



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



ANA CRISTINA VIANA BARROS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTE POR FUNGO
FILAMENTOSO: UMA FONTE ALTERNATIVA E RENOVÁVEL DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS**

MANAUS - AM

2023

ANA CRISTINA VIANA BARROS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTE POR FUNGO FILAMENTOSO:
UMA FONTE ALTERNATIVA E RENOVÁVEL DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Dissertação elaborada no curso de mestrado e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGBIOTEC-UFAM), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologias para a área agroflorestal – Conservação e uso de recursos genéticos microbianos da Amazônia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS- AM
2023

Ficha Catalográfica

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

B277p Barros, Ana Cristina Viana
Produção e caracterização de coagulante por fungo filamentoso:
uma fonte alternativa e renovável de enzimas proteolíticas / Ana
Cristina Viana Barros. 2023
62 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Aspergillus oryzae. 2. Atividade proteolítica. 3. Coagulação do
leite. 4. Fermentação submersa. I. Teixeira, Maria Francisca Simas.
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTE POR FUNGO FILAMENTOSO: UMA FONTE ALTERNATIVA E RENOVÁVEL DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Dissertação elaborada no curso: Mestrado em Biotecnologia e apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC - UFAM), como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 16 de novembro de 2023.

BANCA AVALIADORA

Prof.^a Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
Orientadora - 1º Avaliador (a)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof.º Dr. Salomão Rocha Martim
2º Avaliador (a)
Universidade Nilton Lins – UNINILTONLINS

Prof.^a Dra. Ana Rita Gaia Machado
3º Avaliador (a)
Centro Universitário FAMETRO

Prof.^a Dra. Rosany Piccolotto Carvalho
Coordenadora
(Portaria N° 1303/GR)
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação
em Biotecnologia

A mim, pela **DETERMINAÇÃO** e **FOCO**. E a
todos os que me ajudaram ao longo desta
caminhada.

DEDICATÓRIA

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.

Este trabalho é, em grande parte, uma celebração da rede de apoio que tive a sorte de construir ao longo da minha jornada acadêmica. À minha família, que é a base sólida sobre a qual construí meus sonhos e conquistas, expresso minha eterna gratidão.

À minha mãe, Cristiane Viana, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos, nunca medindo esforços em meu favor e por acreditar em mim quando eu próprio duvidava.

Ao meu amor, Michael W. S., cujo apoio constante e paciência foram fundamentais durante as longas horas dedicadas a esta pesquisa. Seu encorajamento e compreensão tornaram possível superar os desafios acadêmicos.

À Professora Dra. Maria Francisca Simas Teixeira, pelo acolhimento no laboratório, pela orientação, sempre disposta a ensinar e me auxiliar durante todo o processo de construção deste trabalho. Muito obrigada por cada lição, levo cada aprendizado que tive para ser aplicado nos meus próximos passos, pois se conseguir ser metade da profissional que és, estarei realizada.

Aos colegas que compõe o grupo de pesquisadores da Micoteca/Coleção de Cultura DPUA da Universidade Federal do Amazonas, e em especial a Samara Claudia Batista, Ana Kezia de Brito Pimental e Tiara Cabral, 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.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram para que esse ciclo acontecesse em minha vida.

*Nada na vida deve ser temido, apenas
compreendido. Agora é hora de
compreender mais para temer menos*
(Marie Curie)

RESUMO

A crescente demanda por enzimas com atividade coagulante do leite bovino tem impulsionado pesquisas na área, resultando em uma maior busca por fontes dessas enzimas para suprir o mercado. Proteases são enzimas de significativa relevância econômica e podem ser sintetizadas por diversas espécies de fungos filamentosos, incluindo aquelas pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a produção e caracterização das proteases coagulantes sintetizadas pela espécie *Aspergillus oryzae* DPUA1624. A cultura matriz foi desenvolvida CYA [Czapek 0,5% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v)] e mantida por sete dias a 25 °C. Após esse período, foi inoculado uma suspensão de esporos para meio líquido contendo Extrato de Levedura Czapek (CYA); Extrato de Sabouraud (SAB); Glicose, Extrato de Levedura e Peptona (GYP), e a fermentação ocorreu em agitador orbital a 150 rpm e 25 °C. Após 72 horas, o extrato bruto foi recuperado e filtrado à vácuo. A atividade das proteases foi avaliada utilizando como substrato azocaseína 1% (p/v) em solução tampão Tris-HCl, pH 7,2. A produção de proteases coagulantes do leite bovino também foi determinada quanto ao pH e temperatura ideais, estabilidade de pH e temperatura. Os resultados indicaram que *A. oryzae* excretou proteases com valores significativos no meio CYA, com atividade proteolítica (17,33 U/mL). A atividade ótima dessas enzimas foi determinada em pH 6,0, a 50 °C. Enzimas com atividade coagulante foram detectadas somente em CYA (30,89 U), com atividade ótima em pH 5,0 a uma temperatura de 50 °C. Os resultados sugerem que as proteases de *A. oryzae* podem ser aplicadas em diversos setores industriais, como a indústria alimentícia, têxtil e panificação, ampliando suas possibilidades de uso como importantes ferramentas biotecnológicas.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*, Atividade proteolítica, Coagulação do leite, Fermentação submersa.

ABSTRACT

The growing demand for enzymes with milk-clotting activity in bovine milk has driven research in the field, leading to an increased search for sources of these enzymes to meet market demands. Proteases are enzymes of significant economic relevance and can be synthesized by various species of filamentous fungi, including those belonging to the genus *Aspergillus*. This research aimed to evaluate the production and characterization of milk-clotting proteases synthesized by the species *Aspergillus oryzae* DPUA1624. The culture matrix was developed using CYA [Czapek 0,5% (w/v) + yeast extract 0,5% (w/v)] and maintained for seven days at 25°C. After this period, a spore suspension was inoculated into a liquid medium containing Czapek Yeast Extract (CYA), Sabouraud Extract (SAB), Glucose, Yeast Extract, and Peptone (GYP), and fermentation took place on an orbital shaker at 150 rpm and 25 °C. After 72 hours, the crude extract was recovered and vacuum-filtered. The activity of the proteases was assessed using 1% (w/v) azocasein as a substrate in Tris-HCl buffer solution, pH 7,2. The production of bovine milk-clotting proteases was also determined regarding the optimal pH and temperature, pH stability, and temperature stability. The results indicated that *A. oryzae* excreted proteases with significant values in the CYA medium, showing proteolytic activity (17,33 U/mL). The optimal activity of these enzymes was determined at pH 6,0 and 50°C. Coagulating enzymes were detected only in CYA (30,89 U), with optimal activity at pH 5,0 and a temperature of 50°C. The results suggest that *A. oryzae* proteases can be applied in various industrial sectors, such as the food, textile, and baking industries, expanding their potential use as important biotechnological tools.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Proteolytic Activity, Milk Clotting, Submerged Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estruturas características do gênero <i>Aspergillus</i>	16
Figura 2. Características macroscópicas da colônia de <i>A. oryzae</i>	18
Figura 3. Características micromorfológicas de <i>A. oryzae</i>	19
Figura 4. Classificação das proteases quanto ao mecanismo de ação.....	20
Figura 5. Processo de coagulação do leite.....	24

CAPÍTULO III

Figura 1. Força de coagulação de <i>A. oryzae</i> DPUA 1624.....	40
Figura 2. Efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) das proteases de <i>A. oryzae</i>	40
Figura 3. Efeito da temperatura na atividade (A) e na estabilidade (B) das proteases de <i>A. oryzae</i>	41
Figura 4. Efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) coagulante de <i>A. oryzae</i>	42
Figura 5. Efeito da temperatura na atividade (A) e na estabilidade (B) coagulante de <i>A. oryzae</i>	43

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição química dos meios de fermentação.....	28
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1: Atividade proteolítica, Coagulante e Razão Coagulante dos extratos de <i>Aspergillus oryzae</i> DPUA 1624.....	39
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
CAPÍTULO I: REVISÃO LITERARURA.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Morfologia e fisiologia do gênero <i>Aspergillus</i>	16
2.2. <i>Aspergillus</i>	17
2.3. <i>Aspergillus oryzae</i>	18
2.4. As enzimas	19
2.5. Proteases	20
2.5.1. Fontes de Proteases	21
2.6. Produção de proteases por fermentação submersa.....	22
2.7. Coalhos e coagulantes.....	23
2.8. Processo de coagulação do leite.....	24
CAPÍTULO II: OBJETIVOS E METODOLOGIA	
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. METODOLOGIA	28
4.1. Microrganismos.....	28
4.2. Autenticação e manutenção dos microrganismos	28
4.3. Teste de aflatoxina por vapor de amônia em meio sólido.....	28
4.4. Preparação do inóculo	28
4.5. Fermentação submersa	29
4.6. Recuperação do extrato bruto	29
4.7. Métodos de análise enzimática	29
4.7.1. Determinação da atividade de proteases.....	29
4.7.2. Determinação da atividade de coagulação do leite	30
4.8. Caracterização parcial das proteases	31
4.8.1. Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das proteases	31
4.8.2. Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade do coagulante	31
4.9. Análise estatística	31
CAPÍTULO III: Artigo: "EXPLORATION OF THE POTENTIAL OF ANAMORPHIC FUNGUS IN MILK-CLOTTING PRODUCTION/ EXPLORAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGO ANAMÓRFICO NA PRODUÇÃO DE COAGULANTE DO LEITE".....	32
5. CONCLUSÕES GERAIS	49
6. REFERÊNCIAS	50
ANEXOS.....	58

1. INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas em peptídeos e aminoácidos. Essas enzimas desempenham um papel essencial na fisiologia de todos os seres vivos, pois são responsáveis por catalisar diversas reações metabólicas. (RAZZAQ et al., 2019; ALI et al., 2016).

Devido aos obstáculos na obtenção de proteases de origem vegetal e animal, as enzimas de origem microbiana se destacam, apresentando diversas vantagens. Proteases produzidas por microrganismos são obtidas através de processos simples, rápidos e de baixo custo, além de serem, em geral, mais estáveis que as homólogas de plantas e animais (NOVELLI et al., 2016; FREITAS, 2013).

Vários grupos de microrganismos produzem diferentes proteases e, os fungos filamentosos têm sido amplamente empregados, principalmente pelo fato de suas enzimas serem, em sua maioria, extracelulares, o que facilita o processo de extração e recuperação a partir de um meio fermentado (BENSMAIL et al., 2020).

Espécies de fungos filamentosos, como as dos gêneros *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. e *Aspergillus* spp., são conhecidas por sintetizarem proteases coagulantes, as quais costumam ser utilizadas em diversos ramos da indústria, especialmente na alimentícia (PRADO et al., 2021; MAMO et al., 2020; BARZKAR et al., 2018). O processo de obtenção dessas proteases pode envolver técnicas de fermentação e cultivo em meio sólido e líquido (MACHADO et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Nos últimos anos, os coagulantes de origem microbiana têm sido amplamente explorados, representando aproximadamente um terço da produção global de queijos. Esses biocatalisadores oferecem vantagens significativas, como facilidade de produção, obtenção em menor tempo, baixo custo, alto rendimento, elevada capacidade de coagulação do leite, termo estabilidade, maior especificidade, ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética (CHIMBEKUJWO et al., 2020; MAMO et al., 2020; RAZZAQ et al., 2019; BASKAR et al., 2017). Além disso, proteases desempenham um papel fundamental no aprimoramento da qualidade dos produtos, contudo uma diversidade dessas enzimas continua inexplorada (NAEEM et al. 2022).

A identificação de microrganismos com capacidade de sintetizar enzimas coagulantes é uma medida crucial para atender às exigências da indústria alimentícia. No entanto, antes de serem utilizados em larga escala, esses bioprodutos devem passar pela certificação GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), estabelecida

pela *US Food and Drug Administration*, condição que garante a segurança e a adequação desses coagulantes para uso industrial (PATYSHAKULIYEVA, 2021).

