



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
REDE DE BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL –
REDE BIONORTE**



**COGUMELOS DA AMAZÔNIA COMO FONTE DE
PROTEASE PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE QUEIJO**

SALOMÃO ROCHA MARTIM

**MANAUS
JUNHO/2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
REDE DE BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL –
REDE BIONORTE**



SALOMÃO ROCHA MARTIM

**COGUMELOS DA AMAZÔNIA COMO FONTE DE
PROTEASE PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE QUEIJO**

Tese apresentada à Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Rede Bionorte, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

**MANAUS
JUNHO/2017**

Ficha Catalográfica

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

M378c Martim, Salomão Rocha
Cogumelos da Amazônia como fonte de protease para aplicação
na indústria de queijo / Salomão Rocha Martim. 2017
119 f.: il. color; 31 cm.

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

1. proteases coagulantes. 2. fermentação. 3. resíduos . 4.
laticínio. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

SALOMÃO ROCHA MARTIM

**COGUMELOS DA AMAZÔNIA COMO FONTE DE PROTEASE
PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE QUEIJO**

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira (UFAM) - Presidente

Professora Doutora Ires Paula de Andrade Miranda (INPA) - Titular

Professora Doutora Kilma Cristiane Silva Neves (IFAM) - Titular

Professora Doutora Larissa de Souza Kirsch (UEA) - Titular

Professora Doutora Waldireny Caldas Rocha (UFAM) - Titular

**MANAUS
JUNHO/2017**

Dedico:

Aos meus pais, Ismael e Ivone Martim, e aos irmãos Ângelo, Leonardo e Yonara Martim, sempre presentes nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós Pedro Martim, Raimunda Felícia, Mario Rocha e Júlia Rocha, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas pela estrutura fornecida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pela bolsa de estudos concedida

À professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira pelos valiosos ensinamentos, paciência, amizade e por ser um exemplo de pesquisadora.

A Deus pelas bênçãos alcançadas.

Ao Dr. Fábio Lopes, do laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas, pelo auxílio nas análises físico-químicas.

À Leilane Bentes e à professora Marne Vasconcellos, do Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM, pela realização dos testes de toxicidade.

Ao Dr. Raimundo Felipe pelo auxílio nas análises microbiológicas.

À Lúcia Pontes, exemplo de profissional e amiga que há anos tem me ajudado na resolução de entraves burocráticos.

Ao casal Roberto e Cleide Peres, proprietários do Laticínio Uirapuru, pelo auxílio na fabricação do queijo.

Aos amigos da Micoteca-Ufam: Ana Rita, Bianca Cordeiro, Fabiano Prado, Larissa Svetlana, Lorisa Simas, Mircella Alecrim, Nélly Vinhote e Taciana Silva, pelo apoio incondicional e pelos momentos únicos que vivenciamos no dia a dia.

Nada é por acaso, tudo está escrito.

Autor desconhecido

RESUMO

O aumento da produção mundial de queijos, a escassez do coalho animal e a rejeição de proteases geneticamente modificadas, incentiva a busca por novas fontes de coagulantes do leite. Dentre os fungos, os cogumelos têm se destacado como fonte alternativa de peptidases coagulantes para aplicação na indústria de laticínios. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a síntese de proteases por seis cogumelos do acervo da Coleção de Culturas DPUA para selecionar uma espécie produtora de coagulante com características físico-químicas para elaboração de queijo. A fermentação em meio líquido foi realizada em GYP [(20 g de glicose, 5 g de extrato de levedura, 15 g de peptona/1000 mL de água)], com 0,5 % de gelatina (p/v). O macrofungo produtor de proteases com elevada razão coagulante, em meio líquido, foi cultivado em resíduos lignocelulósicos amazônicos: serragem de angelim, exocarpos de cupuaçu e tucumã, engaço de banana e semente de açaí, suplementados com farelo de arroz. As atividades proteolítica e coagulante foram determinadas utilizando como substratos azocaseína 1% (p/v) e leite desnatado em pó a 10% (p/v), respectivamente. Os parâmetros que influenciam a produção de coagulantes (pH do meio de cultivo, tempo de fermentação, tamanho e idade do inóculo) foram avaliados. O coagulante foi caracterizado quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e à temperatura, e efeito de íons metálicos e inibidores. A citotoxicidade do coagulante foi avaliada em fibroblastos humanos MRC-5. No queijo elaborado com o coagulante foi determinada a composição centesimal e a microbiológica. Na fermentação submersa, *Pleurotus albidus* foi o produtor significativo de proteases (34,00 U/mL) e a síntese dessas enzimas foi estimulada pela idade (10 dias) e volume do inóculo (5%, p/v). As proteases mostraram atividade ótima em pH 5 a 60°C, estabilidade em pH (5-8), temperatura de 30°C até 60°C, sendo classificadas como cisteíno e serinoproteases. O coagulante de *Pleurotus albidus* expressou razão coagulante de 21,60 com máxima atividade a 60 °C, pH 6. Ácido iodoacético inibiu significativamente a atividade coagulante, sugerindo maior quantitativo de cisteínoproteases. As enzimas de *Pleurotus albidus* não apresentaram toxicidade contra fibroblastos humanos (MRC5). Em matriz sólida, *Pleurotus albidus* cultivado em semente de açaí e farelo de arroz (90:10, p/p) produziu protease com elevada razão coagulante (14,58), formação de soro abundante e forte coagulação. As condições ideais para produção do coagulante foram: inóculo (10 dias de idade), meio de cultivo pH 6, tamanho do inóculo (2,5%, p/v) e idade do inóculo 10 dias. O coagulante exibiu máxima atividade em pH 5, a 55 °C, com estabilidade até 45 °C, sendo inibido por ácido iodoacético. O queijo elaborado apresentou umidade (55%), lipídios (20%), proteínas (18%) e atendeu aos padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira. *Pleurotus albidus* é uma fonte de coagulante que pode ser aplicada na indústria de laticínios, em especial na fabricação de queijo.

Palavras-Chave: proteases coagulantes, fermentação, resíduos, laticínio.

ABSTRACT

The increase in world cheese production, the scarcity of animal rennet, associated with the rejection of genetically modified proteases, encourages the search for new sources of milk-clotting enzymes. Among fungi, edible mushrooms have stood out as alternative sources of peptidases that can be used as milk-clotting. This research aimed to evaluate the synthesis of proteases by six edible mushrooms from DPUA Culture Collection and select a milk-clotting producer species with physicochemical characteristics for cheese production. The submerged fermentation was carried out in GYP medium (glucose, yeast extract and peptone) with 0.5% (w/v) of gelatine. The edible mushroom that produced proteases with higher coagulant ratio in the liquid medium was cultivated in Amazon agroindustrial wastes as substrate: angelim sawdust, cupuaçu, exocarp of tucumã, banana leaf and açai seeds, supplemented with rice bran. The proteolytic activity was determined using 1% (w/v) of azocasein as substrate and the determination of milk-clotting activity was used 10% (w/v) of skimmed milk solution as substrate. Some parameters were used to evaluate the influence of milk-clotting enzymes production (pH of the culture medium, fermentation time, size and age of the inoculum). The enzymes were characterized according to optimums pH and temperature, pH and temperature stabilities, and effect of metallic ions and inhibitors. The cytotoxic effect of the selected mushroom crude extract was evaluated in human MRC-5 fibroblast. The analysis of centesimal and microbiological composition was determined in the elaborated cheese. In submerged fermentation conditions, *Pleurotus albidus* was the best protease producer (34.00 U/mL) and the synthesis of these enzymes were stimulated by culture age (10 days) e inoculum volume [5% (p/v)]. The enzymes showed optimum activities at pH 5 and 60°C, with stabilities at pH 5 to 8 and 30°C to 60°C, being classified as cysteine and serine proteases. The milk-clotting enzymes from *Pleurotus albidus* expressed the highest coagulant ratio (21.60) with maximum activity at 60 °C and pH 6. Iodoacetic acid was the inhibitor of higher action in the proteolytic activity suggesting the presence of cysteine proteases. *Pleurotus albidus* milk-clotting enzymes showed no toxicity against human fibroblasts (MRC5). In the solid fermentation, *Pleurotus albidus* presented high enzyme production in the mixture composed by açai seeds and rice bran (90:10, w/w). The milk-clotting enzymes demonstrated coagulant ratio of 14.58, abundant whey formation and strong coagulation in milk solution. The best conditions to milk-clotting enzymes production were: inoculum with 10 days of age, culture medium at pH 6 and inoculum size of 2.5% (p/v). The enzymes exhibited maximum catalytic activity at pH 5 and 55 °C with stability until 45°C. They were completely inhibited by iodoacetic acid. The cheese produced with *Pleurotus albidus* milk-clotting enzymes as coagulant agent demonstrated contents of moisture, lipid and protein of 55%, 20% and 18%, respectively. The microbiological analysis showed that the cheese was under the standards required by Brazilian legislation. *Pleurotus albidus* is a potential source of coagulant that can be applied in dairy industry, especially in the manufacture of cheese.

Keywords: coagulant proteases, fermentation, residues, dairy.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Composição química de diferentes tipos de leite.....	17
Quadro 2. Principais proteínas do leite bovino.....	17
Quadro 3. Fontes de proteases coagulantes.....	22
Quadro 4. Produção e resíduos lignocelulósicos gerados (2009) e projeção para produção (2021/2022) das principais culturas produzidas no Brasil.....	28
Tabela 1. Resíduos Lignocelulósicos (RL) utilizados na fermentação em matriz sólida para crescimento e produção de coagulante por cogumelos.....	34
Figura 1. Corte transversal da micela de caseína no modelo de submicelas	19
Figura 2. <i>Agaricus vidoceosquamulosos</i> : A- Basidioma; B- Lamelas; C- Basídio, corado com azul de lactofenol (aumento de 400x); D- Basidiosporos corados com reagente de Melzer (aumento de 400x).....	23

Capítulo 2

Tabela 1. Produção de proteases por cogumelos comestíveis pertencentes à coleção DPUA.....	61
Figura 1. Efeito do tamanho do inóculo na atividade proteolítica de <i>P. albidus</i>	62
Figura 2. Efeito da idade do inóculo na atividade proteolítica de <i>P. albidus</i>	63
Figura 3. Efeito do pH na atividade proteolítica de <i>P. albidus</i>	64
Figura 4. Efeito da temperatura na atividade proteolítica de <i>P. albidus</i>	65
Figura 5. Efeito do pH na estabilidade da atividade proteolítica de <i>P. albidus</i>	65
Figura 6. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade proteolítica de <i>P. albidus</i>	66
Figura 7. Efeito de inibidores na atividade proteolítica de <i>P. albidus</i>	67
Figura 8. Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica de <i>P. albidus</i>	68

Capítulo 3

Tabela 1. Efeito de íons e inibidores na atividade coagulante de <i>P. albidus</i>	87
--	----

Capítulo 4

Figura 1. Atividade coagulante do extrato Bruto de <i>P. albidus</i>	82
--	----

Figura 2. Efeito do pH na atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	83
--	----

Figura 3. Efeito da temperatura na atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	84
---	----

Figura 4. Efeito do pH na estabilidade das proteases coagulantes do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	85
--	----

Figura 5. Efeito da temperatura na estabilidade das proteases coagulantes de <i>P. albidus</i>	86
---	----

Figura 6. Citotoxicidade do extrato coagulante de <i>P. albidus</i> em fibroblastos humanos (MRC-5) após 72 horas de tratamento.....	88
--	----

Tabela 1. Resíduos agroindustriais (RA) utilizados na fermentação em matriz sólida para produção de coagulante por <i>P. albidus</i>	97
--	----

Tabela 2. Atividade coagulante, razão coagulante e classificação da coagulação das proteases produzidas por <i>P. albidus</i> em diferentes resíduos lignocelulósicos.....	101
--	-----

Tabela 3. Efeito de íons e inibidores na atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	110
---	-----

Tabela 4. Composição centesimal do queijo Minas frescal produzido com coagulante de <i>P. albidus</i>	112
---	-----

Figura 1. Coagulação do leite bovino usando enzimas de <i>P. albidus</i> cultivado em semente de açaí suplementada com farelo de arroz (90:10, p/p), em triplicata.....	102
---	-----

Figura 2. Efeito do tamanho do inóculo na atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	103
--	-----

Figura 3. Efeito do tempo de fermentação na atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	104
--	-----

Figura 4. Efeito do pH inicial do meio de cultivo na atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	105
---	-----

Figura 5. Efeito da idade do inóculo na atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	
.....	106
Figura 6. Efeito do pH na atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	107
Figura 7. Efeito da temperatura na atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i>	108
Figura 8. Efeito do pH na estabilidade da atividade coagulante do extrato bruto de <i>P. albidus</i> .	
.....	109
Figura 9. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade coagulante do extrato bruto de <i>P.albidus</i>	110

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Proteases	15
2.2 Leite.....	16
2.3 Processo de coagulação do leite	19
2.4 Fontes de enzimas coagulantes	21
2.5 Queijo Minas frescal	23
2.6 Processos fermentativos	24
2.7 Resíduos lignocelulósicos.....	27
3. OBJETIVOS	31
3.1 GERAL.....	31
3.2 ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Organismos	32
4.2 Produção de Protease por Fermentação Submersa	32
4.2.1 Determinação da atividade proteolítica.....	32
4.2.2 Determinação da atividade coagulante	33
4.3 Produção de coagulante em Fermentação no Estado Sólido.....	33
4.3.1 Seleção do substrato para produção de coagulante em matriz sólida	34
4.3.2 Extração e Filtração do extrato enzimático	35
4.4 Teste de toxicidade.....	35
4.4.1 Linhagem e condições de cultivo	35
4.4.2 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	35
4.5 Avaliação dos parâmetros de fermentação para produção de proteases em meio líquido e matriz sólida	36

4.6 Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease e do coagulante.....	36
4.7 Efeito de inibidores de proteases e íons metálicos na atividade proteolítica e coagulante	36
4.8 Produção de queijo em escala semi-industrial com proteases coagulante de cogumelo	37
4.8.1 Determinação da composição centesimal do queijo	37
4.8.2 Análise microbiológica do queijo	37
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
7. RESULTADOS.....	54
Capítulo 1	54
Pedido de registro de propriedade intelectual	54
Capítulo 2	55
Artigo 1	56
Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial.....	56
Capítulo 3	74
Artigo 2	76
<i>Pleurotus albidus</i> : A new source of milk-clotting proteases	76
Capítulo 4	94
Artigo 3	95
Coagulante de <i>Pleurotus albidus</i> DPUA 1692 cultivado em resíduos lignocelulósicos da Amazônia	95
8. CONCLUSÃO	119

1. INTRODUÇÃO

As proteases representam um grupo fundamental de enzimas devido à diversidade de suas funções fisiológicas e aplicações biotecnológicas. Estes biocatalisadores são utilizados na indústria farmacêutica, médica, de alimentos e em processos de biorremediação (SRILAKSHMI et al., 2015).

A demanda por proteases com especificidade e estabilidade em vastas faixas de pH, temperatura e em presença de íons metálicos, tensoativos, solventes orgânicos e oxidantes tem estimulado a busca de novas fontes enzimáticas, em especial, as de origem microbiana. (NAIR; GEETHU, 2015).

Os fungos representam uma fonte potencial de proteases, devido a sua ampla diversidade bioquímica, susceptibilidade para a manipulação genética, alta produtividade, e sendo extracelulares são facilmente recuperáveis a partir do meio de fermentação (CASTRO; NISHIDE; SATO, 2014).

As peptidases são produzidas tanto por fermentação submersa quanto por fermentação em matriz sólida. Devido à semelhança ao habitat natural dos fungos o cultivo em estado sólido é considerado o método mais apropriado para o crescimento desses organismos. Além disso, características como simplicidade, altos rendimentos, custo reduzido, obtenção de elevadas concentrações enzimáticas e utilização de resíduos agrícolas tornam a fermentação em matriz sólida mais atraente que o cultivo em meio submerso (SOUZA et al., 2015). Na Amazônia, exocarpo de cupuaçu e semente de açaí têm sido utilizados como substratos para produção de enzimas proteolíticas de cogumelos pertencentes aos gêneros *Pleurotus* e *Lentinus*, por fermentação em matriz sólida (FONSECA et al., 2014; MACHADO et al., 2016).

Proteases coagulantes do leite podem ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas. A falta de coalho suficiente para atender à crescente demanda da produção de queijo tem incentivado o desenvolvimento de pesquisas para identificar novas fontes de proteases coagulantes do leite (JACOB et al., 2011; SHAMTSYAN et al., 2014). Dentre os fungos, os cogumelos têm se destacado como produtores de proteases. Contudo são escassos os estudos reportando a produção de coagulante por cogumelos comestíveis com características bioquímicas ideais para aplicação na indústria de laticínios, em especial em processos de coagulação do leite e fabricação do queijo (ERJAVEC et al., 2012).

O Brasil apresenta grande potencial para a produção de novos extratos enzimáticos microbianos, considerando a elevada quantidade e variedade de produtos naturais, uma vasta biodiversidade microbiana a ser explorada, para aplicação imediata, ou após melhoramento genético, visando à produção de enzimas por processos fermentativos, transformando resíduos em produtos de valor agregado (ZIMMER et al., 2009).

Diante do exposto, considerando o potencial dos cogumelos como fonte de enzimas e a disponibilidade de resíduos agroindustriais, este estudo teve como objetivo encontrar uma fonte alternativa de protease coagulante com propriedades físico-químicas adequadas para uso na fabricação de queijo, particularmente regional como forma de reduzir os custos do processo e do produto final.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteases

As proteases, também chamadas peptidases ou proteinases, constituem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas em peptídeos. Estes biocatalisadores podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, condições ótimas de pH e aminoácidos presentes no sítio ativo (BACH et al., 2012).

Em relação ao mecanismo catalítico as proteases são classificadas em exopeptidases quando atuam nas extremidades das cadeias polipeptídicas, clivando ligações peptídicas N- ou C-terminal. As proteases classificadas como endopeptidases agem nas ligações peptídicas internas das cadeias protéicas, constituindo o grupo de maior importância industrial (JOSHI; SATYANARAYANA, 2013).

Outra forma de classificação das proteases leva em consideração a faixa de pH de atuação da enzima, diferenciando-as em ácidas, neutras ou alcalinas. As ácidas incluem, principalmente as aspartatoprotease que apresentam atividade na faixa de pH de 2 a 6. As proteases neutras demonstram atividade na faixa de pH entre 6 e 8, sendo representadas, principalmente pelas, cisteínoproteases, metaloproteases e serinoproteases. As proteases alcalinas apresentam maior atividade em pH entre 9 e 11 e incluem, principalmente as serinoproteases (SINGHAL; NIGAM; VIDYARTHI, 2012; INÁCIO et al., 2014).

Baseado nos aminoácidos e metais presentes no sítio ativo, as proteases podem ser classificadas em seis grupos principais: serinoprotease (serina), cisteínoprotease (cisteína), aspartatoprotease (ácido aspártico), metaloprotease (íons metálicos), treoninoprotease (treonina) e glutaminoproteases (ácido glutâmico) (LI et al., 2013).

A evolução orgânica no sítio catalítico demonstrada pelo grupo das proteases foi uma ferramenta que contribuiu para que essas enzimas participassem de diferentes reações bioquímicas (ERJAVEC et al., 2012). Essa característica foi fundamental para a ampla utilização das proteases em diferentes setores industriais, pois várias reações bioquímicas podem ser catalisadas por esse grupo de enzimas (SUGANTHI et al., 2013).

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, representando 65% do mercado global e são amplamente utilizadas na produção de queijos, amaciamento de carnes, produção de hidrolisados protéicos, em produtos de panificação, elaboração de detergentes, formulações médicas, beneficiamento do couro e da seda, tratamento

de águas residuais e na recuperação da prata (VIJAYARAGHAVAN et al., 2014; BANO; DAHOT; NAQVI, 2016).

A ocorrência de proteases em todos os organismos vivos indica o seu importante papel nas funções metabólicas e reguladoras essenciais em muitos processos biológicos. As proteases catalisam a hidrólise de proteínas em peptídeos e aminoácidos para subsequente absorção, contribuindo para o crescimento e proliferação celular. Esses biocatalisadores também regulam atividade de muitas proteínas, modulam as interações proteína-proteína e contribuem para a geração e transdução de sinais de amplificação molecular. A regulação da expressão gênica, a replicação de DNA, o transporte de proteínas e diferenciação celular também estão relacionados com a ação das proteases (SABOTIČ; KOS, 2012).

Dentre as fontes de peptidases, os micro-organismos são considerados excelentes produtores de enzimas devido ao elevado rendimento de proteases purificadas e a sua ampla gama de propriedades bioquímicas e catalíticas. Além disso, as enzimas produzidas por micro-organismos são geralmente extracelulares, facilitando sua recuperação no final do bioprocessamento (ORTIZ et al., 2016). Muitas espécies de micro-organismos são comumente reconhecidas como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (MUSHTAQ et al., 2015), por isso são investigados para aplicação na indústria de alimentos, inclusive quanto à produção de proteases coagulantes.

2.2 Leite

O leite é uma emulsão de gorduras em água estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas. Este alimento possui alto valor biológico, pois fornece aos mamíferos, nutrientes como, proteínas, lipídios, glicídios, minerais e vitaminas que são essenciais para o desenvolvimento animal. Além disso, as características do leite influenciam no rendimento, nos benefícios nutricionais e nas propriedades estruturais e físico-químicas de seus produtos derivados (YE, 2011). Segundo Sabahelkhier et al. (2012) a composição química do leite das espécies de mamíferos é influenciada por fatores genéticos, fisiológicos e nutricionais, além das condições ambientais (Quadro 1).

Quadro 1. Composição química de diferentes tipos de leite.

Tipo de leite	Proteína (%)	Lactose (%)	Lipídios (%)	Cinza (%)	Umidade (%)
Humano	1,25	6,95	3,20	0,21	88,25
Cabra	3,30	4,40	3,90	0,70	88,00
Camelo	2,95	4,30	3,60	0,75	88,35
Vaca	3,40	4,80	3,75	0,71	87,23
Ovelha	6,35	5,00	6,90	0,85	80,70

Fonte: Sabahelkhier et al. (2012).

As proteínas do leite fornecem cálcio, fósforo, aminoácidos, imunoglobulinas, para o recém-nascido. Estes biocompostos são distribuídos em duas grandes classes, as caseínas que representam 80% das proteínas do leite e as proteínas do soro que correspondem aos 20% restantes do conteúdo proteico. As caseínas consistem de quatro proteínas principais: α_1 , α_2 , β e κ -caseína, representando 15%, 4%, 11%, 4%, respectivamente (LIVNEY, 2010).

A β -lactoglobulina é peptídeo presente em maior concentração do soro (45% a 57%), representando 3,2 g/L no leite bovino. Já a α -lactalbumina, em termos quantitativos é o segundo peptídeo do soro (15% a 25%) do leite bovino (SGARBIERI, 2005). Os percentuais dos valores das proteínas que constituem diferentes tipos de leite podem variar em função da raça dos animais, da ração fornecida e do país de origem (BITTANTE et al., 2012). No quadro 2 está demonstrado o conteúdo protéico do leite bovino.

Quadro 2. Principais proteínas do leite bovino.

Proteínas	Quantidade no leite (g/L)
CASEÍNAS	24-28
α_{s1}	12-15
α_{s2}	3-4
β	9-11
κ	3-4
PROTEÍNAS DO SORO	5-7
β -lactoglobulina	2-4
α -lactoalbumina	1-1,5
Albumina sérica	0,1-0,4
Imunoglobulinas	0,6-1,0
Lactoferrina	~0,1
PROTEÍNAS DAS MEMBRANAS DOS GLÓBULOS DE GORDURA	~0,4
Total de proteínas do leite (%)	30-35

Fonte: Livney (2010).

As caseínas (CN) são fosfoproteínas insolúveis em pH 4,6 que além da função nutricional, auxiliam no transporte de cálcio pelo epitélio mamário sem provocar calcificação.

