



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS



PRODUÇÃO DE ENZIMAS COAGULANTES DO LEITE POR
Aspergillus flavo furcatis **EM RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA**

MIRCELLA MARIALVA ALECRIM

Manaus-AM

Janeiro/2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS



MIRCELLA MARIALVA ALECRIM

PRODUÇÃO DE ENZIMAS COAGULANTES DO LEITE POR
***Aspergillus flavo furcatis* EM RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA**

Dissertação apresentada à Faculdade Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de **Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos**, área de concentração Microbiologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira

Manaus-AM

Janeiro/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Versão final da dissertação de Mestrado “Produção de enzimas coagulantes do leite por *Aspergillus flavo furcatis* em resíduos da agroindústria” apresentada por Mircella Marialva Alecrim perante banca examinadora em 14 de janeiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira
Universidade Federal do Amazonas
(Orientadora)

Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
Universidade Federal do Amazonas
(Titular)

Profa. Dra. Rosana Antunes Palheta
Instituto Federal do Amazonas- Campus Zona Leste
(Titular)

Profa. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz- Insituto Leônidas e Maria Deane
(Titular)

*A Deus, família, amigos e professora Maria Francisca.
Obrigada pela força, paciência, apoio e amor.*

AGRADECIMENTOS

À professora Ila Maria de Aguiar, minha orientadora, pelo apoio e dedicação durante o desenvolvimento do trabalho;

À professora Maria Francisca Simas, pelo suporte e concessão de espaço físico, na Coleção de Culturas DPUA, pela paciência e apoio voltados para a realização bem sucedida deste trabalho. Exemplo de pesquisadora. Apaixonada pela profissão;

Às “meninas” do laboratório de Micologia: Nelly, Larissa Kirsch, Kilma, Taciana, Lorisa, Larissa Silva, Tamiris, Áila, Jéssica, Leonanda, Annie, Hellen, Bianca e Joana. Obrigada pela grande ajuda e suporte, pelas risadas e companheirismo;

Aos “meninos” do laboratório: Felipe, por sua grande ajuda nas análises dos dados, e Salomão, pelo apoio durante as atividades;

À professora Rosana Palheta pelo apoio oferecido e sugestões valiosas;

Às meninas amigas do mestrado em Ciência de Alimentos: Anna Carolina, Flávia, Esher, Karine, Renata, Silmara e Vanessa. Vocês foram um grande presente na minha vida.

Aos membros da banca examinadora de qualificação e defesa, pelo incentivo e apoio dados;

À Cléo, secretária do Programa de Pós-graduação, pela ajuda em todas as ocasiões.

Aos amigos: Rebeca e Sérgio pelo apoio constante;

Aos amigos de faculdade: Lorena, Monique, Leonardo, Pedro, Juan, Ana Júlia, Thayana e Rodrigo, apesar de distantes sempre houve apoio e interação;

À minha melhor amiga de todas: Ana Rita Gaia Machado, pelo apoio na vida, união no trabalho e amor dedicado à nossa amizade.

Aos meus pais, Marco, pelo apoio incondicional, e Mariléa, pelo amor e orações. Ao meu padrasto, meus irmãos, aos meus tios: Dora, Gorete, Walter, Júlio, César, Marcos, Manuel, Nazaré e Amelina. Aos primos e primas.

À minha querida tia Maria Alice que, apesar de não se fazer mais presente entre nós, foi a causa de eu ter me tornado Bióloga. Obrigada, tia, por seu grande amor e por ter marcado minha vida com sua presença.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.

Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;

Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor nunca falha; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá;

Porque, em parte, conhecemos, e em parte profetizamos;

Mas, quando vier o que é perfeito, então o que o é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, discorria como menino, mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino.

Porque agora vemos por espelho em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor”.

I Coríntios 13:2-13

RESUMO

Seis linhagens de *Aspergillus flavo furcatis* foram selecionadas para investigar a produção de proteases coagulantes por fermentação em meio líquido natural. O meio de cultura consistiu de extratos de Casca de Cupuaçu+Farelo de Arroz [CC+FA 10% ou 20% (v/v)] e Resíduo de Açaí+Farelo de Arroz [RA+FA 10% ou 20% (v/v)] com ou sem suplementação de extrato de levedura 0,1% (p/v) e gelatina 0,5% (p/v). Valores significativos de atividade coagulante foram determinados por *A. flavo furcatis* DPUA 1461 e DPUA 1608 no meio padrão e natural, respectivamente. De acordo com o critério de formação de coágulo e separação de soro, 8,3% das amostras testadas foram classificadas como coagulação forte, 41,70% apresentaram coagulação fraca e em 50% não foi observada a coagulação do leite. As proteases coagulantes de *A. flavo furcatis* DPUA 1608 foram inibidas por pepstatina (94,72%) e moderadamente inibidas por outros íons metálicos testados. A ação ótima das enzimas foi determinada a 40 °C e pH 7,0.

Palavras-chave: enzimas coagulantes do leite; resíduos; fermentação submersa; micro-organismos

ABSTRACT

Six strains of *Aspergillus flavo furcatis* were screened to investigate milk-clotting enzyme production by fermentation in natural liquid medium. The growth media comprised extracts of Cupuaçu Exocarp+Rice Bran [10% or 20% (v/v) CE+RB] and Açaí Waste+Rice Bran [10% or 20% (v/v) AW+RB] with or without supplementation 0.1% (w/v) of yeast extract and 0.5% (w/v) gelatin. Significant values of milk-clotting activity were determined by *A. flavo furcatis* DPUA 1461 and DPUA 1608, in the standard and natural media, respectively. According to criteria of clot and whey formations, 8.3% of the samples tested were classified as strong coagulation, 41.70% showed weak coagulation and in 50% wasn't observed milk coagulation. Milk-clotting proteases of *A. flavo furcatis* DPUA 1608 were inhibited by pepstatin (94.72%) and moderately inhibited by the others metal ions tested. The optimal action was at 40 °C and pH 7.0.

Keywords: milk-clotting enzymes; waste; submerged fermentation; micro-organisms

APRESENTAÇÃO

A dissertação está redigida em dois capítulos:

O capítulo I consiste em uma revisão bibliográfica e descrição completa do material e métodos da pesquisa. A revisão bibliográfica discorre sobre as proteases coagulantes, fungos como fonte de proteases, produção de proteases fermentação submersa e a utilização de resíduos da agroindústria como substrato na fermentação.

O capítulo II foi redigido em forma de artigo científico publicado em revista de Língua Inglesa. Ele encontra-se em anexo na dissertação e contém a metodologia e os resultados obtidos em todo o trabalho desenvolvido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de uma ligação peptídica sendo clivada por hidrólise.....	17
Figura 2. Representação dos dois tipos de clivagem das proteases.....	19
Figura 3. Demonstração do verso da placa de Petri com a delimitação da área de inoculação dos esporos.....	25
Figura 4. Fluxograma de preparação dos meios concentrados de CCFA e RAFA [1:1].....	27
Figura 5. Fluxograma da formulação dos meios de fermentação submersa a partir dos extratos concentrados de CCFA e RAFA [1:1].....	21
Figure 1. Classification of the samples according to clot and whey formation: (a) Strong milk coagulation, (b) Weak milk coagulation and (c) Milk without coagulation.....	42
Figure 2. Effect of pH (a) and temperature (b) on Milk-clotting activity of <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608 crude extract.....	43
Figure 3. Effect of pH on stability of <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1608 milk-clotting enzymes.....	43
Figure 4. Effect of temperature (°C) on stability of <i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1608 milk-clotting enzymes.....	43

LISTA DE TABELAS

Table 1. Submerged fermentation media using cupuaçu exocarp or açai waste extracts with or without supplementation and the standard medium formulation..	40
Table 2. Milk-clotting activity (U) and coagulation ratio of <i>Aspergillus flavo furcatis</i> strains cultivated in mineral solution (Standard).....	41
Table 3. Milk-clotting activity (U) and coagulant ratio of <i>Aspergillus flavo furcatis</i> strains cultivated in CE+RB or AW+RB supplemented with 0.1% (w/v) yeast extract 0.5% (w/v) gelatin.....	42

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	13
2.OBJETIVOS.....	15
Capítulo I: Revisão Bibliográfica e Material e Métodos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1.Proteases.....	17
3.1.1.Características gerais.....	17
3.1.2.Classificação.....	17
3.1.3.Importância das proteases.....	19
3.2. Proteases coagulantes.....	20
3.3.Fungos como fonte de proteases.....	21
3.4.Produção de proteases por fermentação submersa.....	22
3.5.Utilização de resíduos na fermentação.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1.Micro-organismos.....	24
4.2.Reativação de <i>Aspergillus flavo furcatis</i>	24
4.3.Obtenção de linhagens em meio sólido.....	25
4.3.1.Preparo das culturas monospóricas.....	25
4.4.Autenticação de <i>Aspergillus flavo furcatis</i>	25
4.5.Teste de aflatoxina em meio sólido.....	26
4.6.Fermentação submersa: produção das proteases coagulantes.....	26
4.6.1.Preparo dos extratos CCFA e RAFA [1:1].....	26
4.6.1.1.Formulação dos meios de fermentação.....	28
4.7.Preparo do inóculo e condições de cultura.....	29
4.8.Determinação da atividade de proteases.....	29
4.9.Determinação da atividade coagulante do leite.....	29
4.10.Caracterização enzimática.....	30
4.10.1.Determinação do efeito da temperatura e do pH na	30

atividade e estabilidade das proteases.....	
4.10.1.1.Determinação do efeito da temperatura e pH na atividade das proteases.....	30
4.10.1.2. Determinação do efeito da temperatura e do pH na estabilidade das proteases.....	31
4.11.Análise estatística dos dados.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
Capítulo II: Artigo.....	38
Mill-clotting enzymes produced by <i>Aspergillus flavo furcatis</i> strains on Amazonic fruit waste.....	39
Summary.....	39
Introduction.....	39
Materials and methods.....	40
Micro-organisms.....	40
Fermentation media and culture conditions.....	40
Proteolytic activity assay.....	40
Milk-clotting protease assay.....	40
Effect of pH and temperature on milk-clotting enzyme activity and stability.....	41
Effect of protease inhibitors and metal ions on milk-clotting activity.....	41
Results and discussion.....	41
Protease production by submerged fermentation.....	41
Enzyme characterisation of <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	43
Conclusions.....	44
Acknowledgments.....	44
References.....	44

1.INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas. Elas representam um dos três maiores grupos de biocatalisadores industriais, contam com cerca de 60% da venda total mundial de enzimas e são líderes no mercado internacional de enzimas utilizadas na indústria (Savitha *et al.*, 2011).

Os micro-organismos são a fonte preferencial dessas enzimas devido sua ampla diversidade bioquímica, susceptibilidade para manipulação genética e por apresentarem características desejadas para aplicações industriais em termos de ação catalítica, especificidade de substrato, mecanismo de ativação, termoestabilidade e pH ótimo (Sandhya *et al.*, 2004; Ramakrishna *et al.*, 2010).

As proteases provenientes de micro-organismos podem ser produzidas por processos de fermentação submersa em que se utiliza um ou mais substratos dissolvidos ou suspensos em meio aquoso (Sumantha *et al.*, 2006).

Diversos subprodutos agroindustriais têm sido usados como substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por apresentarem uma fonte alternativa de baixo valor comercial (Silva *et al.*, 2009).

