

**López, Débora ; Galante, Micaela ; Ruggieri, Germán ;  
Lombardi, Julia ; Boeris, Valeria ; Spelzini, Darío**

*Producción de proteasas fúngicas para la  
hidrólisis de proteínas vegetales*

*Fungal protease production for the hydrolysis of  
vegetable proteins*

Energeia, Vol. 15, N° 15, 2018

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

López, D. et al. Producción de proteasas fúngicas para la hidrólisis de proteínas vegetales [en línea]. Energeia, 15(15), 2018. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/greenstone/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=Revistas&d=produccion-proteasas-fungicas-hidrolisis> [Fecha de consulta: .....]

## Producción de proteasas fúngicas para la hidrólisis de proteínas vegetales

### Fungal protease production for the hydrolysis of vegetable proteins

Débora López<sup>1,2,3</sup>, Micaela Galante<sup>1,2,3</sup>, Germán Ruggieri<sup>2</sup>, Julia Lombardi<sup>2,3</sup>,  
Valeria Boeris<sup>1,2,3</sup>, Darío Spelzini<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Universidad Católica Argentina. Facultad de Química e Ingeniería del Rosario. Pellegrini 3314, Rosario, Argentina

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Rosario. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Suipacha 531, Rosario, Argentina.

<sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Proyecto: "Caracterización fisicoquímica de péptidos obtenidos por hidrólisis de proteínas vegetales"

**Resumen.** En este trabajo se estudia la producción de peptidasas de *Aspergillus niger* utilizando distintos residuos agroindustriales como sustratos en fermentaciones en estado sólido. Se emplearon cáscara de naranja, cascarilla de soja, aquenio de plátano (*Platanus x hispanica*) y yerba mate (*Ilex paraguayensis*) como sustrato de las fermentaciones. Los resultados indicaron que la cáscara de naranja fue adecuada para el desarrollo del *A. niger* mientras que la cascarilla de soja fue adecuada para la producción de la peptidasa extracelular por lo que durante la optimización del proceso de producción se utilizó una mezcla de ambos residuos. La actividad proteolítica de los extractos enzimáticos obtenidos fue máxima a pH 10, siendo además, elevada en el rango de pH de 7 a 12. Esto permitiría que estas peptidasas sean aplicadas a la producción de hidrolizados de proteínas vegetales.

**Palabras claves:** Peptidasas fúngicas, residuos agroindustriales, fermentación en estado sólido

**Abstract.** In this work, the production of peptidases of *Aspergillus niger* using different agroindustrial residues as substrates in solid state fermentations was studied. Orange peel, soybean husk, achene of platano (*Platanus x hispanica*) and yerba mate (*Ilex paraguayensis*) were used as fermentation substrates. Results indicated that orange peel was suitable for the development of the *A. niger* while soybean husk was adequate for the production of extracellular peptidases; thus, during the optimization of the production process, a mixture of them was used. The proteolytic activity of the enzymatic extracts obtained was maximum at pH 10, also being high in the pH range of 7 to 12. This would allow these peptidases to be applied to the production of vegetable protein hydrolysates.

**Keywords:** Fungal peptidases, agroindustrial wastes, solid state fermentation

## 1. Introducción

Las proteasas son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos de una proteína y se clasifican como ácidas, básicas y neutras, en función de su rango de pH óptimo. Pueden extraerse de fuentes animales, plantas o microorganismos. Dentro de este último grupo, los hongos son productores de enzimas que poseen ciertas ventajas. Por una parte, la mayoría de las cepas son incluidas dentro de la denominación GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros). Por otra parte, producen enzimas extracelulares, lo que simplifica su recuperación del medio de cultivo <sup>1</sup>.

*Aspergillus niger* es uno de los microorganismos con mayor aplicación en la industria biotecnológica para la producción de enzimas extracelulares, desde la década del '60 se ha convertido en una fuente de numerosas enzimas con gran aplicación en la industria alimentaria. *A. niger* es ampliamente utilizado a nivel industrial para la producción de numerosas enzimas de gran importancia comercial <sup>2</sup>.

