

PODER EXECUTIVO
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FABIANO BRITO PRADO

PRODUÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTES
PRODUZIDOS POR ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS*

Manaus/AM

2022

FABIANO BRITO PRADO

**PRODUÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTES
PRODUZIDOS POR ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

ORIENTADORA: DR^a. MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA

COORIENTADOR: DR. SALOMÃO ROCHA MARTIM

Manaus/AM

2022

Ficha Catalográfica

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

P896p Prado, Fabiano Brito
Produção, otimização e caracterização de coagulantes produzidos por *Aspergillus* / Fabiano Brito Prado . 2022
84 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
Coorientador: Salomão Rocha Martim
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Protease. 2. Coagulação do leite. 3. Leite. 4. Fermentação submersa. I. Teixeira, Maria Francisca Simas. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FABIANO BRITO PRADO

**PRODUÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTES
PRODUZIDOS POR ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS***

Aprovado em 03 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Maria Francisca Simas Teixeira
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dr^a Teresa Alarcón Castillo
Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía - UNIA

Dr^a Kilma Cristiane Silva Neves
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - IFAM

Dr^a Waldireny Rocha Gomes
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dr^a Ormezinda Celeste Cristo Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela proteção, por sempre iluminar meus caminhos e pela oportunidade de estar aqui concluindo mais uma etapa da minha vida.

À minha mãe, Walmery Brito, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos, nunca medindo esforços em meu favor.

À Professora Dr^a. Maria Francisca Simas Teixeira, pela orientação de anos, sempre disposta a ensinar e me auxiliar durante todo o processo de construção deste trabalho.

Ao Professor Dr. Salomão Rocha Martim pela coorientação, ajuda e contribuição no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao pessoal do laboratório Ana Kézia, Elliza, Laynah, Dib, Profa. Socorro, Profa. Waldireny, Prof. Felipe e a minha amiga do lab Samara Claudia, pela parceria e ajuda em vários momentos durante esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, todos os professores e colaboradores, pela contribuição na minha formação acadêmica.

À Universidade Federal do Amazonas – UFAM, pela estrutura necessária para a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Amazonas – FAPEAM, pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

*“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é
o desejo de vencer”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

O coalho extraído de bezerro, fonte de coagulantes do leite bovino, nos últimos anos não atende as exigências de alguns grupos de consumidores, devido a diversas causas, como a mudança de hábitos alimentares e crenças religiosas. Mundialmente, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas na busca por novas fontes de enzimas que possam suprir a necessidade do mercado de queijos. Com base na importância industrial dos fungos, este estudo teve como objetivo avaliar espécies do gênero *Aspergillus* para selecionar uma linhagem produtora de enzimas coagulantes do leite bovino e investigar mecanismos regulatórios de síntese dos coagulantes para identificação das características para aplicação industrial. As linhagens: *A. clavato flavus* DPUA 929, *A. fischeri* DPUA 653, *A. flavo furcatis* DPUA 1451, *A. flavo furcatis* DPUA 1455, *A. japonicus* DPUA 542, *A. japonicus* DPUA 1727, *A. melleus* DPUA 323, *A. niger* DPUA 398, *A. niger* DPUA 399, *A. ostianus* DPUA 315, *A. oryzae* DPUA 541, *A. oryzae* DPUA 1624 e *A. wentii* DPUA 1725, são os 13 representantes do gênero *Aspergillus*. Na primeira etapa, as linhagens foram autenticadas com base nas características macromorfológicas e micromorfológicas. As culturas puras e viáveis foram utilizadas na seleção de uma espécie produtora de proteases e coagulantes por fermentação submersa, em condições padronizadas. O extrato enzimático recuperado da fermentação foi utilizado para determinação da atividade das proteases e posterior caracterização parcial quanto ao efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade e efeito de íons metálicos e inibidores na atividade enzimática. E para identificação das exigências nutricionais, foram selecionadas como fonte de carbono, amido e como fonte de nitrogênio, caseína, associados a três diferentes tempos de incubação, e para a síntese dos coagulantes por *Aspergillus*, em planejamento fatorial completo 2³, com 3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos. O extrato com maior razão coagulante foi caracterizado quanto ao efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática. Também foi avaliado o efeito de inibidores e íons metálicos na atividade coagulante, além da avaliação quanto à citotoxicidade *in vitro* utilizando fibroblastos humanos. A maioria das linhagens testadas produziram proteases em meio líquido. *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451 foi identificada como fonte significativa de serinoproteases e metaloproteases que expressam atividade catalítica significativa em pH 5,0 e 50 °C, com estabilidade em pH 7 a 9, até 40 °C, em 60 minutos, o que demonstra o uso potencial destes biocatalisadores na indústria de alimentos, principalmente para a produção de queijos.

Palavras-chave: protease, coagulação do leite, fermentação submersa.

ABSTRACT

The rennet extracted from calf, a source of coagulants in bovine milk, in recent years has not met the requirements of some consumer groups, due to various causes, such as changing eating habits and religious beliefs. Worldwide, several researches are being carried out in the search for new sources of enzymes that can meet the needs of the cheese market. Based on the industrial importance of fungi, this study aimed to evaluate species of the genus *Aspergillus* to select a strain that produces coagulant enzymes from bovine milk and to investigate regulatory mechanisms of coagulant synthesis to identify characteristics for industrial application. The strains: *A. clavato flavus* DPUA 929, *A. fischeri* DPUA 653, *A. flavo furcatis* DPUA 1451, *A. flavo furcatis* DPUA 1455, *A. japonicus* DPUA 542, *A. japonicus* DPUA 1727, *A. melleus* DPUA 323, *A. niger* DPUA 398, *A. niger* DPUA 399, *A. ostianus* DPUA 315, *A. oryzae* DPUA 541, *A. oryzae* DPUA 1624 and *A. wentii* DPUA 1725, are the 13 representatives of the genus *Aspergillus*. In the first step, the lines were authenticated based on macromorphological and micromorphological characteristics. Pure and viable cultures were used in the selection of a species that produced proteases and coagulants by submerged fermentation under standardized conditions. The enzyme extract recovered from fermentation was used to determine the activity of proteases and later partial characterization regarding the effect of pH and temperature on the activity and stability and effect of metal ions and inhibitors on the enzyme activity. And to identify the nutritional requirements, they were selected as a source of carbon, starch and as a source of nitrogen, casein, associated with three different incubation times, and for the synthesis of coagulants by *Aspergillus*, in a complete factorial design 2³, with 3 central points, totaling 11 experiments. The extract with the highest coagulant ratio was characterized as to the effect of pH and temperature on enzyme activity and stability. The effect of inhibitors and metal ions on clotting activity was also evaluated, in addition to the evaluation of in vitro cytotoxicity using human fibroblasts. Most of the tested strains produced proteases in liquid medium. *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451 was identified as a significant source of serine proteases and metalloproteases that express significant catalytic activity at pH 5.0 and 50 °C, with stability at pH 7 to 9, up to 40 °C, in 60 minutes, which demonstrates the potential use of these biocatalysts in the food industry, mainly for cheese production.

Keywords: protease, milk coagulation, submerged fermentation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
Capítulo 1: Revisão da Literatura	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 O gênero <i>Aspergillus</i>	14
2.2 Proteases de origem microbiana.....	15
2.3 Coalhos e coagulantes.....	17
2.4 Caseína do leite.....	18
2.4.1 O processo de coagulação do leite.....	19
2.5 Coagulantes produzidos por fungos.....	19
2.6 Fermentação.....	21
2.6.1 Tipos de fermentação.....	21
2.7 Ensaio de toxicidade com fibroblastos humanos.....	22
Capítulo 2: Objetivos e metodologia	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específicos.....	34
4 METODOLOGIA	35
4.1 Microrganismos.....	35
4.2 Autenticação e manutenção dos fungos.....	35
4.3 Seleção de uma espécie produtora de proteases coagulantes por fermentação submersa.....	35
4.3.1 Preparação do Inóculo.....	35
4.3.2 Fermentação submersa.....	36
4.3.2.1 Meio de fermentação	36
4.3.3 Recuperação do extrato bruto.....	36
4.4 Métodos de análise enzimática.....	36
4.4.1 Determinação qualitativa da atividade proteolítica.....	36
4.4.2 Determinação quantitativa da atividade proteolítica.....	36
4.4.3 Determinação da atividade de coagulação do leite.....	37
4.5 Análise dos mecanismos regulatórios da síntese de proteases coagulantes.....	38
4.5.1 Determinação do efeito de fontes de carbono, nitrogênio e tempo de fermentação.....	38
4.5.1.1 Planejamento fatorial.....	38
4.6 Caracterização parcial das proteases.....	38
4.6.1 Enzimas proteolíticas.....	38
4.6.1.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das enzimas proteolíticas...38	
4.6.1.2 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade das enzimas proteolíticas.....	39
4.6.2 Proteases coagulantes.....	39
4.6.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das proteases coagulantes..39	
4.6.2.2 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade das proteases coagulantes.....	39
4.7 Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> em fibroblastos humanos.....	40
5 Análise estatística	40
Capítulo 3: Resultados e discussão	43
Artigo: “Viabilidade da produção de proteases por espécies de Aspergillaceae e triagem de coagulantes do leite bovino”.....	44
Capítulo 4: Resultados e discussão	64
Artigo: “Produção, otimização e caracterização de proteases coagulantes de uma espécie de fungo filamentosso epifítico de região tropical”	65

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

- Figura 1. Estruturas características do gênero *Aspergillus* (KLICH e PITT, 1988).....15
- Figura 2. Classificação das proteases quanto ao mecanismo de ação (Fonte: autor)16
- Figura 3. Corte transversal de uma micela da caseína do leite, mostrando as sub micelas ligadas à camada da cadeia peptídica protuberante e ao fosfato de cálcio (WALSTRA, 1999).18
- Figura 4. Proteases de origem microbiana com ação coagulante do leite bovino (fonte: autor)...19
- Quadro 1. Fungos como produtores de coagulantes (Fonte: autor).....20
- Figura 5. Cultivo em meio líquido: estruturas denominadas de pellets (massa micelial em forma de novelo) (Fonte: autor).22

Capítulo 3:

- Figura 1. Atividade de proteases das espécies de *Aspergillus*, cultivadas em meio líquido, a 30 °C, 180 rpm, utilizando gelatina como substrato.....53
- Figura 2. Efeito do pH na atividade (■) e estabilidade (▲) de proteases de *A. oryzae*.....54
- Figura 3. Efeito da temperatura na atividade (■) e estabilidade (▲) de proteases de *A. oryzae*...55
- Figura 4. Classificação da força de coagulação das proteases de *Aspergillus*: A= *A. oryzae* DPUA 541 e B = *A. oryzae* DPUA 1624 (Coagulação forte do leite); C= *A. melleus* DPUA 323 (Coagulação fraca do leite).....57

Capítulo 4:

- Figura 1. Gráfico de Pareto identificando os fatores e as interações significativos na produção de proteases coagulantes do leite de *A. flavo furcatis*.....74
- Figura 2. Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática de *A. flavo furcatis* DPUA 1451...75
- Figura 3. Efeito da temperatura na atividade (●) e estabilidade (■) enzimática de *A. flavo furcatis* DPUA 1451.....76
- Figura 4. Avaliação do efeito citotóxico do extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451 frente a fibroblastos MRC-5 humanos em diferentes concentrações de DMSO (controle negativo).....78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros avaliados no planejamento fatorial 2^3 completo com três pontos centrais para otimização da produção de proteases da espécie de <i>Aspergillus</i> . [(-1), (0) e (+1) correspondem aos níveis inferior, central e superior, respectivamente].....	38
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Característica do halo de degradação, diâmetro do halo e Índice de Atividade Enzimática (IAE) de espécies de <i>Aspergillus</i>	52
Tabela 2. Efeito de íons metálicos inibidores na atividade proteolítica de <i>A. oryzae</i> DPUA 541.....	56
Tabela 3. Atividade coagulante e força de coagulação das proteases de culturas de <i>Aspergillus</i>	56

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Parâmetros avaliados no planejamento fatorial 2^3 completo com três pontos centrais para otimização da produção de proteases da espécie de <i>Aspergillus</i>	69
Tabela 2. Design fatorial 2^3 completo com três pontos centrais para a otimização da produção de coagulantes <i>A. flavo furcatis</i>	73
Tabela 3. Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade de <i>A. flavo furcatis</i>	77

1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, o coalho extraído de bezerro por ser uma mistura de enzimas proteolíticas com ação na caseína do leite vem sendo utilizado na fabricação de diferentes queijos comerciais (BASKAR *et al.*, 2017; MAMO *et al.*, 2020).

Para atender as exigências dos consumidores, a indústria de laticínios vem buscando novas tecnologias como formas de reduzir o custo do processo de fabricação e a qualidade dos produtos para comercialização (KHAN e SELAMOGLU, 2020). Além disso, as questões éticas sobre o uso de animais como fonte de coalho e demanda da produção de queijo está proporcionando a busca por coalho oriundo de outras fontes (VISHWANATHA *et al.*, 2010; KOSALKOVÁ *et al.*, 2020).

Como fontes alternativas de coalho são citadas espécies vegetais e microrganismos, entre estes predominam fungos e bactérias. Entre os fungos, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Aspergillus oryzae*, *A. flavo furcatis* e *A. niger* são produtores de coagulantes (BENSMAIL *et al.*, 2020; SAMBO *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, as proteases coagulantes de origem microbiana são utilizadas em aproximadamente um terço de todo o queijo produzido mundialmente. Esses biocatalisadores são de fácil produção, obtenção em tempo menor, baixo custo, alto rendimento, elevada razão coagulante do leite, termoestabilidade, maior especificidade, extensa diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética e contribuem no aumento da qualidade dos produtos (BASKAR *et al.*, 2017; BARZKAR *et al.*, 2018; RAZZAQ *et al.*, 2019; CHIMBEKUJWO *et al.*, 2020; MAMO *et al.*, 2020; BAKR *et al.*, 2021).

Atualmente, os coagulantes microbianos são frequentemente utilizados como substitutos ao coalho ou quimosina, na fabricação de queijo, representando uma boa fatia deste mercado, com cerca de 33% do mercado total de proteases (MAMO *et al.*, 2020).

A busca por microrganismos que sintetizem coagulantes são ações imperativas para suprir a demanda da indústria alimentícia. Todavia, produtos, como coagulantes microbianos são aceitos para produção em escala industrial após certificação GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), da US Food and Drug Administration.

Para avaliar se o produto é próprio para inserção no mercado se faz necessário o ensaio de toxicidade em células humanas, a exemplo de produtos já comercializados com enzimas sintetizadas por *Aspergillus niger*, *A. sojae*, *A. awamori* e *A. oryzae* (KOSALKOVÁ *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2018; NTANA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2021; PRADO *et al.*, 2021).

Referências Bibliográficas

BAKR, A.; IBRAHIM, O.; EL-GHANDOUR, A. E. S.; EL-DEEB, N. Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme from Edible Mushroom (*Pleurotus florida*). Letters in Applied NanoBioScience. V. 11. N. 2. P. 3362-3373. 2021. DOI: <https://doi.org/10.33263/LIANBS112.33623373>.

BASKAR, G.; SNEHA, D.V.; MERLIN, B. S.; VIDHULA, J. A. Optimization of microbial milk clotting enzyme production by *Aspergillus candidus* MTCC1989 using statistical method. International Journal of Industrial Engineering. V. 1, n. 5, 2017. Pp. 171-177. 2017.

BARZKAR, N.; HOMAELI, A.; HEMMATI, R.; PATEL, S. Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. Extremophiles. V. 22. 335-346. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007%2Fs00792-018-1009-8>.

BENSMAIL, S.; BOUDJEMA, K.; NAIMI-FAZOUANE, F. Production of Extracellular Rennin-Like Enzyme by a Newly Isolate *Mucor circinelloides* (von Tieghem) and its Application in Camembert Cheese Making. Journal of Applied Biotechnology Reports. V. 7, n 1, pp: 16-24. 2020. DOI <https://doi.org/10.30491/JABR.2020.105914>

CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. Scientific African. V. 8. 2020.

KHAN, M. U.; SELAMOGLU, Z. Use of Enzymes in Dairy Industry: A Review of Current Progress. Archives of Razi Institute. V. 75. n. 1. p. 131-136. 2020. DOI: [0.22092/ari.2019.126286.1341](https://doi.org/10.22092/ari.2019.126286.1341)

KOSALKOVÁ, K.; GARCÍA-ESTRADA, C.; BARREIRO, C.; FLÓREZ, M. G.; JAMI, M. S.; PANIAGUA, M. A.; MARTÍN, J. F. Casein phosphopeptides drastically increase the secretion of extracellular proteins in *Aspergillus awamori*. Proteomics studies reveal changes in the secretory pathway. Microbial Cell Factories. V. 11, n 5. 2012.

MAMO, J.; KANGWA, M.; FERNANDEZ-LAHOIRE, H. M.; ASSEFA, F. Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. Brazilian Journal of Microbiology. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00243-y>. 2020.

NTANA, F.; MORTENSEN, U. H.; SARAZIN, C.; FIGGE, R. *Aspergillus*: A Powerful Protein Production Platform. Catalysts. V. 10, n. 1064. 2020. DOI: [doi:10.3390/catal10091064](https://doi.org/10.3390/catal10091064).

OLIVEIRA, G. P.; GOMES, L. S. S.; VENÂNCIO, G. N.; LIMA, E. S.; SOUZA, T. P.; BANDEIRA, M. F. C. L.; TODA, C.; CONDE, N. C. O. Citotoxicidade de uma formulação em orabase de *Libidibia ferrea*. Research, Society and Development. V. 10. N. 10. p. 1-8. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18713>.

PRADO, F. B.; BATISTA, S. C. P.; MARTIM, S. R.; TEIXEIRA, M. F. S. Viabilidade Da Produção De Proteases Por Espécies De *Aspergillaceae* E Triagem De Coagulantes Do Leite Bovino. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 2, p. 16356–16373, 2021.

RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRAF, M. Microbial Proteases Applications. Bioengineering and Biotechnology. V. 7. N. 110. P. 1-20. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.

SAMBO, S.; MAGASHI, A. M.; FAROUQ, A. A.; HASSAN, S. W. An overview of the solid state fermentation in the production of fungal protease enzymes. World Journal of Advanced Research and Reviews. V. 09, n 3, pp: 085–089. 2021. DOI <https://doi.org/10.30574/wjarr.2021.9.3.0061>

SILVA, O. S.; ALMEIDA, E. M.; MELO, A. H. F.; PORTO, T. S. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaritii* URM4634. International Journal of Biological Macromolecules. V. 117, p. 1081-1088. 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.002>.

VISHWANATHA, K. S; APPU R.; A. G.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. J Ind Microbiol Biotechnol V. 37, n 2 Pp: 129–138. 2010.

Capítulo 1

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O gênero *Aspergillus*

Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são fungos filamentosos microscópicos, descritos por Micheli em 1729, se destaca como um dos gêneros que tem maior importância econômica em biotecnologia por produzir enzimas, ácidos orgânicos, antimicrobianos, lovastatina, entre outros constituintes bioativos (RODRIGUES *et al.*, 2011; KOCSUBÉ *et al.*, 2016; SUBHAN *et al.*, 2020).