No cultivo em meio líquido, também conhecido como fermentação submersa (SmF), o processo ocorre através do crescimento microbiano em um meio aquoso. A utilização dessa técnica traz vantagens significativas para a produção de enzimas, pois permite um melhor controle das condições ambientais, tais como intensidade de luz, temperatura, pH, agitação e a adição de fontes de carbono e nitrogênio (MANAN & WEBB, 2017).

CAPÍTULO I
REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Morfologia e fisiologia do gênero *Aspergillus*

A primeira descrição do gênero *Aspergillus* ocorreu em 1729 pelo Padre Florentino e pelo micologista Pietro Antonio Micheli. O nome dado ao gênero se deve às similaridades estruturais do conidióforo e do *aspergillum*, instrumento litúrgico usado para aspergir água benta na igreja (KLICH, 2002; BENNETT, 2010). Este nome refere-se a um gênero de fungos que se reproduzem exclusivamente por reprodução assexuada (SAMSON; VARGA, 2012).

Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são considerados anamorfos de ascomicetos pertencentes ao Reino *Fungi*, Divisão *Ascomycota*, à ordem *Eurotiales* e, portanto, são caracterizados pela produção de esporos assexuais (KLICH; PITT, 1988). Uma das principais características que distingue as espécies é a coloração das colônias, que pode apresentar tons de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza (KLICH, 2002). Além disso, produzem um conidióforo, com a base normalmente em forma de “T” ou “L” chamada de “célula pé” conectada a uma hifa vegetativa (Figura 1).

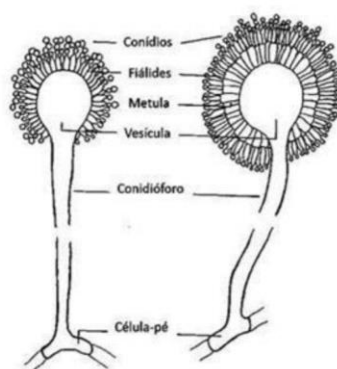


Figura 1. Estruturas características do gênero *Aspergillus*.

Fonte: Klich e Pitt (1988).

O conidióforo, de comprimento variável, tem extremidade dilatada denominada de vesícula, na qual são formadas as metulas e/ou fiáldes. As vesículas são classificadas de uniseriadas, quando há ausência de metula, se há presença de metula são bisseriadas. (KLICH; PITT, 1988; KLICH, 2002; RAPER; FENNEL, 1965; SAMSON; VARGA, 2012).

O gênero *Aspergillus* tem distribuição cosmopolita, comumente ocorre em ambientes de climas quentes e temperados. As espécies podem se desenvolver em condições de altas temperaturas e baixa atividade de água (aw), o que lhes permite adaptar-se em diversos cereais e frutas secas (PITT; HOCKING, 1997).

De acordo com a literatura, *Aspergillus* está representado por aproximadamente 250 espécies do gênero, principalmente na forma anamorfa (reprodução assexuada) e alguns teleomorfos (reprodução sexuada), sendo 40 delas consideradas patógenos oportunistas ao homem (MESQUITA-ROCHA, 2019). O gênero *Aspergillus* é dividido em diversas seções: *Flavi*, *Circundati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candidi*, *Cremeri*, *Sparsi* e *Wentii* (KLICH, 2002).

2.2. *Aspergillus*

Raper e Fennell (1977) mencionaram, preliminarmente, a existência de 132 espécies do gênero *Aspergillus*, as quais foram identificadas com base em características morfológicas e agrupadas em 18 grupos. Posteriormente, Klich e Pitt (1988) realizaram uma classificação do gênero, dividindo-o em seis subgêneros, sendo que cada subgênero continha uma ou mais seções. Nessa classificação, o termo "seção" foi adotado em substituição ao termo "grupo", uma vez que o último não possui relevância no Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICN).

Os fungos do gênero *Aspergillus* estão entre os microrganismos de maior importância econômica (SAMSON et al., 2014), pois podem ser utilizados em diversos processos nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Espécies desse gênero são valorizados principalmente por sua capacidade de produzir uma ampla variedade de enzimas, como beta-glucosidases, endoglucanases e ácidos orgânicos (BENCHEK, 2020; SUBHAN et al., 2020).

Os fungos filamentosos, tais como *Aspergillus* spp., demonstram a capacidade de sintetizar diversas enzimas, incluindo amilase, protease, lipase, fitase, celulase e xilanase, além de serem destacados produtores de ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico e glucônico (FERREIRA et al., 2016). Essa flexibilidade está diretamente relacionada à habilidade desses microrganismos de crescer em diferentes substratos, muitos dos quais de baixo custo, como farelo de trigo, milho, bagaço de cana ou espiga de milho. Isso abre oportunidades para aplicações biotecnológicas voltadas à valorização de resíduos e subprodutos da agroindústria, contribuindo para a otimização dos processos produtivos (SOCCOL et al., 2017).

2.3. *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae, uma espécie do Reino Fungi que tem reprodução assexuada, multicelular aeróbio. Esta espécie é amplamente reconhecida por sua relevância na área biotecnológica. Sendo utilizada nos setores alimentício, industrial, veterinário e farmacêutico. É muito utilizado na indústria alimentícia na produção de alimentos fermentados (missô, shoyu, tane-koji, vinagre, etc) e bebidas alcoólicas, sendo capaz de produzir altas concentrações de proteínas (DABA et al., 2021; YIN et al., 2013).

Notavelmente, o *Aspergillus oryzae* é classificado como seguro, de acordo com o termo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) estabelecido pela *Food and Drug Administration* (FDA). Além disso, este organismo possui a habilidade de sintetizar várias enzimas, incluindo amilase, lipase, celulase, pectinase, entre outras (DABA et al., 2021; GOMI, 2014).

O *A. oryzae* está classificado no grupo *Aspergillus flavus-oryzae*, e suas espécies podem ser diferenciadas de acordo com a morfologia de seus conídios (esporos). Esse fungo demonstra crescimento vigoroso e rápido em vários meios de cultura, com destaque em PDA (Potato Dextrose Agar). Sua faixa de crescimento ótimo ocorre a temperaturas entre 32-36 °C. Além disso, a faixa de pH adequada para germinação e crescimento do *A. oryzae* varia entre 5,0-6,0, mas o fungo pode germinar em um intervalo de pH mais amplo, entre 2,0-8,0 (DABA et al., 2021).

Quando cultivado em ágar Czapeck com Extrato de Levedura, *A. oryzae* forma inicialmente micélio de coloração branca e, posteriormente, com a formação dos esporos, esse micélio torna-se de coloração amarelo-esverdeado (GOMI, 2014; RAPPER; FENNELL, 1965) (Figura 2).

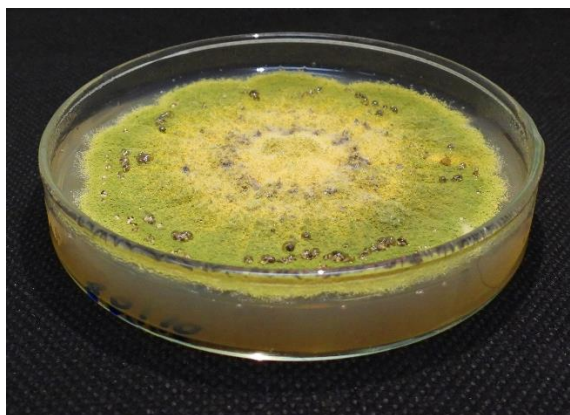


Figura 2: Características macroscópicas da colônia de *A. oryzae*.
Fonte: autor.

Quando observado sob microscópio (Figura 3), *A. oryzae* exibe características distintas, tais como micélio septado, conidióforo, vesícula radiada a colunar, predominantemente uniseriada, que formam conídios em cadeias com parede lisa e finamente rugoso. Seus conidióforos são de comprimento significativo, originando-se a partir do substrato, possuindo paredes de textura rugosa (BENCHEK, 2020; KLICH; PITT, 1988).

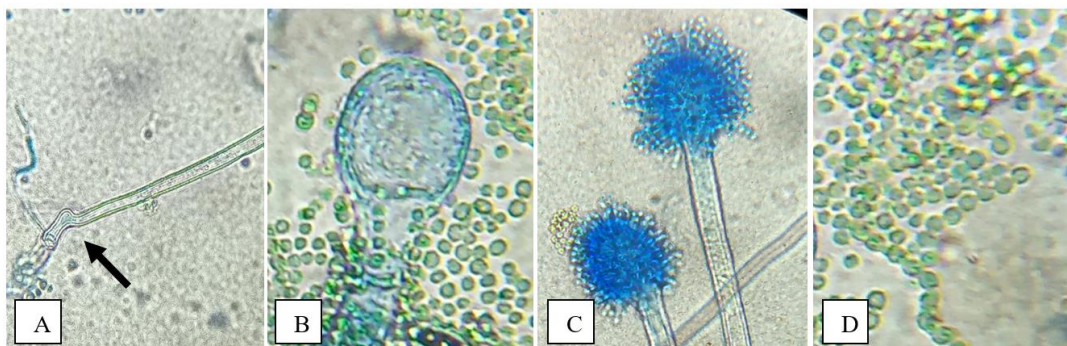


Figura 3: Características micromorfológicas de *A. oryzae* DPUA 1624. (A – célula-pé e conidióforo; B – vesícula na forma piriforme; C – métulas e fíalides e D – conídios.
Fonte: autor.

2.4. As enzimas

As enzimas são proteínas com capacidade catalítica, sendo altamente eficientes na conversão de substratos em produtos específicos, em diversos ambientes. Há séculos, esses biocatalisadores desempenham um papel fundamental em diversos processos, como produção de cerveja, panificação e fabricação de álcool. Estes aceleram reações químicas, demonstrando versatilidade, especificidade estereoespecífica e desempenhando um papel importante nos avanços da biotecnologia (BENMRAD et al., 2019).

Segundo Homaei et al. (2016), as enzimas são classificadas como endoenzimas ou exoenzimas, com base em seu modo de ação, conforme definido pela Comissão de Enzimas em 1967. Dependendo da reação catalisada, são agrupadas em seis categorias: óxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Quanto à localização, podem ser extracelulares, secretadas para o meio, ou intracelulares, retidas no interior das células microbianas (HUANG et al., 2020).

A produção de enzimas extracelulares ocorre durante a fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária, enquanto as enzimas intracelulares são sintetizadas durante o crescimento na fase estacionária e apenas liberadas no meio através da lise celular, que ocorre na fase estacionária ou na fase de declínio (DENG et al., 2018).

As enzimas obtidas por meio de processos fermentativos têm sido extensivamente pesquisadas e amplamente utilizadas em todo o mundo. Até o momento, estima-se que existam cerca de 3.000 enzimas identificadas, porém apenas cerca de 60 delas possuem aplicações industriais (PAPADAKI et al., 2020). A aplicação industrial das enzimas é determinada por critérios como atividade, especificidade, estabilidade de armazenamento, disponibilidade e custos. A atividade enzimática é influenciada pela concentração da enzima e do substrato, concentração de cofatores, presença, concentração e tipos de inibidores, potencial iônico, pH, temperatura e tempo de reação (DABAJA et al., 2019).

2.5. Proteases

As proteases são enzimas responsáveis pela catálise da hidrólise das ligações peptídicas, resultando na degradação de proteínas e peptídeos, com diferentes graus de especificidade (BENMRAD et al., 2019).

