



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL



COAGULANTE DE *Aspergillus* PARA ELABORAÇÃO DE QUEIJO COM
BIOMASSA DE MACROFUNGO

MIRCELLA MARIALVA ALECRIM

MANAUS-AM

2017

MIRCELLA MARIALVA ALECRIM

**COAGULANTE DE *Aspergillus* PARA ELABORAÇÃO DE QUEIJO COM
BIOMASSA DE MACROFUNGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal-
BIONORTE para a obtenção do título de Doutora em
Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

Área de Concentração: Biotecnologia

Linha de Pesquisa: Bioprospecção e desenvolvimento de bioprocessos e bioprodutos

MANAUS-AM

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A366c Alecrim, Mircella Marialva
Coagulante de Aspergillus para elaboração de queijo com
biomassa de macrofungo / Mircella Marialva Alecrim. 2017
111 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Coagulante microbiano. 2. Proteases. 3. Fermentação
submersa. 4. Aspergillus flavo furcatis. I. Teixeira, Maria Francisca
Simas II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
Universidade Federal do Amazonas-UFAM
(Presidente/Orientadora)

Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
(Titular)

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia-INPA
(Titular)

Profa. Dra. Kilma Cristiane Silva Neves
Instituto Federal do Amazonas-IFAM Campus Zona Leste
(Titular)

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

O Menestrel

Um dia você aprende...

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se. E que companhia nem sempre significa segurança. Começa a aprender que beijos não são contratos e que presentes não são promessas. Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança. Aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo. E aprende que, não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende que falar pode aliviar dores emocionais. Descobre que se leva anos para construir confiança e apenas segundos para destruí-la... E que você pode fazer coisas em um instante das quais se arrepende pelo resto da vida. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

...

Aprende que, ou você controla seus atos, ou eles o controlarão... e que ser flexível não significa ser fraco, ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem, pelo menos, dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.

...

Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém... Algumas vezes você tem de aprender a perdoar a si mesmo. Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.

Aprende que o tempo não é algo que possa voltar. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, em vez de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.”

William Shakespeare

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

AGRADECIMENTOS

O primeiro agradecimento é para Deus. Ele que abençoa e estende “suas mãos” a todo aquele que O clama. Obrigada Senhor por todas as bênçãos concedidas.

A meu pai lindo Marco Antônio e minha mamis Mariléa que é incansável em suas orações; ao meu padrasto Stélio; meus irmãos Brenda, Beatriz e Tiago; minha “voivó” Maria do Rosário; tias mais que queridas Maria Auxiliadora, Maria Gorete, Maria Nazaré, Amelina, Alciléia e Grace; ao meu tio Walter que é o preferido de todos; tio Marcos; primas Tati e Jéssica; primos Rogério, Thiago e Bruno; Luigie, Ana Luiza, Guilherme; e a todos da minha super grande família.

Em memória póstuma à Maria Alice Alecrim, minha tia-mãe-madrinha-amiga, que me guiou para o caminho em que pude encontrar meu sucesso profissional. Saudades é o que mais sinto. Te amo.

À minha orientadora, Maria Francisca Simas Teixeira, exemplo de profissional. A você, Prof, dedico minha formação. Obrigada por me acolher e por seus ensinamentos preciosos.

À minha melhor amiga, Ana Rita. Muito obrigada por sua amizade mais que sincera. Lembre-se: a amizade não se restringe à convivência física, mas está enraizada no coração. Se eu ando com ele, ando com você também. Agradeço também à tia Ana Maria por todo o apoio como amiga e mãe em todos os momentos nestes últimos anos.

Aos meus queridos amigos e companheiros de laboratório: Nellyzita, farmacêutica Bianca, Saloh, Lari S., Lari P., Raiane, Dib, Paulo, Taci, Lori, Adrya, Ro, Kilma, Valery, Felipe Cruz e Fabiano.

Aos amigos de vida Maycon, Juliana, Eduardo, Rebeca, Sérgio, Juan...

À minha linda amiga Leila Feitosa, mãe do Bonito. Ela, conhecedora da mente e amiga que conquistei e tenho imenso carinho. Ele, o nerd que me salvou em vários momentos. Obrigada.

Aos professores que contribuíram com o desenvolvimento do projeto: Antônio Fábio, Valéria Ebinuma, João Vicente, Ormezinda Celeste, Rosana Palheta, Kilma Neves, Marne Vasconcellos, Leilane de Souza, Ila Maria Aguiar.

À super Lúcia Pontes por sua paciência e profissionalismo ao sempre se dispor em ajudar.

E a todos aqueles que, de certa forma, contribuíram, deram força, apoio, puxões de orelha e conselhos valiosos para chegar aonde cheguei.

Mais uma vez... Obrigada. Muito obrigada mesmo.

“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, se não tivesse amor, nada seria”.

I Coríntios 13

RESUMO

As proteases coagulantes do leite são importantes enzimas utilizadas na indústria de laticínios. Devido à crescente demanda para a produção de queijo associada ao aumento do preço do coalho animal e a questões culturais, as fontes coagulantes microbianas são alternativas ecologicamente viáveis. Esta pesquisa foi realizada para investigar a produção de proteases coagulantes por *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 e elaboração de queijo adicionado de biomassa de cogumelo comestível. *Aspergillus* foi reativado, autenticado e avaliado quanto à produção de aflatoxinas em meio sólido. Na escolha do meio sólido para cultivo do inóculo foi utilizado ágar glicose, peptona e extrato de levedura (SAB+GLI); ágar sacarose, peptona e extrato de levedura (SAB+SAC); ágar batata e glicose (BDA+GLI); e ágar batata e sacarose (BDA+SAC). Para selecionar o meio líquido para obtenção do inóculo e para produção do coagulante por fermentação submersa, os cultivos foram realizados em solução salina (MA01) formulada, separadamente, com glicose 1% (p/v) (MAGLi) e; sacarose 1% (p/v) (MASac), respectivamente. Ao término da fermentação, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo. Nos meios de cultura selecionados foi realizada a produção de enzimas coagulantes para avaliar a influência das fontes de carbono e nitrogênio, idade e tamanho do inóculo, tempo de fermentação, temperatura, agitação e pH inicial do meio. O extrato bruto selecionado, de acordo com a atividade coagulante, foi caracterizado quanto ao pH e temperatura (atividade ótima e estabilidade) e efeito de íons metálicos e inibidores. Depois do processo de caracterização esse extrato bruto foi avaliado quanto à citotoxicidade *in vitro* com o teste em fibroblastos humanos e sangue de carneiro comercial. O queijo foi elaborado com o coagulante caracterizado e adicionado de biomassa de cogumelo comestível (*Pleurotus ostreatoroseus*). Ao término do processamento, o queijo foi analisado quanto à qualidade nutricional e microbiológica. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados revelaram que *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 expressou fenótipo típico da espécie e não sintetizou aflatoxinas em meio sólido. BDA+SAC e MA01, respectivamente, foram os meios de inóculo de cultivo submerso que promoveram maiores atividades coagulantes do leite. As condições que influenciaram na produção das enzimas coagulantes foram: inóculo com 5 dias de cultivo em meio sólido e, no meio de fermentação, suspensão celular de 10^6 esporos/mL de meio; pH 7; 3 dias de cultivo; 30°C; 150 rpm. As melhores fontes de carbono e nitrogênio foram amido 0,1% (p/v) e peptona 0,1% (p/v), respectivamente. As proteases apresentaram atividade ótima em pH 7, a 50°C. Elas foram estáveis até 40°C e em pH 5 ao 9. Os íons Zn^{2+} e Cu^{2+} promoveram a maior redução da atividade e ácido iodoacético foi o inibidor de maior interferência. As enzimas coagulantes do leite foram mais ativas em pH 7, 45°C e se mantiveram estáveis em pH 5 a 9, de 25 a 55°C. Os íons Zn^{2+} e K^+ promoveram aumento da atividade e novamente ácido iodoacético foi o inibidor de maior interferência, caracterizando as enzimas como cisteína proteases. Tais enzimas não expressaram toxicidade. A análise microbiológica está de acordo com a legislação vigente. Os queijos produzidos apresentaram aumento do conteúdo de carboidratos, proteínas, cinzas e umidade associados à concentração do basidioma adicionado na massa do queijo. O aumento da concentração do cogumelo promoveu a redução do conteúdo de lipídeos e valor energético total. *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 tem potencial como coagulante de fonte microbiana para aplicação na fabricação de queijo.

Palavras-chave: Coagulante microbiano, proteases, fermentação submersa, *Aspergillus flavo furcatis*.

ABSTRACT

Milk-clotting proteases are important enzymes used in the dairy industry. Due to the increasing demand for cheese production, the increase in the price of animal rennet and cultural issues, the search for alternative coagulating sources, among them microbial, is necessary. The objective of this work was to investigate the production of coagulant proteases by *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 by the fermentation technology for the elaboration of cheese with macrofungo biomass. The culture was reactivated, authenticated and evaluated for the production of aflatoxins in solid medium. The inoculum medium was selected using SAB+GLI, SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC. The liquid fermentation medium was selected from a base saline solution (MA01). In the other media, 1% (w/v) glucose (MAGLi) and 1% (w/v) sucrose (MASac), respectively, were added. At the end of the fermentation, the biomass was separated from the crude extract by vacuum filtration. The medium and inoculum in which the best milk coagulant activity was determined were used to optimize the production of coagulant enzymes: carbon and nitrogen sources, inoculum age and size, fermentation time, temperature, agitation and initial pH of the medium. The enzymes of the selected crude extract were characterized as to pH and temperature (optimum activity and stability) and effect of inhibitors. *In vitro* cytotoxicity testing was also performed with the test on human fibroblasts and commercial sheep blood. At the end of the characterization, a cheese supplemented with mushroom biomass (*Pleurotus ostreatoroseus*) was elaborated and the physical-chemical and microbiological analyzes of the product were determined. The culture medium of the inoculum and fermentation medium that promoted higher milk coagulant activities were BDA+SAC and MA01, respectively. The milk coagulant enzymes were best produced in submerged fermentation medium according to the following parameters: age (5 days) and inoculum size (10^6 spores per ml medium), initial pH of the medium (pH 7), fermentation (3 days), fermentation temperature (30°C), stirring (150 rpm), carbon source (0.1% (w/v) starch and nitrogen (peptone 0.1% (w/v))). According to the proteolytic activity, the enzymes presented optimum activity at pH 7 at 50 °C. They were stable up to 40 °C and pH 5 to 9. The Zn^{2+} and Cu^{2+} ions promoted the greatest reduction of activity and iodoacetic acid was the inhibitor of higher interference. For the milk coagulant activity, the enzymes were more active at pH 7 and temperature of 45 °C. They remained stable from pH 5 to 9 and temperature from 25 to 55 °C. Zn^{2+} and K^+ promoted increased activity and again iodoacetic acid was the inhibitor of greater interference, characterizing the enzymes as cysteine protease. There was no detection of toxicity according to the tests. The microbiological analysis is in agreement with the vigent legislation. The cheeses presented increasing in the amount of carbohydrates, protein, ashes and humidity according to the increasing of mushroom concentration. However, was also observed that the increasing in mushroom concentration promoted the decreasing in the amount of lipids and also the total energy *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 has potential as microbial source of milk-clotting enzymes and can be used in dairy industry to cheese manufacturing.

Keywords: Microbial coagulant, proteases, submerged fermentation, *Aspergillus flavo furcatis*.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
Referências bibliográficas.....	16
CAPÍTULO 1: Revisão da literatura.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Proteases: Características gerais.....	18
2.2. Aplicação das proteases na indústria de laticínios.....	20
2.3. Coagulação do leite.....	20
2.3.1. Proteases coagulantes do leite.....	20
2.3.2. Fontes microbianas de proteases coagulantes.....	21
2.3.3. Suplementação de produtos derivados do leite.....	22
2.3.3.1. Cogumelos comestíveis.....	22
2.4. Fermentação em estado líquido.....	24
Referências bibliográficas.....	26
CAPÍTULO 2: Objetivos e Material e Métodos.....	32
3. OBJETIVO GERAL.....	32
3.1. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1. Micro-organismo.....	34
4.2. Teste de aflatoxina em meio sólido.....	34
4.3. Fermentação submersa.....	36
4.3.1. Preparação do inóculo.....	36
4.3.2. Meio de fermentação.....	36
4.4. Determinação da atividade proteolítica.....	37
4.5. Determinação da atividade coagulante do leite.....	37
4.6. Determinação dos parâmetros que influenciam na produção de proteases.....	38
4.6.1. Determinação da influência da idade e tamanho do inóculo.....	39
4.6.2. Avaliação da influência do tempo e temperatura de fermentação, velocidade de agitação e pH inicial do meio.....	40
4.6.3. Determinação do efeito de fontes de carbono e nitrogênio.....	40
4.7. Caracterização enzimática parcial.....	41
4.7.1. Enzimas proteolíticas.....	41
4.7.1.1. Determinação do efeito da temperatura e pH na atividade das enzimas proteolíticas.....	41
4.7.1.2. Determinação do efeito da temperatura e pH na estabilidade das enzimas proteolíticas.....	41
4.7.1.3. Determinação do efeito de íons metálicos e inibidores na atividade das enzimas proteolíticas.....	42
4.7.2. Proteases coagulantes do leite.....	42
4.7.2.1. Determinação do efeito da temperatura e pH na atividade das proteases coagulantes do leite.....	42

4.7.2.2. Determinação do efeito da temperatura e pH na estabilidade das proteases coagulantes.....	42
4.7.2.3.Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade coagulante do leite.....	43
4.8. Teste de toxicidade <i>in vitro</i>	43
4.8.1.Toxicidade em fibroblastos humanos.....	43
4.8.2. Hemólise.....	44
4.9. Elaboração do queijo.....	46
4.10. Análise centesimal do queijo.....	47
4.11. Análise microbiológica do queijo.....	47
4.12. Análise estatística dos dados.....	47
Referências bibliográficas.....	47
CAPÍTULO 3: Resultados e Discussão	
Artigo 1: “ <i>Aspergillus flavo furcatis</i> : aflatoxin test and milk-clotting protease production in submerged and solid state fermentation”.....	49
CAPÍTULO 4: Resultados e Discussão	
Artigo 2: “Caracterização de enzimas coagulantes do leite bovino produzidas por <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608”.....	57
CAPÍTULO 5: Resultados e Discussão	
Artigo 3: “Elaboração de queijo com biomassa de cogumelo comestível utilizando enzimas de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608”.....	96
CONCLUSÕES	111

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	
Figura 1. Esquema de uma ligação peptídica sendo clivada por hidrólise.....	18
Figura 2. Representação do tipos de clivagem das proteases.....	19
Figura 3. <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	24
CAPÍTULO 2	
Figura 4. Reativação da cultura de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	34
Figura 5. Meios sólidos para detecção de aflatoxina	35
Figura 6. Meios de fermentação submersa: MA01, MaGli e MaSac.....	36
Figura 7. Atividade coagulante do leite.....	38
Figura 8. Fermentação submersa.....	39
Figura 9. Etapas do teste de hemólise em sague de carneiro comercial.....	45
Fluxograma 1.. Etapas da produção do queijo com coagulante de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608 e adição de biomassa de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	46
CAPÍTULO 3	
Figure 1. Results of aflatoxin production by ammonia vapor test.....	53
Figure 2. Classification of the samples according to clot and whey formation.....	54
CAPÍTULO 4	
Figura 1. Características macroscópicas (A e B) e microscópicas (C e D) de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> cultivado em meio Czapek.....	67
Figura 2. Classificação da coagulação do leite (A) coagulação forte (B) coagulação fraca.....	69
Figura 3. Efeito do pH na atividade (A) e estabilidade (B) das enzimas coagulantes do leite de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	89
Figura 4. Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) das enzimas coagulantes do leite de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	90
CAPÍTULO 5	
Figura1. Atividade hemolítica qualitativa do extrato de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608 em diferentes concentrações utilizando sangue de carneiro comercial.	104
Figura 2. Avaliação do efeito citotóxico do extrato bruto de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608 frente a fibroblastos MRC-5 humanos.....	105
Figura 3. Queijos produzidos com coagulante de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608 e adicionados de biomassa de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	106

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 4

Gráfico 1. Efeito da idade do inóculo na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	68
Gráfico 2. Efeito do tamanho do inóculo na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	70
Gráfico 3. Efeito do tempo de fermentação na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	72
Gráfico 4. Efeito da temperature de fermentação na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	74
Gráfico 5. Efeito da agitação na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	76
Gráfico 6. Efeito do pH do meio de fermentação na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	78
Gráfico 7. Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na atividade proteolítica (A e C) e coagulante do leite (B e D) das enzimas de <i>Aspergillus falvo furcatis</i> DPUA 1608.....	81
Gráfico 8. Efeito do pH e a temperature na atividade (A e C, respectivamente) e estabilidade (B e D) enzimas proteolíticas de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	82
Gráfico 9. Efeito do pH na ativiidade (A) e estabilidade (B) das enzimas coagulantes do leite de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	84
Gráfico 10. Efeito da temperature na ativiidade (A) e estabilidade (B) das enzimas coagulantes do leite de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	89
Gráfico 11. Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) das enzimas coagulantes do leite de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608.....	90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Meios de fermentação submersa a partir de solução mineral base..... 37

Tabela 2. Preparação do teste para a determinação da atividade hemolítica em tubos de ensaio..... 44

CAPÍTULO 3

Table 2. Protease activity (U/mL), milk-clotting activity (U), coagulant ratio (R) and clot classification of *A. flavo furcatis* DPUA 1608 enzymes produced in submerged and solid-state fermentation..... 54

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Efeito de íons e inibidores na atividade proteolítica das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608..... 86

Tabela 2. Efeito de íons e inibidores na atividade coagulante do leite das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608..... 91

CAPÍTULO 5

Tabela 2. Teste de atividade hemolítica do extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 em sangue comercial de carneiro..... 104

Tabela 3. Análise centesimal dos queijos preparados com as enzimas coagulantes do leite de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 107

1. INTRODUÇÃO

O queijo é um produto lácteo nutritivo de interesse econômico significativo. Cerca de um terço de toda a produção de leite é consumido por esta forma. Produtos da indústria de laticínios enriquecidos com compostos bioativos têm atraído crescente interesse de consumidores por agregarem valor nutricional ao alimento (NEVES, 2014; LEMES et al., 2016).

A escolha do coagulante é uma etapa fundamental no processo de elaboração do queijo. As enzimas presentes no agente de coagulação apresentam diferentes intensidades de ação e mecanismos de atividade proteolítica, o que interfere na degradação das proteínas do leite e influencia na característica do produto final (SILVA et al., 2009).

Proteases são enzimas produzidas por uma ampla variedade de micro-organismos, entre eles os fungos. Elas atuam em funções metabólicas essenciais e possuem características que as tornam importantes para aplicações industriais como, por exemplo, na fabricação de queijo. Entre os coagulantes microbianos disponíveis comercialmente destacam-se aqueles produzidos por espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, benéficos por serem geralmente considerados seguros ou GRAS (Generally Regarded as Safe) (CHUTMANOP e PENJIT, 2008; MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2016; MONTEIRO et al. 2005; NISHIWAKI et al., 2009; SAVITHA et al., 2011).

Aspergillus flavo furcatis é um fungo filamentosso anamórfico que têm apresentado potencial como produtor de enzimas proteolíticas. Um estudo recente reportou a produção de proteases coagulantes por esta espécie em fermentação submersa utilizando como substratos casca de cupuaçu e semente de açaí, ambos suplementados com farelo de arroz (ALECRIM et al., 2015).

Para produção de proteases coagulantes de origem microbiana são utilizadas as tecnologias da fermentação sob cultivo submerso e em estado sólido. Na fermentação submersa, ou em estado líquido (SmF), o processo é conduzido através do crescimento microbiano na presença de excesso de água. As vantagens da produção de enzimas pela fermentação em estado líquido ocorrem devido ao melhor monitoramento das condições estabelecidas como luz, temperatura, pH do meio, agitação e adição de fontes de carbono e nitrogênio (BON et al., 2008; SINGHANIA et al., 2010).

Referências bibliográficas

ALECRIM, M. M.; PALHETA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, I. M. A. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus falvo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. *International Journal of Food Science and Technology* (50) 151-157. 2015.

BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N.; GOTTSALK, 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.

CHUTMANOP, S. C.; Y. C., PENJIT, S. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates Jarun. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (83) 1012–1018. 2008.

LEMES, A. C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; RAZYCKI, S.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 in cream cheese development. *LWT-Food Science and Technology* 66, 217-224. 2016.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V.; VILLA-TANACA, L.; ANDUCHO-REYES, M. A.; MERCADO-FLORES, Y. Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Rev. Iberoame. de Micol.* 2016.

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 na extracellular protease from *Nocardiosis* sp. fermentation broth. *Biochemical Engineering Journal.* (24) 87-90. 2005.

NEVES, K. C. S. Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia. Tese. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Renorbio. 99p. 2014.

NISHIWAKI, T.; ASANO, S.; OHYAMA, T. Properties and substrate of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* (107) 605-609. 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 proteases obtidas por *Gliocadium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* (3) 28-41. 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production tehcnologie using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and microbial Technology* 46, 541-549. 2010.

CAPÍTULO 1

Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Proteases: características gerais

Enzimas proteolíticas, proteases ou peptidases são hidrolases que catalisam a quebra das ligações peptídicas de substrato proteico resultando em peptídeos e/ou aminoácidos (Figura 1). A proteólise é um processo importante para o metabolismo. Nos fungos, por exemplo, ela está envolvida na formação e germinação de esporos, na patogênese e em processos regulatórios (MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2016).

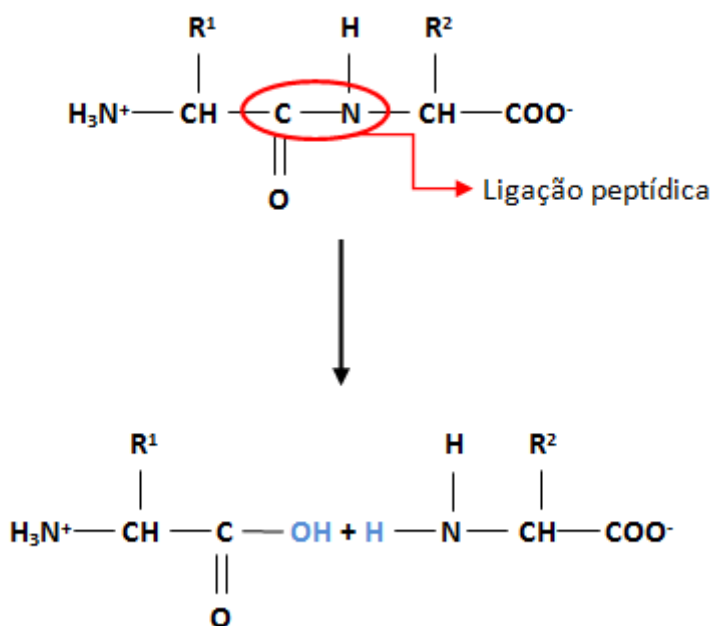


Figura 1. Esquema de uma ligação peptídica sendo clivada por hidrólise.

A história das enzimas proteolíticas é conhecida desde o fim do século XVIII. Atualmente, pesquisas têm reportado várias aplicações biotecnológicas destes catalisadores na síntese de peptídeos, processamento de alimentos e ração animal, processamento de couros e como aditivos de detergentes. Por isso, elas são consideradas as mais significativas enzimas industriais com venda anual de cerca de US\$ 3 bilhões (CHEN et al., 2016; HOMAIEI et al., 2016; YOUNES et al., 2015).

As proteases são divididas em dois grupos de acordo com seu mecanismo de ação: endopeptidases e exopeptidases. As primeiras hidrolisam as ligações ao centro ou partes mais internas da cadeia polipeptídica enquanto que as exopeptidases atuam próximas às

extremidades da cadeia (Figura 2). Alternativamente, também podem ser classificadas de acordo com o pH ótimo como ácidas, neutras e alcalinas e ainda classificadas em cisteína, serina, metalo e aspártica protease (HOMAEI et al., 2016).

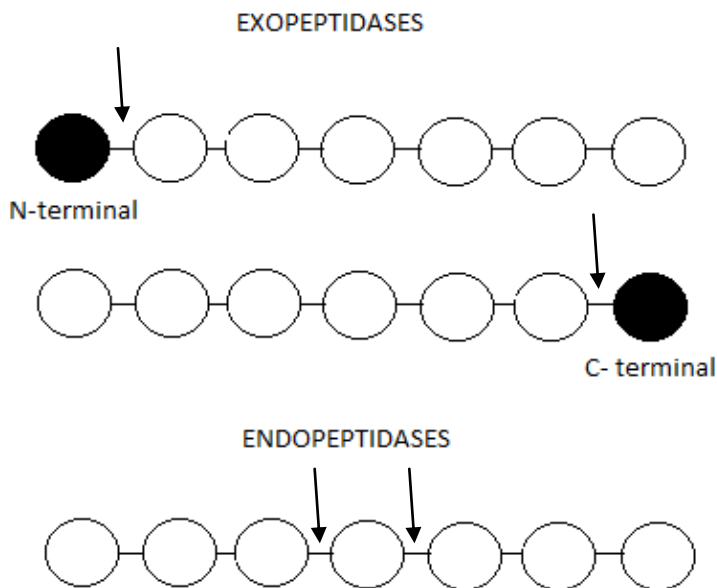


Figura 2. Representação dos tipos de clivagem das proteases.

O pH é um fator muito importante que interfere na atividade enzimática. Valores extremamente altos ou baixos influenciam em completa perda de atividade. As proteases ácidas possuem atividade ótima de pH variando de 2,0 a 4,0. Elas têm aplicação na indústria de laticínios para a fabricação de queijo, no amaciamento de carnes, na produção de alimentos fermentados e também em limpeza de compostos ácidos (RAO e NARASU 2007; THYS, 2004; TIWARI et al., 2014).

Proteases neutras possuem importante papel no processamento de molho de soja e seus derivados. O tratamento enzimático com elas resulta em hidrolisados com alta solubilidade, bom rendimento protéico e baixa acidez. Além disso, as proteases neutras são aplicadas em processos de panificação, modificação de proteínas, tratamento de couro e na indústria farmacêutica (SOUZA et al., 2015; SUMANTHA et al., 2006).

Já as proteases alcalinas são biocatalisadores muito utilizados na indústria de detergentes, amaciamento de couro, indústria de seda, modificação de alimentos, preparação de cerveja, para reagentes de diagnósticos, síntese de peptídeos, recuperação de

prata de filmes de raios-X e fotografia, preparação de fertilizantes orgânicos e tratamento de resíduos (RATHOD e PATHAK, 2016).

2.2. Aplicação das proteases na indústria de laticínios

O leite, matéria-prima da indústria de laticínios, é a secreção produzida por mamíferos com a finalidade de nutrir seus filhotes. É rico em proteínas, lipídios, açúcares, vitaminas e minerais, os quais são necessários para seu crescimento e desenvolvimento. Por ser uma excelente fonte de energia e nutrientes, os leites de vaca, búfala, cabra e ovelha têm sido utilizados há milênios na dieta humana (COSTA et al., 2009).

O leite é constituído por 87% de água e 13% de elementos sólidos distribuídos entre lipídios (3,9%), proteínas (3,4%), lactose (4,8%), vitaminas e minerais (0,8%), elementos responsáveis pelo valor nutritivo e pelas propriedades como sabor e cor (REIS *et al.*, 2012). Dois tipos de proteínas constituem o leite: as globulares solúveis no soro e as caseínas, presentes em suspensão coloidal estável de agregados conhecidos como micelas de caseínas. Os tipos de caseína juntos somam cerca de 80% das proteínas do leite bovino (HORNE e BANKS, 2004).

A hidrólise enzimática da caseína é realizada por endopeptidases do grupo aspartil-protease (EC 3.4.23), hidrolisando a ligação peptídica entre a Phe (105) e a Met (106) da K-caseína que provoca a desestabilização da micela com consequente precipitação da caseína do leite. A precipitação proteica da caseína é amplamente utilizada na produção de queijos, sendo as proteases provenientes do estômago de bovinos jovens as mais utilizadas neste processo industrial (CAMPOS et al., 2010).

Os estudos do processo de coagulação do leite são importantes na fabricação e maturação de queijos por serem essenciais para o bom manuseio das condições experimentais ótimas dentro da matriz do queijo e, portanto, para a formação e intensidade de seu aroma, por exemplo. Um coagulante adequado para a produção de queijo é caracterizado por apresentar alta especificidade caseinolítica e baixa atividade proteolítica (BRUTI et al., 2012).

2.3 Coagulação do leite

2.3.1. Proteases coagulantes do leite

A coagulação do leite é a etapa fundamental na fabricação de queijo e outros produtos lácteos. As enzimas coagulantes mais específicas conhecidas são aquelas de

origem animal provenientes do estômago de bezerros antes do desmame, também conhecida como quimosina (YEGIN et al., 2012).

Contudo, devido à crescente produção mundial e consumo de queijo, juntamente com o aumento do preço do coalho animal, a investigação de coagulantes do leite capazes de substituir a quimosina na fabricação de produtos lácteos se faz necessária. Além disso, a procura destas novas fontes coagulantes do leite torna-se ainda maior por fatores relacionados a restrições alimentares, dietas especiais e questões religiosas (ESPOSITO et al., 2016).

