JENITTA , J.X ;PRIVA , E.S ; GANANADOS .2015. Optimization of Culture Conditions and Inducers for Improved Protease Production by *Penicillium griseofulvum* LCJ231 under Submerged Fermentation. *International Journal of Biotechnology*,, 16, 152-160.

JISHA, N.O. V ; SMITHA ,B.R ; PRADEEP, S ; SREEDEVI ; UNNI, N.K ; PRIJI S.2013. Versatility of microbial proteases Advances in Enzyme. *Research* , 1,39-51.

KOSSEN ,N . W . F .2000.The morphology of filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 70 ,1-33.

KRULL, R ; WUCHERPFENNIG, T ; ESFANDABADI, M.E ; WALISKO, R , MELZER, G ; HEMPEL, D. C.2002. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology . *J. Biotechnol*,163 , 112-123.

KUDDUS, M ; RAMTEKE, P. P.2012. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases.*Critical Reviews in Microbiology*, 34,330-338.

KUMAR, S ; SHARMA, S. N ; SAHARAN, R. M ; SINGH, R.2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*:purification and characterization. *Process Biochem* , 40 , 1701 -1705.

KUSUMOTO, K . L ; MURTHY, S. P. P.2015. Produção de protease ácida por *Aspergillus oryzae* em polpa de batata em pó com ênfase na glicina atividade de liberação: um benefício para a indústria de alimentos. *Food and Bioproducts Processing* , 9, 180–188.

LADEIRA, A. S ; ANDRADE, V .M ;DELATORRE, B. A ; PEREZ, H.V ; MARTINS, L. L. M. 2010. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de protease pelo termófilo *Bacillus* spp. Em fermentação submersa: Otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova* , 3,324-328.

- LEE, K. M.1999. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88 ,646-650.
- LEIGHTONO, T.J DOI ,R.H ;WARREN, R. A . J R. A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 76,103-122.
- LIMA ,F ,B ; AMORIM, S. H ; NASCIMENTO, E. A ; TAKAKI, C. M. G ; SILVA, A. A.2014. Seleção de meios de produção de lipase por amostras de *Aspergillus spp*. Isolados da caatinga Pernambuco. *E-xacta* , 7,147 -157.
- LIMA, B.F ; AMORIM, S.H ; NASCIMENTO, E. A ; TAKAKI, C. M. G ; SILVA, A. A .2014. Seleção de meios de produção de lipase por amostra de *Aspergillus sp* isoladas da caatinga de Pernambuco. *R. Exacta*, 7,147-157.
- LOPES, F.C ; TICHOTA, D.M ; PEREIRA ,J.Q ; SEGALIN , J ; RIOS ,A. O;BRANDELLI,A.2013. Pigment Production by Filamentous Fungi on Agro-Industrial Byproducts: an Eco-Friendly Alternative. *Biotechnology and Applied Biochemistry* , 171,616-625.
- LUNA, C . A . M . 2015. Efeitos do cobre em:Aspectos morfológicos, ultraestruturais e bioquímicos *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1261.2013.132f. Dissertação (mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.
- MACHADO, R. C. A ; MONTEIRO,C. A ; MOCHI, A. D ;YOSHIDA, L.2009. Resíduos e subprodutos agroindustriais e grão como substrato para a produção do fungo *Lecanicillium lecanii*. *Bragantia*, 68,703-714.
- MALATHI ,S ; CHAKRABORTY, R .1991. Production of alkaline protease by a new *Aspergillusflavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied and Environmental Microbiology*.57, 712-716.
- MELO, A. V ; TAKAKI, C. M. G ; SILVA, A. A. C.2015. Produção de protease utilizando diferentes meios através de amostras de *Bacillus licheniformis* isoladas do porto da cidade do Recife-Pernambuco.*Revista E-xacta* , 8, 57-65.
- MELO, A . G , PEDROSO R . C . F ; GUIMARÃES, L . H . S ; ALVES, J . G . L . F ; DIAS, E S ;RESENDE,V.L.M ; CARDOSO,G.P .2014. . The Optimization of *Aspergillus spp*. GM4 Tannase Production under Submerged Fermentationo. *Advances in Applied Microbiology* , 4,143-150.
- MENEZES, J.D.S ; DRUZIAN, J.I ; PADILHA, F.F , SOUZA, R.R.2012. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. *Reget* ,8,1761-1776.
- MERHEB-DINI, C ; GOMES ,E ; BOSCOLO ; M ; SILVA , R .2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chemistry* ,3 ,87-93.
- MUNIZ , S . C . M ; LIMA ,F. B ; TAKAKI, C. M. G ; SILVA, A. A. 2014. Seleção de amostras de *Aspergillus sp* isoladas da Caatinga de Pernambuco e produção de ácido cítrico por fermentação submersa. *E-xacta*, 2,55-65