As enzimas proteolíticas são classificadas em dois amplos grupos: as exopeptidases e as endopeptidases (Figura 4). As exopeptidases atuam na quebra das ligações peptídicas localizadas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas, sendo denominadas aminopeptidases ou carboxipeptidases. Por outro lado, as endopeptidases têm preferência por hidrolisar ligações peptídicas em regiões internas das cadeias polipeptídicas. Além disso, as endopeptidases podem ser subdivididas de acordo com seu mecanismo catalítico em aspártico, cisteína, glutamato, malato, serina e treonina proteases (MURI et al., 2014).

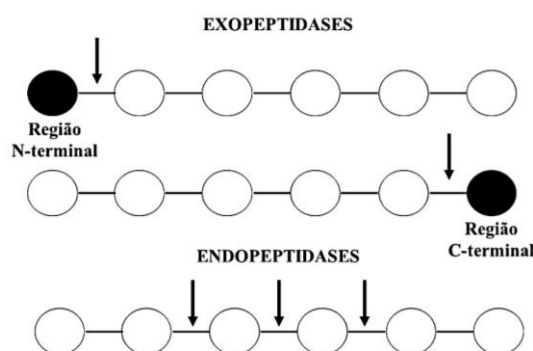


Figura 4. Classificação das proteases quanto ao mecanismo de ação.
Fonte: Prado, 2021.

As proteases foram as primeiras enzimas exploradas economicamente devido às suas atividades e propriedades. O mercado mundial de biocatalisadores, estimado em US\$ 14,9 bilhões a partir de 2020, as enzimas proteolíticas representam até 75%

de uso nas indústrias (BATISTA et al., 2021). As proteases são utilizadas em diversos setores, como na indústria de alimentos para amaciar carnes, na indústria farmacêutica para desenvolvimento de medicamentos, na indústria de limpeza para potencializar detergentes, na indústria de couros para remoção de pelos, e no ramo da estética para procedimentos de peeling (PATYSHAKULIYEVA, 2021).

A presença das proteases em diversos ramos industriais ilustra sua relevância e versatilidade. Essas enzimas desempenham um papel crucial na otimização de processos produtivos, melhoria de produtos e desenvolvimento de soluções inovadoras. O contínuo avanço científico e tecnológico nessa área impulsiona a evolução das proteases, ampliando suas aplicações em novos setores e contribuindo para o progresso da indústria e o desenvolvimento de produtos mais eficientes (PATYSHAKULIYEVA, 2021).

De acordo com Patyshakuliyeva (2021) as enzimas proteolíticas microbianas são frequentemente produzidas de forma extracelular por meio de processos fermentativos. Um amplo grupo de microrganismos é capaz de sintetizar proteases durante a fermentação, o que as torna aplicáveis em diversos setores industriais.

2.5.1. Fontes de Proteases

As proteases são enzimas ubíquas encontradas em uma ampla variedade de organismos, incluindo animais, plantas e microrganismos. Devido à sua presença em diversos eventos biológicos, as proteases de origem animal e vegetal são frequentemente encontradas nos tecidos e fluidos corporais desses organismos, bem como em produtos derivados deles. Exemplos de proteases animais podem ser encontrados nas peçonhas de serpentes, no corpo de crustáceos e no trato digestivo de peixes (NEUMANN et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020; LIU et al., 2019).

A utilização de animais como fontes de proteases pode apresentar desvantagens, pois pode envolver o sacrifício dos animais e requer a aprovação de comitês de ética para a obtenção das enzimas. No entanto, essa abordagem pode ser benéfica no aproveitamento de resíduos sólidos gerados por certas indústrias, como a pesqueira, onde estudos têm demonstrado o uso de vísceras de peixes como fonte de proteases (SILVA et al., 2021). Diversas enzimas proteolíticas, como pepsina, tripsina e quimiotripsina, já foram identificadas, extraídas e utilizadas a partir do sistema digestivo de animais (GURUMALLESH et al., 2019).

Em plantas, as proteases geralmente são detectadas em tecidos sementes e látex. A obtenção dessas enzimas vegetais requer conhecimento especializado em manejo de plantas, além de depender de fatores ambientais, como clima, umidade,

temperatura e sazonalidade. Essa dependência de condições ambientais torna os processos de extração mais complexos, demorados e sujeitos a variações (MUSIDLAK et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Diante das características relacionadas à obtenção de proteases de animais e plantas, os microrganismos têm se mostrado uma fonte mais econômica e rápida. A produção de proteases por microrganismos é frequentemente realizada por meio de processos fermentativos, nos quais é necessária apenas uma fonte de substrato e condições adequadas para o crescimento do microrganismo e a produção das biomoléculas desejadas. Essas condições podem ser facilmente controladas durante a fermentação, proporcionando maior eficiência do bioprocessamento. Pesquisas científicas têm relatado a produção bem-sucedida de proteases a partir de fungos, bactérias e cianobactérias (ELLEUCH et al., 2021; OSMOLOVSKIY et al., 2021; SHAFIQUE et al., 2021).

As proteases microbianas estão entre as hidrolases mais importantes e têm sido largamente estudadas. A maior parte das enzimas produzidas por bactérias são classificadas como neutras e alcalinas, principalmente aquelas obtidas por espécies do gênero *Bacillus* (SOUZA et al., 2015).

Os fungos produzem uma maior variedade de enzimas do que as bactérias, com destaque para os 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 apresenta vantagens quando comparadas a produção por bactérias, tais como: o micélio pode ser mais facilmente removido, dispensando o uso de técnicas caras de filtração (SOUZA, et al., 2015). Outra vantagem dos fungos é que são usualmente apontados como organismos GRAS (geralmente reconhecidos como seguros) (SHIH; UMANSKY, 2020).

2.6. Produção de proteases por fermentação submersa

Os processos de produção de enzimas por microrganismos ocorrem principalmente em cultivos submersos e em estado sólido, sendo os cultivos submersos os mais utilizados na indústria. A natureza da fermentação, seja sólida ou submersa, influencia em vários aspectos do crescimento do microrganismo e na produção de enzimas (GMOSER et al., 2019).

A fermentação submersa (SmF) é uma técnica amplamente empregada na produção de enzimas, em que as células produtoras se desenvolvem em meio de cultivo com excesso de água e são agitadas. Durante esse processo, parâmetros

operacionais como pH, temperatura, consumo de oxigênio e formação de dióxido de carbono são controlados e monitorados. Aproximadamente 90% das enzimas industriais são produzidas por meio da fermentação submersa. Essa abordagem apresenta vantagens notáveis, incluindo a facilidade de separação de biomassa, exopolissacarídeos e enzimas de interesse comercial do meio de cultivo (RIBEIRO et al., 2015; BELMESSIKH et al., 2013; SINGHANIA et al., 2010).

No cultivo em meio líquido, a escolha de diferentes substratos resulta em atividades proteolíticas distintas. Substratos simples, como caseína e gelatina, fornecem baixa produção de unidades enzimáticas, enquanto substratos mais complexos, como farelo de soja e farelo de trigo, levam a atividades proteolíticas mais elevadas. Além disso, a suplementação do meio de cultivo com fontes ricas em nitrogênio e glicose demonstrou aumentar a produção de proteases (GMOSER et al., 2019).

2.7. Coalhos e coagulantes

O coalho animal, é obtido a partir do estômago de bezerros e tem a quimosina como seu componente principal (HELLMUTH; BRINK, 2013). Entretanto, devido ao seu custo elevado e às preocupações éticas relacionadas ao uso de animais, o uso desse tipo de coalho é indesejado em alguns mercados (ALECRIM et al., 2014; HELLMUTH & BRINK, 2013).

Uma alternativa ao coalho animal é o uso de coagulante de origem microbiana, sendo a protease aspártica de *Mucor miehei* a principal enzima utilizada atualmente. Além disso, enzimas de *M. pusillus* e *Endothia parasitica* também são empregadas na produção de diferentes produtos lácteos (LEITE JÚNIOR et al., 2022).

As proteases coagulantes provenientes de fontes microbianas são sintetizadas por microrganismos, como bactérias (HANG et al., 2016; KARTHIKEYAN et al., 2018) e fungos (BENSMAIL et al., 2020; CHINMAYEE et al., 2019; MAMO et al., 2020). Essas enzimas microbianas têm sido extensivamente estudadas, purificadas e clonadas, com o objetivo de sua aplicação comercial na indústria de alimentos, substituindo o coalho animal na fabricação de queijos, cervejas e outros produtos (SATHYA et al., 2009).

No entanto, os coagulantes de fontes microbianas como alternativas ao coalho apresentam algumas limitações, como menor especificidade, o que resulta em rendimentos reduzidos e possível sabor amargo ou perda de sabor indesejada em determinados tipos de queijo (SINGH et al., 2016; VISHWANATHA et al., 2010;

PREETHA & BOOPATHY, 1997). No entanto, existem técnicas disponíveis para mitigar o sabor amargo de hidrolisados proteicos (SHARMA et al., 2019).

2.8. Processo de coagulação do leite

O leite apresenta-se como uma emulsão líquida constituída de duas fases: contínua e descontínua. A fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura (BEUX et al., 2017). O início da fabricação de queijos envolve a coagulação das caseínas do leite, por enzimas proteolíticas coagulantes ou pela acidificação (GOMES, et al., 2019).

Os agentes coagulantes são classificados de acordo com sua especificidade, pois uma elevada atividade proteolítica pode acarretar a quebra excessiva ou não das proteínas dos queijos que compromete a consistência e ainda propicia o desenvolvimento de gosto amargo, devido à liberação de pequenos peptídeos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos os quais podem interagir com receptores de amargor na cavidade oral (BEUX et al., 2017).

O coalho possui a capacidade de hidrolisar a cadeia de aminoácidos rompendo a κ -caseína especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). As duas partes resultantes são a para- κ -caseína insolúvel (resíduos de aminoácidos de 1 a 105 (Figura 5), que formará o paracaseinato de cálcio) que permanece associada à micela de caseína e um peptídeo solúvel (glicomacropéptido; resíduos 106 a 169) (GOMES, et al., 2019).

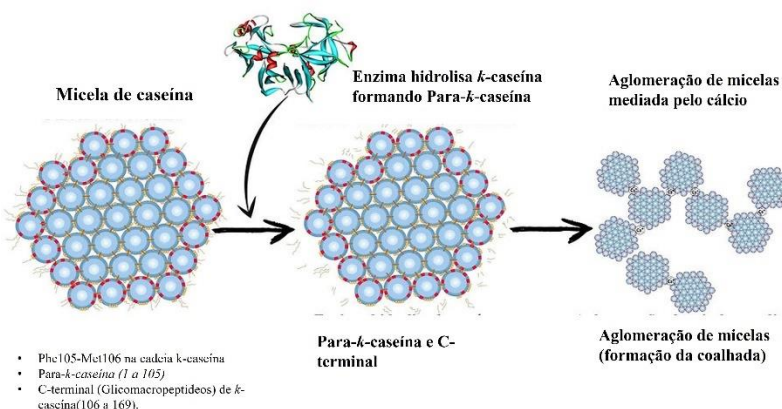


Figura 5. Processo de coagulação do leite.
Fonte: Adaptado de Walstra (1999).

A hidrólise enzimática que ocorre na produção do queijo resulta na remoção ou dissociação da κ -caseína da superfície das micelas, eliminando a estabilidade eletrostática e estérica da superfície micelar e aumentando a hidrofobicidade de superfície (BEUX et al., 2017), com isso, a para- κ -caseína não mais estabiliza a

estrutura micelar e as frações alfa e beta podem precipitar, na presença de cálcio, formando o coágulo, onde a gordura fica retida e o soro formado é expulso pelo processo de sinérese (PENAS, 2018). A consistência do gel é aumentada gradativamente, à medida que aumenta a rigidez dos retículos de caseinato de cálcio, culminando a um ponto ideal, em função da elasticidade requerida na massa para queijos (PENAS, 2018).