Muitas enzimas proteolíticas têm a capacidade de promover a coagulação do leite. No entanto, diferentes enzimas têm diferentes mecanismos de ação para quebrar a ligação específica da k-caseína e de outras ligações não específicas das proteínas do leite. Geralmente, quando o coalho ou outras enzimas coagulantes são adicionados ao leite, após certo período, inicia-se o processo de coagulação que resulta na formação de um gel firme e tridimensional com liberação do soro (NARWAL et al., 2016).

Proteases coagulantes do leite são geralmente obtidas por fontes animais, vegetais e microbianas. Apesar da variedade de proteases microbianas disponíveis, o uso delas em escala industrial é ainda limitado devido a altos custos de produção e o fato de suas atividades serem restritas a uma faixa de características bioquímicas. Portanto, estudos envolvendo outras fontes de enzimas microbianas são importantes (LEITE JÚNIOR et al., 2014; NOVELLI et al., 2016).

2.3.2. Fontes microbianas de proteases coagulantes

Proteases coagulantes de origem microbiana, dentre elas as de fungos filamentosos, têm atraído atenção de biotecnologistas por crescerem em substratos líquidos e sólidos de baixo custo e secretar grandes quantidades de enzimas no meio de cultura (SOUZA et al., 2015).

Os fungos filamentosos são utilizados em muitos processos industriais para a produção de enzimas e outros metabólitos. Dentre as vantagens oferecidas para a produção de enzimas por fungos podem ser citadas a facilidade de recuperação após o processo fermentativo, pois geralmente são extracelulares, resultando em elevado rendimento e produtividade (GERMANO et al., 2003; VISHWANATHA et al., 2009).

Nas últimas décadas, centenas de fungos mostraram a capacidade de produzir enzimas coagulantes do leite. A maioria delas foi caracterizada como proteases aspárticas,

contudo, existem exceções de proteases com características neutras (HANG et al., 2016). Espécies do gênero *Aspergillus*, como *Aspergillus niger* tem uma longa tradição de ser considerada segura para uso na produção de enzimas e de ácidos orgânicos. Muitos de seus produtos já foram listados como GRAS, sigla em inglês que significa “Geralmente Reconhecido como Seguro” (CASTRO et al., 2014).

Aspergillus flavo furcatis (ALECRIM et al., 2015), *Geotricum candidum* (BOUTROU & GUENGUEN, 2005), *Termitomyces clypeatus* (MAJUMDER et al., 2015), *Coprinus lagopides* (SHAMTSYAN et al., 2014), *Mucor mucedo* (YEGIN et al, 2011; AYANA et al., 2015), *Thermomucor indicae-seudaticae* (MERHEB-DINI et al., 2012; SILVA et al., 2014), *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae*, *Irpex lactics* (VASCONCELOS et al., 2004), *Aspergillus tamarii*, *Penicillium pinophilum* (BENLOUNISSI et al., 2014), *Aspergillus niger* (BENSMAIL et al., 2015), *Mucor pusillus* (NOUANI et al., 2011), *Aspergillus oryzae* (PALLAVI et al, 2012), *Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis* (SUN et al., 2014) são exemplos de algumas espécies de fungos produtores de enzimas capazes de coagular o leite.

2.3.3. Suplementação de produtos derivados do leite

O mercado mundial de enzimas teve como expectativa, gerar vendas de \$8 bilhões em 2015. Destes, \$1,3 representam o segmento de bebidas e alimentos, com maior ocorrência na indústria de laticínios. O crescente mercado e aumento do potencial das enzimas microbianas como coagulantes do leite na fabricação de queijo estimula a pesquisa por novas fontes em substituição ao coalho (ALVES, 2013).

Produtos lácteos enriquecidos com compostos bioativos têm atraído crescente interesse de consumo. A quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) é uma semente reconhecida por seu alto conteúdo de aminoácidos, proteínas, fibras e minerais e a chia (*Salvia hispanica* L.), além dos altos teores de proteínas e fibras, tem alto conteúdo de ácidos α -linoléico. As duas têm ação antioxidante e outras propriedades funcionais e já foram utilizadas como suplemento de cream cheese, um derivado do leite (LEMES et al., 2016).

2.3.3.1. Cogumelos comestíveis

Os cogumelos comestíveis são utilizados na alimentação humana não apenas devido ao seu sabor único e sutil, mas também por suas propriedades nutricionais. Eles são ricos em carboidratos, proteínas, fibras, vitaminas e minerais, contêm ácidos graxos insaturados e

pouca quantidade de gordura. Por isso, podem ser considerados como excelente escolha de alimentos para incluir nas mais variadas dietas (HELENO et al., 2015).

Os macrofungos comestíveis são apreciados desde a idade antiga e são considerados uma especiaria nobre em pratos culinários. De acordo com o *Codex Alimentarius*, os cogumelos pertencem ao grupo Funghi, podem crescer em estado silvestre ou serem cultivados. São conhecidas aproximadamente 2000 espécies comestíveis e dentre estas 25 são cultivadas comercialmente. Existem 3 espécies mais comumente cultivadas e consumidas no Brasil: *Agaricus bisporus*, conhecido como champignon de Paris; *Lentinula edodes*, o Shiitake; e *Pleurotus* sp., conhecido como shimeji ou hiratake (FURLANI e GODOY, 2007; ORSINE et al., 2012).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são naturalmente encontrados em florestas úmidas tropicais e subtropicais de todo mundo e podem ser cultivados artificialmente. Eles têm demonstrado atividades biológicas de caráter médico e, por isso, utilizados em terapias há muito tempo. Estão relatadas na literatura terapias antitumorais, antivirais, tratamentos imunomodulatórios e atividades antioxidantes, antimicrobiana, antimitogênica e antiproliferativa (PAZ et al., 2013).

O cultivo de espécies de *Pleurotus* spp. para uso na culinária e fins medicinais tem sido estimulada pela demanda de mercado. Além disso, este cogumelo apresenta maiores facilidades no cultivo, pois coloniza diversos materiais contendo lignocelulose, possui habilidade de crescer em uma maior amplitude de temperatura e demanda curto tempo de cultivo (ALBUQUERQUE et al., 2013).

Pleurotus ostreatoroseus (Figura 3) é uma espécie comestível que se destaca pela coloração rosa característica de seu corpo de frutificação ou basidioma. Esta espécie de macrofungo foi primeiramente descrita por Singer em 1961 a partir de material de amostras coletadas em Recife, Pernambuco. *P. ostreatoroseus* está incluído entre os fungos de podridão branca por seu excelente potencial em degradar lignina e é também considerado um cogumelo autóctone dos trópicos por crescer muito bem em temperaturas tropicais (CORRÊA et al., 2015).



Figura 3. *Pleurotus ostreatoroseus*. Fonte: Herbário Micológico Jair Putzke.

Vários substratos agroindustriais como casca de mamona, palha de arroz, bagaço de cana, resíduos de algodão, palha de soja, sabugo de milho, capim elefante, aveia, azevém, semente de girassol, de serragem de eucalipto e vinhaça têm sido utilizados para cultivo de *P. ostreatoroseus* (FONSECA et al., 2015).

De acordo com o estudo de Fonseca et al. (2015), *P. ostreatoroseus* produzido em casca de cupuaçu suplementada com farelo de arroz, apresentou teores importantes de proteínas (25,53%) e fibras (12,79%) e baixa quantidade de gordura (3,08%). Além da presença de aminoácidos essenciais e não essenciais e minerais como zinco (78,06 mg/Kg), ferro (72,34 mg/Kg), potássio (24,19 g/Kg) e fósforo (10,39 g/Kg).

2.4. Fermentação em estado líquido

O termo “fermentação” é derivado do latim *fervere*, que significa ferver, descrevendo a aparência da ação das leveduras nos extratos de fruta ou grãos de malte. A aparência de estar fervendo é devido à produção de bolhas de gás carbônico causadas pelo catabolismo anaeróbico dos açúcares presentes no extrato. No entanto, este termo tem obtido diferentes significados para bioquímicos e microbiologistas industriais. O significado bioquímico está relacionado à geração de energia pelo catabolismo dos compostos orgânicos, enquanto que para fins industriais significa a produção de compostos de interesse industrial através do consumo de determinado substrato (STANBURY et al., 1995).

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

A fermentação submersa (SmF) é definida como o cultivo na presença de excesso de água em que a célula produtora se desenvolve no 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. Aproximadamente 90% das enzimas industriais são produzidas por fermentação submersa. O cultivo líquido de fungos possui vantagens como a fácil separação de biocompostos de interesse comercial como biomassa, exopolissacarídeos (EPS) e enzimas (CAMPOS et al., 2010, INACIO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015; SINGHANIA et al., 2010; BELMESSIKH et al., 2013)

No cultivo em meio líquido, a utilização de diferentes substratos resulta em atividades proteolíticas diversificadas. 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).

Referências bibliográficas

- ABIDI, L. F.; NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Process Biochemistry*, v.43, n.11, p.1202–1208. 2008.
- ALBUQUERQUE, M. P.; PEIL, R. M. N.; NASCIMENTO, J. S. Capacidade de colonização micelial de *Pleurotus ostratoroseus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Lentinus sajor-caju* em diferentes substratos. *Caderno de Pesquisa, série Biologia* (24). 2013.
- ALECRIM, M. M.; PALHETA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, I. M. A. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus falvo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. *International Journal of Food Science and Technology* (50) 151-157. 2015.
- ALVES, L.S.; MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; GIGANTE, M.L. Yield, changes in proteolysis, and sensory quality on Prato cheese produced with different coagulants. *Journal of Dairy Science* 96, 7490-7499. 2013.
- AYANA, I. A. A. A.; IBRAHIM, A. E.; SABER, W. I. A. Statistical optimization of milk clotting enzymes biosynthesis by *Mucor mucedo* KP736529 its further application in cheese production. *International Journal of Dairy Science*. (10) 61-76. 2015.
- BELMESSIKH, A.; BOUKHALFA, H.; MECHAKRA-MAZA, A.; GHERIBI-AOULMI, Z.; AMRANE, A. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* (44) 377-385. 2013.
- BENLOUNISSI, A.; MECHAKRA-MAZA, A.; BLUM, L. J.; MARQUETTE, C. A. Identification and characterization of milk-clotting proteases produced by two species of mold. *African Journal of Biotechnology* (13) 1275-1280. 2014.
- BENSMAIL, S.; MECHAKRA, A.; FAZOUANE-NAIMI, F. Optimization of milk-clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus niger* FFB1 solid-state fermentation. *J. Microbiol Biotech Food Sci* (5) 467-472. 2015.
- BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N.; GOTTSALK, 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.
- BOUTROU, R.; GUEGUEN, M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*. (102) 1-20. 2005.
- BRUTTI, C. B.; PARDO, M. F.; CAFFINI, N. O.; NATALUCCI, C. L. *Onopordum acanthium* (Asteraceae) florets as coagulant agent for cheesemaking. *LWT-Food Science and Technology* (45) 172-179. 2012.

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. Ciênci, Vet. Zool. Unipar (13) 19-24. 2010.

CASTRO, R. J. S.; NISHIDE, T. G.; SATO, H. H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (3) 236-245. 2014.

CHEN, Y.; FU, X.; MEI, X.; ZHOU, Y.; DU, B.; TU, Y.; YANG, Z. Characterization of functional proteases from flowers of tea (*Camellia sinensis*) plants. J. of Func. Food. (25) 149-159. 2016.

CORRÊA, R. C. G.; SOUZA, A. H. P.; CALHEIRA, R. C.; BARROS, L.; GLAMOCLIJIA, J.; SOKOVIC, M.; PERALTA, R. M.; BRACH, A.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. Food and Function (6) 2155-2165. 2015.

COSTA, M. R.; JIMENEZ-FLORES, R.; GIGANTE, M. L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. Alim. Nutri. Araraquara (30) 507-514. 2009.

ESPOSITO, M.; DI PIERRO, P.; DEJONGHE, W.; MARINIELLO, L.; PORTA, R. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. Food Chemistry (204) 115-121. 2016.

FONSECA, T. R. B.; SILVA, T. A.; ALECRIM, M. M.; CRUZ FILHO, R. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from north Brazil. African Journal of Microbiology Research (30) 1814-1822. 2015.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. Ciênc. Technol. Aliment. Campinas (27) 154-157. 2007.

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.

HAKI, G.D., RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology (89) 17-34. 2003.

HANG, F.; WANG, Q.; HONG, Q.; LIU, P.; WU, Z.; LIU, Z.; ZHANG, H.; CHEN, W. Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from *Paenobacillus* spp. BD3526. International Journal of Biological Macromolecules (85) 547-554. 2016.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology (153) 1677-1692. 2007.

HELENO, S. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORALES, P.; FERNANDEZ-RUIZ, V.; GLAMOCLJA, J.; SOKOVIC, M.; FERREURA, I. C. F. R. Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. *LWT- Food Science and Technology* (63) 799-806. 2015.

HOMAEI, A.; LAVAJOO, F.; SARIRI, R. Development of amrine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *Int. J. of Biol. Macromol.* (88) 543-552. 2016.

HORNE, D. S.; BANKS, J. M. Rennet-induced coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Third Edition. (1) 47-70. 2004.

INÁCIO, F. D.; FERREIRA, R. O.; ARAÚJO, C. A. V.; BRUGNARI, T.; CASTOLDI, R.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. *BioMed Research International* (1) 1-15. 2015.

LEITE JÚNIOR, B. R. C.; TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and influence of rheological behavior of the milk coagulation process. *Innovative Food Science and Emerginf Technologies* (21) 44-49. 2014.

LEMES, A. C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; RAZYCKI, S.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 in cream cheese development. *LWT-Food Science and Technology* 66, 217-224. 2016.

MAJUMDER, R.; BANIK, S. P.; KHOWALA, S. Purification and characterization of k-casein specific milk-clotting metalloprotease from *termitomyces clypeatus* MTCC 5091. *Food Chemistry* (173) 441-448. 2015.

MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A. C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor inficacae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. *Food Chemistry* (130) 859-865. 2012.

NARWAL, R. K.; BHUSHAN, B.; PAL, A.; PANWAR, A.; MALHOTRA, S. Purification, physico-chemico-kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. *LWT-Food Science and Technology* (65) 652-660. 2016.

NASCIMENTO, A. W. C., MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* (26) 582-588. 2006.

NEVES, K. C. S. Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia. Tese. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Renorbio. 99p. 2014.

NOUANI, A.; MOULTI-MATI, F.; BELBRAOUE, S.; BELLAL, M. M. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Mucor pusillus*: method comparison. African Journal of Biotechnology (10) 1655-1665. 2011.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. Food Chemistry (198) 119-124. 2016.

ORSINE, J. V. C.; BRITO, L. M.; NOVAES, M. R. C. G. Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e farmacológicas. Revista HPCA (32) 452-460. 2012.

PALLAVI, P. M. AVANTI, K. A.; PALLAVI, K. T. Production of milk clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* under solid-state fermentation using mixture of wheat bran and rice bran. International Journal of Scientific and Research Publication (2) 1-12. 2012.

PAZ, M. F.; DEMENJOUR, P. L. M. M.; CARDOSO, J. C. P.; LEITE, R. S. R. Cultivation of edible mushroom Hiboukitake in caja bagase by Jun-Cao Technique. Journal of Biotechnology and Biodiversity (4) 146-152. 2013.

RAO, K.; NARASU, M. L. Alkaline protease from *Bacillus frimus* 7728. Afri. J. of Biotechnol. (21) 2493-2496. 2007.

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

RATHOD, M. G.; PATHAK, A.P. Optimized production, characterization and application of alkaline proteases from taxonomically assessed microbial isolates from Lonas soda lake, India. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (7) 164-173. 2016.

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 (33) 3421-3436. 2012.

RIBEIRO, R. C. S.; RIBEIRO, T. R. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MEDEIROS, E. V.; MOREIRA, K. A. Production and partial characterization of proteases from *Mucor hiemalis* URM 3773. Acta Scientiarum (37) 71-79. 2015.

SALIHI, A.; ASOODEH, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. Biological Macromolecules. 2016.

SHAMTSYAN, M.; DMITRIYEVA, T.; KOLESNIKOV, B.; DENISOVA, N. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus logopides* basidial mushroom. LWT-Food Science and Technology (58) 343-347. 2014.

SILVA, B. L.; GERALDES, F. M.; MURARI, C. S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged

fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. Appl. Biochem. Biotechnol (172) 199-2011. 2014.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Produção e caracterização de proteases obtidas por *Gliocadium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial (3) 28-41. 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologie using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and microbial Technology 46, 541-549. 2010.

SOUZA, P. M. de; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FERREIRA FILHO, E. X.; PESSOA JÚNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazil. J. of Microbiol. (46) 337-346. 2015.

STANBURY, P.F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Principles of fermentation technology. Pergamon. Second Edition. 357p. 1995.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. Food Technol. Biotechnol. 44(2) 211-220. 2006.

SUN, Q.; PING, X.; YAN, Q. J.; CHEN, W.; JIANG Z. Q. Purification and characterization of a chymosin from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. Appl. Biochem. Biotechnol. (174) 174-185. 2014.

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 et al., 2012. Biodiversidade Amazônica: Caracterização, Ecologia e Conservação. Manaus: Edua, 2012.

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

TIWARI, S.; IWARI, S.; ARNOLD, R.; SAXENA, A.; PANDEY, S. K.; MISHRA, N. Optimization and characterization of proteases roduced by different species of *Aspergillus* in special reference to pH: A review. Journal of Chem. Biol. And Physic. Scienc. (4) 1101-1107. 2014.

YEGIN, S.; FERNANDEZ-LABORE, M.; SALGADO, A. J. G.; GUVENC, U.; GOKSUNGUR, Y.; TARI, C. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. (89) 949-960. 2011.

YEGIN, S.; GOKSUNGUR, Y.; FERNAFEZ-LAHORE, M. Purification, structural characterization and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* dms 809. Food Chemistry (133) 1312-1319. 2012.

YOUNES, I.; NASRI, R.; BKHAIRIA, I.; JELLOULI, K.; NASRI, M. New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaema scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. Food and Bioproducts Processing (84) 453-462. 2015.

VASCONCELOS, M.; ARAÚJO, K. G. L; VERRRUMA-BERNARDI, M. R. Efeito do pH de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. Rev. Bras. Agrocência (10) 499-502. 2004.

VISHWANATHA, K.S.; APPU RAO, A. G.; SINGH, S. A. Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Food Chemistry (114) 402-407. 2009.

CAPÍTULO 2

Objetivos e Material e Métodos

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a produção de proteases coagulantes do leite por *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 e utilizá-las na elaboração de queijo adicionado de cogumelo comestível.

3.1. Objetivos específicos

- Reativar e autenticar a linhagem de *A. flavo furcatis* DPUA 1608 de acordo com suas características macro e micromorfológicas;
- Avaliar a produção de aflatoxinas por *A. flavo furcatis* DPUA 1608 em diferentes meios de cultivo sólidos;
- Selecionar meio de crescimento do inóculo e o meio de cultivo líquido para produção de proteases e coagulantes do leite;
- Verificar as condições de cultivo (idade, tamanho do inóculo, pH do meio, temperatura de fermentação, velocidade de agitação, fontes de carbono e nitrogênio) que influenciam na produção de proteases e coagulantes do leite;
- Caracterizar as enzimas proteolíticas e coagulantes do leite quanto à atividade ótima e estabilidade utilizando diferentes parâmetros de pH, temperatura e efeito de íons metálicos e inibidores;
- Determinar a toxicidade *in vitro* do extrato enzimático de *A. flavo furcatis* DPUA 1608;
- Elaborar um queijo adicionado com cogumelo comestível, *Pleurotus ostreatoroseus*;
- Analisar as características microbiológicas e centesimais do produto final.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

Para a produção de enzimas coagulantes do leite foi selecionada a linhagem de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, cedida pela Coleção de Culturas da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. A espécie anamórfica foi reativada em Caldo glicosado 2% (p/v). Após crescimento, a cultura estoque foi repicada para meio contendo (p/v): Glicose 1.0%, Peptona de carne 1.0% e Ágar 1.5% (Sabouraud-SAB), incubadas a 30 °C por 7 dias (Figura 4) (TEIXEIRA et al., 2011).

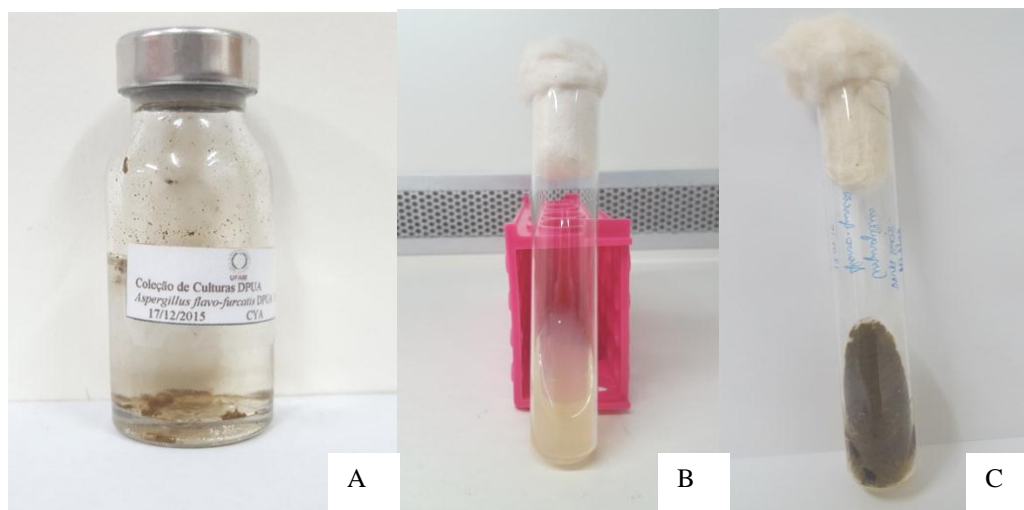


Figura 4. Reativação da cultura de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608: (A) Cultura preservada em água destilada esterilizada; (B) Meio Sabouraud em tubo de ensaio para obtenção da cultura estoque; (C) Cultura crescida após 7 dias, a 30 °C.

4.2. Teste de aflatoxina em meio sólido

O teste de aflatoxina foi conduzido utilizando o método descrito por Saito e Machida (1999) em que a produção de toxinas é confirmada pela mudança de cor (rosado, avermelhado ou alaranjado) no reverso da colônia de acordo com o meio de cultura utilizado. Sete meios de cultivo diferentes foram utilizados para determinar a mudança de cor e produção das aflatoxinas: BDA (Ágar Batata Dextrose), COA (Ágar Coco), CYA (Ágar Czapek com extrato de levedura 0,5% (p/v)), CZ (Ágar Czapek), GMS (Ágar Glicose e sais minerais), PMS (Ágar Peptona e minerais) e YES (Ágar Extrato de levedura e Sacarose) (Figura 5). *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, com quatro dias de crescimento em ágar Sabouraud, foi inoculado no centro dos meios de cultura solidificados em placas de Petri e, então, as placas foram mantidas a temperatura ambiente (25 °C)

durante 5 dias. Para observar a mudança de cor, no reverso da colônia, as placas foram dispostas no lado inverso e 0,2 mL de solução de amônia 25 % (p/v) foram adicionados na tampa das placas.

O meio BDA foi preparado utilizando solução comercial pronta (Himedia) contendo (g/L): infusão de batatas (200), dextrose (20) e ágar (15). O meio COA, foi preparado utilizando (g/L): coco ralado seco (100) homogeneizado a 300mL de água quente e então filtrado. O filtrado foi adicionado a 300mL de água destilada e a ágar (15). Meio CYA em g/L: sacarose (30), NaNO_3 (3), KH_2PO_4 (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), KCl (0,5), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01), extrato de levedura (5) e ágar (15). Meio CZ em g/L: sacarose (30), NaNO_3 (3), KH_2PO_4 (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), KCl (0,5), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01) e ágar (15). O meio GMS (g/L): glicose (60), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (2), KH_2PO_4 (10) e 1 mL de solução de minerais. A solução de minerais consistiu de: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (700mg), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6,080 mg), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (300 mg), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.76 g) e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (110 mg) em 100 mL de água destilada O meio PMS foi preparado de modo idêntico ao GMS, substituindo apenas a glicose por peptona na formulação. Todos os meios foram esterilizados a 121 °C, durante 15 minutos. Após resfriamento, os meios foram distribuídos em placas de Petri.

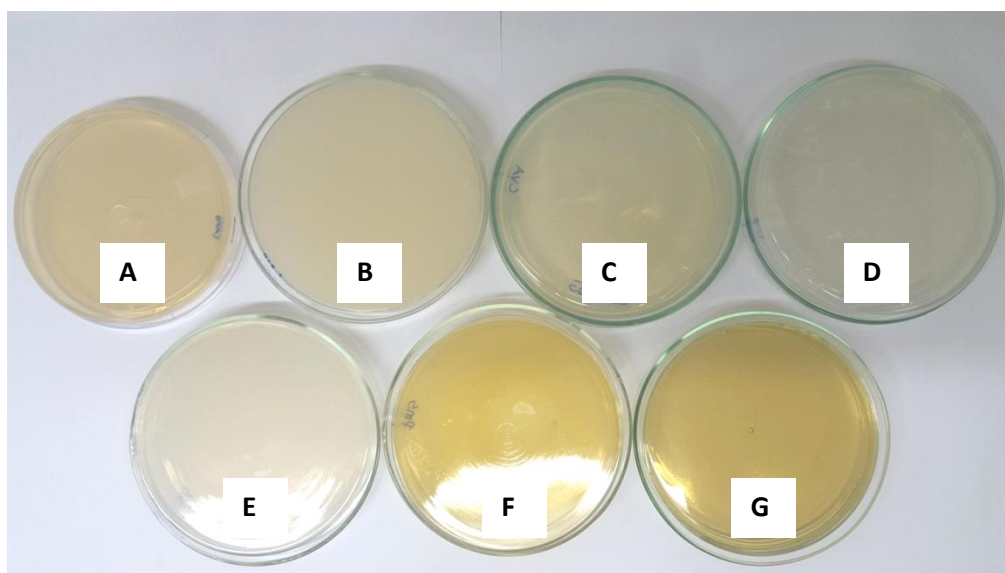


Figura 5. Meios de cultura para detecção de aflatoxina. (A) BDA; (B) COA; (C) CYA; (D) CZ; (E) GMS; (F) PMS; e (G) YES.

4.3 Fermentação Submersa

4.3.1 Preparação do Inóculo

Para selecionar um meio para obtenção do inóculo, *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 foi cultivado em quatro meios de cultura diferentes, em tubos de ensaio: ágar Glicose, peptona e extrato de levedura (SAB+GLI); Ágar Sacarose, peptona e extrato de levedura (SAB+SAC); Ágar Batata e Glicose (BDA+GLI); e Ágar Batata e Sacarose (BDA+SAC). As culturas foram mantidas a 30 °C, durante sete dias. Em cada cultivo foi preparada uma suspensão celular. Dessa suspensão foi retirado volume equivalente a 10^5 esporos/ mL e semeado em 50 mL dos meios de fermentação citados no item 4.3.2. A fermentação foi conduzida a 30 °C, a 180 rpm, em agitador orbital. Após 72 horas, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman nº 1. No extrato bruto recuperado foram determinadas as atividades proteolítica e coagulante conforme descrito nos itens 4.4 e 4.5, respectivamente.

4.3.2 Meio de fermentação

A seleção de um meio de fermentação submersa para a produção de proteases coagulantes foi realizada utilizando solução salina (MA01)(g/L): [KH_2PO_4 (2.0); $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (1.0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.9); Extrato de levedura (1.0), Gelatina (5.0)]. Nos outros dois meios, foram adicionados Glicose 1% (p/v) (MAGLi) e Sacarose 1% (p/v) (MASac), respectivamente (Figura 6 e Tabela 1).



Figura 6. Meios de fermentação submersa: MA01, MaGli e MaSac, respectivamente. MA01 = Meio de solução mineral base; MAGli = Solução mineral base + glicose; MASac = Solução mineral base + sacarose.

Tabela 1. Formulações dos meios de fermentação submersa a partir de solução mineral base.

Meio	Composição (g.L ⁻¹)
MA01	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); Extrato de levedura (1,0), Gelatina (5,0)
MAGli	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); Extrato de levedura (1,0), Gelatina (5,0), Glicose (10,0)
MASac	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); Extrato de levedura (1,0), Gelatina (5,0), Sacarose (10,0)

MA01 = Meio se solução mineral base; MAGli = Solução mineral base +glicose; MASac = Solução mineral base + sacarose.

4.4 Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada segundo a metodologia descrita por Leighton *et al.*, (1973). O extrato bruto (150 µL) foi adicionado em tubo tipo Falcon contendo 250 µL de substrato [azocaseína a 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2]. Após 60 minutos de incubação a 25° C, na ausência de luz, a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) e o resíduo remanescente foi removido por centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirados 0,8 mL e adicionados em 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M. A leitura foi realizada a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzimas capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1 em uma hora (COURI *et al.*, 2000). Todas as análises foram preparadas em triplicata.

4.5 Determinação da atividade coagulante do leite

Para a determinação da atividade coagulante (Figura 7) foi utilizado leite desnatado em pó como substrato, conforme a metodologia descrita por Merheb, 2007. A solução de leite desnatado 10% (p/v) foi preparada com CaCl₂ 0,05M, homogeneizando-se em agitador magnético até a completa dissolução do leite. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1M. Uma amostra de solução do leite igual a 5mL foi distribuída em tubos de ensaio e mantida a 40° C em banho de água circulante. Após 15 minutos, foram adicionados 0,5mL do extrato enzimático bruto. A atividade coagulante foi determinada como positiva através da visualização da formação de coágulos na parede do tubo de ensaio em até 40 minutos. O tempo final da coagulação foi determinado com cronômetro digital. Todas as análises dos extratos foram realizadas em triplicata. O resultado qualitativo da

atividade coagulante foi expresso com base na formação de coágulo e a forma de separação do soro do leite visualizado nos tubos de ensaio em: **coagulação forte** (coágulo distinto e soro abundante) e **coagulação fraca** (coagulação sem separação visual de soro).