Essas proteínas estão presentes no leite na forma de estruturas coloidais - micelas – que tem como funções: fluidizar as moléculas de CN, solubilizar cálcio e fosfato, além de serem responsáveis pela estabilidade térmica do leite (FARRELL et al., 2006; FOX; BRODKORB, 2008). Na indústria de laticínios as CN são os componentes mais importantes do leite porque influenciam nas características sensoriais, nutricionais e na textura de produtos lácteos, como o leite líquido, o queijo e o iogurte (DE KRUIF et al., 2012).

Muitos modelos de estruturas micelares têm sido propostos, mas ainda são considerados imprecisos. O consenso é que a estrutura interna da micela de CN seja formada principalmente por α_1 , α_2 , β -CN e nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal. Contudo a κ -CN está localizada preferencialmente na superfície micelar (DALGLEISH, 2011).

Dentre os modelos de estrutura micelar que são aceitos pela comunidade científica destaca-se o proposto por Walstra (1999) (Figura 1). Nesse modelo a micela possui formato esférico e sua superfície não se apresenta lisa. A micela é formada de subunidades menores, denominadas submicelas, constituídas principalmente por caseína. As submicelas permanecem ligadas por aglomerados (*clusters*) de fosfato de cálcio que servem como “cimento” para manter as submicelas ordenadas. As submicelas se agregam até a formação completa da micela, em que a κ -caseína se posiciona na superfície. A porção C-terminal da κ -caseína projeta-se para fora da micela formando uma camada esponjosa que previne a agregação de mais submicelas, finalizando o crescimento micelar, e é também responsável pela estabilidade da micela contra floculação no leite devido à repulsão eletrostática e impedimento estérico (WALSTRA, 1999; SGARBIERI, 2005).

O elevado teor de prolina torna as estruturas secundárias ou terciárias das CN pouco organizadas. Isso explica a estabilidade destas proteínas contra desnaturação pelo calor, porém torna-as mais susceptíveis à proteólise. As regiões polares e apolares das cadeias peptídicas da CN não são uniformemente distribuídas, conferindo-lhes uma estrutura anfifílica (DE KRUIF; GRINBERG, 2002).

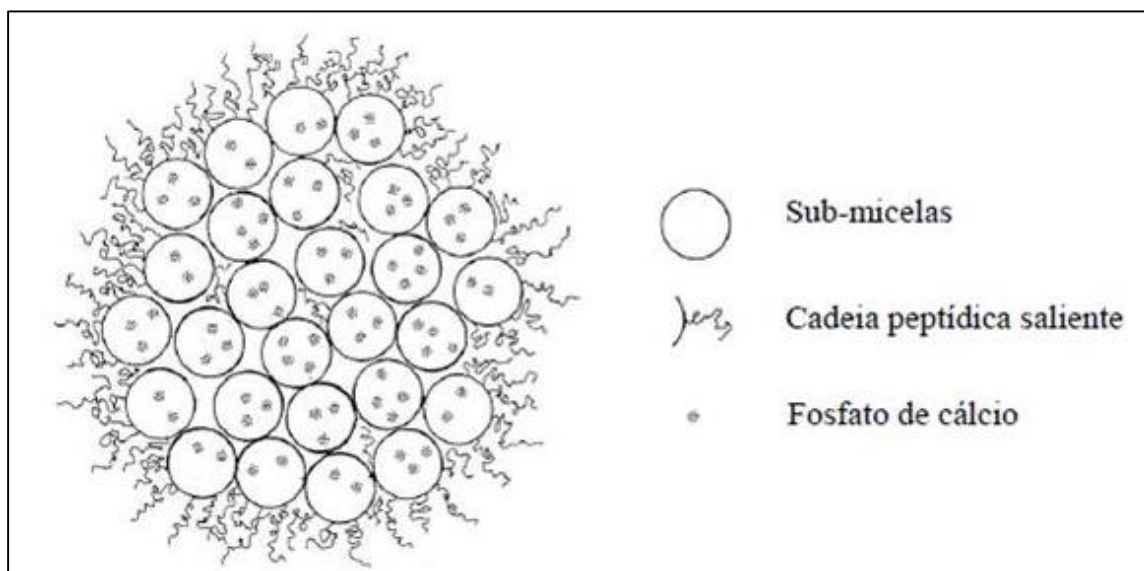


Figura 1. Corte transversal da micela de caseína no modelo de submicelas
Fonte: Walstra, 1999

Os conteúdos de prolina e de fosfato, constituem a base para a capacidade de caseínas formarem micelas. Os grupos fosfato são esterificados nas caseínas via o grupo hidroxila da serina. Estes resíduos de fosfoserina se ligam ao cálcio, que por sua vez se unem ao fosfato de cálcio coloidal. Estas ligações contribuem para unir as caseínas e formar as micelas. As concentrações de proteínas e cálcio geralmente encontradas no leite causam a precipitação de α s1-CN, α s2-CN, e β -CN pela ligação do cálcio aos resíduos de fosfoserina (HALLÉN, 2008).

A κ -CN, no entanto possui apenas um grupo fosfoserina, tornando-a insolúvel ao cálcio, o que permite sua interação e consequente estabilização das outras caseínas para dar início à formação de micelas e propiciar um estado coloidal estável (FARRELL et al., 2006).

O interesse na caseína micelar mantém-se constante ao longo dos anos, e pesquisas sobre o assunto continuam a ser realizadas, uma vez que muitas das propriedades tecnologicamente importantes do leite, por exemplo, a cor branca, a estabilidade ao calor, ao etanol e a coagulação pelo coalho são devidos às propriedades das micelas de caseína (FOX; BRODKORB, 2008).

2.3 Processo de coagulação do leite

Dentre os derivados do leite o queijo se destaca como um dos produtos mais consumidos no mundo. Este produto lácteo constitui uma boa fonte de proteína, vitaminas e minerais, particularmente de cálcio e de fósforo, que são componentes essenciais na alimentação humana. O queijo pode ser consumido como o componente principal de uma refeição, como sobremesa, como lanche, como condimento, ou como ingrediente alimentar.

Apesar de existirem mais de 500 tipos de queijo, novas variedades continuam a ser desenvolvidas para atender a demanda por alimentos saudáveis (EL-BAKRY; SHEEHAN, 2014).

O coalho é um complexo enzimático, constituído por uma mistura de enzimas proteolíticas, que tem sido utilizado na indústria de queijos há muitos anos. Por definição o coalho é o extrato obtido do abomasso de jovens vitelos abatidos, sendo constituído principalmente por quimosina (E.C 3.4.23.4) e pepsina (E.C 3.4.23.1). A quimosina representa mais de 90% do rendimento total de enzima extraída do estômago de bezerros jovens, porém no animal adulto tende a desaparecer, enquanto a concentração de pepsina aumenta (ANDREN, 2011).

A quimosina bovina continua sendo considerada como coagulante padrão, devido à sua alta especificidade para clivar a ligação fenilalanina (105) e metionina (106) da κ -caseína o que resulta em uma alta razão entre a atividade coagulante e a atividade proteolítica (HAYALOGU et al., 2014; CORRONS et al., 2012). Coalhos microbianos são proteinases aspárticas derivadas de fungos ou fontes bacterianas, tais como *Rhizomucor pusillus*, *R. miehei*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Irpex lactis*, e tem especificidade comparável com a quimosina, mas com maior estabilidade térmica (MAZORRA-MANZANO et al., 2013).

Quimosinas recombinantes obtidas de fungos e bactérias têm sido utilizadas em escala comercial para fabricação de queijos. As proteases coagulantes de *R. miehei* têm sido expressas em *A. oryzae* e a quimosina de bezerro foi adicionada geneticamente em espécies de *Kluyveromyces lactis*, *A. nidulans*, *A. niger* e *Trichoderma reesei* (PANAYOTOV et al., 2013; YEGIN; DEKKER, 2013). A protease aspártica de *P. ostreatus* expressa em *Pichia pastoris* exibiu elevada atividade coagulante, conforme relatado por Yin et al. (2014).

A qualidade de enzimas utilizadas na fabricação de queijo influencia na biotransformação dos componentes do leite e no processo de formação do coalho, determinando as propriedades organolépticas do produto lácteo acabado (ABDELGAWAD et al., 2014).

A coagulação enzimática do leite, que é uma etapa fundamental no processo de fabricação de queijos, pode ser dividida em etapas. A primeira etapa a ser executada é a desestabilização da estrutura micelar das caseínas do leite, por enzimas proteolíticas coagulantes. Neste processo a quimosina cliva a κ -caseína especificamente entre as unidades de fenilalanina (105) e metionina (106), resultando em duas frações, a para- κ -caseína insolúvel

que permanece associada à micela de caseína, e um caseinomacropeptídeo (CMP) solúvel que se difunde no soro do leite (YEGIN et al., 2011).

Na etapa não enzimática, a κ -caseína perde a capacidade de estabilizar a estrutura micelar e as frações α e β precipitam, na presença de cálcio, formando o paracaseinato de cálcio. O cálcio ajuda na coagulação por criar condições isoeletricas e por agir como uma ponte entre as micelas. A coagulação se dá quando aproximadamente 86% da κ -caseína foi hidrolisada. Esta fase é sensível à temperatura, pH do meio e concentração de íons Ca^{2+} (BADGUJAR; MAHAJAN, 2014; THORN et al., 2015).

Os requisitos para a seleção de novas fontes de proteases coagulantes são as propriedades enzimáticas específicas que devem ser semelhantes aos da enzima padrão, a quimosina, ou seja, devem apresentar elevada atividade de coagulação do leite e baixa atividade proteolítica, que poderia resultar na proteólise inespecífica de caseína. Um dos principais índices utilizados na seleção de novas proteases coagulantes é a razão coagulante, entre a atividade coagulante e a proteolítica (SHAMTSYAN et al., 2014).

2.4 Fontes de enzimas coagulantes

A atividade coagulante representa a especificidade da atividade proteolítica, ou seja, está relacionada com a clivagem da ligação fenilalanina (105) - metionina (106) da caseína. Já a atividade proteolítica envolve a hidrólise inespecífica de qualquer ligação peptídica da caseína que o coagulante possa apresentar. Portanto, o valor da razão coagulante deve ser sempre alto para que não ocorra proteólise inespecífica excessiva durante a produção de queijos, formação de estruturas de gel fracas, alta perda de proteína/gordura para o soro e baixo rendimento de matéria seca nos queijos (CIPOLAT-GOTET et al., 2012; BØRSTING et al., 2014).

As proteases coagulantes podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (Quadro 3). A elevação da produção mundial de queijo, a escassez e o elevado preço do coalho tradicionalmente extraído de bezerros, a rejeição das proteases geneticamente modificadas e alteração do estilo de vida dos consumidores tem incentivado a busca por novas fontes de enzimas, destacando-se o interesse por coagulantes microbianos (EL-BAKY et al., 2011; LEITE JÚNIOR; TRIBST; CRISTIANINI, 2014; WANG et al., 2015).

Quadro 3. Fontes de proteases coagulantes.

Fontes	Referências
VEGETAIS	
<i>Actinidia deliciosa</i>	Grozdanovic et al. (2013)
<i>Artocarpus altilis</i>	Soares et al. (2015)
<i>Balanites aegyptiaca</i>	Beka et al. (2014)
<i>Bromelia hieronymi</i>	Bruno et al. (2010)
<i>Calotropis procera</i>	Oseni; Ekperigin (2013)
<i>Citrus aurantium</i>	Mazorra-Manzano et al. (2013)
<i>Cryptostegia grandiflora</i>	Freitas et al. (2016)
<i>Cucumis melo</i>	Mazorra-Manzano et al. (2013)
<i>Cynara scolymus</i>	Esposito et al. (2016)
<i>Euphorbia nivulia</i>	Badgujar; Mahajan (2014)
<i>Ficus religiosa</i>	Kumari et al. (2012)
<i>Helianthus annuus</i>	Assia et al. (2016)
<i>Zingiber officinale</i>	Gagaoua; Hoggas; Hafid (2015)
ANIMAIS	
<i>Bubalus bubalis</i>	Ahmed et al. (2013)
<i>Camelus dromedarius</i>	Saliha et al. (2011)
<i>Capra hircus</i>	Kumar et al. (2006)
<i>Crustaceans Munida</i>	D'Ambrosio et al. (2003)
MICROBIANAS	
Bactérias	
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ahmed; Helmy (2012)
<i>Bacillus sp.</i>	Lemes et al. (2016)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Ahmed et al. (2016)
<i>Bacillus subtilis</i>	Narwal et al. (2017)
<i>Paenibacillus spp.</i>	Hang et al. (2016)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Imdakim et al. (2015)
Fungos	
Microfungos	
<i>Amylomyces rouxii</i>	Yu; Chou (2005)
<i>Aspergillus flavo furcatis</i>	Alecrim et al. (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Castro et al. (2014)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Patil et al. (2012); Vishwanatha et al. (2010)
<i>Cryptococcus sp</i>	Rao et al. (2011)
<i>Mucor mucedo</i>	Ibrahim et al. (2015)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Hashem (2000)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Hayaloglu; Karatekin; Gurkan (2014); Foda et al. (2012)
<i>Rhizomucor nainitalensis</i>	Khademi et al. (2013)
<i>Rhizopus microsporus</i>	Sun et al. (2014)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Kumar et al. (2005)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	Merheb-Dini et al. (2010)
Macrofungos	
<i>Coprinus lagopides</i>	Shamtsyan et al. (2014)
<i>Hericium erinaceum</i>	Nakamura et al. (2014)
<i>Piptoporus soloniensis</i>	El-Baky et al. (2011)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Yin et al. (2014); Lebedeva; Proskuryakov (2009)
<i>Schizophyllum commune</i>	Okamura-Matsui et al. (2001)
<i>Termitomyces clypeatus</i>	Majumder; Banik; Khowala (2015)

As preparações enzimáticas oriundas de plantas apresentam alta atividade proteolítica originando peptídeos de cadeia curta em grande quantidade, condição que interfere na textura e no sabor do queijo e, por isso, são considerados inadequados para serem utilizados na indústria de laticínios (GROZDANOVIC; BURAZER; GAVROVIC-JANKULOVIC, 2013).

Entre as diversas fontes de protease, espécimes de cogumelos (Figura 2) representam uma fonte alternativa dessas enzimas devido ao comportamento fisiológico, entre outros fatores, como o padrão de crescimento e adaptação em diferentes condições de cultivo. Em escala laboratorial ou em processos industriais, enzimas hidrolíticas extracelulares, como as proteases são obtidas por fermentação em meio líquido ou em matriz sólida e recuperadas no final do bioprocessamento (GUPTA et al., 2008; NAKAMURA et al., 2011). Estes aspectos associados ao fato dos fungos serem fontes renováveis de compostos bioativos determinam a preferência por esses biocatalisadores àqueles de origem animal e vegetal (ORTIZ et al., 2016).



Figura 2. *Agaricus vidoceosquamulosus*: A- Basidioma; B- Lamelas; C- Basídio, corado com azul de lactofenol (aumento de 400x); D- Basidiosporos corados com reagente de Melzer (aumento de 400x).

Fonte: próprio autor

2.5 Queijo Minas frescal

A Portaria N° 352 de 1997 e a Instrução Normativa n° 04 de 2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) definem o queijo Minas frescal como “o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado um queijo semi-gordo, de muito alta umidade que deve ser consumido fresco” (BRASIL, 2004).

O queijo minas frescal é um produto lácteo genuinamente brasileiro, sendo o quarto tipo de queijo mais consumido no Brasil. O quantitativo de lipídios do queijo minas frescal tradicional é inferior ao de outros queijos, como o requeijão cremoso, o prato e o muçarela,

justificando a expansão de seu consumo entre os brasileiros que buscam alimentos mais saudáveis (SPADOTI et al., 2016).

O processo de elaboração do queijo minas frescal é relativamente simples e são utilizados equipamentos tradicionais, características que contribuem para o aumento do número de indústrias produtoras deste derivado do leite. No comércio, o queijo minas frescal é vendido em formato cilíndrico, pesando de 0,3 kg a 5 kg (MAGENIS et al., 2014).

Pequenos e médios empresários se destacam com os principais produtores de queijo Minas frescal. Devido ao elevado conteúdo de umidade, ausência de conservantes químicos, falta de boas práticas de fabricação e manipulação intensa, pesquisas têm demonstrado a ocorrência de elevada contaminação microbiana que resultam em intoxicações e infecções aos consumidores (PINTO et al., 2011; MARTINS; REIS, 2012; VINHA et al., 2016; GARCIA et al., 2017).

Estudos têm demonstrado diferenças na composição físico-química e nutricional de queijos Minas frescal produzidos no Brasil (RICARDO et al., 2011; MAGENIS et al., 2014; OLIVEIRA; SILVA; PASCOAL, 2014; SANTOS et al., 2015). As variações observadas na composição centesimal de queijos Minas frescal ocorrem devido a diferenças no processamento industrial relacionadas com a não padronização dos fermentos, da utilização de diferentes temperaturas de coagulação do leite e a utilização ou não de prensagem da massa coagulada (BRIGIDO et al., 2004).

2.6 Processos fermentativos

Um processo importante para obtenção de diversos bioprodutos continua sendo a fermentação. Neste bioprocessos acompanha-se o desenvolvimento do micro-organismo e a recuperação de diversos produtos, tais como biomassa, vitaminas, hormônios, pigmentos, enzimas, biosurfactantes e biopesticidas (RAJORIYA; GUPTA, 2016).

A fermentação semissólida (FSs), ou em matriz sólida, é definida como o processo fermentativo que envolve a utilização de uma matriz sólida em que há ausência ou baixa quantidade de água livre, no entanto, o substrato deve conter umidade suficiente para a manutenção do crescimento e do metabolismo do micro-organismo (SINDHU et al., 2015).

A FSs simula as condições de vida reais de fungos, constituindo um dos processos biotecnológicos mais antigos utilizados na obtenção de bioprodutos. Este processo tem sido

utilizado na produção de enzimas, metabólitos, esporos e biomassa. No entanto, a aplicação industrial de FSs ainda sofre devido à dificuldade de recuperação e purificação do produto devido à heterogeneidade dos meios de fermentação, dificuldade de produção de biocompostos em larga escala, perdas da enzima nos resíduos sólidos e a necessidade de longos períodos de fermentação (UZUNER; CEKMECELIOGLU, 2015).

Embora já existam diversos formatos de fermentador, ainda há dificuldade de separar completamente o micélio dos substratos sólidos, a determinação direta da biomassa do fungo tem sido estimada por métodos indiretos como, mudanças nos constituintes de biomassa (quitina, glucosamina e ergosterol), variação de peso seco, bem como análise digital de imagens (ZHANG et al. 2013).

O método de fermentação submersa (FSm) tem sido utilizado com êxito para a produção de vários metabólitos. Uma das principais vantagens de cultivos submersos é a base tecnológica bem estabelecida para escalonamento de processos a nível industrial, devido ao controle de pH, temperatura, oxigênio e disponibilidade de nutrientes. Outra vantagem é que a recuperação do produto é mais simples o que facilita as etapas posteriores de purificação do bioproduto. A reprodutibilidade dos cultivos submersos muitas vezes não é contestada pela heterogeneidade do meio de fermentação, uma vez que na maior parte utiliza fontes de carbono e nitrogênio solúveis (HANSEN et al., 2015).

Para obtenção de peptidases coagulantes produzidas por fungos filamentosos, tanto a FSs como a FSm são bastante empregadas. A produção de protease ácida por *Rhizopus oryzae* em FSs utilizando farelo de arroz como suporte foi relatada por Kumar et al. (2005). A enzima foi purificada, caracterizada e demonstrou elevada atividade coagulante (760U/mL).

Vishwanatha et al. (2010) estudaram a produção de proteases coagulante por *A. oryzae*, utilizando FSs. Os resultados demonstraram que a enzima purificada apresentou elevada atividade coagulante, baixa atividade proteolítica e pouca estabilidade térmica, reforçando a utilidade potencial da enzima como um substituto para o coalho de vitelo na fabricação do queijo.

Yegin et al. (2010) investigaram as condições de crescimento de *Mucor mucedo* em cultivo submerso para avaliar a produção de proteases coagulantes. A máxima atividade coagulante foi verificada nas seguintes condições: 48 h de fermentação, a 24 °C, utilizando meio de cultivo com pH 4,5 e velocidade de agitação de 220 rpm. A glicose a 1 % foi a melhor fonte de carbono e caseína a 0,5 % foi a melhor fonte de nitrogênio.

A peptidase aspártica produzida por *Piptoporus soloniensis* em FSm, clivou a κ -caseína de forma semelhante à quimosina, hidrolisou lentamente a β -caseína e foi considerada como um possível substituto da quimosina bovina (EL-BAKY et al., 2011).

Foda et al. (2012) utilizaram vinte resíduos agroindustriais para a produção de proteases coagulantes por diferentes espécies de *Rhizomucor*. Dentre as espécies de fungos avaliadas *Rhizomucor miehei* cultivado em farelo de trigo produziu peptidases com atividade coagulante de 33.350 SU/g, umidade de 50%, a 40 °C, por 72 horas.

Os extratos de *A. oryzae* cultivado em mistura de farelo de trigo e arroz (7:3, m/m) demonstraram atividade coagulante de 513,1 (U/gm), pH 7,5, 120 horas de incubação a 30 °C, conforme relatado por Patil; Kulkarni; Kininge (2012).

Castro;Nishidi;Sato (2014) realizaram o estudo e a caracterização bioquímica de peptidases coagulantes de *A. niger* cultivado em farelos de trigo, soja e algodão. Os valores de razão coagulante foram, em ordem decrescente 15,24 (farelo de trigo), 6,24 (farelo de algodão) e 0,38 (farelo de soja), suplementados com hemoglobina de sangue bovino. As proteases apresentaram atividade ótima na faixa de pH 3-4 e temperatura de 50 °C.

Nakamura et al. (2014) avaliaram 20 espécies de cogumelos comestíveis como fonte de protease coagulante. Os macrofungos foram cultivados em matriz sólida contendo farelo de trigo. Dentre as espécies estudadas, *Hericium erinaceum* apresentou significativa atividade coagulante (241 U/mL). Contudo os extratos de *Auricularia auricula-judae*, *Grifola frondosa*, *Laetiporus sulphureus*, *L. edodes*, *P. ostreatus* também coagularam o leite bovino.

Em estudo realizado por Shamtsyan et al. (2014) 11 espécies de cogumelos produziram e excretaram protease coagulante em meio líquido. Atividade coagulante significativa foi constatada para *Coprinus lagopides* (13,30 U/mL). Porém, *Trametes suaveolens*, *Irpex lacteus*, *Flammulina velutipes*, *G. frondosa*, *T. ochracea*, *Fomes fomentarius*, *G. lucidum*, *Bjerkandera adusta*, *Panus conchatus* e *P. ostreatus* também produziram coagulante, nas condições avaliadas.

Sun et al. (2014) investigaram a produção de quimosina por *Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis*, em cultivo submerso. As propriedades demonstradas pela quimosina purificada, como a elevada atividade coagulante de 1.001 (U/mL), sugerem que esta protease tem potencial para ser utilizada na indústria de queijo.

Ayana; Ibrahim; Saber (2015) avaliaram o potencial de 15 espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Hirsutella*, *Mucor*, *Penicillium* e *Trichoderma* como

produtores de peptidases coagulantes em meio líquido. Nas condições estudadas *Mucor mucedo* se destacou como fonte de protease apresentando atividade coagulante de 3,51 (U/mL), após 48 de incubação.

Majumder; Banik; Khowala (2015) usaram FSm para produção de enzimas coagulantes utilizando o fungo comestível *T. clypeatus*. Os resultados encontrados demonstraram que a enzima purificada pertencia ao grupo das metaloproteases e apresentava elevada atividade coagulante (333,33 U/mL) e razão coagulante (64).

2.7 Resíduos lignocelulósicos

A FSs é uma alternativa eficaz em relação à tecnologia de fermentação à base de meios de cultura líquidos. Os substratos utilizados em FSs fornecem os nutrientes básicos para os micro-organismos e servem como suporte para as células, fornecendo habitat adequado para fungos produzirem biocompostos principalmente quando são utilizados resíduos agroindustriais (VELMURUGAN et al., 2011).