Certas espécies de *Aspergillus* são reconhecidas como organismos GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), por exemplo, *A. oryzae* já incluído nessa classificação por sua utilização histórica na produção de alimentos tradicionais fermentados, devido à sua alta atividade proteolítica (CASTRO e SATO, 2014)

O quantitativo de 132 espécies do gênero *Aspergillus*, preliminarmente, foi citado por Raper e Fennell (1965), identificados com base nas características morfológicas, em 18 grupos. Na classificação feita por Klich e Pitt (1988), o gênero em seis subgêneros, cada um contendo uma ou mais seções. Nesta classificação, o termo “Seção” corresponde aos grupos do sistema de Raper & Fennell. A alteração foi necessária porque o termo "grupo" não tem relevância no Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICN).

Samson *et al.* (2014), em sua revisão mantém o conceito amplo de *Aspergillus* e atualiza o número de espécies para 350 representantes, também reforça a importância das características morfológicas e de marcadores de DNA para identificação confiável a nível de espécie.

Este gênero anamórfico, que tem como característica, hifas septadas, estruturas celulares que se diferencia em outras especializadas, o conidióforo, formado por três partes: distintas: (1) célula-pé (hifa basal em forma de “T” ou “L”), às vezes separada por um septo que dá origem ao conidióforo; (2) hifa cilíndrica e, (3) vesícula (extremidade alargada).

Na vesícula estão dispostas as células conidiogênicas, as fiálides. Em muitas espécies, entre a vesícula e as fiálides estão outras células chamadas metulas. Vesículas unisseridas têm apenas fiálides, aqueles com fiálides e metulas, são denominadas de vesículas bisseriadas (KLICH e PITT, 1988) (Figura 1).

A denominação *Aspergillus* foi dada por Micheli (1729) em função da semelhança das características do gênero a um *Aspergillum* (dispositivo utilizado pela igreja católica para aspergir água benta) (KOCSUBÉ *et al.*, 2016).

O impacto na economia e na sociedade de certas espécies de *Aspergillus* está associado à produção de enzimas de importância biotecnológica. Boa parte das espécies do gênero *Aspergillus*

são consideradas como seguras e excelentes produtoras de proteases, que possuem atividade em uma vasta faixa de pH ou temperatura. (SANDHYA *et al.*, 2005; PAIVA *et al.*, 2015).

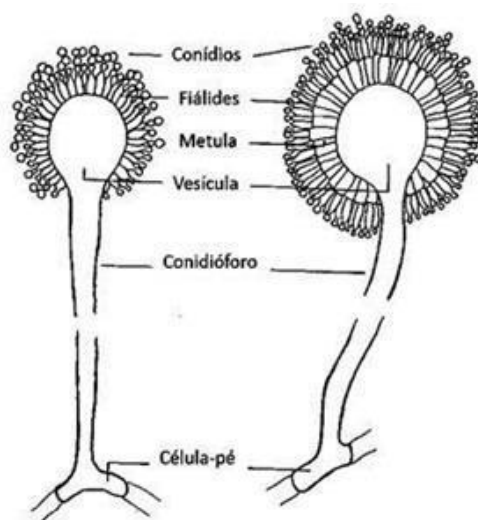


Figura 1. Estruturas características do gênero *Aspergillus* (KLICH e PITT, 1988).

2.2 Proteases de origem microbiana

As enzimas podem ser sintetizadas em grandes quantidades em um período de tempo relativamente curto por processos já estabelecidos de fermentação (GUPTA 2002; SOUZA *et al.*, 2015). Geralmente, as proteases microbianas são de origem extracelular e secretadas diretamente no meio fermentativo, o que torna mais simples o processo se comparado às proteases obtidas de plantas ou animais (SAVITHA, 2011; SOUZA *et al.*, 2015).

As proteases, peptidases ou proteinases são um grupo de enzimas que realizam a proteólise, ou hidrólise de ligações peptídicas que ligam os aminoácidos em uma cadeia polipeptídica, formando as proteínas.

Estas enzimas possuem atividade catalítica em uma ampla faixa de pH e temperatura, sendo divididas em dois grupos conforme seu mecanismo de ação: as exopeptidases, caso a hidrólise peptídica aconteça próxima as extremidades da cadeia ou endopeptidases, se a quebra da ligação ocorra no centro ou nas regiões internas da cadeia (figura 2) (HEDSTROM, 2002; SRILAKSHMI *et al.*, 2015; HOMAIEI *et al.*, 2016).

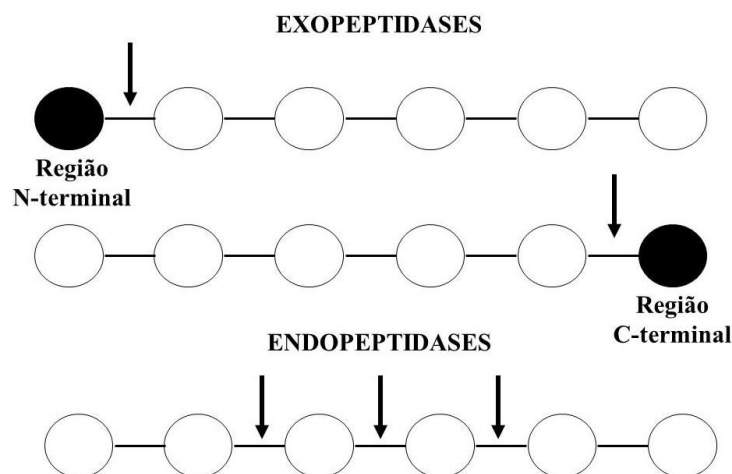


Figura 2. Classificação das proteases quanto ao mecanismo de ação (Fonte: autor)

As proteases microbianas podem ser classificadas em grupos, de acordo com os aminoácidos do sítio ativo que estão envolvidos na catálise e por determinação da atividade em diferentes faixas de pH, podendo ser metalo proteases (SHENDE *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2020), proteases aspárticas (SOUZA *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2018), cisteíno proteases (SINGH *et al.*, 2016; SILVA, 2017) e serino proteases (AISSAOUI *et al.*, 2016; FRANCO *et al.*, 2017).

As proteases são classificadas com base em vários critérios como: os aminoácidos alvo para a hidrólise, o ambiente químico e o tipo de substrato. Entretanto, a melhor maneira de classificação das proteases é baseada no aminoácido envolvido na hidrólise, dessa forma, as proteases se dividem em seis grupos: serino proteases, treonina proteases, cisteíno proteases, aspártico proteases, proteases de ácido glutâmico e metalo proteases (CUNNINGHAM *et al.*, 1999; SRILAKSHMI *et al.*, 2015).

As serino proteases contribuem com um alvo maior na indústria e na medicina com várias serino proteases recombinantes produzidas e já em uso comercial (SRILAKSHMI *et al.*, 2015).

As proteases de treonina são importantes na fisiologia, um exemplo é o proteassoma, que se agrupa a um complexo multimérico para posicionar seus substratos e utilizar as ligações thr-glu/asp-lis (BAIRD *et al.*, 2006). As cisteíno proteases, que também são denominadas tiol proteases, desempenham um papel de destaque em aplicações industriais, estando presente em frutas como mamão, abacaxi, figo e kiwi e são utilizadas principalmente como amaciadores de carne (SRILAKSHMI *et al.*, 2015).

As proteases aspárticas diferem das demais proteases com desempenho em funções fisiológicas, os exemplos clássicos são as pepsinas, catepsinas e a renina, enzimas chave para a manutenção da fisiologia (BENES *et al.*, 2008; SRILAKSHMI *et al.*, 2015; LEHRBACH,

RUVKUN, 2016). As proteases de ácido glutâmico são amplamente presentes em fungos, utilizadas no processamento de alimentos, e em terapias antitumorais e anticancer (HASHIMOTO *et al.*, 1973; SRILAKSHMI *et al.*, 2015).

As metalo proteases são utilizadas na fabricação de fármacos. Devido à grande afinidade de substratos e diversas fontes de proteases, as aplicações destas enzimas podem ser feitas em diferentes indústrias (GOVIND *et al.*, 1981; SRILAKSHMI *et al.*, 2015).

As proteases microbianas estão entre as enzimas hidrolíticas mais importantes e têm sido largamente estudadas (SOUZA *et al.*, 2015). A maior parte das enzimas produzidas por bactérias são classificadas como neutras e alcalinas, principalmente por espécies do gênero *Bacillus*. Os fungos produzem uma maior variedade de enzimas do que as bactérias, como representantes do gênero *Aspergillus*, que sintetizam proteases ácidas, neutras ou alcalinas, que são ativas em uma ampla faixa de pH que varia de 4 a 11 (RAO *et al.*, 1998).

A síntese de proteases por fungos tem uma vantagem sobre a produção por bactérias: o micélio pode ser mais facilmente removido, dispensando o uso de técnicas caras de filtração (GERMANO, 2003; SOUZA, *et al.*, 2015). Outra vantagem dos fungos é que são usualmente apontados como organismos GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) (SOUZA, *et al.*, 2015).

2.3 Coalhos e coagulantes

Segundo Hellmuth & Brink (2013), o coalho animal é uma enzima de coagulação do leite isolada do estômago de bezerros, o principal componente do coalho é a quimosina. Devido ao custo elevado e a preocupações éticas ao que se refere ao uso de animais, este coalho é indesejado em alguns mercados (HELLMUTH & BRINK, 2013; ALECRIM *et al.* 2014).

O coalho é uma protease aspártica, é a principal enzima empregada na produção de queijo, não somente agindo na coagulação do leite, mas também desempenhando um papel importante na maturação do queijo, etapa essencial para o desenvolvimento do sabor e textura do produto (SATHYA *et al.*, 2009).

O coalho microbiano é uma alternativa ao de origem animal e atualmente a principal enzima é a protease aspártica de *Mucor miehei* (HARBOE, 2010), também são utilizadas as enzimas de *M. pusillus* e *Endothia parasitica* (GAGNAIRE *et al.* 2001).

As proteases coagulantes de fontes microbianas são enzimas sintetizadas por microrganismos como bactérias (AGEITOS *et al.*, 2007; DUTT *et al.*, 2008; HANG *et al.*, 2016; KARTHIKEYAN *et al.*, 2018), ou por fungos (SATHYA *et al.*, 2009; MERHEB-DINI *et al.*, 2010; BENSMAIL *et al.*, 2020; CHINMAYEE *et al.*, 2019; MAMO *et al.*, 2020).

As enzimas microbianas vêm sendo estudadas extensivamente, purificadas e clonadas, com o interesse na aplicação comercial na indústria de alimentos, substituindo o coalho animal, seja para a fabricação de queijo, de cervejas, entre outros produtos (SATHYA *et al.*, 2009).

Todavia, as proteases de fontes microbianas alternativas ao coalho revelam um inconveniente, são menos específicas, o que resulta em certos tipos de queijo com rendimentos reduzidos e podem apresentar um sabor amargo, ou perda do sabor, além de um amaciamento do produto indesejado (PREETHA & BOOPATHY, 1997; SINGH *et al.*, 2005; VISHWANATHA *et al.*, 2010). Contudo, existem técnicas que auxiliam no desamargamento de hidrolisados proteicos (SHARMA *et al.*, 2019).

2.4 Caseína do leite

A caseína do leite é composta por micelas (figura 3) de formato aproximadamente esférico, com superfície rugosa, constituída por unidades menores denominadas de sub micelas, que são de dois tipos: uma é composta por α -caseína e β -caseína, a outra forma possui α - e κ -caseína. As sub micelas podem se unir a aglomerados de fosfato de cálcio, dessa forma as sub micelas se ligam até formar a micela, cadeias de c-terminal da κ -caseína se salientam da superfície da micela, impedindo a agregação de mais sub micelas (WALSTRA, 1999).

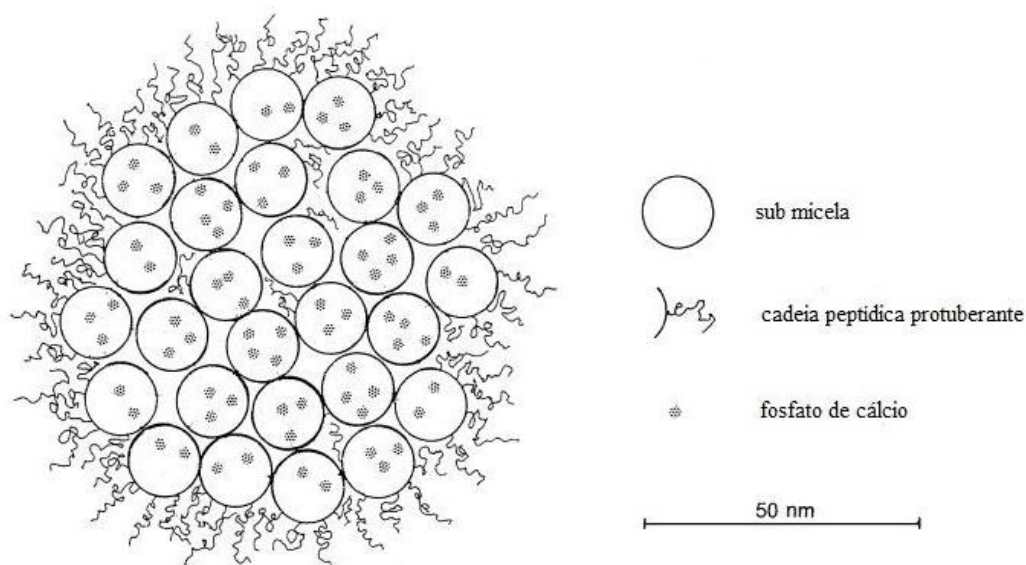


Figura 3. Corte transversal de uma micela da caseína do leite, mostrando as sub micelas ligadas à camada da cadeia peptídica protuberante e ao fosfato de cálcio (WALSTRA, 1999).

2.4.1 O processo de coagulação do leite

A coagulação do leite pela quimosina inclui três fases principais: a primeira é a ação da quimosina sobre a caseína, onde ocorre a liberação do glicopeptídeo da κ -caseína. Durante a segunda fase, o coágulo é formado, e na fase terciária, todos os componentes da caseína são hidrolisados lentamente (JOLLÈS, 1975).

A proteólise da quimosina contribui para a formação de compostos do sabor, a exemplo da maturação do queijo, a ligação Phe105-Met106 da κ -caseína é o sítio primário da quimosina na fabricação do queijo e a liberação do macropéptido da κ -caseína causa desestabilização das micelas da caseína, resultando na formação da coalhada (REID *et al.*, 1997).

2.5 Coagulantes produzidos por fungos

Os microrganismos produzem uma grande variedade de proteases, que podem ser de origem intracelulares ou extracelulares. Dentre as diversas proteases, boa parte das que contém ação coagulante (figura 4) são aplicadas na indústria de alimentos para a fabricação de diferentes tipos de queijos (VISHWANATHA *et al.*, 2010).



Figura 4. Proteases de origem microbiana com ação coagulante do leite bovino (fonte: autor)

Uma das principais enzimas utilizadas na fabricação de queijos é a quimosina, que compõe o coalho, extraída do quarto estômago de bezerros em fase de lactação. No entanto, com o aumento da demanda pelo produto, a busca por enzimas que possam substituir as produzidas por animais, a alternativa mais viável pela rapidez na obtenção e por ser uma boa alternativa na redução de custos são as enzimas de origem microbiana (SILVA *et al.*, 2017).

Dos produtores de enzimas coagulantes de origem microbiana, os fungos (Quadro 1) são como uma fonte notável na produção destas enzimas devido à facilidade de manipulação, diversidade de espécies, suas enzimas possuem a capacidade para degradar polímeros complexos

como a lignina ou queratina) e alto desempenho no processo de produção (SILVA, 2017). Dentro do gênero *Aspergillus*, *A. oryzae* vem sendo utilizado amplamente na fabricação de queijo e na síntese de coagulantes disponíveis no mercado (JACOB *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2013).

Quadro 1. Fungos como produtores de coagulantes.

Espécie	Tipo de protease	Condições ótimas	Aplicação	Fonte
<i>Penicillium roqueforti</i>	-	pH 3,0-5,5 e 35-43°C	Fabricação de queijo	KINSELLA <i>et al.</i> , 1976
<i>Rhizopus oryzae</i>	Aspártico protease	pH 5,5 e 60°C	-	KUMAR <i>et al.</i> 2005
<i>Aspergillus tamaritii</i>	Serino alcalino protease	pH 9,0 e 30°C	Agente depilatório bovino	ANANDAN <i>et al.</i> 2007
<i>Fusarium sp</i>	Alcalino protease	pH 9,5 e 50°C	Terapia trombolítica	UEDA <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus nidulans</i>	Serino protease	pH 8,0 e 35°C °C	Indústria farmacêutica, couro e alimentos	CHARLES <i>et al.</i> 2008
<i>Aspergillus niger</i>	Alcalina	pH 8,5 e 45°C	Indústria de detergentes	DEVI <i>et al.</i> 2008;
<i>Aspergillus flavus</i>	Alcalino protease	pH 9,0 e 45-60°C	Agente depilatório	CHELLAPANDI, 2010
<i>Aspergillus terreus</i>	Alcalino protease	pH 8,0 e 45-60°C	Indústria de couro	CHELLAPANDI, 2010
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Protease ácida	pH 5,0 e 30°C	Aplicação industrial	OYLEKE <i>et al.</i> 2010
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	pH 5,4 e 45°C	Indústria farmacêutica e de alimentos	VISHWANATHA <i>et al.</i> 2010
<i>Cryptococcus sp</i>	Aspártico protease	pH 3,0-7,0 e 50°C	-	RAO <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus flavo furcatis</i>	Aspártico protease	pH 7,0 e 40°C	Alternativa ao coalho	ALECRIM <i>et al.</i> 2015
<i>Mucor pusillus</i>	Aspártico protease	pH 5,0-7,0 e 60°C	Coagulante do leite	YUQIU <i>et al.</i> 2015
<i>Penicillium citrinum</i>	Serino alcalino protease	pH 6,0-8,0 e 30°C	Indústria alimentícia	XIE <i>et al.</i> , 2016
<i>Aspergillus foetidus</i>	Aspártico protease	pH 5,0 e 55°C	Indústria farmacêutica, alimentos	SOUZA <i>et al.</i> 2017
<i>Rhizomucor miehei/Pichia pastoris</i>	Serino protease	pH 5,5 e 55°C	Aplicações industriais	SUN <i>et al.</i> , 2017

(Fonte: autor)

2.6 Fermentação

Há milênios as pessoas vêm buscando formas de se utilizar as enzimas para fabricar bebidas e alimentos, no Egito cerca de 2000 a.C. há relatos do uso de enzimas para a fabricação de pão. Na China, por volta de 1200 a 1046 a.C. há os primeiros textos sobre a produção de cerveja (MCGOVERN *et al.* 2004; WANDERLEY *et al.* 2011).

A palavra fermentação vem do latim “fermentum” (fermentar) e tem por definição como o processo no qual mudanças químicas em um substrato orgânico ocorrem como resultado da ação de enzimas microbianas (CHOJNACKA, 2010).

O processo fermentativo é uma alternativa muito importante para a obtenção de enzimas para aplicação industrial, a obtenção de metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, ácidos orgânicos, biossurfactantes, biocombustíveis e etc. (PANDEY, 2003).

2.6.1 Tipos de fermentação

Para a produção de proteases, atualmente se utilizam principalmente de dois processos fermentativos: a fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). (SANDHYA *et al.*, 2005; MERHEB *et al.*, 2007; KRISHNA *et al.*, 2009; MERHEB-DINI *et al.*, 2010; ROCHA, 2010; DING *et al.*, 2012).