A unidade de atividade de coagulação (U) foi definida como a quantidade de enzima, presente no volume do extrato, que coagula o volume de substrato em 40 minutos, a 40° C (Equação I).

$$\text{Equação I} \quad U = \frac{2400}{T} \times \frac{V}{v}$$

Onde:

2400 = Tempo total de espera da atividade coagulante, em segundos (40 minutos)

V= Volume de leite utilizado, em mL

v = volume do extrato enzimático adicionado, em mL

T= Tempo de coagulação da amostra, em segundos.



Figura 7. Atividade coagulante do leite. (A) Solução de leite desnatado; (B) Distribuição dos tubos de ensaio em banho de água circulante; (C) Determinação da atividade coagulante positiva por visualização de coágulos de leite na parede do tubo de ensaio.

4.6. Determinação de parâmetros que influenciam na produção de proteases

Nos meios selecionados no item 4.3.1 e 4.3.2, *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 foi cultivado para avaliar a influência da idade e tamanho do inóculo, tempo de fermentação, temperatura de fermentação, velocidade de agitação, pH inicial do meio, concentração de fontes de carbono e nitrogênio (Figura 8). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

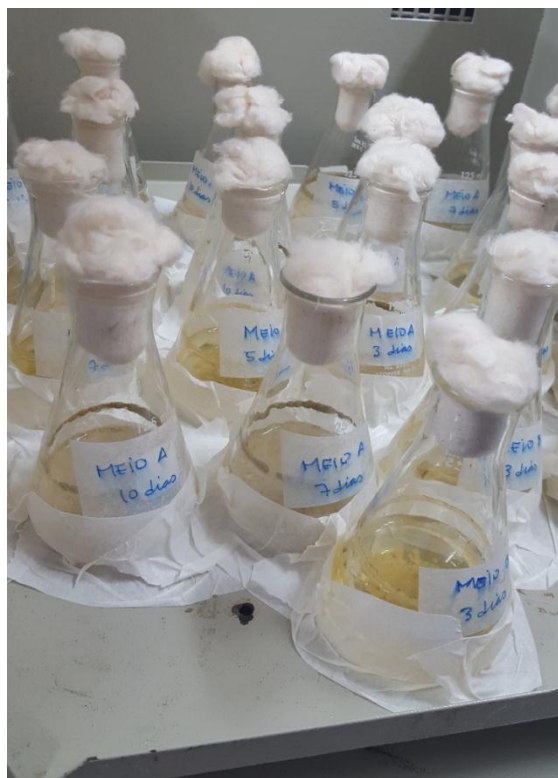


Figura 8. Fermentação submersa.

4.6.1 Determinação da influência da idade e tamanho do inóculo

Para a padronização da idade do inóculo *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 foi cultivado no meio selecionado no item 4.3.1, em tubos de ensaio. Os cultivos foram mantidos a 30° C, durante 3, 5, 7, 9, 11 e 13 dias. Foi preparada uma suspensão celular do cultivo. Dessa suspensão foi retirado volume equivalente a 10^5 esporos/ mL e semeado em 50 mL dos meios de fermentação citados no item 4.3.2. Na determinação do tamanho do inóculo foram retirados, da suspensão celular, volumes equivalentes a 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 esporos/mL, respectivamente, e semeados em 50 mL do meio selecionado no item 4.3.1. Nos dois experimentos, a fermentação foi conduzida a 30 °C, 180 rpm. Após 72 horas, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman n° 1. Nos extratos brutos recuperados foram determinadas as atividades proteolítica e coagulante conforme citado no item 4.4 e 4.5.

4.6.2 Avaliação da influência do tempo e temperatura de fermentação, velocidade de agitação e pH inicial do meio

Aspergillus flavo furcatis DPUA 1608 foi cultivado no meio de inóculo selecionado no item 4.3.2, em tubos de ensaio. Os cultivos foram mantidos a 30 °C por 7 dias. Foi preparada uma suspensão celular do cultivo. Dessa suspensão foi retirado volume equivalente a 10^5 esporos/ mL e semeado em 50 mL dos meios de fermentação citados no item 4.3.2. Para a determinação do tempo de fermentação, o bioprocessamento foi conduzido a 30 °C, sob agitação de 180 rpm durante 24, 48, 72, 96 e 120h (1, 2, 3, 4 e 5 dias, respectivamente). Para verificar a influência da temperatura de fermentação na produção de enzimas coagulante do leite, foram avaliadas as temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C, sob agitação de 180 rpm, durante 72 horas. Para avaliar a velocidade de agitação, o processo fermentativo foi conduzido a 30 °C, sob agitação de 150, 180 e 200 rpm durante 72 horas. Para verificar a influência do pH do meio, foi preparada uma suspensão celular do cultivo. Dessa suspensão foi retirado volume equivalente a 10^5 esporos/ mL e semeado em 50 mL dos meios de fermentação (item 4.3.2.) com pH inicial ajustado para 4, 5, 6, 7 e 8. A fermentação foi conduzida a 30 °C, sob agitação de 180 rpm, durante 72 horas.

Ao final de todos os processos fermentativos, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração à vácuo em papel de filtro Whatman nº 1. Nos extratos brutos recuperados foram determinadas as atividades proteolítica e coagulante conforme descrito nos itens 4.4 e 4.5, respectivamente.

4.6.3 Determinação do efeito de fontes de carbono e nitrogênio

Para avaliar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de enzimas coagulantes do leite, a fermentação submersa foi conduzida utilizando o meio citado no item 4.3.2. O meio foi suplementado com as seguintes fontes de carbono: glicose, sacarose e amido e; nitrogênio: peptona, extrato de levedura e gelatina. Esses nutrientes foram adicionados nas concentrações de 0,1%, 0,2% e 0,5% (p/v). Nestes experimentos o inóculo foi preparado no meio selecionado no item 4.3.1, em tubos de ensaio. Os cultivos foram mantidos a 30 °C por 7 dias. Nestes cultivos foi adicionada água destilada esterilizada para obtenção de uma suspensão celular. De cada suspensão foi retirado volume equivalente a 10^5 esporos/ mL e semeado em 50 mL dos meios de fermentação. A fermentação foi conduzida a 30°C, 180 rpm, durante 72 horas.

A biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman nº 1. Nos extratos brutos recuperados foram realizadas as atividades proteolítica e coagulante conforme citado no item 4.4 e 4.5, respectivamente.

4.7 Caracterização enzimática parcial

O extrato que apresentou atividade coagulante significativa e classificação da coagulação como forte foi utilizado para a caracterização de suas enzimas. Foram determinados o efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade das enzimas de acordo com a atividade proteolítica (enzimas proteolíticas) e coagulante (enzimas coagulantes do leite). Também foi avaliado o efeito de íons metálicos e inibidores enzimáticos (MARTIM et al., 2017). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7.1 Enzimas proteolíticas

4.7.1.1. Determinação do efeito da temperatura e pH na atividade das enzimas proteolíticas

A temperatura ótima de atividade foi avaliada em diferentes faixas (25° C a 80° C), utilizando solução de azocaseína 1% (p/v) (diluída em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,2) como substrato. O pH ótimo foi avaliado nas faixas de 4 a 10, em azocaseína 1% (p/v) diluída nos seguintes tampões (0,1 M): Citrato (pH 4), Acetato (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10). Todos os sistemas de reação e o branco foram incubados por uma hora, na ausência de luz e em seguida foi determinada a atividade proteolítica, conforme o item 4.4.

4.7.1.2 Determinação do efeito da temperatura e do pH na estabilidade das enzimas proteolíticas

Para testar a estabilidade térmica e ao pH, o substrato azocaseína 1% (p/v) foi diluído em tampão de atividade ótima.

O extrato bruto, incluindo o branco, foi incubado nas diferentes temperaturas (25° C a 80° C) durante 30 minutos. Após este período, foi adicionado substrato e a reação foi mantida na temperatura ótima de atividade, durante 60 minutos, na ausência de luz. A estabilidade ao pH foi realizada incubando o extrato bruto em todos os tampões [Citrato (pH 4), Acetato (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10)], na proporção 1:1, durante 30 minutos. Após este período, as amostras foram incubadas em

azocaseína 1% (p/v) durante 60 minutos, na ausência de luz, na temperatura ótima. A atividade proteolítica foi determinada.

4.7.1.3 Determinação do efeito de íons metálicos e inibidores na atividade das enzimas proteolíticas

O efeito de íons metálicos foi determinado utilizando água destilada deionizada para obtenção das seguintes soluções: [0,1M (cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de cobre (CuSO_4), sulfato ferroso (FeSO_4), sulfato de zinco (ZnSO_4)]. Na avaliação de inibidores, ácido iodoacético 0,1M foi diluído em água deionizada; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1M diluído em tampão fosfato pH 7,0; fluoreto fenilmetilsulfomil (PMSF) 0,1 M diluído em metanol e, pepstatina A 0,01M diluída em etanol P.A.). O substrato azocaseína 1% (p/v) foi diluído em tampão de pH de atividade ótima. O extrato bruto foi incubado com cada solução de íon metálico ou inibidor durante 30 minutos. Após este período, foi adicionado o substrato e a reação foi mantida na temperatura ótima de atividade, durante 60 minutos, na ausência de luz. Todos os sistemas de reação e o branco foram incubados de acordo com a metodologia de determinação da atividade proteolítica.

4.7.2 Proteases coagulantes do leite

4.7.2.1 Determinação do efeito da temperatura e pH na atividade das proteases coagulantes do leite

Para determinação do pH de atividade ótima da enzima coagulante foi elaborada solução de leite desnatado 10% (p/v) nos seguintes tampões (0,1 M): Citrato (pH 4), Acetato (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10). A temperatura ótima de atividade foi avaliada em diferentes faixas (25° C a 80° C), utilizando a solução de leite 10% (p/v) diluída em tampão de pH ótimo, como substrato. Todos os sistemas de reação e o branco foram incubados de acordo com a metodologia de determinação da atividade coagulante (item 4.5).

4.7.2.2 Determinação do efeito da temperatura e pH na estabilidade das proteases coagulantes do leite

Para testar a estabilidade térmica e de pH, a solução de leite 10% (p/v) foi diluída em tampão de pH de atividade ótima. A solução de leite foi submetida a diferentes

temperaturas (25° C a 80° C). O extrato bruto foi incubado em cada temperatura por 30 minutos. Após este período, foi adicionado na solução de leite. Para a estabilidade ao pH, o extrato bruto foi incubado em todos os tampões [Citrato (pH 4), Acetato (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10)], na proporção 1:1, durante 30 minutos. Após este período, foi adicionado na solução de leite. A reação com o substrato foi realizada na temperatura de atividade ótima. Todos os sistemas de reação e o branco foram incubados de acordo com a metodologia de determinação da atividade coagulante.

4.7.2.3 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade coagulante do leite

O efeito de íons metálicos foi determinado utilizando água destilada deionizada para obtenção das seguintes soluções: [0,1M (cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de cobre (CuSO_4), sulfato ferroso (FeSO_4), sulfato de zinco (ZnSO_4)]. Na avaliação de inibidores, ácido iodoacético 0,1M foi diluído em água deionizada; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1M diluído em tampão fosfato pH 7,0; Fluoreto fenilmetilsulfomil (PMSF) 0,1 M diluído em metanol e, pepstatina A 0,01M diluída em etanol P.A.). O substrato solução de leite desnatado 10% (p/v) foi diluído em tampão de pH de atividade ótima. O extrato bruto foi incubado como cada solução de íon metálico ou inibidor durante 30 minutos. Após este período, foi adicionado o substrato e a reação foi realizada de acordo com a metodologia de determinação da atividade coagulante do leite (item 4.5).

4.8 Teste de toxicidade *in vitro*

4.8.1 Toxicidade em fibroblastos humanos

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizados fibroblastos humanos (MRC-5) mantidos no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e Penicilina 1% (p/v). As células foram mantidas em estufa com injeção de 5% de CO_2 , a 37 °C. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do Alamar Blue (Ahmed et al.,1994). As células foram inoculadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço, em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C, com CO_2 a 5%. Após 24 horas, as células foram tratadas na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato liofilizado durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizada a doxorrubicina (20 μM ou 34 $\mu\text{g/mL}$) e como controle negativo dimetilsulfóxido-DMSO (0,01%, v/v). Após adição do Alamar Blue (0,4% v/v) a fluorescência foi medida a 465 nm e 540 nm no leitor de

microplaca (DTX800 Beckman e Coulter). Os experimentos foram realizados em triplicata. As imagens foram capturadas por meio do programa Zen 2 da Carl Zeiss Microscópio GmbH Company® e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 6.0.

4.8.2 Hemólise

O extrato bruto enzimático (Figura 9A) foi submetido ao teste de hemólise utilizando sangue de carneiro comercial (Ebefarma®). O sangue foi centrifugado e lavado com soro fisiológico 0.9% (p/v) para separação em camadas e deposição das hemácias no fundo do tubo (Figura 9B). Esse processo foi repetido até a obtenção de sobrenadante límpido e precipitado contendo um hematócrito de 100%.

Para a obtenção da solução de hemácias (Figura 9C), o sobrenadante foi descartado e preparada uma suspensão de hemácias a 2% (v/v). Ou seja, 2mL de eritrócitos lavados foram diluídos em 98mL de solução fisiológica 0,9% (p/v).

As amostras foram avaliadas em triplicata com 10 concentrações crescentes (Figura 9D). O ensaio foi realizado em tubos de ensaio e a preparação está de acordo com a tabela 2 (Figura 9E).

Tabela 2. Preparação do teste para a determinação da atividade hemolítica em tubos de ensaio.

	TUBOS										CONTROLE	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	HM*	HT**
Amostra (mL)***	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	-	-
Solução fisiológica (mL)	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-	1	-
Triton-X 100 1% (v/v) (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Suspensão de hemácias (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volume final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

*HM=hemólise mecânica (ensaio em branco); **HT= hemólise total (100% de hemólise); ***Diluir a mostra na mesma solução da suspensão de hemácias.

As amostras foram incubadas a 37°C. Depois de 60 minutos, o grau de hemólise foi avaliado pela tonalidade vermelha do sobrenadante (Figura 9F). A coloração do

sobrenadante dos tubos teste foram comparados com os dos tubos controle. O resultado foi avaliado considerando 0 (zero) para o controle negativo, quatro cruces para controle positivo, e o número de cruces que represente a tonalidade do tubo teste em relação ao controle positivo (TEIXEIRA et al., 2011).

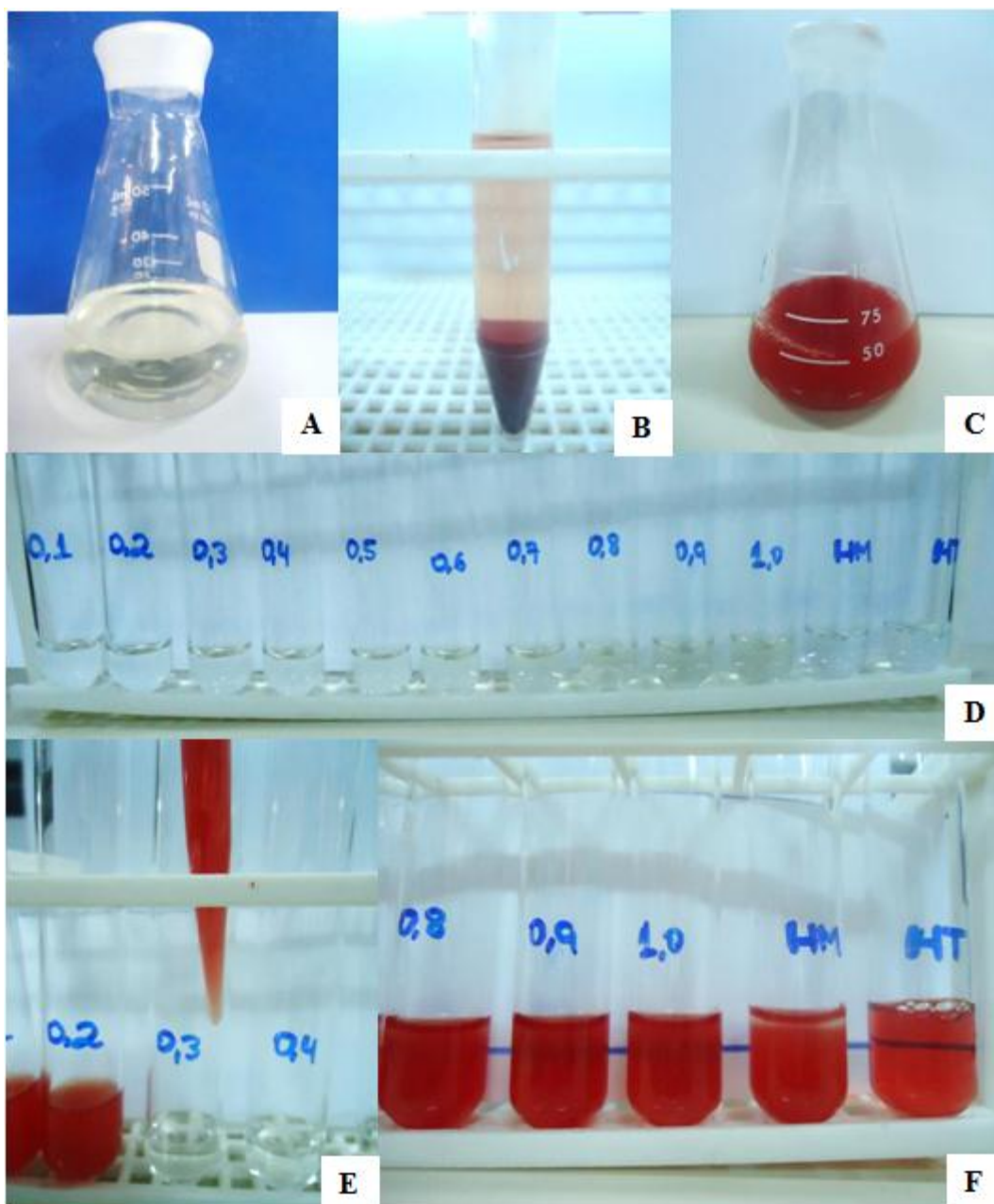
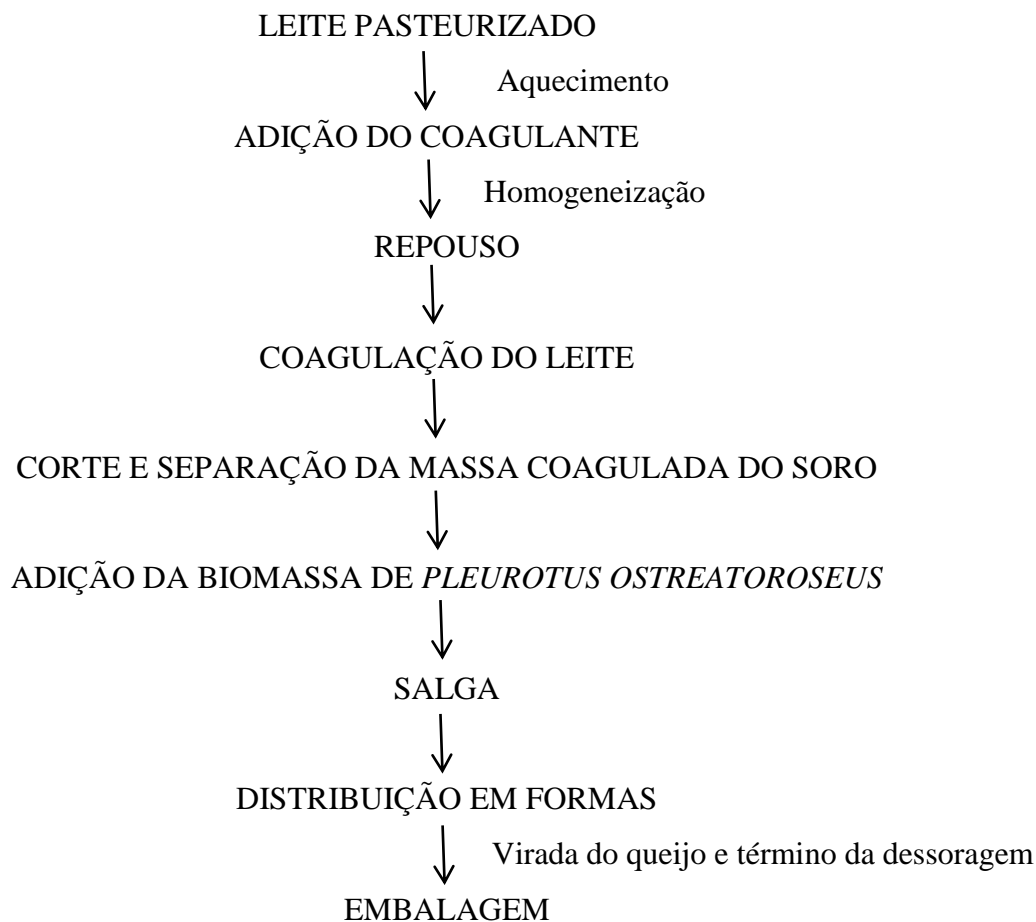


Figura 9. Etapas do teste de hemólise em sangue de carneiro comercial. (A) Extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608; (B) Lavagem do sangue em soro fisiológico 0,9% (p/v); (C) Suspensão de hemácias a 2% (v/v); (D) Distribuição das diferentes concentrações da amostra em tubos de ensaio; (E) Distribuição da suspensão de hemácias em cada concentração da amostra; (F) Avaliação visual do grau de hemólise dos tubos teste comparando aos tubos controle.

4.9 Elaboração do queijo

O queijo foi produzido substituindo o coagulante comercial pelo extrato coagulante de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, obtido por fermentação em meio líquido e, posteriormente, adicionado de biomassa de cogumelo comestível *Pleurotus ostreatoroseus* (p/p): 5%, 10% e 15% (Fluxograma 1).

A biomassa desidratada de *P. ostreatoroseus* foi cedida pelo Herbário Micológico Jair Putzke, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Ao término da elaboração dos queijos, o produto foi submetido a análise centesimal e microbiológica.



Fluxograma 1. Etapas da produção do queijo com coagulante de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 e adição de biomassa de *Pleurotus ostreatoroseus*.

4.10 Análise centesimal do queijo

O produto final foi submetido à determinação dos seguintes parâmetros físico-químicos: teor de umidade, proteína, cinzas, lipídios, carboidratos, fibras e valor calórico. As análises foram realizadas no Laboratório Tecnologia do Pescado – Universidade Federal do Amazonas, sob supervisão técnica do professor Doutor Antônio Fábio Lopes. A umidade foi determinada por desidratação em estufa de circulação de ar forçado a 105 °C até obtenção de peso constante segundo a A.O.A.C. (2005). A análise da fração proteica foi realizada pelo método micro Kjeldahl (A.O.A.C, 2005), usando fator de conversão de 6,38. A quantificação dos lipídeos foi realizada pelo método Bligh and Dyer. As cinzas foram determinadas por incineração do material em mufla a 550°C até obtenção de peso constante conforme A.O.A.C. (2005). A fibra bruta foi obtida através de digestão ácido-básica, segundo método de Weende, estabelecido pela A.O.A.C (2005). Os carboidratos totais serão estimados por diferença (100 g - gramas totais de umidade, proteína, lipídios e cinzas) e a energia total será calculada pela seguinte fórmula (TACO, 2011):

Energia total= (4kcal/g de proteína) + (4kcal/g carboidratos totais) + (9kcal/g de lipídios)

4.11 Análise microbiológica do queijo

A análise microbiológica do queijo Minas frescal foi realizada conforme preconizado pela RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001, seguindo as metodologias descritas por Silva et al. (2010). Os micro-organismos analisados foram: *Staphylococcus aureus* coagulase positivo, Coliformes a 45°C e *Salmonella* sp.

4.12 Análise estatística dos dados

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

Referências bibliográficas

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 18. ed. Maryland, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Diário Oficial da União, 12/01/2001.

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.

MARTIM, S. R.; SILVA, L. S. C.; SOUZA, L. B.; CARMO, E. J.; ALECRIM, M. M.; VASCONCELLOS, M. C.; OLIVEIRA, I. M. A.; TEIXEIRA, M.F.S. *Pleurotus albidus*: a new source of Milk-clotting proteases. African Journal of Microbiology Research 11, 660-667. 2017.

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.

SAITO, M.; MACHIDA, S. A rapide identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience (40) 205-208. 1999.

SILVA, N. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4.ed. São Paulo: Livraria Varela, 624 p. 2010.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO)/NEPA- Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP-4. ed. rev. e ampl., Campinas. 161 p. 2011.

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.

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão

Artigo 1: “*Aspergillus flavo furcatis*: aflatoxin test and milk-clotting protease production in submerged and solid state fermentation”

Artigo submetido na revista científica African Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

***Aspergillus flavo furcatis*: Aflatoxin test and milk-clotting protease production in submerged and solid state fermentation**

Mircella Marialva Alecrim¹, Salomão Rocha Martim¹, Bianca Cordeiro de Souza²
and Maria Francisca Simas Teixeira^{3*}

¹Federal University of Amazonas, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Manaus, Brazil. ²Centro Universitário do Norte, Uninorte, Manaus, Brazil.

³Culture Collection DPUA, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil.

Received 28 November 2016; Accepted 6 February, 2017

Proteolytic enzymes are metabolites that can be produced by microbial sources and develop important functions in food industry as in cheese manufacturing. However, it is necessary to ensure the final product safety by testing toxins production by microorganisms. As a result of this, the aim of this study was to investigate the production of proteases by *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 in submerged and solid state fermentation and also certify the non-production of aflatoxin by this species. The aflatoxin test was carried out using the method of ammonia vapor. In this test, *A. flavo furcatis* DPUA 1608 was inoculated in seven different media cultures (COA, YES, CZ, CYA, GMS, PMS and PDA) and the production of toxins was confirmed by the color change of culture reverse after adding a 25% (w/v) ammonia solution. The protease production was conducted using four inoculums (SAB+GLI, SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC) in three media cultures of submerged fermentation obtained by a base mineral solution (MA01, MAGli and MASac) and in solid state fermentation using açai seeds and rice bran as substrate (SAFA). According to ammonia vapor test, *A. flavo furcatis* is not an aflatoxin producer. There was no color change in the colonies reverse of any culture media. All crude extracts obtained in both fermentations were tested for protease production. The best protease activity was observed in the medium MA01 (inoculums SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC). Milk clotting activity was determined in all crude extracts of submerged and solid fermentation. However, the clot formed was considered as strong milk coagulation only in the media MA01 of submerged fermentation (inoculums SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC) and in all inoculums of solid state fermentation (SAFA). *A. flavo furcatis* DPUA 1608 showed potential milk-clotting protease production in both fermentations media used.

Key words: Ammonia vapor test, *Aspergillus*, milk-clotting enzymes, liquid fermentation, solid fermentation.

INTRODUCTION

Proteases are enzymes capable of hydrolyzing the peptide bond in a protein molecule. They represent one

of the largest groups of industrial enzymes with increasing market demands due to their applications

in industrial process like in cheese manufacturing using rennet enzymes (Mandujano-González et al., 2016; Sandhya et al., 2005). Since the limited availability of mammalian rennet and most rennet of plants are unsuitable because they impart a bitter taste to cheese, microbial sources can be potential as substitute to animal rennet. Among the microbial sources, fungi as enzyme producers have many advantages, since they are normally generally regarded as safe (GRAS) strains and the produced enzymes are extracellular which makes its easy recuperation from fermentation broth (Ayana et al., 2015; Sandhya et al., 2005).

Aflatoxins are carcinogenic fungal metabolites commonly produced by some species of *Aspergillus* such as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* (Blankson and Mill-Robertson, 2016; Kamika et al., 2016). These fungi can infect a number of foods and feeds such like peanuts and maize and cause contamination (Saito and Machida, 1999).

Aspergillus flavo furcatis is anamorphic fungi that have shown potential as enzyme producer (Teixeira et al., 2012). A recent study reported the production of milk-clotting enzymes by the species in submerged fermentation (Alecrim et al., 2015). On Czapek's solution agar, its colony spread rapidly, attaining a diameter of 6.0 to 7.0 cm in 10 to 12 days at room temperature (24-26°C) and showing dark olive-buff through brownish olive color when young, becoming sepia to mummy brown (Raper and Fennell, 1977).

Submerged fermentation (SmF) is a well-known process to produce enzymes by the growing of microorganisms in liquid substrate or in the presence of excess water while solid-state fermentation (SSF) involves the growth of microorganisms on solid substrates in the absence or near absence of free water in the space between particles (Bensmail et al., 2015; Singhania et al., 2010). Because of need for new microbial milk-clotting proteases sources due the shortage of rennet and the increase demand for cheese, the aim of this study was to investigate the protease production by *A. flavo furcatis* DPUA 1608 in submerged and solid state fermentation and also certify the non-production of aflatoxin by this species.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

The culture of *A. flavo furcatis* DPUA 1608 (Culture Collection DPUA/Federal University of Amazonas-UFAM) was inoculated in test tubes containing (w/v): 1.0% sucrose, 1.0% meat peptone and

1.5% Agar and maintained at 30°C for seven days (Klich and Pitt, 1988).