La fermentación en estado sólido (FES) se refiere a todo proceso de fermentación que se lleva a

cabo sobre un sustrato sólido insoluble en agua, en el cual existe crecimiento microbiano, prácticamente en ausencia de agua libre. Sin embargo, el sustrato debe proporcionar cierto grado de humedad para permitir el desarrollo microbiano y puede actuar como fuente de nutrientes o simplemente ser soporte inerte para el crecimiento<sup>1,3</sup>. Debido a que la actividad biológica decae por debajo de 12 % de humedad, este es el límite mínimo requerido para los sistemas de FES<sup>4</sup>. Particularmente, los procesos fermentativos más antiguos se han basado en los principios de la FES<sup>3</sup>. Principalmente, la fermentación ha sido realizada en estado sólido en alimentos fermentados como el queso, pan, tempeh (producto procedente de la fermentación de la soja), salsa de soja y miso (pasta aromatizante fermentada, realizada con semillas de soja y/o cereales y sal marina). En los últimos 20 años se ha avanzado en nuevos desarrollos en FES con fines biotecnológicos<sup>5</sup>. Una ventaja importante del uso de FES es la posibilidad de utilizar sub-productos agroindustriales como sustratos. Anualmente, las industrias producen enormes cantidades de residuos, y su eliminación no siempre es sencilla<sup>6</sup>.

Usualmente, los desechos de las industrias forestales, agrícolas y alimentarias son ricos en azúcares, minerales y proteínas, por lo cual poseen un elevado valor nutricional. Por lo tanto, no sería apropiado denominarlos "residuos", sino materias primas con fines industriales. Aquellos derivados de actividades agrícolas incluyen paja, tallos, hojas, cáscara de frutas y verduras (naranja, banana, manzana, tomate), pelusa, semillas, harina de soja, pulpa de frutas, legumbres o cereales (arroz, trigo, maíz, cebada, sorgo, entre otros), bagazo de caña de azúcar, mijo, entre otros<sup>6-8</sup>. El aspecto económico más importante de su empleo como sustrato en FES radica en la utilización de materias primas de bajo costo para la elaboración de compuestos con elevado valor agregado. A su vez, otro aspecto importante es el favorable impacto medioambiental causado por la reutilización de residuos industriales. Generalmente, éstos poseen compuestos fenólicos, con lo cual su incorrecta eliminación provoca serios daños medioambientales, revertido al ser reutilizados.

La hidrólisis de las proteínas alimentarias usando peptidasas modifica sus propiedades funcionales. Si la hidrólisis es lo suficientemente extensiva se puede producir la solubilización de las proteínas antes insolubles. Estos hidrolizados contienen péptidos de bajo peso molecular, en el orden de dipéptidos a tetrapéptidos<sup>9</sup>. Existen numerosos estudios que demuestran que las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias pueden mejorarse a través de la hidrólisis enzimática: aumento de la solubilidad<sup>10</sup>, estabilización de espumas<sup>11</sup> y de emulsiones<sup>12</sup>. Además, los hidrolizados proteicos presentan diversas propiedades biológicas como actividad antioxidante y de inhibición de la actividad convertidora de angiotensina<sup>13-14</sup>.