Para obtenção do queijo, a escolha das enzimas do agente coagulante é fundamental, pois influenciam na degradação proteica, sendo algumas mais proteolíticas que outras (Silva *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, a busca por novos coagulantes para fabricação de queijo tem se voltado para a pesquisa de proteases em micro-organismos, destacando-se os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, que são fontes potenciais dessas enzimas. Na maioria das vezes, ocorre a manipulação genética dos micro-organismos que são utilizados como hospedeiros para produção do gene clonado da quimosina, que é o principal agente coagulante (Horne & Banks, 2004).

Tradicionalmente, os coalhos são de origem animal, principalmente bezerros e porcos mas, para atender às necessidades especiais de grupos como os vegetarianos e os muçulmanos, foram desenvolvidos coalhos de origem vegetal e microbiana. Os de origem vegetal têm, em geral, bom desempenho, mas os queijos fabricados com eles costumam apresentar sabor amargo depois de algum tempo de armazenamento. Já os coalhos de

origem microbiana têm características bastante semelhantes aos de origem animal (Perry, 2004).

O queijo obtido por coagulação do leite com coalho, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, classificado como queijo de média a alta umidade, é denominado de queijo-coalho (Santana *et al.*, 2008) .

O queijo de coalho é um alimento muito nutritivo e a sua produção constitui uma fração relevante na economia da região Nordeste, onde a maior parte da produção de queijo de coalho é obtida em pequenas e médias queijarias (Fonte, 2012).

As principais regiões produtoras de queijos artesanais no Brasil são: Sudeste, em Minas Gerais, com a produção dos queijos Canastra e Serro; Nordeste, em Alagoas, com os queijos de Manteiga e Coalho e; Sul, na serra Catarinense e Gaúcha, com os queijos Serrano e Colonial (Santana *et al.*, 2008) .

No Amazonas, empresas da cooperativa Mista do município de Careiro da Várzea produzem, em média, 17.200 litros diários de leite e, incluindo-se a área de terra firme de Autaz Mirim, atinge-se 24.000 litros. Dessa quantidade, 85% é transformado em queijo, 10% é transportado in natura para Manaus e os outros 5% usados em doces e derivados (Frota Filho *et al.*, 2011).

Devido às características dos fungos em produzir importantes compostos, dentre os quais proteases coagulantes, é de suma importância a realização de pesquisas para a descoberta de novos agentes de origem microbiana que possam ser desenvolvidos utilizando-se resíduos da agroindústria, a fim de atender a crescente demanda desse mercado de laticínios.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Produzir proteases coagulantes do leite por fermentação submersa a partir de linhagens de *Aspergillus flavo furcatis* utilizando-se resíduos da casca de cupuaçu (*Theobroma glandiflorum*), resíduo do processamento do açaí (*Euterpe oleracea*) e farelo de arroz (*Oryza sativa*).

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a atividade proteolítica e coagulante dos extratos obtidos das linhagens de *Aspergillus flavo furcatis* cultivadas nos meios de fermentação submersa;
- Selecionar a linhagem e o meio de fermentação de acordo com a atividade coagulante, razão coagulante e classificação do coágulo formado;
- Caracterizar as enzimas da linhagem selecionada quanto ao pH e temperatura ótima de atividade e estabilidade;

CAPÍTULO I
Revisão Bibliográfica e Material e Métodos

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Proteases

3.1.1. Características gerais

O termo protease foi citado na literatura alemã dentro da química fisiológica, na última metade do século XIX, se referindo às enzimas proteolíticas. Esta nomenclatura foi usada como uma forma genérica para englobar todas as hidrolases (Beynor & Bond, 2001) que degradam proteínas em peptídeos e aminoácidos (Sumantha *et al.* 2006). Portanto, as proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas (Figura 1) (Nelson e & Cox, 2004).

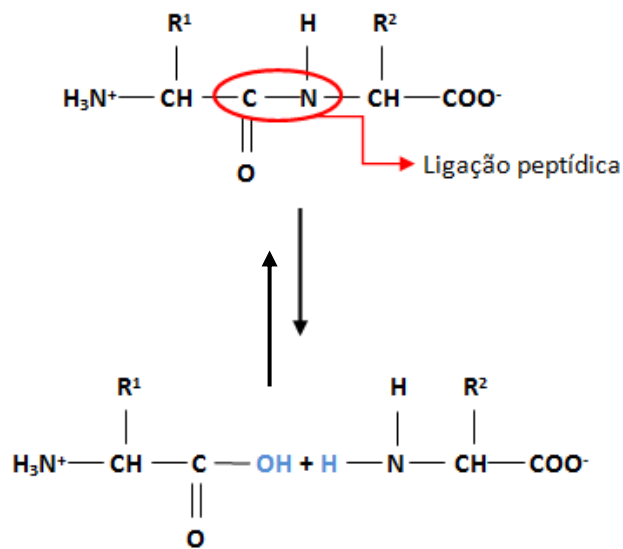


Figura 1. Esquema de uma ligação peptídica sendo clivada por hidrólise

3.1.2. Classificação

As enzimas proteolíticas constituem um amplo e complexo grupo de enzimas, diferindo-se em propriedades como: substrato específico, sítio de ação, mecanismo catalítico, pH e temperatura ótimas e perfil de estabilidade (Sumantha *et al.* 2006).

Segundo a Comissão de Enzimas, Enzyme Commission (EC), as proteases pertencem ao grupo das hidrolases, enzimas que clivam o substrato com a introdução de uma molécula de água, ou seja, a hidrólise das ligações peptídicas (Turk, 2006).

As enzimas proteolíticas são subdivididas em 2 grupos: exoproteases, aquelas que hidrolisam ligações peptídicas próximas às extremidades da cadeia polipeptídica e, endoproteases, as que atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica (Figura 2) (Monod *et al.* 2002).

As exopeptidases dividem-se, ainda, em: carboxipeptidases que rompem as ligações a partir da extremidade C-terminal e as aminopeptidases que rompem as ligações a partir da extremidade N-terminal (Rao *et al.*, 1998). As endopeptidases são divididas em seis subgrupos baseados em seus mecanismos catalíticos: aspártico, cisteína, glutamato, malato, serina e treonina proteases (Li *et al.*, 2013).

Quanto ao potencial hidrogeniônico, as proteases são classificadas em ácidas, neutras e alcalinas com base na faixa de pH em que sua atividade é ótima (Sandhya *et al.*, 2004).

As proteases ácidas possuem uma faixa ótima de pH de 2,0 a 4,0, são produzidas por fungos e têm aplicação na fabricação de queijo, amaciamento de carne, na produção de alimentos fermentados e também em limpeza de compostos ácidos (Rao & Narasu 2007; Thys, 2004).

Proteases neutras produzidas por fungos são importante em aplicações nas indústrias de panificação, processamento de alimentos, modificação de proteínas, tratamento de couro, alimentos para animais e na indústria farmacêutica (Sumantha *et al.* 2006).

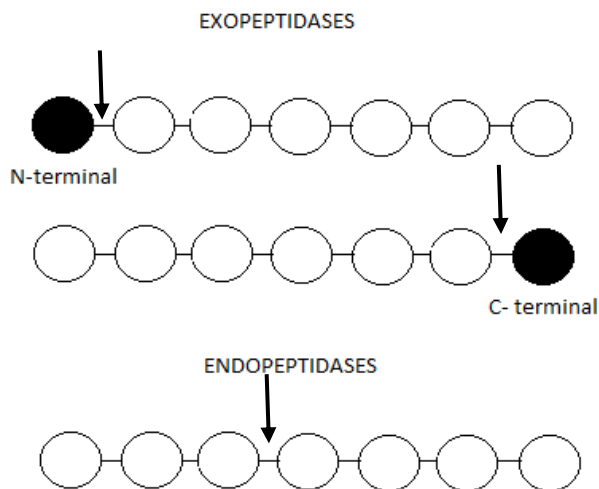


Figura 2. Representação dos dois tipos de clivagem das proteases

As proteases alcalinas podem ser obtidas de diferentes fontes como bactérias, fungos e certos insetos. Elas são classificadas dentro do grupo das serino protease e são um importante grupo de enzimas utilizadas, principalmente, na formulação de detergentes em pó, ajudando na remoção de manchas de origem protéica (Kumar & Takagi 1999; Moreira *et al.*, 2003; Espósito, 2006; Rao & Narasu, 2007).

A temperatura, também, é um dos agentes críticos sobre a atividade das proteases. Quando se eleva a temperatura a atividade aumenta, todavia o processo de desnaturação cresce, em decorrência da ação do calor (Ferreira *et al.* 2010).

3.1.3.Importância das proteases

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas que são utilizadas para aplicação industrial e acadêmica (Rao *et al.*, 2009). Elas representam um dos três maiores grupos de biocatalisadores industriais, contam com cerca de 60% da venda total mundial de enzimas e são líderes no mercado internacional de enzimas utilizadas na indústria (Savitha *et al.*, 2011).

A vasta diversidade das proteases ilustra a influência destas enzimas na biosfera. Elas estão presentes em todos os ambientes sendo encontradas em plantas, animais e micro-organismos (Sandhya *et al.*, 2004).

As enzimas proteolíticas apresentam uma ampla variedade de aplicações nas indústrias de detergentes, farmacêutica, química, de diagnósticos e alimentícia, onde são utilizadas na produção de queijo, cerveja e molho de soja (Monteiro *et al.* 2005; Nishiwaki *et al.*, 2009).

3.2. Proteases coagulantes

A maioria dos queijos são fabricados utilizando-se a quimosina, um coagulante do leite tradicionalmente extraído do quarto estômago de bezerros desmamados (Hashim et al, 2011).

Para obtenção do queijo, a escolha das enzimas do agente coagulante é fundamental, pois influenciam na degradação proteica, sendo algumas mais proteolíticas que outras (Silva *et al.*, 2009).

O aumento da produção e consumo de queijo juntamente com o aumento do preço do coalho e redução da disponibilidade do coalho, tem voltado-se a uma investigação sistemática para novos substitutos do coalho (Ahmed *et al.*, 2009).

Para atender às necessidades especiais de grupos como os vegetarianos e os muçulmanos, foram desenvolvidos coalhos de origem vegetal e microbiana. Os de origem vegetal têm, em geral, bom desempenho, mas os queijos fabricados com eles costumam apresentar sabor amargo depois de algum tempo de armazenamento. Já os coalhos de origem microbiana têm características bastante semelhantes aos de origem animal (Perry, 2004).

Proteases de origem animal, vegetal e microbiana têm sido utilizadas como coagulantes do leite. Nas últimas décadas, a busca por novos coagulantes para fabricação de queijo tem se voltado para a pesquisa de proteases em micro-organismos, destacando-se os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, que são fontes potenciais dessas enzimas. Na maioria das vezes, ocorre a manipulação genética dos micro-organismos que são utilizados

como hospedeiros para produção do gene clonado da quimosina, que é o principal agente coagulante (Horne & Banks, 2004).

3.3. Fungos como fonte de proteases

As proteases provenientes de micro-organismos podem ser produzidas por processos de fermentação submersa em que se utiliza um ou mais substratos dissolvidos ou suspensos em meio aquoso (Sumantha *et al.*, 2006).

A utilização de fungos na dieta e como fonte de bebidas é conhecida desde os tempos antigos. Mas foi a partir de 1960 que houve o aumento do uso de enzimas microbianas, dentre elas as proteases, na indústria de alimentos (Ghorai *et al.*, 2009).

As enzimas produzidas por fungos são mais seguras que aquelas produzidas por bactérias, desde que eles estejam normalmente reconhecidos com GRAS-Generally Regarded As Safe (Germano *et al.*, 2003).

Recentemente, o uso de micro-organismos como fonte biotecnológica de enzimas de relevância industrial estimulou o interesse na exploração de atividades enzimáticas em vários micro-organismos (Goud *et al.*, 2009).