A FES é um processo estático, onde não há gasto de energia, embora haja a necessidade do controle do pH e temperatura (SANDHYA *et al.*, 2005; CHOJNACKA, 2010). A FES tem mostrado vantagens na produção de metabólitos, na utilização para a produção de alimentos, a alta reprodutibilidade com geração mínima de resíduos, bem como a utilização de restos alimentares como matéria-prima pode ser uma alternativa para o aproveitamento destes resíduos, além de fornecer altos rendimentos de produção de enzimas (CHUTMANOP *et al.*, 2008; GMOSER *et al.*, 2019).

Atualmente, a FES está associada ao desenvolvimento de produtos feitos em pequenas quantidades e alto valor como amilases e proteases, devido ao enorme potencial para a produção de enzimas (KUNAMNENI *et al.*, 2005; CHUTMANOP *et al.*, 2008; GMOSER *et al.*, 2019).

Algumas desvantagens do uso da FES são a utilização incompleta dos nutrientes por causa da baixa transferência de oxigênio e calor no substrato (CHUTMANOP *et al.*, 2008).

O processo de FS tem como principal característica o uso de meio de cultivo líquido contendo nutrientes para o microrganismo produzir vários tipos de metabólitos, em condições fisiológicas ótimas, como enzimas, antibióticos e colorantes. A formação de dois tipos extremos

de morfologia: pellets e filamentos (figura 5), são comumente observados (CUI *et al.*, 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2011).

O cultivo de microrganismos, como fungos, vem sendo feito em escala industrial principalmente em fermentação submersa (GMOSER *et al.*, 2019).



Figura 5. Cultivo em meio líquido: estruturas denominadas de pellets (massa micelial em forma de novelo) (Fonte: autor).

2.7 Ensaio de toxicidade com fibroblastos humanos

Antes que um produto chegue ao mercado, é necessário que seja realizado um ensaio que confirme que o produto é próprio para o consumo da população. Por isso o ensaio de citotoxicidade utilizando fibroblastos humanos com *Alamar Blue* é utilizado. Este ensaio foi realizado a princípio por Ahmed *et al.*, (1994), modificado, em sua pesquisa para encontrar um novo método simples e não-radioativo para a determinação da proliferação de linfócitos como alternativa ao método com incorporação de [³H]timidina.

Esta técnica colorimétrica consiste em uma forma rápida, simples, confiável, de custo reduzido e segura para a avaliação do crescimento celular, por meio da redução da resazurina (Alamar Blue) em resofurina, esta transformação ocorre quando o corante recebe elétrons e reduz a coloração rosa, resofurina fluorescente. Esta mudança pode ser medida quantitativamente em espectrofotômetro, analisando as absorvâncias na faixa de onda de 570 a 600 nanômetros (SHARMA *et al.*, 2019).

Referências Bibliográficas

AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; SESTELO, A. B. F.; POZA, M.; VILLA, T. G. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *Journal of Applied Microbiology*. V. 103. p. 2205–2213. 2007.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M. Jr.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*. V. 170. p. 211-224. 199

AISSAOUI, N.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T.; MARZOUKI, M. N.; ABIDI, F. Purification and Biochemical Characterization of a Neutral Serine Protease from *Trichoderma harzianum*. Use in Antibacterial Peptide Production from a Fish By-Product Hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 182. p. 831–845. 2017. DOI: 10.1007/s12010-016-2365-4.

ALECRIM, M. M.; PALHETA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, I. M. A. Milkclotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. *International Journal of food Science and technology*, v. 50, n. 1, p. 11-157. DOI: 10.1111/ijfs.12677. 2014.

ALVES, L. S.; MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; SILVA, R.; GIGANTE, M. L. Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. *Journal of Dairy Science*. V. 96. p. 7490–7499. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7119>

ANANDAN, D.; MARMER, W. N.; DUDLEY, R. L. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. V. 34. p. 339–347. 2007.

BAIRD, T. T. JR.; WRIGHT, W. D.; CRAIK, C. S. Conversion of trypsin to a functional threonine protease. *Protein Science*. V. 15. p. 1229–1238. 2006.

BENES, P.; VETVICK, V.; FUSEK, M. Cathepsin D – many functions of one aspartic protease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. V. 68. n. 1. p. 12–28. 2008.

BENSMAIL, S.; BOUDJEMA, K.; NAIMI-FAZOUANE, F. Production of Extracellular Rennin-Like Enzyme by a Newly Isolate *Mucor circinelloides* (von Tieghem) and its Application in

Camembert Cheese Making. Journal of Applied Biotechnology Reports. V. 7, n 1, pp: 16-24. 2020.
DOI <https://doi.org/10.30491/JABR.2020.105914>

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. V. 2014, p. 1-11. 2014.

CHARLES, P.; DEVANATHAN, V.; ANBU, P.; PONNUSWAMY, M. N.; KALAICHELVAN, P. T.; HUR, B. K. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. Journal of Basic Microbiology. V. 48. p. 347–352. 2008.

CHELLAPANDI, P. Production and Preliminary Characterization of Alkaline Protease from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus*. E-Journal of Chemistry. V. 7. n. 2. p. 479-482. 2010.

CHINMAYEE, C. V.; VIDYA, C.; RANI, A.; SINGH, S. A. Production of highly active fungal milk-clotting enzyme by solid-state fermentation. Preparative Biochemistry and Biotechnology. V. 49. n. 9. 2019. DOI <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1630647>

CHOJNACKA, K. Fermentation products. Chemical engineering and chemical process technology. V. 5. 2010.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. V. 83. p: 1012–1018. 2008.

CUNNINGHAM, E. L.; JASWAL, S. S.; SOHL, J. L.; AGARD, D. A. Kinetic stability as a mechanism for protease longevity. Proceedings of the National Academy of Sciences. V. 96. P. 11008-11014. 1999.

DENG, J. J.; HUANG, W. Q.; LI, Z. W.; LU, D. L.; ZHANG, Y.; LUO, X. C. Biocontrol Activity of Recombinant Aspartic Protease from *Trichoderma harzianum* against Pathogenic Fungi. V. 112. p. 35-42. 2018.

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. V. 1. n. 7. 2008.

DING, Z.; AI, L.; OUYANG, A.; DING, M.; WANG, W.; WANG, B.; LIU, S.; GU, Z.; ZHANG, L.; SHI, G. A two-stage oxygen supply control strategy for enhancing milkclotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens*. Eur Food Res Technology, p. 1043-1048, 2012.

DUTT, K.; MEGHWANSHI, G. K.; GUPTA, P.; SAXENA, R. K. Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis*. Letters in Applied Microbiology. V. 46. p. 513–518. 2008.

FRANCO, D. G.; SPALANZANI, R. N.; LIMA, E. E.; MARCHETTI, C. R.; SILVA, P. O.; MASUI, D. C.; GIANNESI, D. C.; ZANOELO, F. F. Biochemical properties of a serine protease from *Aspergillus flavus* and application in dehairing. Biocatalysis and Biotransformation. V. 35. n. 4. 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/10242422.2017.1322584>.

GAGNAIRE, V.; MOLLE, D.; HERROUIN, M.; LEONIL, J. Peptides Identified during Emmental Cheese Ripening: Origin and Proteolytic Systems Involved. Journal of Agricultural and Food Chemistry. V. 49. p. 4402–4413. 2001.

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. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251. 2003.

GMOSER, R.; SINTCA, C.; TAHERZADEH, M. J.; LENNARTSSON, P. R. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus *N. intermedia*. Waste Management. V. 97. p. 63-70. 2019.

GOVIND, N. S.; MEHTA, B.; SHARMA, M.; MODI, V. V. Protease and carotenogenesis in *blakeslea trispora*. Phytochemistry. V. 20. n. 2. p. 2483 2485. 1981.

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

HANG, F.; LIU, P.; WANG, Q.; HAN, J.; WU, Z.; GAO, C.; LIU, Z.; ZHANG, H.; CHEN, W. High Milk-Clotting Activity Expressed by the Newly Isolated *Paenibacillus* spp. Strain BD3526. *Molecules*. V. 21. n. 73. 2016.

HARBOE, M.; BROE, M. L.; QVIST, K.B. *Technology of Cheesemaking*. Blackwell Publishing. p. 98-129. 2010.

HASHIMOTO, H.; KANEKO, Y.; IWAASA, T.; YOKOTSUKA, T. Production and Purification of Acid Protease from the Thermophilic Fungus, *Penicillium duponti* K1014. *APPLIED MICROBIOLOGY*. V. 25. p. 584-588. 1973.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*. V. 102. p. 4501–4523. 2002.

HELLMUTH, K.; VAN DEN BRINK, J. M. Microbial production of enzymes used in food application. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. p. 262-287. 2013.

HOMAEI, A.; LAVAJOO, F.; SARIRI, R. Development of marine biotechnology as a source for novel proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules*. V. 88. p. 542-552. 2016. DOI. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.023>.

HUANG, A.; LU, M.; LING, E.; LI, P.; WANG C. A M35 family metalloprotease is required for fungal virulence against insects by inactivating host prophenoloxidasases and beyond. *Virulence*. V. 11. n. 1. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1731126>.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*. V. 64. n. 1. 2011.

JOLLÉS, P. Structural aspects of the milk clotting process. Comparative features with the blood clotting process. *Molecular & Cellular Biochemistry*. V. 7. n. 2. 1975.

KARTHIKEYAN, G.; PALANISAMY, A.; VIKNESH, M. R.; SUDHAKAR, N. Milk clotting and proteolytic activity of protease enzyme from *Lactobacillus delbrueckii* isolated from raw goat milk. *Australian Journal of Pharmaceutical Biology*. V. 1. n. 1. 2018.

KINSELLA, J. E.; HWANG, D. H.; DWIVEDI, B. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. V. 8. n.2. p. 191-228. 1976. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408397609527222>

KLICH, M. A. & J. I. PITT, 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs: 1-115. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, Australia.

KOCSUBÉ, S.; PERRONE, G.; MAGISTA, D.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; SZIGETI, G.; HUBKA, V.; HONG, S.-B.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Aspergillusis monophyletic*: Evidence from multiple genephylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology*. V. 85. p. 199–213. 2016.

KRISHNA, V.; GUPTA, M.; GUPTA, N.; GAUDANI, H.; TRIVEDI, S.; PATIL, P.; GUPTA, G.; KHAIRNAR, Y.; BORASATE, A.; MISHRA D. Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. *International Journal of Microbiology Research*, V. 1, n. 1. p. 14-18. 2009.

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

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase Production in Solid State Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*. V. 100, n. 2, p. 168–171. 2005. DOI: 10.1263/jbb.100.168.

LEHRBACH, N. J.; RUVKUN, G. Proteasome dysfunction triggers activation of SKN-1A/Nrf1 by the aspartic protease DDI-1. *eLife*. V. 5. 2016.

MAMO, J.; KANGWA, M.; FERNANDEZ-LAHOIRE, H. M.; ASSEFA, F. Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00243-y>. 2020.

MCGOVERN, P. E.; ZHANG, J.; TANG, J.; ZHANG, Z.; HALL, G. R.; MOREAU, A. N.; BUTRYM, E. D.; RICHARDS, M. P.; WANG, C.; CHENG, G.; ZHAO, Z.; WANG, C. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 101, n. 51. 2004.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). *Food Chemistry*. V. 120. p. 87–93. 2010.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*. V. 104. p. 127–131. 2007.

OYELEKE, S. B.; EGWIM, E. C.; AUTA, S. H. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. V. 2. n. 7. p. 83-87. 2010.

PAIVA, F. C.; ALECRIM, M. M.; TEIXEIRA, M. F. S.; KIRSCH, L. S.; JESUS, R. S. Produção de hidrolisado proteico de pirarucu utilizando-se protease de *Aspergillus flavo-furcatis* e pancreatina. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. V. 45. n. 1. p. 89-96. 2015.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. V. 13. p. 81–84. 2003.

PREETHA, S.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. V. 13. p. 573-578. 1997.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS. V. 62. n. 3. p. 597–635. 1998.

RAO, S.; MIZUTANI, O.; HIRANO, T.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. Journal of Bioscience and Bioengineering V. 112. n. 5. p. 441–446. 2011.

RAPER, K. B. & D. I. FENNEL, 1977. The genus *Aspergillus*: 1-686.

REID, J. R.; COOLBEAR, T.; AYERSB, J. S.; COOLBEAR, K. P. The Action of Chymosin on K-Casein and its Macropeptide: Effect of pH and Analysis of Products of Secondary Hydrolysis. International Dairy Journal. V. 7. p. 559-569. 1997.

ROCHA, C. P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. Uberlândia. Dissertação de mestrado, Universidade federal de Uberlândia. 2010.

RODRIGUES, P.; SANTOS, C.; VEN NCIO, A.; LIMA, N. Species identification of *Aspergillus* section Flavi isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. Journal of Applied Microbiology. V. 111. p. 877-892. 2011.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. V. 78. p. 141-173. 2014.

SANDHYA, C.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Microbial Proteases. Methods in Biotechnology, Vol. 17: Microbial Enzymes and Biotransformations. 2005.

SATHYA, R.; PRADEEP, B. V.; ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M. Production of Milk Clotting Protease by a Local Isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using Agro-industrial Wastes. Biotechnology and Bioprocess Engineering. V. 14. p. 788-794. 2009.

SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. V 42. p. 298–304. 2011.

SHARMA, M.; GAT, Y.; ARYA, S.; KUMAR, V.; PANGHAL, A.; KUMAR, A. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. *INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY*. V. 15. n. 2. 2019.

SHENDE, R.; WONG, S. S. W.; RAPOLE, S.; BEAU, R.; IBRAHIM-GRANET, O.; MONOD, M.; GUHRS, K. H.; PAL, J. K.; LATGÉ, J. P.; MADAN, T.; AIMANIANDA, V.; SAHU, A. *Aspergillus fumigatus* conidial metalloprotease Mep1p cleaves host complement proteins. *Journal of Biological Chemistry*. V. 293. n. 40. p. 15538-15555. 2018.

SILVA, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 183. p. 1–19. DOI 10.1007/s12010-017-2427-2. 2017.

SINGH, R.; MITTAL, A. KUMAR, M.; MEHTA, P. K. Microbial Proteases in Commercial Applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. V. 4. n. 3. p. 365-374. 2016.

SINGH, T. K.; YOUNG, N. D.; DRAKE, M.; CADWALLADER, K. R. Production and Sensory Characterization of a Bitter Peptide from α -Casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 53. p. 1185–1189. 2005.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; JUNIOR, A. P. MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*. V. 46. n 2. p. 337-346. 2015.

SOUZA, P. M.; WERNECK, G.; ALIAKBARIAN, B.; SIQUEIRA, F.; FILHO, E. X. F.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; MAGALHÃES, P. O.; JUNIOR, A. P. A Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*. V. 1. n. 8. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.055>.

SRILAKSHMI, J.; MADHAVI, J.; LAVANYA, S.; AMMANI, K. Commercial Potential of Fungal Protease: Past, Present and Future Prospects. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. V. 2. n. 4. p. 218-234. 2015.

SUBHAN, M.; FARYAL, R.; MACREADIE, I.; Utilization of an Industry Byproduct, *Corymbia maculata* Leaves, by *Aspergillus terreus* to Produce Lovastatin. *Bioengineering*. V. 7. N. 3. 2020.

SUN, Q.; CHEN, F.; GENG, F.; LUO, Y.; GONG, S. JIANG, Z. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptide. V. 245. p. 570-577. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.113>.

TEIXEIRA, M. F. S., T. A. SILVA, R. A. PALHETA, A. L. B. CARNEIRO & H. M. ATAYDE. *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)* 1-255. Editora UFAM. 2011.

UEDA, M.; KUBO, T.; MIYATAKE, K.; NAKAMURA, T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB. *Applied Microbiology and Biotechnology*. V. 74. p. 331–338. 2007.

VISHWANATHA, K. S; APPU R.; A. G.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol* V. 37, n 2 Pp: 129–138. 2010.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, v. 9, p.189-192, 1999.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. *Revista Hestia Citino*, v. 1, n.1, p. 30-36, 2011.

XIE, L.; XIAO, Y.; GAO, X. Purification and Characterization of a Halotolerant Alkaline Serine Protease from *Penicillium citrinum* YL-1 Isolated from Traditional Chinese Fish Sauce. *Food Biotechnology*. V. 30. n. 2. p. 137-153. 2016.

YUQIU, L.; HUA, T.; DA, L.; ZHOULIN, L.; YANPING, C.; YUANYUAN, J.; XIANGYING, L.; JINGHUI, W.; QIYUN, L. Screening and Characterization of a Mutant Fungal Aspartic Proteinase from *Mucor pusillus*. The Open Biotechnology Journal V. 9. p. 119-126. 2015.

CAPÍTULO 2

Objetivos e metodologia

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Selecionar entre representantes do gênero *Aspergillus*, espécies produtoras de protease e coagulantes, assim como, padronizar as condições do bioprocesso para aplicação industrial das enzimas investigadas.

3.2 Específicos

- Realizar a autenticação com base nas características macromorfológicas e micromorfológicas;
- Selecionar espécie de *Aspergillus* produtora de coagulante utilizando fermentação submersa;
- Investigar e padronizar as condições do bioprocesso para síntese de coagulante da espécie de *Aspergillus* selecionada nos testes qualitativos;
- Caracterizar a enzima coagulante quanto ao efeito do pH e temperatura, estabilidade ao pH e temperatura, efeito de íons metálicos e inibidores na atividade coagulante do leite;
- Determinar citotoxicidade *in vitro* do extrato enzimático da espécie de *Aspergillus* produtora de coagulante.

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismos

Neste estudo foram selecionados, aleatoriamente, treze representantes do gênero *Aspergillus* (*A. clavato flavus* DPUA 929, *A. fischeri* DPUA 653, *A. flavo furcatis* DPUA 1451, *A. flavo furcatis* DPUA 1455, *A. japonicus* DPUA 542, *A. japonicus* DPUA 1727, *A. melleus* DPUA 323, *A. niger* DPUA 398, *A. niger* DPUA 399, *A. ostianus* DPUA 315, *A. oryzae* DPUA 541, *A. oryzae* DPUA 1624 e *A. wentii* DPUA 1725) para identificação de uma espécie produtora de proteases e coagulantes. Os microrganismos foram cedidos do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. As culturas viáveis e puras foram cultivadas em ágar CYA [Czapek 0,5% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placa de Petri de 90 mm x 15 mm, a 25 °C e mantidas por sete dias (KLICH & PITT, 1988).

4.2 Autenticação e manutenção dos fungos

Os testes de autenticação das espécies e verificação da pureza das colônias foram realizados com base nas características macromorfológicas, micromorfológicas e forma de reprodução. Para autenticação dessas características foram realizados cultivos em Caldo Glicosado 2% (p/v) (Lacaz *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2017). Os cultivos foram mantidos a 25 °C. Após sete dias, as colônias foram transferidas para Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), ágar Czapek (CZ) e Ágar Extrato de Malte (MEA), em placas de Petri de 90 mm x 15 mm. As culturas foram mantidas a 25 °C durante sete dias (RAPER e FENNELL, 1977; KLICH e PITT, 1988; PRADO *et al.*, 2017). Para manutenção da cultura viável, a cada 30 dias foram preparados subcultivos em Ágar CYA, em tubo de ensaio de 148 x 230 mm e mantidos a 4 °C.