Aflatoxin test by ammonia vapor

The aflatoxin test was carried out using the method reported by Saito and Machida (1999). The toxin production was confirmed by color change at colony reverse in the media used. Seven different media were used to determine the color change: Coconut (COA), yeast extract-sucrose (YES), Czapek (CZ), Czapek-yeast extract (CYA), glucose-mineral salts (GMS), peptone-mineral mix (PMS) and potato-dextrose agar (PDA). The strain (4 days growth) was inoculated at the center of solidified agar medium in Petri dishes and incubated at room temperature (25°C). To observe the color change of colony reverse, the dishes were placed upside down and a drop (0.2 ml) of 25% (w/v) ammonia solution was put into the lid of the Petri dish. The samples were prepared in triplicate.

Inoculum

Four different inoculums of *A. flavo furcatis* DPUA 1608 were used to select the best one after the fermentation processes. The strain was inoculated in test tubes containing: [1] glucose+meat peptone (SAB+GLI) [2] sucrose+meat peptone (SAB+SAC) [3] potato+glucose (BDA+GLI) and [4] potato+sucrose (BDA+SAC). The cultures were incubated at 30°C for 7 days and after this period, solutions of 10^5 mL⁻¹ spores were prepared for use in each fermentation medium.

Fermentation media and culture conditions

The production of milk-clotting enzymes was made by submerged and solid state fermentation. The submerged fermentation was conducted by using three media cultures (MA01, MAGli and MASac) based on a mineral solution (MA01) (g.L⁻¹): [KH₂ PO₄ (2.0); (NH₄)SO₄ (1.0); MgSO₄.7H₂O (0.1); Na₂HPO₄.7H₂O (0.9); yeast extract (1.0) and gelatin (5.0)]. In MAGli medium was added 1% (w/v) glucose in the mineral solution (MA01) and in MASac medium was added 1% (w/v) sucrose in the mineral solution (MA01) (Table 1). The fermentation was performed in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 ml of sterilized medium with the spore solution (10^5 mL⁻¹ spores) of all inoculums (SAB+GLI, SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC), incubated at 30°C, and 180 rpm for 72 h. The biomass was separated from the crude extract by vacuum filtration on Whatman filter paper number 1. The solid-state fermentation was carried out using two local agro industrial residues: açai seeds and rice bran (SAFA) [9:1]. The mixture (50 g, 60% humidity and pH 6.0) was distributed in 500 mL Erlenmeyer flasks and sterilized at 121°C for 15 min. After cooling, the flasks were inoculated using the same spore solutions (inoculums) of the submerged fermentation. The flasks were maintained at 30°C for 5 days. The enzymes were extracted by adding 250 mL of sterilized distilled water and submitted to agitation (180 rpm) for one hour. The biomass was separated from the crude extract by vacuum filtration on Whatman filter paper number 1.

Proteolytic activity assay

The proteolytic activity was determined according to the

*Corresponding author. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br.

Table 1. Submerged fermentation media based on a mineral solution (MA01).

Medium	Medium composition (g.L ⁻¹)
MA01	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)
MAGli	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), Glucose (10)
MASac	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), Sucrose (10)

MA01 = Mineral solution base medium; MAGli = Mineral solution base medium+glucose; MASac = Mineral solution base medium+sucrose.

method described by Leighton et al. (1973). The crude extracts (0.15 mL) were mixed with 1.0% (w/v) azocasein (0.25 mL) in 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 7.0. The incubation was made in absence of light for one hour. The reaction was stopped by adding 1.2 mL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), centrifuged at 10 000 rpm and the supernatant (0.8 mL) was transferred to 1.4 mL of 1 M NaOH. One unit of proteolytic enzyme was defined as the amount of enzyme that produces a 0.1 increase of absorbance in 1 h at 440 nm. All samples were prepared in triplicate.

Milk-clotting protease assay

Milk-clotting activity was determined according to Alecrim et al. (2015) using 10% (w/v) skimmed milk powder in 0.05 M CaCl₂, as substrate. The milk solution (5 mL) were distributed in test tubes and pre-incubated in water bath at 50°C for 15 min. The enzyme extract (0.5 mL) was added to the milk solution and the clot formation was observed while manually rotating the test tube. The time, in seconds, at which the first particles were formed was measured. All samples were prepared in triplicate.

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

Where, 2400 is the total time of milk-clotting activity (s), S is the milk volume (mL), E is the enzyme volume (mL) and T is the time of clotting formation (s). The samples were grouped into two classes according to the formation of compact milk clot and milk whey separation in the test tube: strong milk coagulation (distinct clot and abundant whey) and weak milk coagulation (clot formation without clear separation of the whey).

Statistical analysis

In all experiments, the data were subjected to descriptive statistical analysis of variance and the averages were compared by Tukey's test ($p < 0.05$) using Minitab program, version 17.0. (Minitab, 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

Aflatoxin test by ammonia vapor

A. flavo furcatis DPUA 1608 did not produce aflatoxin in

any of the media tested (Figure 1). In the colony reverse, the change of color induced by ammonia vapor was not observed. Saito and Machida (1999) observed the change of color in 13 strains of *A. parasiticus* and in 55 strains from 83 of *A. flavus* while the strains of *A. oryzae* (19 strains) and *Aspergillus sojae* (5 strains) did not produce aflatoxin.

Aflatoxins have been studied because of the possible hazards to human health. They commonly are produced by *A. flavus* and *A. parasiticus*. In the study of Kulkarni and Chavan (2015), nine of twelve isolates of *A. flavus* (three maize varieties), showed the aflatoxin production represented (75%) by thin layer chromatography (TLC) method. However, in the same study, the aflatoxin production was also detected by the ammonia vapor test. In this test, only one isolate was found to be non-toxicogenic.

Nair et al. (2014) also reported aflatoxin production by the ammonia vapor test in *Aspergillus* strains isolated from spice samples that previously were considered positive by HPLC analysis. The ammonia vapor test was also effective and considered easy and not expensive in the study of Zrari (2013). The author isolated strains of *Aspergillus* spp. showed both aflatoxigenic and non-aflatoxigenic classifications.

The result of the present study in respect to *A. flavo furcatis* DPUA 1608 is important due the intention to implicate the enzymes of this fungus in food industry. Another test might be done to consider it as safe or GRAS as citotoxic tests *in vitro* (*Artemia salina* and hemolysis, for example).

"GRAS" is an acronym for the phrase generally recognized as safe. Under sections 201(s) and 409 of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (the Act), any substance that is intentionally added to food is a food additive, that is subject to premarket review and approval by FDA, unless the substance is generally recognized, among qualified experts, as having been adequately shown to be safe under the conditions of its intended use, or unless the use of the substance is otherwise excluded from the definition of a food additive (FDA, 2016).

Protease production and milk-clotting activity

In this study, *A. flavo furcatis* synthesized and excreted

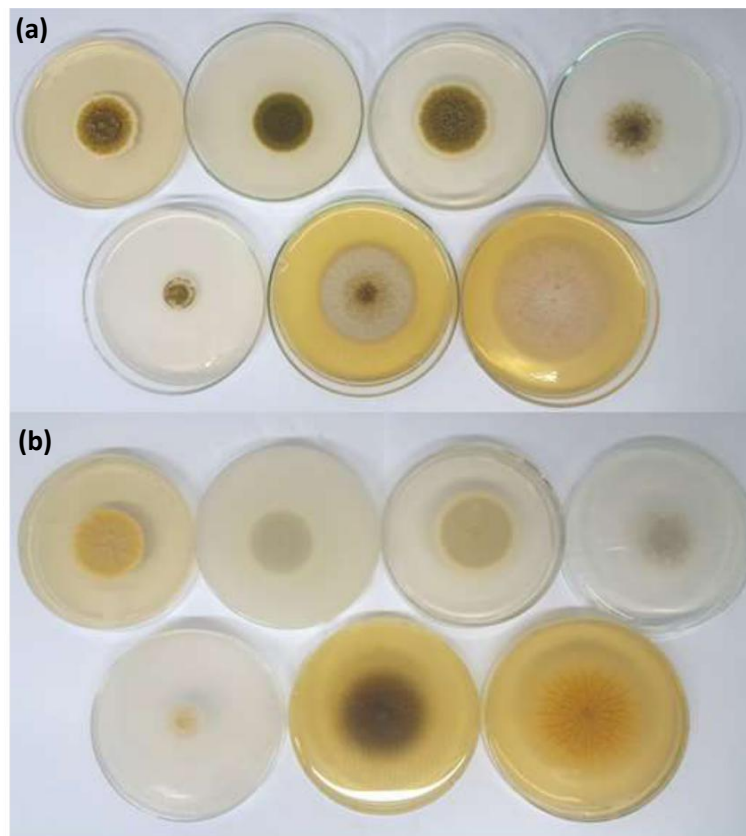


Figure 1. Results of aflatoxin production by ammonia vapor test. Front (a) and reverse (b) of *A. flavo furcatis* in BDA, COA, CYA, CZ, GMS, PMS and YES plates, respectively (from the top to the bottom).

proteases from all media of submerged and solid-state fermentation (Table 2). Comparing the media and inoculums used in submerged fermentation, the proteolytic activity was higher in the media supported with mineral solution base (MA01) in the inoculums SAB+SAC, BDA+SAC and BDA+GLI (53.00, 52.40 and 50.66 U/mL, respectively). In the inoculum supported with SAB+GLI, the activity was 0.49 U/mL. In the other two media of submerged fermentation (MAGli and MASAc), the activity was low in all inoculums. In MAGli, the protease activity were 0.75, 0.75, 0.88 and 0.93 U/mL (SAB+GLI, SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC, respectively) and in MASAc, the proteases activity were 0.67, 0.84, 0.71 and 1.53 U/mL (SAB+GLI, SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC, respectively). In the media of solid fermentation, the proteolytic activity was determined in all crude extracts from the inoculums used: SAB+GLI, SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC (17.31, 16.97, 13.27 and 13.60 U/mL, respectively).

The milk-clotting activity was determined in all crude extracts for the submerged and solid fermentation. However, in the submerged fermentation, according to

the classification of coagulation established, the milk strong coagulation was observed only in the mineral solution base media (MA01) (Figure 2A) (inoculums SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC). The other crude extracts of submerged fermentation (MAGli and MASAc) also promoted milk clotting activity but it was considered as weak milk coagulation (Figure 2B). In the solid-state fermentation, the milk coagulation was observed in all crude extracts using açai seeds and rice bran (inoculums SAB+GLI, SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC).

Alecrim et al. (2015) observed similar results of milk coagulation using the same strain in submerged fermentation with agro industrial residues as substrates. The authors reported three classifications of milk-clotting: strong milk coagulation, weak milk coagulation and milk without coagulation. The statistical analysis of milk-clotting activity and coagulant ratio were made only with the results of the crude extracts (submerged and solid fermentation) that showed milk strong coagulation in the visual classification: MA01 (Inoculums SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC) and SAFA (Inoculums SAB+GLI, SAB+SAC, BDA+GLI and BDA+SAC).

Table 2. Protease activity (U/mL), milk-clotting activity (U), coagulant ratio (R) and clot classification of *A. flavo furcatis* DPUA 1608 enzymes produced in submerged and solid-state fermentation.

Media / Inoculum	Proteolytic activity (U/mL)	Milk-clotting activity (U)	Coagulant Ratio (R)	Clot Classification	
Submerged fermentation	MA01 (SAB+GLI)	0.49±0.10 ^f	45.80	93.7	Weak
	MA01 (SAB+SAC)	53.00±0.07 ^a	470.71±9.23 ^c	8.90±0.20 ^e	Strong
	MA01 (BDA+GLI)	50.66±0.11	507.09±6.14 ^b	10.03±0.11 ^{d,e}	Strong
	MA01 (BDA+SAC)	52.40±0.35 ^a	595.12±8.45 ^a	11.33±0.21 ^d	Strong
	MAGli (SAB+GLI)	0.75±0.04 ^{e,f}	122.11	161.60	Weak
	MAGli (SAB+SAC)	0.76±0.75 ^{e,f}	107.35	142.10	Weak
	MAGli (BDA+GLI)	0.89±0.07 ^{e,f}	199.21	224.10	Weak
	MAGli (BDA+SAC)	0.93±0.00 ^{e,f}	188.25	201.70	Weak
	MASac (SAB+GLI)	0.67±0.00 ^{e,f}	110.31	165.50	Weak
	MASac (SAB+SAC)	0.84±0.07 ^{e,f}	195.95	232.00	Weak
	MASac (BDA+GLI)	0.71±0.03 ^{e,f}	192.80	271.10	Weak
	MASac (BDA+SAC)	1.54±0.11 ^e	254.17	165.80	Weak
	Solid-state fermentation	SAFA (SAB+GLI)	17.31±0.19 ^c	389.70±17.8 ^e	22.53±0.93 ^b
SAFA (SAB+SAC)		16.98±0.27 ^c	428.66±7.66 ^d	25.27±0.59 ^a	Strong
SAFA (BDA+GLI)		13.27±1.04 ^d	247.63±8.67 ^f	18.70±0.87 ^c	Strong
SAFA (BDA+SAC)		13.60±0.35 ^d	273.00±10.5 ^f	20.07±0.66 ^c	Strong

Means followed by the same letters in the columns did not differ from one another by the Tukey's test ($p < 0.05$) / (\pm) = st. dev./ DPUA= Code of Culture Collection from Federal University of Amazonas/MA01 = Mineral solution base medium; MAGli = Mineral solution base medium+glucose; MASac = Mineral solution base medium+sucrose; SAFA= Açai seeds+rice bran/ Inoculums: SAB+GLI= Glucose+Peptone; SAB+SAC= Sucrose+Peptone; BDA+GLI= Potato+Glucose; BDA+SAC= Potato+Sucrose; NMCA= No milk-clotting activity.

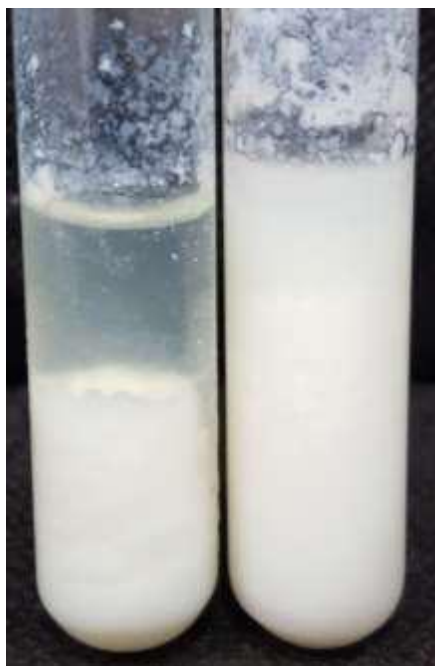


Figure 2. Classification of the samples according to clot and whey formation: (A) Strong milk coagulation (B) Weak milk coagulation.

The milk-clotting activity of *A. flavo furcatis* crude extracts were more significant in the submerged fermentation as compared to the solid state fermentation. From the inoculums used in the submerged fermentation, the most significant milk-clotting activity was BDA+SAC (595.12 U) followed by BDA+GLI and SAB+SAC (507.09 and 470.71 U, respectively). In the solid-state fermentation, the most significant inoculums to milk-clotting activity was SAB+SAC (428.66 U), followed by SAB+GLI, BDA+SAC and BDA+GLI (389.70 U, 273.00 U and 247.63 U) (Table 2).

Ayana et al. (2015) reported the production of milk-clotting enzymes by *Mucor mucedo* in liquid medium containing glucose, peptone, casein, KHPO, olive cake and corn steep liquor. *Aspergillus tamari* and *Penicillium pinophilum* also demonstrated great milk-clotting protease production in liquid medium containing whey as one of the main substrates (Benlounissi et al., 2014). In the study of Bensmail et al. (2015), *A. niger* produced proteolytic enzymes with wheat bran as substrate in submerged and solid-state fermentation. Castro et al. (2014) also studied milk-clotting enzymes secreted by *A. niger*. The authors used wheat bran, soybean meal and cottonseed meal as substrates in solid-state fermentation.

Solid state fermentation an appropriate method

because solid substrates resemble the natural habitat of fungi improving their growth and enzymes production. The simplicity, low cost, high yields and concentrations of the enzyme sand are some of the advantages of this process (Castro et al., 2014).

However, in submerged fermentation, the conditions are monitored with greater accuracy as compared to solid state fermentation. Almost all the large-scale enzyme producing facilities are using the proven technology of submerged fermentation due to better monitoring and ease of handling (Singhania et al., 2010). Both submerged and solid-state fermentation are suitable for use of inexpensive and widely agricultural residues as substrates (Sumantha et al., 2006)

According to coagulant ratio (R), there was significant difference between the inoculums used on submerged fermentation and solid state fermentation. In the solid state fermentation, the most significant value (25.27) was observed in the inoculums supported with SAB+SAC followed by SAB+GLI, BDA+SAC and BDA+GLI (22.53, 20.06 and 18.70, respectively) (Table 2). In the submerged fermentation inoculums, the highest value of coagulant ratio was observed in BDA+SAC (11.33), followed by BDA+GLI (10.03) and SAB+SAC (8.90).

The coagulant ratio (R) demonstrates the potential commercial suitability of milk-clotting enzyme in cheese manufacturing.

Enzymatic preparations used for milk clotting usually exhibit proteolytic action, but is important that the enzymes have specificity of cleavage (Phe₁₀₅-Met₁₀₆ connection of casein). It defines a good coagulant (Perry, 2004; Visser, 1993; Barros et al., 2001; Hashem, 1999; Merheb-Dini et al., 2010; Yegin et al., 2011).

Conclusions

The strain of *A. flavo furcatis* does not produce aflatoxin in the media tested by the ammonia vapor method. The color change in the reverse of colonies was not observed. Proteolytic milk-clotting enzymes were produced by *A. flavo furcatis* in submerged and solid fermentation media. In submerged fermentation, MA01 was the medium that promoted the highest activity of these enzymes in three of the inoculums used. In solid fermentation, açai seeds and rice bran showed potential as substrates to produce proteolytic milk-clotting enzymes by the microorganism.

The coagulant ratio was higher in crude extracts from solid fermentation than the submerged fermentation. The inoculums used in the process promoted the production of milk-clotting proteases. In submerged fermentation, the best inoculum was BDA+SAC (MA01) and in solid fermentation, the best inoculum was SAB+SAC.

The properties of *A. flavo furcatis* enzymes in this study encourage future milk-clotting characterization and cheese production experiments to check its potential as microbial coagulant source.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Alecrim MM, Palheta RA, Teixeira MFS, Oliveira IMA (2015). Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonian fruit waste. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50(1):151-157.
- Ayana IAAA, Ibrahim AE, Saber WIA (2015). Statistical optimization of milk clotting enzymes biosynthesis by *Mucor mucedo* KP736529 its further application in cheese production. *Int. J. Dairy Sci.* 1 (2):61-76.
- Barros RM, Ferreira CA, Silva SV, Malcata FX (2001). Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by cardosins precipitates by ammonium sulfate. *Enz. Microb. Technol.* 29(8):541-547.
- Benlounissi A, Mechakra-Maza A, Blum LJ, Marquette CA (2014). Identification and characterization of milk-clotting proteases produced by two species of mold. *Afr. J. Biotechnol.* 13(11):1275-1280.
- Bensmail S, Mechakra A, Fazouane-Naimi F (2015). Optimization of milk-clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus niger* FFB1 solid-state fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 5:467-472.
- Blankson GK, Mill-Robertson FC (2016). Aflatoxin contamination and exposure in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in greater Accra, Ghana. *Food Contr.* 64:212-217.
- Castro RJS, Nishide TG, Sato HH (2014). Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. *Biocat. Agric. Biotechnol.* 3:236-245.
- FDA (2016). U.S. Food and Drug Administration (Access on 05/10th/2016). <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>.
- Hashem A M (1999). Optimization of milk-clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Biores. Technol.* 70:203-207.
- Kamika I, Ngbolua K-te-N, Tekere M (2016). Occurrence of aflatoxin contamination in maize throughout the supply chain in the Democratic Republic of Congo. *Food Contr.* 69:292-296.
- Klich MA, Pitt JI (1988). A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 116p.
- Kulkarni AU, Chavan AM (2015). Culture characteristics and aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* from maize grains. *Sci. Res. Reporter* 5:24-29.
- Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973). The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 76(1):103-122.
- Mandujano-González V, Villa-Tanaca L, Anducho-Reyes MA, Mercado-Flores Y (2016). Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Rev. Iberoame. Micol.* 33(2):76-82.
- Merheb-Dini C, Gomes E, Boscolo M, Da Silva R (2010). Production and characterisation of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31). *Food Chemist.* 120:87-93.
- Minitab (2010). Minitab Statistical Software. LEAD Technologies, Inc. Version 16.0.
- Nair SC, Bhagobaty RK, Nampoothiti K, Kalaigandhi V, Menon KRK (2014). Detection of aflatoxin production by fungi in spice samples using HPLC and direct visual cultural methods. *Innov. Roman. Food Biotechnol.* 14:1-12.
- Perry KSP (2004). Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. *Quim. Nova.* 27:293-300.
- Raper KB, Fennell DI (1977). The Genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Company, New York, 686 p.
- Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.* 40:2689-2694

318 Afr. J. Microbiol. Res

- Saito M, Machida S (1999). A rapide identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience* 40: 205-208.
- Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enz. Microb. Technol.* 46:541-549.
- Sumantha A, Larroche C, Pandey A (2006). Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44:211-220.
- Teixeira MFS, Alecrim MM, Palheta RA, Silva TA, Porto ALF (2012). 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.
- Visser S (1993). Symposium: Proteolytic enzymes and cheese ripening. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J. Dairy Sci.* 76:329-350.
- Yegin S, Fernandez-Lahore M, Salgado AJG, Guvene U, Goksungur Y, Tari C (2011). Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:949-960.
- Zrari TJO (2013). Detection of aflatoxin from some *Aspergillus* sp. isolated from wheat seeds. *J. Life Sci.* 7:1041-1047.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

Artigo 2: “Caracterização de enzimas coagulantes do leite bovino produzidas por
Aspergillus flavo furcatis DPUA 1608”

Caracterização de enzimas coagulantes do leite bovino produzidas por *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608

Mircella Marialva Alecrim, Salomão Rocha Martim, Maria Francisca Simas Teixeira

Resumo

As proteases coagulantes do leite são importantes enzimas utilizadas na indústria de laticínios. Devido à crescente demanda para a produção de queijo, ao aumento do preço do coalho animal e a questões culturais, a pesquisa por fontes coagulantes alternativas, dentre elas as microbianas, se faz necessário. O objetivo deste trabalho foi o de investigar a produção de proteases coagulantes do leite por *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 sob diferentes condições de fermentação submersa. As enzimas foram caracterizadas, através das atividades proteolítica e coagulante do leite, quanto ao pH e temperatura (atividade ótima e estabilidade) e efeito de íons metálicos e inibidores. As enzimas coagulantes do leite foram mais bem produzidas em meio de fermentação submersa de acordo com os seguintes parâmetros: idade (5 dias) e tamanho do inóculo (10^6 esporo/mL de meio), pH inicial do meio (pH 7), tempo de fermentação (3 dias), temperatura de fermentação (30°C), agitação (150 rpm), fonte de carbono (amido 0,1% (p/v) e nitrogênio (peptona 0,1% (p/v)). De acordo com a atividade proteolítica, as enzimas apresentaram atividade ótima em pH 7, a 50°C. Elas foram estáveis até 40°C e do pH 5 ao 9. Os íons Zn^{2+} e Cu^{2+} promoveram a maior redução da atividade e ácido iodoacético foi o inibidor de maior interferência. Para a atividade coagulante do leite, as enzimas foram mais ativas em pH 7 e temperatura de 45°C. Elas se mantiveram estáveis do pH 5 a 9 e temperatura de 25 a 55°C. Os íons Zn^{2+} e K^+ promoveram aumento da atividade e novamente ácido iodoacético foi o inibidor de maior interferência, caracterizando as enzimas como cisteína proteases. Este estudo evidencia que *Aspergillus flavo furcatis* DPUA1608 tem potencial como coagulante microbiano na indústria de laticínios, para a fabricação de queijo.

Palavras-chave: protease, *Aspergillus*, caracterização enzimática..

Abstract

Milk-clotting proteases are important enzymes used in the dairy industry. Due to the increasing demand for cheese production, the increase in the price of animal rennet and cultural issues, the search for alternative coagulating sources, among them microbial, is necessary. The objective of this work was to investigate the production of milk coagulant proteases by *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 under different submerged fermentation conditions. The enzymes were characterized, through the proteolytic and milk coagulant activities, as to pH and temperature (optimum activity and stability) and effect of metallic ions and inhibitors. The milk coagulant enzymes were best produced in submerged fermentation medium according to the following parameters: age (5 days) and inoculum size (10^6 spores/ml medium), initial pH of the medium (pH 7), Fermentation (3 days), fermentation temperature (30°C), stirring (150 rpm), carbon source (0.1% (w / v) starch and nitrogen (peptone 0.1% (w / v)). According to the proteolytic activity, the enzymes presented optimum activity at pH 7 at 50 °C. They were stable up to 40 °C and pH 5 to 9. The Zn^{2+} and Cu^{2+} ions promoted the greatest reduction of activity and iodoacetic acid was the Inhibitor of higher interference For the milk coagulant activity, the enzymes were more active at pH 7 and temperature of 45 °C. They remained stable from pH 5 to 9 and temperature from 25 to 55 °C. Zn^{2+} and K^+ Promoted increased activity and again iodoacetic acid was the inhibitor of greater interference, characterizing the enzymes as cysteine protease This study shows that *Aspergillus flavo furcatis* DPUA1608 has potential as a microbial coagulant in the dairy industry for the manufacture of cheese.

Keywords: protease, *Aspergillus*, enzyme characterization.

Introdução

Coagulantes microbianos, especialmente os produzidas por fungos, são utilizados na fabricação de queijo desde 1960. Entretanto, diversas pesquisas ainda são realizadas com a finalidade da identificação de novos coagulantes do leite devido à necessidade de substituição da quimosina, de origem animal, na fabricação de queijo (RAY e ROSELL, 2017).

Coagulante é a denominação aplicada a qualquer preparação enzimática de animais, plantas ou micro-organismos que coagula o leite e desempenha função importante na elaboração do queijo. Destas fontes, os micro-organismos são alternativas viáveis em função do baixo custo de produção, da diversidade bioquímica e são de fácil manipulação genética (SHAH et al., 2014; AYANA et al., 2015; AHMED et al., 2016).

Cerca de um terço da produção mundial de queijo vem sendo realizada com coagulantes de fonte microbiana. *Rhizopus microsporus*, *Mucor* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus flavo furcatis*, *Penicillium* sp. e *Pleurotus albidus* são reportados como produtores de coagulantes e as enzimas de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusilus*, *Aspergillus oryzae* e *Endothia parasítica* já são utilizadas comercialmente (ALECRIM et al., 2015; MARTIM et al., 2017; NARWAL et al., 2017).

Enzimas coagulantes extracelulares são comumente produzidas por fungos em condições *in vitro* através tecnologia da fermentação, utilizando meio líquido ou em matriz sólida. Nesses bioprocessos diversas espécies exigem condições nutricionais e físico-químicas adequadas para síntese dessas enzimas, tais como fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, aeração, luminosidade, densidade do inóculo e tempo de crescimento microbiano (SOUZA et al., 2015; RHODES e STANBURY, 1997)

Sendo assim, a utilização de meios de cultura específicos são condições que contribuem para o aumento, predominantemente significativo, e para o rendimento enzimático. Dessa forma, a otimização das condições de produção também tem grande relevância para a redução dos custos do bioprocesso (NASCIMENTO et al., 2007; LADEIRA et al., 2010; NARWAL et al., 2017).

A produção de enzimas microbianas está sendo um processo importante para indústria considerando os altos desempenhos desses biocatalizadores. Portanto, o desenvolvimento de pesquisas para selecionar novas fontes microbianas de enzimas

utilizando tecnologias “eco amigáveis” são parâmetros que beneficiam a comercialização desses biocompostos (SINGH et al., 2016; UDDIN et al., 2016).

Esta pesquisa foi realizada com objetivo de identificar por fermentação submersa condições nutricionais e físico-químicas que influenciam na produção de proteases coagulantes do leite bovino por *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 e posterior caracterização parcial.

Material e Métodos

Micro-organismo

Para a produção de enzimas coagulantes do leite foi selecionada a linhagem de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, cedida pela Coleção de Culturas da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. A espécie foi reativada em Caldo glicosado 2% (p/v). Após crescimento, a cultura estoque foi repicada para meio contendo (p/v): Glicose 1.0%, Peptona de carne 1.0% e Ágar 1.5% (Sabouraud-SAB), incubadas a 30 °C por 7 dias (TEIXEIRA et al., 2011).

Fermentação submersa

Aspergillus flavo furcatis DPUA 1608 foi cultivado em meio de fermentação submersa para avaliar a influência da idade e tamanho do inóculo, tempo de fermentação, temperatura de fermentação, velocidade de agitação, pH inicial do meio e concentração de fontes de carbono e nitrogênio. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Meio de cultivo

O meio de fermentação submersa para a produção de proteases coagulantes foi preparado com a seguinte solução salina (MA01)(g/L): [KH₂ PO₄ (2.0); (NH₄)SO₄ (1.0); MgSO₄.7H₂O (0.1); Na₂HPO₄.7H₂O (0.9); Extrato de levedura (1.0), Gelatina (5.0)].