O reaproveitamento da biomassa remanescente dos processos empregados na agricultura e agroindústria evita a acumulação dos resíduos, contribui para o controle da poluição, proporciona melhores condições de saúde pública, minimiza a dependência de fertilizantes químicos importados e viabiliza a sustentabilidade do crescimento da produção agrícola (BRASIL, 2012a; ALANANBEH et al., 2014).

Muitos resíduos lignocelulósicos, como palhas, cascas, caules, pedúnculos, madeiras de coníferas, farelo de trigo, soja, algodão, arroz, bagaço de laranja, bagaço de cana, resíduos de indústrias de polpa e papel têm sido usados como substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial (SILVA et al., 2005; NUNES et al., 2013). Assim, pode-se, com seu aproveitamento, agregar valor a estes produtos e reduzir custos de produção das enzimas (POSTEMSKY; DELMASTRO; CURVETTO, 2014).

A produção e os resíduos lignocelulósicos gerados em 2009, além da projeção das principais culturas cultivadas no Brasil para os anos de 2021/2022 estão demonstrados no Quadro 4.

Quadro 4. Produção e resíduos lignocelulósicos gerados (2009) e projeção para produção (2021/2022) das principais culturas produzidas no Brasil.

Produto	Produção total colhida (toneladas) em 2009	Resíduos gerados/ano (toneladas) em 2009	Projeção para produção em 2021/2022 (mil toneladas)
Soja	57.345.382	41.862.129	88.913
Milho	50.745.996	29.432.678	70.4
Cana-de-açúcar (bagaço e torta de filtro)	671.394.957	201.418.487	ND
Feijão	3.486.763	1.847.984	4.093
Arroz	12.651.774	2.530.355	15.2
Trigo	5.055.525	3.033.315	6.937
Café	2.440.057	1.220.029	70.6
Cacau	218.487	83.025	ND
Banana	6.642.739	99.640	689
Laranja	18.385.991	8.825.276	19.3
Uva	1.365.720	300.459	1.780

Fonte: BRASIL (2012a); BRASIL (2012b); ND = não determinado.

Segundo dados do Instituto de Pesquisa Econômica e Aplicada (2012), na região norte, as atividades agrícolas e agroindustriais proporcionaram a formação de toneladas de resíduos, como por exemplo: soja (1.053.694), milho (738.670), cana de açúcar (607.763), arroz (191.879) e banana (12.193). Estes resíduos quando descartados no ambiente se tornam substratos para o desenvolvimento de micro-organismos oportunistas, proporcionando até o crescimento de fitopatógenos e patógenos humanos, muitas vezes transmissores de doenças.

O açaí é um dos frutos mais populares e consumidos na região Norte, sendo o Estado do Pará o maior produtor deste fruto no Brasil. Porém, a semente, que é o principal subproduto do processamento da indústria do açaí, ainda não possui tratamento adequado, sendo despejada em lixões ou nas próprias ruas (FARINAS et al., 2009).

Banana, goiaba e manga são frutos que geram consideráveis quantidades de resíduos durante seu processamento. A casca da banana corresponde a 40% do seu peso, gerando anualmente 83.537 toneladas de resíduos (ZHANG et al., 2005). No processamento da goiaba as sementes e parte da polpa não utilizada, representam 19.000 toneladas de resíduos por ano (NASCIMENTO et al., 2010). No beneficiamento da manga há o descarte do caroço e das cascas, resíduo que correspondente a 28-43% do peso total da fruta (KAUR et al., 2004).

Os resíduos oriundos da agroindústria, como cascas e bagaços geralmente são ricos em fibras e compostos bioativos que podem ser utilizados pelos micro-organismos para seu crescimento e produção de diversas enzimas (PANDA et al., 2016).

Stroparo et al. (2012) investigaram a produção de hidrolases por espécies de *Aspergillus* e *Penicilium* cultivados em resíduos agroindustriais. Neste estudo foi verificada produção de xilanases por *A. niger* J4 cultivado em bagaço de malte. A excreção de endoglucanases por *P. miczynskii* foi favorecida na presença da casca de abacaxi. O farelo de trigo induziu a síntese de amilase por *A. niger* J6.

Santos et al. (2012) avaliaram a produção de amiloglucosidase por *A. awamori* em meio sólido, utilizando como substrato resíduo do processamento de batata e de cenoura. Os autores concluíram que os meios de cultura utilizados podem ser considerados boas fontes para a produção de amiloglucosidase.

Oliveira et al. (2013) utilizaram resíduos de levedo de cerveja para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa, utilizando *Candida guilliermondi* e concluíram que o levedo constitui uma alternativa viável para a produção de lipases.

Resíduos agroindustriais também podem constituir meios de cultivo líquidos para a produção de enzimas. Manera et al. (2011) concluíram que avaliaram o emprego de soro de queijo e água de maceração do milho na produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*, por cultivo submerso, reduzem custos e propiciam a obtenção de elevada atividade enzimáticas.

A síntese de proteases por fungos filamentosos cultivados em resíduos industriais também é reportada na literatura científica. Cha et al., 2010 verificaram a produção de proteases por *P. eryngii* cultivado em bagaço de milho e verificaram que as proteases apresentaram elevado grau de especificidade para a fibrina.

Zanphorlin et al. (2011) relatam a purificação de uma nova protease alcalina a partir de um fungo termofílico, *Myceliophthora* sp, utilizando farelo de trigo como suporte no processo fermentativo. Os estudos demonstraram inibição da enzima purificada por PMSF, sugerindo que a enzima pertence à classe das serino-proteases.

Ravikumar et al. (2012) utilizaram a FSs para produção de proteases por *Pleurotus sajor-caju*. De todos os substratos testados, a farinha de milho foi considerada o melhor substrato para a produção de protease. Os outros substratos, farelo de trigo, farelo de arroz e grama verde comparativamente proporcionaram menor produção de protease.

Cunha et al. (2013) verificaram a produção de peptidases por *Trichoderma auroviride* utilizando bagaço de cana de açúcar. Oliveira et al. (2013) relataram a produção de proteases

por *Penicillium* sp, empregando-se resíduo de levedo de cerveja como meio de cultivo, em fermentação submersa.

Castro et al. (2014) utilizaram os farelos de trigo, soja e algodão como suporte para a produção de proteases por *A. oryzae*. Os resultados demonstraram que o farelo de trigo tem grande potencial como substrato para produção de proteases por *A. oryzae*.

Fonseca et al. (2014) relataram que casca de cupuaçu e semente de açaí quando suplementados com farelo de arroz, coroa e casca de abacaxi podem ser utilizados como substratos, em fermentação semissólida para produção de enzimas proteolíticas por *P. ostreatoroseus*.

Alecrim et al. (2015) utilizaram extratos obtidos de casca de cupuaçu e semente de açaí para produção, em cultivo submerso, de proteases coagulantes por *A. flavo furcatis*. Os resultados relevaram que, dentre os resíduos lignocelulósicos utilizados, a casca de cupuaçu suplementada com farelo de arroz foi o resíduo que mais estimulou a produção de proteases coagulantes por *A. flavo furcatis*.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a produção de proteases coagulantes por cogumelos comestíveis do acervo da Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, utilizando fermentação em meio líquido e em matriz sólida para selecionar uma espécie fonte dessas enzimas para fabricação de queijo em escala industrial.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Verificar o potencial de espécies de cogumelos comestíveis como fonte de proteases por fermentação submersa para selecionar uma espécie proteolítica coagulante;
2. Produzir proteases coagulantes por fermentação semissólida utilizando engaço de banana (*Musa* sp), exocarpos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum) e tucumã (*Astrocarium vulgare* Mart.), semente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e serragem de angelim (*Hymenolobium* sp. Ducke), suplementados com farelo de arroz (*Oryza sativa* L.);
3. Avaliar a toxicidade *in vitro* do extrato coagulante selecionado;
4. Verificar, na fermentação em estado sólido, a influência da idade, tamanho do inóculo, tempo de fermentação e pH do meio de cultivo na produção de peptidases coagulantes;
5. Caracterizar as proteases quanto à temperatura e pH ótimos, estabilidade à temperatura e ao pH e avaliar o efeito de íons e inibidores;
6. Produzir queijo do tipo Minas frescal para verificar a atividade coagulante da espécie produtora dos maiores níveis enzimáticos;
7. Determinar a composição físico-química e microbiológica do queijo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Organismos

Para caracterizar cogumelos comestíveis quanto à produção de proteases e selecionar uma espécie produtora de coagulante para a fabricação de queijo foram utilizadas culturas de *Pleurotus albidus* DPUA1692, *Auricularia mixotricha* DPUA 1695, *Ganoderma lucidum* DPUA 1694, *Lentinus citrinus* DPUA 1535, *Lentinus crinitus* DPUA 1693, *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, preservadas sob óleo mineral, provenientes do acervo da Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas-DPUA. De cada cultura preservada sob óleo mineral foram retirados fragmentos para inoculação em Caldo Glicosado (LACAZ et al., 2002). Para obtenção de cultura viável, fragmentos da massa micelial foram transferidos para BDA [ágar batata dextrose adicionado de extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placas de Petri. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por oito dias para posterior processamento e uso nos demais experimentos.

4.2 Produção de Protease por Fermentação Submersa

Para produção de proteases coagulantes das culturas de cada macrofungo obtidas no item 4.1, foram retirados fragmentos miceliais de 5mm (Ø) para inoculação em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido [GYP (20 g de glicose, 5 g de extrato de levedura, 15 g de peptona para cada 1000 mL de água)]. O meio líquido, pH 5,6 foi suplementado com 0,5 % de gelatina (p/v). A fermentação foi realizada a 30 °C, 150 rpm. Após cinco dias, a biomassa foi separada por filtração sob vácuo em papel de filtro Whatman no 1, seguindo as filtrações em membrana de éster de celulose de 0,45 µm (Ø) e em membrana polietersulfônica de 0,22 µm (Ø), respectivamente. No extrato bruto foi determinada a atividade proteolítica e coagulante.

4.2.1 Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada segundo Leighton et al., (1973). Como substrato foi utilizado 250 µL de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl a 150 µL do extrato enzimático bruto. A mistura-reação mantida durante 60 minutos a 25 °C e a reação interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v), procedendo-se a centrifugação a 4 °C (8.000xg/5 minutos). Do sobrenadante recuperado foi retirado 1,2 mL para homogeneização com 1,4 mL de NaOH 1M. O branco foi preparado mantendo-se nas mesmas condições da

amostra. Uma unidade de atividade de proteases foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,1 em 60 minutos.

4.2.2 Determinação da atividade coagulante

Com a finalidade de selecionar a espécie promissora quanto ao potencial coagulante, foram seguidas as metodologias de Kumar et al. (2005) e Palheta (2010). Como substrato foram utilizados 10 g de leite em pó desnatado dissolvidos em 100 mL de solução de CaCl_2 0,05 M. O pH dessa mistura foi ajustado para 5,8 utilizando-se solução de NaOH ou HCl 0.1 N, se necessário. Em seguida a mistura foi incubada a 40 °C e, após 15 minutos, foram retirados 5 mL para ser acondicionados em tubo de ensaio acrescido de 0,5 mL do extrato enzimático bruto.

O início da coagulação foi acompanhado com um cronômetro observando-se periodicamente a formação de pequenos coágulos na parede dos tubos de ensaio e o tempo inicial da coagulação registrado em segundos. Os experimentos foram realizados em triplicata, em banho-maria. A unidade de atividade de coagulação (U) foi definida como a quantidade de enzima que coagula 1,0 mL de leite, em 40 minutos, a 40 °C. A atividade coagulante e a razão coagulante (R) foram calculadas utilizando as equações 1 e 2, respectivamente (ALECRIM et al., 2015).

Equação 1:

$$U/\text{mL} = \frac{2400 \times S}{T \times E}$$

Equação 2:

$$R = \frac{\text{Atividade coagulante}}{\text{Atividade proteolítica}}$$

Onde: onde S é o volume de leite, T é o tempo necessário para formação do coágulo e E é o volume da enzima.

4.3 Produção de coagulante em Fermentação no Estado Sólido

O cogumelo que produziu proteases com atividade e razão coagulante significativas evidenciadas pela formação de coágulo forte, com separação de soro foi utilizada para produção de coagulante em matriz sólida.

4.3.1 Seleção do substrato para produção de coagulante em matriz sólida

Os resíduos lignocelulósicos para os cultivos no estado sólido foram higienizados e desidratados, no laboratório de Micologia da Ufam. Para avaliar o substrato indutor da síntese de protease com elevada razão coagulante, a fermentação em matriz sólida foi realizada utilizando 20 g de cada mistura de resíduo, conforme citado na tabela 1. O pH de cada mistura foi ajustado para 6,0 e a umidade corrigida para 60 %. Em seguida, cada mistura foi acondicionada em tubos de borosilicato (200 mm x 25 mm) formando uma coluna de 130 mm e os frascos foram esterilizados a 121 °C por 60 minutos. Após resfriamento dos meios de cultivo foram adicionados três discos miceliais de 5 mm (Ø) e o bioprocesso conduzido por 15 dias a 25 °C, no escuro.

Tabela 1. Resíduos Lignocelulósicos (RL) utilizadas na fermentação em matriz sólida para crescimento e produção de coagulante por cogumelos

Resíduos lignocelulósicos	Concentrações (% p/p)
EB	100
EB:FA	90:10
EB:FA	80:20
EC	100
EC:FA	90:10
EC:FA	80:20
ET	100
ET:FA	90:10
ET:FA	80:20
SA	100
SA:FA	90:10
SA:FA	80:20
SE	100
SE:FA	90:10
SE:FA	80:20

EB: engaço de banana; EC: exocarpo de cupuaçu; ET: exocarpo de tucumã;
FA: farelo de arroz; SA: semente de açaí; SE: serragem de angelim

Após constatar qual substrato estimulou a excreção de peptidases com significativa razão coagulante e visando obter maior quantitativo de enzimas para as análises subsequentes foram utilizados 200 g de resíduos (pH 6,0, umidade 60 %) no bioprocesso. Em seguida cada mistura foi acondicionada em sacos de polietileno para esterilização a 121 °C durante 1h. Posteriormente foram adicionados dez discos miceliais de 5 mm (Ø) e a fermentação em estado sólido conduzida por 15 dias, a 25 °C, no escuro. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.2 Extração e Filtração do extrato enzimático

As proteases produzidas por fermentação semissólida foram extraídas a 30 °C, em água destilada esterilizada na razão 1: 5 (substrato:água, p/v), mantendo-se 150 rpm. Após 30 minutos o extrato bruto foi recuperado por filtração sob vácuo em papel de filtro Whatman N° 1, seguindo as filtrações em membrana de éster de celulose (0,45 µm, Merck®) e em membrana polietersulfônica (0,22 µm, Kasvi®), respectivamente. A determinação da atividade coagulante foi realizada como descrito no item 4.2.2.

4.4 Teste de toxicidade

4.4.1 Linhagem e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizados fibroblastos humanos (MRC5) mantidos em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino a 10 % (v/v) e os antibióticos Ampicilina-Estreptomicina a 1% (p/v). As células foram acondicionadas em estufa com CO₂ a 5%, a 37 °C.

4.4.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade do extrato do cogumelo selecionado foi avaliada conforme metodologia descrita por Ahmed; Cogal; Walsh (1994). As células foram transferidas para placas com 96 poços na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço. Esta placa foi mantida a 37 °C com CO₂ a 5%, por 24 horas. Após este período as células foram tratadas na concentração única de 200 µg/ml de extrato do cogumelo, durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizado doxorubicina (20µM ou 34µg/mL) e como controle negativo foi utilizado DMSO 0,1% (v/v). Três horas antes do final de cada tempo de tratamento foi acrescentado 10 µL do Alamar Blue 0,4% (v/v) na concentração de 0,02% (v/v) por poço e a leitura das placas realizada em Leitor de microplaca na região de fluorescência em 465 nm e 540 nm. As imagens foram capturadas utilizando o programa Zen 2 da Carl Zeiss Microscópio GmbH Company® e os dados analisados no programa GraphPad prism 6.0. Neste teste o Alamar Blue (resazurina) de cor azul e não fluorescente, é reduzido à resofurina, de cor rosa e fluorescente, pelas células viáveis.

4.5 Avaliação dos parâmetros de fermentação para produção de proteases em meio líquido e matriz sólida

Para avaliar a influência da idade na produção de proteases, em meio líquido, pela espécie de cogumelo selecionada, foram utilizadas culturas com 2, 5, 8, 12 e 15 dias, cultivadas em BDA suplementado com extrato levedura a 0,5% (p/v). Na análise de volume de inóculo foram utilizados discos miceliais equivalentes a 2%, 4%, 10%, 20% e 40% (m/v).

Os parâmetros utilizados na avaliação das condições ótimas de produção de coagulante, em matriz sólida foram: influência da idade do inóculo (4, 7, 10, 13 e 16 dias), tamanho do inóculo (0,5%, 1,0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), pH inicial do meio de cultivo (5, 6, 7, 8, 9, 10) e tempo de fermentação (6, 8, 10, 12, 14, 16 dias).

4.6 Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease e do coagulante

Para avaliação do pH ótimo, as atividades proteolítica e coagulante foram determinadas em 25 °C e 40 °C, respectivamente, utilizando as seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80 °C.

Nos estudos de avaliação da estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:1) nas seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10) e mantidos a 25 °C por 24 horas. Após este período foram determinadas as atividades proteolítica e coagulante, nas condições ótimas de pH e temperatura. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80 °C, por 1 hora. Em seguida, foram determinadas as atividades proteolítica e coagulante, nas condições ótimas de análise. Os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos.

4.7 Efeito de inibidores de proteases e íons metálicos na atividade proteolítica e coagulante

O efeito de inibidores na atividade proteolítica e coagulante foi investigado utilizando 10 mM de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), 10 mM de ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), 10 mM de ácido iodoacético e 0,1 mM de Pepstatin, na mistura reacional. Os íons metálicos utilizados na concentração de 10 mM, na mistura reacional foram CaCl₂, CuSO₄,

FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl. As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura. A atividade enzimática residual foi comparada com o controle que foi incubado sem os inibidores e os íons metálicos e correspondeu a 100 % de atividade.

4.8 Produção de queijo em escala semi-industrial com proteases coagulante de cogumelo

O queijo Minas frescal elaborado com coagulante de *P. albidus* foi produzido de acordo com a metodologia utilizada na Fábrica de Laticínios Uirapuru, localizada no Km 24 da BR 174 – Am. O queijo foi produzido substituindo-se o coagulante comercial pelo extrato coagulante produzido por cogumelo em fermentação semissólida.

4.8.1 Determinação da composição centesimal do queijo

O queijo foi submetido à análise de composição centesimal, como citado a seguir:

- Umidade: determinada por dessecação em estufa com circulação de ar a 105 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante (A.O.A.C., 2005);
- Proteína total: determinada pela concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro *Kjeldahl*, aplicando o fator de conversão 6,38 (A.O.A.C., 2005);
- Cinzas: determinadas por incineração do material em mufla a 550 °C até obtenção de peso constante (A.O.A.C., 2005);
- Lipídios: obtido com misturas de solventes a frio segundo o método *Bligh and Dyer* (A.O.A.C., 2005);
- Carboidratos totais: estimados por diferença entre o somatório das porcentagens de umidade, umidade, proteína, lipídios, cinzas (TACO, 2011);
- Energia: a energia total metabolizável = (4kcal/g de proteína) + (4kcal/g carboidratos totais) + (9kcal/g de lipídios), conforme preconizado pela TACO (2011).

4.8.2 Análise microbiológica do queijo

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

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando programa Minitab, versão 16.0 (Minitab, 2010). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGAWAD, A. R.; GUAMIS, B.; CASTILLO, M. Using a fiber optic sensor for cutting time prediction in cheese manufacture from a mixture of cow, sheep and goat milk. **Journal of Food Engineering**, v. 125, p. 157-68, 2014.

AHMED, G.; KHAN, S. A.; KHASKHELI, M.; QURESHI, M. A.; AHMAD, I. Production and properties of rennet from *Buffalo Calves* abomasam. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 23, p. 5-9, 2013.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; 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.

AHMED, S. A.; HELMY, W. A. Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 1, p. 69-76, 2012.

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

ALANANBEH, K. M.; BOUQELLAH, N. A.; KAFF, N. S. A. Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on date-palm leaves mixed with other agro-wastes in Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 616-625, 2014.

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

ANDREN, A. Cheese rennets and coagulants. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd ed. London: academic press. p. 574-578, 2011.

ASSIA, I. A. M.; NASR, I. A. M. A.; OMER, I. A. H. Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Food Science & Nutrition**, v. 4, n. 5. p. 733-741, 2016.

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

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

BACH, E.; SANT'ANNA, V.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, v. 47, p.2455-2462, 2012.

BADGUJAR, S. B.; MAHAJAN, R. Nivulian-II a new milk clotting cysteine protease of *Euphorbia nivulia* latex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 391-398, 2014.

BANO, S.; DAHOT, M. U.; NAQVI, S. H. A. Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. **Pakistan Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 3. p. 193-198, 2016.

BEKA, R. G; KRIER, F.; BOTQUIN, M.; GUIAMA, V. D.; DONN, P.; LIBOUGA, D. G.; MBOFUNG, C. M.; DIMITROV, K.; SLOMIANNY, M. C.; GUILLOCHON, D.; VERCAIGNE-MARKO, D. Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 25-31, 2014.

BITTANTE, G.; PENASA, M.; CECCHINATO, A. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6843-6870, 2012.

BØRSTING, M. W.; QVIST, K. B.; ARDÖ, Y. Influence of pH on retention of camel chymosin in curd. **International Dairy Journal**, v. 38, p. 133-135, 2014.

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

BRASIL. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada-IPEA. **Relatório de pesquisa**. Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor agrossilvopastoril e agroindústrias associadas, 2012a, 134p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - **Assessoria de Gestão Estratégica**. Brasil projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022, 2012b, 50p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. Brasília: **Diário Oficial da União** (Seção 1), 08/09/97.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 4, Altera o regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. Brasília: **Diário Oficial da União** (Seção 1), 05/03/2004.

BRUNO, M. A.; LAZZA, C. M.; ERRASTI, M. E.; LÓPEZ, L. M. I.; CAFFINI, N. O.; PARDO, M. F. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 695–701, 2010.

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

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Protease from *Aspergillus oryzae*: Biochemical characterization and application as a potential biocatalyst for production of protein hydrolysates with antioxidant activities. **Journal of Food Processing**, v. 2014, p. 11, 2014.

CHA, W. S.; PARK, S. S.; KIM, S. J.; CHOI, D. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6475-6481, 2010.

CIPOLAT-GOTET, A.; CECCHINATO, M.; DE MARCHI, M.; PENASA, G.; BITTANTE. Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6806-6819, 2012.

CORRONS, M. A.; BERTUCCI, J. A.; LIGGIERI, C. S.; LÓPEZ, L. M. I.; BRUNO, M. A. Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, p. 103-109, 2012.

CUNHA, M. N. C.; NASCIMENTO, J. C. S.; SOUZA-MOTTA, M. C.; ALBERTINI, A. V. P.; LIMA, C. A.; MARQUES, D. A. V.; PORTO, A. L. F. Production of enzymes by

filamentous fungus using sugarcane and sugarcane bagasse as substrate. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 11, n. 2, p. 227-234, 2013.

D'AMBROSIO, A.; ROSSANO, R.; UNGARO, N.; RICCIOA, P. Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 145-150, 2003.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265–2272, 2011.

DE KRUIF, C. G.; GRINBERG, V. Y. Micellisation of β -casein. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 210, p. 183-190, 2002.

DE KRUIF, C. G.; HUPPERTZ, T.; URBAN, V. S.; PETUKHOV, A. V. Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 171–172, p. 36-52, 2012.

EL-BAKRY, M.; SHEEHAN, J. J. Analysing cheese microstructure: A review of recent developments. **Journal and Food and Engineering**, v. 125, p. 84-96, 2014.

EL-BAKY, H. A.; LINKE, D.; NIMTZ, M.; BERGER, R. G. PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10311–10316, 2011.