4.3 Seleção de uma espécie produtora de proteases coagulantes por fermentação submersa

4.3.1 Preparação do Inóculo

Como inóculo foram utilizadas culturas dos *Aspergillus* em ágar Czapek + extrato de levedura (CYA), em tubo de ensaio, mantidas a 25 °C por sete dias. Em cada cultura foi preparada uma suspensão de esporos de concentração final 10⁶ esporos/mL de meio. Cada suspensão celular foi homogeneizada em agitador de tubo e a contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer (MENDES *et al.* 2016).

4.3.2 Fermentação Submersa

4.3.2.1 Meio de fermentação

O cultivo em meio líquido foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo meio líquido formulado com (g/L): K₂HPO₄ (2,0); (NH₄)₂SO₄ (1,0); MgSO₄.7H₂O (0,1); NaH₂PO₄.7H₂O (0,9); Extrato de levedura (1,0), Gelatina (5,0). O meio de fermentação foi esterilizado a 121 °C por 15 min. Para cada 50 mL de meio, em cada frasco Erlenmeyer de 125 mL foi inoculada a suspensão de esporos equivalente a 10⁶ esporos/mL. A fermentação foi conduzida em agitador orbital New Brunswick Scientific®, a 30 °C, 180 rpm, por 72 horas.

4.3.3 Recuperação do extrato bruto

O extrato bruto foi separado da biomassa por filtração a vácuo utilizando papel de filtro Whatman n. 1. Em seguida, as amostras de extrato foram novamente filtradas sob vácuo utilizando membranas de éster de celulose (0,45 µm) e polietersulfônica (0,22 µm), respectivamente. Em cada amostra de extrato bruto foi determinada a atividade das enzimas.

4.4 Métodos de análise enzimática

4.4.1 Determinação qualitativa da atividade proteolítica

Para avaliar a produção de proteases em meio sólido foi utilizada a técnica de difusão em ágar por poço utilizando ágar leite (g/L): leite em pó desnatado 5,0; ágar nutriente 1,0 (CHEN *et al.*, 2003). O meio foi esterilizado a 121 °C/15 minutos, em seguida, distribuído em placas de Petri de 90 mm x 15 mm. Após solidificação, na superfície do meio foram perfurados poços de 8 mm de diâmetro e inoculação de 100 µL de extrato enzimático. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas. Os halos foram medidos diametralmente com auxílio de régua e os resultados expressos em milímetros. A atividade enzimática foi determinada pelo índice de atividade enzimática (IAE), calculado de acordo com a equação 1 (HYSENI *et al.*, 2020).

$$\text{Equação 1. } IAE = \frac{\text{diâmetro do halo (mm)}}{\text{diâmetro do poço (mm)}}$$

4.4.2 Determinação quantitativa da atividade proteolítica

Nos extratos brutos protease positiva foi realizada a quantificação de enzimas proteolíticas utilizando a metodologia descrita por Leighton *et al.* (1973). Para cada tubo reação foi transferido 250 µL solução de azocaseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl, pH 7,2 e, 150 µL de extrato enzimático. Após uma hora, na ausência de luz, a 25 °C, foi adicionado 1,2 mL de ácido Tricloroacético 10% (p/v) para interromper a reação. Para precipitação do resíduo proteico não

digerido pelas enzimas, a mistura foi submetida a centrifugação a 4 °C, 8.000 x g/10 minutos. Do sobrenadante recuperado foi retirado 800 µL para homogeneização em 1,4 mL de NaOH 1M. O branco foi preparado nas mesmas condições utilizadas na amostra teste. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,1 em 60 minutos. O extrato com atividade de proteases significativa foi caracterizado parcialmente quanto às suas propriedades bioquímicas.

4.4.3 Determinação da atividade de coagulação do leite

A atividade coagulante do leite foi determinada de acordo com Arima *et al.* (1970). Como substrato foi utilizado leite desnatado 10% (p/v) (Itambé, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), diluído em solução de CaCl₂ 0,05M, pH 5,8 (MARTIM *et al.*, 2017). Desta solução foi transferido 5 mL para cada tubo reação, seguindo a incubados a 40° C, em banho-maria com agitação (Marconi MA 179). Após 15 minutos foi adicionado 0,5 mL do extrato bruto, seguindo a homogeneização da mistura e incubação durante 40 minutos. A atividade coagulante foi determinada como positiva após visualização de coágulos na parede do tubo. Para o controle do ensaio, foram utilizados tubos contendo somente a solução de leite 10% (p/v) dissolvido em CaCl₂ 0,05M. O resultado 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) ou coagulação fraca (coagulação sem separação visual de soro) (ALECRIM *et al.*, 2017). Uma unidade de atividade coagulante (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular 1 mL de substrato em 40 minutos a 40 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A atividade coagulante foi calculada de acordo com a equação 2.

$$\text{Equação 2. } U = \frac{2400 \times S}{T \times E}$$

Onde 2400 = tempo total do ensaio de atividade coagulante em segundos; S = volume de leite (mL); E = volume do extrato bruto utilizado (mL) e T = tempo de formação do coágulo, em segundos.

A razão (R) coagulante foi calculada de acordo com a razão da atividade de coagulação do leite e valores de atividade proteolítica como observado na equação (3).

$$\text{Equação 3. } R = \frac{\text{Atividade de coagulação}}{\text{Atividade proteolítica}}$$

4.5 Análise dos mecanismos regulatórios da síntese de proteases coagulantes

Para identificação das exigências de constituintes nutricionais, como fontes de carbono, nitrogênio e o tempo de fermentação para síntese dos coagulantes pela espécie de *Aspergillus* selecionada, foram realizados os experimentos citados a seguir.

4.5.1 Determinação do efeito de fontes de carbono, nitrogênio e tempo de fermentação

4.5.1.1 Planejamento fatorial

Para verificação da influência da concentração de fontes de carbono e nitrogênio, e tempo de fermentação foi delineado um planejamento fatorial completo 2^3 , com 3 pontos centrais (tabela 1), utilizando o *software* Minitab versão 19.0. No delineamento experimental, inteiramente casualizado foi utilizado como fonte de carbono Amido (A), e como fonte de nitrogênio Caseína de soja (Cs), e três tempos de fermentação (3, 5 e 7 dias), totalizando 11 experimentos. A fermentação submersa foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido. Em cada frasco foi inoculada uma suspensão celular de 10^6 esporos/mL de meio. A fermentação foi conduzida a 30 °C, 180 rpm. A atividade proteolítica foi realizada em triplicata.

Tabela 1. Parâmetros avaliados no planejamento fatorial 2^3 completo com três pontos centrais para otimização da produção de proteases da espécie de *Aspergillus*. [(-1), (0) e (+1) correspondem aos níveis inferior, central e superior, respectivamente].

Fatores	Nível -1	Nível 0	Nível +1
Fonte de carbono (%)	0,25	0,50	1,0
Fonte de nitrogênio (%)	0,25	0,50	1,0
Tempo de Fermentação (dias)	3	5	7

4.6 Caracterização parcial das proteases

4.6.1 Enzimas proteolíticas

4.6.1.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das enzimas proteolíticas

Para determinação do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada a 25 °C, utilizando as seguintes soluções tampão (0,1 M): acetato de sódio (pH 5,0 e 6,0), Tris-HCl (pH 7,0 e 8,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10) por 60 minutos na ausência de luz para determinação da atividade proteolítica. A temperatura ótima foi determinada incubando o extrato bruto nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C (MARTIM et al., 2017). Na avaliação da estabilidade ao pH, o extrato enzimático foi diluído em cada tampão (1:1, v/v), a 25 °C por 1 hora. No ensaio de estabilidade a temperatura, os extratos foram incubados em temperaturas de 30 a 80 °C por 1 hora. A atividade

das proteases foi determinada nas condições ótimas de pH e temperatura. Os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos (MARTIM *et al.*, 2017).

4.6.1.2 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade das enzimas proteolíticas

O efeito de inibidores na atividade das proteases foi determinado de acordo com Martim *et al.* (2017). Os extratos enzimáticos foram incubados nas condições ótimas de pH e de temperatura por 30 minutos com diferentes inibidores de proteases a 10 mM: ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido iodoacético, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e pepstatina 1 mM. O efeito dos íons metálicos foi determinado nas soluções (10 mM) de: sulfato ferroso (FeSO_4), sulfato de manganês (MnSO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de zinco (ZnSO_4), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2) e sulfato de cobre (CuSO_4). As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura. A atividade enzimática residual da mistura reacional foi comparada ao controle e os valores de 100 % foram estabelecidos sem os inibidores ou íons metálicos.

4.6.3 Proteases coagulantes

4.6.3.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das proteases coagulantes

Para determinação do pH ótimo, a atividade coagulante foi realizada a 40 °C durante 40 minutos, utilizando as seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C, em pH ótimo. Na avaliação da estabilidade ao pH, o extrato enzimático foi diluído em cada tampão (1:1, v/v), a 25 °C por 1 hora. No ensaio de estabilidade a temperatura, os extratos foram incubados em temperaturas de 30 a 80 °C por 1 hora.

Os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos (MARTIM *et al.*, 2017).

4.6.3.2 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade das proteases coagulantes

Para determinação do efeito de inibidores na atividade coagulante foram utilizados: ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, ácido iodoacético 1 mM, Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM e pepstatina 1mM. O efeito dos íons metálicos foi determinado as seguintes soluções (1 mM) de: sulfato ferroso (FeSO_4), sulfato de manganês (MnSO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de zinco (ZnSO_4), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2) e sulfato de cobre (CuSO_4). As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura. A atividade enzimática residual e coagulante foi

comparada ao controle, incubado sem os inibidores ou íons metálicos e corresponderá a 100 % de atividade (MARTIM *et al.*, 2017).

4.7 Teste de citotoxicidade *in vitro* em fibroblastos humanos

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizados fibroblastos humanos (MRC-5) conservado no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com Soro Fetal Bovino 10% [v/v (SFB)] e Penicilina 1% (p/v). As células foram mantidas em estufa com injeção de CO₂ a 5%, 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 do extrato liofilizado durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizada a doxorrubicina (20µM ou 34µg/mL) e como controle negativo dimetilsulfóxido-DMSO (0,01%, v/v). Após adição do Alamar Blue (0,4% v/v) as fluorescências foram medidas 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.

5 Análise estatística

Em todos os experimentos realizados em triplicata, os dados foram submetidos a análise estatística de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o programa Minitab, versão 19.0.

Referências Bibliográficas

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M. Jr.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*. V. 170. p. 211-224. 1994.

ALECRIM, M. M.; MARTIM, S. R.; CORDEIRO, B. C.; TEIXEIRA, M. F. S. *Aspergillus flavo furcatis*: Aflatoxin test and milk-clotting protease production in submerged and solid state fermentation. V. 11. n. 7. 2017. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8400>.

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-Clotting Enzyme from *Mucor pussilus* var. Lindt. *Methods in Enzimology*. V. 19. p. 446-459. 1970.

HYSENI, B.; FERATI, F.; REXHEPI, F.; MORINA, R.; BALIU, Y.; HYSENI, S.; RUSHITI, A.; HAJDINI, S.; NIKEREL, E. Isolation and Characterization of Microorganisms for Protease Production from Soil Samples from Kosovo and Testing the Enzymes in Food Industry Application. *Journal of Environmental Treatment Techniques*, v. 8. n. 2, p. 687-693. 2020.

KLICH, M. A. & J. I. PITT, 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs: 1-115. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, Australia.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. *Tratado de Micologia Médica*. Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. 1104p. ilustr. ISBN 85-7378-123-8.

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*. *Journal of Molecular Biology*, v. 76, n. 1, p. 103-122. DOI: 10.1016/0022-2836(73)90083-1. 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*, v. 11, n. 17, p. 660-667. DOI: 10.5897/AJMR2017.8520. 2017.

MENDES, L. D.; BRESOLIN, J. D.; ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Avaliação in vitro da Ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *Penicillium expansum*. Brazilian Journal of Biosystems Engineering, v. 10, n. 1, p. 116- 128. 2016.

MINITAB. Minitab Statistical Software. LEAD Technologies, Inc. Version 19.0. 2019.

PRADO, F. B.; ROCHA, W. C.; MARTIM, S. R.; ALECRIM, M. M.; SILVA, L. P.; SILVA, L. S. C.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi – Ciências Naturais. V. 12. n. 1. p. 37-47. 2017.

RAPER, K. B. & D. I. FENNEL, 1977. The genus *Aspergillus*: 1-686.

Capítulo 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo “Viabilidade da produção de proteases por espécies de Aspergillaceae e triagem de coagulantes do leite bovino”

Viabilidade da produção de proteases por espécies de Aspergillaceae e triagem de coagulantes do leite bovino

Feasibility of protease production by Aspergillaceae species and screening of coagulants from bovine milk

DOI:10.34117/bjdv7n2-317

Recebimento dos originais: 18/01/2021
Aceitação para publicação: 18/02/2021

Fabiano Brito Prado

Mestre em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal do Amazonas- UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I)- CEP : 69080-900
Manaus-AM

E-mail: fabiano.prado7@gmail.com

Samara Claudia Picanço Batista

Graduada em Engenharia de Alimentos

Instituição: Universidade Federal do Amazonas- UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I)- CEP : 69080-900
Manaus-AM

E-mail: samara.claudia18@gmail.com

Salomão Rocha Martim

Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia

Instituição: Universidade Nilton Lins

Endereço: Av. Prof. Nilton Lins, 3259 (Bairro Flores)- CEP : 69058-030, Manaus – AM
E-mail: salomao.martim@gmail.com

Maria Francisca Simas Teixeira

Doutora em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) – CEP : 69080-900
Manaus-AM

E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

RESUMO

Proteases são enzimas de elevada importância econômica e com ampla aplicabilidade industrial. Enzimas proteolíticas com atividade coagulante do leite bovino, sintetizadas por *Aspergillus* sp., vêm demonstrando características bioquímicas com potencial para uso na produção de queijos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases por treze culturas de *Aspergillus* provenientes da coleção de culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas. A avaliação da viabilidade das espécies e pureza das colônias foi realizada com base nas características macro, micromorfológicas e forma de reprodução. Após autenticação, as espécies de *Aspergillus* foram submetidas ao cultivo em meio líquido para produção de enzimas proteolíticas. A determinação da atividade

proteolítica foi realizada em meio sólido e por colorimetria, utilizando como substratos ágar leite e solução de azocaseína 1% (p/v), respectivamente. As proteases do fungo que apresentou atividade proteolítica significativa pela análise colorimétrica foram submetidas à caracterização bioquímica. A produção de proteases coagulantes do leite bovino pelas espécies de *Aspergillus* também foi determinada. Nos testes de autenticação foi verificada a viabilidade de 100% das espécies de *Aspergillus*. As proteases das espécies de *Aspergillus* demonstraram diferentes perfis de degradação do substrato, formando halos translúcidos e opacos em meio sólido. Os halos de hidrólise significativa foram determinados nos extratos brutos de *A. niger* DPUA 399 (39,67 mm) e *A. japonicus* DPUA 1727 (34,27 mm). Na avaliação da síntese de protease utilizando técnica colorimétrica foi verificada produção significativa por *A. oryzae* DPUA 541 (32,00 U/mL). Este fungo sintetiza serinoproteases e metaloproteases que demonstram atividade catalítica ótima em pH 5, a 50 °C, mantendo estabilidade na faixa de pH 7 a 10, até 40 °C. Atividade coagulante significativa foi determinada nos extratos de *A. melleus* DPUA (19,84 U) e *A. oryzae* DPUA 541 (19,74 U). Entretanto, *A. oryzae* DPUA 541 e *A. oryzae* DPUA 1624 sintetizaram enzimas proteolíticas com forte coagulação do leite bovino. Os resultados indicam o potencial das espécies de *Aspergillus* avaliadas como fonte de proteases com aplicabilidade industrial na área de alimentos, em especial para a produção de queijos.

Palavras-chave: *Aspergillus*, enzimas proteolíticas, fermentação submersa, leite, queijo.

ABSTRACT

Proteases are enzymes of high economic importance and with wide industrial applicability. Proteolytic enzymes with coagulant activity in bovine milk, synthesized by *Aspergillus* sp., have demonstrated biochemical characteristics with potential use in cheese production. The objective of this work was to evaluate the production of proteases by thirteen *Aspergillus* cultures from the DPUA culture collection of the Federal University of Amazonas. The evaluation of species viability and purity of colonies was performed based on macro-, micromorphological characteristics and reproduction form. After authentication, the *Aspergillus* species were cultured in liquid medium for proteolytic enzyme production. The determination of proteolytic activity was performed in solid medium and by colorimetry, using as substrates milk agar and azocasein solution 1% (w/v), respectively. The proteases from the fungus that showed significant proteolytic activity by colorimetric analysis were submitted to biochemical characterization. The production of bovine milk coagulating proteases by *Aspergillus* species was also determined. In the authentication tests, 100% of the *Aspergillus* species were found to be viable. The proteases of *Aspergillus* species showed different profiles of substrate degradation, forming translucent and opaque halos in solid medium. Significant hydrolysis halos were determined in the crude extracts of *A. niger* DPUA 399 (39.67 mm) and *A. japonicus* DPUA 1727 (34.27 mm). In the evaluation of protease synthesis using colorimetric technique, significant production was verified by *A. oryzae* DPUA 541 (32.00 U/mL). This fungus synthesizes serinoproteases and metalloproteases that show optimal catalytic activity at pH 5, at 50 °C, maintaining stability in the pH range 7 to 10, up to 40 °C. Significant coagulant activity was determined in the extracts of *A. melleus* DPUA (19.84 U) and *A. oryzae* DPUA 541 (19.74 U). However, *A. oryzae* DPUA 541 and *A. oryzae* DPUA 1624 synthesized proteolytic enzymes with strong coagulation of bovine milk. The results indicate the potential of the evaluated *Aspergillus* species as

strong proteases with industrial applicability in the food area, especially for cheese production.

Keywords: *Aspergillus*, proteolytic enzymes, submerged fermentation, milk, cheese.

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são biocatalisadores essenciais para a vida, atuando em quase todos os processos biológicos. Desde os tempos antigos têm sido usadas na fabricação de diferentes produtos alimentícios, incluindo vinho, cerveja, queijo, massa fermentada, entre outros (SHARMA et al., 2019).

Dentre as enzimas mais conhecidas se destacam as proteases, que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas. Estas desempenham diversas funções, como a regulação da morfogênese, o metabolismo e atuam na fisiologia humana e animal (BARBOSA et al., 2020).

Além das funções fisiológicas, as proteases constituem um dos principais grupos de biocatalisadores com aplicabilidade industrial, sendo utilizadas na produção de alimentos, na fabricação de detergentes, medicamentos, cosméticos, no beneficiamento do couro e em processos de biorremediação (ALECRIM et al., 2017; SNYMAN et al., 2019). A crescente demanda por proteases com ação específica, estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura incentiva a busca por novas fontes de enzimas proteolíticas (BANERJEE e RAY, 2017).

Os microrganismos têm se destacado como fonte de proteases, devido a características vantajosas como maior rentabilidade, manipulação genética e menor tempo e espaço no processo de produção (AHMED et al., 2018; RAZZAQ et al., 2019). Além disso, proteases de origem microbiana mantêm a estabilidade catalítica em diferentes condições de armazenamento (SHARMA et al., 2017; GURUMALLESH et al., 2019).