Determinação da influência da idade e tamanho do inóculo

Para a padronização da idade do inóculo, *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 foi cultivado no meio de inóculo ágar batata sacarose (BDA+SAC), em tubos de ensaio. Os cultivos foram mantidos a 30° C durante 3, 5, 7, 9, 11 e 13 dias. Foi preparada uma

suspensão celular do cultivo. Dessa suspensão foi retirado volume equivalente a 10^5 esporos/ mL e semeado em 50 mL dos meios de fermentação. Na determinação do tamanho do inóculo foram retirados, da suspensão celular, volumes equivalentes a 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 esporos/mL, respectivamente, e semeados em 50 mL do meio. As fermentações foram conduzidas a 30 °C, 180 rpm. Após 72 horas, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração à vácuo em papel de filtro Whatman nº 1. Nos extratos brutos recuperados foram determinadas as atividades proteolítica e coagulante.

Avaliação da influência do tempo e temperatura de fermentação, velocidade de agitação e pH inicial do meio

Aspergillus flavo furcatis DPUA 1608 foi cultivado no meio de inoculo (BDA+SAC), em tubos de ensaio. Os cultivos foram mantidos a 30 °C por 7 dias. Foi preparada suspensão celular dos cultivos. Dessa suspensão foi retirado volume equivalente a 10^5 esporos/mL e semeado em 50 mL do meio. Para a determinação do tempo de fermentação, o bioprocessos foi conduzido a 30 °C, sob agitação de 180 rpm, durante 24, 48, 72, 96 e 120h (1, 2, 3, 4 e 5 dias). Para verificar a influência da temperatura de fermentação na produção de enzimas, foram avaliadas as temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C, sob agitação de 180 rpm, durante 72 horas. Para avaliar a velocidade de agitação, o processo fermentativo foi conduzido a 30 °C, sob agitação de 150, 180 e 200 rpm durante 72 horas. Para verificar a influência do pH do meio, foi retirado volume da suspensão celular equivalente a 10^5 esporos/ mL e semeado em 50 mL dos meios de fermentação com pH inicial ajustado para 4, 5, 6, 7 e 8. A fermentação foi conduzida a 30 °C, sob agitação de 180 rpm, durante 72 horas.

Ao final de todos os processos fermentativos, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração à vácuo em papel de filtro Whatman nº 1. Nos extratos brutos recuperados foram determinadas as atividades proteolítica e coagulante.

Determinação do efeito de fontes de carbono e nitrogênio na produção de proteases coagulantes

Para avaliar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de enzimas coagulantes do leite, a fermentação submersa foi conduzida utilizando a solução

salina como meio (MA01). O meio foi suplementado com as seguintes fontes de carbono: glicose, sacarose e amido e; nitrogênio: peptona, extrato de levedura e gelatina. Esses nutrientes foram adicionados nas concentrações de 0,1%, 0,2% e 0,5% (p/v). Nestes experimentos o inóculo foi preparado em BDA+SAC, em tubos de ensaio. Os cultivos foram mantidos a 30 °C por 7 dias. Nestes cultivos foi adicionada água destilada esterilizada para obtenção de uma suspensão celular. Da suspensão foi retirado volume equivalente a 10^5 esporos/ mL e semeado em 50 mL dos meios de fermentação. A fermentação foi conduzida a 30°C, 180 rpm, durante 72 horas.

Após o bioprocesso, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração à vácuo em papel de filtro Whatman nº 1. Nos extratos brutos recuperados foram realizadas as atividades proteolítica e coagulante do leite.

Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada segundo a metodologia descrita por Leighton *et al.*, (1973). O extrato bruto (150 µL) foi adicionado em tubo tipo Falcon contendo 250 µL de substrato [azocaseína a 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2]. Após 60 minutos de incubação a 25° C, na ausência de luz, a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) e o resíduo remanescente foi removido por centrifugação a 8000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirados 0,8 mL e adicionados em 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M. A leitura foi realizada a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzimas capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1 em uma hora.

Determinação da atividade coagulante do leite

Para a determinação da atividade coagulante foi utilizado leite desnatado em pó como substrato, conforme a metodologia descrita por Alecrim *et al.*, (2017). A solução de leite desnatado 10% (p/v) foi preparada com CaCl₂ 0,05M, homogeneizando-se em agitador magnético até a completa dissolução do leite. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1M. Uma amostra de solução do leite igual a 5mL foi distribuída em tubos de ensaio e mantida a 40° C em banho de água circulante. Após 15 minutos, foi RAM adicionados 0,5mL do extrato enzimático bruto. A atividade coagulante foi determinada

como positiva através visualização da formação de coágulos na parede do tubo de ensaio em até 40 minutos. O tempo final da coagulação foi determinado com cronômetro digital. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O resultado qualitativo da atividade coagulante foi expresso com base na formação de coágulo e a forma de separação do soro do leite visualizado nos tubos de ensaio em: **coagulação forte** (coágulo distinto e soro abundante) e **coagulação fraca** (coagulação sem separação visual de soro).

A unidade de atividade de coagulação (U) foi definida como a quantidade de enzima, presente no volume do extrato, que coagula o volume de substrato em 40 minutos, a 40° C (Equação I).

$$\text{Equação I} \quad U = \frac{2400}{T} \times \frac{V}{v}$$

Onde:

2400 = Tempo total de espera da atividade coagulante, em segundos (40 minutos)

V= Volume de leite utilizado, em mL

v = volume do extrato enzimático adicionado, em mL

T= Tempo de coagulação da amostra, em segundos.

Caracterização enzimática

O extrato que apresentou atividade coagulante significativa e classificação da coagulação como forte foi utilizado para a caracterização de suas enzimas. Foram determinados o efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade das enzimas de acordo com a atividade proteolítica (enzimas proteolíticas) e coagulante (enzimas coagulantes do leite), além de avaliar o efeito de íons metálicos e inibidores enzimáticos Martim et al. (2017). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Determinação do efeito da temperatura e pH na atividade das enzimas proteolíticas

A temperatura ótima de atividade foi avaliada em diferentes faixas (25° C a 80° C), utilizando solução de azocaseína 1% (p/v) (diluída em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,2) como substrato. O pH ótimo foi avaliado nas faixas de 4 a 10, em azocaseína 1% (p/v) diluída nos seguintes tampões (0,1 M): Citrato (pH 4), Acetato (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7

e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10). Todos os sistemas de reação e o branco foram incubados por uma hora, na ausência de luz e em seguida foi determinada a atividade proteolítica.

Determinação do efeito da temperatura e do pH na estabilidade das enzimas proteolíticas

Para testar a estabilidade térmica e de pH, o substrato azocaseína 1% (p/v) foi diluído em tampão de pH de atividade ótima determinado.

O extrato bruto foi incubado nas diferentes temperaturas (25° C a 80° C) durante 30 minutos. Após este período, foi adicionado o substrato e a reação foi mantida, na temperatura ótima de atividade, durante 60 minutos, na ausência de luz. A estabilidade ao pH foi realizada incubando o extrato bruto em todos os tampões [Citrato (pH 4), Acetato (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10)], na proporção 1:1, durante 30 minutos. Após este período, as amostras foram incubadas em azocaseína 1% (p/v) durante 60 minutos, na ausência de luz, na temperatura ótima. A atividade proteolítica foi determinada.

Determinação do efeito de íons metálicos e inibidores na atividade das enzimas proteolíticas

O efeito de inibidores e íons metálicos foi determinado utilizando soluções de 0,1M de cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de cobre (CuSO₄), sulfato ferroso (FeSO₄), sulfato de zinco (ZnSO₄), ácido iodoacético, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) e pepstatina A (0,01M). O substrato azocaseína 1% (p/v) foi diluído em tampão de pH de atividade ótima. O extrato bruto foi incubado em todas as soluções durante 30 minutos. Após este período, foi adicionado o substrato e a reação foi mantida na temperatura ótima de atividade, durante 60 minutos, na ausência de luz. Todos os sistemas de reação e o branco foram incubados de acordo com a metodologia de determinação da atividade proteolítica.

Determinação do efeito da temperatura e pH na atividade das proteases coagulantes do leite

Para determinação do pH de atividade ótima da enzima coagulante, foi elaborada uma solução de leite 10% (p/v) nos seguintes tampões (0,1 M): Citrato (pH 4), Acetato (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10). A temperatura ótima de atividade foi avaliada em diferentes faixas (25° C a 80° C), utilizando a solução de leite 10% (p/v) diluída em tampão de pH ótimo, como substrato. Todos os sistemas de reação e o branco foram incubados de acordo com a metodologia de determinação da atividade coagulante.

Determinação do efeito da temperatura e pH na estabilidade das proteases coagulantes do leite

Para testar a estabilidade térmica e de pH, a solução de leite 10% (p/v) foi diluída em tampão de pH de atividade ótima.

A solução de leite foi submetida a diferentes temperaturas (25° C a 80° C). O extrato bruto foi incubado em cada temperatura por 30 minutos. Após este período, foi adicionado na solução de leite. Para a estabilidade ao pH, o extrato bruto foi incubado em todos os tampões [Citrato (pH 4), Acetato (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10)], na proporção 1:1, durante 30 minutos. Após este período, foi adicionado na solução de leite. A reação com o substrato foi realizada na temperatura de atividade ótima. Todos os sistemas de reação e o branco foram incubados de acordo com a metodologia de determinação da atividade coagulante.

Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade coagulante do leite

O efeito de íons metálicos foi determinado utilizando água destilada deionizada para obtenção das seguintes soluções: [0,1M (cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de cobre (CuSO_4), sulfato ferroso (FeSO_4), sulfato de zinco (ZnSO_4)]. Na avaliação de inibidores, ácido iodoacético 0,1M foi diluído em água deionizada; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1M diluído em tampão fosfato pH 7,0; Fluoreto fenilmetilsulfomil (PMSF) 0,1 M diluído em metanol e, pepstatina A 0,01M diluída em etanol P.A.). O substrato solução de leite desnatado 10% (p/v) foi diluído em tampão de pH de atividade ótima. O extrato bruto foi incubado como cada solução de íon

metálico ou inibidor durante 30 minutos. Após este período, foi adicionado o substrato e a reação foi realizada de acordo com a metodologia de determinação da atividade coagulante do leite.

Análise estatística dos dados

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

Resultados e Discussão

Reativação e autenticação de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608

Aspergillus flavo furcatis DPUA 1608, quando cultivado em ágar Czapek a 25 °C, apresentou em sete dias: colônia circular com diâmetro médio de 68 mm, micélio com coloração marrom-oliva a marrom e formação de exudato nos primeiros dias de crescimento. As estruturas observadas sob microscópio óptico foram: vesícula na forma de frasco a subglobosa, de tamanho variado, na extremidade de conidióforo. Na superfície da vesícula, esterigma em duas séries e ocasionalmente pequenas vesículas unisseriadas (com única série de esterigma). Os conídios formados nos esterigmas ou fiálides apresentaram coloração marrom-amarelada, são elípticos a piriformes quando jovens, tornando-se subglobosos a globosos na maturidade e apresentando, na superfície, grânulos pigmentados (Figura 1A a D) (HEDAYATI et al., 2007; RAPER e FENNELL, 1977).

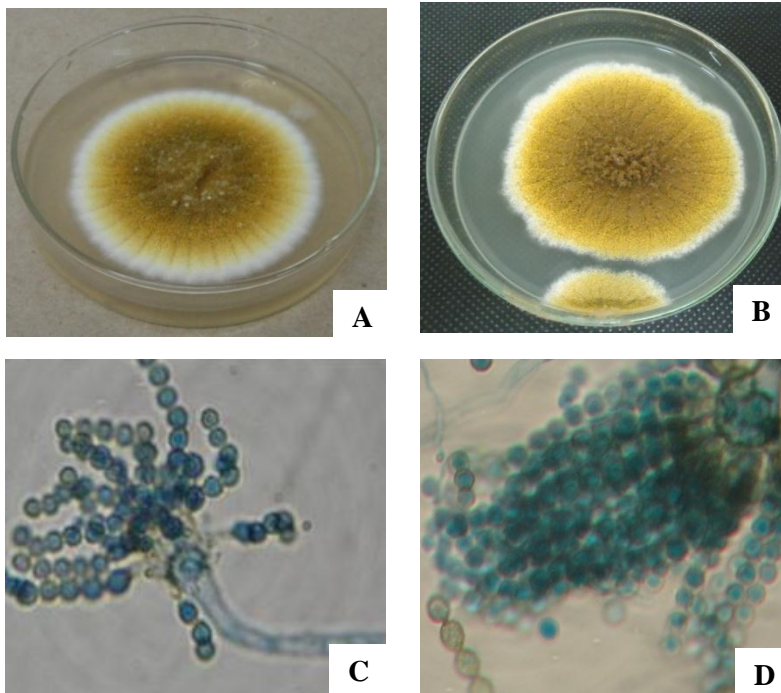


Figura 1. Características macroscópicas (A e B) e microscópicas (C e D) de *Aspergillus flavo-furcatis* cultivado em ágar Czapek.

Identificação dos fatores que influenciam na atividade proteolítica e coagulante do leite

Na fermentação submersa, os resultados dos parâmetros de produção de enzimas por *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1608 estão demonstrados nos gráficos 1 a 7.

De acordo com a determinação da influência da idade e do tamanho do inóculo, em todas as condições de cultivo foi determinada a produção de enzimas proteolíticas e coagulantes do leite. A melhor idade do inóculo para a produção de enzimas proteolíticas foi de 11 dias (43,36 U/mL) (Gráfico 1A), enquanto que, para a produção de enzimas coagulantes do leite foi de 5 dias (260,25 U) (Gráfico 1B). A partir de três dias de crescimento em meio sólido, a atividade coagulantes do leite foi igual a 69,9 U.

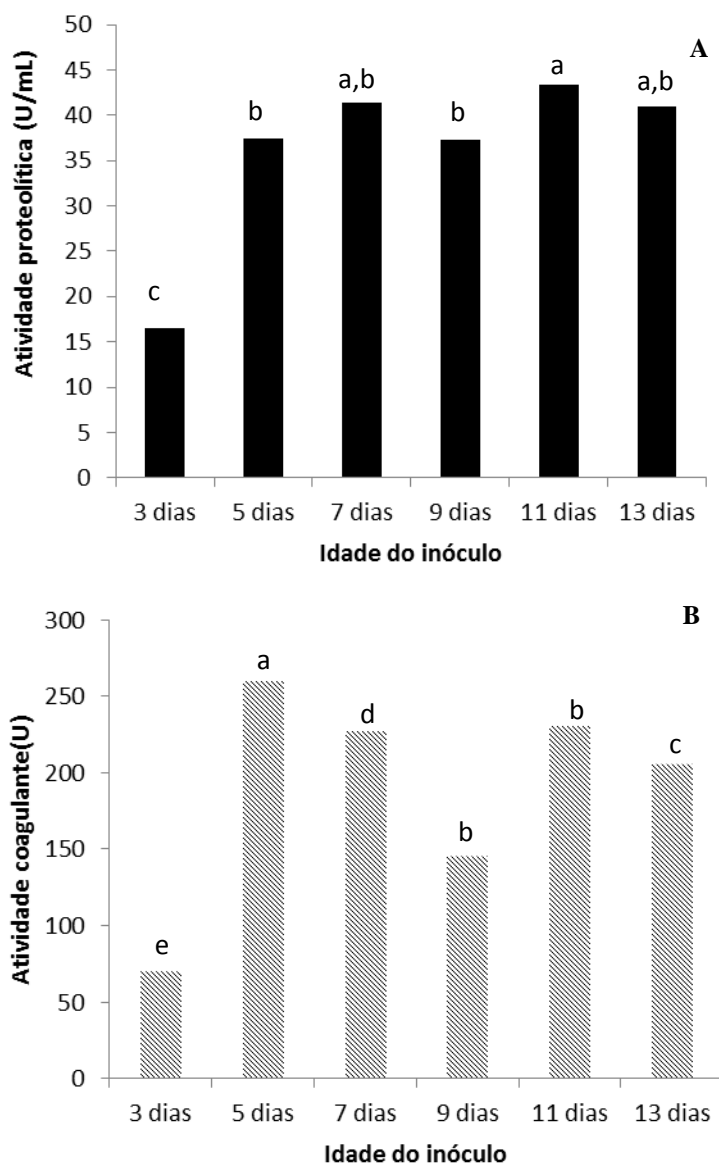


Gráfico 1. Efeito da idade do inóculo na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608. Inóculo cultivado em meio BDA+SAC e volume de 10^5 esporos/mL. Fermentação a 30°C, 180 rpm, 72h, pH inicial do meio 7,0. Letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o Teste de Tukey.

A produção de enzimas proteolíticas foi significativa (39,09 U/mL) quando foi utilizado inóculo de tamanho equivalente a 10^4 esporos/mL de meio (Gráfico 2A). Nas condições similares de fermentação para as enzimas coagulantes, o inóculo de 10^6 esporos/mL de meio, seguido de 10^4 , 10^7 e 10^5 esporos/de meio (Gráfico 2B) foram os que promoveram atividade coagulantes significativa, correspondendo a 216,93 U; 195,12 U; 148,19 U e 120,08 U, respectivamente.

No estudo de Srinubabu et al. (2007), a produção de enzimas por *Aspergillus oryzae* 637 não sofreu influência da idade do inóculo quando foram avaliadas culturas com idades de 0 a 5 dias obtidas em ágar batata dextrose. De acordo com esses autores, não houve efeito significativo desse parâmetro na produção de proteases alcalinas.

Papagianni e Moo-Young (2002) citaram que proteases de *Aspergillus niger* ATCC 13496 apresentaram diferentes valores da produção de proteases em inóculos de 10^5 e 10^8 esporos/mL. Ao final dos experimentos, a concentração dessas enzimas extracelular foi significativamente maior no inóculo de 10^8 esporos/mL.

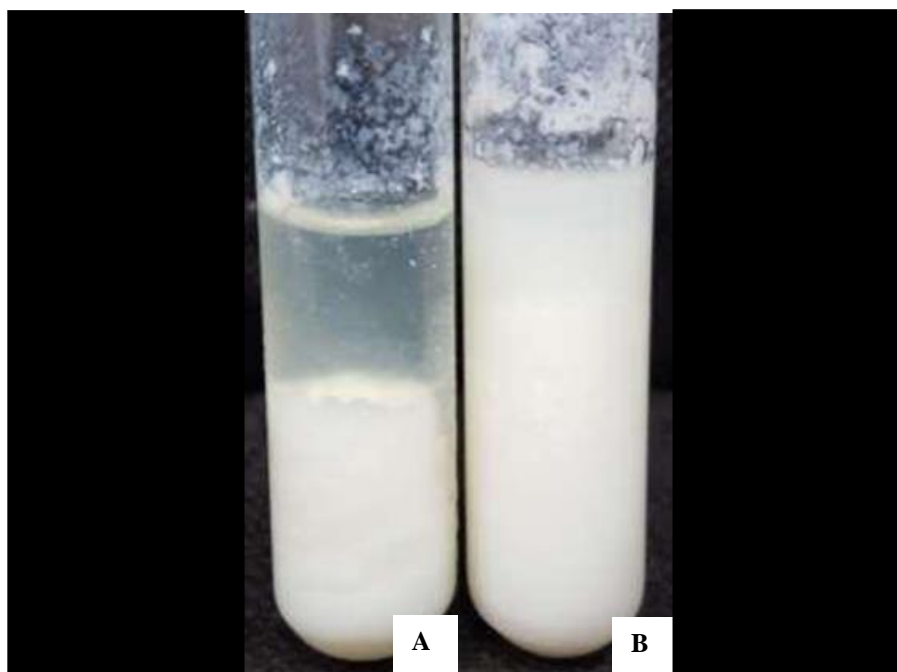


Figura 2. Classificação da coagulação do leite (A) coagulação forte (B) coagulação fraca.

Na pesquisa de Boukhalfa-Lezzar et al. (2014) com *Aspergillus oryzae*, o tamanho mais elevado do inóculo (2mL) não aumentou a produção de enzimas proteolíticas; isto pode ter ocorrido devido ao aumento da concorrência pela fonte de carbono e nutrientes. Assim, um equilíbrio entre o crescimento da biomassa e os nutrientes disponíveis produzirão a máxima produção de enzimas.

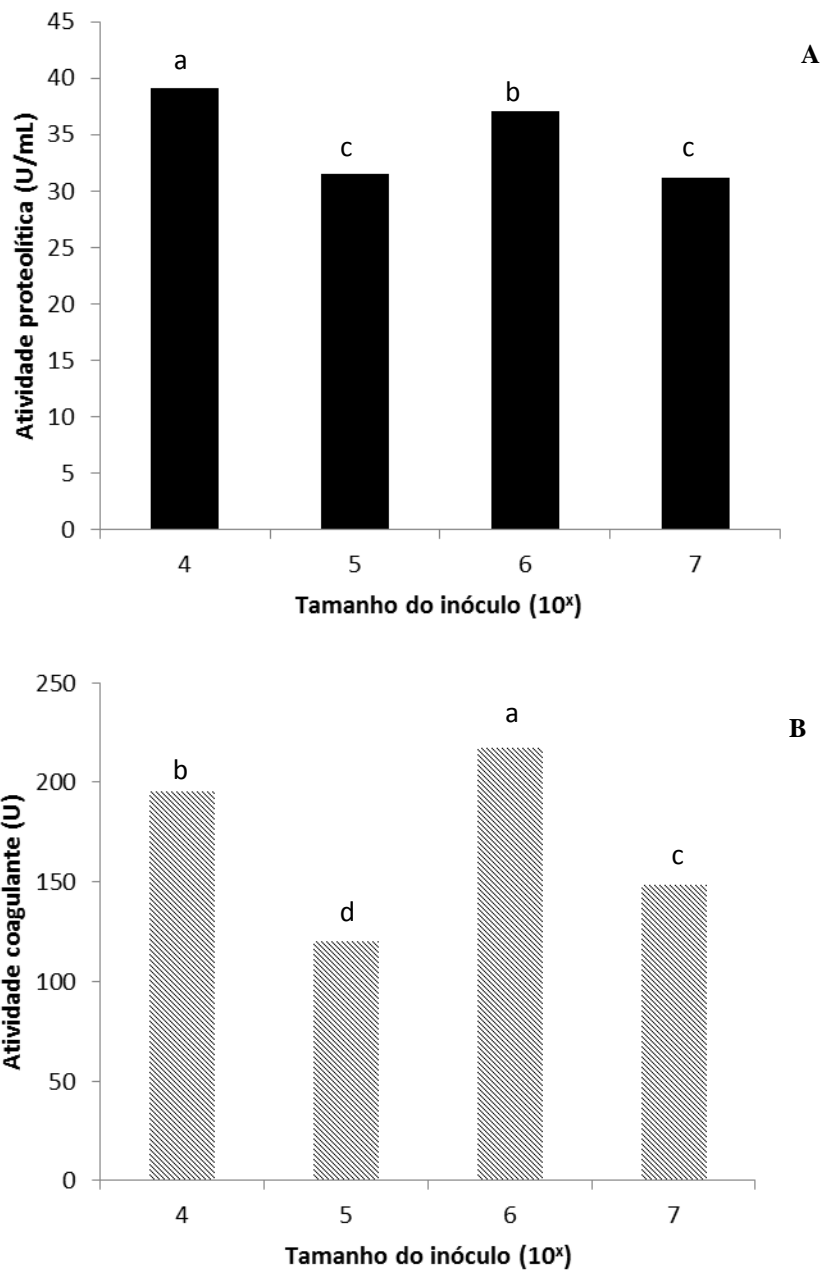


Gráfico 2. Efeito do tamanho do inóculo na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608. Inóculo cultivado em meio BDA+SAC durante 5 dias. Fermentação a 30°C, 180 rpm, 72h, pH inicial do meio 7,0. Letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o Teste de Tukey.

O desenvolvimento e gerenciamento do inóculo através de vários estágios tem um efeito sobre o desempenho e economia do processo fermentativo. Já é um fato conhecido que a idade e densidade do inóculo influenciam a duração da fase lag, taxa de crescimento específico, rendimento da biomassa, esporulação, qualidade do produto final e custo. A

obtenção de um crescimento ótimo no estágio de produção depende principalmente da idade e densidade do inóculo. Ambos os parâmetros estão inter-relacionado e devem ser otimizados em conjunto (SEN e SWAMINATHAN, 2004).

Para o tempo de fermentação, nas análises realizadas com enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, houve atividade de proteases em todos os extratos brutos obtidos por fermentação submersa em 24, 48, 73, 96 e 120 horas. No entanto, a maior atividade proteolítica foi observada em 72 horas e 120 horas, com atividades de 50,33 U/mL e 49,40 U/mL, respectivamente (Gráfico 3A).

A produção de proteases por *Aspergillus oryzae* também foram determinadas após 24 horas. Após 72 horas houve produção máxima e o subsequente declínio na atividade enzimática, de acordo com o aumento do tempo de fermentação, foi justificado pelos autores devido ao término da produção de enzimas (BOUKHALFA-LEZZAR et al., 2014).

Os dados desta pesquisa, com *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, mostraram que a maior atividade coagulante do leite também foi determinada em 72 horas e 120 horas com atividades coagulantes de 409,20 U e 354,75 U, respectivamente (Gráfico 3B). Apesar de ter havido atividade proteolítica com apenas 24 horas de fermentação não houve determinação de atividade coagulante do leite neste mesmo período de fermentação. A partir de 48 horas (219,05 U) foi observada a atividade coagulante do leite pelas enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608.

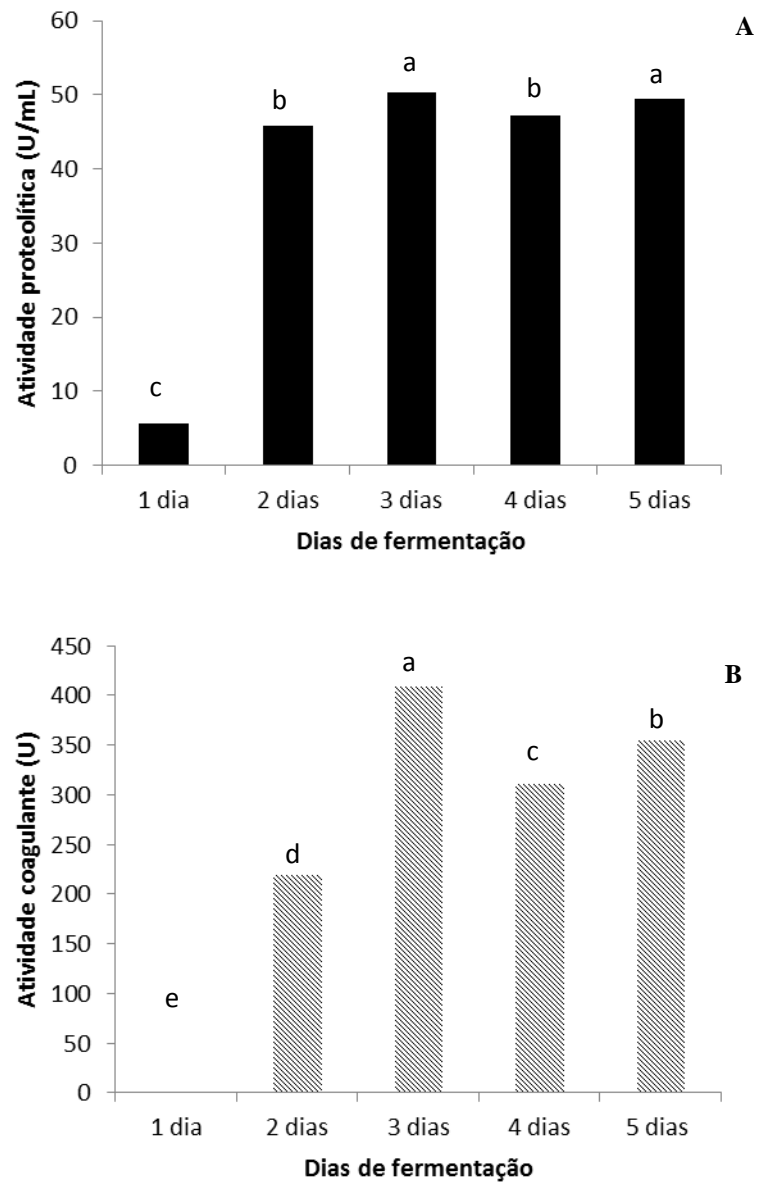


Gráfico 3. Efeito do tempo de fermentação na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608. Inóculo cultivado em meio BDA+SAC durante 5 dias e volume de 10^5 esporos/mL. Fermentação a 30°C, 180 rpm, pH inicial do meio 7,0. Letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o Teste de Tukey.

De acordo com a temperatura, gráfico 4A e B, respectivamente, os resultados mostraram que, as maiores atividades proteolítica (50,38 U/mL) e coagulante (165,94 U) foram determinadas a 30°C. Na temperatura de 40°C, houve determinação da atividade proteolítica (0,58 U/mL), contudo, não foi determinada atividade coagulante do leite na mesma condição.

Silva et al. (2016) reportaram a produção de proteases por *Aspergillus tamarii* URM4634 cultivado em matriz sólida. Estas enzimas também foram observadas em maior quantitativo a 30°C. No estudo de Chandrasekaran et al. (2015), a maior produção de enzimas por *Aspergillus flavus* foi determinada a 30°C e por *Aspergillus niger* a 35°C. Estes autores incubaram o meio de fermentação líquida em temperaturas de 20 a 45°C e observaram a completa inativação da enzima a 45°C.