ERJAVEC, J.; KOS, J.; RAVNIKAR, M.; DREO, T.; SABOTIČ, J. Proteins of higher fungi- from forest to application. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 5, 2012.

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

FARINAS, C. S.; RODRIGO, R. M. S.; BERTUCCI NETO, V.; PESSOA, J. D. C. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**: Aproveitamento do caroço do açaí como substrato para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009.

FARRELL, H. M.; MALIN, E.L., BROWN, E. M.; QI, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 135-147, 2006.

FODA, M. S.; MOHARAM, M. E.; RAMADAN, A.; EL-BENDARY, M. A. Over production of milk clotting enzyme from *Rhizomucor miehei* through adjustment of growth under solid state fermentation conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 8, p. 579-589, 2012.

FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F. TEIXEIRA, M. F. S. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, p. 1227-1236, 2014.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677-684, 2008.

FREITAS, C. D. T.; LEITE, H. B.; OLIVEIRA, J. P. B.; AMARAL, J. L.; EGITO, A. S.; VAIRO-CAVALLI, S. LOBO, M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; RAMOS, M. V. Insights into milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. **Food Research International**, v. 87, p. 50-59, 2016.

GAGAOUA, M.; HOGGAS, N.; HAFID, K. Three phase partitioning of zingibain, a milk-clotting enzyme from *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 245-252, 2015.

GARCIA, E. P.; SILVA, F. A. R.; PAIVA FILHO, O. M.; SILVA, D. H. L.; BRAGA, A. V. U.; MORELLI, S. A.; SANTOS, R. F. S. Qualidade microbiológica de queijos Minas frescal e ricota comercializados na região metropolitana de Campinas-SP. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 264/265, p. 132-137, 2017.

GROZDANOVIC, M. M.; BURAZER, L.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M. Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. **International Dairy Journal**, v. 32, p. 46-52, 2013.

GUPTA, AMIT.; JOSEPH, B.; MANI, A.; THOMAS, G. Biosynthesis and properties of na extracellular thermostable serine alkaline protease from *Virgibacillus pantothenicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 237-243, 2008.

HALLÉN, E. Coagulation Properties of Milk. **Acta Universitatis agriculturae Sueciae**, v. 75, 2008.

HANG, F.; WANG, Q.; HONG, Q.; LIU, P.; WU, Z.; LIU, Z.; ZHANG, H.; CHEN, W.; Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from *Paenibacillus* spp. BD3526. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 547-54, 2016.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation, **Process Biochemistry**, 2015.

HASHEM, A. M. Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 219-222, 2000.

HAYALOGLU, A. A.; KARATEKIN, B.; GURKAN. Thermal stability of chymosin of microbial coagulant in the manufacture of Malatya, a Halloumi type cheese: Proteolysis, microstructure and functional properties. **International Dairy Journal**, v. 38, p. 136-144, 2014.

IBRAHIM, A. A.; ABOU, A.; AMAL, E. I.; WESAM, I. A. S. Statistical optimization of milk clotting enzyme biosynthesis by *Mucor mucedo* KP736529 and its further application in cheese production. **International Journal of Dairy Science**, v. 10, n. 2, p. 61-76, 2015.

IMDAKIM, M. M.; HASSAN, Z.; AWEEN, M. M.; ELSHAAFI, I. M.; MUHIALDIN, B. J. Milk clotting and proteolytic activity of enzyme preparation from *Pediococcus acidilactici* SH for dairy products. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 133-142, 2015.

INÁCIO, F. D.; FERREIRA, R. O.; ARAUJO, C. A. VAZ.; BRUGNARI, T.; CASTOLDI, R.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**, 2014.

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

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Biotechnology of Cold-Active Proteases. **Biology**, v. 2, p. 755-783, 2013.

KAUR, M.; SINGH, N.; SANDHU, K. S.; GURAYA, H. S. Physicochemical, morphological, thermal, and rheological properties of starches separated from kernels of some Indian mango cultivars (*Mangifera indica* L.). **Food Chemistry**, v.85, p.131-140, 2004.

KHADEMI, F.; ABACHI, S.; MORTAZAVI, A.; EHSANI, M. A.; TABATABAEI, M. R.; MALEKZADEH, F. A. Screening and isolation of substitute-rennet producing thermophilic phycomycetes, by modified Warcup method and improved selective medium. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 2, p. 30-37, 2013.

KUMAR, A.; SHARMA, J.; MOHANTY, A. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 145, p. 108-113, 2006.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAN, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1295-1303, 2012.

LACAZ, C. S.; PORTO, E. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Savier, 2002. 1104p.

LEBEDEVA, G. V.; PROSKURYAKOV, M. T. Purification and Characterization of Milk-Clotting Enzymes from Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 623-625, 2009.

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**, n. 76, p. 103-122, 1973.

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

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

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, p. 1155-1163, 2013.

LIVNEY, Y, D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interfaces Science**, v. 15, p. 73-83, 2010.

MACHADO, A. R. G.; TEIXEIRA, M. F. S.; KIRSCH, L. S.; CAMPELO, M. C. OLIVEIRA, I. M. A. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 23, p. 621-627, 2016.

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; STEPHAN, M. P.; EGITO, A. S.; DAGUER, H. Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. **Food Control**, v. 45, p. 22-28, 2014.

MAJUMDER, R.; BANIK, S. P.; KHOWALA, S. Purification and characterisation of κ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. **Food Chemistry**, v. 173, p. 441-448, 2015.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 2, p. 155-161, 2011.

MARTINS, E. S.; REIS, N. E. V. Determinação de coliformes e *Staphylococcus coagulase* positiva em queijos Minas frescal. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, p. 842- 851, 2012.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J. M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 325-330, 2013.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; PEREA-GUTIÉRREZ, T. C.; LUGO-SÁNCHEZ, M. E.; RAMIREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.;

VALLEJO-CORDOBA, B. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1902-1907, 2013.

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

MUSHTAQ, Z.; IRFAN, M.; NADEEM, M.; NAZ, M.; SYED, Q. Kinetics Study of Extracellular Detergent Stable Alkaline Protease from *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, p. 175-184, 2015.

NAIR, R. A.; GEETHU, C. Purification and characterization of secretory serine protease from necrotrophic oomycete, *Pythium myriotylum* Dreschler. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 85-94, 2015.

NAKAMURA, K.; KOBAYASHI, N.; TANIMOTO, M. Screening of edible mushrooms producing milk-clotting enzyme. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 61, n. 9, p. 444-447, 2014.

NAKAMURA, M.; IKETANI, A.; SHIOI, Y. A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates. **Mycoscience**, v. 52, p. 234-241, 2011.

NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.21, n.2, p.209-216, 2010.

NARWAL, R. K.; BHUSHAN, B.; PAL, A.; PANWAR, A.; MALHOTRA, S. Purification, physico-chemico-kinetic characterization and thermal inactivation thermodynamics of milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 652-660, 2017.

NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS, Á. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

OKAMURA-MATSUI, T.; TAKEMURA, K.; SERA, M.; TAKENO, T.; NODA, H.; FUKUDA, S.; OHSUGI, M. Characteristics of a cheese-like food produced by fermentation

of the mushroom *Schizophyllum commune*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 30-32, 2001.

OLIVEIRA, A. C. D.; VARGAS, J. V. C.; FERNANDES, R. M. L.; MARIANO, A. B. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 1, p. 19-26, 2013.

OLIVEIRA, L. E.; SILVA, C. O.; PASCOAL, G. B. Comparação entre a composição nutricional dos rótulos e as análises laboratoriais de queijos Minas frescal (tradicional e *light*). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 4, p. 280-288, 2014.

ORTIZ, G. E.; NOSEDA, D. G.; MORA, M. C. P.; RECUPERO, M. N.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E. A Comparative study of new *Aspergillus* strains for proteolytic enzymes production by solid state fermentation. **Enzyme Research**, v. 2016, p. 1-11, 2016.

PALHETA, R. A. **Látex de *Brosimum parinarioides* Ducke da Amazônia: Fonte Alternativa de Coagulantes para a indústria de laticínios**. 2010. 143f. Tese (Doutorado em Diversidade Biológica) - Curso de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

PANAYOTOV, P.; YOANIDU, K.; BOYANOVA, P.; MILENKOV, B. Influence of the amount of milk clotting enzyme with microbial and camel origin on the coagulation time of cow's milk. **Agricultural Science and Technology**, v. 5, n. 3, p. 339-342, 2013.

PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYITESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental Research**, v. 146, p. 161-172, 2016.

PATIL, P. M.; KULKARNI, A. A.; KININGE, P. Production of milk clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* under solid-state fermentation using mixture of wheat bran and rice bran. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, n. 10, 2012.

PINTO, F.G.S.; SOUZA, M.; SALING, S.; MOURA, A. C. Qualidade microbiológica de queijo Minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

POSTEMSKY, P. D.; DELMASTRO, S. E.; CURVETTO, N. R. Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 93, p. 25-32, 2014.

RAJORIYA, A.; GUPTA, N. Useful extracellular enzymatic activity of mycelial culture of some edible mushrooms of Odisha. **Agricultural Research & Technology**, v. 3, n. 1, p. 555-604, 2016.

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

RAVIKUMAR, G.; GOMATHI, D.; KALAISELVI, M.; UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 5411-5417, 2012.

RICARDO, N. R.; KATSUDA, M. SAYURI.; MAIA, L. F.; ABRANTES, L. F.; OSHIRO, L. M. Análise físico-química de queijos Minas frescal artesanais e industrializados comercializados em Londrina-PR. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 2, n. 2, p. 89-95, 2011.

SABAHELKHIER, M. K.; FATEN, M. M.; OMER, F. I. Comparative determination of biochemical constituents between animals (goat, sheep, cow and camel) milk with human milk. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, n. 5, p. 69-71, 2012.

SABOTIČ, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors-current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1351-1375, 2012.

SALIHA, B. H.; LOUIS, L. C.; FARIDA, M. M.; SALIHA, S. A.; NASMA, M.; ELKHIR, S. O.; ABDERRAHMANE, M. Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 23, p: 301-310, 2011.

SANTOS, L.; KOTOVICZ, V.; BARANA, A. C.; ALMEIDA, M. M. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 1, p. 655-664, 2012.

SANTOS, T. J.; PIERETTI, G. G.; MARQUES, D. R.; SCAPIM, M. R. S.; BRANCO, I. G.; MADRONA, G. S. Microbial, physical, chemical and sensory properties of Minas Frescal Cheese with Inulin and gum Acacia. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 37, n. 1, p. 155-160, 2015.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, p. 43-56, 2005.

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

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, ROBERTO.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885-2889, 2005.

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

SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Solid-state Fermentation for the Production of Poly (hydroxyalkanoates). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 173-181, 2015.

SINGHAL, P.; NIGAM, V. K.; VIDYARTHI, A. S. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 3, p. 653-669, 2012.

SOARES, E. F.; SILVA, A. C.; QUEIROZ, A. E. S. F.; GOMES, J. E. G.; HERCULANO, P. N.; MOREIRA, K. A. Potencial do látex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite. **Ciência Rural**, v. 45, n.1, p.149-154, 2015.

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

SPADOTI, L. M.; VIEIRA, M. C.; CAVICHIOLO, J. R.; GOMES, R. A. R.; ZACARCHENCO, P. B.; ALVES, A. T. S. Análise comparativa e viabilidade econômica da

produção industrial de queijo Minas frescal tradicional e *light* com diferentes teores de concentrado proteico de soro. **Informações Econômicas**, v. 46, n. 6, p. 13-26, 2016.

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

STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUGANTHI, C.; MAGESWARI, A.; KARTHIKEYAN, S.; ANBALAGAN, M.; SIVAKUMAR, A.; GOTHANDAM, K.M. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, p. 47-52, 2013.

SUN, Q.; WANG, X. P.; YAN, Q. J.; CHEN, W.; JIANG, Z. Q. Purification and characterization of a chymosin from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 174-185, 2014.

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

THORN, D. C.; ECROYD, H.; CARVER, J. A. HOLT, C. Casein structures in the context of unfolded proteins. **International Dairy Journal**, v. 46, p. 2-11, 2015.

UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolysate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 62-67, 2015.

VELMURUGAN, P.; HUR, H.; BALACHANDAR, V.; KAMALA-KANNAN, S.; LEE, K. J.; LEE, S. M.; CHAE, J. C.; SHEA, P. J.; OH, B. T. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 590-594, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARUS, S.; VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 27-34, 2014.

VINHA, M. B.; PINTO, C. L. O.; VANETTI, M. C. D.; SOUZA, M. R. M.; CHAVES, J. B. PAES. Qualidade de queijos Minas frescal produzidos e comercializados informalmente em agroindústrias familiares. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 6, n. 4, p. 51-60, 2016.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1849-1859, 2010.

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

WANG N.; WANG, K.; LI, G.; GUO, W.; LIU, D. Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 111, p. 75-81, 2015.

YE, A. Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 14-20, 2011.

YEGIN, S.; DEKKER, P. Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. **Dairy Science and Technology**, v. 93, p. 565-594, 2013.

YEGIN, S.; FERNANDEZ-LAHOE, M.; GAMA SALGADO, A. J.; GUVENC, U.; GOKSUNGUR, Y.; TARI, C. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 949-960, 2011.

YEGIN, S.; FERNÁNDEZ-LAHOE, M.; GUVENC, U.; GOKSUNGUR, Y. Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6380-6386, 2010.

YIN, C.; ZHENG L.; CHEN, L.; TAN, Q.; SHANG, X.; MA, A. Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2119-2131, 2014.

YU, P. J.; CHOU, C. C. Factors Affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 283-288, 2005.

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp, **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2137-2143, 2011.

ZHANG, B. B.; LU, L. P.; XIA, Y. J.; WANG, Y. L.; XU, G. R. Use of agar as carrier in solid-state fermentation for Monacolin K production by *Monascus*: A novel method for direct determination of biomass and accurate comparison with submerged fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 10-13, 2013.

ZHANG, P.; WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; HAMAKER, B. R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility-a review. **Carbohydrate Polymers**, v.59, p.443–458, 2005.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, W. C.; FRASSON, A. P.; GRAEFI, A. A.; GOMES, P. MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10. n. 14, p. 123-137, 2009.

7. RESULTADOS

Capítulo 1

Pedido de registro de propriedade intelectual

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que *Pleurotus albidus* sintetiza coagulante do leite bovino com características bioquímicas adequadas para utilização na indústrias de laticínios. Neste contexto, foi submetido ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI) o pedido de registro de propriedade intelectual da invenção **Produção e extração de coagulante do leite bovino utilizando o cogumelo comestível *Pleurotus albidus***, número de pedido: BR 10 2017 014665 0, protocolo 870170047468, em 06 de julho de 2017.

Capítulo 2

Artigo aceito para publicação no Boletim do
Museu Paraense Emílio Goeldi.

Artigo 1

Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial

Acid proteases from Amazonian edible mushroom for industrial applicability

Salomão Rocha Martim^I, Larissa Svetlana Cavalcanti Silva^I, Mircella Marialva Alecrim^I, Bianca Cordeiro de Souza^{II}, Ila Maria de Aguiar Oliveira^I, Maria Francisca Simas Teixeira^I

^IUniversidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil. Endereço: Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep: 69080-900

^{II}Centro Universitário do Norte. Manaus, Amazonas, Brasil. Avenida Joaquim Nabuco, nº 1.232, Centro, Cep: 69020-030.

salomao.martim@gmail.com

larissasvetlanas@gmail.com

mircella.ma@gmail.com

farmaceuticabiancab@gmail.com

ilamaria@ig.com.br

msimasteixeira@gmail.com

Resumo

As proteases constituem um grupo de enzimas que apresentam elevada aplicabilidade em diversos setores industriais e são obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas. Dentre os fungos, os cogumelos têm se destacado como fonte de proteases com potencial biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de proteases por cogumelos utilizando a fermentação em meio líquido. A cultura matriz foi preparada em ágar batata dextrose acrescida de extrato de levedura 0,5% (p/v) e o bioprocessamento foi conduzido durante cinco dias, a 150 rpm, 25°C. Azocaseína 1% (p/v) foi utilizada como substrato para avaliar a atividade proteolítica dos cogumelos. Dentre as espécies avaliadas, *P. albidus* foi a produtora significativa de proteases (34,00 U/mL) e a síntese dessas enzimas foi estimulada pela idade e volume do inóculo. Essas enzimas mostraram atividade ótima em pH 5 a 60°C, estabilidade em pH (5-8), temperatura de 30°C até 60°C. As proteases foram classificadas como cisteíno e serinoproteases.

Palavras chave: proteases, basidiomicetos, fermentação submersa.

Abstract

Proteases are a group of enzymes that have high applicability in many industrial areas and can be obtained from animal, plant and microbial sources. Among the fungi sources, mushrooms have been noticed as proteases producer with biotechnological potential. The aim of this study was to investigate the protease production by mushrooms in liquid fermentation. The main culture was prepared in potato dextrose agar with 0.5 % (w/v) yeast extract. The fermentation was carried out for five days, 150 rpm at 25°C. Azocasein 1% (p/v) was used as substrate to evaluate the proteolytic activity of mushrooms. Among the species evaluated, *P. albidus* was the significant producer of proteases (34,00 U/mL) and the synthesis of these enzymes was stimulated by the age and inoculum volume. The proteases from *P. albidus* showed optimum activity at pH 5.0 and 60°C with stability at pH 5-8 and from 30°C until 60°C. They were classified as cysteine and serine proteases.

Keywords: protease, basidiomycetes, submerged fermentation.

INTRODUÇÃO

As proteases constituem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas em peptídeos (Rajput *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016). Estes biocatalisadores são classificados de acordo com o mecanismo de ação (exo e endopeptidases), condições ótimas de pH (ácidas, neutras e básicas), aminoácidos e íons metálicos presentes no sítio ativo (serinoprotease, cisteínoprotease, aspartatoprotease, treoninoprotease, glutaminoproteases e metaloproteases) (; Li *et al.*, 2013; Inácio *et al.*, 2014).

A evolução orgânica ocorrida no sítio catalítico das proteases contribuiu para que essas enzimas participassem de reações bioquímicas relacionadas com funções metabólicas e reguladoras essenciais em processos biológicos, por isso as enzimas proteolíticas são encontradas em todos os organismos vivos (Erjavec *et al.*, 2012; Sabotič & Kos, 2012; Suganthi *et al.*, 2013).

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, representando mais de 70 % do mercado global e são amplamente utilizadas na produção de queijos, amaciamento de carnes, produção de hidrolisados protéicos, em produtos de panificação, elaboração de detergentes, formulações médicas, beneficiamento do couro e da

seda, tratamento de águas residuais e na recuperação da prata (Srilakshmi *et al.*, 2014; Bano *et al.*, 2016).

Dentre as fontes de protease, os micro-organismos são considerados excelentes produtores devido ao elevado rendimento de enzimas proteolíticas purificadas e a sua ampla gama de propriedades bioquímicas e catalíticas. Além disso, tais enzimas são geralmente extracelulares, facilitando sua recuperação no final do bioprocesso (Ortiz *et al.*, 2016). Muitas espécies de micro-organismos são comumente reconhecidas como GRAS (*Generally Regarded As Safe*), não são tóxicos e nem patogênicos, por isso são investigados para aplicação na indústria de alimentos, inclusive quanto à produção de proteases (Malik & Shinde, 2016).

Os fungos representam fonte potencial de proteases devido a sua ampla diversidade bioquímica, susceptibilidade à manipulação genética, alta produtividade de biocompostos extracelulares facilmente recuperados quando cultivados em meio líquido ou matriz sólida. Dentre os fungos, cogumelos têm se destacado como fonte de proteases: *Cordyceps sobolifera* (Wang *et al.*, 2012), *Pleurotus sajor-caju* (Ravikumar *et al.*, 2012), *Flammulina velutipes* (Iketani *et al.*, 2013), *Hypsizygus ulmarius* (Shivashankar & Premkumari, 2014), *Pleurotus ostreatoroseus* (Fonseca *et al.*, 2014), *Lentinus citrinus* (Machado *et al.*, 2016), *P. eryngii* (Bano *et al.*, 2016), *Russula brevipes* (Rajoriya & Gupta, 2016).

A demanda por proteases com especificidade e estabilidade em vastas faixas de pH e temperatura, retenção da atividade na presença de íons metálicos, tensoativos, solventes orgânicos e oxidantes estimula a busca por novas fontes enzimáticas, em especial, as de origem microbiana (Nair & Geethu, 2015). O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas proteolíticas por cogumelos e selecionar uma espécie produtora de proteases com potencial biotecnológico.

MATERIAL E MÉTODOS

COGUMELOS

Nesta pesquisa foram avaliados seis cogumelos (*Auricularia mixotricha* DPUA 1695, *Ganoderma lucidum* DPUA 1694, *Lentinus citrinus* DPUA 1535, *Lentinus crinitus* DPUA 1693, *Pleurotus albidus* DPUA 1692 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720) provenientes do acervo da Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do

Amazonas-DPUA. De cada cultura preservada sob óleo mineral foram transferidos fragmentos para Caldo Glicosado para obtenção de cultura viável (Lacaz *et al.*, 2002). Fragmentos da massa micelial foram transferidos para BDA (ágar batata dextrose) adicionado de extrato de levedura 0,5% (p/v), em placas de Petri. Todos os cultivos foram mantidos a 25 °C por oito dias para uso nos demais experimentos.

FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para produção de proteases cinco fragmentos miceliais de 5mm de diâmetro foram inoculados em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 ml de meio líquido GYP (20 g de glicose, 5 g de extrato de levedura, 5 g de peptona para cada 1000 mL de água destilada), suplementado com gelatina a 0,5% (p/v), pH 5,6. A fermentação foi realizada a 30 °C, 150 rpm. Após cinco dias, a biomassa foi separada por filtração sob vácuo em papel de filtro Whatman n° 1, seguindo as filtrações em membrana de éster de celulose de 0,45 µm e em membrana polietersulfônica de 0,22 µm. A partir do extrato bruto foi determinada a atividade proteolítica, em triplicata.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA IDADE E DO TAMANHO DO INÓCULO NA SÍNTESE DE PROTEASE

Para avaliar a influência da idade e do tamanho do inóculo na produção de proteases pela espécie de cogumelo selecionada foram utilizadas culturas com 2, 5, 8, 12 e 15 dias. De cada cultura foram retirados discos miceliais equivalentes a 2%, 4%, 10%, 20% e 40% (m/v) para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de GYP, suplementado com gelatina a 0,5% (p/v), pH 5,6. A fermentação foi realizada a 30 °C, 150 rpm. Após cinco dias, a biomassa foi separada por filtração, conforme descrito no item anterior.

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A atividade proteolítica foi determinada segundo Leighton *et al.* (1973) utilizando azocaseína a 1% como substrato enzimático. Uma unidade de atividade de proteases foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,01 em 60 minutos.

DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para ensaio do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada a 25 °C em diferentes valores de pH utilizando as seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80 °C. Para estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:1) nas seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10) e mantidos a 25 °C por 24 horas. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80 °C por 1 hora (Merheb-Dini *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos.

EFEITO DE INIBIDORES E ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O efeito de inibidores na atividade proteolítica foi investigado utilizando 10 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF), 10 mM de ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), 10 mM de ácido iodoacético e 1 mM de Pepstatin A, na mistura reacional. Os íons metálicos utilizados na concentração de 10 mM, na mistura reacional, foram: CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl. As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura. A atividade enzimática residual foi comparada com o controle que foi incubado sem os inibidores ou íons metálicos que correspondeu a 100 % de atividade.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P <0,05) utilizando programa Minitab, versão 16.0 (Minitab, 2010). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR ESPÉCIES DE COGUMELOS COMESTÍVEIS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Nas condições de fermentação em meio líquido, todos os cogumelos excretaram proteases. *P. albidus*, *L. crinitus* e *G. lucidum* sintetizaram maiores quantitativos de proteases, em ordem decrescente, 34,00 U/mL, 27,20 U/mL e 23,50 U/mL, respectivamente. *P.*

ostreatoroseus demonstrou os menores valores de atividade proteásica (1,90 U/mL) (Tabela 1). Estudos têm demonstrado que espécies de cogumelos pertencentes ao gênero *Pleurotus* são eficientes na produção de proteases em diferentes condições de cultivo. Genier *et al.* (2015) e Campos *et al.* (2010) relataram valores de 70 U/mL e 0,45 U/mL, respectivamente, de atividade proteolítica por *P. ostreatus* utilizando cultivo submerso. Fonseca *et al.* (2014) utilizaram cultivo semissólido para produção de proteases por *P. ostreatoroseus* e verificaram valores de 7,89 U/mL e 4,50 U/mL de atividade proteásica, na presença e ausência de luz, respectivamente. Ravikumar *et al.* (2012) relataram valores de atividade de aproximadamente 45 U/mL de atividade proteolítica de *P. sajor-caju*, em cultivo semissólido. As diferenças no quantitativo de proteases produzidas por basidiomicetos ocorrem porque estes organismos utilizam rotas metabólicas distintas, de acordo com o seu curso de vida. As diferenças desenvolvidas entre as espécies durante a evolução resultaram em diferenças genotípicas que influenciam na síntese de enzimas proteolíticas (Kudryatseva *et al.*, 2008).