O cálcio ajuda na coagulação por criar condições isoelétricas e por agir como uma ponte entre as micelas (MERHEB-DINI et al., 2010), porém, quando sua concentração é baixa a coagulação é lenta e o coágulo é fraco, todavia em concentrações adequadas o cálcio e o fósforo tornam o coágulo mais compacto, flexível, elástico, impermeável e contrátil, condições estas que permitem à massa do queijo suportar as forças mecânicas durante o processo de fabricação (GOMES, et al., 2019).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E METODOLOGIA

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo investigar a produção de proteases coagulantes extracelulares de uma espécie de fungo filamentoso para futura aplicação na indústria de laticíneos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade e proceder a autenticação com base nas características macromorfológicas e micromorfológicas de *Aspergillus oryzae* DPUA 1624;
- Verificar a produção de micotoxinas em meio sólido;
- Selecionar um meio de cultivo para produção de proteases coagulantes extracelulares;
- Proceder a caracterização bioquímica das proteases coagulantes de atividade significativa sintetizadas pela espécie de *Aspergillus oryzae* DPUA 1624.

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismos

Neste estudo foi analisado *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 cedido do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. A cultura matriz foi reativada 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 (PRADO et al., 2021; KLICH; PITT, 1988).

A espécie está implementada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob cadastro de acesso Nº A0A6957.

4.2. Autenticação e manutenção dos microrganismos

A verificação da viabilidade da espécie e pureza da colônia foram realizadas com base nas características macro e micromorfológicas. Para autenticação dessa espécie foi realizado cultivo 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 por 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.

4.3. Teste de aflatoxina por vapor de amônia em meio sólido

O teste de aflatoxina foi realizado de acordo com o método relatado por Alecrim et al. (2017). A produção de micotoxina foi confirmada pela mudança de cor do reverso da colônia no meio de cultura sólido. Três meios diferentes foram usados para determinar a mudança de cor: extrato de levedura-sacarose (YES), Czapek (CZ) e extrato de levedura Czapek (CYA). Em cada meio foi inoculado, centralmente, um disco micelial retirado de cultura com quatro dias de cultivo. Os cultivos foram mantidos por 7 dias, a 25°C. Em cada colônia foi adicionado 0,2 mL de solução de amônia 25% (p/v), na tampa da placa de Petri, em posição invertida. A mudança de cor da colônia foi observada pelo reverso de cada cultura. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4. Preparação do inóculo

Como inóculo foi utilizada cultura de *A. oryzae* em meio CYA, em tubo de ensaio, obtidas a 25 °C por sete dias. Cada suspensão celular foi homogeneizada em

agitador de tubo e a densidade óptica foi ajustada para 0,5 abs a 600 nm (equivalente a 10^6 esporos/mL de meio) (FUJITA et al., 1994).

4.5. Fermentação submersa

Os bioprocessos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL dos meios CYA (Czapek Yeast Extract), SAB (Extrato de Sabouraud), GYP (Glicose, Yeast Extract, Peptona), Tabela 1, previamente, os meios de fermentação foram esterilizados 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 orbital New Brunswick Scientific®, a 30 °C, 180 rpm, por 72 horas (PRADO et al., 2021).

Tabela 1. Composição química dos meios de fermentação.

Meios	Composição (g/L)	pH meio de fermentação
CYA	Fosfato de potássio dibásico...1,0 g	6,3
	Extrato de levedura.....5,0 g	
	Czapek concentrado.....10 mL	
	Sacarose.....30 g	
GYP	Glicose.....20 g	5,6
	Peptona.....15 g	
	Extrato de levedura.....5 g	
SAB	Glicose.....20 g	5,6
	Peptona.....10 g	

4.6. Recuperação do extrato bruto

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

4.7. Métodos de análise enzimática

4.7.1. Determinação da atividade de proteases

A determinação da atividade das proteases foi de acordo com Leighton et al. (1973), utilizado o substrato 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 (TCA) 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 hidróxido de sódio (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 absorvância igual a 0,1 em 60 minutos. O extrato com atividade de proteases significativa será caracterizado parcialmente quanto às suas propriedades bioquímicas.

4.7.2. 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 CaCl₂ 0,05M, pH 5,8 (MARTIM et al., 2021). Dessa solução foi transferido 5 mL para cada tubo reação, 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 será 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) (MARTIM et al., 2021). 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 serão realizados em triplicata.

A atividade coagulante (U) foi calculada de acordo com a Equação 1, e a razão coagulante (R) conforme a Equação 2.

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

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. Consta

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

4.8. Caracterização parcial das proteases

4.8.1. 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 (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.*, 2021).

4.8.2. Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade do coagulante

Para determinação do pH de atividade ótima do coagulante, foram elaboradas soluções de leite desnatado 10% (p/v) nos seguintes tampões 0,1 M: acetato de sódio (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10). Na avaliação da estabilidade ao pH, o extrato enzimático foi diluído em cada tampão (1:1, v/v), a 25 °C, por vinte quatro horas. Todas as reações e o branco foram conduzidos posteriormente de acordo com a metodologia descrita por Martim *et al.* (2021).

Nos ensaios de avaliação do efeito da temperatura na atividade coagulante, o extrato enzimático e a solução de leite foram incubados na faixa de 30 °C a 80 °C, durante 40 minutos. No teste de estabilidade à temperatura, os extratos foram incubados em temperaturas de 30 °C a 80 °C, por uma hora. Posteriormente, esses extratos foram misturados com solução de leite, observando a formação de coágulos na parede do tubo de ensaio. Os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos (MARTIM *et al.*, 2017).

4.9. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, os resultados submetidos a análise estatística de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o programa Minitab, versão 18.0.

CAPÍTULO III

Artigo: “EXPLORATION OF THE POTENTIAL OF ANAMORPHIC FUNGUS IN MILK-CLOTTING PRODUCTION/ EXPLORAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGO ANAMÓRFICO NA PRODUÇÃO DE COAGULANTE DO LEITE”

Submetido na revista científica:

HOLOS - Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN).

DOI: 10.15628

Qualis CAPES A1

EXPLORATION OF THE POTENTIAL OF ANAMORPHIC FUNGUS IN MILK-CLOTTING PRODUCTION

A. C. V. BARROS*, S. C. P. BATISTA, A. K. P. DE BRITO, T. S. CABRAL, T. C. ALARCÓN & M. F. S. TEIXEIRA

Universidade Federal do Amazonas

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2167-7382>*acristinavb@gmail.com*

Submitted October 16, 2023 - Accepted xx xx, 2023

DOI: 10pts.15628/holos.2023.XXXX

ABSTRACT

The search for milk-clotting enzymes has been driving the discovery of new renewable sources with potential applications in cheese production. This study aimed to evaluate the production and characterize coagulants produced by *Aspergillus oryzae* DPUA 1624. The species was cultivated in liquid media: Glucose, Yeast Extract, and Peptone; Sabouraud Extract, and Czapek Yeast Extract. To determine protease and coagulant activity, 1% azocasein and 10% skim milk (w/v) were used as substrates,

respectively. The enzymatic extract was characterized regarding the effect of optimal pH and temperature, as well as the stability of both. *Aspergillus oryzae* secreted proteases in all tested media, with significant activity in Czapek Yeast Extract (17,33 U/mL). The proteases exhibited optimal activity at pH 6,0 at 50°C. Coagulant activity was determined only in the Czapek Yeast Extract medium (30,89 U), with optimal activity at pH 5,0 at 50°C.

KEYWORDS: Enzymes, Proteases, Milk-clotting, *Aspergillus* sp.

EXPLORAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGO ANAMÓRFICO NA PRODUÇÃO DE COAGULANTE DO LEITE

RESUMO

A busca por enzimas que coagulam o leite tem impulsionado a descoberta de novas fontes renováveis com potencial aplicação na produção de queijos. Este estudo teve como objetivo avaliar a produção e caracterizar coagulantes produzidos por *Aspergillus oryzae* DPUA 1624. A espécie foi cultivada nos meios líquidos: Glicose, Extrato de Levedura e Peptona; Extrato de Sabouraud e Czapek Extrato de Levedura. Para determinação da atividade das proteases e coagulante, foi utilizado como substrato azocaseína 1% e leite

desnatado 10% (p/v), respectivamente. O extrato enzimático foi caracterizado quanto ao efeito do pH e temperatura ótima, e estabilidade de ambos. *Aspergillus oryzae* excretou proteases em todos os meios testados, com atividade significativa em Czapek Extrato de Levedura (17,33 U/mL). As proteases apresentaram atividade ótima em pH 6,0 a 50°C. A atividade coagulante foi determinada apenas no meio Czapek Extrato de Levedura (30,89 U), com atividade ótima em pH 5,0, à 50°C.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas, Proteases, Coagulação do leite, *Aspergillus* sp.

1. INTRODUÇÃO

Proteases ou peptidases catalisam reações hidrolíticas, desempenham papel de destaque nos setores têxtil, farmacêutico, detergentes, cosmético e alimentício. Comercialmente essas enzimas representam 75% do volume total de vendas a nível global (BATISTA et al., 2021; FASIM et al., 2021; BARZKAR et al., 2018;). As peptidases são divididas em endopeptidases e exopeptidases, com base na posição da ligação peptídica a ser clivada. E de acordo com o pH de atividade máxima são classificadas, em proteases ácidas (pH 2,0 a 6,0), neutras (pH 6,0 a 8,0) e alcalinas (pH 8,0 a 13,0) (SOUZA et al. 2015).

Em função da participação em diversos eventos biológicos, proteases ocorrem em diversos organismos, animais, vegetais, bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Todavia, os biocatalisadores de origem fúngica oferecem vantagens distintas quando comparadas aos demais seres vivos, em termos da facilidade do processamento, envolvimento do baixo custo energético e ainda demonstram maior eficiência (CARDOSO et al. 2022; NASCIMENTO et al., 2021). Além dessas propriedades, predominam os fungos que são cultiváveis em larga escala, fisiologicamente expressam diversas características bioquímicas e tecnológicas favoráveis para uso industrial (BARBOSA et al., 2020).

Na indústria de alimentos, as proteases são usadas na fabricação de vinho, cerveja, vinagre, panificação, laticínios e amaciamento de carne (DENTI et al., 2022; NASCIMENTO et al., 2021). Entre essas enzimas, as proteases coagulantes ou coagulantes são usadas na produção de queijo em substituição a renina (WEHAIDY et al., 2023). Na produção de queijo os coagulantes fazem a clivagem entre as partes hidrofóbicas e hidrofílicas da *K*-caseína sem causar efeito negativo no rendimento e na propriedade organoléptica do queijo. Os queijos são fontes de proteínas, cálcio, magnésio e vitaminas (BILYI et al., 2022).

Entre as espécies de fungos, *Aspergillus* vêm se destacando como fontes naturais e renováveis de proteases coagulantes do leite bovino. *A. flavo furcatis* (ALECRIM et al., 2017), *A. melleus* (PRADO et al., 2021), *A. tamarii* (SADIYA, 2022) e *A. niger* (LOMBARDI et al., 2019) sintetizam coagulantes com características bioquímicas para uso na produção de queijo. Mamo et al. (2020), cita que *Aspergillus oryzae* é uma espécie que produz proteases com potencial industrial, tornando-se uma nova alternativa para biossíntese de enzimas coagulantes do leite.

Durante tecnologia de transformação do leite em queijo as enzimas participam da biotransformação dos componentes do leite em compostos que influenciam nas características organolépticas do produto (BILYI et al., 2022). Com base na importância dos coagulantes de origem microbiana este estudo teve como objetivo avaliar a produção de proteases e coagulante por *A. oryzae* DPUA 1624.

2. METODOLOGIA

2.1 Microrganismo

Neste estudo foi analisada a espécie *Aspergillus oryzae* DPUA 1624, cedida do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. A cultura matriz foi reativada em ágar CYA [Czapek 0,5% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placa de Petri a 25 °C por sete dias (KLICH & PITT, 1988; PRADO et al., 2021).