As proteases ácidas, produzidas por micro-organismos, vêm substituindo largamente as enzimas provenientes do estômago de bezerro (coalho), facilitando a expansão da indústria de fabricação de queijo, cujo desenvolvimento estava sendo impedido por questões relacionadas aos direitos animais (Sumantha *et al.*, 2006).

Cryphonectria parasitica, *Penicillium janthinellum*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Rhizopus chinensis*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* e *Yarrowia lipolytica* são exemplos de fungos já conhecidos como produtores de proteases coagulantes (Crabbe, 2004; Campos *et al.*, 2010).

Dentre os fungos produtores de proteases coagulantes, destacam-se os pertencentes ao gênero *Aspergillus* que é encontrado no mundo inteiro e têm cerca de 180 espécies reconhecidas oficialmente (Ward *et al.*, 2006).

O gênero *Aspergillus* compreende um grupo particular de fungos filamentosos cuja maioria de seus representantes produz moléculas que catalisam a decomposição de

polissacarídeos de plantas e, também, são importantes micro-organismos industriais para a produção de enzimas em larga-escala (Ward *et al.*, 2006).

Aspergillus niger e *Aspergillus oryzae* são as espécies mais comumente utilizadas industrialmente para a produção de produtos farmacêuticos, ingredientes alimentares e enzimas. Elas têm um longo histórico a respeito de melhoramento de suas cepas para otimizar a produção de enzimas (Hu *et al.*, 2011).

O extrato enzimático proveniente do fungo *Aspergillus niger* var. *awamori*, por exemplo, já é produzido industrialmente e comercializado como coagulante do leite. (Silva *et al.*, 2009).

O isolamento e seleção de novos micro-organismos com potencial para a produção de proteases é necessário e, para isso, são realizadas técnicas rápidas e sensíveis para detecção e caracterização de proteases microbianas (Saran *et al.*, 2007).

Dentre as proteases fúngicas citam-se aquelas provenientes de *Thermoascus aurantiacus* (Merheb *et al.*, 2007), *Penicillium oxalycum* (Hashem *et al.*, 1999), *Mucor miehei* (Ayhan *et al.*, 2001; Preetha & Boopathy 1994; Silveira *et al.*, 2005), *Mucor circinelloides* (Sathya *et al.*, 2009), *Mucor mucedo* (Yegin *et al.*, 2011), *Cryptococcus* sp. (Rao *et al.*, 2011) e *Coprinus lagopides* (Shamtsyan *et al.*, 2013). *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus chinensis*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*, *Endothia parasitica* e *Aspergillus oryzae* são exemplos de fungos já conhecidos como produtores de proteases coagulantes (Crabbe, 2004; Campos *et al.*, 2010).

3.4. Produção de proteases por fermentação submersa

Os processos microbianos de produção de enzimas ocorrem, basicamente, em cultivos submersos e cultivos em estado sólido, sendo os primeiros mais utilizados industrialmente (Bon *et al.*, 2008)

A natureza da fermentação, sólida ou submersa, influencia vários aspectos do crescimento do micro-organismo, assim como a produção de enzimas (Sumantha *et al.*, 2006).

Os processos submersos são aqueles em que a célula produtora se desenvolve no seio do meio de cultivo, sob agitação. Os parâmetros operacionais tais como pH,

temperatura, consumo de oxigênio e formação de dióxido de carbono são medidos e controlados (Bon *et al.*, 2008).

A fermentação submersa também é definida como a fermentação conduzida na presença de excesso de água. A facilidade da produção de enzimas nesse processo ocorre devido ao melhor monitoramento das condições estabelecidas e manuseio (Singhania *et al.*, 2010).

Aproximadamente 90% da produção industrial da maioria das enzimas utiliza o método de fermentação submersa (SmF), cujo substrato é solubilizado ou permanece em suspensão em meio aquoso (Pandey *et al.*, 2000; Sumantha *et al.*, 2006; Belmessikh *et al.*, 2013)

A utilização de diferentes substratos na fermentação submersa resulta em atividades proteolíticas variadas. Enquanto simples substratos, como a caseína e a gelatina rendem poucas unidades de enzimas, substratos mais complexos como o farelo soja e farelo de trigo resultam em atividades proteolíticas altas. A suplementação com um meio rico em nitrogênio e glicose também aumenta a produção de proteases (Sumantha *et al.*, 2006).

O cultivo líquido de fungos possui vantagens como a fácil separação de biocompostos de interesse comercial como a biomassa e exopolissacarídeos (Campos *et al.*, 2010).

3.5.Utilização de resíduos na fermentação

Diversos subprodutos agroindustriais têm sido usados como substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por apresentarem uma fonte alternativa de baixo valor comercial (Silva *et al.*, 2009).

A indústria alimentícia, especialmente a indústria de sucos, gera uma enorme quantidade de resíduos provenientes do processamento das frutas, obtendo-se ao final do processo quantidades apreciáveis de casca, albedo e sementes que, quando descartados inadequadamente, acarretam graves consequências ambientais devido à elevada carga orgânica (Menezes *et al.*, 2006).

É cada vez maior o interesse na produção de compostos bioquímicos a partir de matérias-primas alternativas renováveis e de resíduos orgânicos. Nestes processos, as

enzimas comerciais são frequentemente utilizadas para promover a bioconversão de substratos em produtos (Wang *et al.*, 2008).

Grande quantidade de resíduos agrícolas e de alimentos processados ou subprodutos são produzidos anualmente em todo o mundo. Estes subprodutos são utilizados, principalmente, como alimento para animais ou eliminados em aterros. Do ponto de vista econômico e ambiental, a reciclagem desses resíduos é essencial (Wahab *et al.*, 2009).

Uma alternativa para a minimização do problema consiste no aproveitamento desses resíduos em processos fermentativos, uma vez que podem ser usados como substrato sólido e meio para o desenvolvimento de micro-organismos, pois a matéria orgânica que o constitui é utilizada como fonte de energia para o crescimento e carbono para síntese da biomassa celular e outros produtos do metabolismo microbiano (Menezes *et al.*, 2006).

Os resíduos podem conter muitas substâncias de alto valor. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. A implementação na transformação de resíduos industriais em produtos de valor agregado pode ser através da conversão de resíduos em ingredientes para a indústria de sucos e panificação, bioconversão dos resíduos por fermentação em estado sólido e, também, submersa ou como bioadsorventes em tratamentos de resíduos (Pelizer *et al.*, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

Seis linhagens de *Aspergillus flavo furcatis* (Batista & Maia, 1955) (DPUA 1461, DPUA 1493, DPUA 1539, DPUA 1608, DPUA 1622 e DPUA 1623), cedidos pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM foram avaliadas para selecionar uma produtora de protease coagulante.

4.2. Reativação de *Aspergillus flavo furcatis*

Para obtenção de subcultivos viáveis, fragmentos das seis culturas foram transferidos, separadamente, para Caldo Glicosado 2% (p/v) (Lacaz *et al.*, 2002). Os cultivos estacionários foram mantidos a 25 °C durante sete dias. Para obtenção da cultura

estoque, após o crescimento, as culturas foram semeadas na superfície de ágar CYA [Czapek e extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placas de Petri, e incubadas a 25 °C durante 7 (sete) dias (Klich & Pitt, 1988).

4.3. Obtenção de linhagens em meio sólido

Para reduzir as variações ao nível morfo-fisiológico, as linhagens de *Aspergillus flavo furcatis* foram submetidas a cultivo monospórico de acordo com a metodologia descrita por Teixeira *et al.* (2011).

4.3.1. Preparo das culturas monospóricas

Os cultivos monospóricos foram preparados em ágar água 1,8% (p/v) e, após esterilização a 121 °C, durante 15 minutos, o meio foi distribuído em placas de Petri (90 mm x 120 mm). Após solidificação do meio, no verso da placa foi delimitada uma área na forma da letra “E” para inoculação dos esporos (Figura 3).

De cada cultura de *A. flavo furcatis* foi preparada uma suspensão de esporos em água destilada esterilizada para determinar a densidade, sob microscópio óptico, de três esporos em 10 µL. Desta suspensão, o volume de 10 µL foi semeado na placa de ágar água. As culturas foram mantidas a 25 °C. Após germinação, o esporo foi transferido para CYA obtendo-se, assim, o cultivo monospórico.

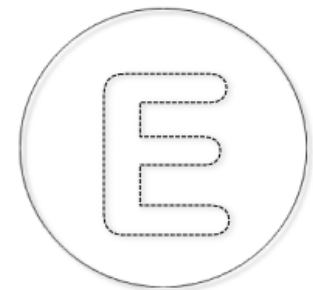


Figura 3. Demonstração do verso da placa de Petri com a delimitação da área de inoculação dos esporos.

4.4. Autenticação de *A. flavo furcatis*

Para autenticação das linhagens de *Aspergillus flavo furcatis* foi realizada a análise das características morfológicas macro e microscópica segundo Raper & Fennel (1977) e Klich & Pitt (1988). Para observação das características macromorfológicas foram preparadas macrocolônias em ágar CYA [Czapek+Extrato de levedura 0,5 % (p/v)], ágar Extrato de Malte (MEA) e ágar Czapek (CZ), em placas de Petri. O inóculo foi semeado em

três pontos equidistantes na superfície de cada meio de cultura, utilizando alça de níquel cromo com a extremidade na forma de agulha. Os cultivos foram mantidos a 25 °C, durante sete dias.

Para observação das microestruturas características da espécie foi preparado cultivo em lamínula. Os fragmentos da cultura de cada linhagem de *A. flavo furcatis* foi semeado em ágar CYA, em polos opostos, na placa de Petri e em cada inóculo foi superposta uma lamínula. Os cultivos foram incubados a 25 °C, por sete dias. Ao término do crescimento nos cultivos em lamínula, as estruturas de *A. flavo furcatis* foram submetidas a ação de um fixador (álcool 95%) e coradas com azul de lactofenol para observação sob microscópio óptico (Ramakrishnan & Sulochana, 2012).

4.5. Teste de aflatoxina em meio sólido

Para verificação da produção de aflatoxinas, as linhagens de *A. flavo furcatis* foram cultivadas em ágar extrato de levedura e sacarose (YES), em placa de Petri. Na superfície do ágar YES, centralmente, foram semeados os esporos. Após sete dias de crescimento, a 25 °C, foi observada a alteração da cor do reverso da colônia. Para confirmar a produção de micotoxinas, em cada cultivo, mantendo-se a placa de Petri invertida, foi adicionado, na tampa da placa, 0,2 mL de uma solução de amônio 25% (v/v). O resultado positivo foi observado pela intensificação da coloração rosa no reverso da colônia (Saito & Machida, 1999; Teixeira *et al.*, 2011).

4.6. Fermentação submersa: produção das proteases coagulantes

A produção das enzimas foi realizada por fermentação submersa utilizando meio de cultura provenientes da Casca de Cupuaçu (CC) ou Resíduo de Açáí (RA) suplementados com Farelo de Arroz (FA) na proporção 1:1.

4.6.1. Preparo dos extratos CC+FA e RA+FA [1:1]

Após lavagem em água corrente, 100g de cada resíduo foram misturados com 100g de farelo de arroz, em béquer de 3000 mL contendo água de torneira (1000 mL) para cocção em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O extrato de cada mistura de resíduo foi

separado por filtração em tecido com algodão hidrófilo. O volume de extrato recuperado foi completado para 1000 mL com água destilada (Figura 4).