A temperatura de incubação exerce papel importante nas atividades metabólicas de um micro-organismo, podendo causar efeitos adversos. Mesmo pequenas mudanças na temperatura podem afetar a produção enzimática. Porém alguns micro-organismos produzem proteases estáveis ao calor que podem ser ativas em altas temperaturas (CHANDRASEKARAN et al., 2015; MUTHULAKSHMI et al. 2011).

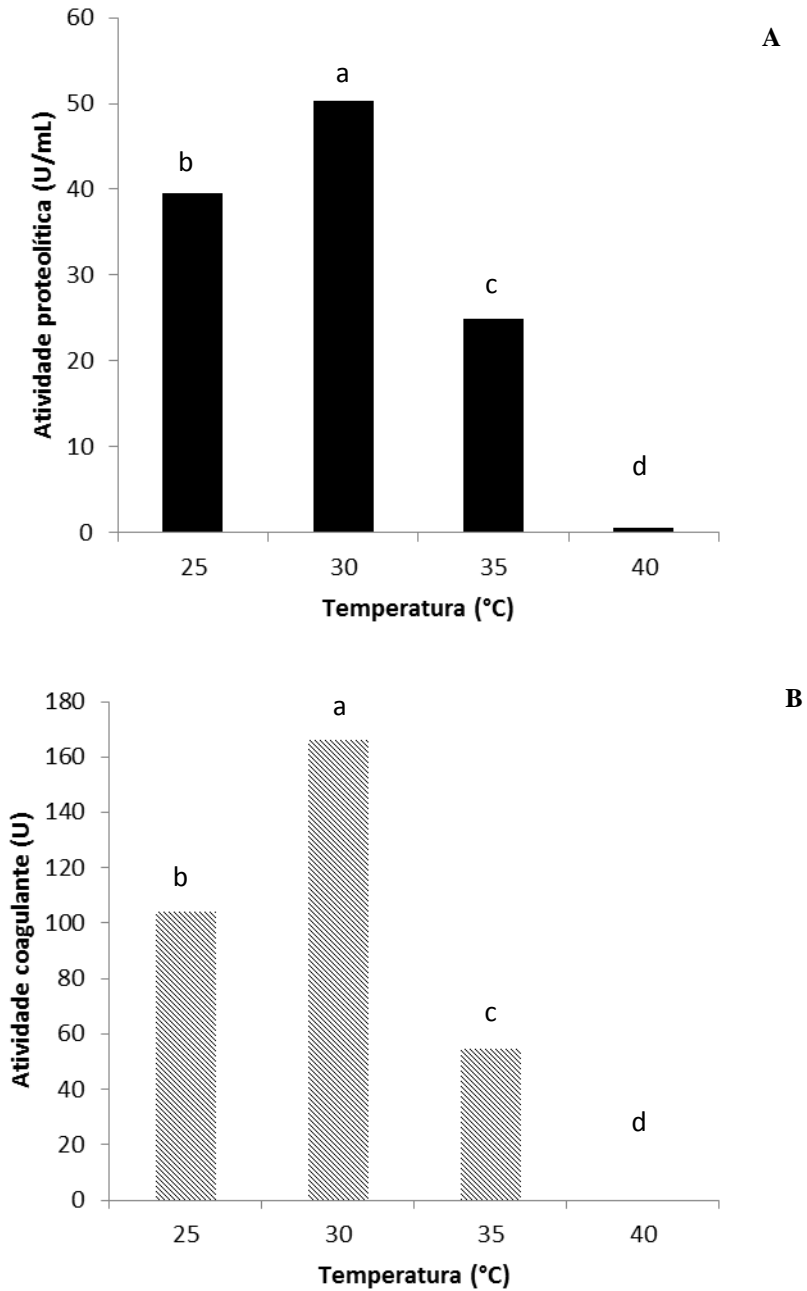


Gráfico 4. Efeito da temperatura de fermentação na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608. Inóculo cultivado em meio BDA+SAC durante 5 dias e volume de 10^5 esporos/mL. Fermentação a 180 rpm, 72h, pH inicial do meio 7,0. Letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o Teste de Tukey.

Quando os cultivos de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 foram submetidos a 150, 180 e 200 rpm, a atividade das proteases foi significativa, atingindo valor máximo de 50,38 U/mL sob agitação de 180 rpm (Gráfico 5A). Contudo, o valor máximo da atividade coagulante do leite (192,69 U) foi determinada 150 rpm (Gráfico 5B). Nestas condições, todos os coágulos visualizados foram classificados como fortes (Figura 2).

Resultados similares referentes a atividades proteolítica foram obtidos por Alecrim et al. (2017), quando a fermentação foi realizada a 180 rpm. Valores de atividade coagulante do leite também foram máximas na fermentação submersa realizada a 150 rpm por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 usando meio contendo farelo de trigo em solução salina (SILVA et al., 2014).

A agitação proporciona aeração e a homogeneização do meio versus a massa micelial microbiana. Condição essa que favorece a síntese de enzimas proteolíticas. Na fermentação, a transferência de oxigênio é uma variável importante em função da aeração e agitação. Portanto, é necessário estabelecer uma combinação ótima de fluxo de ar e agitação para o máximo rendimento (POTUMARTHI et al., 2007).

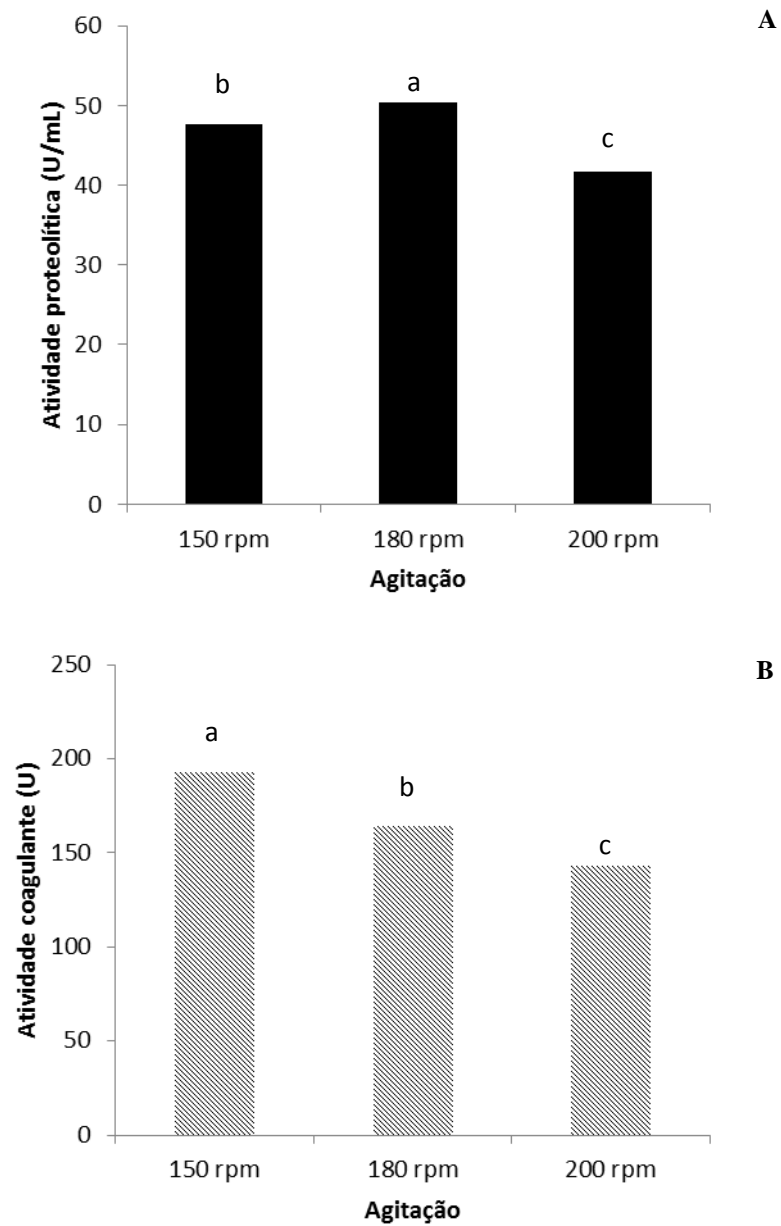


Gráfico 5. Efeito da agitação na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608. Inóculo cultivado em meio BDA+SAC durante 5 dias e volume de 10^5 esporos/mL. Fermentação a 30°C, 72h, pH inicial do meio 7,0. Letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o Teste de Tukey.

O pH inicial do meio de fermentação nos cultivos de *A. flavo furcatis* DPUA 1608 influenciou na atividade proteolítica e coagulante (Gráficos 6 A e 6 B). A atividade proteolítica foi significativa no meio de pH 6,0 (46,71 U/mL) enquanto que a atividade coagulante foi significativa no meio de pH 7,0 (500,00U).

Dados da literatura reportam que *Aspergillus awamori* KGSR 12 produziu enzimas proteolíticas em meio líquido com pH ajustado de 3,0 a 7,0. O estudo revelou que houve aumento da atividade de protease com o aumento do pH do meio na faixa de 3,0 até 6,0 (PILLI e SIDDALINGESHWARA, 2016). Niyonzima e More (2013) reportaram atividade proteolítica máxima por *Aspergillus terreus* em meio líquido de pH 10.

Muthulakshmi et al. (2011) reportaram que o pH do meio de fermentação tem efeito substancial na produção de proteases. Este parâmetro pode influenciar o crescimento microbiano e também, indiretamente, a disponibilidade de nutrientes e, diretamente, pela ação na superfície das células.

Em todos os meios contendo fontes de carbono (amido, glicose e sacarose), nas concentrações de 0,1%; 0,2% e 0,5% (p/v), foram determinadas atividades proteolíticas. Na presença de amido, glicose e sacarose 0,1% (p/v), no meio de fermentação, foram determinadas atividades significativas de proteases de 31,98 U/mL; 10,98 U/mL e 25,22 U/mL, respectivamente. Com o aumento da concentração da fonte de carbono para 0,2% (p/v) a atividade proteolítica reduziu em 65,67%, 29,60 % e 28,99 % na presença de amido, glicose e sacarose, respectivamente. Já na concentração de 0,5 % (p/v), houve redução 75,83%, 80,79% e 92,00% da atividade proteolítica na presença de amido, glicose e sacarose, respectivamente (Gráfico 7 A e 7B).

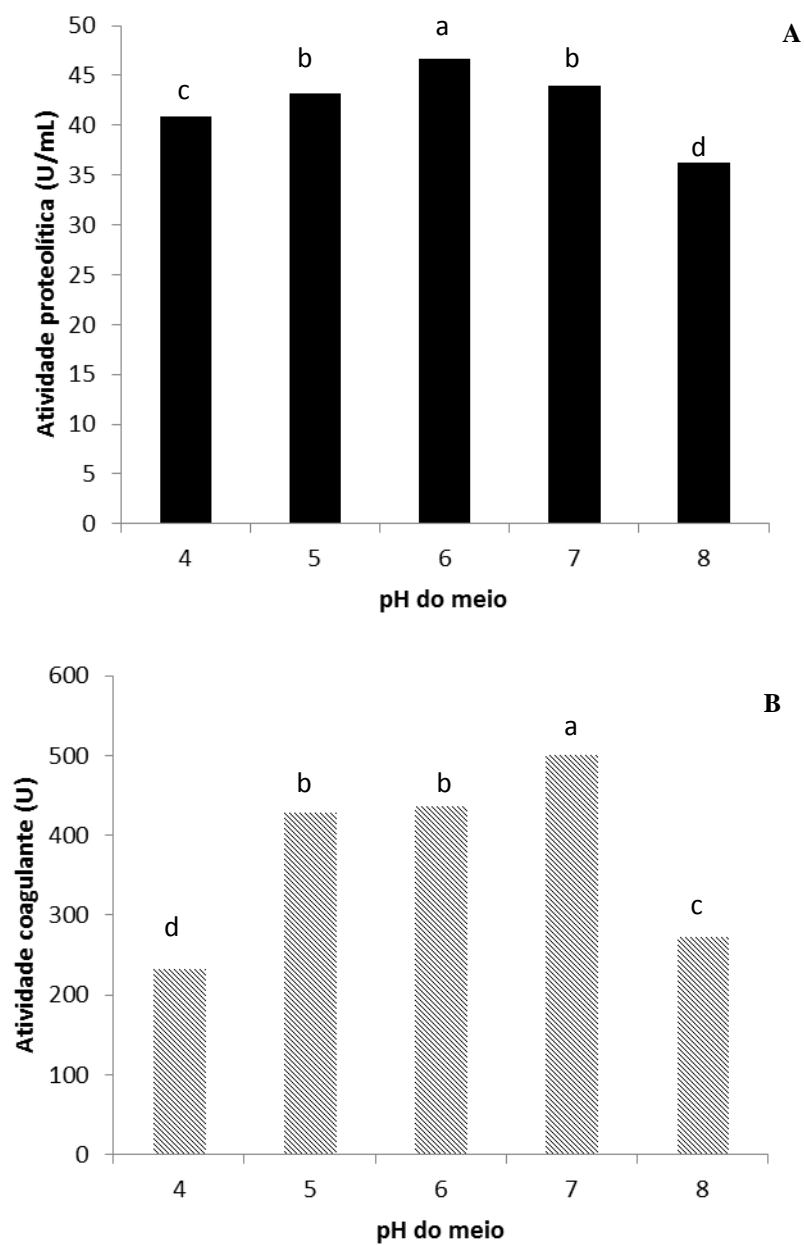


Gráfico 6. Efeito do pH do meio de fermentação na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608. Inóculo cultivado em meio BDA+SAC durante 5 dias e volume de 10^5 esporos/mL. Fermentação a 30°C, 180rpm, 72h. Letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o Teste de Tukey.

O efeito da concentração das fontes de carbono também foi observado na atividade coagulante do leite. A máxima foi determinada nos meios contendo amido, glicose e sacarose na menor concentração [0,1% (p/v)], condição cuja atividade foi igual a 135,85 U; 118,85 U e 85,36 U, respectivamente. Com essas fontes de carbono na concentração de 0,2 % (p/v), a redução da atividade coagulante foi de 87,01%; 48,97% e 41,91% na presença de amido, glicose e sacarose, respectivamente. Não foi determinada atividade coagulante em nenhum dos meios de cultivo adicionados com essas fontes de carbono na concentração de 0,5% (p/v).

Na determinação da influência das fontes de nitrogênio, a atividade proteolítica foi significativa nos meios contendo peptona (33,09 U/mL), gelatina (31,98 U/mL) e, extrato de levedura (19,73 U/mL), nas concentrações de 0,2%, 0,2% e 0,5% (p/v), respectivamente. O aumento na atividade das proteases foi crescente nos meios suplementados com extrato de levedura (Gráfico 8A). No entanto, nos meios contendo peptona e gelatina houve aumento de atividade até 0,2% (p/v) com diminuição da mesma na concentração de 0,5% (p/v).

A atividade coagulante foi significativa nos meios de fermentação suplementados com peptona (146,64 U), gelatina (109,16 U) e extrato de levedura (65,28 U) nas concentrações de 0,1%, 0,2% e 0,5% (p/v), respectivamente. Novamente foi observado aumento crescente de atividade de acordo com aumento da concentração de extrato de levedura (Gráfico 8B). Houve diminuição em 5,15% e 85,86% da atividade coagulante do leite com o aumento da concentração de peptona para 0,2% e 0,5% (p/v), respectivamente. Já nos meios suplementados com gelatina foi observado aumento de atividade até a concentração de 0,2% (p/v), com diminuição no meio contendo 0,5% (p/v).

Souza et al. (2017) reportaram a produção de proteases ácidas por *Aspergillus foetidus* utilizando diferentes combinações de glicose 3% (p/v), como fonte de carbono em caldo Sabouraud e, peptona 2% (p/v), caseína 2% (p/v) e extrato de levedura 1% (p/v), como fontes de nitrogênio. Os autores descreveram que o meio contendo apenas peptona foi o de melhor efeito na atividade de proteases, seguido das combinações de peptona com caseína e caldo e de peptona com extrato de levedura. Por outro lado a produção foi baixa nos meios contendo caseína com caldo, peptona com caldo e apenas caseína.

Sharma et al. (2015) utilizaram variadas fontes de carbono (frutose, glicose, amido, galactose, maltose e manitol) e nitrogênio (nitrato de amônia, sulfato de amônia, caseína, extrato de carne, extrato de levedura e peptona) para determinar a produção de proteases por fungos isolados do solo. Galactose foi considerada a melhor fonte de carbono e a caseína como fonte de nitrogênio na atividade proteolítica.

As fontes de carbono (glicose, sacarose, galactose, maltose, amido e lactose) e de nitrogênio (extrato de malte, peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, cloreto de amônio e nitrato de amônio) foram utilizadas na pesquisa de Gnanadoss e Devi (2015) para a produção de proteases por *Aspergillus nidulans* LCJ249 e *Aspergillus flavus* LCJ253. Dentre as fontes de carbono, glicose promoveu maior atividade proteolítica para *Aspergillus nidulans* e o amido para *Aspergillus flavus*. Dentre as fontes de nitrogênio, extrato de malte promoveu maior atividade proteolítica para *Aspergillus nidulans* e peptona para *Aspergillus flavus*.

A otimização dos componentes do meio é um importante elemento em processos biológicos. Ela é realizada para manter o balanço entre os vários constituintes com o intuito de reduzir a quantidade não utilizada dos mesmos no final da fermentação. Apesar de muitas pesquisas reportarem o uso de diversas culturas de fungos, há ainda uma necessidade de seleção extensiva e contínua de novas proteases produzidas por fungos com propriedades adequadas para a exploração comercial (NIYONZIMA e MORE, 2013).

Especificamente, a produção de proteases comumente é influenciada pela variação da razão carbono e nitrogênio, a presença de alguns açúcares facilmente metabolizáveis tais como glicose, e íons metálicos. Além disso, outros fatores físicos como aeração, densidade do inóculo, pH, temperatura e tempo de incubação. As proteases também são afetadas por fontes de nitrogênio rapidamente metabolizáveis, como aminoácidos presentes no meio (SOUZA et al., 2015).

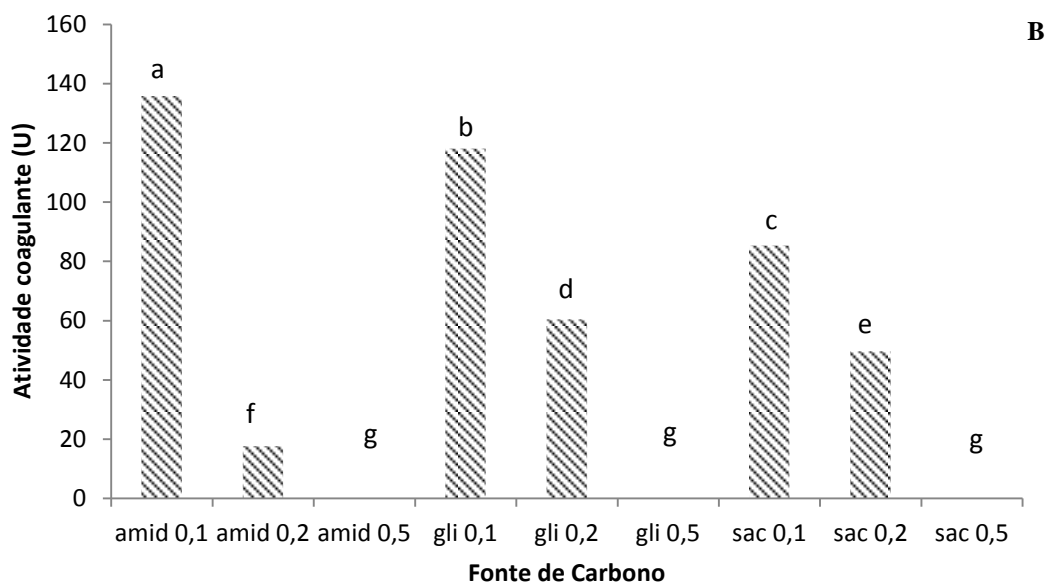
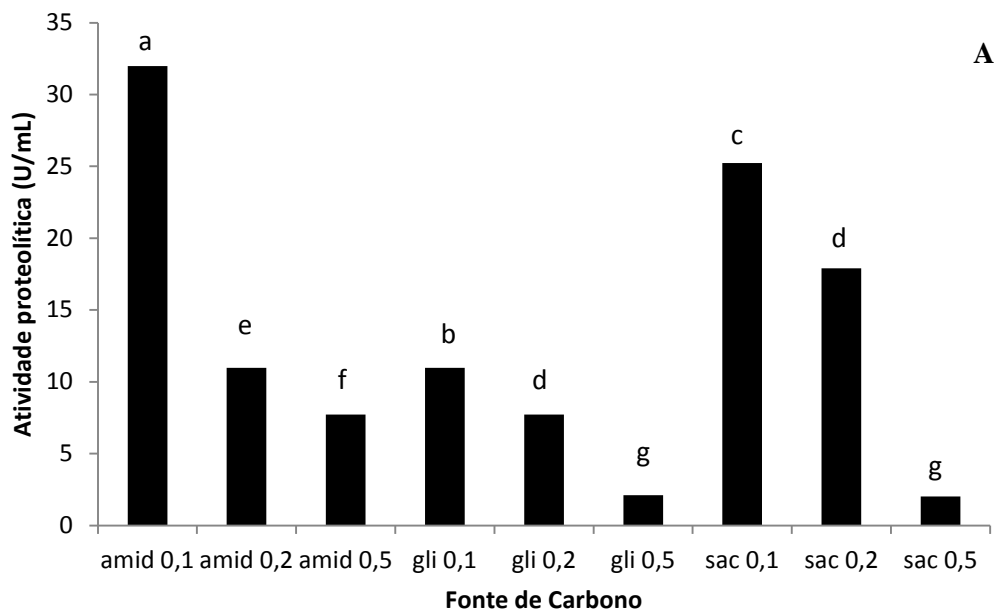


Gráfico 7. Efeito de diferentes fontes de carbono na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de *Aspergillus falvo furcatis* DPUA 1608. Amid=amido; gli=glicose; sac=sacarose. Inóculo cultivado em meio BDA+SAC durante 5 dias e volume de 10^5 esporos/mL. Fermentação a 30°C, 180rpm, 72h, pH inicial do meio 7,0. Letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o Teste de Tukey.

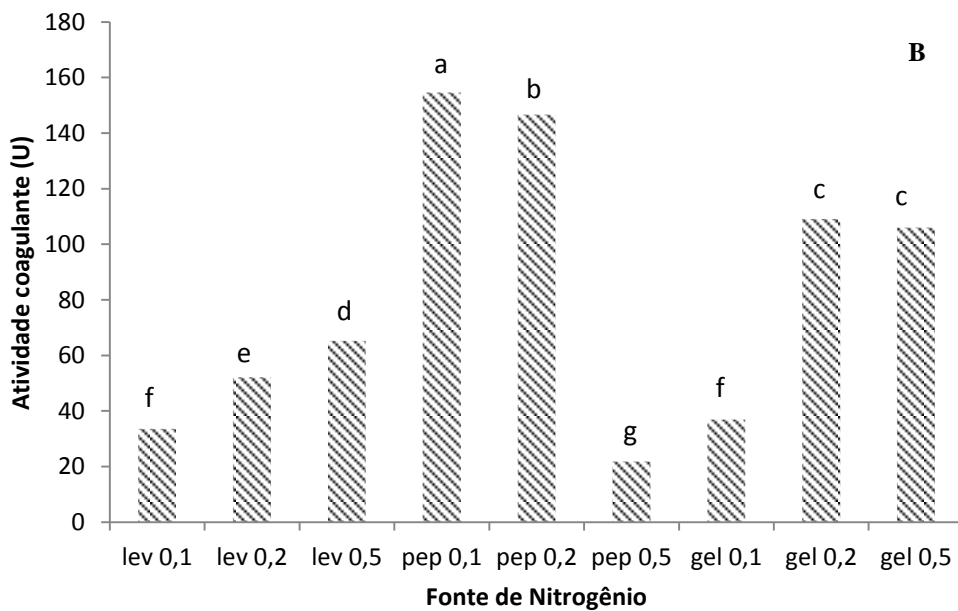
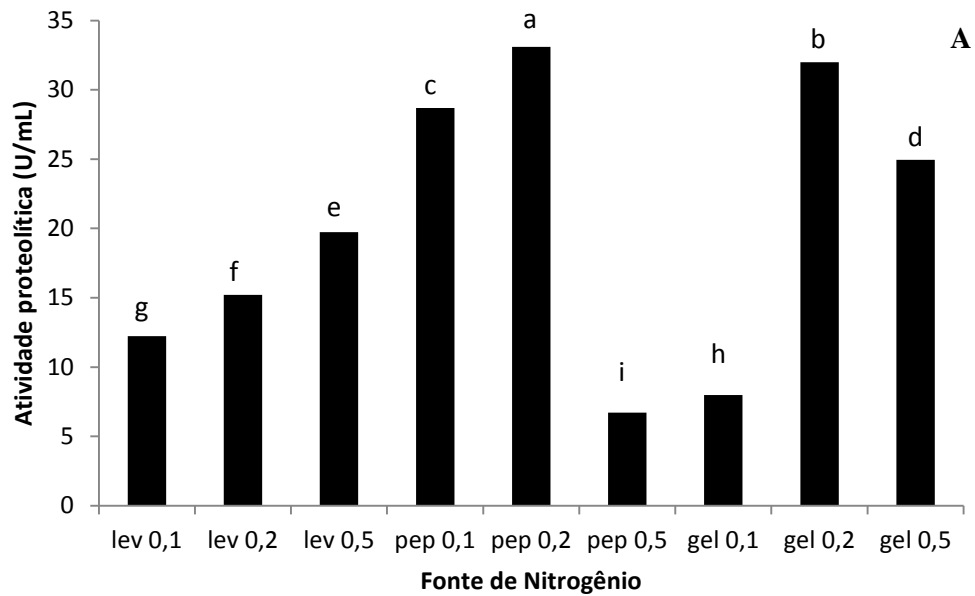


Gráfico 8. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na atividade proteolítica (A) e coagulante do leite (B) das enzimas de *Aspergillus falvo furcatis* DPUA 1608. Lev=extrato de levedura; pep= peptona e; gel= gelatina. Inóculo cultivado em meio BDA+SAC durante 5 dias e volume de 10^5 esporos/mL. Fermentação a 30°C, 180rpm, 72h, pH inicial do meio 7,0. Letras iguais não diferem entre si significativamente de acordo com o Teste de Tukey.

Na atividade coagulante, quando utilizado o leite bovino desnatado, os coagulantes de *A. flavo furcatis* DPUA 1608, foram classificados como forte ou fraco em função da separação do coágulo e o soro visualizado em tubo de ensaio. Nesse contexto, as enzimas coagulantes obtidas nas diferentes condições de fermentação promoveram coagulação do leite classificada como fraca apenas na presença dos extratos recuperados do bioprocessamento cujo o meio continha amido 0,2% (p/v), extrato de levedura 0,1 % (p/v), peptona 0,5% (p/v) e gelatina 0,1% (p/v). Nas demais condições essa característica não foi observada, portanto a coagulação forte foi a predominante (Figura 2).

Caracterização enzimática

Determinação do efeito da temperatura e pH na atividade estabilidade das enzimas proteolíticas

O estudo das propriedades das proteases, tais como a influência de inibidores ou ativadores, a especificidade do substrato, as condições ótimas de pH e temperatura e perfis de estabilidade são parâmetros que podem ser usados para aplicar com sucesso as enzimas em indústrias específicas ou otimizar processos (CASTRO e SATO, 2014).

Para a caracterização parcial as enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, esses biocatalisadores foram produzidos nas condições ótimas de fermentação. As enzimas proteolíticas apresentaram atividade em todas as condições testadas, mas os valores significativos foram determinados a 50°C (126,04 U/mL), pH 7 (216,33 U/mL) (Gráfico 9A e B). A 60°C, as proteases apresentaram apenas 51,66% de atividade e nas temperaturas de 70°C e 80°C apresentaram 45,17% e 8,15% de atividade, respectivamente. Em pH 6, a atividade foi 99,96% e, na faixa de pH8 a 10 foi observada a redução da atividade de forma decrescente, atingindo valores de 48,64%, 26,66% e 16,90%, respectivamente.

Quanto à estabilidade (Gráfico 9C e D), as enzimas proteolíticas mantiveram atividade acima de 95% até a temperatura de 40°C. A partir de 50°C, a atividade foi de apenas 12,86%, chegando a 1,73%, 0,95% e 0,75%, nas temperaturas de 60, 70 e 80°C, respectivamente. As proteases apresentaram baixa estabilidade em pH 4 (6,10%). A partir do pH 5 até o pH 9 foi observada estabilidade enzimática com atividade acima de 80%. Em pH 10, a atividade foi reduzida a 66,81%.

As enzimas proteolíticas de *Aspergillus foetidus* apresentaram atividade ótima em pH 5. A partir do pH 7, mantiveram menos que 80% de sua atividade. Neste mesmo estudo, foi avaliada a meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas. Este parâmetro indica o tempo necessário para que atividade enzimática diminua para 50% do valor inicial em determinada temperatura. Esta análise ajuda a determinar as possíveis aplicações de enzimas industriais visto que quanto maior for esse valor, maior será a termoestabilidade das enzimas. A partir de 55°C, observou-se o decréscimo deste parâmetro (SOUZA et al., 2015).