2.2 Autenticação e manutenção dos microrganismos

A verificação da viabilidade da espécie foi realizada com base nas características macro e micromorfológicas. Para a autenticação dessa espécie, foi realizado o cultivo em Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA), Ágar Czapek (CZ) e Ágar Extrato de Malte (MEA), em placas de Petri a 25 °C por sete dias (KLICH e PITT, 1988; RAPER e FENNELL, 1977).

2.3 Teste de aflatoxina por vapor de amônia em meio sólido

O teste de aflatoxina foi realizado de acordo com Alecrim et al. (2017). Foram utilizados três meios: Ágar Extrato de Levedura, Sacarose (YES); Ágar Czapek (CZ); e Ágar Extrato de Levedura Czapek (CYA). Em cada meio, foi inoculado, centralmente, um disco micelial retirado de cultura com quatro dias, mantidos a 25 °C por sete dias. Para a leitura, foi utilizada a solução de sulfato de amônia 25% (p/v). A mudança de cor da colônia foi observada pelo reverso de cada cultura. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4 Preparação da suspensão celular de esporos

Para a preparação da suspensão celular de esporos foram utilizadas culturas de *A. oryzae* em meio CYA, em tubo de ensaio, obtidas a 25 °C, por sete dias. Cada suspensão celular foi homogeneizada em agitador de tubo e a densidade óptica dessa suspensão foi então ajustada para 0,5 abs a 600 nm (equivalente a 10⁶ esporos/mL de meio) (FUJITA et al., 1994).

2.5 Fermentação submersa

Para o cultivo submerso foram utilizados três meios de cultura líquida: Extrato de Levedura Czapek (CYA); Extrato de Sabouraud (SAB); Glicose, Extrato de Levedura e Peptona (GYP). Para cada 50 mL de meio, em cada frasco Erlenmeyer de 125 mL foi inoculada uma suspensão de esporos equivalente a 10⁶ esporos/mL. A fermentação foi conduzida a 30 °C, 180 rpm por 72 horas (PRADO et al., 2021).

2.6 Recuperação do extrato bruto

Após 72h, a biomassa foi separada por filtração sob vácuo em papel filtro Whatman N.º 1. Posteriormente, as amostras de extrato foram novamente filtradas utilizando membrana éster de celulose (0,45 µm).

2.7 Determinação da atividade de proteases

A determinação da atividade das proteases foi de acordo com Leighton et al. (1973), utilizando o substrato de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl e 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. Uma unidade de atividade proteolítica (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual ou superior a 0,1 abs, em 60 minutos.

2.8 Determinação da atividade de coagulação do leite

A atividade coagulante do leite foi determinada de acordo com Arima et al. (1970). Foi utilizado leite desnatado 10% (p/v) (Itambé, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) diluído em CaCl₂ 0,05M, pH 5,8. Foram transferidos 5 mL de solução para cada tubo reação, seguindo com a incubação, 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 a 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). 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 (U) foi calculada de acordo com a Equação (1), e a razão coagulante (R) conforme a Equação (2).

$$\text{Equação 1} - U = \frac{2400 \times S}{T \times E} \quad (1)$$

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.

$$\text{Equação 2} - R = \frac{\text{atividade coagulante}}{\text{atividade proteolítica}} \quad (2)$$

2.9 Caracterização parcial das proteases

2.9.1 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 (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 10,0) 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 a 80 °C (MARTIM et al., 2021). 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., 2021).

2.9.2 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade do coagulante

Para determinação do pH de atividade ótima do coagulante, foram elaboradas soluções de leite desnatado 10% (p/v) nos seguintes tampões 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 10,0). Na avaliação da estabilidade ao pH, o extrato enzimático foi diluído em cada tampão (1:1, v/v), a 25 °C, por 1 hora. Todas as reações e o controle foram conduzidos posteriormente, de acordo com a metodologia descrita por Martim *et al.* (2021).

Nos ensaios de avaliação do efeito da temperatura na atividade coagulante, o extrato enzimático e a solução de leite foram incubados na faixa de 25 a 60 °C, durante 40 minutos. No teste de estabilidade à temperatura, os extratos foram incubados em temperaturas de 25 a 60 °C, por uma hora. Posteriormente, esses extratos foram adicionados a solução de leite, observando a formação de coágulos na parede do tubo de ensaio. Os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos (MARTIM et al., 2021).

2.10 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, os resultados foram submetidos à análise estatística de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o programa Minitab, versão 18.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Autenticação de *A. oryzae* DPUA 1624

Os resultados do processo de autenticação em ágar Czapek (CZ), ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) e ágar Malte (MEA), *A. oryzae* DPUA 1624 expressou viabilidade e as características macro e micromorfológicas típicas da espécie (KLICH E PITT, 1988; RAPER E FENNEL, 1977).

3.2 Teste de aflatoxinas por vapor de amônia

A. oryzae DPUA 1624 não produziu aflatoxina nos meios testados, resultado evidenciado pela ausência da mudança de cor no reverso da colônia. De acordo com He et al. (2019), *A. oryzae* foi categorizado como "Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS)" pela *Food and Drug Administration* (FDA), e sua segurança foi endossada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), dados que corroboram com o presente estudo.

3.3 Seleção de meio de cultura para produção de coagulantes

A Tabela 1 apresenta os dados referentes à atividade de proteases, coagulante e razão coagulante de enzimas sintetizadas por *A. oryzae* DPUA 1624 em cultivo submerso. O valor significativo da atividade proteolítica foi determinado em CYA (17,33 U/mL). Em um estudo similar realizado por Prado et al. (2020) foi verificado que *A. oryzae* DPUA 541 expressou atividade significativa (32 U/mL) no cultivo realizado em Solução de Manachini adicionada de gelatina, como substrato indutor.

Com relação à atividade coagulante (Tabela 1), essas enzimas foram detectadas somente em CYA (30,89 U), que foi um resultado superior ao encontrado para *A. oryzae* DPUA 541, quando cultivados em solução Manachini (19,74 U). *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 também sintetizou proteases coagulantes (13,30 U) (PRADO et al., 2021). Em estudo similar feito por Vishwanatha et al. (2010), utilizando farelo de trigo, resultou em valores significativos de coagulante (40,0 U).

Tabela 1: Atividade proteolítica, Coagulante e Razão Coagulante dos extrato de *Aspergillus oryzae* DPUA 1624.

Meio de fermentação	Atividade de proteases (U/mL)	Atividade coagulante (U)	Razão coagulante (R)
CYA	17,33±0,87 ^a	30,89±1,92 ^a	1,94±0,58 ^a
GYP	8,93±0,12 ^b	ND±0,0 ^{b*}	ND±0,0 ^{b*}
SAB	2,44±0,12 ^c	ND±0,0 ^{b*}	ND±0,0 ^{b*}

*ND = não detectado. CYA (Extrato de Levedura Czapek); GYP (Glicose, Extrato de Levedura, Peptona); SAB (Extrato de Sabouraud). Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo método de Tukey ($p < 0,05$)

Nas condições avaliadas, a razão coagulante (R) em CYA foi igual a 1,94, valor viável para processo de coagulação do leite bovino. A razão é um índice usado para justificar a adequabilidade de um extrato enzimático para uso como substituto de coalho, ou seja, justifica o aproveitamento do extrato como substituto de renina ($R > 1$) (HASHIM, 1999).

Alecrim et al. (2017), analisou a síntese de coagulante em bioprocesso otimizado por *A. flavo furcatis* e os resultados da razão coagulante foram superiores ao obtido no presente estudo, nos cultivos em Caldo Batata e Caldo de Sabouraud.

Tratando-se de fontes alternativas ao coalho tradicional, a razão coagulante é um parâmetro relevante, pois reflete a quantidade significativa de enzimas com ação coagulante específica sobre a caseína do leite (TROCH et al., 2017). A seleção de fontes de coagulantes que tenham a capacidade desejada para a coagulação do leite assegura a eficiência do processo de produção de derivados lácteos, como queijos (TILOCCA et al., 2020).

A aplicação de proteases com uma baixa razão coagulante acarreta na produção de queijos com reduzido rendimento e sabor amargoso, atributos indesejáveis na indústria de queijo (ALJAMMAS et al., 2018).

A figura 1 expressa a força da coagulação das proteases coagulantes. Foi observado que o meio CYA sintetizou enzimas proteolíticas com forte coagulação (presença de coágulo distinto e soro abundante), entretanto, nos meios SAB e GYP não foram detectados atividade coagulante (sem formação de coágulo).

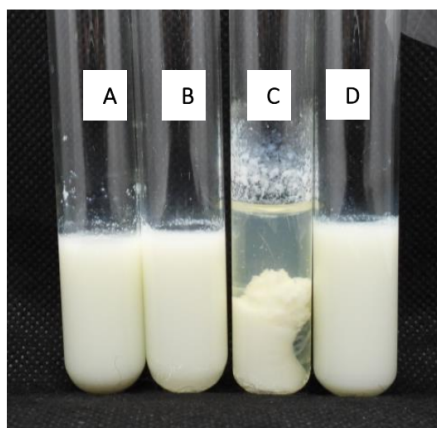


Figura 1: - Força de coagulação de *A. oryzae* DPUA 1624 (A - GYP, B - SAB, C - CYA e D- controle).

3.4 Caracterização bioquímica da atividade enzimática de *A. oryzae* DPUA 1624

3.4.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das proteases

O efeito do pH na atividade e estabilidade das proteases de *A. oryzae* DPUA 1624 é apresentado na Figura 2. Sob as condições avaliadas, as enzimas proteolíticas de *A. oryzae* DPUA 1624 demonstraram atividade em todas as faixas de pH testadas. No entanto, a atividade significativa foi observada em pH 6,0 (Figura 2A), indicando a presença de uma protease levemente ácida (NITU et al., 2021). À medida que o pH aumentou, a atividade catalítica da enzima diminuiu, e em pH 10, apresentou uma redução de 37,72% de atividade proteolítica. Isso evidencia que o pH é um fator crucial para avaliar o desempenho das proteases e sua eficácia.

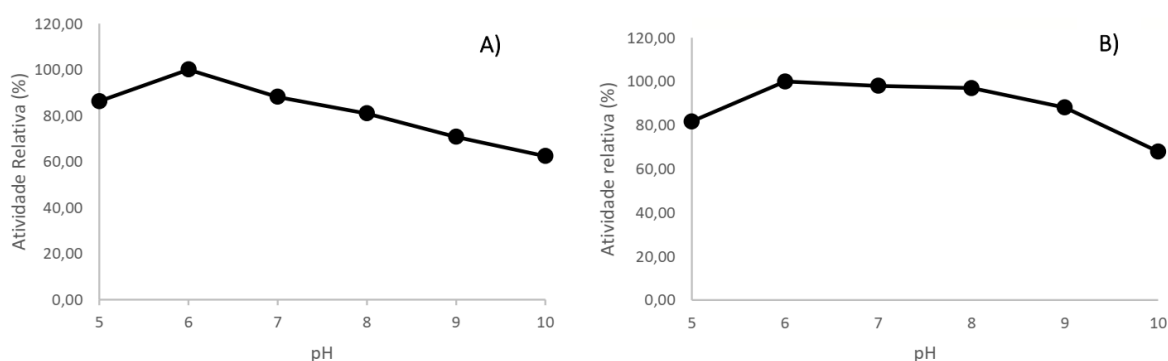


Figura 2: Efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) das proteases de *A. oryzae*.