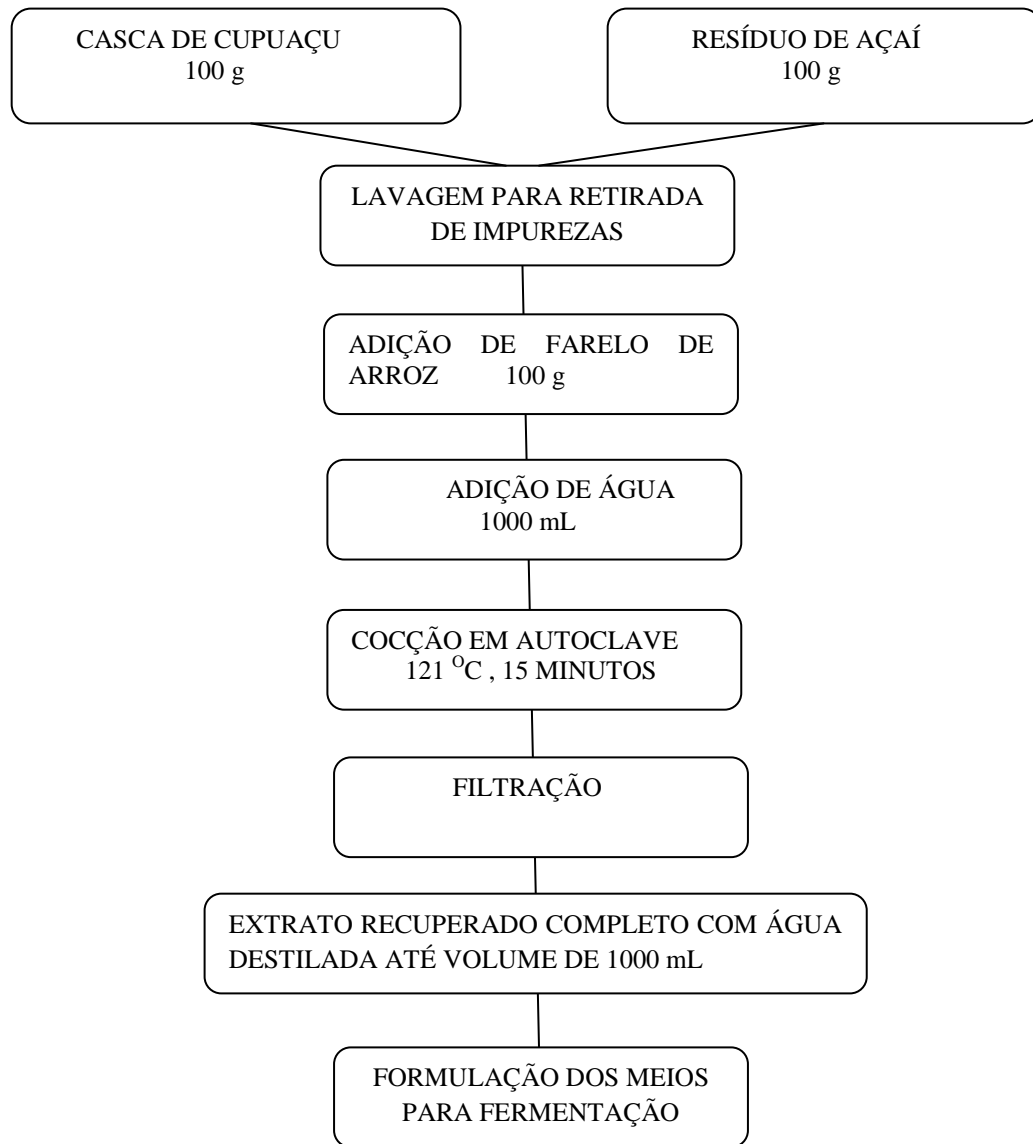


Figura 4. Fluxograma de preparação dos meios concentrados de CCFA e RAFA [1:1].

4.6.1.1. Formulação dos meios de fermentação

Na formulação dos meios para crescimento dos *A. flavo furcatis* foram utilizadas diferentes concentrações de cada extrato de CC+FA e RA+FA [10% e 20% (v/v)] com (CS) ou sem suplementação (SS) de extrato de levedura 0,1% (p/v) e gelatina 0,5% (p/v), totalizando oito experimentos com cada uma das seis linhagens. Como meio padrão foi utilizada solução mineral recomendada por Teixeira *et al.*, (2012). O pH de cada meio foi aferido para 4,0, com solução de HCl 1M (Figura 5):

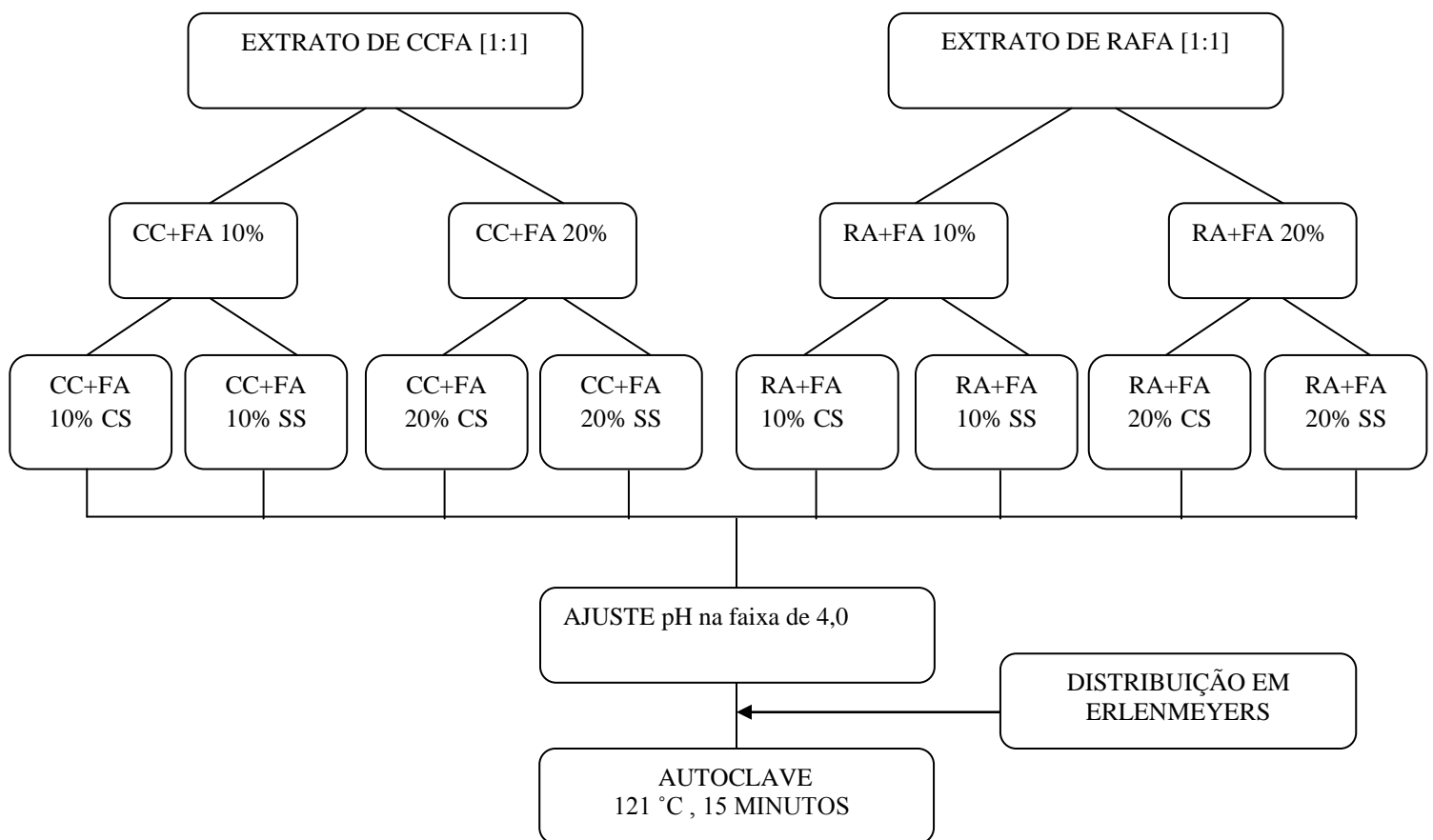


Figura 5. Fluxograma da formulação dos meios de fermentação submersa a partir dos extratos concentrados de CC+FA e RA+FA [1:1]

4.7. Preparo do inóculo e condições de cultura

A fermentação foi conduzida em 50 mL de meio esterilizado a 121° C durante 15 minutos, em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Após resfriamento do meio, cada frasco foi inoculado com uma suspensão de esporos (10^5 esporos/mL de meio) e mantido a 30 °C, 180 rpm. Após 72 horas a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman nº 1.

4.8. Determinação da atividade de proteases

A atividade proteolítica foi determinada segundo Leighton *et al.* (1973). Em cada tubo do tipo Falcon foram adicionados 150 µL do extrato enzimático e 250 µL de solução de azocaseína a 1% (p/v) dissolvida em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2. Após 60 minutos de incubação a 25° C, no escuro. A reação foi interrompida com 1200 µL de ácido tricloroacético 10% (p/v). O resíduo remanescente foi removido por centrifugação (8000 rpm) por 15 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante foram retirados 800 µL e transferidos para 1400 µL de hidróxido de sódio 1M. As leituras foram realizadas a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,1 unidade em uma hora. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

4.9. Determinação da atividade coagulante do leite

A atividade coagulante foi determinada segundo metodologia descrita por Merheb (2007), utilizando como substrato leite em pó desnatado 10% em CaCl_2 0,05M. Previamente, 5 mL da solução de leite foi incubada a 50° C durante 15 minutos. O extrato enzimático (0,5 mL) foi adicionado ao leite e o tempo de coagulação foi medido com um cronômetro. Uma unidade de atividade coagulante foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular 1mL do substrato em 40 minutos a 50°C. Todas as análises dos extratos serão realizadas em triplicata. A unidade de atividade de coagulação (U) será definida como a quantidade de enzima que coagula 1mL de leite em 1 minuto a 50 °C (equação I) e a razão coagulante (R) será determinada segunda a Equação II:

$$U = \frac{2400 \times QS}{QE \times TC} \quad \text{Equação I}$$

$$R = \frac{\text{Atividade Coagulante (U)}}{\text{Atividade Protease (U/mL)}} \quad \text{Equação II}$$

Onde:

2400= Tempo total de espera da atividade coagulante, em segundos

QS= Quantidade de substrato utilizado, mL

QE= Quantidade do extrato enzimático adicionado, em mL

TC= Tempo de coagulação da amostra, em segundos

Para selecionar uma linhagem para caracterização das enzimas foi considerado os seguintes critérios: formação de coágulo compacto e separação do soro no tubo de ensaio. As amostras foram agrupadas em quatro classes de acordo com suas propriedades de coagulação: leite de coagulação forte (coágulo distinto e soro abundante); leite de coagulação fraca (formação coágulo sem separação nítida do soro) e leite sem coagulação (coágulo e soro ausente).

4.10. Caracterização enzimática

4.10.1. Determinação do efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade das proteases

O extrato que apresentar a maior atividade coagulante será utilizado para a determinação do efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade das proteases coagulantes, de acordo com a metodologia de Merheb (2007).

4.10.1.1. Determinação do efeito da temperatura e pH na atividade das proteases

A temperatura ótima das enzimas será avaliada em diferentes faixas (25 °C a 80 °C), em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,2. Já o pH ótimo será determinado a 25C nas faixa de 3,0 a 10,0, utilizando-se solução tampão citrato 0,1 M (pH 3, 4, 5 e 6), tampão fosfato 0,1 M (pH 7-8) e tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9-10). A determinação da atividade será realizada utilizando-se como substrato azocaseína 1% (p/v), nas condições citadas no

item 4.8. Todos os sistemas de reação e o branco serão incubados por uma hora e em seguida será determinada a atividade proteolítica. Todos os experimentos serão realizados em triplicata.