Entre os microrganismos produtores de biocatalisadores, espécies de *Aspergillus* Geralmente Reconhecidas Como Seguras (GRAS) porque não sintetizam substâncias tóxicas, vêm sendo avaliadas como fonte de proteases com aplicação em diferentes setores industriais: *A. oryzae* (MANAN e WEBB, 2016); *A. tamarii* (SILVA et al., 2016); *A. foetidus* (SOUZA et al., 2017); *A. flavo furcatis* (ALECRIM et al., 2017); *A. hennebergii* (HUANG et al., 2017); *A. niger* (AHMED et al., 2018) e *A. fumigatus* (REDES et al., 2019).

Dentre as diversas aplicações comerciais, proteases utilizadas na produção de queijo vêm ganhando destaque. Neste contexto, novas fontes de enzimas coagulantes do

leite bovino são necessárias devido ao aumento da produção mundial de queijo, escassez de coelho animal, além de restrições religiosas e alimentares (MAMO et al., 2020).

O estudo das propriedades bioquímicas das proteases, como condições ótimas de pH e temperatura, perfis de estabilidade, além da influência de inibidores ou ativadores, são importantes para indicar a aplicação comercial, industrial e biotecnológica desses biocatalisadores (HAMIN NETO et al., 2017; TARRAHIMOFRAD et al., 2020). Esta pesquisa demonstra a produção de biocatalisadores proteolíticos, a caracterização bioquímica de proteases com valor de atividade significativa e a triagem de coagulantes por espécies de fungos anamórficos filamentosos do gênero *Aspergillus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

Neste estudo foram selecionados, aleatoriamente, treze representantes do gênero *Aspergillus* (*A. clavato flavus* DPUA 929, *A. fischeri* DPUA 653, *A. flavo furcatis* DPUA 1451, *A. flavo furcatis* DPUA 1455, *A. japonicus* DPUA 542, *A. japonicus* DPUA 1727, *A. melleus* DPUA 323, *A. niger* DPUA 398, *A. niger* DPUA 399, *A. ostianus* DPUA 315, *A. oryzae* DPUA 541, *A. oryzae* DPUA 1624 e *A. wentii* DPUA 1725) para identificação de uma espécie produtora de proteases e coagulantes. Os microrganismos foram cedidos do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. As culturas viáveis e puras foram obtidas em ágar CYA [Czapek 0,5% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placa de Petri de 90 mm x 15 mm, a 25 °C por sete dias (KLICH & PITT, 1988).

2.2 AUTENTICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A verificação da viabilidade das espécies e pureza das colônias foi realizada com base nas características macro, micromorfológicas e forma de reprodução. Para autenticação dessas características foram realizados cultivos em Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), ágar Czapek (CZ) e Ágar Extrato de Malte (MEA), em placas de Petri (90 mm x 15 mm). As culturas foram mantidas a 25 °C durante sete dias (RAPER e FENNELL, 1977; KLICH e PITT, 1988). Para manutenção da cultura viável, a cada 30 dias foram preparados subcultivos em ágar CYA, em tubo de ensaio e mantidos a 4 °C.

2.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Como inóculo foram utilizadas culturas dos *Aspergillus* em ágar CYA, em tubo de ensaio, obtidas a 25 °C por sete dias. Em cada cultura foi preparada uma suspensão de esporos de concentração final 10^6 esporos/mL de meio. Cada suspensão celular foi homogeneizada em agitador de tubo e a contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer (MENDES et al. 2016).

2.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O cultivo em meio líquido foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo meio líquido formulado com (g/L): K_2HPO_4 (2,0); $(NH_4)_2SO_4$ (1,0); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1); $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ (0,9); Extrato de levedura (1,0), Gelatina (5,0)]. O meio de fermentação foi esterilizado a 121 °C por 15 min. Para cada 50 mL de meio, em cada frasco Erlenmeyer de 125 mL foi inoculada uma suspensão de esporos equivalente a 10^6 esporos/mL. A fermentação foi conduzida em agitador rotatório, a 30 °C, 180 rpm, por 72 horas.

2.5 RECUPERAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

A biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo, utilizando papel de filtro Whatman n. 1. Em seguida, as amostras de extrato foram novamente filtradas sob vácuo utilizando membranas de éster de celulose (0,45 μ m) e polietersulfônica (0,22 μ m), respectivamente. Em cada amostra de extrato bruto foi determinada a atividade das enzimas.

3 MÉTODOS DE ANÁLISE ENZIMÁTICA

3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM MEIO SÓLIDO

Para avaliar a produção de proteases em meio sólido foi utilizada a técnica de difusão em ágar por poço utilizando ágar leite (g/L): leite em pó desnatado 5,0; ágar nutriente 1,0 (CHEN et al., 2003). O meio foi esterilizado a 121 °C/15 minutos e, em seguida, distribuído em placas de Petri de 90 mm x 15 mm. Após solidificação, na superfície do meio foram perfurados poços de 8 mm de diâmetro e inoculação de 100 μ L de extrato enzimático. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas. Os halos foram medidos diametralmente com auxílio de régua e os resultados expressos em milímetros. A atividade enzimática foi determinada pelo índice de atividade enzimática (IAE), calculado de acordo com a equação 1 (HYSENI et al., 2020).

$$\text{Equação 1. IAE} = \frac{\text{diâmetro do halo (mm)}}{\text{diâmetro do poço (mm)}}$$

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES POR COLORIMETRIA

Nos extratos brutos que apresentaram atividade em meio sólido foi realizada a quantificação de enzimas proteolíticas utilizando a metodologia colorimétrica descrita por Leighton et al. (1973). Na determinação da atividade das proteases das espécies de *Aspergillus* foi utilizada solução de azocaseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl, pH 7,2. A mistura reacional, constituída por 150 µL de extrato enzimático e 250 µL de azocaseína foi mantida na ausência de luz, a 25 °C. Após uma hora, a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido Tricloroacético 10% (p/v), seguido de centrifugação a 4 °C (8.000 x g/10 minutos). Do sobrenadante recuperado foi retirado 800 µL para homogeneização em 1,4 mL de NaOH 1M. O branco foi preparado nas mesmas condições utilizadas na amostra teste. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,1 em 60 minutos. O extrato com atividade de proteases significativa foi caracterizado parcialmente quanto às suas propriedades bioquímicas.

4 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PROTEASES

4.1 EFEITO DO PH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS PROTEASES

Para determinação do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada a 25 °C, utilizando as seguintes soluções tampão: acetato de sódio (pH 5,0 e 6,0), Tris-HCl (pH 7,0 e 8,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10). A temperatura ótima foi determinada incubando o extrato bruto nas temperaturas de 30 °C a 80 °C (MARTIM et al., 2017).

Na avaliação da estabilidade ao pH, o extrato enzimático foi diluído em cada tampão (1:1, v/v), a 25 °C por uma hora. No ensaio de estabilidade a temperatura, os extratos foram incubados em temperaturas de 30 a 80 °C por 1 hora. A atividade das proteases foi determinada nas condições ótimas de pH e temperatura. Os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos (MARTIM et al., 2017).

4.2 EFEITOS DE INIBIDORES E ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O efeito de inibidores na atividade das proteases foi determinado de acordo com Martim et al. (2017), utilizando como substrato solução de azocaseína a 1% (p/v). Os extratos enzimáticos foram incubados nas condições ótimas de pH e de temperatura por 30 minutos com diferentes inibidores de proteases (10 mM): ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), ácido iodoacético, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e pepstatina 1mM. O efeito dos íons metálicos foi determinado nas soluções (10mM): sulfato ferroso (FeSO_4), sulfato de manganês (MnSO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de zinco (ZnSO_4), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2) e sulfato de cobre (CuSO_4). A atividade enzimática residual da mistura reacional foi comparada com o branco e, os valores de 100% foram estabelecidos sem inibidores ou íons metálicos.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE COAGULAÇÃO DO LEITE

A atividade coagulante do leite foi determinada de acordo com Arima et al. (1970). Como substrato foi utilizado leite desnatado 10% (p/v) (Itambé, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), diluído em CaCl_2 0,05M, pH 5,8 (MARTIM et al., 2017). Dessa solução foi transferido 5 mL para cada tubo reação, seguindo a incubados a 40° C, em banho-maria com agitação interna (Marconi MA 179). Após 15 minutos foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático bruto, seguindo a homogeneização da mistura e incubação durante 40 minutos. A atividade coagulante foi determinada como positiva após formação de coágulos na parede do tubo. O resultado 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) ou **coagulação fraca** (coagulação sem separação visual de soro) (ALECRIM et al., 2017). Uma unidade de atividade coagulante (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular 1 mL de substrato em 40 minutos a 40 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A atividade coagulante foi calculada de acordo com a equação 2.

$$\text{Equação 2. } U = \frac{2400 \times S}{T \times E}$$

Onde 2400 = tempo total do ensaio de atividade coagulante em segundos; S = volume de leite (mL); E = volume do extrato bruto utilizado (mL) e T = tempo de formação do coágulo, em segundos.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os experimentos realizados em triplicata, os dados foram submetidos a análise estatística de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o programa Minitab, versão 19.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de autenticação foi confirmada a viabilidade de 100% das espécies de *Aspergillus*, com base nas características macro, micromorfológicas e forma de reprodução (Raper e Fennell, 1977; Klich e Pitt, 1988).

A tabela 1 demonstra os resultados da determinação da atividade enzimática em meio sólido. Nas condições avaliadas foi observado que as proteases das espécies de *Aspergillus* testadas têm diferentes perfis de degradação do substrato. As proteases de *A. flavo furcatis* DPUA 1455, *A. japonicus* DPUA 1727, *A. ostianus* DPUA 315 e *A. oryzae* DPUA 541 degradaram ágar leite, formando halo translúcido ao redor de cada *cup plate*. As proteases de *A. fischeri* DPUA 653, *A. niger* DPUA 399 e *A. melleus* DPUA 323 causaram a formação de halos opacos no teste *in vitro*. Para as demais espécies de *Aspergillus* não foi observada atividade enzimática.

Os halos de degradação significativos foram determinados nos extratos brutos de *A. niger* DPUA 399 (39,67 mm) e *A. japonicus* DPUA 1727 (34,27 mm). Palanivel et al. (2013) verificaram halos de 30 mm ao utilizarem extrato proteolítico de *Aspergillus* ssp. KH 17 (Tabela 1). Suryawanshi e Pandya (2017) e Díaz et al. (2019) relataram halos de hidrólise de 20 mm e 14,30 mm para *A. niger* e *Aspergillus* sp. LBM 128, respectivamente.

Tabela 1. Característica do halo de degradação, diâmetro do halo e Índice de Atividade Enzimática (IAE) de linhagens de *Aspergillus*.

Linhagem de <i>Aspergillus</i>	Característica do halo	Diâmetro do halo (mm)	IAE
<i>A. clavato flavus</i> DPUA 929	ND	ND ± 0,0 ^e	ND ± 0,0 ^e
<i>A. fischeri</i> DPUA 653	Opaco	26,50 ± 3,0 ^{c,d}	3,30 ± 0,38 ^{c,d}
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1451	Translúcido	28,17 ± 0,38 ^c	3,55 ± 0,30 ^c
<i>A. flavo furcatis</i> DPUA 1455	Translúcido	30,67 ± 4,93 ^{b,c}	3,86 ± 0,60 ^{b,c}
<i>A. japonicus</i> DPUA 542	ND	ND ± 0,0 ^e	ND ± 0,0 ^e
<i>A. japonicus</i> DPUA 1727	Translúcido	34,27 ± 1,68 ^{a,b}	4,28 ± 0,20 ^{a,b}
<i>A. melleus</i> DPUA 323	Opaco	22,17 ± 1,0 ^d	2,77 ± 0,13 ^d
<i>A. niger</i> DPUA 398	ND	ND ± 0,0 ^e	ND ± 0,0 ^e
<i>A. niger</i> DPUA 399	Opaco	39,67 ± 2,08 ^a	4,96 ± 0,26 ^a
<i>A. ostianus</i> DPUA 315	Translúcido	33,27 ± 1,68 ^b	4,15 ± 0,20 ^b
<i>A. oryzae</i> DPUA 541	Translúcido	30,23 ± 1,61 ^{b,c}	3,78 ± 0,20 ^{b,c}
<i>A. oryzae</i> DPUA 1624	ND	ND ± 0,0 ^e	ND ± 0,0 ^e
<i>A. wentii</i> DPUA 1725	ND	ND ± 0,0 ^e	ND ± 0,0 ^e

*IAE = Índice de Atividade enzimática; **ND = não detectado. Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo método de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade proteolítica determinada pelo IAE foi significativa para *A. niger* DPUA 399 (4,96) e *A. japonicus* DPUA 1727 (4,28). *A. ostianus* DPUA 315, *A. flavo furcatis* DPUA 1455, *A. oryzae* DPUA 541, *A. fischeri* DPUA 653 e *A. melleus* DPUA 323 apresentaram IAE 16,33%, 22,18%, 23,80%, 33,47%, e 44,15% inferiores quando comparados com *A. niger* DPUA 399. Teixeira et al. (2011) relataram que microrganismos com IAE superiores a 2,0 são considerados eficientes produtores de biocatalisadores.

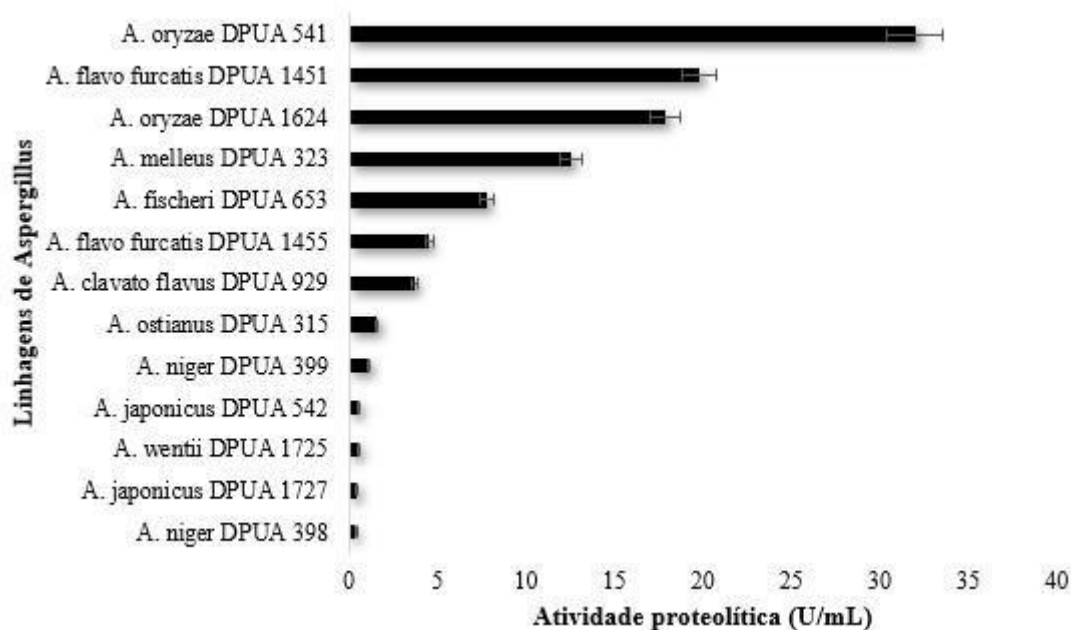
A técnica de difusão em ágar por poço constitui uma importante ferramenta analítica que vem sendo utilizada para selecionar diferentes espécies de microrganismos produtores de enzimas proteolíticas (PHYU et al., 2015; MANORMA et al., 2017). Entretanto, não existe um único meio de cultivo, que seja 100% eficaz para avaliar a produção dessas enzimas excretadas por diferentes microrganismos. Sendo assim, o desenvolvimento de um meio padrão é essencial para diferenciar espécies de fungos produtoras de protease, bem como avaliar os distintos perfis de degradação dos substratos utilizados nos testes de avaliação enzimática (SCHUSTER et al., 2019).

As propriedades catalíticas das proteases variam de acordo com a linhagem do microrganismo, bioprocesso para obtenção da enzima, tipo de substrato proteico que pode inibir ou estimular a síntese proteica, capacidade do microrganismo em se adaptar ao meio de cultivo e secretar enzimas para obtenção de fontes de carbono e nitrogênio. Além disso, o microrganismo pode secretar proteases que não são capazes de degradar as proteínas presentes no meio de cultivo (SCHUSTER et al., 2019). Esta característica

estaria relacionada com a presença de sítios de clivagem específicos na proteína utilizada no teste *in vitro*. Neste sentido, são formados halos opacos ao redor do *cup plate* ou da colônia microbiana, em detrimento aos halos translúcidos observados quando ocorre a clivagem enzimática específica (PETINATE et al., 1999).

Nos testes quantitativos de determinação de atividade proteolítica realizados neste estudo foi verificado que 100% das espécies de *Aspergillus* sintetizaram e excretaram proteases. Entretanto, no extrato bruto de *A. oryzae* DPUA 541 foi determinada atividade significativa (32,00 U/mL) (Figura 1). *Aspergillus oryzae* já foi demonstrado como uma espécie eficiente e promissora na produção de proteases (KARTHIC et al., 2014; SOUZA et al., 2015b; RAM e KUMAR, 2018. Historicamente *A. oryzae* tem utilização industrial na produção de alimentos fermentados tradicionais devido à alta atividade de proteases e comumente é uma espécie não tóxica (DE CASTRO e SATO, 2014a, SOUZA et al., 2015a).

Figura 1. Atividade de proteases das espécies de *Aspergillus*, cultivadas em meio líquido, a 30 °C, 180 rpm, utilizando gelatina como substrato.



5.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PROTEASES DE *A. ORYZAE* DPUA 541

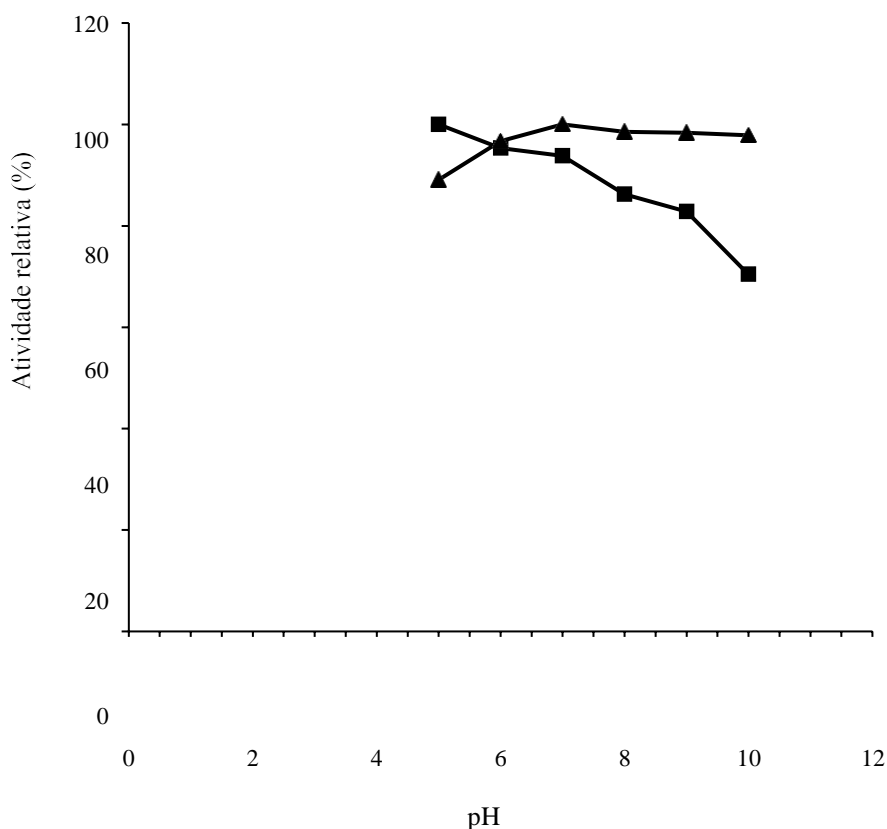
5.1.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

O efeito do pH na atividade e estabilidade das proteases de *A. oryzae* DPUA 541 está demonstrado na figura 2. Nas condições avaliadas, as enzimas proteolíticas de *A. oryzae* DPUA 541 foram ativas em todas as faixas de pH testadas. Entretanto, a atividade significativa foi observada em pH 5, resultado que revelou a presença de protease

levemente ácida (VISHWANATHA et al., 2010). Dados da literatura mostram que proteases de diferentes linhagens de *A. oryzae* foram ativas na faixa de pH 5,0-5,5 (DE CASTRO e SATO, 2014a; DE CASTRO e SATO, 2014b). Proteases ácidas são comumente utilizadas na indústria de alimentos para a produção de molhos, hidrolisados proteicos, clarificação de sucos e cerveja, amaciamento de carnes e massas a base de trigo, na produção de queijo (JI et al., 2019; RAZZAQ et al., 2019).