Tabela 1. Produção de proteases por cogumelos comestíveis pertencentes à Coleção DPUA.

Cogumelos	Atividade proteolítica (U/mL)
<i>Auricularia mixotricha</i> DPUA 1695	2,70 ± 0,00 ^e
<i>Ganoderma lucidum</i> DPUA 1694	23,50 ± 0,00 ^c
<i>Lentinus citrinus</i> DPUA 1535	19,30 ± 0,01 ^d
<i>Lentinus crinitus</i> DPUA 1693	27,20 ± 0,02 ^b
<i>Pleurotus albidus</i> DPUA 1692	34,00 ± 0,00 ^a
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> DPUA 1720	1,90 ± 0,00 ^f

Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P < 0.05)

Neste estudo, *P. albidus* expressou os valores significativos de proteases e foi selecionado para caracterização dos parâmetros que influenciaram na produção e atividade de proteases.

INFLUÊNCIA DO TAMANHO E DA IDADE DO INÓCULO NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A figura 1 demonstra a influência do tamanho do inóculo na atividade de proteases por *P. albidus*. Com inóculo de 10 % de volume foi verificada a produção máxima de protease por *P. albidus* (54 U/mL). Quando utilizados inóculos de 2% e 40%, foram observadas atividades proteolíticas de 20,5 U/mL e 21 U/mL, respectivamente. Estes dados demonstram que a utilização de inóculo reduzido ou elevado não favoreceu a síntese de proteases por *P. albidus*. Estudos revelaram que o tamanho do inóculo é um parâmetro que influencia na produção de

proteases, independente da espécie avaliada e do bioprocesso, por exemplo, maior atividade proteolítica de *Rhizopus oligosporus* M30 e *R. arrhizus* M26 foi determinada quando utilizado inóculo de 10% e 5% (v/v), respectivamente (Irfan *et al.*, 2011). *R. oryzae* produziu maiores quantidades de proteases quando foi empregado inóculo de 2% (v/v) (Mushtaq *et al.*, 2015). Inóculo de 3% (v/v) proporcionou maior atividade proteolítica por *P. sajor-caju*, em fermentação semissólida (Ravikumar *et al.*, 2012).

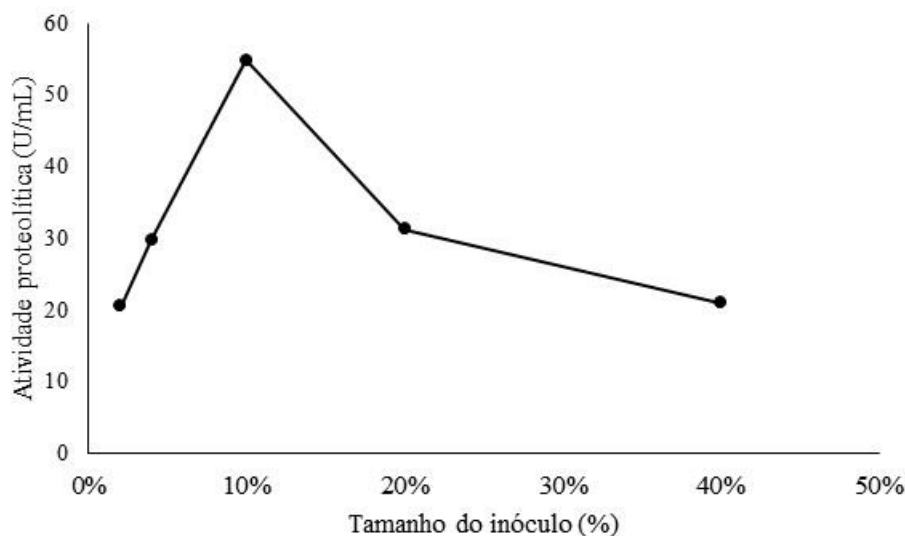


Figura 1. Efeito do tamanho do inóculo na atividade proteolítica de *P. albidus*.

O efeito da idade do inóculo na atividade proteolítica de *P. albidus* está demonstrado na figura 2. A máxima atividade (80,33 U/mL) foi determinada com inóculo de 5 dias de crescimento. Com a utilização de inóculos de 8, 12 e 20 dias foram verificadas reduções de 28,57 %, 47,40 % e 77,39 % nas atividades proteolíticas, respectivamente. Boukhalfa-Lezzar *et al.* (2014) também verificaram que *Aspergillus oryzae* NRRL 2220 produziram maior quantitativo de protease utilizando inóculo com cinco dias idade. Zhou *et al.* (2009), Rani *et al.* (2012), Prasad & Raju (2013), determinaram maior atividade de proteases por *Laccocephalum mylittae*, *A. flavus* AS2 e *R. oligosporus* NCIM 1215 utilizando inóculo com 4 dias de crescimento dessas espécies.

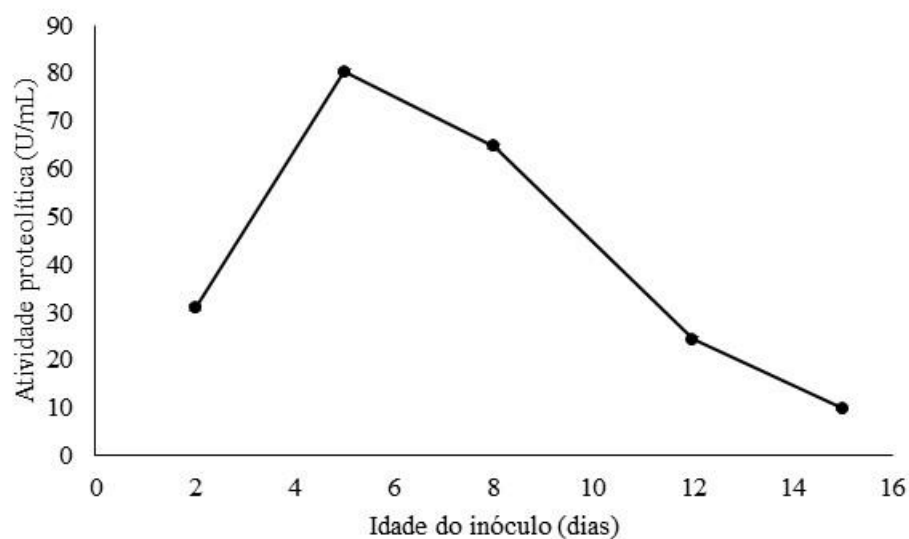


Figura 2. Efeito da idade do inóculo na atividade proteolítica de *P. albidus*.

EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A figura 3 mostra o efeito do pH na atividade proteolítica do extrato bruto de *P. albidus*. A enzima demonstrou maior atividade em pH 5, seguido de decréscimo de atividade nos valores de pH superiores, apresentando somente 23,70 % de atividade em pH 10. Geralmente enzimas de fungos apresentam atividade ótima em pH ácido (Merheb *et al.*, 2007). Em pH 5 as proteases de *P. eryngii*, *Mucor mucedo* DMS 809 e *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091 apresentaram maiores atividades catalíticas, conforme descrito por Cha *et al.* (2010), Yegin *et al.* (2012) e Majumder *et al.* (2015), respectivamente. Vannabun *et al.* (2014) relataram que em condições fora do pH ótimo ocorre perda de atividade enzimática devido a alterações da conformação da proteína causada pela repulsão de cargas. Nessas condições as distribuições de carga da superfície protéica e as conformações são alteradas e enzimas não conseguem se associar com o substrato corretamente.

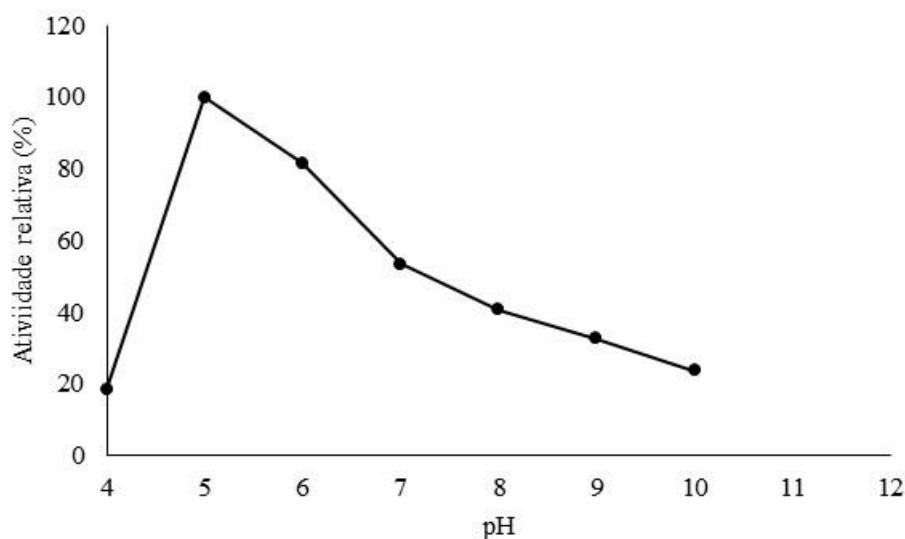


Figura 3. Efeito do pH na atividade proteolítica de *P. albidus*.

O efeito da temperatura na atividade enzimática está demonstrado na figura 4. A atividade das proteases foi determinada em todas as temperaturas avaliadas, porém a máxima atividade catalítica foi verificada em 40 °C, seguido de decréscimo de atividade nas temperaturas mais elevadas. O valor de temperatura ótima encontrado no presente estudo está de acordo com aqueles reportados para outros fungos filamentosos. Guan *et al.* (2011) e Moom *et al.* (2014) relataram que as serinoproteases de *Pholiota nameko* e as metaloproteases fibrinolíticas de *Lyophyllum shimeji*, respectivamente, agiram otimamente na temperatura de 40 °C. As proteases alcalinas de *Myceliophthora sp* apresentaram atividade ótima nas temperaturas de 40-45 °C, conforme relatado por Zanthorlin *et al.* (2011). As proteases de *Piptoporus soloniensis* apresentaram maior atividade catalítica na faixa de temperatura entre 35 a 40 °C (El-Baky *et al.*, 2011). A velocidade de reação aumenta à medida que a temperatura inicialmente aumenta, devido ao aumento da energia cinética da reação de moléculas. No entanto, como a temperatura é aumentada a energia cinética da enzima ultrapassa a barreira de energia, resultando na quebra das ligações de hidrogênio e hidrofóbicas fracas que mantêm a estrutura da enzima. Nestas condições de temperatura, a enzima é desnaturada resultando na perda de atividade catalítica (Daniel *et al.*, 2010; Oueslati & Mounirhaouala, 2014).

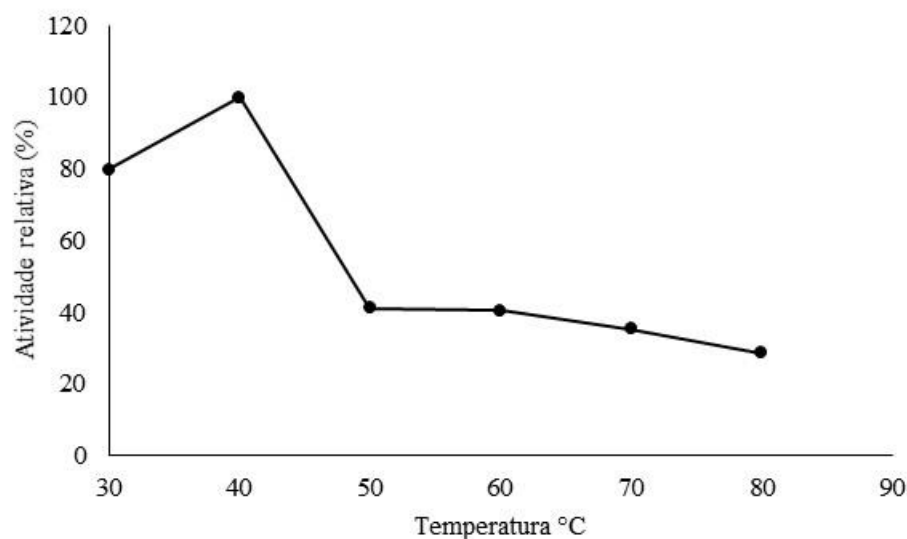


Figura 4. Efeito da temperatura na atividade proteolítica de *P. albidus*.

Os resultados relacionados à estabilidade do extrato bruto em diferentes valores de pH estão demonstrados na figura 5. As proteases de *P. albidus* apresentaram elevada estabilidade, retendo, em média, 90,30 % de atividade entre pH de 5 a 8. Em pH 9 e 10, foi verificada perda de atividade de 25,80 % e 36,80 % respectivamente. As proteases de *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31, reportadas por Merheb-Dini *et al.* (2010), apresentaram estabilidade entre pH 5 e 7, retendo 65-70 % de atividade. As proteases fibrinolíticas de *A. oryzae* KSK-3 estudadas por Shirasaka *et al.* (2012) foram mais ativas na faixa de pH entre 4 e 9. As serinoproteases de *A. fumigatus* demonstraram estabilidade entre pH de 7 a 11, com valores de atividades residuais acima de 50 %, conforme relatado por Hernandez-Martínez *et al.* (2011).

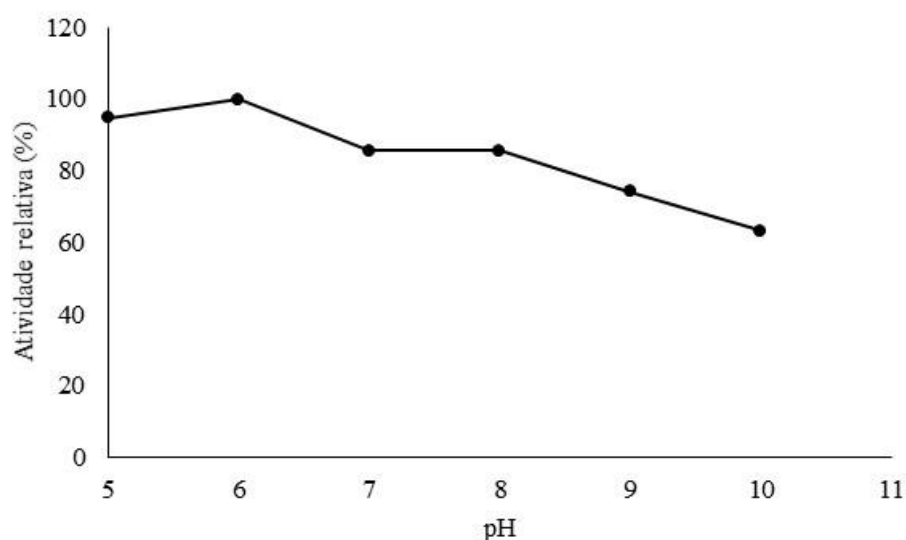


Figura 5. Efeito do pH na estabilidade da atividade proteolítica de *P. albidus*.

A estabilidade do extrato bruto de *P. albidus* em diferentes temperaturas está demonstrada na figura 6. As proteases exibiram maior estabilidade nas temperaturas entre 30 °C a 60 °C, retendo, em média 86,70 % de atividade. Na temperatura de 80 °C foi verificado decréscimo acentuado na ação catalítica em que a enzima reteve apenas 25,45 % de atividade relativa. Similar estabilidade à temperatura foi descrita por Moon *et al.* (2014) e Shankar *et al.* (2011) para os fungos *Lyophyllum shimeji* e *Beauveria* sp., respectivamente. Em estudo realizado por Kumaran *et al.* (2011) as proteases de *G. lucidum* Vk12 apresentaram estabilidade térmica até 55 °C. Choi *et al.* (2011) verificaram que as proteases de *Cordyceps militaris* apresentaram estabilidade na faixa de temperatura entre 20 °C a 40°C, porém foram completamente inativadas a 50 °C.

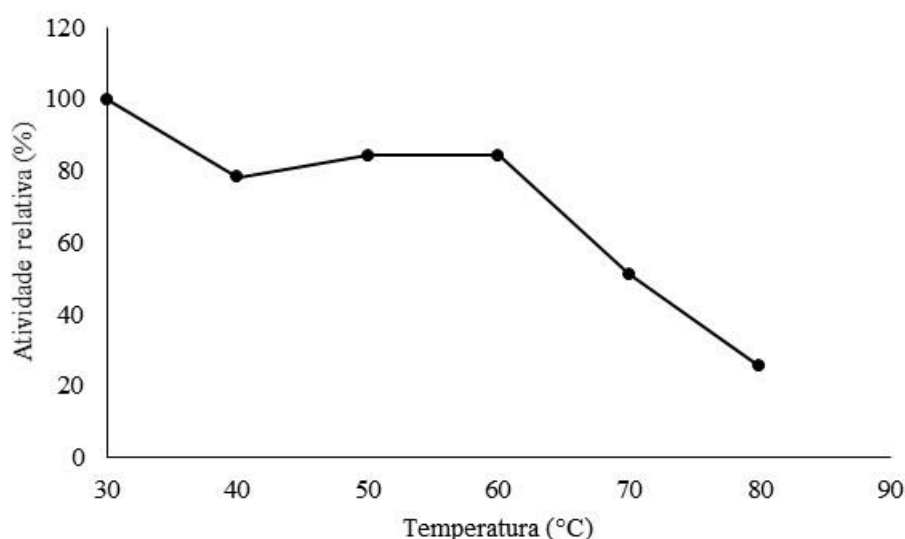


Figura 6. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade proteolítica de *P. albidus*.

EFEITO DE INIBIDORES E ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O efeito de inibidores está demonstrado na figura 7. A protease não foi sensível aos inibidores de metaloproteases (EDTA) e aspartatoproteases (pepstatin A), retendo 93 % e 92 % de atividade, respectivamente. Estes resultados indicam a ausência de íons metálicos e resíduos de ácido aspártico no centro catalítico da enzima. Porém, PMSF e ácido iodoacético foram os inibidores que mais reduziram a atividade proteolítica, ambos causaram inibição de 30 %. Estes resultados sugerem a presença de serinoproteases e cisteinoproteases no extrato bruto de *P.*

albidus. Majumder *et al.* (2014) também relataram que as proteases presentes no extrato bruto do cogumelo *T. clypeatus* foram sensíveis a inibidores de serinoproteases (PMSF) e de cisteinoproteases (E-64 e iodoacetamina). Estes autores sugeriram a presença de proteases com grupos cisteína-serina cruzados, em função da sua susceptibilidade a inibidores de cisteína e serina proteases. Na literatura científica há poucos estudos reportando a presença de cisteinoproteases em extratos de fungos filamentosos. Como exemplo pode ser citado o estudo realizado por Shin & Choi (1998) que purificaram e caracterizaram uma cisteinoprotease de *P. ostreatus*. Contudo a produção de serinoproteases por fungos tem sido reportada em vários estudos, como os de Cha *et al.* (2010), Choi *et al.* (2011), Guan *et al.* (2011), Iketani *et al.* (2013) e Zhang *et al.* (2010).

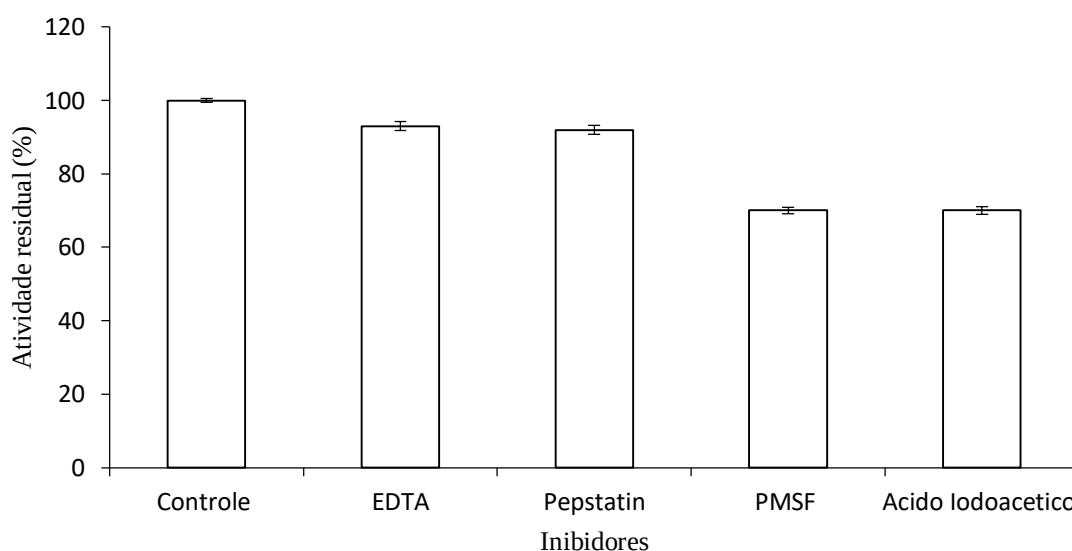


Figura 7. Efeito de inibidores na atividade proteolítica de *P. albidus*.

Os resultados referentes ao efeito de íons metálicos na atividade das proteases estão demonstrados na figura 8. Os íons Fe^{2+} exerceram forte influência, causando aumento de 7 vezes na atividade catalítica, em relação ao controle. Os íons Mn^{2+} elevaram em 16 % atividade proteolítica. Contudo, Cu^{2+} , Na^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} promoveram discreta inibição e a enzima reteve, em ordem decrescente, 91,50 %, 90,30 %, 88,85 %, 87,65 %, 87,15 % e 80,60 % de atividade proteolítica, respectivamente. Sun *et al.* (2014) também relataram incremento na atividade catalítica de *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* F518 na presença de Fe^{2+} e Mn^{2+} . Zhang *et al.* (2010) verificaram que os íons Fe^{2+} elevaram em 62,5 5% a atividade da alcalina protease produzida pelo cogumelo *Helvella lacunosa*. Os íons Mn^{2+} estimularam em 54,10 % as proteases produzidas por *A. oryzae*, conforme reportado por Shirazaka *et al.* (2012). Dentre

os íons que inibiram discretamente a atividade proteolítica de *P. albidus*, Ca^{2+} foi o que mais se sobressaiu. Resultados semelhantes foram relatados por Zheng *et al.* (2011) e Zhang *et al.* (2010) para as proteases dos cogumelos *T. albuminosus* e *Hypsizigus marmoreus*, respectivamente.