4.10.1.2. Determinação do efeito da temperatura e do pH na estabilidade das proteases

Para testar a estabilidade térmica, o extrato bruto será incubado em tampão com pH de atividade ótima previamente determinada no item 4.11.1. As temperaturas variarão de 25 °C a 80 °C com o tempo de incubação das amostras de 0 a 120 minutos, em intervalos de 30 minutos. A estabilidade ao pH será medida em tampão citrato 0,1 M (pH 4,0 5,0 e 6,0), tampão fosfato 0,1 M (7 e 8) e tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9 e 10), sem substrato (azocaseína). Todas as amostras serão incubadas na temperatura ótima de atividade proteolítica determinada no item 4.11.1. O tempo de incubação das amostras será de 0 a 120 minutos, com análise de atividade proteolítica em intervalos de 30 minutos. A atividade será determinada nas condições citadas no item 4.8. Todos os experimentos serão realizados em triplicata.

4.11. Análise estatística dos dados

Em todos os experimentos os dados foram submetidos à análise estatística descritiva de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), utilizando o programa Minitab versão 16.0.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, I. A. M., Morishima, I., Babiker, E. E., & Mori, N. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds. *Food Chemistry*, 116, 395-400. 2009.

Anema, S. G.; Lee, S. K.; Klostermeyer, H. Effect of pH at heat on the hydrolysis of k-casein and the gelation of skim by chimosin. *LWT* 40: 99-106. 2007.

Ayhan, F.; Çelebi, S. S.; Tanyolaç, A. The effect of fermentation parameters on the production of *Mucor miehei* acid protease in a chemically defined medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76: 153-160. 2001.

Batista, A. C.; Maia, H. S. Alguns Aspergillales de Contaminação. *Anais soc. Biol. Pernambuco* 13: 91-126. 1955.

Belmessikh, A.; Bouk halfa, H.; Merchakra-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*. 44: 377-385. 2013.

Beynor, R.; Bond, J. S. *Proteolytic enzymes: A practical approach*. 2nd Edition. *Oxford University*, New York. 2001.

Bon, E. P. S.; Pereira Jr., N.; Gottshalk, L. M. F.; Sá-Pereira, P.; Roseiro, J. C.; Ferrara, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo, M.L. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência: UFRJ:CAPES:FAPERJ;FCT [Portugual]. 506p. 2008.

Campos, C.; Dias, D. C.; Valle, J. S.; Colauto, N. B.; Linde, G. A. Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 13, p. 19-24, jan/jun. 2010.

Costa, M. R.; Jiménez-Flores, R.; Gigante, M. L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. *Alim. Nutr., Araraquara*. v.20, n. 3, p 507-514, jul/set. 2009.

Crabbe, M. J. C. *Rennets: General and Molecular Aspects*. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Third Edition. v. 1, p. 19-45. 2004.

Duarte, A. R.; Duarte, D. M. R.; Moreira, K.A.; Cavalcanti, M.T.H.; Lima-Filho, J.L.; Porto, A.L.F. *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze a New Vegetable Source for Milk clotting Enzymes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52:1-9. 2009.

Espósito, T. S. Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em

pó. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 98p. 2006.

Ferreira, J. F.; Sbruzzi, D.; Barros, K. V. G.; Machado, I. S.; Tambourgi, E. B. Extração e caracterização de uma enzima do curauá (*Ananas erectifolius*). *Exacta* 8:179-184. 2010.

Fonte, A. I. E. Queijo coalho do sertão Alagoano: Enterotoxigenicidade de *S. aureus* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Técnica de Lisboa- Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 2012.

Frota Filho, A. B.; Pereira, S. M. S.; Parédio, J. L.; Rodrigues, D. L.; Cruz, D. R.; Lima, A. B.; Araújo, N. J. Plano de desenvolvimento rural sustentável do município do Careiro da Várzea: uma proposta. *Revista GEONORTE*, v. 01: 1-13. 2011.

Galvão Júnior, J. G. B.; Rangel, A. H. N.; Medeiros, H. R.; Silva, J. B. A.; Aguiar, E. M.; Madruga, R. C.; Lima Júnior, D. M. Efeito da produção diária e da ordem de parto na composição físico-química do leite de vacas de raças zebuínas. *Acta Veterinaria Brasilia*, v. 4, n. 1., p. 25-30. 2010.

Germano, S.; Pandey, A.; Osaku, C.A.; Rocha, S. N.; Soccol, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzymes and Microbial Technology* 32:246-251. 2003.

Ghorai, S.; Banik, P.B.; Verma, D.; Chowdhury, S. Fungal Biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*. Elsevier. 2009.

Goud, M.J.P.; Suryam, A.; Lakshmi pathi, V.; Charya, M.A.S. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. *African Journal of Biotechnology* 8:354-360. 2009.

Hashem, A. M. (1999). Optimization of milk-clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology*, 70, 203-207.

Hashim, M. M. H., Iqbal, M. F., Xiaohong, C., & Mingsheng, B. Impact of processing conditions on the milk clotting activity of crude protease extracted from Chinese ginger. *International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, 9, 327-335. 2011.

Horne, D. S.; Banks, J. M. Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Third Edition. v. 1, p. 47-70. 2004.

Hu, H. L.; Brink, J. van de.; Gruben, B. S.; Wosten, H. A. B.; Gu, J.-D.; Vries, R. P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65: 248-252. 2011.

Karlsson, A. O.; Ipsen, R.; Ardo, Y. Influence of pH and NaCl on rheological properties of rennet-induced casein gels made from UF concentrated skim milk. *International Dairy Journal* 17: 1053-1062. 2007.

Klich, M. A.; Pitt, J.I. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing*, 116p. 1988.

Kumar, C. G.; Takagi, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17:561-594. 1999.

Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N.T. Tratado de Micologia Médica. Savier, 9^a Edição. 1104p. 2002.

Leighton, T. J.; Doi, R. H.; Warren, R.A. J.; Kelln, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, (76): 103-122. 1973.

Li, Q.; Yi, L.; Marek, P.; Iverson, B. L. Commercial proteases: Present and future. *FERBS Letters*. 2013.

Merheb, C. W. Produção, purificação, caracterização bioquímica e determinação do padrão de ação de protease do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*. *Dissertação de mestrado*. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São Paulo, São José do Rio Preto. 2007.

Menezes, G. D. G.; Oliveira, A. C. P.; Damaso, M. C. T.; Oliveira, M. A. C. L.; Couri, S. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. *Revista Universidade Rural* 25:15-27. 2006.

Monod, M.; Borg-Von, Z. M. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biological Chemistry* 383(7-8), pp. 1087-93. 2002.

Monteiro, T.I.R.C., Porto, T.S.; Carneiro-Leão, A.M.A.; Silva, M.P.C.; Carneiro-da-Cunha, M.G. Reversed micellar extraction of an extracellular protease from *Nocardiopsis* sp. fermentation broth. *Biochemical Engineering Journal*. 24:87-90. 2005.

Moreira, K. A.; Porto, T.S.; Teixeira, M.F.S.; Porto, A.L.F.; Lima Filho, J.L. New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp.: partial purification and characterization. *Process Biochemistry*. 39: 67-72. 2003.

Nelson, D. L.; Cox, M. C. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 1119p. 2004.

Nishiwaki, T.; Asano, S.; Ohyama, T. Properties and substrate of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier. 107:605-609. 2009.

Pandey, A.; Soccol, C.R.; Mitchell, D. New development in solid fermentation: I-bioprocess and products. *Process Biochemistry* 35:1153-1169. 2000.

Pelizer, L. H.; Pontieri, M.H.; Moraes, I.O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation* 2:1. 2007.

Perry, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova*, Vol. 27, n. 2, 293-300. 2004.

Preetha, S.; Boopathy, R. Influence of culture conditions on the production of milk-clotting enzymes from *Rizomucor*. *Word Journal of Microbiology & biotechnology* 10: 527-530. 1994.

Ramakrishna, D.P.N.; Gopi, N.R.; Rajagopal, S.V. Purification and properties of extra cellular alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* (MTTC NO-10110). *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6:493-504. 2010.

Ramakrishna, S.; Sulochana, K.N. *Manual of Medical Laboratory Techniques*. Jaypee Brothers Medical Pub; New Delhi- India: Jaypee Brothers Medical Pub, 434p, 2012.

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M.; Deshpande, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and molecular biology review* . p. 597–635. Sept. India. 1998.

Rao, K.; Narasu, L. Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. *African Journal of Biotechnology* 6(21): 2493-2496. 2007.

Rao, C. S.; Sathish, T.; Ravichandra, P.; Prakasham, R. S. Characterization of thermo-and detergent stable serine protease from isolates *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry* 44: 262-268. 2009.

Rao, S.; Mizutani, O.; Hirano, T.; Masaki, K.; Iefuji, H. Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 11: 441-446. 2011.

Raper, K. B.; Fennell, D. I. *The Genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Co., New York, 686 p. 1977.

Reis, A. M.; Costa, M. R.; Costa, R. G.; Suguimoto, H. H.; Souza, C. H. B.; Aragon-Alegro, L. C.; Ludovico, A.; Santana, E. H. W. Efeito do grupo racial e do número

de lactações sobre a produtividade e a composição do leite bovino. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, suplemento 2, p. 3421-3436. 2012.

Saito, M.; Machida, S. A Rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience* 40: 205-208. 1999.

Sandhya, C.; Sumantha, A.; Szakacs, G.; Pandey, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 40:2689-2694. 2004.

Saran, S.; Isar, J.; Saxena, R.K. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *Journal of Biochemical and Biophysical methods* 1:1-3. 2007.

Santana, A.; Okamoto, P. T.; Barboza, L. C.; Santos, C. A.; Figueiredo, L. C. P.; Gracioso, F. dos; Paula, J. de; Mayana, P.; Gallucci, L.; Lamar, F. C.; Almeida, I.; Cunha, R. D. Queijos nacionais: Estudos de mercado Sebre/ESPM. 34p. 2008.

Santana, R. F.; Santos, D. M.; Martinez, A. C. C.; Lima, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 60: 1527-1522. 2008.

Sathya, R.; Pradeep, B. V.; Angayarkanni, J.; Palaniswamy. Production of milk-clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14: 788-794. 2009.

Savitha, S.; Sadhasivam, S.; Swaminathan, K.; Lin, F. H. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 42: 298-304. 2011.

Silva, G. A. B.; Almeida, W. E.S.; Cortes, M.S.; Martins, E.S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. 03:28-41. 2009.

Silveira, G. G. da; Oliveira, G. M. de; Ribeiro, E. J.; Monti, R.; Contiero, J. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal* 46: 931-937. 2005.

Singhania, R. R.; Sukumaran, R. K.; Patel, A. K.; Larroche, C.; Pandey, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and microbial Technology* 46: 541-549. 2010.

Shamtsyan, M., Dmitriyeva, T., Kolesnikov, B., & Denisova, N. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus logopides* basidial mushroom. *LWT- Food Science and Technology*, 1-5. 2013.

Sumantha, A.; Larroche, C.; Pandey, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2) 211-220. 2006.

Teixeira, M. F.S.; Silva, T. A.; Palheta, R. A.; Carneiro, A. L. B.; Atayde, H. M. Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas). Edua, Manaus. 255p. 2011.