- MUSLIM, S. N. O ; MAHAMMED, A. N. O ; MUSAFER , H .K .L .2015. Detection of the Optimal Conditions for Tannase Productivity and Activity by *Erwinia Carotovora*. *Journal of Medical and Biological Engineering*,5, 198-204.
- NAGARAJU , E. V. O ; DIVAKAR, G .2011. An inexpensive substrate for the production of alkaline protease by *Bacillus sp* and its application studies of *Manihot esculenta* . *Pharmacist's Letter*.1, 220-232.
- NASCIMENTO, M. B ; ALVES, E. M. H. M ; TAKAKI, C.M.G ; SILVA, A.A.C ; OKADA, K.2014. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de Tanase por *aspergillus sp* isolados do solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil. *E-xacta*, 7 , 95-103.
- NASCIMENTO, A. C. W; SILVA, R .C ;CARVALHO, V.R ;MARTINS, L. L. M.2007. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus spp*. Termofílico. *Ciências e Tecnologia dos Alimentos*,27,417-421.
- NASCIMENTO, L. A .R ; ALVES, E. M .H. M ; FREITAS, S. E. H . J ; MANHKE, C.L ; LUNA, C. A. M.2015. Aproveitamento da água de maceração de milho para a produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261).*e-xacta* , 8,15-29.
- OLIVEIRA, F . D ; BRAVO, C . E . C ; TONIALB, I . 2012. Soro de leite: Um subproduto valioso. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes Cândido Tostes*, 67,64-71.
- OLIVEIRA, L, R ; GOMES, G, H, M ; PORTO, S. T .2015. Determinação dos parâmetros cinéticos da protease *Aspergillus niger* URM 5741. *Rebagro*, 5 , 94-98.
- ORLANDELLI, R.C ; SPECIAN, V ; FELBER, C. A ; PAMPHILE, A . J. 2012. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Revista. Saúde e Biologia* , 7, 97-109.
- PANDEY, A ; BINOD, P ; USHASREE, M. V ; VIDYA , J.2010. Advanced strategies for improving industrial enzymes. *Chemical Engineering Science*, 23 , 74-84.
- PAPAGIANNI, M . 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnology Advances*, 22 , 189-259.
- PARK, Y ; KANG, S ; LEE, J ; HONG, S ; KIM S.2002. Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs. *Journal of Applied Microbiology* , 58,761-766.
- POPPI, F. A ; COSTAB, R. M ; RENSISC, B. V. M. C ; SIVER, K. 2014. Soro de leite e suas proteínas: Composição e atividade funcional. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde* 12, 31-37.
- PREETHA, S ; BOOPATHY, R .1997. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 13 , 573-578.
- RADHA S, V. J ; NITHYA , R ; BABU , H ; SRIDEVI , A ; PRASAD, L.B.N.2011 . Production and optimization of acid protease by *Aspergillus spp* under submerged fermentation. *Archives of Applied Science Research* , 3, 155-63.
- REIS, S. L ; LEÃO, R. N ; SOUZA, F. A ; SILVA, B. K .G ; LUNA, C. A. M; SILVA, A . A . C ; OKADA , K. 2015. Avaliação do potencial biotecnológico de *Aspergillus parasiticus* UCP 1281 no biotratamento de efluentes da indústria de laticínios e produção de lipídeos. *Rev . e-xacta* , 8,31-42.