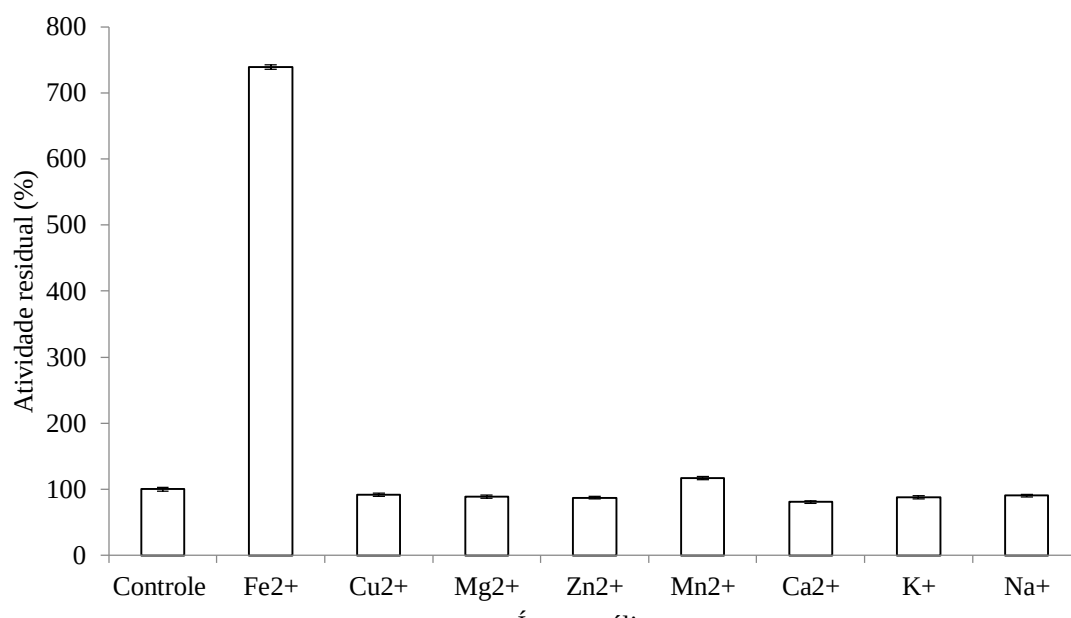


Figura 8. Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica de *P. albidus*.

CONCLUSÃO

Auricularia mixotricha, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus citrinus*, *L. crinitus*, *Pleurotus albidus* e *P. ostreatoroseus* são fontes de enzimas proteolíticas. Destes macrofungos, *P. albidus* sintetizou valor significativo de proteases, sendo a produção destes biocompostos influenciada pelo tamanho e idade do inóculo. Em meio de cultivo líquido, *P. albidus* produz protease ácida, termoestável, do tipo cisteino e serinoprotease, características bioquímicas que indicam a sua aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil e química.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANO, S., M. U. DAHOT & S. H. A. NAQVI, 2016. Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. **Pakistan Journal of Biotechnology** 13(3): 193-198.
- BOUKHALFA-LEZZAR, H., H. LEGHLIMI, E. COPINET, F. DUCHIRON & A. MECHAKRA-MAZA, 2014. Utilization of tomato pomace as a substrate for neutral protease production by *Aspergillus oryzae* 2220 on solid-state fermentation. **International Journal of Advanced Research** 2(11): 338-346.
- CAMPOS, C., D. C. DIAS, J. S. VALLE, N. B. COLAUTO & G. A. LINDE, 2010. Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** 13(1): 19-24.
- CHA, W. S., S. S. PARK, S. J. KIM & D. CHOI, 2010. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource Technology** 101(16): 6475-6481.
- CHOI, D., W. S. CHA, N. PARK, H. W. KIM, J. H. LEE, J. S. PARK & S. S. PARK, 2011. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. **Bioresource Technology** 102(3): 3279-3285.
- DANIEL, R. M., M. E. PETERSON, M. J. DANSON, N. C. PRICE, S. M. KELLY, C. R. MONK, C. S. WEINBERG, M. L. OUDSHOORN & C. K. LEE, 2010. The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. **Biochemical Journal** 425: 353-360.
- EL-BAKY, H. A., D. LINKE, M. NIMTZ & R. G. BERGER, 2011. PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis*. **Process Biochemistry** 46(11): 2137-2143.
- ERJAVEC, J., J. KOS, M. RAVNIKAR, T. DREO & J. SABOTIČ, 2012. Proteins of higher fungi--from forest to application. **Trends in Biotechnology** 30(5): 259-73.
- FONSECA, T. R. B., J. F. BARRONCAS & M. F. S. TEIXEIRA, 2014. Production in solid matrix and proteases partial characterization of edible mushroom from Amazon rain forest. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial** 8(1): 1227-1236.
- GENIER, H. L. A., F. E. F. SOARES, J. H. QUEIROZ, A. S. GOUVEIA, J. V. ARAÚJO, F. R. BRAGA, I. R. PINHEIRO & M. C. M. KASUYA, 2015. Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. **African Journal of Biotechnology** 14(17): 1496-1503.
- GUAN, G. P., G. Q. ZHANG, Y. Y. WU, H. X. WANG & T. B. NG, 2011. Purification and characterization of a novel serine protease from the mushroom *Pholiota nameko*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 111(6): 641-645.

- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R., G. GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, C. W. BERGMANN, O. LOERA-CORRAL, A. ROJO-DOMÍNGUEZ, S. HUERTA-OCHOA, C. REGALADO-GONZÁLEZ & L. A. PRADO-BARRAGÁN, 2011. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry** 46(10): 2001-2006.
- IKETANI, A., M. NAKAMURA, Y. SUZUKI, K. AWAI & Y. SHIOI, 2013. A novel serine protease with caspase- and legumain-like activities from edible basidiomycete *Flammulina velutipes*. **Fungal Biology** 117(3): 173-181.
- INÁCIO, F. D., R. O. FERREIRA, C. A. V. ARAUJO, T. BRUGNARI, R. CASTOLDI, R. M. PERALTA & C. G. M. SOUZA, 2015. Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. **BioMed Research International** 2015: 1-10.
- IRFAN, M., A. RAUF, Q. SYED, M. NADEEM & S. BAIG, 2011. Exploitation of different agro-residues for acid protease production by *Rhizopus* sp. in Koji Fermentation. **International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences** 5(1): 43-52.
- KUDRYATSEVA, O. A., Y. E. DUNAEVSKY, O. V. KAMZOLKINA & M. A. BELOZERSKY, 2008. Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylophilic basidiomycetes. **Microbiology** 77(6): 643-653.
- KUMARAN, S., P. PALANI, R. NISHANTHI, S. SRIMATHI & V. KAVIYARASAN, 2011. Purification of an intracellular fibrinolytic protease from *Ganoderma Lucidum* Vk12 and its susceptibility to different enzyme inhibitors. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** 10(4): 413-420.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E. Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9. ed. São Paulo: Savier, 2002. 1104p.
- LEIGHTON, T. J., R. H. DOI, R. A. J. WARREN & R. A. KELLN, 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology** 76: 103-122.
- LI, Q., L. YI, P. MAREK & B. L. IVERSON, 2013. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters** 587: 1155-1163.
- MACHADO, A. R. G., M. F. S. TEIXEIRA, L. S. KIRSCH, M. C. L. CAMPELO & I. M. A. OLIVEIRA, 2016. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences** 23(5): 621-627.
- MAJUMDER, R., S. P. BANIK & S. KHOWALA, 2015. Purification and characterisation of κ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. **Food Chemistry** 173: 441-448.

- MAJUMDER, R., S. P. BANIK, L. RAMRAKHIANI & SUMAN KHOWALA, 2014. Bioremediation by alkaline protease (AkP) from edible mushroom *Termitomyces clypeatus*: optimization approach based on statistical design and characterization for diverse application. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**.
- MALIK, N. & V. SHINDE, 2016. Comparative analysis of alkaline protease production by solid state and submerged fermentation. **International Journal of Development Research** 6(2): 6972-6976.
- MERHEB, C. W., H. CABRAL, E. GOMES & R. SILVA, 2007. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry** 104(1): 127-131.
- MERHEB-DINI, C., E. GOMES, M. BOSCOLO & R. SILVA, 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry** 120(1): 87-93.
- MOON, S. M., J. S. KIM, H. J. KIM, M. S. CHOI, B. R. PARK, S. G. KIM, H. AHN, H. S. CHUN, Y. K. SHIN, J. J. KIM, D. K. KIM, S. Y. LEE, Y. W. SEO, Y. H. KIM & C. S. KIM, 2014. Purification and characterization of a novel fibrinolytic α chymotrypsin like serine metalloprotease from the edible mushroom, *Lyophyllum shimeji*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 117(5): 544-550.
- MUSHTAQ, Z., M. IRFAN, M. NADEEM, M. NAZ & Q. SYED, 2015. Kinetics study of extracellular detergent stable alkaline protease from *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 58(2): 175-184.
- NAIR, R. A. & C. GEETHU, 2015. Purification and characterization of secretory serine protease from necrotrophic oomycete, *Pythium myriotylum* Dreschler. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 31: 85-94.
- ORTIZ, G. E., D. G. NOSEDA, M. C. P; MORA, M. N. RECUPERO, M. BLASCO & E. ALBERTÓ, 2016. A Comparative study of new *Aspergillus* Strains for proteolytic enzymes production by solid state fermentation. **Enzyme Research** 2016: 1-11.
- OUESLATI, A. & MOUNIRHAOUALA, 2014. Operating conditions effects on enzyme activity: case enzyme protease. **Journal of Engineering Research and Applications** 4(9): 33-37.
- PRASAD, D. S. R. & K. J. RAJU, 2013. Studies on the production of neutral protease by *Rhizopus oligosporus* NCIM 1215 using *Lablab purpureus* seed powder under solid state fermentation. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences** 3(4): 2772-2783.

- RAJORIYA, A. & N. GUPTA, 2016. Useful extracellular enzymatic activity of mycelial culture of some edible mushrooms of Odisha. **Agricultural Research & Technology: Open Access Journal** 3(1): 1-4.
- RAJPUT, K., S. CHANYAL & P. K. AGRAWAL, 2016. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from gymnosperm tree - *Cupressus torulosa* D.DON. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 05 (07): 1034-1054.
- RANI, M. R., N. N. PRASAD & K. R. S. SAMBASIVARAO, 2012. Optimization of cultural conditions for the production of alkaline protease from a mutant *Aspergillus flavus* AS2. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences** 3(3): 565-576.
- RAVIKUMAR, G., D. GOMATHI, M. KALAISELVI & C. UMA, 2012. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 2(1): 411-417.
- SABOTIĆ, J. & J. KOS, 2012. Microbial and fungal protease inhibitors-current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 93(4): 1351-1375.
- SHANKAR, S., M. RAO & R. S. LAXMAN, 2011. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. **Process Biochemistry** 46(2): 579-585.
- SHIN, H. H. & H. S. CHOI, 1998. Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** 62(7):1416-8.
- SHIRASAKA, N., M. NAITOU, K. OKAMURA, M. KUSUDA, Y. FUKUTA & T. TERASHITA, 2012. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience** 53:354-364.
- SHIVASHANKAR, M. & B. PREMKUMARI, 2014. Enzyme kinetics of protease from *Hypsizygus ulmarius*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences** 5(2): 746-754.
- SILVA, O. S., R. L. OLIVEIRA, C. M. SOUZA-MOTTA, A. L. F. PORTO & T. S. PORTO, 2016. Novel Protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: Production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research** 04: 125-143.
- SRILAKSHMI, J., J. MADHAVI, S. LAVANYA & K. AMMANI, 2014. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences** 2(4): 218-234.
- SUGANTHI, C., A. MAGESWARI, S. KARTHIKEYAN, M. ANBALAGAN, A. SIVAKUMAR & K.M. GOTHANDAM, 2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** 11(1): 47-52.

- SUN, Q., X. P. WANG, Q. J. YAN, W. CHEN & Z. Q. JIANG, 2014. Purification and characterization of a chymosin from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 174:174-185.
- VANNABUN, A., S. KETNAWA, S. PHONGTHAI, S. BENJAKUL & S. RAWDKUEN, 2014. Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed giant catfish. **Food Bioscience** 6: 9-16.
- WANG, S. X., Y. LIU, G. Q. ZHANG, S. ZHAO, F. XU, X. L. GENG & H. X. WANG, 2012. Cordysobin, a novel alkaline serine protease with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Cordyceps sobolifera*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 113(1): 42-47.
- YEGIN, S., Y. GOKSUNGUR & M. FERNANDEZ-LAHORE, 2012. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. **Food Chemistry** 133: 1312-1319.
- ZANPHORLIN, L. M., H. CABRAL, E. ARANTES, D. ASSIS, L. JULIANO, M. A. JULIANO, R. DA-SILVA, E. GOMES & G. O. BONILLA-RODRIGUEZ, 2011. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry** 46(11): 2137-2143.
- ZHANG X., Q. LIU, G. ZHANG, H. WANG & T. NG, 2010. Purification and molecular cloning of a serine protease from the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. **Process Biochemistry** 45(5): 724-730.
- ZHANG, G., H. WANG, X. ZHANG & T. NG, 2010. Helvellisin, a novel alkaline protease from the wild ascomycete mushroom *Helvella lacunosa*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 109(1): 20-24.
- ZHENG, S., H. WANG & G. ZHANG, 2011. A novel alkaline protease from wild edible mushroom *Termitomyces albuminosus*. **Acta Biochimica Polonica** 58(2): 269-73.
- ZHOU, L. H., Y. Q. ZHANG, R. J. WANG, X. L. SHEN, Y. Q. LI & W. J. GUAN, 2009. Optimization of mycelial biomass and protease production by *Laccoccephalum mylittae* in submerged fermentation. **African Journal of Biotechnology** 8(8): 1591-1601.

Capítulo 3

Artigo publicado na Revista Científica African
Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

***Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases**

Salomão Rocha Martim¹, Larissa Svetlana Cavalcanti Silva¹, Leilane Bentes de Souza²,
Edson Júnior do Carmo³, Mircella Marialva Alecrim¹, Marne Carvalho de Vasconcellos⁴, Ila
Maria de Aguiar Oliveira⁴ and Maria Francisca Simas Teixeira^{5*}

¹Federal University of Amazonas, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal-Bionorte, Manaus, Brazil.

²Federal University of Amazonas, Pharmaceutical Science Program, Manaus, Brazil.

³Federal University of Amazonas, Program of Biotechnology, Manaus, Brazil.

⁴Federal University of Amazonas, Pharmaceutical Science College, Manaus, Brazil.

⁵Culture Collection DPUA, Federal University of Amazonas, Manaus, Brazil.

Received 10 March, 2017; Accepted 5 April, 2017

Researches have been done to discover new sources of microbial proteases with milk-clotting activity to replace the traditional rennet from calves. The aim of this study was to select a species of edible mushroom as milk-clotting enzymes producer using the submerged fermentation technology. From the six species evaluated, *Pleurotus albidus* was the one that expressed the highest value of coagulant ratio (21.60). The milk-clotting enzymes showed maximum activity at 60°C and pH 6.0. Iodoacetic acid presented the highest inhibition in proteolytic activity suggesting the presence of cysteine proteases in the crude extract from *P. albidus*. The enzymes did not present toxic action against human fibroblasts (MRC5) in the analyzed conditions and, for that reason, can be suitable to applications in food industry. This is the first report of milk-clotting enzymes production by the edible mushroom *P. albidus*.

Key words: *Pleurotus albidus*, milk-clotting, submerged fermentation.

INTRODUCTION

Proteolytic enzymes represent 65% of worldwide enzymes industry market and, among them, chymosin has great application in dairy industry acting in the casein peptides linkages during the cheese making (Yin et al.,

encouraged the search of new milk-clotting sources, especially the ones from microbial source (Ahmed et al., 2010; El-Baky et al., 2011; Leite Júnior et al., 2014; Wang et al., 2015).

Artigo 2

***Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases**

Salomão Rocha Martim¹, Larissa Svetlana Cavalcanti Silva¹, Leilane Bentes de Souza², Edson Júnior do Carmo³, Mircella Marialva Alecrim¹, Marne Carvalho de Vasconcellos⁴, Ila Maria de Aguiar Oliveira⁴ e Maria Francisca Simas Teixeira⁵

1Universidade Federal do Amazonas, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal-Bionorte, Manaus, Brazil. 2Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Manaus, Brazil. 3 Universidade Federal do Amazonas Programa de Biotecnologia, Manaus, Brazil. 4 Universidade Federal do Amazonas Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Brazil. 5 Coleção de Culturas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil.

Resumo

Pesquisas têm sido realizadas para descoberta de novas fontes de proteases microbianas com atividade coagulante do leite bovino, em substituição aos coalhos tradicionais. Este estudo foi realizado com objetivo de selecionar uma espécie de cogumelo produtora de proteases coagulantes utilizando a tecnologia da fermentação submersa. Entre as seis espécies avaliadas, *Pleurotus albidus* expressou o maior valor de razão coagulante (21,60). As enzimas coagulantes apresentaram máxima atividade na temperatura de 60 °C e pH 6. Ácido iodoacético demonstrou maior inibição na atividade proteolítica sugerindo maior quantitativo de cisteínoproteases no extrato bruto de *Pleurotus albidus*. Os coagulantes de *Pleurotus albidus* não apresentaram toxicidade contra fibroblastos humanos (MRC5) nas condições analisadas e podem ser aplicados na indústria de alimentos. Essa é a primeira publicação reportando a produção de coagulante por *P. albidus*.

Palavras chave: *Pleurotus albidus*, coagulante, fermentação submersa

INTRODUÇÃO

As proteases representam 65% do mercado mundial e dentre essas enzimas a quimosina tem ampla utilização na indústria de laticínios para coagular a caseína durante a fabricação do queijo (Yin et al., 2014). A elevação da produção mundial de queijo, a escassez e o elevado preço do coalho tradicional associado a rejeição das proteases geneticamente modificadas tem incentivado a busca por novas fontes de enzimas coagulantes, em especial as de origem microbianas (Ahmed et al., 2010; El-Baky et al., 2011; Leite Júnior; Tribst; Cristianini, 2014; Wang et al., 2015).

As proteases microbianas apresentam vantagens em relação às de origem vegetal e animal por que os micro-organismos expressam maior diversidade bioquímica, facilidade de manipulação genética e menores custos de produção (Erjavec, 2012)

Membros da diversidade microbiana, os fungos têm muitas vantagens considerando que são normalmente GRAS (Geralmente Considerado como Seguro) e as suas enzimas extracelulares são facilmente recuperados em bioprocessos (Sandhya et al., 2005). Dentre os fungos, os cogumelos se destacam como produtores de proteases coagulantes, sendo a fermentação submersa (FSm) um dos métodos mais utilizados para produção dessas enzimas. As principais vantagens encontradas com a FSm são o controle de parâmetros do processo, tais como pH, temperatura, transferência de oxigênio e umidade, além da facilidade de controlar a produção em grande escala (Sandri et al., 2015; Uzuner e Cekmecelioglu, 2015; Sandhya et al., 2005).

Devido as propriedades nutricionais e medicinais dos cogumelos, tem crescido a utilização desses macrofungos na indústria de alimentos e farmacêutica. Dentre as 7,000 espécies de cogumelos que apresentam níveis variáveis de comestibilidade, apenas 2,000 são consideradas seguras. Contudo um número reduzido de espécies de cogumelos são consideradas perigosas porque produzem substancias toxicas, maleficas à saude humana, inclusive podendo ser letal ao individuo (Jo et al., 2014).

O objetivo desse estudo foi investigar proteases coagulantes de cogumelos para selecionar uma espécie fonte dessas enzimas com características para futura aplicação na indústria de queijo. Este é o primeiro estudo reportando as características das proteases coagulantes de *Pleurotus albidus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cogumelos

Pleurotus albidus DPUA1692, *Auricularia mixotricha* DPUA 1695, *Ganoderma lucidum* DPUA 1694, *Lentinus citrinus* DPUA 1535, *Lentinus crinitus* DPUA 1693, *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, do acervo da Coleção DPUA, da Universidade Federal do Amazonas foram avaliados quanto à produção de proteases coagulantes. Para obtenção de cultura viável, do cultivo de cada espécie foram transferidos fragmentos micelial para superfície

de ágar BDA [ágar batata dextrose adicionado de extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placas de Petri. As culturas foram mantidas a 25 °C por 12 dias.

Meio de fermentação e condições de cultivo

Para produção de proteases coagulantes os cogumelos foram cultivados em meio líquido (g/L de água destilada): glicose (20), extrato de levedura (5), peptona de carne (5), gelatina (5), pH 5,6. A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento, em cada frasco foi inoculado com 10 discos miceliais de 5mm de diâmetro. A fermentação foi conduzida a 30 °C, a 150 r.p.m. em agitador orbital (Nova Tecnica, modelo 712, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Após 120 h, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo utilizando papel de filtro Whatman n.1 e em membrana de celulose (0,45µm). Nos extratos recuperados foi determinada a atividade proteolítica, atividade coagulante e razão coagulante.

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada segundo Leighton et al. (1973). Na mistura reacional foi utilizado 250 µL de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl para cada 150 µL do extrato enzimático bruto. A reação, incluindo o branco, foi incubada a 25 °C e, após 60 minutos adicionado 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v). O resíduo remanescente foi separado por centrifugação a 4 °C (8.000xg/5 minutos). Do sobrenadante foi retirado 800 µL e adicionado em 1,4 mL de NaOH 1M. A leitura foi realizada em 440 nm. Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância em 1 hora a 440 nm, nas condições de ensaio. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Atividade coagulante

A atividade coagulante foi determinada de acordo com Arima et al. (1970). Como substrato foi utilizada solução de leite em pó desnatado 10 % (p/v) dissolvida em 100 mL de solução de CaCl₂ 0,05 M, pH 5,8. Resumidamente, 5 mL da solução de leite foram distribuídos em tubos de ensaio e incubados em banho maria a 40 °C por 15 minutos. O extrato enzimático foi adicionado ao leite e a contagem do tempo reacional foi iniciada. O tempo de coagulação foi registrado quando foi observada a formação de coágulos na parede dos tubos de ensaio. Os

experimentos foram realizados em triplicata. Uma unidade de atividade coagulante (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de coagular 1 ml de substrato em 40 minutos a 40 °C. A atividade coagulante foi calculada de acordo com Shata (2005): $U = 2400/T \times S/E$, onde T é o tempo necessário para formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume da enzima.

Para selecionar uma cepa e caracterizar suas enzimas, as amostras foram agrupadas em três classes de acordo com a força de compactação do coágulo do leite e separação do soro do leite no tubo de ensaio: forte coagulação do leite (coágulo distinto e soro abundante), fraca coagulação do leite (formação de coágulos sem separação clara do soro de leite) e leite sem coagulação (coágulo e soro de leite ausente) (Alecgrim et al., 2015).

Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima coagulante

Para ensaio do pH ótimo, a atividade coagulante foi determinada a 40 °C em diferentes valores de pH utilizando as seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80 °C. Para estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:1) nas seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10) e mantidos a 25 °C por 24 horas. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80 °C por 1 hora. Leite em pó desnatado (10g) dissolvido em solução 0,05 M de CaCl₂, pH 5,8 foi utilizado como substrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As atividades relativas foram determinadas nas condições ótimas de pH e de temperatura.

Efeito de inibidores de proteases e íons metálicos na atividade coagulante

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi investigado utilizando 10 mM de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), 10 mM de ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), 10 mM de ácido iodoacético e 0,1 mM de Pepstatin, na mistura reacional. Os íons metálicos utilizados na concentração de 10 mM, na mistura reacional foram CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl. As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura. A atividade enzimática residual foi comparada com o controle que foi incubado sem os inibidores e os íons metálicos e correspondeu a 100 % de atividade. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Teste de toxicidade *in vitro*

Todos os testes de toxicidade foram realizados no Laboratório de Atividade Biológica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Linhagem e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizados fibroblastos humanos (MRC5) mantidos em garrafas de cultura contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) 10% (p/v) e antibiótico Ampicilina-Estreptomicina 1% (p/v). As células foram acondicionadas em estufa com 5% de CO₂, a 37° C. O modelo de estudo proporcionou a comparação do efeito citotóxico do extrato de *Pleurotus albidus*, em diferentes concentrações, sobre linhagens de fibroblastos humanos MRC5.

Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade dos extratos de *Pleurotus* foi avaliada pelo teste do Alamar Blue, conforme metodologia descrita por Ahmed, Cogal e Walsh (1994). Neste teste o Alamar Blue (resazurina) de cor azul e não fluorescente, é reduzido a resofurina, de cor rosa e fluorescente, pelas células viáveis. As células foram transferidas para placas com 96 poços na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço. Esta placa foi mantida em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este período as células foram tratadas na concentração única de 200 µg/ml de extrato de *Pleurotus* durante 72 horas. Como controle positivo foi utilizado a doxorubicina (1720 µM). Os poços controle negativo receberam DMSO (diluinte da amostra) a 0,1%. Três horas antes do final de cada tempo de tratamento foi acrescentado 10 µL do Alamar Blue na concentração de 0,02% e foi realizada a leitura das placas em Leitor de microplaca na região da fluorescência nos comprimentos de onda em 465 nm e 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 6.0. As imagens foram capturadas pelo programa Zen 2 da Carl Zeiss Microscópio GmbH Company®.