Teixeira, M. F. S., Alecrim, M. M., Palheta, R. A., Silva, T. A., & Porto, A. L. F. Enzimas de linhagens de *Aspergillus flavo furcatis*: Novas fontes proteolíticas da biodiversidade amazônica. In: Marcon, J.L., Menin, M., Araújo, M. G. P., & Hrbek, T. (ed). Biodiversidade Amazônica: Caracterização, Ecologia e Conservação. Manaus: Edua. 2012.

Thys, R. C. S. Produção. Caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo micro-organismo *Microbacterium* sp. kr 10. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2004.

Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. Nature Publishing Group. Volume 5, September. 2006.

Wahab, k. A.; Shahedur, R. M.; Takashi, A. Application of malt redidue in submerged fermentation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Environmental Sciences Supplement*, p. 533-535. 2009.

Wang, Q.; Wang, X.; Wang, X.; Ma, H. Glucoamylase production from waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry* 43: 280-286. 2008.

Ward, O.P.; Qin, J. D.; Ye, J.; Singh, A. Physiology an Biotechnology of *Aaspergillus*. *Advanges in applied microbiology* 58:1-55. 2006.

Yegin, S., Fernandez-Lahore, M., Salgado, A. J. G., Guvene, U., Goksungur, Y., & Tari, C. (2011). Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Applied. Microbiology Biotechnology*, 89, 949-960.

Capítulo II

Artigo:

“Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste”

Original article

Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste

Mircella M. Alecrim,¹ Rosana A. Palheta,² Maria Francisca S. Teixeira^{1*} & Ila Maria de A. Oliveira³

¹ Culture Collection DPUA, Federal University of Amazonas, Manaus 69077-000, Brazil

² Federal Institute of Amazonas, East Zone Campus, Manaus 69083-000, Brazil

³ Pharmaceutical Science College, Federal University of Amazonas, Manaus 69010-300, Brazil

(Received 24 April 2014; Accepted in revised form 2 September 2014)

Summary Six strains of *Aspergillus flavo furcatis* were screened to investigate milk-clotting enzyme production by fermentation in natural liquid medium. The growth media comprised extracts of cupuaçu exocarp+rice bran [10% or 20% (v/v) CE+RB] and acai waste+rice bran [10% or 20% (v/v) AW+RB] with or without supplementation of 0.1% (w/v) yeast extract and 0.5% (w/v) gelatin. Significant values of milk-clotting activity were determined by *A. flavo furcatis* DPUA 1461 and DPUA 1608, in the standard and natural media, respectively. According to criteria of clot and whey formations, 8.3% of the samples tested were classified as strong coagulation, 41.70% showed weak coagulation and in 50% was not observed milk coagulation. The enzyme optimal action of DPUA 1608, the selected strain, was at 40 °C and pH 7.0. Milk-clotting proteases were inhibited by pepstatin (94.72%) and moderately inhibited by the others metal ions tested.

Keywords *Aspergillus flavo furcatis*, milk-clotting enzymes, submerged fermentation, waste.

Introduction

The use of cheese as ingredient in prepared foods for imparting taste, texture and nutritional qualities are valorised. However, there are currently ethical concerns that refer negatively the consumption of animal rennet. Also, the shortage of rennet has increased the interest in milk-clotting enzymes to replace that extracted from the stomach of calves. Many studies show that enzymes from plants and micro-organisms are already used as coagulants (Ejito et al., 2007; Ahmed et al., 2009; Hashim et al., 2011; Gradanovic et al., 2013; Tita et al., 2013).

Coagulant proteases are synthesised by plants, animals and micro-organisms. However, microbial sources are preferred due to their wide diversity biochemical and susceptibility to genetic manipulation. In addition, micro-organisms have a better acceptance by people whose eating habits and religious beliefs are against the use of enzymes from animal origin (Sachya et al., 2005; Marhab-Dini et al., 2010).

Among microbial sources, enzymes produced by fungi have many advantages because they are normally GRAS (Generally Regarded as Safe) and their extra-

cellular enzymes are easily recovered in fermentation process (Sachya et al., 2005). Milk-clotting enzymes from *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus oryzae* and *Endothia parasitica* are already used commercially (Sachya et al., 2005).

Aspergillus flavo furcatis strains are emerging sources of enzymes to industrial application (Teixeira et al., 2012). According to the morphological characteristics, on Czapek's solution agar, its colonies spreading rapidly, attaining a diameter of 6.0–7.0 cm in 10–12 days at room temperature (24–26 °C), dark olive buff through brownish olive when young, becoming sepia to mummy brown (Raper & Fennell, 1977).

Submerged fermentation (SfF) can be used as a method to produce milk-clotting proteases from micro-organisms. In this process, different types of substrates are used including agro-industrial waste with supplementation of carbon and nitrogen sources that can promote diverse proteolytic activities. Moreover, in submerged fermentation, the conditions are monitored with greater accuracy when compared to solid state fermentation (Sumantha et al., 2006; Bon et al., 2008; Singhania et al., 2010).

The aim of this study was to investigate the production of milk-clotting proteases by *Aspergillus flavo furcatis* strains using extracts of cupuaçu exocarp.

*Correspondent: E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

(*Theobroma grandiflorum* Willd Ex Spreng Shum) and açai waste (*Euterpe deracea*) both mixed with rice bran (*Oryza sativa*), select a promising strain and characterise its milk-clotting proteases according to the effect of pH and temperature on activity and stability and the effect of some inhibitors

Materials and methods

Micro-organisms

Six *Aspergillus flavo furcatis* strains (DPJA 1461, DPJA 1493, DPJA 1539, DPJA 1608, DPJA 1622 and DPJA 1623) obtained from Culture Collection DPJA of the Federal University of Amazonas-UFAM were selected. These strains were selected for showing significant amounts of milk-clotting proteases and being nonproducers of mycotoxins among ten strains previously reported (Teixeira, 2012). To obtain the main culture fragments of the strains were inoculated on CYA agar surface [0.5% (w/v) Czapek + 0.5% (w/v) yeast extract] in plates. The cultures were incubated at 25 °C for 7 days (Klich & Pitt, 1988).

Fermentation media and culture conditions

The production of milk-clotting enzymes was made by submerged fermentation. Two main extracts using cupuacu exocarp (CE) and açai waste (AW) were made. The extracts were prepared by washing the raw material in water then mixing 100 g of each residue with 100 g of rice bran (RB) in 1000 mL of water and cooked in autoclave at 121 °C for 15 min. The residue of each extract was separated by filtration in hydrophobic cotton, and the recovered volume was completed until 1000 mL with distilled water.

The main extracts obtained were used as basis to the formulation of fermentation media. Different concentrations [10% and 20% (v/v)] of CE+RB and

AW+RB main extracts were used, with or without supplementation of 0.1% (w/v) yeast extract and 0.5% (w/v) gelatin. Eight fermentation media were obtained (Table 1), and a mineral solution recommended by Teixeira et al. (2012) was used as standard medium. The pH of each medium was measured to 4.0 with 1M HCl solution.

The fermentation was performed in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of sterilised medium (121 °C for 15 min). After cooling, each flask was inoculated using a spore solution (10^5 mL⁻¹ spores) and incubated at 30 °C, on rotatory shaker (Nova Técnica, model 712, Fraicaba, São Paulo, Brazil) at 180 r.p.m. during 72 h. The biomass was separated from the crude extract by vacuum filtration on Whatman number 1 paper filter.

Proteolytic activity assay

The proteolytic activity was determined according Leighton et al. (1973). Protease activity was determined in the crude extracts using 10% (w/v) azocasein in 0.2M Tris-HCl buffer, pH 7. One unit of proteolytic enzyme was defined as the amount of enzyme that produces a 0.1 increase of absorbance in 1h at 440nm. All samples were prepared in triplicate.

Milk-clotting protease assay

Milk-clotting activity was determined according to Mørhe-Dini et al. (2010) using 10% (w/v) skimmed milk powder (Mlco, Nestlé, Aracatuba, São Paulo, Brazil) in 0.05 M CaCl₂ as substrate. Briefly, 5 mL of milk solution were distributed in test tubes and preincubated in water bath (Gant, model 179, Cambridge, UK) at 50 °C for 15 min. The enzyme extract (0.5 mL) was added to the milk and counting time started. Clot formation was observed while manually rotating the test tube. The time at which the first

Table 1 Submerged fermentation media using cupuacu exocarp or açai waste extracts with or without supplementation and the standard medium formulation

Extract	Medium	Medium composition
CE+RB [1:1] (w/w)	10% CE+RB	100 mL of CE+RB extract + 900 mL of distilled water
	10% CE+RB S	100 mL of CE+RB extract + 900 mL of distilled water + 0.1% (w/v) yeast extract + 0.5% (w/v) gelatin
	20% CE+RB	200 mL of CE+RB extract + 800 mL of distilled water
	20% CE+RB S	200 mL of CE+RB extract + 800 mL of distilled water + 0.1% (w/v) yeast extract + 0.5% (w/v) gelatin
AW+RB [1:1] (w/w)	10% AW+RB	100 mL of AW+RB extract + 900 mL of distilled water
	10% AW+RB S	100 mL of AW+RB extract + 900 mL of distilled water + 0.1% (w/v) yeast extract + 0.5% (w/v) gelatin
	20% AW+RB	200 mL of AW+RB extract + 800 mL of distilled water
	20% AW+RB S	200 mL of AW+RB extract + 800 mL of distilled water + 0.1% (w/v) yeast extract + 0.5% (w/v) gelatin
Standard	Mineral solution (g L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (2.0); (NH ₄)SO ₄ (1.0); MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.1); Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (0.9); Yeast extract (1.0), gelatin (5.0)

CE+RB = cupuacu exocarp and rice bran; AW+RB = açai waste and rice bran; S = medium with supplementation of 0.1% (w/v) yeast extract and 0.5% (w/v) gelatin.

partides were formed was measured. All samples were prepared in triplicate

An unit of milk-dotting activity (U) was defined as the amount of enzyme required to coagulate 1 mL of substrate in 40 min at 50 °C. Milk-dotting activity (U) (eqn 1) and the ratio (R) (eqn 2) were calculated using the following equations

$$U = \frac{2400 \cdot S}{T \cdot E}$$

$$R = \frac{\text{Milk-dotting activity}}{\text{Proteolytic activity}}$$

where 2400 is the total time of milk-dotting activity (s), S is the milk volume (mL), E is the enzyme volume (mL) and T is the time of dotting formation (s).

To select a strain and characterize its enzymes, the samples were grouped into three classes according to the formation of compact milk dot and milk whey separation in the test tube: strong milk coagulation (distinct dot and abundant whey), weak milk coagulation (dot formation without clear separation of the whey) and milk without coagulation (dot and whey absent).

Effect of pH and temperature on milk-clotting enzyme activity and stability

To assay optimum pH, milk-dotting activity was determined at 25 °C at different pH values using the following 0.1M buffer solutions: citrate (4.0, 5.0 and 6.0), phosphate (7.0 and 8.0) and carbonate-bicarbonate (9.0 and 10.0). Optimum temperature was determined by incubating the crude extract at different temperatures ranging from 25 to 80 °C and assaying the activity at the pH determined as optimum.

For pH stability, the crude extract was dispersed (1%) in the following 0.1M buffer solutions: citrate (4.0, 5.0 and 6.0), phosphate (7.0 and 8.0) and carbonate-bicarbonate (9.0 and 10.0) and maintained at 25 °C for 24 h. In thermal stability, the extract was incubated at different temperatures ranging from 25 to 80 °C for 1 h. Skimmed milk powder (10% w/v) in 0.05 M CaCl₂ pH 6.0, was used as substrate. All samples were prepared in triplicate. Residual milk-dotting activities were determined according to the optimal conditions of pH and temperature (Marhab-Dini et al., 2010).