Neste estudo foi observado que as proteases de *A. oryzae* apresentaram estabilidade na faixa de pH 7,0 a 10 quando mantiveram atividade relativa superior a 97 %, nas condições avaliadas. Yin et al. (2013) e Ao et al. (2018) verificaram que as proteases de *A. oryzae* BCRC 30118 e *A. oryzae* Y1 são estáveis nas faixas de pH 3 a 6 e pH 4,0 a 8,0, respectivamente. Shafique et al. (2016) relataram que as enzimas proteolíticas de *A. oryzae* ML-1 demonstraram atividade catalítica superior a 91% em pH 8,0 a 11.

Figura 2. Efeito do pH na atividade (■) e estabilidade (▲) de proteases de *A. oryzae*.



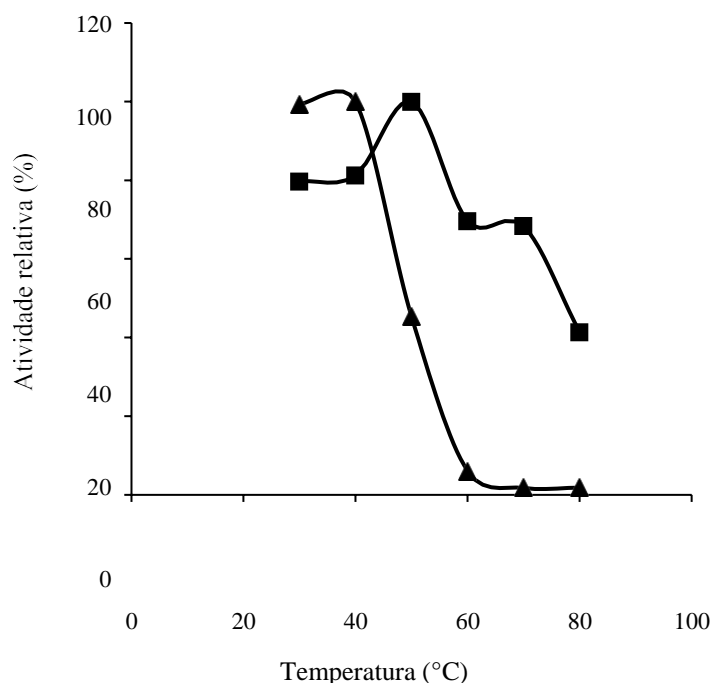
5.1.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

A figura 3 mostra o efeito da temperatura na atividade e estabilidade das proteases de *A. oryzae* DPUA 541. Os dados revelaram que a atividade significativa foi determinada a 50 °C, e houve redução de atividade com o aumento da temperatura. Resultado similar

foi descrito por Salihi et al. (2017) para as proteases de *A. oryzae* CH93. Outros estudos realizados com *A. oryzae* mostraram resultados de atividade ótima a 55 °C (AO et al., 2018) e 60 °C (YIN et al., 2013).

Nas condições experimentais a estabilidade das enzimas proteolíticas foi mantida na faixa de 30 °C a 40 °C, condição analítica em que as proteases de *A. oryzae* DPUA 541 mantiveram atividade superior a 99%. Yin et al. (2013) e Ao et al. (2018) verificaram que as proteases de *A. oryzae* BCRC 30118 e *A. oryzae* Y1 expressaram estabilidade a 40 °C e a 50 °C, respectivamente. Vishwanatha et al. (2010) constataram máxima estabilidade das proteases de *A. oryzae* MTCC 5341 entre 40 °C a 57 °C.

Figura 3. Efeito da temperatura na atividade (■) e estabilidade (▲) de proteases de *A. oryzae*.



5.1.3 Efeitos de inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica

O efeito de inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica está demonstrado na tabela 2. Na presença de PMSF e EDTA as proteases foram fortemente inibidas demonstrando atividade residual inferior a 50%. Estes resultados indicaram que no extrato de *A. oryzae* DPUA 541 predominaram serinoproteases e metaloproteases, respectivamente. Karthic et al. (2014) reportaram dados similares para as proteases de *A. oryzae* KS 5. Entretanto, Vishwanatha et al. (2010) e Yin et al. (2013) relataram que *A. oryzae* MTCC 5341 e *A. oryzae* BCRC 30118 sintetizam aspártico proteases. Nas condições de análise foi verificado que 100 % dos íons testados reduziram a ação proteolítica, com destaque para Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} . Resultados semelhantes foram

observados por De Castro et al. (2014b) para as proteases de *A. oryzae* LBA 01. Dados opostos foram verificados por Yin et al. (2013) que não observaram inibição de atividade por íons Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} . Entretanto, Karthic et al. (2014) relataram que íons Cu^{2+} estimularam as proteases de *A. oryzae* KS 5.

Tabela 2. Efeito de íons metálicos inibidores na atividade proteolítica de *A. oryzae* DPUA 541

Íons metálicos e inibidores	Atividade residual (%)
Controle	100
Pepstatina	91,67
Ácido iodoacético	61,18
EDTA	45,00
PMSF	34,26
MgSO_4	81,16
KCl	74,28
CaCl_2	73,96
MnSO_4	73,22
NaCl	72,57
FeSO_4	18,52
CuSO_4	7,81
ZnSO_4	6,70

EDTA = ácido etilendiamino tetra-acético; PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfonila.

A tabela 3 apresenta os valores da atividade coagulante e a força de coagulação das proteases de espécies de *Aspergillus* que sintetizaram e excretaram proteases coagulantes do leite bovino. A produção significativa foi determinada em *A. melleus* DPUA (19,84 U) e *A. oryzae* DPUA 541 (19,74 U). *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 também sintetizou proteases coagulantes (13,30 U), mas nas demais espécies não foi observada biossíntese dessas enzimas. A síntese de protease coagulante por *A. oryzae* também foi reportada por outros autores (VISHWANATHA et al., 2010; MAMO et al., 2020).

Tabela 3. Atividade coagulante e força de coagulação das proteases de culturas de *Aspergillus*.

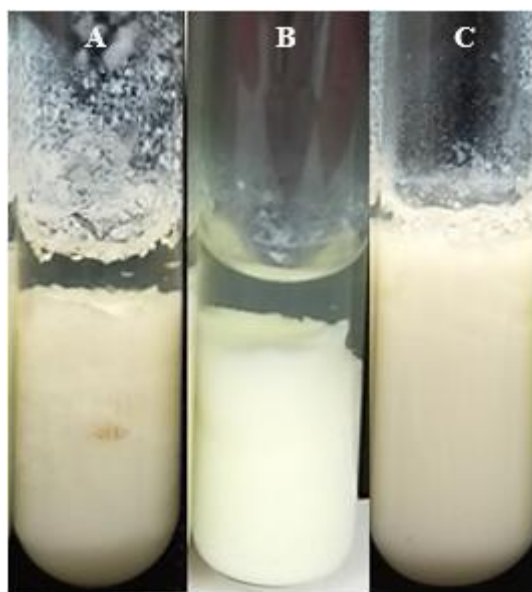
Espécies de <i>Aspergillus</i>	Atividade coagulante (U)	Força da coagulação
<i>A. melleus</i> DPUA 323	$19,84 \pm 0,06^a$	Fraca
<i>A. oryzae</i> DPUA 541	$19,74 \pm 0,04^a$	Forte
<i>A. oryzae</i> DPUA 1624	$13,30 \pm 0,15^b$	Forte

Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo método de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação à força da coagulação das proteases coagulantes foi observado que *A. oryzae* DPUA 541 e *A. oryzae* DPUA 1624 sintetizaram enzimas proteolíticas com forte coagulação (presença de coágulo distinto e soro abundante). Entretanto, o extrato bruto

de *A. melleus* DPUA 323 apresentou coagulação fraca, sem formação de coágulo distinto e ausência de soro abundante (Figura 5). Alecrim et al. (2014) relataram que a seleção de uma nova fonte de proteases coagulantes é um processo complexo, pois a atividade coagulante e a força de coagulação enzimática são influenciados por diversos fatores como pH, conteúdo de metais como cálcio e fósforo, temperatura e especificidade enzimática.

Figura 5. Classificação da força de coagulação das proteases de *Aspergillus*: A= *A. oryzae* DPUA 541 e B = *A. oryzae* DPUA 1624 (Coagulação forte do leite); C= *A. melleus* DPUA 323 (Coagulação fraca do leite).



6 CONCLUSÃO

Baseado nos dados obtidos, as 13 linhagens de *Aspergillus* testadas produziram proteases em meio líquido. *Aspergillus oryzae* DPUA 541 foi identificada como fonte significativa de serinoproteases e metaloproteases que expressam atividade catalítica significativa em pH 5,0 e 50 °C, com estabilidade em pH 7 a 10, até 40 °C, em 60 minutos. *Aspergillus oryzae* DPUA 541 e *A. oryzae* DPUA 1624 sintetizam e excretam proteases com forte coagulação do leite bovino. As características bioquímicas das proteases das espécies de *Aspergillus* avaliadas demonstram o uso potencial destes biocatalisadores na indústria de alimentos, em especial na elaboração de queijos.

AGRADECIMENTOS

À Coleção de Culturas DPUA e ao Laboratório de Microbiologia Industrial e Médica, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por terem disponibilizado os microrganismos estudados, aparelhagem e materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo fomento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

AHMED, M. E.; Extraction and purification of protease from *Aspergillus niger* isolation. Pharmacy & Pharmacology International Journal, v. 6, n. 2, p. 96-99. DOI: 10.15406/ppij.2018.06.00162. 2018.

ALECRIM, M. M.; PALHETA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, I. M. A. Milkclotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. International Journal of food Science and technology, v. 50, n. 1, p. 11-157. DOI: 10.1111/ijfs.12677. 2014.

ALECRIM, M. M.; MARTIM, S. R.; SOUZA, B. C.; TEIXEIRA, M. F. S. *Aspergillus flavo furcatis*: Aflatoxin test and milkclotting protease production in submerged and solid state fermentation. African Journal of Microbiology Research, v. 11, n. 7, p. 312-318. DOI: 10.5897/AJMR2016.8400. 2017.

AO, X. L. et al. Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans. AMB Express, v. 8, n. 96, p. 1-10. DOI: 10.1186/s13568-018-0611-6. 2018.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial protease on biotechnological industries. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 33, n. 2, p. 119-143. DOI: 10.1080/02648725.2017.1408256. 2017.

BARBOSA, E. E. P. et al. Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. Brazilian Journal of Development. v. 6, n. 11, p. 92475-92485. DOI: 10.34117/bjdv6n11-598. 2020.

CHEN, L. S. et al. Produção de enzimas proteolíticas neutras por fermentação fúngica em meio semissólido. Simpósio Nacional de Bioprocessos, 14, Florianópolis. 2003.

DE CASTRO, R. J. S; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, n. 3, p. 20-25. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.12.002. 2014a.

DE 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, v. 2014, p. 1-11. DOI: 10.1155/2014/372352. 2014b.

DÍAZ, G. V. et al. Evaluation of new xylanolytic-producing isolates of *Aspergillus* from Misiones subtropical rainforest using sugarcane bagasse. Arab Journal of Basic and Applied Sciences, v. 26, n.1, p. 292-301. DOI: 10.1080/25765299.2019.1622922. 2019.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. International Journal of Biological Macromolecules, v. 128, p. 254-267. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081. 2019.

HAMIN NETO, Y. A. A. et al. Analysis of the Specificity and Biochemical Characterization of Metalloproteases Isolated from *Eupenicillium javanicum* Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Peptides. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 113. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02141. 2017.

HUANG, Y.; WANG, Y.; XU, Y. Purification and characterisation of an acid protease from the *Aspergillus hennebergii* HX08 and its potential in traditional fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 123, n. 3, p. 432-441. DOI: 10.1002/jib.427. 2017.

HYSENI, B. et al. Isolation and Characterization of Microorganisms for Protease Production from Soil Samples from Kosovo and Testing the Enzymes in Food Industry Application. *Journal of Environmental Treatment Techniques*, v. 8, n. 2, p. 687-693. 2020.

Jl, H.; DONG, C.; YANG, G.; PANG, Z. Production of Levulinic Acid from Lignocellulosic Biomass with a Recyclable Aromatic Acid and Its Kinetic Study. *BioResources*, v. 14, n. 1, p. 725-736. 2019.

KARTHIC, J. et al. Characterization of *Aspergillus oryzae* protease through submerged fermentation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 3, n. 5, p. 1023-1028. 2014.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, p. 1-115. 1988.

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*. *Journal of Molecular Biology*, v. 76, n. 1, p. 103-122. DOI: 10.1016/00222836(73)90083-1. 1973.

MAMO, J. et al. Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 571-584. DOI: 10.1007/s42770-020-00243-y. 2020.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Water Retention Value: A Study Model-based by *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae* Embrace Three Models of Solid Substrate. *Journal of Life Sciences*, v. 8, p. 420-429. DOI: 10.17265/1934-7391/2016.08.008. 2016.

MANORMA, K. et al. Screening and Isolation of Protease Producing Bacteria from Rhizospheric Soil of Apple Orchards from Shimla District (HP), India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 6, n. 5, p. 249-255. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.605.030. 2017.

MARTIM, S. R. et al. *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. *African Journal of Microbiology Research*, v. 11, n. 17, p. 660-667. DOI: 10.5897/AJMR2017.8520. 2017.

MENDES, L. D.; BRESOLIN, J. D.; ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Avaliação *in vitro* da Ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *Penicillium expansum*. Brazilian Journal of Biosystems Engineering, v. 10, n. 1, p. 116128. 2016.

PALANIVEL, P. et al. Production, purification and fibrinolytic characterization of alkaline protease from extremophilic soil fungi. International Journal of Pharma and Bio Sciences, v. 4, n. 2, p. 101-110. 2013.

PETINATE, S. D. G. et al. Influence of Growth Medium in Proteinase and Pigment Production by *Streptomyces cyaneus*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 173-177. 1999.

PHYU, H. E. et al. Screening on Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria From Various Yogurts and Fermented Milk. International Journal of Advances in Science Engineering and Technology, v. 5, p. 34-37. 2015.

RAM, M. R.; KUMAR, S. Production of alkaline protease from *Aspergillus oryzae* isolated from seashore of Bay of Bengal. Journal of Applied and Natural Science, v. 10, n. 4, p. 1210-1215. DOI: 10.31018/jans.v10i4.1905. 2018.

RAPER, K. B.; D. I. FENNEL. The genus *Aspergillus*: Robert E. Krieger Co. p. 1-686. 1977.

RAZZAQ, A. et al. Microbial proteases applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 7, p. 1-20. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00110. 2019.

REDES, J. L. et al. *Aspergillus fumigatus*-Secreted Alkaline Protease 1 Mediates Airways Hyperresponsiveness in Severe Asthma. ImmunoHorizons, v. 3, n. 8, p. 368-377. DOI: 10.4049/immunohorizons.1900046. 2019.

SALIHI, A.; ASSODEH, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. International Journal of Biological Macromolecules, v. 94, p. 827-835. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.023. 2017.

SCHUSTER, F. P. W. et al. Screening and evaluation of filamentous fungi potential for protease production in swine plasma and red blood cells-based media: qualitative and quantitative methods. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 21. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101313. 2019.

SHAFIQUE, Q. et al. Production of alkaline protease from *Aspergillus oryzae* via static liquid surface culture technique and its potential application as a detergent additive. International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences, v. 5, n. 1, p. 227-247, 2016.

SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. Journal of Genetic

Engineering and Biotechnology. v. 15, n. 1, p. 115-126. DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.02.001. 2017.

SHARMA, K. M. et al. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool For Various Industrial Approaches. *Industrial Biotechnology*. v. 15, n. 2, p. 69-78. DOI: 10.1089/ind.2018.0032. 2019.

SILVA, O. S. et al. Novel Protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation. *Advances in Enzyme Research*, v. 4, p. 125-143. DOI: 10.4236/aer.2016.44012. 2016.

SNYMAN, C.; THERON, L. W.; DIVOL, B. Understanding the regulation of extracellular protease gene expression in fungi: a key step towards their biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, n. 14, p. 5517-5532. DOI: 10.1007/s00253-019-09902-z. 2019.

SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 2, p. 337-346. DOI: 10.1590/S1517-838246220140359. 2015a.

SOUZA, P. M. et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 17-21. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043. 2015b.

SOUZA, P. M. et al. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 1103-1110. DOI: 10.1016/j.fct.2017.03.055. 2017.

SURYAWANSHI, H. K.; PANDYA, N. D. Screening, Identification of Alkaline Proteases Producing Fungi from Soil of Different Habitats of Amalner Tahsil [Maharashtra] and Their Applications. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, v. 5, n. 3, p. 397-402. DOI: 10.3126/ijasbt.v5i3.18304. 2017.

TARRAHIMOFRAD, H. et al. Structural and biochemical characterization of a novel thermophilic Coh01147 protease. *Plos One*. v. 15, n. 6, DOI: 10.1371/journal.pone.0234958. 2020.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas), p. 1-255. Editora da Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2011.

VISHWANATHA, K. S.; APPU RAO, A. G.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 129138 DOI: 10.1007/s10295-009-0654-4. 2010.

YIN, L. J.; CHOU, Y. H.; JIANG, S. T. Purification And Characterization of Acidic Protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. *Journal of Marine Science*



Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo: “Produção, otimização e caracterização de proteases coagulantes de uma espécie de fungo filamentosso epifítico de região tropical”

Produção, otimização e caracterização de proteases coagulantes de uma espécie de fungo filamentosso epifítico de região tropical

Production, optimization and characterization of coagulant proteases from a species of epiphytic filamentous fungus from a tropical region

Producción, optimización y caracterización de proteasas coagulantes a partir de una especie de hongo filamentosso epífito de una región tropical

Resumo

A busca por enzimas com ação coagulante do leite bovino tem aumentado com o passar dos anos, o que ocasiona a alta demanda para suprir o mercado, gerando a necessidade pela busca por fontes destas enzimas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a produção e otimização da síntese de coagulantes de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451. A cultura matriz foi obtida em ágar CYA [Czapek 0,5% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v)], mantida em placa de Petri por 7 dias. Após esse período, da cultura inóculo foi feita suspensão em concentração final de 10^6 esporos/mL em câmara de Neubauer. A fermentação submersa foi feita em frascos Erlenmeyer de 125mL formulado (g/L): K_2HPO_4 (2,0); $(NH_4)_2SO_4$ (1,0); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1); $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ (0,9); Extrato de levedura (1,0), Gelatina (5,0) e incubado a 30°C e 180 rpm por 72 horas. Após a recuperação do extrato bruto em papel de filtro e filtração a vácuo, foram verificados os efeitos da influência de fontes de carbono e nitrogênio e tempo de fermentação, utilizando planejamento fatorial 2^3 completo com três pontos centrais. A atividade proteolítica foi determinada utilizando solução de azocaseína 1% (p/v) e atividade coagulante verificada utilizando solução de leite desnatado em pó diluído em $CaCl_2$. A caracterização enzimática foi realizada no extrato com razão coagulante significativa ($R=1,330$), com o predomínio de serinoproteases e metaloproteases e atividade catalítica em pH 5,0 e 50°C. As enzimas foram fortemente inibidas por Zn^{+2} e Cu^{+2} . Os parâmetros utilizados favorecem a produção de coagulantes de *Aspergillus flavo furcatis*.