Os resultados obtidos por Prado et al. (2021) para as proteases de *A. oryzae* mostraram similaridade com os deste estudo. Também foram encontradas condições ótimas de atividade em

pH 5,0. Esses resultados sugerem que as proteases de *A. oryzae* podem ter propriedades vantajosas e aplicabilidade em diferentes sistemas de cultivo, reforçando seu potencial industrial em diversas aplicações biotecnológicas. Usman et al. (2021) investigaram *Aspergillus sp.*, observando sua atividade máxima em pH 5,0, também em consonância com os resultados desta pesquisa. Proteases ácidas são amplamente empregadas na indústria de alimentos para a produção de molhos, hidrolisados proteicos, clarificação de sucos e cerveja, amaciamento de carnes, massas à base de trigo e na fabricação de queijos (RAZZAQ et al., 2019).

Neste estudo, foi observado que as proteases de *A. oryzae* DPUA 1624 mantiveram estabilidade na faixa de pH 6,0 a 8,0 (Figura 2B), mantendo uma atividade relativa superior a 95%. Resultados semelhantes é descrito por Prado et al. (2021), onde *A. oryzae* DPUA 541 apresentou estabilidade na faixa de pH 7,0 a 10. Yin et al. (2013) e Ao et al. (2018), verificaram que proteases de *A. oryzae* BCRC 30118 e *A. oryzae* Y1 são estáveis em faixas de pH de 3,0 a 6,0 e 4,0 a 8,0, respectivamente.

Na Figura 3A os resultados indicaram que a atividade ótima foi verificada a 50 °C, havendo uma diminuição da atividade conforme o aumento da temperatura. Resultados semelhantes obtidos por Salihi et al. (2017) na pesquisa de *A. oryzae* CH93. Outros estudos realizados com *A. oryzae* mostraram diferentes temperaturas ótimas de atividade, como 55 °C (Ao et al., 2018) e 60 °C (Yin et al., 2013).

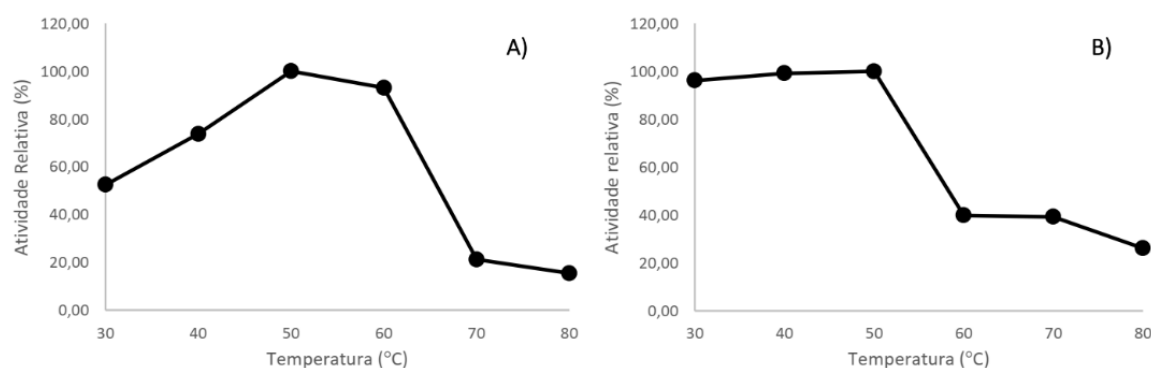


Figura 3: Efeitos da temperatura na atividade (A) e na estabilidade (B) das proteases de *A. oryzae*.

Nas condições experimentais deste estudo, as enzimas proteolíticas mantiveram estabilidade na faixa de 40 a 50 °C (Figura 3B), com atividade superior a 89%. Resultados semelhantes foram observados por Yin et al. (2013) e Ao et al. (2018) para proteases de *A. oryzae* BCRC 30118 e *A. oryzae* Y1, respectivamente, que expressaram estabilidade a 40 e 50 °C,

corroborando com os dados dessa pesquisa. Vishwanatha et al. (2010) também encontraram máxima estabilidade para proteases de *A. oryzae* MTCC 5341 entre 40 °C e 57 °C.

3.5 Caracterização bioquímica de enzimas coagulantes de *A. oryzae* DPUA 1624

3.5.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade coagulante

Nas condições avaliadas, os coagulantes apresentaram atividade ótima em pH 5,0 (Figura 4A). Conforme o pH aumentou, houve uma redução na atividade catalítica de 74,14 % em pH 10. A estabilidade enzimática foi observada na faixa de pH 6,0 a 7,0 (Figura 4B), onde o coagulante manteve uma atividade acima de 82%. Entre vários fatores, o pH e a temperatura são considerados cruciais para alcançar a máxima atividade enzimática (BANERJEE et al., 2017).

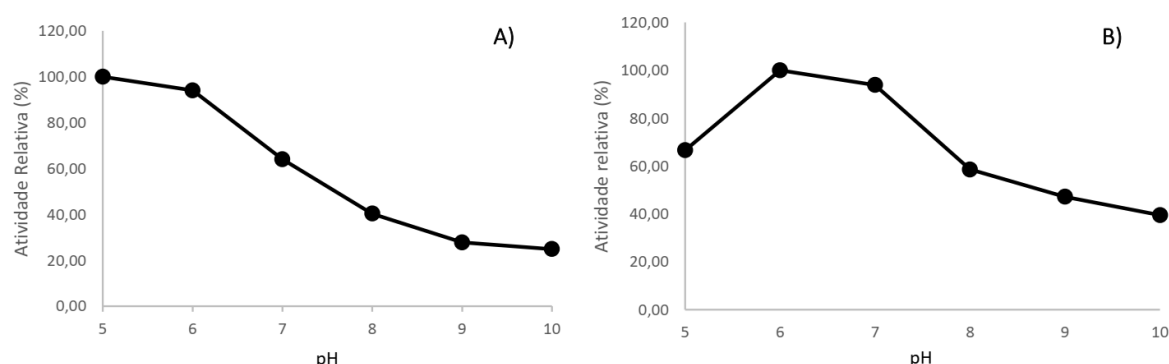


Figura 4: Efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) coagulante de *A. oryzae*.

Usman et al. (2021), utilizando *Aspergillus* sp., alcançaram atividade máxima em pH 5,0, e observaram estabilidade ao pH na faixa de 4,0 a 6,0. Mamo et al. (2020), em sua pesquisa com *A. oryzae*, também observaram atividade de coagulação em pH 5,0, com resultados semelhantes aos encontrados neste estudo.

Conforme relatado por Nicósia (2022) e Martim et al. (2021), variações no pH têm o potencial de modificar a carga elétrica dos aminoácidos no sítio ativo da enzima ou influenciar na estrutura das enzimas. Essas alterações podem afetar a afinidade da enzima e o substrato, levando, por conseguinte, à diminuição da sua atividade catalítica.

A Figura 5 representa a influência da temperatura na atividade e na estabilidade das enzimas proteolíticas coagulantes de *A. oryzae*. A temperatura ótima de atividade enzimática foi registrada a 50 °C (Figura 7a), com uma redução na atividade catalítica à medida que a temperatura aumentou. A estabilidade foi observada na faixa de 40 a 50 °C (Figura 5B).

Usman et al. (2021) verificaram que a temperatura ótima de atividade de um isolado do gênero *Aspergillus* foi de 50 °C, com estabilidade na faixa de temperatura de 40 a 60 °C, resultados

similares aos obtidos neste estudo. *A. oryzae*, no teste de temperatura ótima apresentou atividade de coagulação a 60 °C, com estabilidade na faixa de 35 a 45 °C, resultados que se assemelham aos apresentados neste estudo (Mamo et al.2020).

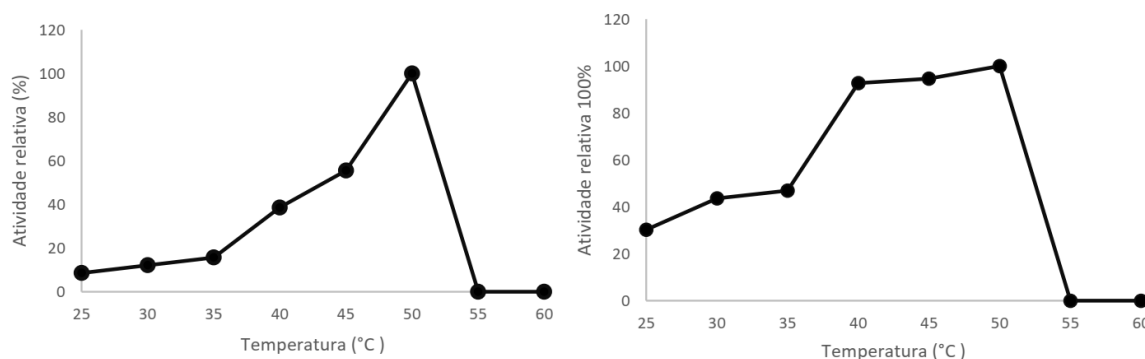


Figura 5: Efeito da temperatura (°C) na atividade (A) e na estabilidade (B) coagulante de *A. oryzae*.

4. CONCLUSÕES

1. *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 foi identificada como uma fonte promissora de coagulante quando cultivo em extrato de Czapek adicionado de extrato de levedura;
2. Os coagulantes *A. oryzae* expressam atividade máxima em pH 5,0 e temperatura 50 °C;
3. As propriedades bioquímicas dos coagulantes apontam seu potencial uso na indústria de laticínios, especificamente na produção de queijos.

5. AGRADECIMENTOS

À Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por ter disponibilizado o microrganismo estudado, aparelhagem e materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo fomento da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253- 262.
- 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. *Afr. J. Microbiol. Res.* V. 11. n. 7. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8400>

- Aljammas, H. A.; Alkhalaf, H. F. W. (2018). Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using solid-state fermentations. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 16, n. 1.
- Ao, X. L. et al. (2018). 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.
- Araújo, F. S. DE, Souza, I. H. da S., & Freitas, A. C. de. (2021). Estudo das condições de PH e temperatura para máxima atividade de protease de *Aspergillus oryzae* NRRL 1911/ Study of PH and temperature conditions for maximum protease activity of *Aspergillus oryzae* NRRL 1911. *Brazilian Journal of Development*, 6(1), 3077–3091. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n1-223>.
- Arima, K.; YU, J.; Iwasaki, S. (1970) Milk-Clotting Enzyme from *Mucor pussilus* var. Lindt. *Methods in Enzimology*. V. 19. p. 446-459.
- Banerjee, G.; Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 33, n. 2, p. 119–143.
- Barbosa, E. E. P., Pimenta, L., Brito, A. K.P., Martim, S. R. & Teixeira, M. F. S. (2020). Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. *Brazilian Journal of Development*. 6(11), 92475-92485.
- Barzkar, N., Homaei A., Hemmati R., & Patel, S. (2018). Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles*, 22(3), 335-346.
- Batista, S. C. P.; Prado, F. B.; Brito, A. K. P de.; Coelho, M. do P. S de LV.; Castillo, TA.; Martim, S. R.; Teixeira, M. F. S. (2021). Biomassa residual do processamento de resíduos hortícolas da Amazônia para crescimento micelial e produção de proteases por uma espécie de cogumelo comestível. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento, [S. l.]*, v. 3, pág. e35310313393.
- Bilyi, V., & Merzlov, S. (2022). Effect of some current enzymes on milk coagulation indicators. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural Sciences*, 24 (96), 144-147.
- Cardoso, K. B. B.; Nascimento, T. P.; Oliveira, V. de M.; Costa, R. M. P. B.; Pastrana, L. ; Batista, J. M. da S.; Porto, A. L. F. (2022). Protease with fibrinolytic and collagenolytic activity produced by *Aspergillus ochraceus* URM604. *Research, Society and Development, [S. l.]*, v. 11, n. 2, p. e15511225500.
- Chandrasekaran, S.; Kumaresan, S. S. P.; Manalavan, M. (2015). Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from paddy soil n Thiruvavur district Taminaldu. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 3, 66-69.