Effect of protease inhibitors and metal ions on milk-clotting activity

The effect of inhibitors and metal ions on enzyme activity was investigated by using 0.1 mM of phenyl-

methylsulfonyl fluoride (PMSF), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pepstatin A, iodoacetic acid, CaCl₂, CoCl₂, MnSO₄, NaCl and ZnSO₄. Samples were incubated at 37 °C for 60 min and residual enzyme activities were determined and compared with the control which was incubated without the inhibitors and metal ions and corresponds to 100% of activity. All samples were prepared in triplicate.

Statistical analysis

In all experiments, the data were subjected to descriptive statistical analysis of variance and the averages were compared by Tukey test (P < 0.05) using Minitab program version 16.0 (Minitab, 2010).

Results and discussion

Protease production by submerged fermentation

In this investigation, all strains of *Aspergillus flavo furcatis* synthesized and excreted coagulant proteases in standard medium. The values of coagulant ratio were significant for *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1461 (16.19 U) (Table 2). The coagulant ratio (R) demonstrates the potential commercial suitability of these milk-dotting enzymes in cheese manufacturing (Hashem 1999; Barros et al., 2001; Marhab-Dini et al., 2010). Therefore, the specificity of cleavage, in opposition to extensive proteolysis, defines a good coagulant (Yegni et al., 2011).

Fermentation conditions in standard medium (Table 2) showed that the second largest milk-dotting activities were detected in extracts of *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1493 and *Aspergillus flavo furcatis*

Table 2 Milk-clotting activity (U) and coagulant ratio of *Aspergillus flavo furcatis* strains cultivated in mineral solution (Standard)

Strains	Milk-clotting activity (U)	Coagulant ratio
<i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1461	116.19 ± 3.30 ^a	2.86 ± 0.35 ^a
<i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1493	68.61 ± 1.96 ^b	1.81 ± 0.05 ^b
<i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1539	30.04 ± 0.38 ^e	1.03 ± 0.04 ^d
<i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608	36.36 ± 0 ^d	2.03 ± 0.05 ^b
<i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1622	53.35 ± 1.19 ^c	1.61 ± 0.10 ^{b,c}
<i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1623	19.05 ± 0 ^f	1.26 ± 0.02 ^{c,d}

Means followed by the same letters did not differ from one another by the Tukey test (P < 0.05)/(_) = SD/DPUA = Code of Culture Collection from Federal University of Amazonas.

Table 3 Milk-clotting activity (U) and coagulant ratio of *Aspergillus flavo furcatis* strains cultivated in CE+RB or AW+RB supplemented with 0.1% (w/v) yeast extract and 0.5% (w/v) gelatin

Strains	10% CE+RB (U)	Coagulant ratio	20% CE+RB (U)	Coagulant ratio	10% AW+RB (U)	Coagulant ratio	20% AW+RB (U)	Coagulant ratio
DPUA 1461	8.79 \pm 0.27 ^c	0.49 \pm 0.04 ^c	54.65 \pm 1.18 ^a	5.91 \pm 0.26 ^a	20.34 \pm 0.34 ^d	3.85 \pm 0.22 ^a	36.95 \pm 0.42 ^c	4.05 \pm 0.10 ^{b,c}
DPUA 1493	25.22 \pm 5.50 ^a	1.57 \pm 0.30 ^a	18.89 \pm 3.99 ^c	4.65 \pm 1.11 ^b	40.0 \pm 1.33 ^c	3.44 \pm 0.15 ^{a,b,c}	62.73 \pm 1.23 ^a	4.0 \pm 0.25 ^{b,c}
DPUA 1539	19.84 \pm 0.23 ^b	0.89 \pm 0.01 ^b	15.35 \pm 1.76 ^c	2.59 \pm 0.41 ^c	Nd	Nd	27.59 \pm 0.27 ^d	3.62 \pm 0.38 ^c
DPUA 1608	11.54 \pm 0.05 ^c	0.69 \pm 0.01 ^{b,c}	39.87 \pm 0.66 ^b	3.80 \pm 0.11 ^{b,c}	70.96 \pm 4.19 ^a	3.60 \pm 0.24 ^{a,b}	53.66 \pm 0.84 ^b	4.35 \pm 0.40 ^{b,c}
DPUA 1622	Nd	Nd	18.18 \pm 0.27 ^c	3.54 \pm 0.13 ^{b,c}	45.93 \pm 1.75 ^b	3.30 \pm 0.13 ^{b,c}	37.37 \pm 0.29 ^c	4.80 \pm 0.24 ^b
DPUA 1623	17.65 \pm 0.13 ^b	0.78 \pm 0.03 ^b	17.32 \pm 0.58 ^c	3.56 \pm 0.19 ^{b,c}	48.56 \pm 3.63 ^b	3.06 \pm 0.32 ^c	11.02 \pm 0.05 ^g	8.70 \pm 0.49 ^a

Means followed by the same letters did not differ from one another by the Tukey test ($P < 0.05$)/(_) = SD/DPUA = Code of Culture Collection from Federal University of Amazonas/CE+RB = cupuaçu exocarp and rice bran; AW+RB = açaí waste and rice bran.

DPUA 1622 In *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1639 and *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1623, the proteolytic activities were lower 68.7%, 74.14% and 83.60%, respectively, when compared to the highest activity.

These results are in agreement with those described by Cavalcanti et al. (2004), Hashem (2000), Shantsyan et al. (2013) and Yegin et al. (2012) where milk-clotting proteases were produced by *Nozardopsis* sp., *Penicillium oxalicum*, some basidiomycetes and *Mucor mucosus*, respectively, using as fermentation medium mineral solution.

A diversity of agricultural by-products such as bran, exocarp, seeds and others are used as substrate for growth and production of biocompounds especially proteolytic enzymes. Table 3 shows the effect of differ-

ent concentrations of extracts obtained by the mixture of cupuaçu exocarp and rice bran (CE+RB) or açaí waste and rice bran (AW+RB) as culture medium for the production of extracellular milk-clotting proteases by *Aspergillus flavo furcatis* strains. The highest values of milk-clotting activity were observed only in the media supplemented with gelatin and yeast extract: DPUA 1622 in 10% AW+RB (45.93 U), DPUA 1623 in 10% AW+RB (48.56 U), DPUA 1608 in 20% AW+RB (53.66 U), DPUA 1461 in 20% CE+RB (54.65 U), DPUA 1493 in 20% AW+RB (62.73 U) and DPUA 1608 in 10% AW+RB (70.96 U).

Milk-clotting activity was found in all crude extracts of CE+RB and AW+RB with supplementation. However, in 10% CE+RB and 10% AW+RB extracts with supplementation, the proteolytic activity was not detected in DPUA 1639 and DPUA 1622, respectively. Some studies show that protease production by many micro-organisms varies according to the culture medium used and the regulatory effects exerted by carbon and nitrogen sources as well as the fungal strain and other factors (Braskma & Runt, 2008; Hamzah et al., 2009).

Only two strains grown in the extracts without supplementation produced milk-clotting enzymes: DPUA 1461 (5.03 U) and DPUA 1493 (17.94 U), both cultivated in 20% AW+RB. These results indicate the constitutive nature of these enzymes. The use of different substrates commonly affects the production of protease. Casein and gelatin can promote low levels of enzyme activity while more complex substrates such as soya bean meal and wheat increase the proteolytic activity (Sumantha et al., 2006; Yegin et al., 2011). The residues can be substrates of carbon and nitrogen sources, vitamins and minerals which stimulate the growth of micro-organisms and can also act as cofactors of some enzymes (Alves Neto, 2012).

The statistical analysis revealed that the complex media composed by exocarp and seed of Amazonian fruits extracts produced higher levels of microbial coagulants when compared to the values determined in mineral solution (Standard).

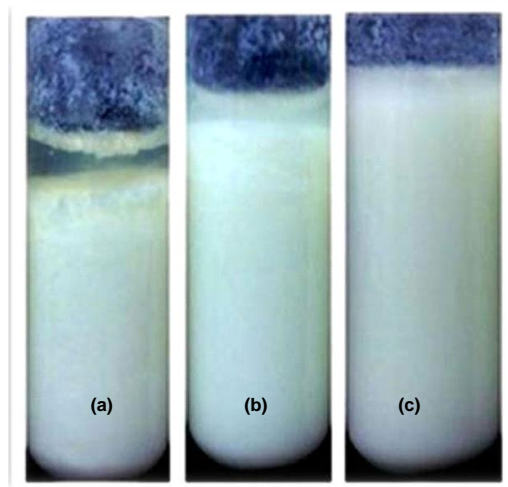


Figure 1 Classification of the samples according to clot and whey formation: (a) Strong milk coagulation, (b) Weak milk coagulation (c) Milk without coagulation.

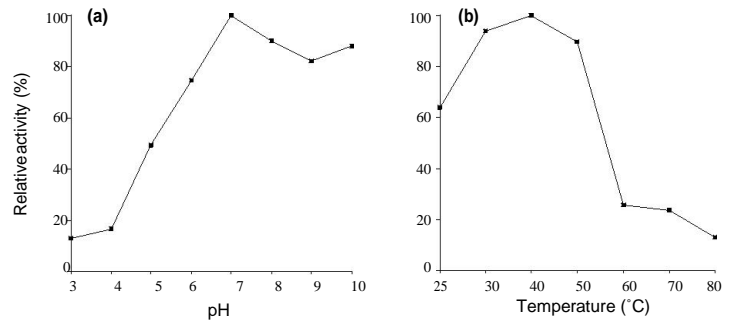


Figure 2 Effect of pH (a) and temperature (b) on milk-clotting activity of *A. flavo furcatis* DPUA 1608 crude extract.

In this research, all the forty-eight milk samples tested in the dotting process were classified following the defined criteria. Thus, strong coagulation was found in 8.3% of the samples (Fig. 1a), 41.7% (Fig. 1b) exhibited weak coagulation and in 50% of the samples, no coagulation was observed (Fig. 1c).

Based only on the values of milk-dotting activity and comparing them with dot formation, was not possible establish a comparative relation. The ratio of proteolytic and milk-dotting activities and the classification of the dot were the main parameters used to select a strain. Therefore, the selected strain for enzyme characterisation was *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, grown in 20% CE+RB with supplementation, which expressed strong coagulation and showed high coagulation ratio (38) (Table 3).

It is known that enzymatic preparations used for milk-dotting exhibit proteolytic activity, and the important thing is to use a preparation with strong milk-dotting activity and extremely low proteolytic activity (coagulant ratio) (Mehrab-Dini et al., 2010).

There are reports that the factors that influence on milk coagulation are pH, calcium contents, phosphorus and temperature. The lower pH and increased temperature helps to reduce dotting time and increased levels of calcium promote a better reaction (Hurley et al., 1999; Shaked-Ur-Rehman et al., 1999; Perry, 2004; Hall et al., 2008). Moreover, the proteolytic enzymes used as coagulants, such as the microbial ones, may have specificity in Phe₁₆₅-Met₁₆₆ connection, but also the specificity of these may be absent or the action can occur in other peptide bond (Messer, 1993; Perry, 2004).