- RIBEIRO, B. D ; CASTRO, M. A ; SALGADO , M. A ; COELHO, A. M.2013. Aplicação de Enzimas: Propostas para Disciplina Experimental. *Revista Virtual Química* , 5,787-805.
- ROCHA, I.S ; SILVEIRA, S. T. P ; MIRANDA ,L. A ; SOARES,E. S.2015. Estudos prospectivos relativos as enzimas peptidases. *Caderno de . Prospecção* , 8,123-132.
- SANTOS, T. C ; ROCHA, T. J. O ; OLIVEIRA; A.C ; ABREU, F. G ; FRANCO, M . 2013. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (theobroma cacao). *Revista Arquivos do Instituto Biológico*, 80,:65-71.
- SARROUH, B ; SANTOS, M. T ; MIYOSHI, A ; DIAS, R ; AZEVEDO, V. 2012. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *Journal of Bioprocessing* , 4 ,1-10.
- SATYANARAYANA, T, JOSHI, S. 2015. In vitro engineering of microbial enzymes with multifarious applications: Prospects and perspectives. *Bioresour Technol* ,176 , 273–283.
- SETHI, B.K.; DIKSHIT, B.; SAHOO, S.L.; PRADHAN, C.; SENA, S.; BEHE, B.C. Extracellular Production of Amylase and Protease by *Penicillium purpurogenum* BKS9. 2017. *Bioengineering and Bioscience*, 5 (1), 1-6.
- SILVA, E. T. 2013. *Estabilização de proteases para aplicação tecnológica*. Tese (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco.
- SILVA, K .R .I ; DURRANT, L. R ; MENEZES, C. R.2007. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos basidiomicetos de degradação branca cultivados em bagaço de cana-de-açúcar através de fermentação semisólida. In: *Workshop Internacional Brasil-Japão em biocombustível, meio-ambiente e novos produtos de biomassa*, 4,1-8.
- TAVARES, D. C. A ; FONSECA, S. J ; FONSECA, B. R. T ; BARRONCAS, F. J ; SOUZA, T. A .2012. Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. *Bioch Biot Report* , 1, 1-6.
- TAVARES, I. M .C.2013. *Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em sólido estado por aspergillus niger a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial DECRÓTON GREWIOIDES*. Dissertação (Mestrado no Curso de Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
- THADATHIL, N. O ; VELAPPAN, S. P. P . 2014. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. *Food Chemistry* , 150, 392- 399.
- VELOORVALAPPIL , N ; SMITHA, R ; PRADEEP, S ; SREEDEVI, S ; UNN, N. K ; SREEDHARAN,S ; PRAKASAN P ; MOOLAKKARIYIL, S. J ; SAILAS, B . 2011. Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*.1, 39-51.
- WANG, Y ; LEE, M.1996. Influence of culture and nutritional conditions on the production of proteases from thermophilic strain of *Aspergillus spp.*NTU-FC671. *Journal of the Chinese Chemical Society* , 34,732-736.
- WARD, O. P. P. 1985. Proteolytic enzymes. In: Blanc ,H. W , Drew ,S , Wang, D. (eds). *Comprehensive Biotechnology* ,3,811- 818.
- WU, T. Y ;MOHAMMAD, W .A ; JAHIM ,M. J ; ANUAR, N .2006. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology* ,39,1223-1229.

ZHU , M . J ; CHENG, J. R ; CHEN, H. T ; DENG, M. C ; XIE , W. H.2013. Optimization of neutral protease production from *Bacillus subtilis*: Using agroindustrial residues as substrates and response surface methodology. *Biotechnol.Appl. Bioch*, 3, 336-342.