Palavras-chave: coagulação do leite, fermentação submersa, hidrolases.

Abstract

The search for enzymes with coagulant action in bovine milk has increased over the years, which causes a high demand to supply the market, generating the need to search for sources of these enzymes. The objective of this research was to evaluate the production and optimization mechanisms of the synthesis of coagulants from *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451. The

matrix culture was obtained on CYA agar [Czapek 0.5% (w/v) + yeast extract 0.5% (p/v)], kept in a Petri dish for 7 days. After this period, the inoculum culture was suspended at a final concentration of 106 spores/mL in a Neubauer chamber. Submerged fermentation was carried out in 125mL Erlenmeyer flasks formulated (g/L): K₂HPO₄ (2.0); (NH₄)₂SO₄ (1.0); MgSO₄·7H₂O (0.1); NaH₂PO₄·7H₂O (0.9); Yeast Extract (1.0), Gelatin (5.0) and incubated at 30°C and 180 rpm for 72 hours. After recovering the crude extract on filter paper and vacuum filtration, the effects of the influence of carbon and nitrogen sources and fermentation time were verified, using a complete 23 factorial design with three central points. The proteolytic activity was determined using 1% azocasein solution (w/v) and coagulant activity verified using powdered skim milk solution diluted in CaCl₂. Enzymatic characterization was performed on the extract with a significant coagulant ratio (R=1.330), with a predominance of serine and metalloproteases and catalytic activity at pH 5.0 and 50°C. Enzymes were strongly inhibited by Zn⁺² and Cu⁺². The parameters used favor the production of *Aspergillus flavo furcatis* coagulants.

Keywords: milk coagulation, submerged fermentation, hydrolases.

Resumen

La búsqueda de enzimas con acción coagulante en la leche bovina se ha incrementado a lo largo de los años, lo que provoca una alta demanda para abastecer al mercado, generando la necesidad de buscar fuentes de estas enzimas. El objetivo de esta investigación fue evaluar los mecanismos de producción y optimización de la síntesis de coagulantes de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451. El cultivo matriz se obtuvo en agar CYA [Czapek 0.5% (p / v) + extracto de levadura 0.5% (p / v)], conservado en placa Petri durante 7 días. Después de este período, el cultivo de inóculo se suspendió a una concentración final de 106 esporas / mL en una cámara de Neubauer. La fermentación sumergida se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 ml formulados (g / L): K₂HPO₄ (2,0); (NH₄)₂SO₄ (1,0); MgSO₄·7H₂O (0.1); NaH₂PO₄·7H₂O (0.9); Extracto de levadura (1.0), Gelatina (5.0) y se incubó a 30 ° C y 180 rpm durante 72 horas. Luego de recuperar el extracto crudo sobre papel de filtro y filtración al vacío, se verificaron los efectos de la influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno y el tiempo de fermentación, utilizando un diseño factorial completo de 23 con tres puntos centrales. La actividad proteolítica se determinó usando una solución de azocaseína al 1% (p / v) y la actividad coagulante se verificó usando una solución de leche desnatada en polvo diluida en CaCl₂. La caracterización enzimática se realizó sobre el extracto con una relación coagulante

significativa ($R = 1.330$), con predominio de serina y metaloproteasas y actividad catalítica a pH 5.0 y 50 ° C. Las enzimas fueron fuertemente inhibidas por $Zn + 2$ y $Cu + 2$. Los parámetros utilizados favorecen la producción de coagulantes de *Aspergillus flavo furcatis*.

Palabras clave: coagulación de la leche, fermentación sumergida, hidrolasas.

1. Introdução

As proteases são os biocatalisadores mais utilizados em processos biotecnológicos, constituindo 65% do total de vendas no mercado mundial de enzimas (Usman et al., 2021). Estas hidrolases são usadas principalmente no setor têxtil, na fabricação de detergentes, no beneficiamento do couro, na formulação de produtos farmacêuticos, em processos de biorremediação e na elaboração de alimentos (Christopher et al., 2021).

O queijo vem se destacando entre os produtos alimentícios cujo consumo global vem aumentando significativamente a cada ano (FAO, 2021). Para elaboração de diferentes tipos de queijos, tradicionalmente é utilizado o coalho ou quimosina, enzima proteolítica obtida de ruminantes como bezerro, camelo e búfalos (Akishev et al., 2021). Porém, devido à escassez de matéria-prima animal, alto preço dos coalhos, questões religiosas, hábitos alimentares, restrição ao uso de proteases recombinantes, pesquisas têm sido realizadas para encontrar novas fontes de proteases coagulantes para uso na indústria de laticínios (Bakr et al., 2021; Martim et al., 2021).

As proteases de origem microbiana são uma excelente alternativa ao coalho animal, pois são enzimas que possuem alto rendimento, elevada variedade bioquímica, menor tempo para produção, necessitam de menos espaço, facilidade de manipulação genética e custo-benefício favorável (Balachandran et al., 2021; Christopher et al., 2021). Entre os microrganismos, espécies de *Aspergillus* consideradas seguras (*GRAS – Generally Regarded As Safe*), como *A. niger*, *A. oryzae* e *A. flavo furcatis* vêm sendo descritas como fontes de coagulantes do leite para a uso na produção de queijo (Alecrim et al., 2017; Bensmail et al., 2020; Prado et al., 2021; Sambo et al., 2021).

A fermentação submersa, que consiste na utilização de meio líquido contendo nutrientes solúveis, é uma tecnologia eficaz para a obtenção de enzimas proteolíticas (Alecrim et al., 2017). Este bioprocessos possui vantagens como monitoramento dos parâmetros físico-químicos e ambientais, além da distribuição uniformemente do inóculo, condição que facilita a absorção dos nutrientes e a síntese de proteases e de coagulantes (Martim et al., 2017; Lima et al., 2020).

O custo para a produção de proteases é influenciado pela composição do meio de cultura e outros fatores como o pH, temperatura, inóculo e tempo de incubação. Cerca de 30 – 40% dos gastos para a obtenção de novas proteases estão relacionados ao meio de cultivo utilizado para o crescimento do microrganismo. Portanto, pesquisas que avaliam condições ótimas de cultivo são importantes para reduzir o custo de produção e o aumento da biossíntese de enzimas proteolíticas (Mamo et al., 2020).

Esta pesquisa teve como objetivo otimizar e caracterizar a produção de proteases coagulantes de *A. flavo furcatis*, espécie de região tropical, para utilização na indústria de processamento de laticínios, com potencial utilização na fabricação de queijo.

2. Metodologia

2.1 Microrganismo

Nesta pesquisa foi utilizada uma linhagem de *A. flavo furcatis* DPUA 1451, cedida do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. A cultura pura foi obtida em ágar CYA [Czapek 0,5% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v)], e mantida em placa de Petri de 90 mm x 15 mm, a 25 °C por sete dias (Klich & Pitt, 1988).

2.2 Preparo do inóculo

Como inóculo foi utilizada a cultura de *A. flavo furcatis* em ágar CYA, em tubo de ensaio, obtida a 25 °C por sete dias. Na cultura foi preparada uma suspensão de esporos de concentração final 10^6 esporos/mL de meio. A suspensão celular foi homogeneizada em agitador de tubo e foi realizada contagem dos esporos em câmara de Neubauer (Mendes et al. 2016).

2.3 Fermentação submersa

O cultivo em meio líquido foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo meio líquido formulado com (g/L): K_2HPO_4 (2,0); $(NH_4)_2SO_4$ (1,0); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1); $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ (0,9); Extrato de levedura (1,0), Gelatina (5,0). O meio de fermentação será esterilizado a 121 °C por 15 min. Para cada 50 mL de meio, em cada frasco Erlenmeyer de 125 mL foi inoculada a suspensão de esporos equivalente a 10^6 esporos/mL. A fermentação foi conduzida em agitador orbital New Brunswick Scientific®, a 30 °C e 180 rpm por 72 horas.

2.4 Recuperação do extrato bruto

A biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo, utilizando papel de filtro Whatman nº 1. Em seguida, o extrato foi novamente filtrado sob vácuo utilizando membranas de éster de celulose (0,45 µm) e polietersulfônica (0,22 µm), respectivamente.

2.5 Padronização de condições para a produção de enzimas coagulantes

2.5.1 Efeitos de fonte de carbono e nitrogênio na produção de proteases

Para verificação da influência da concentração de fontes de carbono e nitrogênio, e tempo de fermentação foi delineado um planejamento fatorial completo 2^3 , com 3 pontos centrais (Tabela 1), utilizando o *software* Minitab versão 19.0. No delineamento experimental, inteiramente casualizado foi utilizado como fonte de carbono Amido (A), e como fonte de nitrogênio Caseína de soja (Cs), e três tempos de fermentação (3, 5 e 7 dias), totalizando 11 experimentos. A fermentação submersa foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido. Em cada frasco foi inoculada uma suspensão celular de 10^6 esporos/mL de meio. A fermentação foi conduzida a 30 °C, 180 rpm. A atividade proteolítica foi realizada em triplicata.

Tabela 1. Parâmetros avaliados no planejamento fatorial 2^3 completo com três pontos centrais para otimização da produção de proteases de *A. flavo furcatis*. [(-1), (0) e (+1) correspondem aos níveis inferior, central e superior, respectivamente].

Fatores	Nível -1	Nível 0	Nível +1
Fonte de carbono (%)	0,25	0,50	1,0
Fonte de nitrogênio (%)	0,25	0,50	1,0
Tempo de Fermentação (dias)	3	5	7

Fonte: Autores.

2.6 Atividade proteolítica

Do extrato bruto foi realizada a quantificação de enzimas proteolíticas utilizando a metodologia descrita por Leighton et al. (1973), utilizando solução de Azocaseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl, pH 7,2. A mistura reacional, constituída por 150 µL de extrato enzimático e 250 µL de Azocaseína foi mantida na ausência de luz, a 25 °C. Após uma hora, a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido Tricloroacético 10% (p/v), seguido de

centrifugação a 4 °C (8.000 x g/10 minutos). Do sobrenadante recuperado foi retirado 800 µL para homogeneização em 1,4 mL de NaOH 1M. O branco foi preparado nas mesmas condições utilizadas na amostra teste. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,1 em 60 minutos.

2.7 Atividade coagulante

A atividade coagulante do leite foi determinada seguindo metodologia descrita por Arima et al. (1970) com modificações. Como substrato foi utilizado leite desnatado 10% (p/v) (Itambé[®], Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), diluído em CaCl₂ 0,05M, pH 5,8 (Prado et al., 2021). Dessa solução foi transferido 5 mL para cada tubo reação, seguindo a incubados a 40° C, em banho-maria com agitação interna (Marconi MA 179). Após 15 minutos foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático bruto, seguindo a homogeneização da mistura e incubação durante 40 minutos. A atividade coagulante foi determinada como positiva após formação de coágulos na parede do tubo. O resultado 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) ou coagulação fraca (coagulação sem separação visual de soro) (Alecrim et al., 2017). Uma unidade de atividade coagulante (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular 1 mL de substrato em 40 minutos a 40 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A atividade coagulante foi calculada de acordo com a equação 1, onde *T* é o tempo de formação do coágulo, *S* é o volume do leite em (mL) e *E* é o volume de extrato bruto utilizado (Shata, 2005).

$$\text{Equação 1. } U = \frac{2400}{T} \times \frac{S}{E}$$

A razão (R) coagulante do leite foi calculada de acordo com a razão da atividade de coagulação do leite e valores de atividade proteolítica conforme descrito na equação 2.

$$\text{Equação 2. } R = \frac{\text{Atividade coagulante}}{\text{Atividade proteolítica}}$$

2.8 Caracterização bioquímica de proteases coagulantes

2.8.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade de enzimas coagulantes

Para determinação do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada a 40 °C, utilizando as seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (pH 5,0 e 6,0), Tris-HCl (pH 7,0 e 8,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10) por 60 minutos na ausência de luz. Na avaliação da estabilidade ao pH, o extrato enzimático foi diluído em cada tampão (1:1, v/v), a 25 °C em soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (pH 5,0 e 6,0), Tris-HCl (pH 7,0 e 8,0) e Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10) e mantida por 60 minutos. Para a avaliação da temperatura ótima, a mesma foi determinada incubando o extrato bruto nas temperaturas de 30 a 80 °C (Martim *et al.*, 2017). No ensaio de estabilidade a temperatura, o extrato bruto foi incubado em temperaturas de 30 a 80 °C durante 60 minutos. A atividade das proteases foi determinada nas condições ótimas de pH e temperatura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em atividade enzimática relativa em todos os experimentos (Martim *et al.*, 2017).

2.9 Efeito de íons metálicos e inibidores de proteases na atividade coagulante

Para determinação do efeito de inibidores na atividade coagulante foram utilizados: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 1 mM, Ácido Iodoacético 1 mM, Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM e Pepstatina 1mM. O efeito dos íons metálicos foi determinado as seguintes soluções a 1 mM: Sulfato Ferroso (FeSO₄), Sulfato de Manganês (MnSO₄), Sulfato de Magnésio (MgSO₄), Cloreto de Sódio (NaCl), Sulfato de Zinco (ZnSO₄), Cloreto de Potássio (KCl), Cloreto de Cálcio (CaCl₂) e Sulfato de Cobre (CuSO₄). As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura. A atividade enzimática residual e coagulante foi comparada ao controle, incubado sem os inibidores ou íons metálicos e correspondeu a 100% de atividade. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Martim *et al.*, 2017).

2.10 Ensaio de toxicidade *in vitro* de proteases com fibroblastos humanos

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizados fibroblastos humanos (MRC-5), realizado no laboratório Biophar, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, as células conservadas no meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com Soro Fetal Bovino 10% [v/v (SFB)] e Penicilina 1% (p/v). As células foram mantidas em estufa com injeção de CO₂ a 5%, a 37 °C. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de 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 do extrato liofilizado durante 72 horas. Como

controle positivo foi utilizada a Doxorubicina (20 μ M ou 34 μ g/mL) e como controle negativo dimetilsulfóxido-DMSO (0,01%, v/v). Após adição de Alamar Blue (0,4% v/v) as fluorescências foram medidas a 465 nm e 540 nm no leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter). Os ensaios foram feitos em triplicata. As imagens foram capturadas por meio do *software* Zen 2 da Carl Zeiss em Microscópio GmbH Company® e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 6.0.

2.11 Análise estatística

Em todos os experimentos realizados em triplicata, os dados foram submetidos a análise estatística de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o *software* Minitab, versão 19.0 (Minitab, 2019).

3. Resultados e Discussão

3.1 Otimização da produção de proteases de *A. flavo furcatis*

Existem poucos trabalhos disponíveis na literatura com demonstrando a otimização de enzimas proteolíticas sintetizadas por *A. flavo furcatis*. No presente estudo, as melhores fontes de carbono e nitrogênio testadas para a produção de coagulantes foram amido e caseína, respectivamente.

A razão coagulante é um importante fator na escolha de fontes substitutas aos coalhos tradicionais, estes devem possuir razão coagulante significativa, o que indica maior presença de enzimas com ação coagulante específica da caseína do leite, em relação as demais enzimas com atividade proteolítica geral (Troch et al., 2016).

Dos 11 experimentos realizados em fatorial, um quantitativo de 72,7% apresentou atividade coagulante do leite bovino. O experimento 9, com concentração de 0,50% de amido e caseína e tempo de crescimento de 5 dias apresentou razão coagulante significativa ($R = 1,33$). A razão coagulante (R) demonstra a potencial adequação comercial destas enzimas de coagulação do leite na fabricação de queijo (Alecrim et al., 2014). A atividade coagulante do experimento 9 (30,38 U) e as demais atividades proteolíticas (U) dos experimentos estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2. Design fatorial 2³ completo com três pontos centrais para a otimização da produção de coagulantes *A. flavo furcatis*.

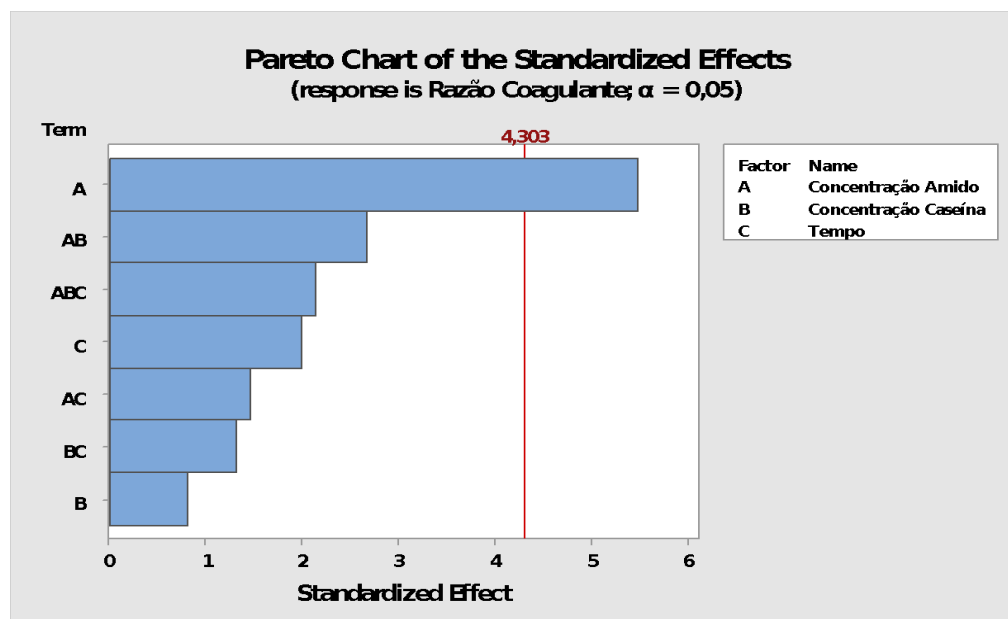
Experimentos	Ponto central	Tempo (dias)	Concentração Amido	Concentração Caseína	Atividade coagulante (U)	Atividade proteolítica (U/mL)	Razão coagulante
1	1	3	0,25	0,25	15,89 ± 0,03 ^e	26,35 ± 1,45 ^b	0,60 ± 0,03 ^{cd}
2	1	7	1,00	0,25	ND	0,55 ± 0,25 ^e	ND
3	1	3	0,25	1,00	14,73 ± 0,03 ^f	28,35 ± 0,10 ^{ab}	0,52 ± 0,01 ^d
4	1	7	1,00	1,00	ND	1,66 ± 0,30 ^{de}	ND
5	1	3	0,25	0,25	23,30 ± 0,07 ^c	31,44 ± 0,73 ^a	0,74 ± 0,01 ^c
6	1	7	1,00	0,25	ND	3,91 ± 0,14 ^d	ND
7	1	3	0,25	1,00	13,71 ± 0,02 ^g	27,65 ± 0,91 ^b	0,49 ± 0,01 ^d
8	1	7	1,00	1,00	14,72 ± 0,03 ^f	26,26 ± 0,91 ^b	0,56 ± 0,02 ^d
9	0	5	0,50	0,50	30,38 ± 0,0 ^a	23,00 ± 1,98 ^c	1,33 ± 0,11 ^a
10	0	5	0,50	0,50	28,23 ± 0,11 ^b	21,81 ± 0,16 ^c	1,29 ± 0,05 ^a
11	0	5	0,50	0,50	22,02 ± 0,07 ^d	20,75 ± 1,19 ^c	1,06 ± 0,06 ^b

ND = não determinado. Fonte: Autores.