- Denti, A., Chies Polina, C., Vanz, J., Lisboa Bernardi, J., Raisel, L. B., Schenatto Palavicini, S. M., Feiden, T., & Backes, G. T. (2022). Enzimas e suas aplicações com ênfase na indústria de alimentos. *Revista Perspectiva*, 46(175), 51-68.
- Fasim, A.; More, V. S.; More S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 69, Pages 68-76.
- Fujita, M., Iwahori, K., Tatsuta, S., AND Yamakawa, K. (1994). Analysis of pellet formation of *Aspergillus niger* based on shear stress. *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 368-373.
- Hashem, A. M. (1999). Otimização da produtividade da enzima coagulante do leite por *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology*, 70, 203-207.
- He B., Tu Y., Hu Z., Ma L., Dai J., Cheng X., Li H., Liu L., Zeng B. (2018). Genome-wide identification and expression profile analysis of the HOG gene family in *Aspergillus oryzae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34:35. doi: 10.1007/s11274-018-2419-6.
- Justina, M. D., Justina, M. B. D., & Skoronsk, E. (2018). O uso das enzimas na indústria de laticínios: uma breve revisão. *Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes*, 73(3), 172-184.
- Klich, M. A.; Pitt, J.I. (1988). A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing*, 116p.
- Kulkarni A. U., Chavan A. M. (2015). Culture characteristics and aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* from maize grains. *Sci. Res. Reporter* 5:24-29.
- Leighton, T. J.; Doi, R. H.; Warren, R. A. J.; Kelln, R. A. (1973). The Relationship of Serine Protease Activity to RNA Polymerase Modification and Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, v. 76, n. 1, p. 103-122. DOI: 10.1016/0022-2836(73)90083-1.
- Lombardi, J., Ciocia, F., Uniacke-Lowe, T., Boeris, V., Risso, P., & Mcsweeney, P. L. H. (2019). Application of an Enzymatic Extract from *Aspergillus niger* as Coagulant for Cheddar Cheese Manufacture. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v, 62.
- 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*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00243-y>.
- 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. Biological Sciences*, 43(1), e57275.
- Nair S. C., Bhagobaty R. K., Nampoothi K., Kalaigandhi V., Menon K. R. K. (2014). Detection of aflatoxin production by fungi in spice samples using HPLC and direct visual cultural methods. *Innov. Roman. Food Biotechnol.* 14:1-12.

- Nascimento, M.; Alencar, V.; Nascimento, T.; Batista, J.; Porto, A. (2021). Proteases e suas aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícias. 10.31692/IICIAGRO.0076.
- Nicósia, F. D.; Puglisi, I.; Pino, A.; Caggia, C.; Randazzo, C. L. (2022). Plant Milk-Clotting Enzymes for Cheesemaking. *Foods*. 11, 871. <https://doi.org/10.3390/foods11060871>
- Nitu, S.; Geicu-Cristea, M.; Matei, F. (2021). Milk-Clotting Enzymes Obtained from Plants in Cheesemaking—A Review. *Sci. Bull. Ser. F Biotechnol.* 25, 66–75.
- Oliveira Filho, D. C de.; Coelho, K. W. dos S. A.; Costa, V. C. A da.; Pimenta, L.; Barbosa, E. E. P.; Brito, A. K. P de.; Batista, S. C. P.; Santana, R. da S.; Cabral, T. S.; Teixeira, M. F. S. (2022). Síntese de proteases por uma espécie de fungo filamentoso anamórfico para aplicação em processos industriais. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento, [S. l.]*, v. 16, pág. e548111638526. DOI: 10.33448/rsd-v11i16.38526.
- 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*, v. 7, n. 2, p. 16356–16373.
- Raper, K. B. e Fennel, D. I. (1965). *O gênero Aspergillus*. Williams e Wilkins, empresa Baltimore, Maryland. 686 pág.
- Razzaq, A. et al. (2019). Microbiais proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, p. 1-20. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00110.
- Sadiya, S. (2022). Studies On Effect of Various Agro-Industrial Waste on Milk-Clotting Activity Extracted from *Aspergillus Tamarii*. *Food Science & Applied Microbiology Reports*, 1(2), 1–5.
- Saito, M.; Machida, S. (1999). A rapide identification method for aflatoxinproducing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience* 40: 205-208.
- Salihi, A., Assodeh, A. & Aliabadian, M. (2017). Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 827-835.
- Samson, R. A; Varga, J. (2012). Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). *Aspergillus: molecular biology and genomics*. Poole: Caister Academic Press. Chap. 2, p. 19- 40.
- Shafique, T. et al. (2021). Screening, selection and development of *Bacillus subtilis* apr-IBL04 for hyper production of macromolecule alkaline protease. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 28, n. 2, p. 1494-1501.
- Souza P. M.; Bittencourt M.L.; Caprara C.C.; de Freitas M.; de Almeida R. P.; Silveira D.; Fonseca Y. M.; Ferreira Filho E. X.; Pessoa Junior A.; Magalhães P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz J Microbiol.* 1;46(2):337-46.

- Tilocca, B.; Costanzo, N.; Morittu, V. M.; Spina, A. A.; Soggiu, A.; Britti, D.; Roncada, P.; Piras, C. (2020). Milk microbiota: characterization methods and role in cheese production. *Journal Of Proteomics*, [s.l.], v. 210, p. 103534-103548. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>
- 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. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, v. 21, n. 4, p. 276-287. 10.25518/1780-4507.13692.
- 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*. Pg 6685963. doi: 10.1155/2021/6685963.
- Vishwanatha, K. S; Appu R.; A. G.; Singh, S. A. (2010). Acid protease production by solidstate fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol* V. 37, n 2 Pp: 129–138.
- Wehaidy, H. R., Abdel-Naby, M. A., Kholif, A. M. M. (2023). The catalytic and kinetic characterization of *Bacillus subtilis* MK775302 milk clotting enzyme: comparison with calf rennet as a coagulant in white soft cheese manufacture. *J Genet Eng Biotechnol* 21, 61.
- Yin, L. J.; Chou, Y. H.; Jiang, S. T. (2013). Purification And Characterization of Acidic Protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. *Journal of Marine Science and Technology*, v. 21, n. 1, p. 105-110. DOI: 10.6119/JMST-012-0529-1.

COMO CITAR ESTE ARTIGO:

XXXX, xxxx (2023). *Holos* (Não preencher; os dados serão preenchidos pelos organizadores).

SOBRE OS AUTORES (Não preencher no arquivo. Inserir as informações no sistema da revista no ato da submissão na área dos METADADOS)

EXEMPLO**R. F. BRASIL**

Doutora em Educação pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN com Estágio Doutoral na Universidade de Lisboa (Portugal); Professora do Programa de Pós-Graduação em Educação Profissional-PPGEP, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte/IFRN (Brasil); Líder do Grupo de Pesquisa Educação, Ciência e Tecnologia/CNPq. E-mail: rffbrasil@ifrn.edu.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-XXXX-XXXX-XXXX>

R. G. NORTE

Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN em co-tutela com a Université de Toulon (França); Engenheiro do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte/IFRN (Brasil); Membro do Núcleo de Inovação Tecnológica do IFRN. E-mail: rgnorte@ifrn.edu.br
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-XXXX-XXXX-XXXX>



Não preencher editor, pareceristas, QR code, datas de recebimento, aceite e publicação.

Editor(a) Responsável: Francinaide de Lima Silva Nascimento/Rafael Hernandez Damascena dos
Passos

Pareceristas *Ad Hoc*: PARECERISTA A E PARECERISTA B



Recibido 05 de janeiro de 2023

Aceito: xx de xx de 2023

Publicado: xx de xx de 2023

5. CONCLUSÕES GERAIS

Aspergillus oryzae DPUA1624 biossintetiza enzimas proteolíticas, incluindo as proteases coagulantes. As características bioquímicas dessas enzimas indicam que *A. oryzae* tem potencialidades para aplicações no setor alimentício, especialmente na fabricação de produtos lácteos.

6. REFERÊNCIAS

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.; 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. 2014.

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. **Afr. J. Microbiol. Res.** v. 11. n. 7. 2017.

ALI, R. et al. Detection and enumeration of Enteric bacteria associated with food handlers and surfaces of food manufacturing industry located in Hub city, Pakistan. **WSN World Scientific News**, v. 49, n. 48, p. 192–203, 2016.

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. 2018.

BARBOSA, E. E. P., PIMENTA, L., BRITO, A. K.P., MARTIM, S. R. & TEIXEIRA, M. F. S. Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. **Brazilian Journal of Development**. 6(11), 92475-92485. 2020.

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. Pp. 171-177. 2017.

BARZKAR, N.; HOMAEI, A.; HEMMATI, R.; PATEL, S. Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. **Extremophiles**. V. 22. 335-346. 2018.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 101368, nov. 2019.

BELMESSIKH, A.; BOUKHALFA, H.; MECHAKRA-MAZA, A.; GHERIBI-AOULMI, Z.; AMRANE, A. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 377-385. 2013.

BENCHEK, B. Koji Beer Brewing Injenuity. In: SHIH, Rich; UMANSKY, J. **Koji Alchemy**: rediscovering the magic of mold-based fermentation. **White River Junction**, Vermont: Chelsea Green Publishing, 2020.

BENMRAD, OMRANE M., MECHRI, S., ZARAÏ JAOUADI, N. *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC Biotechnol** 19, 43, 2019.

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. *Aspergillus: molecular biology and genomics*. **Poole: Caister Academic Press**, chap. 1, p. 1-17. 2010.

BENSMAIL, S.; BOUDJEMA, K. & NAIMI-FAZOUANE, F. Production of Extracellular RenninLike 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. 2020.

BEUX, S., PEREIRA, E. A., CASSANDRO, M., & WASZCZYNSKYJ, A. N. (24 de. Milk coagulation properties and methods of detection. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47: 10, pp. 1-8, 2017.

CAMPOS, C.; DIAS, D. C.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. **Arq. Ciência, Vet. Zool. Unipar**, (13), p. 19-24. 2010.

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.

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

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.

CHANDRASEKARAN, S.; KUMARESAN, S. S. P.; MANALAVAN, M. Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from paddy soil n Thiruvapur district Tamilnadu. **Journal of Applied Biology and Biotechnology** 3, 66-69. 2015.

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.

DABA, G. M.; MOSTAFA, F. A.; ELKHATEEB, W. A. The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 52, jun. 2021.

DABAJA, M. Z.; VARANO, A.; SILVEIRA, G.; IKEGAKI, M.; PEREIRA, E. B. Avaliação da atividade enzimática de fungo endofítico isolado de *Annona crassiflora* (marolo) com interesse biotecnológico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 17, n. 1, 2019.

- DAMARE, S., MISHRA, A., D'SOUZA-TICLO-DINIZ, D., KRISHNASWAMY, K. & RAGHUKUMAR, C. A deep-sea hydrogen peroxide-stable alkaline serine protease from *Aspergillus favus*. **Biotech.** 10 (528). 2020.
- 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.
- ELLEUCH, J. et al. Extracellular neutral protease from *Arthrospira platensis*: Production, optimization and partial characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1491-1498, 2021.
- FERREIRA, J. A. et al. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, p. 334–345, 2016.
- FREITAS, A. C. **Produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillus oryzae* CCBP001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 115 p., 2013.
- 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.
- 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.
- GOMES, S., BELO, A. T., J., D., ALVARENGA, N., LAGE, P., PINHEIRO, C., MARTINS, M. F. Characterization of *Cynara cardunculus* L. flower from Alentejo as a coagulant agent for cheesemaking. **International Dairy Journal**, 91, pp. 178- 184, 2019.
- GOMES, K. D.; POLIZELLI, M. A. Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima betagalactosidase. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 28194-28208, 2020.
- GOMI, K. **ASPERGILLUS | *Aspergillus oryzae*.** **Encyclopedia of Food Microbiology**, Academic Press, 2. ed, p. 92-96, 2014.
- 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.
- 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.
- HASHEM, A. M. Hashem, AM (1999). Otimização da produtividade da enzima coagulante do leite por *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, 70, 203-207, 1999.
- HELLMUTH, K; BRINK, JM. Microbial production of enzymes used in food applications, in: McNeil, B., Archer, D., Giavasis, I., Harvey Enzymes and

Nutraceuticals L.B.T.-M.P. of F.I. (Eds.), **Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals**. Elsevier, pp. 262–287, 2013.