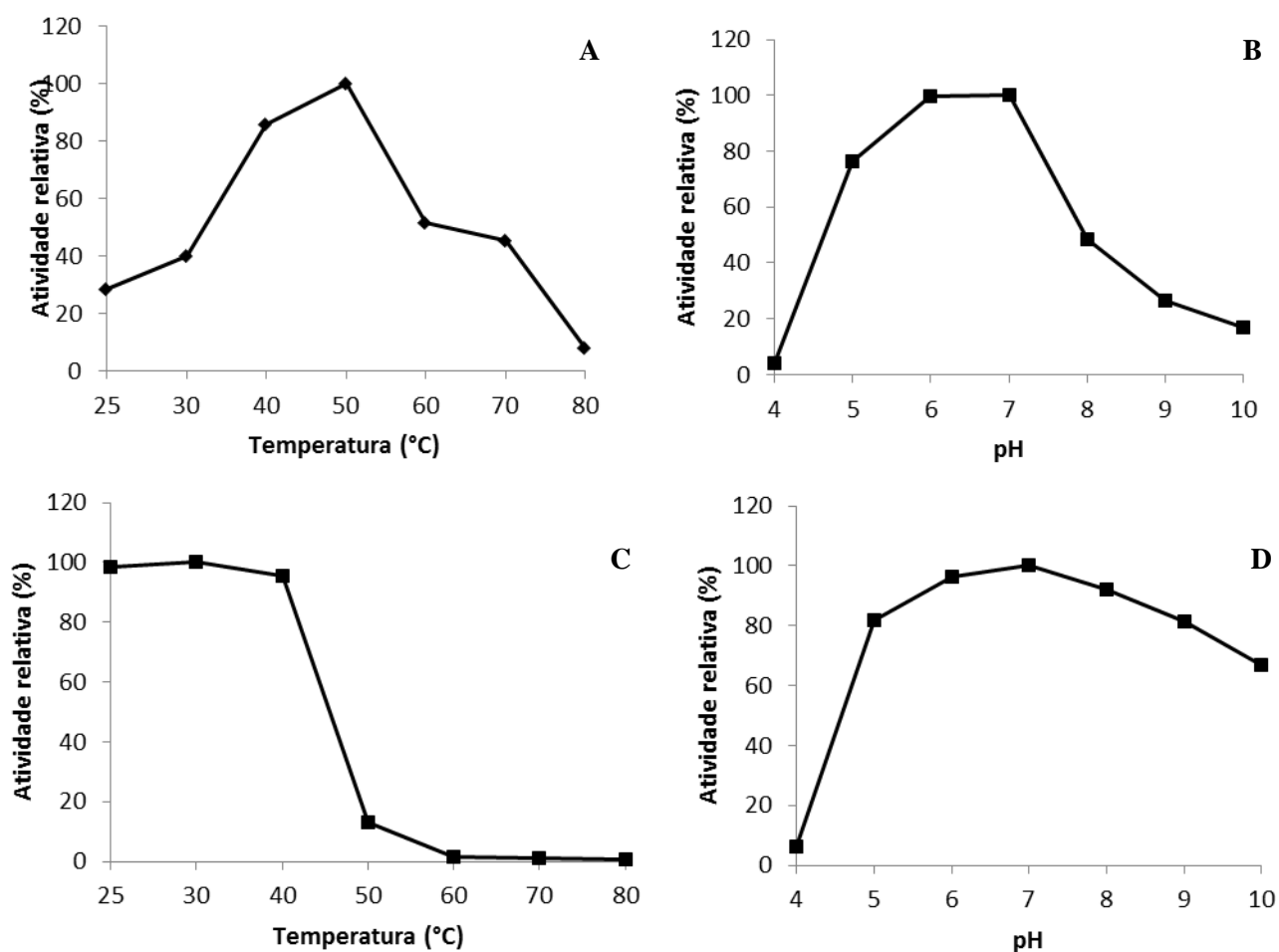


Gráfico 9. Efeito do pH e a temperatura na atividade (A e C, respectivamente) e estabilidade (B e D) enzimas proteolíticas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608. Extrato bruto mantido durante 1h, para a análise de estabilidade seguida de determinação da atividade proteolítica.

No estudo de Salihi et al. (2017) foram analisadas as atividades ótimas, em pH e temperatura, das enzimas proteolíticas de *Aspergillus oryzae* CH93. As proteases apresentaram atividade ótima em pH 8 e temperatura de 50°C. No estudo de Devi et al. (2008) as proteases alcalinas produzidas por *Aspergillus niger* apresentaram atividade ótima a 45°C e pH 10. No entanto, as enzimas foram completamente inativadas a 60°C e houve diminuição da atividade em pH 11.

As enzimas proteolíticas de *Aspergillus oryzae* KS5 cultivadas em meio líquido contendo glicose e leite desnatado demonstraram atividade ótima em pH 9 e temperatura de 55°C (KARTHIC et al., 2014). Biaggio et al. (2016) reportaram que as enzimas proteolíticas de *Aspergillus terreus* apresentaram ótima ação enzimática em pH 7 e temperatura de 45°C.

Determinação do efeito íons e inibidores na atividade das enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas sofreram o efeito da presença de íons metálicos e inibidores em sua atividade. Dentre os íons metálicos analisados, zinco, cobre e cálcio promoveram a diminuição da atividade das proteases apresentando 1,96%, 23,33% e 42,74% de atividade, respectivamente. Potássio, sódio, magnésio, e ferro também interferiram na atividade proteolítica, contudo, elas foram mantidas acima de 53,58%, 70,15%, 74,59% e 95,19%, respectivamente, quando comparadas ao controle (Tabela 1).

Quanto ao efeito dos inibidores enzimáticos, todos eles afetaram a atividade proteolítica das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 em mais de 50%. Ácido iodoacético foi o que promoveu a maior inibição mantendo apenas 2,5% da atividade enzimática, seguido de PMSF, pepstatina A e EDTA com atividades de 15%, 35,6% e 40,5%, respectivamente. As características apresentadas indicam que as enzimas proteolíticas são, em sua maioria, do tipo cisteína. Elas também apresentaram quanto ao efeito dos inibidores características de serina, aspártica e metalo proteases.

Tabela 1. Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade proteolítica das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608.

Íons/Inibidores	Atividade relativa (%)
Controle	100
Ca ²⁺	42,74
Cu ²⁺	23,33
Fe ²⁺	95,19
K ⁺	53,78
Mg ²⁺	74,59
Na ⁺	70,15
Zn ²⁺	1,96
Ácido iodoacético	2,5
EDTA	40,5
Pepstatina A	35,6
PMSF	15,0

As serino proteases são caracterizadas pela presença do grupo serino em seu sítio ativo. Elas são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, baixo peso molecular e aplicação em variadas áreas industriais. As proteases aspárticas são comumente conhecidas como proteases ácidas e dependem de resíduos de ácido aspártico para sua atividade catalítica. As cisteíno proteases dependem de uma díade catalítica de cisteína e histidina. São geralmente ativas na presença de agentes redutores tais como HCN. Papaína é um exemplo deste tipo de enzima. Já as metalo proteases são as mais diversas. Elas requerem um íon metálico divalente para sua atividade (SOUZA et al., 2015).

As proteases de *Aspergillus oryzae* CH93 foram estimuladas pelos íons Na⁺, Mn²⁺ e Fe²⁺ a 2 mM e por Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺ e Fe²⁺ a 5mM. Já os íons Zn²⁺ (ambas concentrações), Cu²⁺ (ambas concentrações), Mg²⁺ e Ca²⁺ (a 2 mM) e Na²⁺ (a 5 mM). O íon Fe²⁺ a 5 mM foi aquele que promoveu o maior efeito na diminuição da atividade proteolítica. Neste mesmo estudo, as enzimas não sofreram inibição por PMSF, mas foram inibidas por EDTA (60%) e 2-ME (Mercaptoetanol) (49%), um inibidor de cisteíno proteases (SALIHI et al., 2017).

Karthic et al. (2014) reportaram que as proteases de *Aspergillus oryzae* sofreram o efeito de íons metálicos e inibidores enzimáticos. A enzima purificada foi induzida em

121% pelo íon Cu^{2+} e PMSF foi o inibidor que mais afetou sua atividade sugerindo a presença de serino proteases. A atividade enzimática das proteases de *Aspergillus terreus* foi estimulada na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} , mas foi inibida por Hg^{2+} e por PMSF (NIYONZIMA e MORE, 2015).

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

As enzimas coagulantes do leite produzidas por *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 apresentaram atividade significativa em pH 7,0 (Gráfico 10A e Figura 3A). Em pH 4,0 não foi observada atividade coagulante. Em pH 10 a atividade coagulante foi reduzida a 24,75%. Para a estabilidade no pH, foi observada atividade coagulante das faixas de pH 5 a 10. As enzimas mantiveram estabilidade de pH 5 a 9 acima de 80% (Gráfico 10B e Figura 3B). Em pH 10 essa atividade diminuiu para 60%. Não houve determinação de atividade coagulante em pH 4. A partir dos dados apresentados, pode ser inferido que as enzimas coagulantes do leite têm propriedades neutras para atividade ótima e mantêm a atividade estável de pH ácido a alcalino.

As enzimas coagulantes do leite apresentaram atividade crescentede 25°C a 45°C. A atividade ótima foi determinada a 45°C (Gráfico 11A e Figura 4A). A partir de 50°C não foi determinada atividade coagulante. Para a estabilidade térmica, as enzimas coagulantes do leite mantiveram atividade acima de 90% a 25, 30, 35, 40 e 45°C. Na temperatura de 50°C foi observada estabilidade em torno de 70%. A partir de 55°C não foi determinada atividade coagulante do leite (Gráfico 11B e Figura 4B).

Phanerochaete chrysosporium apresentou atividade ótima coagulante do leite a 60-65°C (SILVA et al., 2017). Majumder et al. (2015) também reportaram a produção de proteases coagulantes do leite por *Termitomyces chypeatus* MTCC 5091, um cogumelo comestível. De acordo com os autores, essa foi a primeira vez que se reportou a produção de metalo proteases deste fungo e consideraram que elas podem ser potenciais substitutas da quimisina na fabricação de queijo.

Martim et al. (2017) em seu estudo com o cogumelo comestível *Pleurotus albidus*, reportaram a produção de enzimas coagulantes do leite com atividade ótima em pH 6 e temperatura de 60°C. Contudo, elas apresentaram maior estabilidade em pH 4 e a 40°C.

Aspergillus flavo furcatis DPUA 1608, na pesquisa de Alecrim et al. (2015), apresentou enzimas coagulantes do leite com atividade ótima a 40°C e pH 7. Neste estudo, a cultura foi cultivada sob fermentação submersa em meios de cultivos preparados a partir de extratos de resíduos da agroindústria com e sem suplementação de gelatina e extrato de levedura.

Na atividade coagulante, quando utilizado o leite bovino desnatado, os coagulantes de *A. flavo furcatis* DPUA 1608, foram classificados como forte ou fraco em função da separação do coágulo e o soro visualizado em tubo de ensaio. As enzimas coagulantes obtidas nas diferentes condições de pH e temperatura, promoveram coagulação do leite classificada como fraca apenas na presença dos extratos recuperados do bioprocessamento em pH 10. Nas demais condições essa característica não foi observada, portanto a coagulação forte foi a predominante.

Determinação do efeito íons e inibidores na atividade das proteases coagulante do leite

Todos os íons metálicos exerceram efeito estimulante da atividade coagulante do leite (Tabela 2). Os íons zinco e potássio foram os que melhor promoveram este efeito como atividade 776,67% e 466% superiores ao controle. Já os íons cálcio, cobre, ferro, magnésio e sódio exerceram efeito de 211,82%, 172,59%, 153,29%, 137,06% e 114,22% superiores ao controle. Quanto ao efeito dos inibidores enzimáticos, apenas Pepstatina A e EDTA exerceram efeito estimulante de atividade de 132,7% e 108,4%, respectivamente. Ácido iodoacético foi o que mais inibiu as enzimas na atividade coagulante do leite (29,5%), seguido de PMSF (61,1%). As enzimas coagulantes do leite podem ser classificadas, de acordo com o efeito dos inibidores, como cisteíno e serino proteases

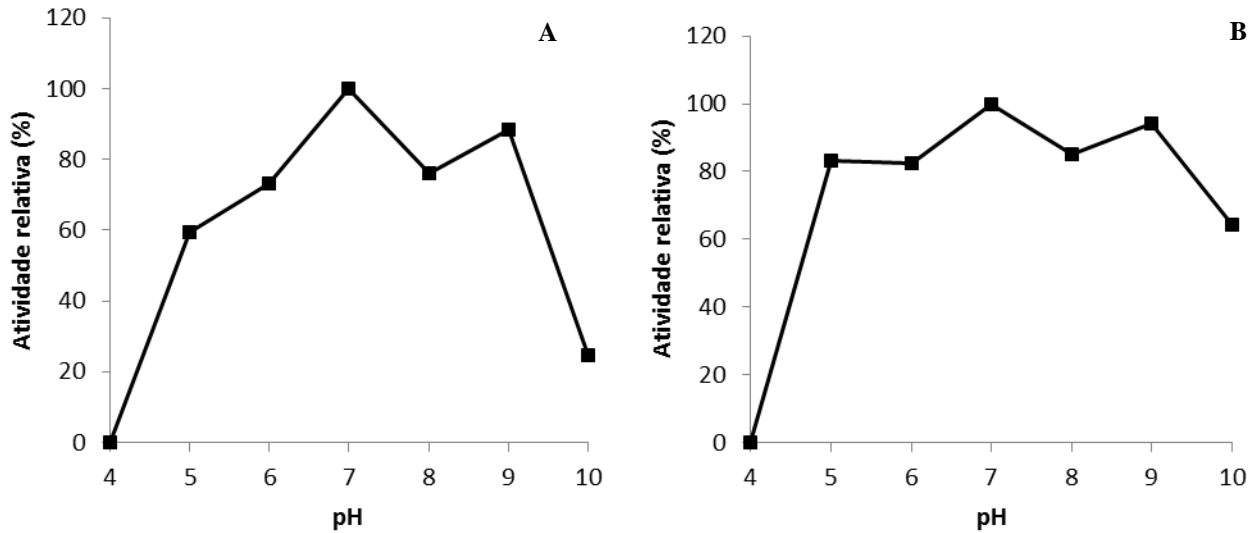


Gráfico 10. Efeito do pH na atividade (A) e estabilidade (B) das enzimas coagulantes do leite de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608.

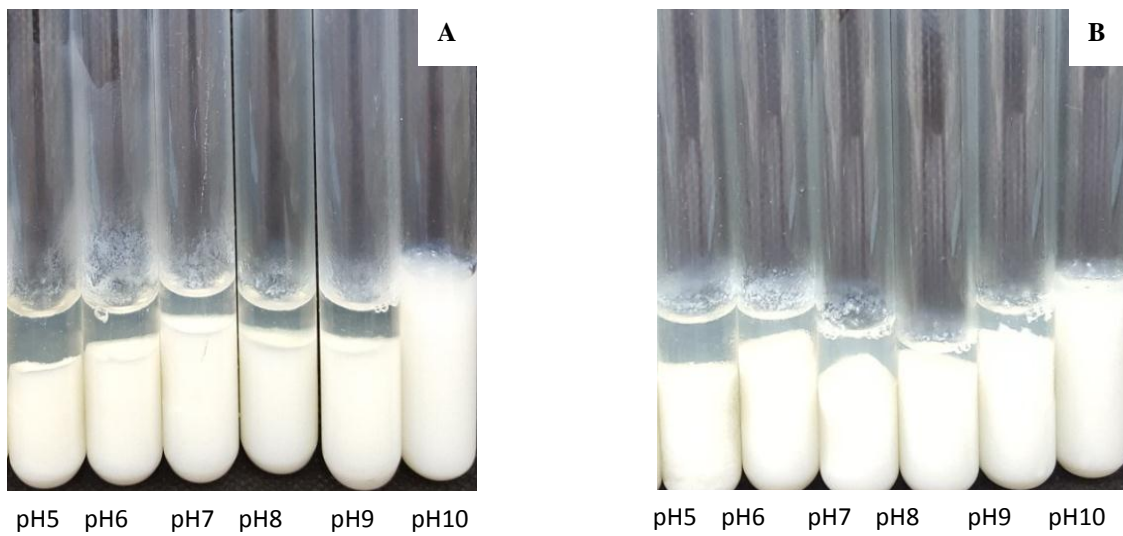


Figura 3. Efeito do pH na atividade (A) e estabilidade (B) das enzimas coagulantes do leite de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608.

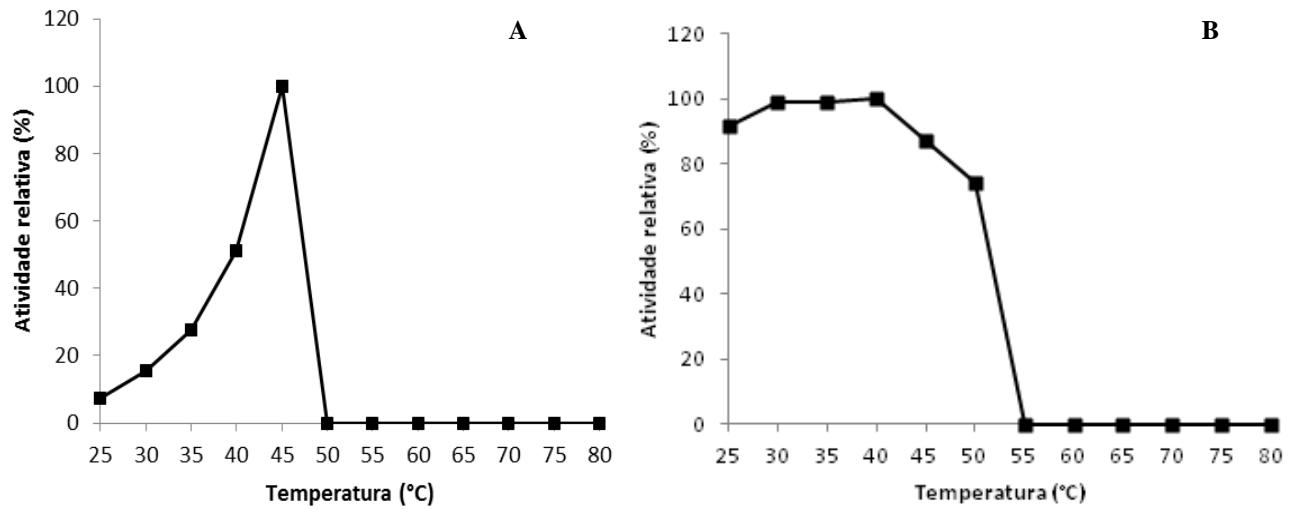


Gráfico 11. Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) das enzimas coagulantes do leite de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608.

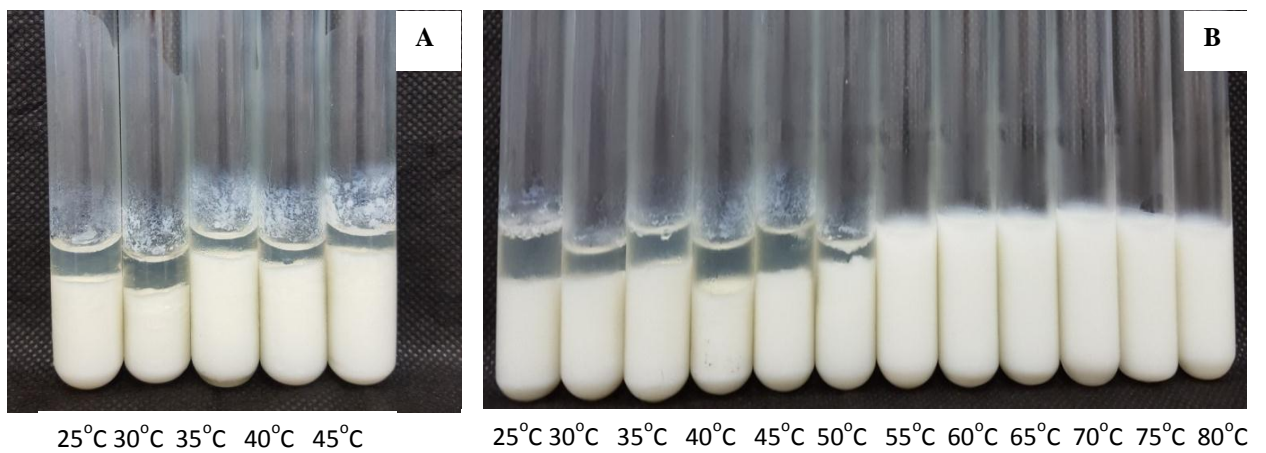


Figura 4. Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) das enzimas coagulantes do leite de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608.

Tabela 2. Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade coagulante do leite das enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608.

Íons/Inibidores	Atividade relativa (%)
Controle	100,00
Ca ²⁺	211,82
Cu ²⁺	172,59
Fe ²⁺	153,29
K ⁺	466,00
Mg ²⁺	137,06
Na ⁺	114,22
Zn ²⁺	776,67
Ácido iodoacético	29,5
EDTA	108,4
Pepstatina A	132,7
PMSF	61,1

No estudo de Martim et al. (2017), o íon Zn²⁺ aumentou a atividade coagulante em 78% e os íons Mn²⁺, Fe²⁺ e Cu²⁺ causaram redução da atividade em 97,60%, 78,75% e 35%, respectivamente. Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺ e K⁺ promoveram inibição total da atividade coagulante do leite. As enzimas coagulantes do leite deste cogumelo comestível mantiveram estabilidade frente a EDTA (93,7%). Já pepstatina A, PMSF e ácido iodoacético causaram inibição enzimática. Sendo o último citado de maior inibição, caracterizando as enzimas como pertencentes à família das cisteíno proteases.

Conclusão

Aspergillus flavo furcatis DPUA 1608 produziu enzimas com propriedades coagulantes do leite utilizando meio de cultura com pH 7,0; inóculo em meio sólido com 5 dias de cultivo e concentração equivalente a 10⁶ esporos/mL de meio. As melhores condições de cultivo para o crescimento e produção das enzimas por fermentação submersa foi 72 horas, 150rpm, 30°C. Amido e peptona a 0,1% (p/v) foram as fontes de carbono e nitrogênio que estimularam a síntese das enzimas coagulantes do leite. Nas mesmas condições de fermentação, as enzimas proteolíticas apresentaram atividade ótima em pH 7, a 50°C. Os íons zinco e cobre promoveram a maior redução da atividade. As enzimas coagulantes do leite foram mais ativas em pH 7 e a 45°C. Para as estas enzimas, zinco e

potássio promoveram aumento significativo da atividade enquanto ácido iodoacético foi o inibidor que afetou em ambas as atividades enzimáticas, parâmetro que caracteriza a presença de cisteína proteases. Assim, fica evidenciado que *Aspergillus flavo furcatis* DPUA1608 é um potencial produtor de coagulante para uso na fabricação de queijo.

Referências bibliográficas

ALECRIM, M. M.; PALHETA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, I. M. A. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. International Journal of Food Science and Technology (50) 151-157. 2015.

ALECRIM, M.M.; MARTIM, S. R.; SOUZA, B. C.; TEIXEIRA, M. F. S. *Aspergillus flavo furcatis*: aflatoxin test and Milk-clotting proteases production in submerged and solid state fermentation. African Journal of Microbiology Research 11, 312-318. 2017.

AHMED, S. A.; WEHAIDY, H. R.; IBRAHIM, O. A.; EL GHANI, S. A.; EL-HOFI, M. A. Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 7-241-249. 2016.

AYANA, I. A.A.A., IBRAHIM, A. E.; SABER, W. I. A. Statistical optimization of milk-clotting enzyme biosynthesis by *Mucor mucedo* KP736529 and its further application in cheese production. International Journal of Dairy Science 10 (2), 61-76. 2015.

BIAGGIO, R.T.; SILVA, R. R.; ROSA, N. G.; LEITE, R. S. R.; ARANTES, E. C.; CABRAL, T. P. F.; JULIANO, M. A.; CABRAL, H. Purification and Biochemical characterization of an extracellular serine peptidase from *Aspergillus terreus*. Preparative Biochemistry and Biotechnology 46 (3), 2016.

BOUKHALFA-LEZZAR, H.; LEGHLIMI, H.; COPINER, E.; DUCHIRON, F.; MECHAKRA-MAZA, A. Utilization of tomato pomace as a substrate for neutral protease production by *Aspergillus oryzae* 2220 on solid-state fermentation. International Journal of Advanced Research 2, 338-346. 2014.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Protease from *Aspergillus oryzae*: biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolysates with antioxidant activities. Journal of Food Processing, 1-12. 2014.

CHANDRASEKARAN, S.; KUMARESAN, S. S. P.; MANALAVAN, M. Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from paddy soil in Thiruvannamalai district Tamil Nadu. Journal of Applied Biology and Biotechnology 3, 66-69. 2015.

DEVI, M. K.; BANU, A. R.; GNANAPRABHAL, G. R.; PRADEEP, B. V.; 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 1, 1-6. 2008.

GNANADOSS, J. J.; DEVI, S. K. Optimization of nutritional and culture conditions for improved proteases production by *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 4, 518-523. 2015.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology (153) 1677-1692. 2007.

HOMAEI, A.; LAVAJOO, F.; SARIRI, R. Development of amrine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. Int. J. of Biol. Macromol. (88) 543-552. 2016.

KARTHIC, J.; SAROJ, Y.; NAVEEN, M.; PRAMOD, T.; SIDDALINGESHWARA, K.G. Characterization of *Aspergillus oryzae* proteases through submerged fermentation. International Journal of Currents Microbiology and Applied Sciences 3, 1023-1028. 2014.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTONS, M. L. L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. Química Nova 33, 324-328. 2010.

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.

MAJUMDER, R.; BANIK, S. P.; KHOWALA, S. Purification and characterization of k-casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. Food Chemistry (173) 441-448. 2015.

MARTIM, S. R.; SILVA, L. S. C.; SOUZA, L. B.; CARMO, E. J.; ALECRIM, M. M.; VASCONCELLOS, M. C.; OLIVEIRA, I. M. A.; TEIXEIRA, M.F.S. *Pleurotus albidus*: a new source of Milk-clotting proteases. African Journal of Microbiology Research 11, 660-667. 2017.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. Jordan Journal of Biological Sciences 4, 137-148. 2011.

NARWAL, R. K.; BHUSHAN, B.; PAL, A.; MALHOTRA, S. P. Optimization of upstream parameters for enhance production of thermostable milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. Journal of Food Process Engineering 40, 1-11. 2017.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R. V.; MARTONS, M. L. L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 27, 417-421. 2007.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* gr. under submerged fermentation. International Journal of Pharma and Bio Sciences 4, 1016-1028. 2013.

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, J. N. Comparative studies on extracellular proteases secretion and glucoamylase production by free immobilized *Aspergillus niger* cultures. J. Ind. Microbiol. Biotechnol 29, 259-263. 2002.

PILLI, R.; SIDDALINGESHWARA, K.G. Rapid confirmation and molecular identification of alkaline protease producing *Aspergillus awamori* through submerged fermentation. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 5, 1114-1124. 2016.

POTUMARTHI, R.; CH, S.; JETTY, A. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: effect of aeration and agitation regimes. Biochemical Engineering Journal 34, 185-192. 2007.

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

RAY, R. C.; RUSELL, C. M. Microbial enzyme technology in food applications. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raitons, FL. 503p. 2017

RHODES, P. M.; STANBURY, P. F. Applied Microbial Physiology: A practical approach. Oxford University Press. 270p. 1997.

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

SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. Dairy Science & Technology 94. 5-16. 2014.

SILVA, R.R.S.; OLIVEIRA, L. C. G.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, A. H. C.; ROSA, J. C.; CABRAL, H. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Food chemistry 225, 45-54. 2017.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. Biotech 6, 1-15. 2016.

SOUZA, P. M.; ALIAKBARIAN, B.; FILHO, E.X.; MAGALHÃES, P. O.; JÚNIOR, A. P.; CONVERTI, A.; PEREGO, P. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. International Journal of Biol. Macromol 81, 17-21. 2015.

SRINUBABU, G.; LOKESWARI, N.; JAYARAJU, K. Screening of nutritional parameters for the production of proteases from *Aspergillus oryzae*. Journal of Chemistry 4, 208-215. 2007.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculums age and size on surfactin production. Biochemical Engineering Journal 21, 141-148. 2004.

SHARMA, A. K.; SHARMA, V.; SAXENA, J.; YADAV, B.; ALAM, A.; PRAKASH, A. Effect of culture conditions on protease production and activity of protease from soil born fungi. International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences 3, 411-419. 2015.

SILVA, B. L.; GERALDES, F. M.; MURARI, C. S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31. Appl. Biochem. Biotechnol (172) 199-2011. 2014.

SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R.L.; SOUZA-MOTTA, M.; PORTO, A. L. F.; PORTO, T. S. Novel protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. Advances in Enzyme Research 4, 125-143. 2016.

SOUZA, P. M. de; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FERREIRA FILHO, E. X.; PESSOA JÚNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazil. J. of Microbiol. (46) 337-346. 2015.

SOUZA, P. M.; WERNECK, G.; ALIAKBARIAN, B.; SIQUEIRA, F.; FERREIRA FILHO, E. X.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; MAGALHÃES, P. O.; PESSOA JÚNIOR, A. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. Food and Chemical Toxicology. 1-8. 2017.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 90, 1-11. 2013.

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.