O gráfico de Pareto (Figura 1) mostra as variáveis e as interações que influenciaram na produção de coagulantes por *A. flavo furcatis*, somente a concentração de amido apresentou efeito significativo ($p < 0,05$). Kalaskar et al. (2014) apresentaram um aumento na produção de proteases de *A. niger* utilizando amido como fonte de carbono, com potencial aplicação comercial a baixo custo do procedimento. Gnanadoss e Devi (2015) utilizaram amido para aumentar a produção de proteases em *A. nidulans* e *A. flavus*, além de reduzir o custo de produção enzimática.

Sharma et al. (2017) utilizando linhagens de *Aspergillus* verificaram que a utilização de amido para padronização do processo de produção de proteases otimizou este procedimento.

Figura 1. Gráfico de Pareto identificando os fatores e as interações significativos na produção de proteases coagulantes do leite de *A. flavo furcatis*.



Fonte: Autores.

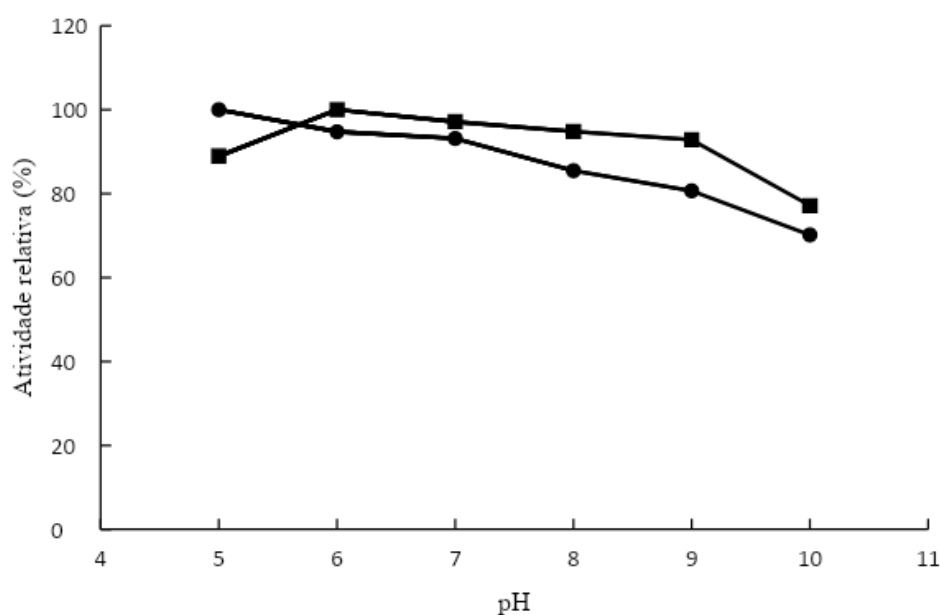
3.2 Caracterização bioquímica de enzimas coagulantes de *A. flavo furcatis*

A figura 2 demonstra o efeito do pH na atividade e na estabilidade do coagulante de *A. flavo furcatis*. Nas condições avaliadas, as proteases apresentaram 100% de atividade relativa em pH 5,0, resultado que evidencia a atividade ótima desses biocatalisadores em pH levemente ácido. Com o aumento do potencial hidrogeniônico, a ação catalítica decaiu e em pH 10 a enzima demonstrou 70,183% de atividade. A estabilidade enzimática foi observada entre pH 7 a 9, faixa em que a protease manteve atividade acima de 90%. Entre vários parâmetros, o pH e a temperatura são considerados essenciais para a máxima atividade enzimática (Banerjee et al., 2017).

Usman et al. (2021) utilizando fungo filamentosos pertencente ao gênero *Aspergillus*, este apresentou atividade máxima em pH 5,0 e estabilidade ao pH na faixa de 4 a 6, resultado que corrobora com os obtidos nesta pesquisa, no entanto foi utilizada a técnica de fermentação em estado sólido nesta investigação. Lizardi-Jiménez et al., (2019) registraram atividade máxima em pH 6,5 na atividade de coagulação do leite bovino do extrato bruto enzimático produzido por fermentação em estado sólido de *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*. Mamo et al., (2020) em sua pesquisa com *Aspergillus oryzae* observaram atividade de coagulação em pH em 5,0, dados similares aos obtidos nesta pesquisa.

De acordo com Ahmed, Wehaidy, Ibrahim, El Ghani, & El-Hofi (2016) e Martim et al. (2021), as modificações de pH podem alterar a carga elétrica de aminoácidos no sítio ativo enzimático ou alterar as estruturas das enzimas. Essas modificações sensibilizam a ligação com o substrato e enzimas, resultando na redução da atividade catalítica.

Figura 2. Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática de *A. flavo furcatis* DPUA 1451.

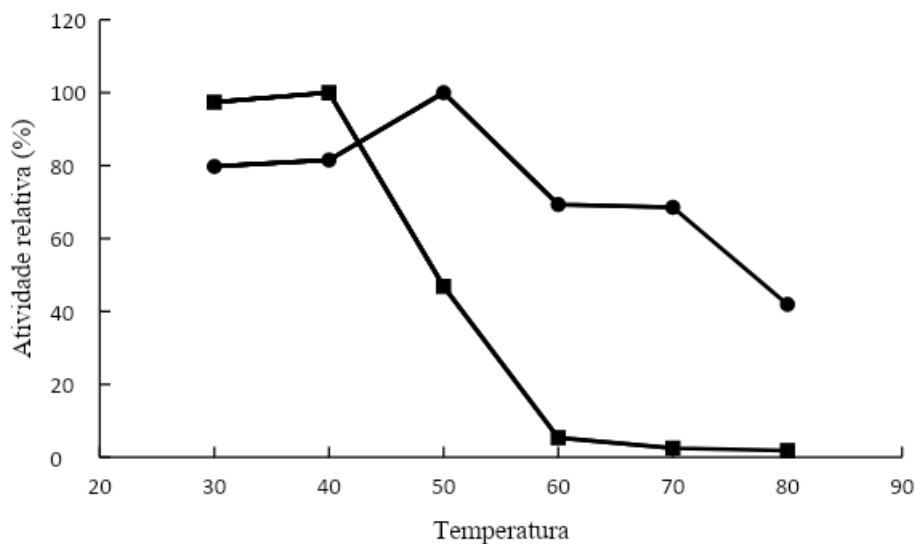


● = Atividade pH ótimo; ■ = Estabilidade ao pH (fonte: Autores).

A temperatura ótima de atividade enzimática foi registrada em 50 °C, com declínio de atividade catalítica com o aumento da temperatura. A estabilidade foi detectada na faixa de 30 a 40 °C (Figura 3). Usman et al. (2021) verificaram que a atividade ótima de um isolado do gênero *Aspergillus* foi em temperatura de 50 °C, e estabilidade a temperatura na faixa de 40-60 °C, resultado similar ao presente trabalho. Mamo et al., (2020) em sua pesquisa com *Aspergillus oryzae* obtiveram temperatura ótima da atividade de coagulação em 60 °C, com estabilidade em 35-45 °C, resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho.

Lizardi-Jiménez et al., (2019) demonstraram atividade catalítica em temperatura de 40 °C do extrato bruto de *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* na caracterização de enzimas coagulantes do leite bovino. A temperatura é um importante fator na síntese enzimática pois pode afetar diretamente a produção de enzimas, com o aumento da temperatura, pode ocorrer a desnaturação proteica, além de influenciar vias metabólicas (Sattar et al., 2019).

Figura 3. Efeito da temperatura na atividade (●) e estabilidade (■) enzimática de *A. flavo furcatis* DPUA 1451.



Fonte: Autores.

O efeito de inibidores na atividade enzimática de *A. flavo furcatis* está demonstrado na tabela 3. Todos os inibidores reduziram a atividade enzimática do extrato de *A. flavo furcatis*. PMSF e EDTA reduziram a atividade em 29 e 39% respectivamente, em concentração de 1 mM, demonstrando a presença de serinoproteases e metaloproteases. Ácido Iodoacético e Pepstatin A atenuaram a atividade das enzimas proteases em 51 e 80% respectivamente.

Resultados semelhantes aos de Mamo et al. (2020), Iodoacetamina, EDTA e PMSF tiveram efeitos leves sobre o extrato de *A. oryzae* na concentração de 10 mM. Silva et al., (2018) também reportaram que as enzimas produzidas por *A. tamaritii* foram inibidas fortemente por Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF), indicando a presença de serinoproteases no extrato.

Os resultados referentes ao efeito de íons metálicos na atividade de proteases demonstraram que os íons Zn^{2+} e Cu^{2+} foram os que mais reduziram a atividade de proteases, com 6,5 e 7,0 % respectivamente. Os íons K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} promoveram discreta inibição com 67, 67 e 72% respectivamente, o resultado completo está demonstrado na tabela 3. Mamo et al., (2020) reportaram que as enzimas produzidas por *A. oryzae* foram inibidas com íons Zn^{2+} e aumentaram a atividade enzimática com íons Mn^{2+} .

Silva et al., (2018) mostraram que a atividade de proteases de *A. tamarii* foi fortemente reduzida com íons Zn^{2+} e apresentou aumento na atividade com íons Mg^{2+} .

Tabela 3. Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade de *A. flavo furcatis*

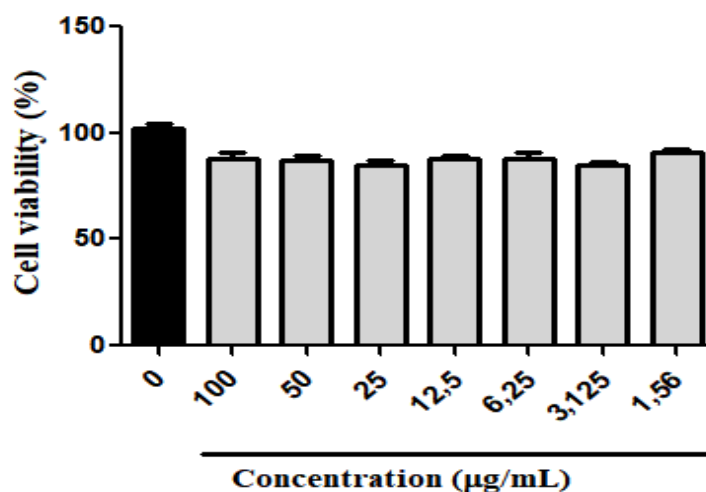
Íon metálicos/inibidores	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)
Controle	-	100
Fe^{2+}	1	16 ± 0,16
Mn^{2+}	1	66 ± 0,04
Mg^{2+}	1	72 ± 0,06
Na^+	1	65 ± 0,03
Zn^{2+}	1	6,5 ± 0,02
K^+	1	67 ± 0,01
Ca^{2+}	1	67 ± 0,35
Cu^{2+}	1	7,0 ± 0,04
Ác. Iodoacético	1	51 ± 0,21
PMSF	1	29 ± 0,35
EDTA	1	39 ± 0,40
Pepstatin A	1	80 ± 0,84

PMSF = Fluoreto de Fenilmetilsulfonila; EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

(fonte: autores).

A toxicidade do extrato bruto enzimático de *A. flavo furcatis* DPUA 1451 foi negativa no ensaio utilizando fibroblastos humanos MRC-5, não sendo observada mudança morfológica das células durante 72 horas de tratamento. Em 7 concentrações testadas não houve alteração na viabilidade celular, quando comparadas ao controle negativo Dimetilsulfóxido - DMSO (figura 4) portanto, as enzimas produzidas podem ser utilizadas na indústria de alimentos. Resultado similar ao de Alecrim (2017), utilizando uma espécie de *A. flavo furcatis* constatou que a espécie não é tóxica a células humanas.

Figura 4. Avaliação do efeito citotóxico do extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451 frente a fibroblastos MRC-5 humanos em diferentes concentrações de DMSO (controle negativo).



Fonte: Autores.

4. Conclusão

As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas nesta pesquisa favoreceram a produção de coagulantes de *Aspergillus flavo furcatis* DPUA 1451. A caracterização enzimática indicou atividade ótima em pH 5,0, e estabilidade ao pH na faixa de 4,0 a 6,0, e temperatura com atividade ótima em 50 °C e estabilidade na faixa de 30-40 °C, com a presença de serinoproteases e metaloproteases e enzimas não tóxicas frente a fibroblastos humanos, indicando potencial utilização na indústria de alimentos, na fabricação de queijos.

5. Referências Bibliográficas

Alecrim, M. M., Palheta R. A., Teixeira, M. F. S., Oliveira, I. M. A. (2014). Milk-Clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. *International Journal of Food Science & Technology*. 1-7.

Alecrim, M. M. (2017). Coagulante de *Aspergillus* para elaboração de queijo com biomassa de macrofungo. Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal BIONORTE.

Ahmed, S. A., Wehaidy, H. R., Ibrahim, O. A., El Ghani, S. A., & El-Hofi, M. A. (2016). Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 241-249.

Ahmed, S. A.; Gogal, R. M. Jr. & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*. 170, 211-224.

Akishev, Z., Kiribayeva, A., Mussakhmetov, A., Baltin, K., Ramankulov, Y., & Khassenov, B. (2021). Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris*. *Heliyon*, 7(5), e07137.

Alecrim, M. M.; Martim, S. R.; Cordeiro, B. C. & Teixeira, M. F. S. (2017). *Aspergillus flavo furcatis*: Aflatoxin test and milk-clotting protease production in submerged and solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*. 11(7), 312-318.

Bakr, A.; Ibrahim, O.; El-Ghandour, A. E. S. & El-Deeb, N. (2021). Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme from Edible Mushroom (*Pleurotus florida*). *Letters in Applied NanoBioScience*. 11(2), 3362-3373.

Balachandran, C.; Vishali, A.; Nagendran, N. A.; Baskar, K.; Hashem, A. & Abd-Allah, E. F. (2021). Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28, 4263-4269.

Bensmail, S.; Boudjema, K. & Naimi-Fazouane, F. (2020). Production of Extracellular Rennin-Like Enzyme by a Newly Isolate *Mucor circinelloides* (von Tieghem) and its Application in Camembert Cheese Making. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 7(1), 16-24.

Bezerra, P. H. A., Stocco, B., Bianchi, C. I., Bianchini, F., Figueiredo, S. A., Fonseca, M. J. V., & Torqueti, M. R. (2021). Soybean extract modified by *Aspergillus awamori* stimulates a greater collagen-I synthesis in the intracellular matrix of human fibroblasts. *Journal of Cosmetic Dermatology*.

Borkar, V., Chakraborty, S. & Gokhale, J. S. Fermentative Production of Nariginase from *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425 Using Citrus Wastes: Process Optimization, Partial Purification, and Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

Christopher, M.; Kooloth-Valappil, P.; Sreeja-Raju, A. & Sukumaran, R. K. (2021). Repurposing proteases: Na *in-silico* analysis of the binding potential of extracellular fungal proteases with selected viral proteins. *Bioresource Technology Reports*. 15, 1-8.

FAO. 2021. Dairy Market Review: Overview of global dairy market developments in 2020, April 2021. Rome.

Gnanadoss, J. J. & Devi, S. K. (2015). Optimization of Nutritional and Culture Conditions for Improved Protease Production by *Aspergillus Nidulans* and *Aspergillus Flavus*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 4(6), 518-523.

Kalaskar, V. V., Kasinathan, N., Subrahmanyam, V. M., & Rao, J. V. Optimization of Extracellular Acid Protease Production from *Aspergillus niger* by Factorial Design. (2014). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 4(2), 132-136.

Klich, M. A. & Pitt, J. I. (1988). A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*.

Lima, E. E., Franco, D. G., Galeano, R. M. S., Guimarães, N. C. A., Masui, D. C., Giannesi, G. C., Zanoelo, F. F. (2020). Biochemical characterization of a partially purified protease from

Aspergillus terreus 7461 and its application as an environmentally friendly dehairing agent for leather industry. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*.

Lizardi-Jiménez, M. A., Ricardo-Díaz, J., Quiñones-Muñoz, T. A., Hernández-Rosas, F., Hernández-Martínez, R. (2019). Fungal strain selection for protease production by solid-state fermentation using agro-industrial waste as substrates. *Chemical Papers*, 73, 2603–2610.

Mamo, J.; Kangwa, M.; Fernandez-Lahore, H. M. & Assefa, F. (2020). Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*.

Martim, S. R., Silva, L. S. C., Alecrim, M. M., Teixeira, L. S. & Teixeira, M. F. S. (2021). Milk-clotting proteases from *Pleurotus albidus*: an innovative alternative for the production of Minas frescal cheese. *Acta Scientiarum*. 43, 1-12.

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. (2017). *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. *African Journal of Microbiology Research*. 11(17), 660-667.

Mendes, L. D.; Bresolin, J. D.; Assis, O. B. G. & Britto, D. (2016). Avaliação *in vitro* da Ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *Penicillium expansum*. *Brazilian Journal of Biosystems Engineering*. 10(1), 116- 128.

Minitab. (2019) Minitab Statistical Software. *LEAD Technologies, Inc.* Version 19.0.

Prado, F. B.; Batista, S. C. P.; Martim, S. R. & Teixeira, M. F. S. (2021). Viabilidade Da Produção De Proteases Por Espécies De *Aspergillaceae* E Triagem De Coagulantes Do Leite Bovino. *Brazilian Journal of Development*. 7(2), 16356–16373.

Sambo, S.; Magashi, A. M.; Farouq, A. A. & Hassan, S. W. (2021). An overview of the solid state fermentation in the production of fungal protease enzymes. *World Journal of Advanced Research and Reviews*. 9(3), 085–089. DOI <https://doi.org/10.30574/wjarr.2021.9.3.0061>.

Sharma, A. K., Negi, S., Sharma, V. & Saxena, J. (2017). Optimization of Protease Production from Wild and Mutant Strains of *Aspergillus* sp. Under Submerged Fermentation. *SMU medical Journal*. 4(2), 234-247.

Shata, H. M. (2005). Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. *Polish Journal of Microbiology*. 54(3), 241-247.

Silva, O. S., Almeida, E. M., Melo, A. H. F., Porto, T. S., (2018). Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaris* URM4634. *International Journal of Biological Macromolecules*. 117 (1), 1081-1088.

Troch, T., Lefébure, E., Baeten, V., Colinet, F., Gengler, N., Sindic, M. (2017). Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 21(4), 276-287.

Usman, A., Mohammed, S. & Mamo, J. (2021). Production, Optimization, and Characterization of an Acid Protease from Filamentous Fungus by Solid-State Fermentation. *International Journal of Microbiology*.