Análise estatística

Em todos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando programa Minitab, versão 16.0 (Minitab, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade de enzimas utilizadas na fabricação de queijo influencia na biotransformação dos componentes do leite e no processo de formação do coalho, determinando as propriedades organolépticas do produto final. Proteases com atividade semelhante aos de coalhos comerciais foram identificadas em basidiomicetos (Shamtsyan et al., 2014).

Outro fator importante parâmetro é a razão coagulante. A relação entre a atividade coagulante e proteolítica associado à especificidade enzimática são fatores que influenciam na escolha de uma nova protease coagulante (Alecrim et al., 2015).

Entre os seis cogumelos estudados, *G. lucidum* e *P. albidus*, nas condições de cultivo, foram as espécies que produziram proteases coagulantes. Os valores de atividade coagulante e razão coagulante foram mais significativos para *P. albidus* (73,39 U/mL e 21,60, respectivamente). Na investigação realizada por Shamtsyan et al. (2014) foi verificada atividade coagulante (5,40 U/mL) e razão coagulante (79,00) para *C. lagopides*. *A. flavo furcatis* DPUA 1493 apresentaram atividade coagulante (68,61 U/mL) e razão coagulante (1,81), conforme relatado por Alecrim et al (2015). O coagulante de *T. clypeatus* apresentou atividade coagulante (333,33 U/mL) e razão coagulante (64,70), de acordo com Majumder et al. (2015).

Nesta pesquisa foi observada a formação de coágulo forte, com separação de soro, quando proteases coagulantes de *P. albidus* foram adicionadas ao leite desnatado (Figura 1), resultado que indica a potencial aplicação desses biocatalisadores na indústria de laticínios na fabricação de queijo. Essa propriedade de coagulação também foi notada por Alecrim et al. (2015), na pesquisa realizada com *Aspergillus flavo furcatis*, uma linhagem do bioma amazônico.



Figura 1. Atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

O estudo das condições ótimas de pH, temperatura e perfil de estabilidade podem ser utilizados na indicação da aplicação industrial de enzimas (Castro e Sato, 2013). O efeito do pH na atividade de enzimas coagulantes de *P. albidus* está mostrado na figura 2. O aumento do pH do leite foi acompanhado de perda de atividade coagulante. A enzima exibiu 100 % de atividade em pH 6, seguida de decréscimo nos pH subsequentes apresentando 19,37% de atividade relativa em pH 10.

Pediococcus acidilactici SH também exibiu máxima atividade coagulante em pH 6, porém a elevação dos valores de pH para 7 e 8 diminuiu a atividade coagulante em 54% e 21 %, respectivamente (Imdakim et al., 2015). Vishwanatha (2010) verificou maior valor de atividade coagulante da enzima purificada de *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 em pH 6,3, seguido de redução da atividade coagulante em pH superiores. Vannabun et al. (2014) relataram que em condições fora do pH ótimo ocorre perda de atividade enzimática devido a alterações da conformação da proteína causada pela repulsão de cargas. Nessas condições as distribuições de carga da superfície proteica e as conformações são alteradas e enzimas não conseguem se associar com o substrato corretamente. Segundo Vasconcelos et al. (2004) o pH pode influenciar no rendimento da coagulação do leite, sendo que na faixa de pH de 5,7 a 6,2, os coalhos de origem microbiana apresentam maior atividade proteolítica em relação aos coalhos de bezerro e genéticos.

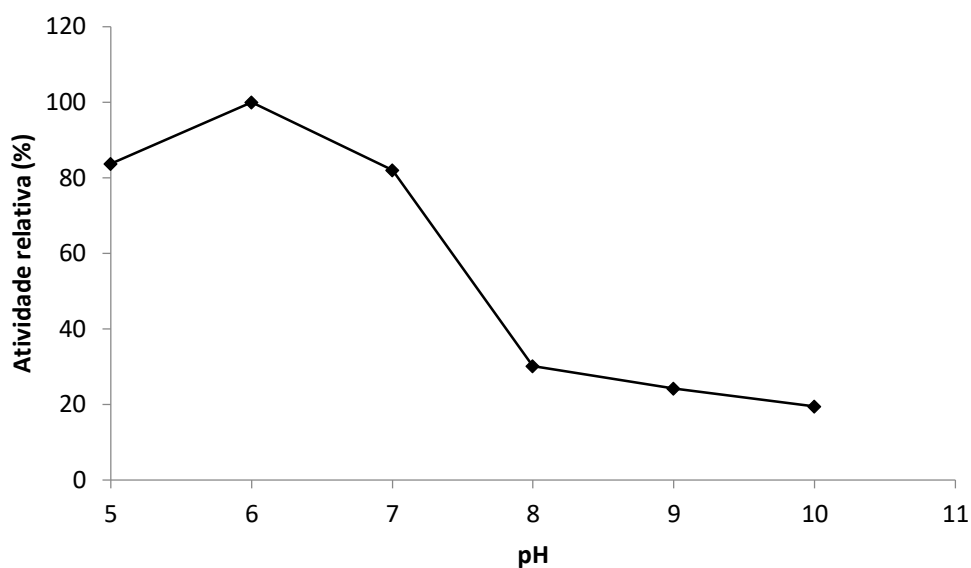


Figura 2. Efeito do pH na atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

A temperatura exerceu forte influência na atividade das proteases coagulantes de *P. albidus* (Figura 3). Nas condições de análise, a atividade ótima foi determinada a 60 °C, seguida de decréscimo nas temperaturas superiores. As proteases coagulantes de *Rhizopus oryzae* (Kumar et al., 2005), *Penicillium oxalicum* (Hashem, 1999) e *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* (Sun et al., 2014) também expressaram ótima a 60 °C. Segundo Dybowska & Fujio (1996) em altas temperaturas o processo de coagulação desacelera. A elevação da temperatura do leite afeta a taxa de agregação proteica, aumenta a velocidade de formação do gel (McMahon et al., 1984) e causa o encolhimento da matriz proteica devido ao aumento de interações hidrofóbicas (Ahmed e Helmy, 2012). O fator responsável pelo aumento do tempo de coagulação do coalho de leite aquecido é o complexo formado entre a κ -caseína e β -lactoglobulina, ou uma α -lactalbumina, embora as alterações no equilíbrio de sal também estejam envolvidas (Balcones et al., 1996).

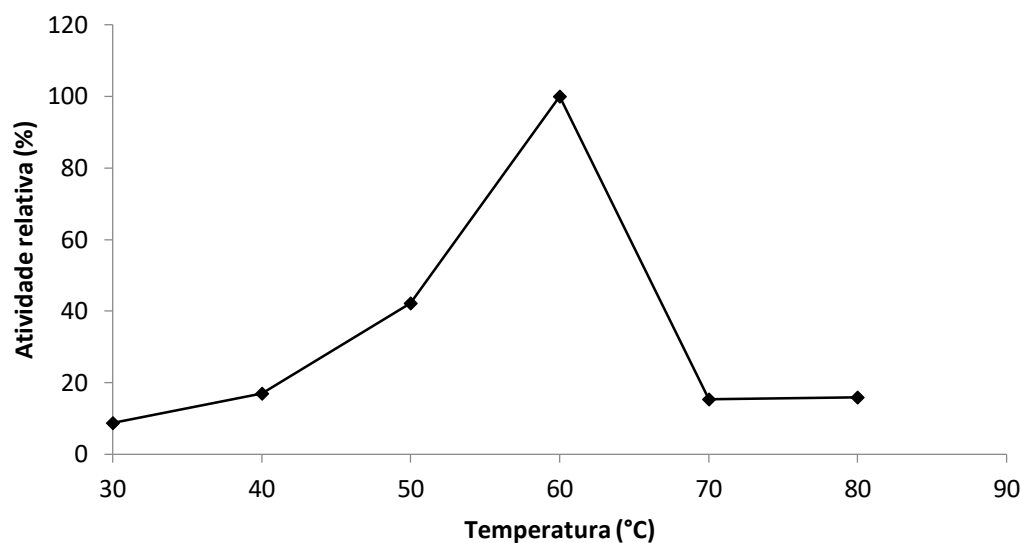


Figura 3. Efeito da temperatura na atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

A figura 4 mostra a estabilidade das proteases coagulantes de *P. albidus* em diferentes valores de pH. Essas enzimas apresentaram atividade em todas as condições de estudo, porém a reduzida estabilidade foi observada com o aumento dos valores de pH. As maiores atividades coagulantes foram verificadas em pH 4. Em pH 5 e 6 a enzima apresentou 51,34 % e 30,82 % de atividade, respectivamente. A maior perda de atividade coagulante foi verificada em pH 10 no qual a enzima apresentou apenas 11,21 % de atividade relativa. Resultados semelhantes foram relatados por Merheb-Dini et al. (2010) com as enzimas de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e, ainda verificaram maior atividade de coagulação do leite em pH 3,5. Yegin (2012) reportaram, no estudo com proteases coagulantes de *Mucor mucedo* DSM 809, estabilidade enzimática na faixa de pH entre 5,0-5,5, mas em valores de pH superiores a 6,0 ocorreu diminuição acentuada da atividade coagulante.

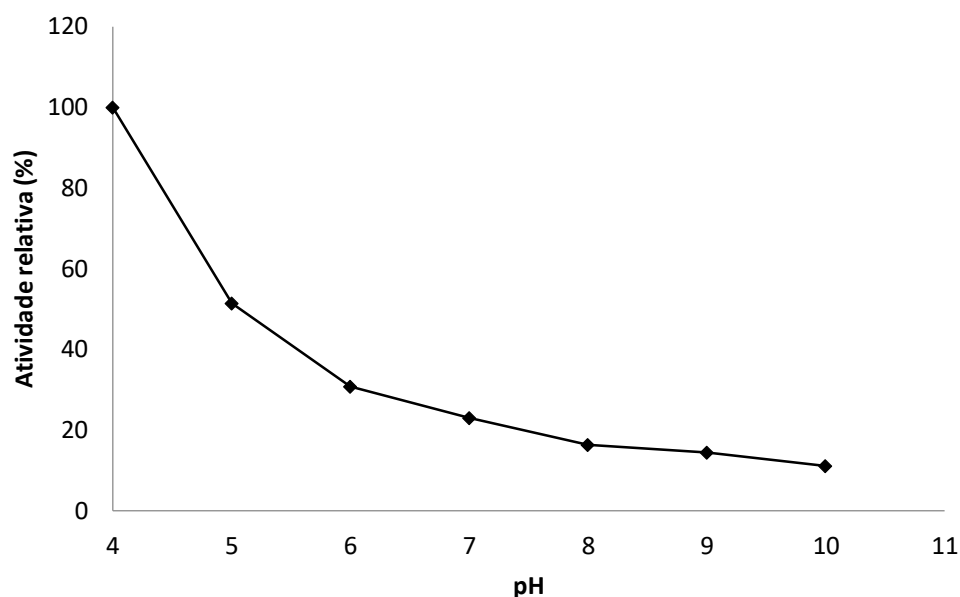


Figura 4. Efeito do pH na estabilidade das proteases coagulantes do extrato bruto de *P. albidus*.

Os diferentes níveis de resistência ao tratamento térmico demonstrados por enzimas coagulantes varia de acordo com a origem da proteína (Hayaloglu et al., 2014). A figura 5 mostra a estabilidade do extrato bruto para diferentes valores de temperatura. Após 1 hora de incubação a 40 °C a enzima apresentou maior atividade coagulante, mas a 50 °C houve decréscimo de 34 %. Nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C foram verificadas perdas de atividade de 72,71 %, 75,85% e 78,80 %, respectivamente. A protease coagulante de *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091, estudada por Majumder et al., (2015) foi moderadamente estável entre 35 °C e 50 °C, retendo mais de 80% da sua atividade e, com decréscimo rápido com o aumento da temperatura. Alecrim et al (2015) verificou que o extrato bruto de *Aspergillus flavo furcatis* demonstrou estabilidade térmica superior a 70 % entre as temperaturas de 40 a 60 °C, porém em temperaturas superiores houve decréscimo de atividade de até 28 %.

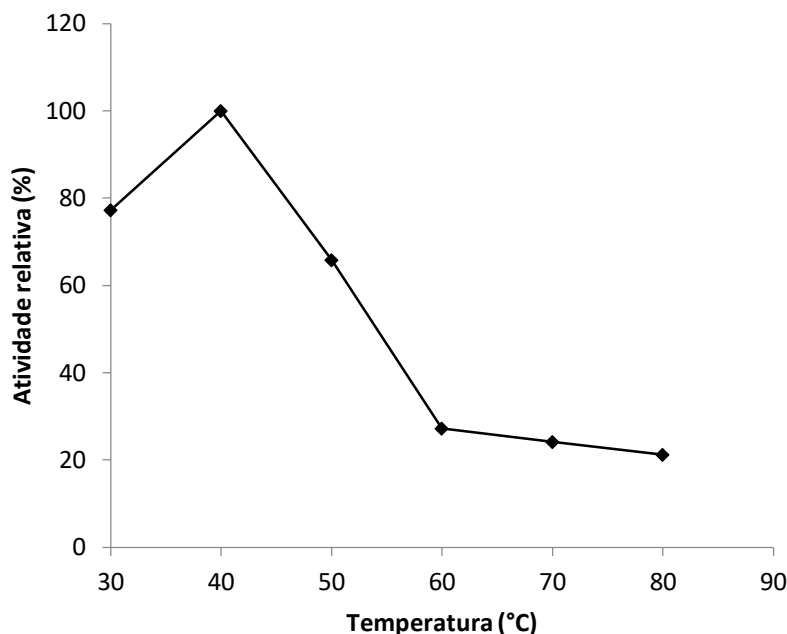


Figura 5. Efeito da temperatura na estabilidade das proteases coagulantes de *P. albidus*.

O efeito de íons metálicos e inibidores na atividade coagulante está demonstrado na Tabela 1. O íon Zn^{2+} elevou a atividade coagulante em 78 %. Os íons Mn^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+} causaram redução de 97,60 %, 78,75 % e 35 %, respectivamente. Os íons Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ e K^+ inibiram completamente a enzima (Figura 5). Sun et al., (2014) verificaram que os íons Zn^{+2} elevaram em 12 % a atividade da protease coagulante de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. Ahmed e Helmy (2012) verificaram que os íons Zn^{2+} elevaram a atividade das proteases coagulantes de *Bacillus licheniformis* 5A5 em 67,7 %. Por outro lado os íons Cu^{2+} e Mg^{2+} estimularam as proteases coagulantes de *Penicillium oxalicum*, conforme reportado por Hashem (2000). Segundo Merheb-Dini et al. (2009) os íons podem se ligar em resíduos de aminoácidos e modificar a estrutura das proteínas influenciando positivamente ou negativamente na atividade proteolítica.

Nos testes utilizando diferentes inibidores, os resultados demonstraram a presença de diferentes grupos de proteases coagulantes de *P. albidus*, com maior prevalência de cisteino-proteases. As proteases coagulantes de *P. albidus* mantiveram estabilidade frente ao EDTA retendo 93,70 % de atividade coagulante. Pepstatin A e PMSF causaram inibição de 35 % e 49,50%, respectivamente. Porém, na presença de ácido iodoacético o coagulante reteve apenas 38 % de atividade (Figura 6). Estes resultados demonstraram os grupos SH provavelmente

podem estar envolvidas no mecanismo catalítico e sugere que as proteases coagulantes de *P. albidus* pertencem à família das cisteína proteases.

Tabela 1. Efeito de íons e inibidores na atividade coagulante de *P. albidus*.

Reagentes	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)
Controle	—	100 ± 0,00
Zn ²⁺	10	178 ± 0,20
Mn ²⁺	10	98 ± 0,17
Fe ²⁺	10	79 ± 0,04
Cu ²⁺	10	35 ± 0,02
Mg ²⁺	10	0 ± 0,00
Na ⁺	10	0 ± 0,00
Ca ²⁺	10	0 ± 0,00
K ⁺	10	0 ± 0,00
EDTA	10	94 ± 0,13
Pepstatin A	1	65 ± 0,22
PMSF	10	51 ± 0,29
Ácido iodoacético	10	38 ± 0,20

Após 72 h de tratamento com os extratos de *P. albidus* a viabilidade celular da MRC-5 foi superior a 100% e as células não apresentaram alterações morfológicas quando comparadas ao controle negativo DMSO. Como controle positivo de morte celular foi utilizada a doxorrubicina, o qual apresentou 23% de viabilidade celular quando testada a 20µM ou 34µg/mL (Figura 6). Estes resultados demonstram que o extrato coagulante de *P. albidus* não apresenta toxicidade e pode ser utilizado com segurança na indústria de alimentos. Al-Temimay et al. (2015) e Lai et al. (2013) relataram que os extratos de *P. ostreatus* e *Hericium erinaceus* não apresentaram citotoxicidade contra linhagens celulares de fibroblastos MRC-5. O extrato aquoso aquecido *Lignosus rhinocerotis* também não foi tóxico para fibroblastos MRC-5, conforme demonstrado por Lau et al. (2013).

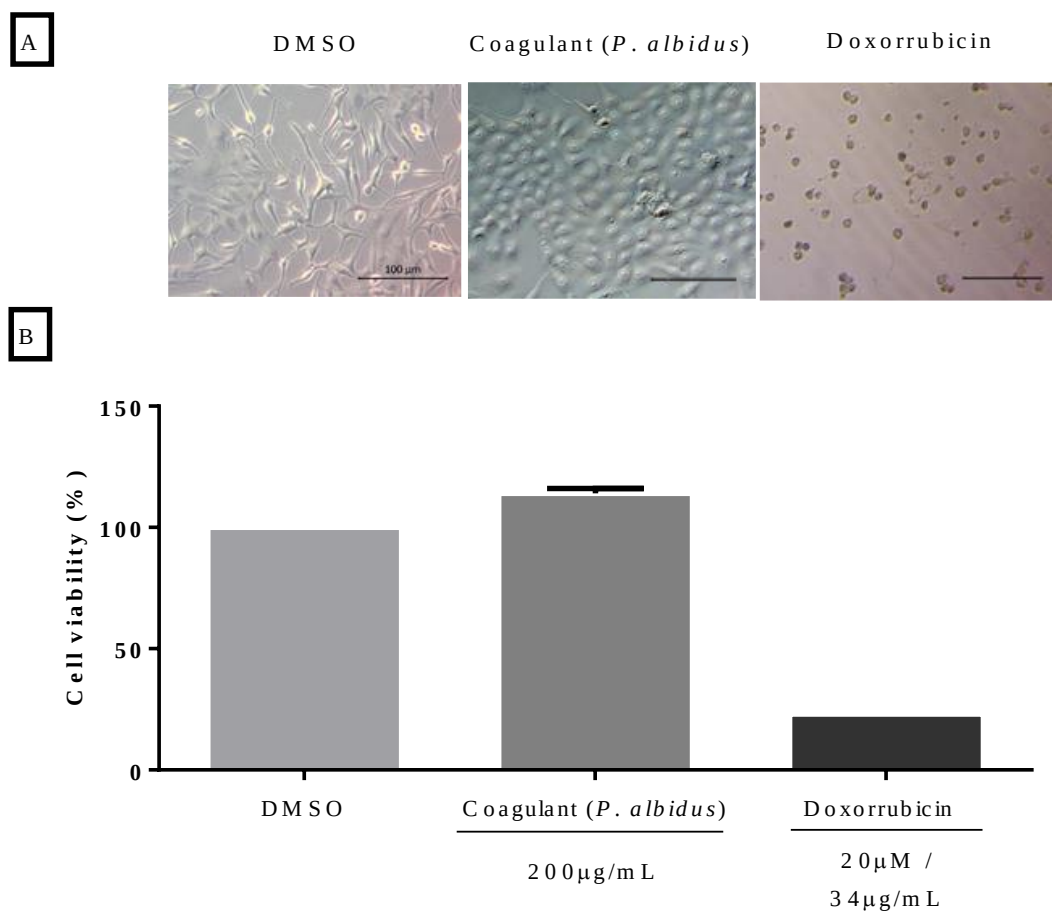


Figura 6: Citotoxicidade do extrato coagulante de *P. albidus* em fibroblastos humanos (MRC-5) após 72 horas de tratamento. A: MRC-5 após tratamento com DMSO, Extrato coagulante de *P. albidus* PASUB, Doxorubicina. B: Viabilidade celular do extrato de *P. albidus*, DMSO - Dimetilsulfóxido (controle negativo, 0,01%) e DOXO - Doxorubicina (controle positivo, 20µM ou 34µg/mL).

CONCLUSÃO

Dos seis macrofungos avaliados, *Pleurotus albidus*, uma espécie de cogumelo comestível não tóxica, nativa do ecossistema amazônico, sintetiza coagulante do leite bovino. Este coagulante expressa atividade ótima em pH 6 a 60 °C e tem maior estabilidade em pH 4,0 a 40 °C, com predomínio de cisteíno-protease.

REFERÊNCIAS

- Ahmed IAM, Babiker EE, Mori N (2010). pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. LWT - Food Sci. Technol. (43) 759-764.
- Ahmed SA, Gogal Jr RM, Walsh JE (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. J Immunol Methods (170) 211-224.
- Ahmed SA, Helmy WA (2012). Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes. Braz. J. Chem. Eng. (29) 69-76.
- Alecrim MM, Palheta RA, Teixeira MFS, Oliveira IMA (2015). Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. Int. J. Food Sci. and Technol. (50) 151-157.
- Al-Temimay IA, AL-Jibouri MH, Hassan AA, Mohammad FI (2015). Test the cytotoxicity of Pleurotin extracted from an edible mushroom *Pleurotus osteratus* against three human carcinoma cell line. Iraqi J Sci. (56) 2773-2781.
- Arima K, Yu J, Iwasaki S (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. Methods Enzymol. (19) 446-459.
- Balcones E, Olano A, Calvo MM (1996). Factors affecting the rennet clotting properties of Ewes, milk. J. Agric. Food. Chem. (44) 1993-1996.
- Castro RJS, Sato HH (2014). Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. Biocat. Agric. Biotechnol. (3) 20-25.
- Dybowska E, Fujio Y (1996). Effect of temperature and gluconod-lactone (GDL) concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method. Milchwissenschaft, (51) 557-560.

- El-Baky HA, Linke D, Nimtz M, Berger RG (2011). PsoP1, a Milk-Clotting Aspartic Peptidase from the Basidiomycete Fungus *Piptoporus soloniensis*. J. Agric. Food Chem. (59) 10311-10316.
- Erjavec J, Kos J, Ravnikar M, Dreo T, Sabotič J (2012). Proteins of higher fungi--from forest to application. Trends Biotechnol. (30) 259-273.
- Hashem AM (1999). Optimization of milk-clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. Bioresour. Technol. (70) 203-207.
- Hashem AM (2000). Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Penicillium oxalicum*. Bioresour. Technol (75) 219-222.
- Hayaloglu AA, Karatekin B, Gurkan H (2014). Thermal stability of chymosin or microbial coagulant in the manufacture of Malatya, a Halloumi type cheese: Proteolysis, microstructure and functional properties. Int Dairy J. (38) 136-144.
- Imdakim MM, Hassan Z, Aween MM, Elshaafi BM, Muhialdin BJ (2015). Milk clotting and proteolytic activity of enzyme preparation from *Pediococcus acidilactici* SH for dairy products. Afr. J. Biotechnol. (14) 133-142.
- Jo WS, Hossain MA, Park SC (2014). Toxicological profiles of poisonous, edible, and medicinal mushrooms. Mycobiology 42:215-220.
- Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: Purification and characterization. Process Biochem. (40) 1701-1705.
- Lai PL, Naidu M, Sabaratnam V, Wong KH, David RP, Kuppusamy UR, Abdullah N, Malek SN (2013). Neurotrophic properties of the Lion's mane medicinal mushroom, *Hericium erinaceus* (Higher Basidiomycetes) from Malaysia. Int J Med Mushrooms (15) 539-554.