Uno de los alimentos que ha ganado recientemente una gran importancia en el mundo gracias a sus reportados beneficios nutricionales es la quinua. El valor nutricional de los granos de quinua ha sido ampliamente reconocido por sus proteínas de alta calidad (PQ), particularmente ricas en aminoácidos esenciales, como lisina y metionina, los cuales son deficientes en otros cereales. De acuerdo a la literatura, los granos de quinua presentan un contenido medio de proteínas de 12-13% y según las recomendaciones de la FAO y la WHO, la quinua suministra niveles adecuados de aminoácidos aromáticos, mientras que los niveles de aminoácidos esenciales son suficientes para niños de 10 a 12 años<sup>15</sup>. Inclusive, diversos estudios de las propiedades biológicas y las aplicaciones funcionales de aislados de PQ como también de sus hidrolizados ofrecen perspectivas nutraceuticas. Los resultados de estudios realizados por Takao y col.<sup>16</sup> sugieren que la prevención del incremento del colesterol en el plasma y en el hígado de ratones alimentados con una dieta a base de aislados e hidrolizados de PQ, puede ser atribuida a la inhibición de la reabsorción de ácidos biliares en el intestino delgado y al control de la síntesis de colesterol y su catabolismo. Otros estudios han mostrado además que las propiedades bioactivas de hidrolizados de PQ logran disminuir significativamente la presión sanguínea en ratas<sup>13</sup>.

El objetivo de este periodo fue realizar fermentaciones en estado sólido con *A. niger* utilizando materiales de desecho como sustrato no inerte con el fin de producir proteasas. Estas enzimas, a continuación, serán empleadas para generar hidrolizados de PQ.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Residuos agroindustriales y domésticos

Se evaluó el empleo de residuos agroindustriales como sustratos sólidos no inertes para la producción de proteasas mediante FES de *A. niger*. En un primer ensayo, se estudió el uso de cáscara de naranja, cascarilla de soja, aquenio de plátano (*Platanus x hispanica*) y yerba mate (*Ilex paraguayensis*). Previo a su utilización, la cáscara de naranja se secó y trituró con un homogeneizador de cuchillas. Posteriormente se tamizó obteniéndose partículas cuyo tamaño supere los 297 µm. La cascarilla de soja se utilizó sin tratamiento previo. La pelusa de plátano fue lavada y secada previo a su empleo. La yerba mate fue secada y utilizada sin molienda previa.

## 2.2. Medio basal

La composición del medio basal salino fue  $\text{MgSO}_4$  83 mM, NaCl 171 mM,  $\text{FeSO}_4$  0,05 mM, y buffer fosfato 250 mM<sup>17</sup>. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la concentración de nitrato de sodio entre 0 y 15 mM. El pH del medio se varió entre 5 y 7,5. El medio basal salino fue esterilizado a 121 °C durante 15 minutos previo a su utilización.

## 2.3. Obtención de proteasas de *Aspergillus niger* por FES

### 2.3.1. Crecimiento de *Aspergillus niger*

El crecimiento de la cepa *A. niger* NRRL 3 se realizó en tubos picos de flauta en medio agar papa nutritivo (39 g/L), durante 4 días a 35 °C. Luego, se agregaron 2 mL de agua destilada estéril y se rasparon los conidios empleando una espátula estéril. Se determinó la concentración de conidios por medidas de absorbancia a 620 nm. La correlación entre dicha medida espectrofotométrica y la concentración de la suspensión de conidios fue previamente estudiada empleando la cámara de Neubauer<sup>18</sup>.

### 2.3.2. Fermentación en estado sólido

Las FES fueron llevadas a cabo por triplicado en placas de Petri estériles de 90 x 15 mm, en las cuales se colocaron 3 g de sustrato sólido estéril y se agregó una cantidad adecuada de medio basal, de acuerdo al índice de ganancia de agua de cada sustrato en estudio. Se permitió la hidratación del sustrato sólido durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se inoculó cada placa con una suspensión conteniendo 50000 conidios y se incubó a 35 °C.

### 2.3.3. Preparación de los extractos enzimáticos

Luego del período de incubación, se colocó el contenido de cada placa en un vaso de precipitado al cual se le adicionaron 10 mL de agua destilada. Se agitó durante 10 minutos en agitador magnético y se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos. Se descartó el pellet, y se filtró el sobrenadante, de manera de obtener el extracto enzimático, el cual fue almacenado a -20 °C, hasta la determinación de actividad proteasa.