UDDIN, M. E.; ALAM, M. G.; AHMAD, T.; MAHMUD, S.; NAZMUZZAMAN, M.; ALAM, M. F.; KARIM, M. R.; BARMAN, N. C.; ARIF-UZ-ZAMAU, M.; AHAMMED, T.; FARUQUEE, H. M. Screening, optimization and exploration of microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences, 178-191. 2016.

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão

Artigo 3: “Elaboração de queijo com biomassa de cogumelo comestível utilizando enzimas de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608”

Elaboração de queijo com biomassa de cogumelo comestível utilizando enzimas de
Aspergillus flavo furcatis DPUA 1608

Mircella Marialva Alecrim, Salomão Rocha Martim, Marne Carvalho de Vasconcellos, Leilane Bentes de Souza, Antônio Fábio Lopes e Maria Francisca Simas Teixeira

Resumo

O queijo é um alimento considerado nutritivo. Uma das etapas de sua fabricação é a coagulação do leite. O objetivo desta pesquisa foi o de utilizar o coagulante de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 para produzir queijo suplementado com biomassa de cogumelo comestível. O extrato bruto foi submetido a testes de toxicidade *in vitro*: hemólise e teste em fibroblastos humanos. Os queijos elaborados foram submetidos às análises microbiológica e centesimal. Não houve detecção de toxicidade de acordo com os testes realizados. A análise microbiológica está de acordo com a legislação vigente. Os queijos produzidos apresentaram aumento do conteúdo de carboidratos, proteínas, cinzas e umidade com o aumento da concentração do basidioma na massa do queijo. No entanto, foi observado que o aumento da concentração do cogumelo, promoveu a diminuição do conteúdo de lipídeos e valor energético total. *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 tem potencial como coagulante de fonte microbiano que pode ser aplicado na indústria de laticínios para a fabricação de queijo.

Palavras-chave: queijo, coagulante microbiano, *Aspergillus*, toxicidade.

Abstract

Cheese is well known nutritional food. One of the stped of its manufacturing is the milk coagulation. The aim of this research was to use the coagulant *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 and produce a cheese supplemented with edible mushroom. The crude extract was submitted to toxicicity tests: hemolysis and test in human fibroblastos. The produced cheeses were submitted to microbiological and proximal analysis. There was no detection of toxicity according to the tests. The microbiological analisys is in agrément with the vigente legislation. The cheeses presented increasing in the amount of carbohydrates, ashes and humidity according to the increasing of mushroom concentration. However, was also observed that the increasing in mushrrom concentration promoted the decreasing in the amount of lipids and also the total energy. *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 has potential as microbial source of milk-clotting enzymes and can be used in dairy industry to cheese manufacturing.

Keywords: cheese, microbial coagulante, *Aspergillus*, toxicity.

Introdução

A hidrólise enzimática da caseína ocorre de modo específico por endopeptidases do grupo aspartil-protease, hidrolisando a ligação peptídica entre a Phe (105) e a Met (106) da K-caseína promovendo a desestabilização da micela com consequente precipitação da caseína do leite (coagulação) (CAMPOS et al., 2010).

A coagulação do leite é a etapa fundamental na fabricação de queijo e outros produtos lácteos. As enzimas coagulantes mais específicas conhecidas são aquelas de origem animal provenientes do estômago de bezerros antes do desmame, também conhecida como quimosina (YEGIN et al, 2012).

Devido à disponibilidade limitada de coalho e a maioria das fontes vegetais serem consideradas inadequadas, porque conferem um sabor amargo ao queijo, às fontes microbianas podem ser potenciais como substitutas das fontes animais. Entre as fontes microbianas, os fungos têm vantagens como produtores de enzimas, uma vez que são geralmente considerados como seguros (GRAS) e as enzimas produzidas por eles são extracelulares, o que facilita a recuperação do caldo de fermentação (AYANA et al., 2015; SANDHYA et al ., 2005).

Além disso, a procura destas novas fontes coagulantes do leite torna-se ainda maior por fatores relacionados a restrições alimentares, dietas especiais e questões religiosas (ESPOSITO et al., 2016).

O queijo, um produto lácteo nutritivo de interesse econômico significativo abrange, cerca de um terço da produção total de leite. Produtos da indústria de laticínios enriquecidos com compostos bioativos têm atraído crescente interesse de consumidores em função dos benefícios à saúde humana (NEVES, 2014; LEMES et al., 2016).

Por isso, o objetivo deste trabalho foi o de produzir queijo com coagulante de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 e adicionar biomassa do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatoroseus* ao produto final.

Material e Métodos

Micro-organismo

Para a produção de enzimas coagulantes foi selecionada a linhagem de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, cedido pela Coleção de Culturas da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. A espécie foi reativada em Caldo glicosado 2% (p/v). Após crescimento, a cultura estoque foi repicada para meio contendo (p/v): Glicose 1.0%, Peptona de carne 1.0% e Ágar 1.5% (Sabouraud-SAB), incubadas a 30 °C por 7 dias. (TEIXEIRA et al., 2011).

Obtenção do extrato bruto

Meio de cultivo

O meio de fermentação submersa para a produção de proteases coagulantes foi preparado com a seguinte solução salina (MA01)(g/L): [KH₂ PO₄ (2.0); (NH₄)SO₄ (1.0); MgSO₄.7H₂O (0.1); Na₂HPO₄.7H₂O (0.9); Extrato de levedura (1.0), Gelatina (5.0)]. O meio foi ajustado em pH 7,0.

Inóculo

Aspergillus flavo furcatis DPUA 1608 foi repicado para meio de cultivo ágar batata e sacarose (BDA+SAC), em tubos de ensaio. A cultura foi mantida a 30 °C, durante cinco dias. Uma suspensão equivalente a 10⁶ esporos/ mL de meio foi preparada como base para os experimentos. Em seguida, esta suspensão foi inoculada em 50 mL do meio de fermentação.

Determinação da atividade coagulante do leite

Para a determinação da atividade coagulante (Figura 7) foi utilizado leite desnatado em pó como substrato, conforme a metodologia descrita por Merheb, 2007. A solução de leite desnatado 10% (p/v) foi preparada com CaCl₂ 0,05M, homogeneizando-se em agitador magnético até a completa dissolução do leite. Em seguida, o pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1N. Uma amostra de solução do leite igual a 5mL foi distribuída em tubos de ensaio e mantida a 40° C em banho de água circulante. Após 15 minutos, foram adicionados 0,5mL do extrato enzimático bruto. A atividade coagulante foi determinada

como positiva através visualização da formação de coágulos na parede do tubo de ensaio em até 40 minutos. O tempo final da coagulação foi determinado com cronômetro digital. Todas as análises dos extratos foram realizadas em triplicata. O resultado qualitativo da atividade coagulante foi expresso com base na formação de coágulo e a forma de separação do soro do leite visualizado nos tubos de ensaio em: **coagulação forte** (coágulo distinto e soro abundante) e **coagulação fraca** (coagulação sem separação visual de soro).

A unidade de atividade de coagulação (U) foi definida como a quantidade de enzima, presente no volume do extrato, que coagula o volume de substrato em 40 minutos, a 40° C (Equação I).

$$\text{Equação I} \quad U = \frac{2400}{T} \times \frac{V}{v}$$

Onde:

2400 = Tempo total de espera da atividade coagulante, em segundos (40 minutos)

V= Volume de leite utilizado, em mL

v = volume do extrato enzimático adicionado, em mL

T= Tempo de coagulação da amostra, em segundos.

Teste de toxicidade *in vitro*

Toxicidade em fibroblastos humanos

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizados fibroblastos humanos (MRC5) mantidos no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e Penicilina 1% (p/v). As células foram mantidas em estufa com injeção de 5% de CO₂, a 37 °C. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do Alamar Blue (AHMED et al.,1994). As células foram inoculadas na concentração de 0,5 x 10⁴ células por poço, em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C, com CO₂ a 5%. Após 24 horas, as células foram tratadas na concentração de 100 µg/mL de AgNPs liofilizadas durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizada a doxorrubicina (20µM ou 34µg/mL) e como controle negativo DMSO (0,01%, v/v). Após adição do Alamar Blue (0,4% v/v) a fluorescência foi medida a 465 nm e 540 nm no leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter). Os experimentos foram realizados em triplicata. As imagens foram

capturadas por meio do programa Zen 2 da Carl Zeiss Microscópio GmbH Company® e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 6.0.

Hemólise

O extrato bruto enzimático foi submetido ao teste de hemólise utilizando sangue de carneiro comercial (Ebefarma®). O sangue foi centrifugado e lavado com soro fisiológico 0,9% (p/v) para separação em camadas e deposição das hemácias no fundo do tubo. Esse processo foi repetido até a obtenção de sobrenadante límpido e precipitado contendo um hematócrito de 100%.

Para a obtenção da solução de hemácias, o sobrenadante foi descartado e preparada uma suspensão de hemácias a 2% (v/v). Ou seja, 2mL de eritrócitos lavados foram diluídos em 98mL de solução fisiológica 0,9% (p/v).

As amostras foram avaliadas em triplicata com 10 concentrações crescentes. O ensaio foi realizado em tubos de ensaio e a preparação está de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Preparação do teste para a determinação da atividade hemolítica em tubos de ensaio.

	TUBOS										CONTROLE	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	HM*	HT**
Amostra (mL)***	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1	-	-
Solução fisiológica (mL)	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	-	1	-
Triton-X 100 1% (v/v) (mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Suspensão de hemácias (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volume final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

*HM=hemólise mecânica (ensaio em branco); **HT= hemólise total (100% de hemólise); ***Diluir a mostra na mesma solução da suspensão de hemácias.

As amostras foram incubadas a 37°C, durante 60 minutos. Após este período, o grau de hemólise foi avaliado pela tonalidade vermelha do sobrenadante (Figura 9F). Os tubos teste foram comparados com os tubos controle. O resultado foi avaliado considerando 0

(zero) para o controle negativo, 4 cruces para controle positivo, e o número de cruces que represente a tonalidade do tubo teste em relação ao controle positivo (TEIXEIRA et al., 2011).

Elaboração do queijo

O queijo foi produzido substituindo o coagulante comercial pelo extrato coagulante de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608, obtido por fermentação em meio líquido e, posteriormente, adicionado de biomassa de cogumelo comestível *Pleurotus ostreatoroseus* (p/p): 5%, 10% e 15%.

A biomassa desidratada de *P. ostreatoroseus* foi cedida pelo Herbário Micológico Jair Putzke, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Ao término da elaboração dos queijos, o produto foi submetido a análise centesimal e microbiológica.

Análise centesimal do queijo

O produto final foi submetido à determinação dos seguintes parâmetros físico-químicos: teor de umidade, proteína, cinzas, lipídios, carboidratos, fibras e valor calórico. As análises foram realizadas no Laboratório Tecnologia do Pescado – Universidade Federal do Amazonas, sob supervisão técnica do professor Doutor Antônio Fábio Lopes. A umidade foi determinada por desidratação em estufa de circulação de ar forçado a 105 °C até obtenção de peso constante segundo a A.O.A.C. (2005). A análise da fração proteica foi realizada pelo método micro Kjeldahl (A.O.A.C, 2005), usando fator de conversão de 6,38. A quantificação dos lipídeos foi realizada pelo método Bligh and Dyer. As cinzas foram determinadas por incineração do material em mufla a 550°C até obtenção de peso constante conforme A.O.A.C. (2005). A fibra bruta foi obtida através de digestão ácido-básica, segundo método de Weende, estabelecido pela A.O.A.C (2005). Os carboidratos totais serão estimados por diferença (100 g - gramas totais de umidade, proteína, lipídios e cinzas) e a energia total será calculada pela seguinte fórmula (TACO, 2011):

Energia total= (4kcal/g de proteína) + (4kcal/g carboidratos totais) + (9kcal/g de lipídios)

Análise microbiológica do queijo

A análise microbiológica dos queijos foi realizada conforme preconizado pela RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001, seguindo as metodologias descritas por Silva et al. (2010). Os micro-organismos analisados foram: *Staphylococcus aureus* coagulase positivo, Coliformes a 45°C e *Salmonella* sp.

Análise estatística dos dados

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

Resultados e Discussão

Atividade proteolítica e coagulante do leite

O meio de fermentação submersa utilizado promoveu a produção e excreção de proteases coagulantes do leite. As enzimas proteolíticas apresentaram atividade proteolítica de 150,00 U/mL e atividade coagulante do leite de 105,00 U. A coagulação foi classificada como forte devido à formação de coágulo denso e separação de soro abundante. O extrato bruto enzimático obtido foi utilizado para a determinação de citotoxicidade *in vitro* através de dois testes: hemólise e em fibroblastos MRC-5 humanos.

Teste de citotoxicidade *in vitro*

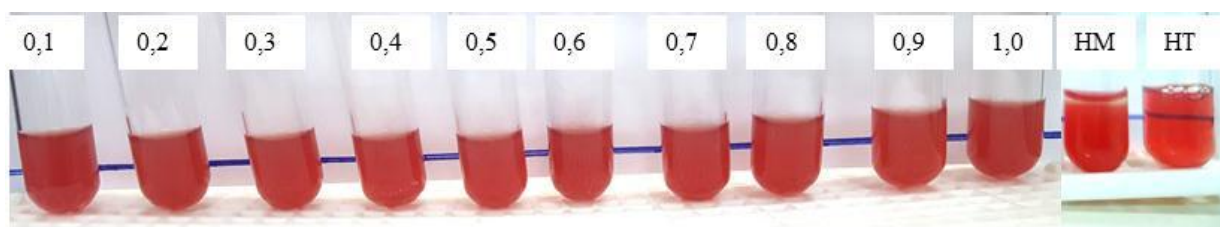
Hemólise em sangue comercial de carneiro e Teste em fibroblastos MCR-5 humanos

A atividade hemolítica do extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 está apresentada na tabela 2 e figura 1. O teste de toxicidade *in vitro* em fibroblastos MRC-5 humanos está apresentado na figura 2.

Tabela 2. Teste de atividade hemolítica do extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 em sangue comercial de carneiro.

Extrato bruto de <i>Aspergillus flavo furcatis</i> DPUA 1608										C-	C+
0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	HM	HT
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++++

Representação da avaliação da tonalidade vermelha do sobrenadante nas diferentes concentrações do extrato. C- (controle negativo-solução fisiológica) e C+ (controle positivo-Triton x-100); HM=hemólise mecânica; HT=hemólise total. Grau de hemólise: (0=negativo); (++++=hemólise total).



Figural. Atividade hemolítica qualitativa do extrato de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 em diferentes concentrações utilizando sangue de carneiro comercial.

Para o teste de hemólise, após 1 hora de incubação do extrato em diferentes concentrações (0,1 a 1mg/mL), de acordo com a tonalidade do sobrenadante não foi verificada atividade hemolítica.

As hemácias são bons modelos para o ensaio de citotoxicidade, pois a estabilidade mecânica de sua membrana é um indicador de toxicidade e bioatividade geral. Além disso, agentes líticos para outros tipos de células de mamíferos são geralmente líticos para hemácias. Dados da literatura demonstram que toxinas de lisam as hemácias são conhecidas como hemolisinas e que, essas toxinas formam poros que interagem com específicos ligantes na superfície celular (NAYAK, et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2011).

A toxicidade do extrato bruto enzimático de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 também foi negativa no teste frente a fibroblastos MRC-5 humanos, pois não observada a mudança morfológica das células. Esta ação está mostrada na figura 2A, assim como a ação dos controles negativo (DMSO), do extrato bruto e controle positivo (Dexorubicina), respectivamente.

Já a figura 2B representa a manutenção da viabilidade celular dos fibroblastos após o teste. O extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 manteve a viabilidade de 94% das células. Esses resultados foram próximos aos do controle negativo DMSO (100%) e superiores ao controle positivo Doxorubicina manteve apenas 23% das células viáveis.

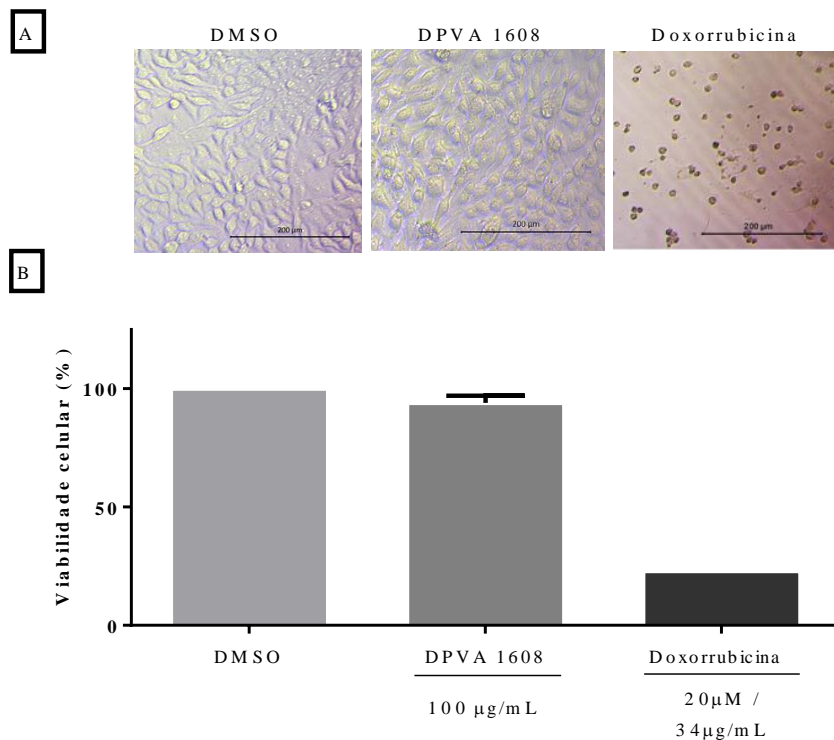


Figura 2. Avaliação do efeito citotóxico do extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 frente a fibroblastos MRC-5 humanos. DMSO=controle negativo; Doxorubicina=controle positivo.

Estudos de cultura celular são geralmente o ponto de partida de uma avaliação de biocompatibilidade. Também fornecem informações toxicológicas em um sistema simplificado que minimiza o efeito de variáveis que muitas vezes representam problemas significativos ao realizar experimentos *in vivo*. Outras vantagens do teste *in vitro* incluem simplicidade, custo-efetividade, confiabilidade e reprodutibilidade (MUKHTAR-FAYYAD, 2011).

O gênero *Aspergillus* tem ampla importância na microbiologia alimentar, seja como produtor de metabólitos úteis (ácido cítrico e enzimas), ou como deteriorantes e produtores de metabólitos tóxicos, como as micotoxinas. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. versicolor* e *A. nomius* são exemplos de espécies produtoras de micotoxinas. Enquanto que *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusilus*, *Aspergillus oryzae* e *Endothia parasitica* são fungos produtores de enzimas coagulantes do leite já

comercializadas e, por isso, são considerados como seguros (GRAS) (ALCANO, et al., 2014; ALECRIM et al., 2015; PRIYANCA et al., 2013).

O extrato bruto enzimático de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 não apresentou características tóxicas nos testes em sangue de carneiro e em fibroblastos MRC-5 humanos. Com estes resultados pode-se inferir que trata-se de espécie que GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros).

Elaboração dos queijos

O extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 foi utilizado como substituto do coagulante comercial no processo de fabricação dos queijos. Ele foi adicionado ao leite na proporção de 1:10 (v/v). A biomassa desidratada e triturada do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatoroseus* foi adicionada na etapa após a coagulação. Além do queijo padrão (sem a adição de cogumelo), Foram preparados três queijos adicionados com biomassa de cogumelo comestível (p/p): 5, 10 e 15% (Figura 3).

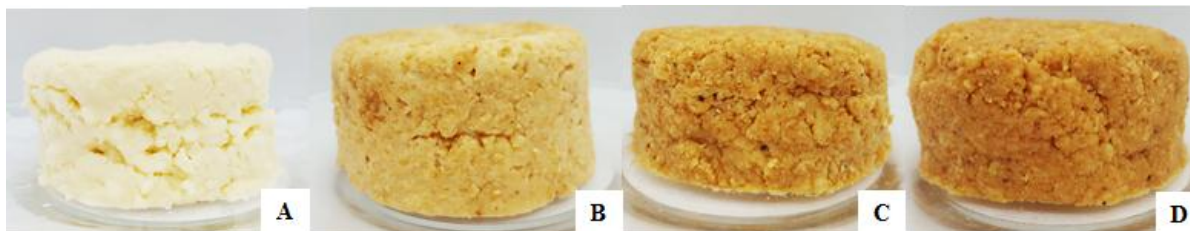


Figura 3. Queijos produzidos com coagulante de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 e adicionados de biomassa de *Pleurotus ostreatoroseus*. (A)=queijo padrão; (B)= queijo adicionado de 5% (p/p) da biomassa de cogumelo; (C) queijo adicionado de 10% (p/p) da biomassa de cogumelo; (D)= queijo adicionado de 15% (p/p) da biomassa de cogumelo.

Análise microbiológica e centesimal

De acordo com a RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001, os queijos analisados apresentaram conteúdo microbiano em quantidades dentro das estabelecidas para *Staphylococcus aureus* coagulase positivo, Coliformes a 45°C e *Salmonella* sp.

A análise centesimal dos queijos está apresentada na tabela 3. Os queijos elaborados com o coagulante de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 foram classificados como do tipo “minas frescal”.

O queijo minas frescal pode ser obtido por ação enzimática com ou sem adição de bactérias lácteas. É classificado como um produto de alta umidade, semi-gordode a ser consumido fresco. O queijo “minas frescal”, é o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com o coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas (SALOTTI et al., 2006).

Neste estudo, o conteúdo de umidade do queijo foi maior quando preparado com 15% (p/p) da biomassa de *P. ostreatoroseus* (Tabela 3). Com o aumento da concentração da biomassa do cogumelo comestível na massa do queijo, maior foi o quantitativo de água, cinzas (2,12%), proteínas (20,80%) e carboidratos (4,1%). A tabela 3 mostra que esse aumento está associado á adição da massa micelial do cogumelo.

Os teores de umidade, cinzas, proteínas e carboidratos aumentaram 8,15%, 53,56%, 9,33% e 85,11%, respectivamente, no queijo adicionado em 15% (p/v) de *P. ostreatoroseus* quando comparado ao padrão. Os valores de lípideos e energia total diminuiram 51,79% e 29,04%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Análise centesimal dos queijos preparados com as enzimas coagulantes do leite de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 .

Amostra/Parâmetro	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Lípideos (%)	Carboidratos (%)	Energia (Kcal)
Queijo padrão	57,93 ^c ±0.02	0,98 ^d ±0.00	18,86 ^b ±0.64	21,55 ^a ±0.38	0,7 ^b ±0.50	269,40 ^a ±2.75
Queijo 5% (p/p)	58,72 ^c ±0.38	1,16 ^c ±0.00	19,62 ^{a,b} ±0.68	19,19 ^b ±0.24	1,3 ^b ±0.27	257,35 ^b ±5.09
Queijo 10% (p/p)	60,83 ^b ±0.78	1,92 ^b ±0.00	20,32 ^{a,b} ±0.30	11,77 ^c ±0.17	4,1 ^a ±0.14	206,77 ^c ±3.38
Queijo 15% (p/p)	63,07 ^a ±0.28	2,12 ^a ±0.01	20,80 ^a ±0.61	10,39 ^d ±0.30	4,7 ^a ±0.47	191,19 ^d ±2.17

Letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si significativamente, de acordo com o Teste de Tukey (p>0,5).

Alves et al. (2013) utilizaram as enzimas do fungo *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 como coagulante na produção de queijo do tipo prato para comparar o efeito de duas proteases de fungos, uma já comercialmente estabelecida e outra produzida em escala laboratorial. Os resultados mostraram que as proteases de *T. indiciae-seudaticae* N31 apresentaram ação similiar quando comparada com as enzimas comerciais, indicando a eficiências destas enzimas como agentes coagulantes na faricação de queijo do tipo “prato”.

No estudo de Lemes et al. (2016) foi investigada a habilidade coagulante do leite de proteases obtidas de *Bacillus* sp. P45 e aplicá-las no desenvolvimento de um cream cheese enriquecido com farinhas de chia e quinoa. Os resultados indicaram que o produto final apresentou condições sanitárias adequadas e características tecnológicas que indicam que o cream cheese suplementado é um produto estável e viável.

Já na pesquisa de Araújo et al. (2009) foi reportado o enriquecimento de queijo tipo “minas padrão” com fibras de maracujá. O queijo produzido apresentou aceitação pelos provadores e pode vir como alternativa para aumentar o valor nutritivo e funcional do produto.

Conclusões

O coagulante não tóxico de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 foi eficiente no processo de coagulação do leite para a fabricação de queijo. Os queijos elaborados com esse coagulante foram classificados como do tipo minas frescal e quando adicionado de concentrações diferentes da biomassa desidratada de *Pleurotus ostreatoroseus* apresentaram características microbiológicas adequada para consumo humano. E quanto maior a concentração de biomassa de cogumelo comestível adicionada ao queijo, menor foram os conteúdos de lipídeos e energia e maior foram os conteúdos de umidade, carboidratos, proteínas e cinzas.

Referências bibliográficas

- ALCANO, M. J.; JAHN, R. C.; SCHERER, C. D.; WIGMANN, E. F.; SACCOMORI, F.; MORAES, V. M.; GARCIA, M. V.; COPETTI, V. Susceptibilidade de *Aspergillus* spp. A ácidos orgânicos conforme o pH. Blucher food Science Proceedings 1. 2014.
- ALVES, L.S.; MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; GIGANTE, M.L. Yield, changes in proteolysis, and sensory quality on Prato cheese produced with different coagulants. Journal of Dairy Science 96, 7490-7499. 2013.
- ARAÚJO, J. I. O.; LIMA, H. C.; LIMA, I. C. C.; BRANDÃO, L. S.; VINCENTINI, G. C.; FARIA, D. A.; COSTA, A. M. Estudo sensorial de queijo minas padrão enriquecido com fibras de casaca de maracujá. Embrapa Cerrados. 2009.
- AYANA, I. A. A. A.; IBRAHIM, A. E.; SABER, W.I.A. Statistical optimization of milk clotting enzymes biosynthesis by *Mucor mucedo* KP736529 its futher application in cheese production. Int. J. Dairy Sci.1 (2): 61-76. 2015.
- 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. Ciênci, Vet. Zool. Unipar (13) 19-24. 2010.
- ESPOSITO, M.; DI PIERRO, P.; DEJONGHE, W.; MARINIELLO, L.; PORTA, R. Enzymatic milk clotting activity in artichoke (*Cynara scolymus*) leaves and alpine thistle (*Carduus defloratus*) flowers. Immobilization of alpine thistle aspartic protease. Food Chemistry (204) 115-121. 2016.
- LEMES, A. C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; RAZYCKI, S.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 in cream cheese development. LWT-Food Science and Technology 66, 217-224. 2016.
- MUKHTAR-FAYYAD, D. Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells (MRC-5). Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology 112, 137-142. 2011.
- NAYAK, A. P.; GREEN, B. J.; BEEZHOLD, D. H. G.Fungal hemolysins. Medical Mycology 51, 1-16. 2013.
- NEVES, K. C. S. Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia. Tese. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Renorbio. 99p. 2014.
- PRIYANCA, S. R.; VENKATARAMANA, M.; JUMAR, G. O.; RAO, V. K.; MURALI, H. C. S.; BATRA, H. V. Occurrence and molecular detection of toxigenic *Aspergillus* species in food grain from India. Science Food and Agriculture 94, 537-543. 2014.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A.C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. I. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. Arq. Inst. Biol. 73, 171-175. 2006.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Proc. Biochem. 40: 2689-2694. 2005.

YEGIN, S.; GOKSUNGUR, Y.; FERNAFEZ-LAHORE, M. Purification, structural characterization and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* dms 809. Food Chemistry (133) 1312-1319. 2012.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesta pesquisa utilizando *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 na produção de proteases e coagulantes conduziram as seguintes conclusões:

- Nas condições de cultivo em meio sólido foi confirmada a viabilidade morfofisiológica, assim com, a ausência da produção de aflatoxinas;
- Entre os meios utilizados para cultivo do inóculo, ágar batata sacarose foi o de maior eficiência, com base na atividade de proteases e coagulante;
- Dos meios líquidos usados na fermentação, na solução salina adicionada de extrato de levedura foi observadas as atividades significativas de proteases e coagulantes;
- Os parâmetros que promoveram o aumento da síntese das proteases e coagulantes durante o bioprocessos foram:
 - Cultura inóculo com 5 dias de crescimento, inóculo equivalente a 10^6 esporos/ mL de meio.
 - Meio de fermentação pH 7,0, contendo amido 0,1% (p/v) e peptona 0,1% (p/v) como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente.
 - Fermentação conduzida a 30°C, 150 rpm por três dias.
- Na caracterização parcial das enzimas analisadas foi verificado que:
 - As proteases expressaram atividade ótima em pH 7, a 50°C e foram inibidas por Zn^{2+} , Cu^{2+} e ácido iodoacético, classificando as enzimas como cisteína proteases;
 - Os biocatalisadores coagulantes expressaram atividade ótima em pH 7, a 45°C. Nenhum dos íons metálicos promoveu efeito redutor na atividade enzimática. No entanto, ácido iodoacético foi o inibidor que mais afetou as enzimas coagulantes o que as caracteriza como cisteína proteases;
- Nas condições de análise, os coagulantes de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 não causaram ação tóxica;
- Os queijos elaborados com o coagulante de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1608 e adicionados de biomassa de *Pleurotus ostreatoroseus* foram classificados como do tipo minas frescal com qualidade nutricional e microbiológica para consumo humano.