HOMAEI, A.; LAVAJO, 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.

HUANG, A.; LU, M.; LING, E.; LI, P.; WANG C. A M35 family metalloprotease is required for fungal virulence against insects by inactivating host prophenoloxidas and beyond. **Virulence**. V. 11. n. 1, 2020.

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.

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. **Identification of common Aspergillus species**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelaures, 116 p. 2002.

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

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, 1973.

LEITE JÚNIOR, B. R. D. C.; DE OLIVEIRA MARTINS, F.; TREVIZANO, L. M.; DA CAPELA, A. P.; DE MELO CARLOS DIAS, T.; PACHECO, A. F. C.; MARTINS, E. M. F. Aplicações de Enzimas no Processamento de Alimentos. **Pesquisa e Avanços Tecnológicos em Ciência de Alimentos**; Academic Press: Cambridge, MA, EUA, 2022; p. 175–194. ISBN 9780323859172.

LIU, H. et al. Functional characterization of two clip-domain serine proteases in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 89, p. 98-107, 2019.

MACHADO, A. R. G. et al. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 46, p. 2160–2166, 2017.

MAMO, J.; KANGWA, M.; FERNANDEZ-LAHORE, 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**. 2020.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. **Appl Biotechnol Bioeng**.4(1):511–532, 2017.

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, 2017.

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, 2017.

MARTIM, S. R., L. S. C. SILVA, M. M. ALECRIM, B. C. SOUZA, I. M. A. OLIVEIRA & M. F. S. TEIXEIRA. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 12(3): 353-362, 2017.

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. **Food Chemistry**, p. 87-93, 2010.

MESQUITA-ROCHA, Sabrina. *Aspergillus fumigatus*: aspectos gerais e importância na medicina contemporânea. **J Health Sci Inst**, [s. l.], v. 37, p. 169-173, 2019.

MUSIDLAK, O. Plant latex proteins and their functions. In: NAWROT, R. Látex, laticíferos e seus componentes moleculares de funções a possíveis aplicativos. Vol. 93. **Advances in Botanical Research**, Amsterdã: Elsevier. Cap. 3, pag. 55-97, 2020.

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

NAEEM M., MANZOOR S., ABID MUH, TAREEN MBK, ASAD M., MUSHTAQ S., ET AL. Fungal proteases as emerging biocatalysts to tackle current challenges and recent advancements in biomedical therapies: an updated review. **J. Fungi** 8 :109, 2022.

NEUMANN, C. et al. Development of a generic high-throughput screening assay for profiling snake venom protease activity after high-resolution chromatographic fractionation. **Toxicon**, v. 178, p. 61-68, 2020.

NOVELLI, PK, BARROS, MM E FLEURI, LF .Novas proteases baratas de fungos: Produção por fermentação e caracterização em estado sólido. **Food Chemistry**, v.198, n. 119-124, 2016.

OLIVEIRA, V. M. et al. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 101509, 2020.

OSMOLOVSKIY, A. A. et al. Vermiculite as a new carrier for extracellular protease production by *Aspergillus spp.* under solid-state fermentation. **Biotechnology Reports**, v. 29, p. e00576, 2021.

PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, N. K.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acidenzymes production process. **Bioresource Technology**, v. 309, 123317, 2020.

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.

PATYSHAKULIYEVA. Fungal Proteases: Current and Potential Industrial Applications. **Reference Module in Life Sciences**. 2021.

PENAS, A. F. **Efeito da formulação e da conservação nas propriedades de extratos de flor de cardo para fabrico de queijo**. Universidade de Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, TESE (Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar). 2018.

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.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 593 p. 1997.

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.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 597–635. Sept. India. 1998.

RAPER, K. B. e FENNEL, D. I. **O gênero Aspergillus**. Williams e Wilkins, empresa Baltimore, Maryland. 686 pág. 1965.

RAZAQ, 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.

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

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Cheesemaking Practice**, 3. ed. NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1998.

ROSSI, M. J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift**. 188 f. Tese (doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

SALIHI, A., ASSODEH, A. & ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillusoryzae* CH93. **International Journal of Biological Macromolecules**, 94, 827-835. 2017.

SHIH, Rich; UMANSKY, Jeremy. Koji Alchemy: rediscovering the magic of mold-based fermentation. **White River Junction, Vermont**: Chelsea Green Publishing, 2020

SAMSON, R. A; VARGA, J. Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. In: MACHIDA, M.; GOMI, K. (Ed.). *Aspergillus*: molecular biology and genomics. Poole: **Caister Academic Press**. Chap. 2, p. 19- 40. 2012.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. **What is a species in *Aspergillus*?** **Medical Mycology**. Oxford, v. 47, n. 1, p. 13-20, Jan. 1995.

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.

SHAFIQUE, T. et al. Screening, selection and development of *Bacillus subtilis* apr-IBL04 for hyper production of macromolecule alkaline protease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 1494-1501, 2021.

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.

SAMSON, Robert A.; HOEKSTRA, Ellen S.; FRISVAD, Jens C. & FILTENBORG, Ole - **Introduction to food-born fungi**. Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. 322p. illust. ISBN: 90-70351-27-7.

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.

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, 2019.

SILVA, R. R. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 183(1): 1-19. 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.

SILVA, A. V. et al. Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, p. 101669, 2020.

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

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, 13, p.205–218, 2003.

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.

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.

TILOCCA, B.; COSTANZO, N.; MORITTU, V. M.; SPINA, A. A.; SOGGIU, A.; BRITTI, D.; RONCADA, P.; PIRAS, C. Milk microbiota: characterization methods and role in cheese production. **Journal Of Proteomics**, [s.l.], v. 210, p. 103534-103548, jan. 2020.

TROCH, T.; LEFÉBURE, E.; BAETEN, V.; COLINET, F.; GENGLER, N.; SINDIC, M. Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 21, n. 4, p. 276-287, 2017. 10.25518/1780-4507.13692

USMAN, A., MOHAMMED, S. & MAMO, J. Production, Optimization, and Characterization of an Acid Protease from Filamentous Fungus by Solid-State Fermentation. **International Journal of Microbiology**. 2021.

VEITER, L.; RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 2997–3006, 2018.

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.

YIN, L. J.; CHOU, Y. H.; JIANG, S. T. Purification And Characterization of Acidic Protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 105-110. DOI: 10.6119/JMST-012-0529-1. 2013.

ANEXOS

ANEXO I

Página da Revista HOLOS para arquivos submetidos

HOLOS

← Back to Submissões

16279 / Viana Barros et al. / EXPLORAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGO ANAMÓRFICO NA PRODUÇÃO DE COAGULAN

Biblioteca da Submissão

Fluxo de Trabalho

Publicação

Submissão

Avaliação

Edição de Texto

Editoração

Arquivos da Submissão

Q Buscar

▶ 41351 Artigo A. oryzae_Ana Cris final 2023.docx

outubro 16, 2023

Texto do Artigo

▶ 41352 Artigo A. oryzae Espanhol Final.docx

outubro 16, 2023

Texto do Artigo

Baixar Todos os Arquivos

Discussão da pré-avaliação

Adicionar comentários

Nome	De	Última resposta	Respostas	Fechado

ANEXO II



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Cadastro de Acesso Nº A0A6957

Tipo de Usuário:	Universidade Federal do Amazonas
Responsável pelo cadastro:	02757451200
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
O acesso foi realizado antes de 17/11/2015 ou obteve autorização de acesso antes de 17/11/2015?	Não, sem solicitação de autorização em tramitação
Finalidade do Acesso:	Pesquisa
Estas atividades são baseadas em acesso realizado anteriormente?:	Não
Este cadastro está vinculado a cadastro anterior de remessa?	Não

Patrimônio Genético

Título da Atividade:	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COAGULANTE POR FUNGO FILAMENTOSO: UMA FONTE ALTERNATIVA E RENOVÁVEL DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS
----------------------	--

Título da Atividade em inglês:

Resumo da atividade (incluindo objetivos e resultados esperados ou obtidos, conforme o caso)

A crescente demanda por enzimas com atividade coagulante no leite bovino tem impulsionado pesquisas na área, resultando em uma maior busca por fontes dessas enzimas para suprir o mercado. Proteases são enzimas de significativa relevância econômica e podem ser sintetizadas por diversas espécies de fungos filamentosos, incluindo aquelas pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a produção e caracterização das proteases coagulantes sintetizadas pela espécie *Aspergillus oryzae*. A cultura matriz foi desenvolvida em ágar CYA e mantida por sete dias a 25 °C. Em seguida, o cultivo foi transferido para meio líquido contendo GYP, CYA e SAB, e a fermentação ocorreu em agitador orbital a 150 rpm e 25 °C. Após 72 horas, o extrato bruto foi recuperado e filtrado. A atividade das proteases foi avaliada utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato em tampão Tris-HCl pH 7,2. Os resultados indicaram que *A. oryzae* excretou proteases somente no meio CYA, com atividade proteolítica (25,07 U/mL), no meio CYA. A atividade ótima dessa enzimas foi determinada em pH 6,0, a 50 °C. Os resultados sugerem que as proteases de *A. oryzae* podem ser aplicadas em diversos setores industriais, como a indústria alimentícia, têxtil e panificação, ampliando suas possibilidades de uso como importantes ferramentas biotecnológicas.

Resumo não sigiloso da Atividade em Inglês

Palavra(s)-chave: **Aspergillus oryzae, coagulação do leite, fermentação submersa, atividade proteolítica.**

Palavra(s)-chave em inglês:

Período das Atividades: **01/02/2023** **Ainda não iniciado ou em execução**

Equipe

Nome Completo	Documento	Instituição	Nacionalidade
Maria Francisca Simas Teixeira	027.574.512-00	iversidade Federal do Amazon	Brasil
Ana Cristina Viana Barros	021.920.282-61	iversidade Federal do Amazon	Brasil
Ana Kezia Pimentel de Brito	022.190.032-21	iversidade Federal do Amazon	Brasil
Samara Claudia Picanço Batista	011.128.962-95	iversidade Federal do Amazon	Brasil
Laynah Pimenta	026.020.632-66	iversidade Federal do Amazon	Brasil
Elliza Emily Perrone Barbosa	531.765.612-53	iversidade Federal do Amazon	Brasil
Tiara Sousa Cabral	055.821.734-63	iversidade Federal do Amazon	Brasil

Sobre o Componente do Patrimônio Genético Acessado

O acesso ao patrimônio genético será realizado em área indispensável à segurança nacional ou águas jurisdicionais brasileiras, plataforma continental e zona econômica exclusiva:

Não

Tipo de Componente: **Fungos**

Nome Científico: **Aspergillus oryzae**

Reino:

Filo/Divisão:

Classe:

Ordem:

Família:

Trata-se de variedade tradicional local ou crioula ou raça localmente adaptada ou crioula? **Não**

Sobre a Procedência Do Patrimônio Genético

Procedência da amostra:	Ex situ
Tipo de fonte ex situ:	Coleção Biológica
Instituição mantenedora da Coleção:	Universidade Federal do Amazonas
Nome da Coleção:	Coleção de Culturas DPUA
Nº do voucher ou de código de acesso do depósito concedido pela coleção:	1624
UF:	AM
Município:	Manaus
Latitude:	3° 10" 1.14' S
Longitude:	59° 97" 4.49' W
Bioma:	Amazônia
Data da coleta	01/02/2023

Data do Cadastro: **02/10/2023 14:14:18**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:19** de **02/10/2023**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**