## 2.4. Determinación de la actividad enzimática

### 2.4.1. Actividad proteasa

Se determinó la actividad proteasa de cada extracto enzimático modificando el protocolo propuesto por Anson<sup>19</sup>, empleando PQ o caseinato de sodio (CAS) como sustrato. La PQ fue desnaturalizada por incubación a pH 2 durante 1 h para favorecer su proteólisis. Se incubaron 600  $\mu\text{L}$  de sustrato proteico 0,65 %P/V en buffer fosfato 50 mM pH 7 con 25  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático, durante 15 minutos a 37 °C. Se cortó la reacción enzimática mediante el agregado de 600  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 5 %P/V, y se separó el sobrenadante mediante centrifugación a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C. La reacción colorimétrica se realizó posteriormente mediante la incubación de 250  $\mu\text{L}$  de una dilución al medio del reactivo Folin-Ciocalteu con 500  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante y 1,25 mL de carbonato de sodio 0,55 M. Asimismo, se realizó para cada caso un blanco en las mismas condiciones, en donde se adicionó ácido tricloroacético previo a la incubación del extracto enzimático con el sustrato. Se midió la absorbancia del producto coloreado a 660 nm, y se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para provocar una variación de 0,01 unidades de absorbancia, en las condiciones ensayadas<sup>20</sup>.

### 2.4.2. Actividad coagulasa de leche

La actividad coagulasa se determinó por el método de Berridge, con algunas modificaciones<sup>21</sup>. Se incubaron tubos de vidrio conteniendo 2 mL de leche en un baño termostático a 37 °C durante 15 min. Se adicionaron distintas alícuotas (50; 100; 150 y 200  $\mu\text{L}$ ) del extracto enzimático a cada tubo y se los invirtió cada 2 min para luego devolverlos al baño termostático. Se definió como tiempo de coagulación al tiempo en que se observa un delgado film que se adhiere sobre las paredes del tubo. Se definió una unidad de AC (1 UC) como el volumen (mL) de extracto enzimático que se necesita para coagular 10 mL de leche en 10 min a 37 °C<sup>22</sup>. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

### 2.4.3. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica

El pH óptimo se determinó llevando a cabo la reacción de hidrólisis de PQ durante 15 min a 37 °C en un rango de pH de 2 a 12.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Crecimiento de *Aspergillus niger*

Luego de 7 días de incubación a 35 °C, se observó escaso crecimiento microbiano en las placas en las que se empleó cascarilla de soja como sustrato sólido mientras que la pelusa de plátano no permitió el desarrollo de *A. niger*. Por otra parte, la yerba mate y la cáscara de naranja resultaron los sustratos sólidos no inertes más apropiados para el crecimiento de *A. niger*.



Figura 1: Fotografías de placas de Petri en distintos estadios de la fermentación en estado sólido de *A. niger* NRRL3. Izquierda: sustrato recién inoculado. Centro: desarrollo de micelio. Derecha: desarrollo de conidios.

En la Figura 1 se observan imágenes correspondientes a las placas obtenidas a distintos tiempos de incubación. En un primer momento, la placa comienza a cubrirse de micelio, el cual conduce a la formación de conidios que posteriormente cubren la placa completamente, lo que se evidencia por el cambio de color del cultivo: la coloración blanca corresponde al desarrollo de *A. niger* mientras que la coloración negra es una consecuencia de la generación de conidios.

#### 3.2. Producción de proteasas de *Aspergillus niger*

Se determinó la actividad proteolítica de los extractos obtenidos a partir de las distintas fermentaciones llevadas a cabo. Pese a permitir el desarrollo de *A. niger*, las condiciones ensayadas para la fermentación empleando yerba mate como sustrato sólido no inertes no resultaron apropiados para la producción de proteasas. Por otra parte, los extractos obtenidos a partir de la fermentación de *A. niger* en medios conteniendo cáscara de naranja presentaron actividad proteolítica moderada. Debido a que se ha reportado que la combinación de diferentes sustratos sólidos puede presentar efectos sinérgicos tanto respecto del crecimiento como de la producción enzimática<sup>23</sup> y que la presencia de proteínas puede inducir la secreción de proteasas<sup>24</sup>, se decidió combinar los sustratos sólidos.