Enzyme characterisation of *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608

Partial characterisation of *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 enzymes is shown in Figs 2a, 3 and 4. The enzymes showed activity at all pH values previously established; however, optimal activity was

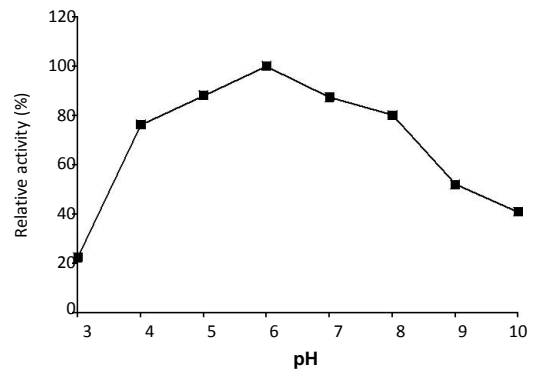


Figure 3 Effect of pH on stability of *A. flavo furcatis* DPUA 1608 milk-clotting enzymes.

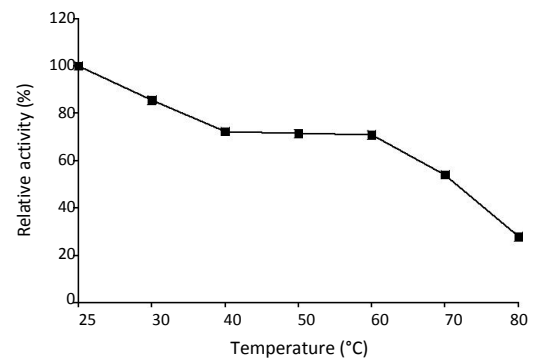


Figure 4 Effect of temperature (°C) on stability of *A. flavo furcatis* DPUA 1608 milk-clotting enzymes.

observed at pH 7.0 (Fig. 2a). These data differ from those reported for coagulant processes from *Aspergillus niger* that showed optimal activity at pH 4.5 (Tichstad et al., 2010) results

The enzyme activity of DRUA 1608 extract was determined in the ranges from 25 to 80 °C (Fig. 2b). Under these conditions, the enzymes showed optimal activity at 40 °C with a decrease of its activity from 50 °C. These data are in agreement with those reported for coagulant proteases from *Bacillus subtilis* which showed optimal activity at 40 and 45 °C (Shieh et al., 2009) and *Mucor mucor* at 40 °C (Yegün et al., 2012).

The effect of pH on the stability of *Aspergillus flavo furcatis* enzymes is shown in Fig. 3

Enzymes were active at all pH ranges evaluated. Milk-clotting proteases stability was maintained between pH 4.0 and 6.0 retaining 76–88% of its activities. From this pH range, the enzyme activity was reduced with fast decreasing from pH 8.0. The thermal stability of these milk-clotting enzymes (Fig. 4) was maintained between 40 and 60 °C, exhibiting 70.9–72.2% of relative activity. In temperatures higher than 60 °C, the activity decreased until 28%. Vishwanata et al. (2010) reported, in the study with *Aspergillus oryzae* M1CC-5341 milk-clotting proteases, stability in the pH range 5.0–8.0. Results reported by Mehrab-Dini et al. (2010), in a study using milk-clotting enzymes of *Thermomucor indica-sudaticae* N31, showed pH stability between 5.0 and 6.0 and thermal stability until 45 °C, exhibiting 60–70% of activity after 1h of incubation at 50 °C.

The enzymes of *Aspergillus flavo furcatis* retained approximately 66.48%, 76.96% and 82.80% in EDTA, PMSF and iodoacetic acid, respectively. However, the crude extract had major influence in the presence of pepstatin, causing 94.72% of inhibition. Therefore, it is suggested the presence of acid proteases in the extract. It is known that the aspartic proteases are commonly used in cheese industry as milk coagulant (Mehrab-Dini et al., 2010; Yegün et al., 2011).

Under the conditions employed, the milk-clotting activities were inhibited in 42.88%, 47.36%, 49.36%, 52.08% and 52.56% by Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Na^{+} and Mn^{2+} , respectively. Cordeiro & Martins (2009) reported in their study, with different metal ions, that the stabilisation of some enzymes can be induced by bivalent ions as Ca, Mn, Zn and Mg. These ions when used in low concentrations can favour the tertiary protein structure promoting the formation of crossed bonds that allow to the protein a major stability.

Conclusions

The strains of *Aspergillus flavo furcatis* produced milk-clotting enzymes in the media made from extracts of cupuaçu, okara and açaí waste both mixed with rice bran with supplementation of yeast extract and gelatin.

According to the established parameters, *A. flavo furcatis* DRUA 1608, grown in 20% CE+RB with supplementation, was the strain selected because its enzymes promoted distinct clot formation and abundant whey and have shown high coagulant ratio. The enzymes have displayed optimal activity at pH 7.0 and 40 °C with predominantly stability between pH 4.0 and 6.0 and thermal stability between 40 and 60 °C. Milk-clotting enzymes were inhibited by pepstatin and showed moderate inhibition by the metal ions tested.

The biochemical properties of the crude enzyme encourage future cheese production experiments and milk-clotting characterisation to check its potential as microbial rennin.

Acknowledgments

The authors wish a special thank to Federal University of Amazonas and to the financial support from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Almeida, I.A.M., Morishima, I., Babiker, E.E. & Mori, N. (2009). Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Stenandrium* seeds. *Food Chemistry*, 116, 395–400.
- Alves-Neto, J.C. (2012). Production of proteases by *Bacillus* sp. in submerged cultivation in the presence of agroindustrial waste (Produção de proteases por *Bacillus* sp. sob cultivo submerso na presença de resíduo agroindustrial). Pp. 99. Recife, Pernambuco (MSc. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Pernambuco).
- Barros, R.M., Ferrera, C.A., Silva, S.V. & Mécate, F.X. (2011). Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by carbon dioxide precipitates by ammonium sulfate. *Enzyme Technology*, 29, 541–547.
- Bon, E.P.S., Pereira, N. J., Gattshalk, L.M.F., Sa-Pereira, P., Roseiro, J.C. & Ferrera, M.A. (2008). Bioprocesses in enzymes production (Biotecnologias para produção de enzimas). In: *Enzymes in Biotechnology: Production, Applications and Market (Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado)* (edited by E.P.S. Bon, M.A. Ferrera & M.L. Corvo). Pp. 506. Editora Interciência, Portugal: Rio de Janeiro.
- Brashear, M. & Punt, P.J. (2008). *Aspergillus* as a cell factory for protein production: controlling protease activity in fungal production. In: *Aspergillus: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods* (edited by G.H. Goldman & S.A. Omani). Pp. 441–455. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Cavalcanti, M.T.H., Teixeira, M.S.F., Lima-Filho, J.L. & Porto, A.L.F. (2004). Partial purification of a new milk-clotting enzyme produced by *Nocardia* sp. *Bioresour. Technol.*, 93, 29–35.
- Cordeiro, C.A.M. & Martins, M.L.L. (2009). Production of a polygalacturonase by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzyme. *Genética e Tecnologia de Alimentos*, 29, 135–141.
- Egito, A.S., Grudet, J.M., Laguna, L.E. et al. (2007). Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and alfalfa seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. *International Dairy Journal*, 17, 816–825.
- Grodenovic, M.M., Burazer, L. & Garovic, B. (2013). Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. *International Dairy Journal*, 32, 46–52.

- Hällén, E. (2008). Coagulation Properties of Milk: Association with Milk Protein Composition and Genetic Polymorphism. Uppsala, Sweden: Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Food Science.
- Hanzah, H.M., Ali, A.H.I. & Hassan, H.G. (2009). Physiological regulation of protease and antibiotics in *Penicillium* sp. using submerged and solid state fermentation techniques. *Journal of Engineering Science and Technology*, 4, 81-89.
- Hashem AM. (1999). Optimization of milk-clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour Technol*, 70, 203-207.
- Hashem AM. (2000). Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour Technol*, 75, 219-222.
- Hashim MMH, Iqbal, M.F., Xiaohong C. & Mingheng B. (2011). Impact of processing conditions on the milk-clotting activity of crude protease extracted from Chinese ginger. *International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, Vol. 9, Pp. 327-335.
- Hurley, M.J., O'Driscoll, B.M., Kelly, A.L. & McSweeney, P.L.H. (1999). Novel assay for the determination of residual coagulant activity in cheese. *International Dairy Journal*, 9, 553-558.
- Klich, M.A. & Pitt, J.I. (1988). A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing. Pp. 16.
- Leighton, T.J., Dai, R.H., Warren, R.A.J. & Kelln, 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.
- Marhab-Dini, C., Gomes, E., Bazzo, M. & Da Silva, R. (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicus* (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicus* (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicus*)). *Food Chemistry*, 120, 87-93. Minitab (2010). Minitab statistical software LEAD Technologies, Inc. Version 16.0, 2010.
- Perry, K.S.P. (2004). Cheese chemical, biochemical and microbiological aspects. *Quimica Nova*, 27, 293-300.
- Reper, K.B. & Fennell, D.I. (1977). *The Genus Aspergillus*. Pp. 686. New York, NY: Robert E. Krieger Publishing Company.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Sakas, G. & Pandey, A. (2006). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 2689-2694.
- Stekel-Ur-Rehman, F., Fenev, E.P., McSweeney, P.L.H. & Fox, P.F. (1999). Inhibition of residual coagulant in cheese using pepstatin. *International Dairy Journal*, 9, 987-992.
- Stantsyan, M., Dzhiriyeva, T., Kolesnikov, B. & Danisova, N. (2013). Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopus* basidial mushroom LWT - *Food Science and Technology*, 53, 1-5.
- Shih, C.J., Thi, L.A.P. & Shih, I.L. (2009). Milk-clotting enzymes produced by cultured *Bacillus subtilis* natto. *Biotechnological Engineering Journal*, 43, 85-91.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patil, A.K., Larroche, C. & Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 541-549.
- Sumantha, A., Larroche, C. & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 211-220.
- Teixeira, M.F.S. (2012). Linhagens amazônicas de *Aspergillus flavo-furcatis* produção de protease com atividade coagulante em matriz sólida (Amazonian strains of *Aspergillus flavo-furcatis* protease production with milk-clotting activity in solid state matrix). Post-Doctorate Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFPE Recife PE.
- Teixeira, M.F.S., Alecrim, M.M., Palheta, R.A., Silva, T.A. & Porto, A.L.F. (2012). Enzimas de linhagens de *Aspergillus flavo-furcatis*: Novas fontes proteolíticas DA BIODIVERSIDADE amazônica. In: Biodiversidade Amazônica: Caracterização - Ecologia e Conservação - (edited by J.L. Marcon, M. Menin, M.G.P. Araujo & T. Hrbek). Manaus: Edua.
- Tichota, D.M., Lopes, F.C., Silva, L.A.D. & Brandelli, A. (2010). Optimization of *Aspergillus niger* protease production (Otimização da produção de protease de *Aspergillus niger*). XI Scientific Initiation. Pontifícia Catholic University of Rio Grande do Sul-FUCRS.
- Tita, M., Kéney, O., Tita, O. & Remzan, M. (2013). The influence of the degree of cheese maturation used as raw materials in the manufacture process traditional cheese emulsifying salts consumption. *Romanian Biotechnological Letters*, 18, 6521-6527.
- Vishwanata, K.S., Rao, A.G.A. & Singh, S.A. (2010). Production and characterization of milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1849-1859.
- Vissar, S. (1993). Symposium proteolytic enzymes and cheese ripening. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*, 76, 329-350.
- Yéjin, S., Fernández-Lahore, M., Silgado, A.J.G., Guene, U., Goksungur, Y. & Tari, C. (2011). Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 949-960.
- Yéjin, S., Goksungur, Y. & Fernández-Lahore, M. (2012). Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucosus* DSM 809. *Food Chemistry*, 133, 182-189.