Se realizaron fermentaciones en mezclas de cáscara de naranja, que favorece el crecimiento y permite la producción de proteasas, y de cascarilla de soja, que permite el crecimiento y favorecería, debido a su elevado contenido proteico, la producción de proteasas. Se evaluó también el efecto del pH y de la concentración de nitrato de sodio en el medio de cultivo.

#### 3.3. Caracterización parcial de las proteasas de *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* produce dos clases de enzimas proteolíticas: por un lado se encuentran las proteasas aspárticas o ácidas, denominadas aspergillopepsinas, que se caracterizan por tener pH óptimos bajos (entre 3 y 4)<sup>25</sup>; por otra parte, el hongo produce proteasas neutras o alcalinas<sup>26</sup>, las cuales son generalmente serin proteasas que se caracterizan por tener pH óptimos altos (entre 7 y 11) y por su estabilidad a altas temperaturas.

Las dos endopeptidasas extracelulares ácidas se denominan aspergillopepsina I y II, tienen un pH óptimo entre 4 y 4,5 y son estables a pH entre 2,5 y 6. La aspergillopepsina I es una peptidasa aspártica típica de la familia de la pepsina, tiene actividad coagulasa de la leche, y es usada para la etapa de coagulación en la fabricación del queso<sup>27</sup>. La aspergillopepsina II, también conocida como proteinasa A no tiene actividad coagulasa de la leche y es resistente a la pepstatina<sup>28</sup>.

En el caso de las proteasas alcalinas se ha estudiado una enzima que presenta una temperatura óptima de 40 °C a pH 9,0, y resulta estable hasta una temperatura de 90 °C por 15 minutos de incubación, manteniendo casi el 50% de su actividad original<sup>29</sup>. Otro estudio permitió aislar otra

proteasa alcalina con una temperatura óptima de 50 °C a pH 10, siendo también termoestable, y reteniendo el total de su actividad por incubación a 40 °C durante una hora<sup>30</sup>.

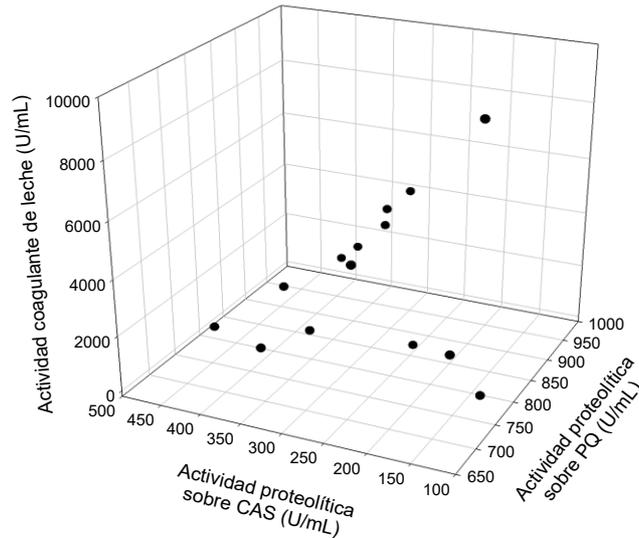


Figura 2: Evaluación de la correlación entre las actividades enzimáticas de las peptidasas de *A. niger* NRRL3 obtenidas por fermentación en estado sólido en distintas condiciones.

De manera de evaluar el o los tipo(s) de proteasa(s) obtenida(s) por las fermentaciones llevadas a cabo en este trabajo, se determinó no sólo la actividad proteolítica sobre PQ sino también sobre CAS así como la actividad coagulante de leche. Los resultados se muestran en la Figura 2. Se encontró que las actividades proteolíticas sobre las PQ y sobre CAS se encuentran correlacionadas. Sin embargo, la actividad proteolítica no se encuentra correlacionada con la actividad coagulante de leche. De esta manera, se sugiere que la relación entre las distintas proteasas producidas está directamente relacionada con las condiciones de pH y la concentración de nitrógeno en el medio.

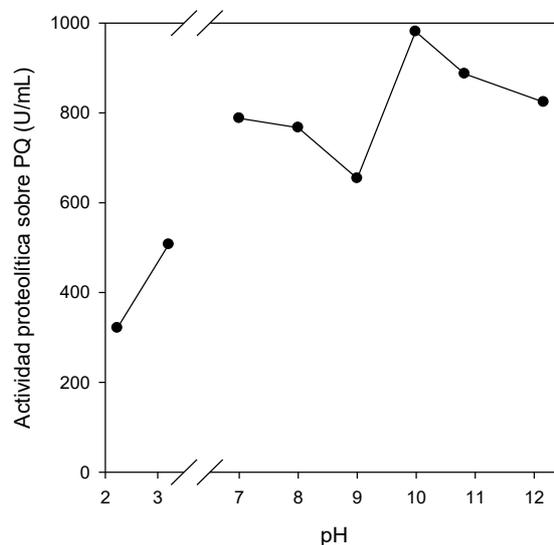


Figura 3: Evaluación del efecto del pH sobre la actividad proteolítica sobre las PQ de las proteasas de *A. niger*

Se determinó el efecto del pH en la actividad proteolítica sobre las PQ. Los resultados se muestran en la Figura 3. Las PQ son insolubles alrededor de su pH isoelectrico (~5), es por esto que no pudo determinarse la actividad proteolítica de las enzimas en el rango entre 3,5 y 6,5. La mayor actividad proteolítica se observó a pH alcalino, lo que sugiere que la proteasa producida mayoritariamente es una serin proteasa. Estos resultados resultan particularmente apropiados de acuerdo con el objetivo del proyecto que es hidrolizar proteínas vegetales, particularmente, PQ cuya solubilidad es elevada por encima de pH 8. Teniendo en cuenta que el máximo de actividad

proteolítica es alrededor de 10 y que en este pH las PQ son completamente solubles, se propone realizar la hidrólisis de las mismas en el rango de pH entre 8 y 10.

#### 4. Conclusiones

A partir de los resultados expuestos se puede concluir que es factible la producción de proteasas de *Aspergillus niger* por FES empleando cáscara de naranja y cascarilla de soja como sustrato. Se encontró que la composición del extracto enzimático obtenido depende de las condiciones de cultivo y que las proteasas extraídas son más activas a pH alcalino. Como perspectiva se plantea la hidrólisis de PQ utilizando las proteasas producidas por *A. niger*.

#### Agradecimientos

Los investigadores agradecen a la Universidad Católica Argentina, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2014-1571), a la Universidad Nacional de Rosario (1BIO585), a la Secretaría de Políticas Universitarias (VT12-UNR4183), a CONICET y a la Fundación Nuevo Banco de Santa Fe por el financiamiento.

#### Bibliografía

1. Cho, K.; Lee, J.; Han, G.; Kim, N. K.; Bae, H.; Hwang, S., Resource recovery using whey permeate to cultivate *Phellinus linteus* mycelium: Solid-state and submerged liquid fermentation. *Journal of Dairy Science* **2015**.
2. Schuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J.; Van Dijck, P., On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied microbiology and biotechnology* **2002**, 59, (4-5), 426-435.
3. Pandey, A., Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **2003**, 13, (2), 81-84.
4. Nigam, P.; Singh, D., Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *Journal of Basic Microbiology* **1994**, 34, (6), 405-423.
5. Bora, N.; Dodd, C.; Desmasures, N., *Diversity, Dynamics and Functional Role of Actinomycetes on European Smear Ripened Cheeses*. Springer: 2014.
6. Orzua, M. C.; Mussatto, S. I.; Contreras-Esquivel, J. C.; Rodriguez, R.; De La Garza, H.; Teixeira, J. A.; Aguilar, C. N., Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products* **2009**, 30, (1), 24-27.
7. de Castro, R. J. S.; Sato, H. H., Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and  $\alpha$ -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. *Industrial Crops and Products* **2013**, 49, 813-821.
8. Mussatto, S. I.; Teixeira, J. A.; Ballesteros, L. F.; Martins, S., *Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes*. INTECH Open Access Publisher: 2012.
9. Nongonierma, A. B.; FitzGerald, R. J., Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides* **2013**, 39, 157-163.
10. Mannheim, A.; Cheryan, M., Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists Society* **1992**, 69, (12), 1163.
11. Martínez, K. D.; Sanchez, C. C.; Patino, J. M. R.; Pílosof, A. M., Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. *Food Hydrocolloids* **2009**, 23, (8), 2149-2157.
12. Celus, I.; Brijs, K.; Delcour, J. A., Fractionation and characterization of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Journal of agricultural and food chemistry* **2009**, 57, (12), 5563-5570.
13. Aluko, R.; Monu, E., Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science* **2003**, 68, (4), 1254-1258.
14. Bougatef, A.; Hajji, M.; Balti, R.; Lassoued, I.; Triki-Ellouz, Y.; Nasri, M., Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry* **2009**, 114, (4), 1198-1205.
15. James, L. E. A., Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Advances in food and nutrition research* **2009**, 58, 1-31.

16. Takao, T.; Watanabe, N.; Yuhara, K.; Itoh, S.; Suda, S.; Tsuruoka, Y.; Nakatsugawa, K.; Konishi, Y., Hypocholesterolemic effect of protein isolated from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Food science and technology research* **2005**, 11, (2), 161-167.
17. Sandhya, C.; Sumantha, A.; Szakacs, G.; Pandey, A., Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.* **2005**, 40, (8), 2689-2694.
18. Piaruchi, J., Producción de proteasas de origen fúngico y evaluación de su actividad enzimática sobre proteínas lácteas. **2014**.
19. Anson, M. L., The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology* **1938**, 22, (1), 79-89.
20. Corrêa, A. P. F.; Daroit, D. J.; Brandelli, A., Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2010**, 64, (1), 1-6.
21. Berridge, N., An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. *Journal of dairy research* **1952**, 19, (3), 328-329.
22. Hashem, A. M., Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology* **2000**, 75, (3), 219-222.
23. de 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. *Biocatal. Agric. Biotech.* **2015**, 4, (4), 678-684.
24. de Castro, R. J. S.; Nishide, T. G.; Sato, H. H., Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. *Biocatal. Agric. Biotech.* **2014**, 3, (4), 236-245.
25. Takahashi, K.; Tanokura, M.; Inoue, H.; Kojima, M.; Muto, Y.; Yamasaki, M.; Makabe, O.; Kimura, T.; Takizawa, T.; Hamaya, T., Structure and function of a pepstatin-insensitive acid proteinase from *Aspergillus niger* var. *macrosporus*. In *Structure and Function of the Aspartic Proteinases*, Springer: 1991; pp 203-211.
26. Abidi, F.; Aissaoui, N.; Lazar, S.; Marzouki, M. N., Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease from *Aspergillus niger*. Use in Antioxidant peptides production. *J. Mater. Environ. Sci* **2014**, 5, (5), 1490-1499.
27. Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews* **1998**, 62, (3), 597-635.
28. Huang, X.-P.; Yabuki, Y.; Kojima, M.; Inoue, H.; Takahashi, K., Activation profiles of the zymogen of aspergilloglutamic peptidase. *Biological chemistry* **2007**, 388, (1), 129-133.
29. Coral, G.; Arian, B.; Unaldi, M.; Guvenmez, H., Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of microbiology* **2003**, 53, (4), 491-498.
30. Devi, M. K.; Banu, A. R.; Gnanaprabha, G.; Pradeep, B.; Palaniswamy, M., Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian journal of science and technology* **2008**, 1, (7), 1-6