- Lau BF, Abdullah N, Aminudin N, Lee HB (2013). Chemical composition and cellular toxicity of ethnobotanical-based hot and cold aqueous preparations of the tiger's milk mushroom (*Lignosus rhinocerotis*). *J Ethnopharmacol.* (150) 252-262.
- Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973). The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* (76) 103-122.
- Leite Júnior BRC, Tribst AAL, Cristianini M (2014). Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. *Innov Food Sci Emerg Technol.* (21) 44-49.
- Majumder R, Banik SP, Khowala S (2015). Purification and characterisation of κ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. *Food Chem.* (173) 441-448.
- McMahon DJ, Richardson GH, Brown RJ (1984). Enzymic milk coagulation: Role of equation involving coagulation time and curd firmness in describing coagulation. *J. Dairy Sci.* (67) 1185-1193.
- Merheb-Dini C, Cabral H, Leite RSR, Zanthorlin LM, Okamoto DN, Rodriguez GOB, Juliano L, Arantes EC, Gomes E, Silva R (2009). Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *J. Agric. Food. Chem.* (57) 9210-9217.
- Merheb-Dini C, Gomes E, Boscolo M, Silva R (2010). Production and characterization of a milk clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). *Food Chem.* (120) 87-93.
- Minitab (2010). Minitab statistical software. LEAD Technologies, Inc. Version 16.0, 2010.
- Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.* (40) 2689-2694.

- Sandri IG, Fontana RC, Silveira, MM (2015). Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. LWT - Food Sci. Technol. (61) 430-436.
- Shamtsyan M, Dmitriyeva T, Kolesnikov B, Denisova N (2014). Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. LWT - Food Sci. Technol. (58) 343-347.
- Shata HM (2005). Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. Pol. J. Microbiol. 54:241-247.
- Sun Q, Wang XP, Yan QJ, Chen W, Jiang ZQ (2014). Purification and Characterization of a chymosin from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. Appl Biochem Biotechnol (174) 174-185.
- Uzuner S, Cekmecelioglu D (2015). Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate. J. Mol. Catal. B: Enzym. (113) 62-67.
- Vannabun A, Ketnawa S, Phongthai S, Benjakul S, Rawdkuen S (2014). Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed Giant Catfish. Food Biosci. (6) 9-16.
- Vasconcelos MP, Araújo KGL, Verruma-Bernardi MR (2004). Efeito do pH de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. R. bras. Agrociência (10) 499-502.
- Vishwanatha KS, Rao AGA, Singh SA (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Appl Microbiol Biotechnol (85) 1849-1859.
- Wang N, Wang KY, Li G, Guo W, Liu D (2015). Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif. (111) 75-81.
- Yegin S, Goksungur Y, Fernandez-Lahore M (2012). Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. Food Chem. (133) 1312-1319.

Yin C, Zheng L, Chen L, Tan Q, Shang X, Ma A (2014). Cloning, Expression, and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Protease Gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. Appl. Biochem. Biotechnol. (172) 2119-2131.

Capítulo 4

Artigo submetido na Revista científica Journal of
Dairy Science

Artigo 3

Coagulante de *Pleurotus albidus* DPUA 1692 cultivado em resíduos lignocelulósicos da Amazônia

Salomão Rocha Martim¹

Larissa Svetlana Cavalcanti Silva¹

Mircella Marialva Alecrim¹

Lorisa Simas Teixeira²

Maria Francisca Simas Teixeira^{3*}

¹Universidade Federal do Amazonas, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal-Bionorte, Manaus, Brasil, salomao.martim@gmail.com, larissasvetlanas@gmail.com and mircella.ma@gmail.com;

²Uninorte- Centro universitário do Norte, Manaus, Brasil.

³Coleção de Cultura DPUA, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil.

*mteixeira@ufam.edu.br

Endereço: Avenida General Rodrigo Octávio, 3000, Coroado I, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brazil.

Resumo

Nos últimos anos os cogumelos têm se destacado como fonte de coagulantes do leite bovino. Neste estudo foi avaliada a síntese de coagulante por *Pleurotus albidus* cultivado em resíduos agroindustriais da Amazônia. Parâmetros que afetam a produção de coagulante por *Pleurotus albidus*, como pH inicial do meio de cultivo, idade e tamanho do inóculo e tempo de fermentação também foram investigados. O coagulante obtido nas condições ótimas de produção foi avaliado quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e a temperatura, efeito de íons e inibidores. *Pleurotus albidus* sintetizou proteases com elevada razão coagulante (14,58), formação de soro abundante e forte coagulação nas seguintes condições: inóculo com 10 dias de cultivo, pH 6 do meio, tamanho do inóculo de 2,5% durante 10 dias de bioprocessamento. O coagulante exibiu máxima atividade catalítica em pH 5, a 55 °C, com estabilidade até 45 °C, sendo completamente inibido por ácido iodoacético. *Pleurotus albidus* é uma fonte potencial de coagulante que pode ser aplicada na indústria de laticínios, em especial na fabricação de queijo.

Palavras chave: cogumelo comestível, protease, fermentação, caracterização, otimização

INTRODUÇÃO

Os coalhos são proteinases extraídas do abomasso de bezerros tradicionalmente utilizados na elaboração de queijos. A desestabilização das micelas, com consequente

agregação e formação da coalhada resulta da clivagem da ligação Phe105-Met106 na cadeia da κ -caseína pela quimosina (Hang et al., 2016; Guleria et al., 2016).

Outras fontes de coagulantes são os vegetais, as bactérias e fungos. Dentre os de origem vegetal tem destaque *Ficus religiosa*, *Cucumis melo* e *Artocarpus altilis* (Kumari et al., 2012; Mazorra-Manzano et al., 2013; Soares et al., 2015). Porém, os extratos de plantas são considerados inadequados porque possuem elevada atividade proteolítica que afeta o sabor e textura dos queijos (Grozdanovic et al., 2013).

A diversidade bioquímica, a facilidade de manipulação genética e a recuperação de compostos bioativos no final do bioprocesso qualificam os fungos como fontes renováveis e eficientes de coagulantes (Ayana et al., 2015; Daudi et al., 2015). Neste contexto, os cogumelos são fontes promissoras de coagulantes com características apropriadas para produção de queijos, isto é, elevada atividade coagulante e baixa atividade proteolítica (Shamtsyan, 2016).

Coprinus lagopides (Shamtsyan et al., 2014), *Hericium erinaceum* NBRC 100328 (Nakamura et al., 2014), *Schizophyllum commune* (Okamura-Matsui et al., 2001), *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091 (Majumder et al., 2015) são espécies de cogumelos comumente exploradas em bioprocessos a baixo custo e em tempo reduzido de produção. Estudos têm demonstrado a utilização de coagulantes obtidos de fungos macroscópicos para elaboração de queijos (Sathya et al., 2009; Alves et al., 2013; Bensmail et al., 2015).

A tecnologia da fermentação em estado sólido (FSS) promove a síntese de coagulantes por fungos em elevada concentração, com baixo consumo energético. FSS mimetiza as condições desejáveis para o crescimento do organismo em resíduos lignocelulolíticos, condição que proporciona redução do custo final do bioprocesso e minimizam o impacto ambiental (Benluvankar et al., 2015; Sindhu et al., 2015).

Resíduos agroindustriais amazônicos como exocarpo de cupuaçu e semente de açaí são usados para produção de proteases e crescimento de cogumelos (Fonseca et al., 2015; Machado et al., 2016). Neste estudo, o coagulante de *P. albidus* DPUA 1692 cultivado em resíduos lignocelulósicos da Amazônia foi caracterizado parcialmente e utilizado na fabricação de Queijo Minas frescal.

METODOLOGIA

Cogumelo e manutenção da cultura estoque

Pleurotus albidus DPUA 1692 foi cultivado em BDA [ágar batata dextrose adicionado de extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placas de Petri. Os cultivos, mantidos a 25 °C por 10 dias, na ausência de luz. A cultura estoque de *P. albidus* foi mantida em BDA com extrato de levedura 0,5% (p/v), em tubos de ensaio a 4 ° C para uso posterior.

Fermentação em matriz sólida

Para produção de coagulante em matriz sólida *P.albidus* foi cultivado em resíduos agroindústrias da Amazônia: engaço de banana (*Musa* sp), exocarpos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum) e tucumã (*Astrocarium vulgare* Mart.), semente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e serragem de angelim (*Hymenolobium* sp. Ducke), suplementados com farelo de arroz (*Oryza sativa* L.) (Tabela 1). O pH de cada mistura de resíduo foi ajustado para 6,0 e a umidade corrigida para 60 %. Em seguida, cada mistura foi acondicionada em sacos de polietileno para esterilização a 121 °C, 1 atm, por 1 hora. Posteriormente foram adicionados cinco discos miceliais de 5mm e o bioprocesso conduzido por 10 dias, a 25 °C, na ausência de luz. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1. Resíduos lignocelulósicos (RL) utilizados na fermentação em matriz sólida para produção de coagulante por *P. albidus*

Resíduos lignocelulósicos	Concentrações (% p/p)
EB	100
EB:FA	90:10
EB:FA	80:20
EC	100
EC:FA	90:10
EC:FA	80:20
ET	100
ET:FA	90:10
ET:FA	80:20
SA	100
SA:FA	90:10
SA:FA	80:20
SE	100
SE:FA	90:10
SE:FA	80:20

EB: engaço de banana; EC: exocarpo de cupuaçu; ET: exocarpo de tucumã;
FA: farelo de arroz; SA: semente de açaí; SE: serragem de angelim

As proteases coagulantes produzidas por fermentação em matriz sólida foram extraídas com água destilada esterilizada na razão 1: 5 (substrato:água, p/v), mantendo-se 150 rpm, a 30 °C. Após 30 minutos o extrato bruto foi recuperado por filtração sob vácuo em papel de filtro Whatman nº 1, seguindo as filtrações em membrana de éster de celulose (0,45 µm) e em membrana polietersulfônica (0,22 µm), respectivamente.

Avaliação de parâmetros de fermentação para produção de coagulante por *P. albidus*

Para avaliar os parâmetros que influenciam na produção de proteases coagulantes em matriz sólida por *P. albidus* foram realizadas as seguintes análises: idade do inóculo (4, 7, 10, 13, 16 dias), tamanho do inóculo (0,5%, 1,0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%, m/v), pH inicial do meio de cultivo (5, 6, 7, 8, 9, 10) e tempo de fermentação (6, 8, 10, 12, 14, 16 dias).

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada segundo Leighton et al. (1973). Na mistura reacional foi utilizado 250 µL de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl para cada 150 µL do extrato enzimático bruto. A reação, incluindo o branco, foi incubada a 25 °C e, após 60 minutos adicionado 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v). O resíduo remanescente foi separado por centrifugação a 4 °C (8.000xg/5 minutos). Do sobrenadante foi retirado 800 µL e adicionado em 1,4 mL de NaOH 1M. A leitura foi realizada em 440 nm. Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância em 1 hora a 440 nm, nas condições de ensaio. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Atividade coagulante

A atividade coagulante foi determinada de acordo com Arima et al. (1970). Como substrato foi utilizada solução de leite em pó desnatado 10 % (p/v) dissolvida em 100 mL de solução de CaCl₂ 0,05 M, pH 5,8. Resumidamente, 5 mL da solução de leite foram distribuídos em tubos de ensaio e incubados em banho maria a 40 °C por 15 minutos. O extrato enzimático foi adicionado ao leite e a contagem do tempo reacional foi iniciada. O tempo de coagulação foi registrado quando foi observada a formação de coágulos na parede dos tubos de ensaio. Os experimentos foram realizados em triplicata. Uma unidade de atividade coagulante (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de coagular 1 ml de substrato em 40 minutos a 40

°C. A atividade coagulante foi calculada de acordo com Shata (2005): $U = 2400/T \times S/E$, onde T é o tempo necessário para formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume da enzima.

A baixa atividade proteolítica, elevada atividade coagulante do leite e a classificação do coágulo foram os parâmetros utilizados na seleção do resíduo lignocelulolíticos e nos estudos dos parâmetros que influenciam na síntese de coagulante por *P. albidus*.

Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima coagulante

Para ensaio do pH ótimo, a atividade coagulante foi determinada a 40 °C em diferentes valores de pH utilizando as seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80 °C. Para estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:1) nas seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e Glicina-NaOH (9 e 10) e mantidos a 25 °C por 24 horas. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 80 °C por 1 hora. Leite em pó desnatado (10%, p/v) dissolvido em solução 0,05 M de CaCl₂, pH 5,8 foi utilizado como substrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As atividades relativas foram determinadas nas condições ótimas de pH e de temperatura.

Efeito de inibidores de proteases e íons metálicos na atividade coagulante

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi investigado utilizando 10 mM de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), 10 mM de ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), 10 mM de ácido iodoacético e 0,1 mM de Pepstatin, na mistura reacional. Os íons metálicos utilizados na concentração de 10 mM, na mistura reacional foram CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl. As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura. A atividade enzimática residual foi comparada com o controle que foi incubado sem os inibidores e os íons metálicos e correspondeu a 100 % de atividade. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Elaboração de queijo utilizando coagulante de *P. albidus*

O queijo Minas frescal elaborado com coagulante de *P. albidus* foi produzido de acordo com a metodologia utilizada na Fábrica de Laticínios Uirapuru, localizada no Km 24 da BR 174 – Am.

Análise da composição centesimal do queijo

A umidade do queijo minas frescal foi determinada em estufa de circulação de ar forçado, a 105 °C até peso constante. O quantitativo de proteína foi determinado pelo método Kjeldahl (fator = 6,38). A fração mineral foi avaliada por incineração da amostra em forno mufla (550 °C). Os lipídios foram determinados utilizando o método de Bligh e Dyer e os carboidratos foram calculados por diferença das demais frações centesimais (AOAC, 2005). O valor calórico foi determinado de acordo com o fator de conversão de Atwater (NEPPA, 2006).

Análise microbiológica do queijo Minas frescal

As análises microbiológicas de Coliformes a 45°C, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Salmonella* sp. foram realizadas de acordo Silva et al. (2010), conforme preconizado na RDC N° 12, de 2001 que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos.

Análise estatística

Em todos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando programa Minitab, versão 16.0 (Minitab, 2010).

RESULTADOS

O uso de resíduos agroindustriais como substratos para produção proteases coagulantes por fungos tem demonstrado eficácia. A fermentação em matriz sólida utilizando exocarpos, sementes, bagaços e farelos é considerada uma tecnologia ecoamigável e economicamente vantajosa, pois são obtidos elevados rendimentos de bioprodutos a baixo custo, além de reduzir a poluição causada pelo descarte inadequado de resíduos no ambiente (Inácio et al., 2015; Silva et al., 2016).

As características bioquímicas dos coalhos influenciam nas propriedades de coagulação do leite, rendimento, sabor e textura do queijo. Os coagulantes comerciais se caracterizam por possuírem elevada razão coagulante, ou seja, alta atividade coagulante e baixa atividade proteolítica (Shamtsyan et al., 2014).

Neste estudo, a razão coagulante (atividade coagulante/atividade proteolítica) e a força da coagulação foram os principais parâmetros utilizados para selecionar os resíduos lignocelulósicos indutores da síntese de coagulante por *P. albidus*. Nas condições avaliadas, *P. albidus* produziu e excretou proteases com diferentes perfis de coagulação (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade coagulante, razão coagulante e classificação da coagulação das proteases produzidas por *P. albidus* em diferentes resíduos lignocelulósicos.

Resíduos lignocelulósicos (% p/p)	Atividade coagulante (U/mL)	Razão coagulante	Classificação da coagulação
EB (100)	N.D	N.D	Sem coagulação
EB:FA (90:10)	46,33 ± 0,28 ⁱ	5,67 ± 0,23 ^{c,d}	Fraca coagulação
EB:FA (80:20)	35,16 ± 0,28 ^j	3,64 ± 0,25 ^f	Fraca coagulação
EC (100)	21,51 ± 0,02 ^l	6,81 ± 0,58 ^c	Fraca coagulação
EC:FA (90:10)	68,83 ± 0,28 ^g	5,54 ± 0,28 ^{c,d}	Forte coagulação
EC:FA (80:20)	133,66 ± 0,28 ^b	6,57 ± 0,41 ^c	Forte coagulação
ET (100)	108,16 ± 0,76 ^d	4,88 ± 0,07 ^{d,e,f}	Forte coagulação
ET:FA (90:10)	99,66 ± 0,57 ^e	3,80 ± 0,03 ^{e,f}	Forte coagulação
ET:FA (80:20)	145,33 ± 0,28 ^a	5,19 ± 0,01 ^{d,e}	Forte coagulação
SA (100)	N.D	N.D	Sem coagulação
SA:FA (90:10)	58,33 ± 0,57 ^h	14,58 ± 0,14 ^a	Forte coagulação
SA:FA (80:20)	114,00 ± 0,86 ^c	11,22 ± 0,39 ^b	Forte coagulação
SE (100)	N.D	N.D	Sem coagulação
SE:FA (90:10)	25,66 ± 0,57 ^k	11,87 ± 0,50 ^b	Fraca coagulação
SE:FA (80:20)	75,16 ± 0,27 ^f	5,50 ± 0,22 ^{c,d}	Forte coagulação

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P < 0.05)

Os valores significativos de atividade coagulante foram, em ordem decrescente, 145,33 U/mL, 133,66 U/mL e 114,00 U/mL quando *P. albidus* foi cultivado em exocarpo de tucumã, exocarpo de cupuaçu e semente de açaí suplementados com 20 % de farelo de arroz,

respectivamente. Contudo, não foi observada síntese de coagulante por *P. albidus* cultivado em exocarpo de banana, semente de açaí e serragem sem suplementação. *P. albidus* quando cultivado em semente de açaí suplementada com 10 % de farelo de arroz produziu peptidases que expressaram significativa razão coagulante (14,58), formação de soro abundante e forte coagulação (Figura 1). Baseado nestas características este coagulante foi selecionado para os estudos subsequentes de caracterização enzimática.



Figura 1. Coagulação do leite bovino usando enzimas de *P. albidus* cultivado em semente de açaí suplementada com farelo de arroz (90:10, p/p), em triplicata.

Fonte: próprio autor.

Resíduos agroindustriais têm sido utilizados como substratos para produção de enzimas coagulantes por fungos. *T. indicae-seudaticae* N31 produziu coagulante com elevada atividade coagulante baixa atividade proteolítica quando cultivado em farelo de trigo (Merheb-Dini et al., 2010). O extrato proteolítico de *A. oryzae* NCIM 1032 cultivado em uma mistura de farelo de trigo e farelo de arroz (7:3, p/p) apresentou elevada razão coagulante, após 120 horas de fermentação, conforme descrito por Patil et al. (2012). Exocarpo de cupuaçu, semente de açaí e farelo de arroz foram utilizados como substratos naturais para produção de coagulantes por diferentes espécies de *Aspergillus* conforme relatado por Alecrim et al. (2015).

Há poucos estudos reportando as condições ambientais ideais para produção de enzimas coagulantes por cogumelos comestíveis. Contudo é conhecido que temperatura, umidade, pH, tamanho do inóculo, fontes de nitrogênio e carbono são fatores que afetam a

produção de enzimas por micro-organismos. Nesse sentido é importante conhecer as condições ambientais em que os micro-organismos produzem quantitativo máximo de enzimas de interesse comercial para que se possa viabilizar a produção desses biocatalisadores em escala industrial (Gais et al., 2009; Narwal et al., 2017).

O tamanho do inóculo é um fator biológico que está associado com a produção de biomassa e enzimas proteolíticas em processos fermentativos. Inóculos concentrados favorecem a formação de biomassa microbiana em excesso (Ravikumar et al., 2012; Vijayaraghavan et al., 2014). Neste contexto os nutrientes presentes no meio de cultivo são consumidos rapidamente afetando a produção de metabólitos. Por outro lado a utilização de reduzidos volumes de inóculos pode dificultar o crescimento microbiano e a síntese de proteases (Sher et al., 2012; Bensmail et al., 2015). A influência do tamanho do inóculo na síntese de coagulante por *P. albidus* cultivado em semente de açaí com farelo de arroz (90:10, p/p) está demonstrada na figura 2. Nas condições avaliadas *P. albidus* produziu coagulante em todos os volumes de inóculo testados. Contudo os níveis significativos de atividade coagulante (42,60 U/mL), com forte coagulação do leite foram verificados com 2,5 % de inóculo. Sathya et al. (2009) relataram que o inóculo de 30% favoreceu a produção de coagulante por *M. circinelloides* cultivado em casca de grão indiano. Os tamanhos de inóculo de 5% e 10% foram considerados como ótimos para produção de proteases por *R. arrhizus*-M26 e *R. oligosporus*-M30, respectivamente (Irfan et al., 2011). Máxima produção de protease alcalina por uma espécie mutante de *A. flavus* AS2 foi verificada com a utilização de 10% de volume de inóculo (Rani et al., 2012).

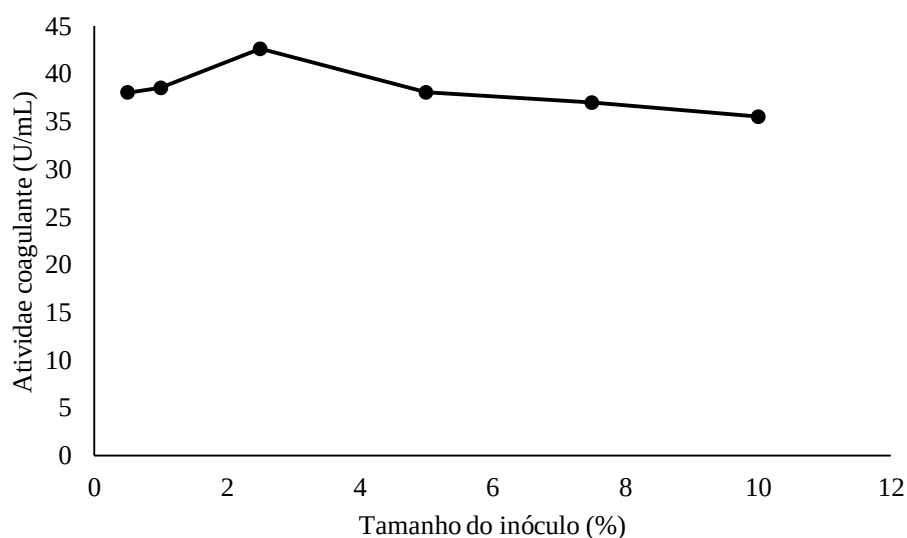


Figura 2. Efeito do tamanho do inóculo na atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

O tempo de fermentação influencia na produção de enzimas proteolíticas. De acordo com o micro-organismo e as condições de cultivo utilizadas no bioprocesso o tempo de fermentação para produção ótima de peptidases varia de 1 dia até semanas (Sharma et al., 2017). Neste estudo *P. albidus* excretou coagulante em todos tempos de fermentação analisados (Figura 3). O valor significativo de coagulante foi verificado no décimo dia de fermentação (35,10 U/mL). No décimo sexto dia de fermentação foi observado o menor valor de atividade coagulante (19,00 U/mL). Nos estudos de otimização dos parâmetros de produtividade de coagulantes do leite por *P. oxalicum* foi verificado que este fungo sintetiza maior quantitativo de coagulante após 8 dias de cultivo em matriz sólida (Hashem 1999). *P. sajor-caju* produziu quantidade significativa de proteases no quarto dia de cultivo em farinha de milho (Ravikumar et al., 2012). *A. oryzae* NCIM 1032 sintetizou quantitativo significativo de coagulante no quinto dia de cultivo em matriz sólida constituída por uma mistura de farelo de trigo e farelo de arroz (Patil et al., 2012). O decréscimo de atividade coagulante por fungos após o tempo ótimo de fermentação estaria associado com a redução dos nutrientes do meio de cultivo e a produção de compostos tóxicos que influenciariam diretamente na síntese de enzimas e no crescimento do fungo (Bensmail et al., 2015).

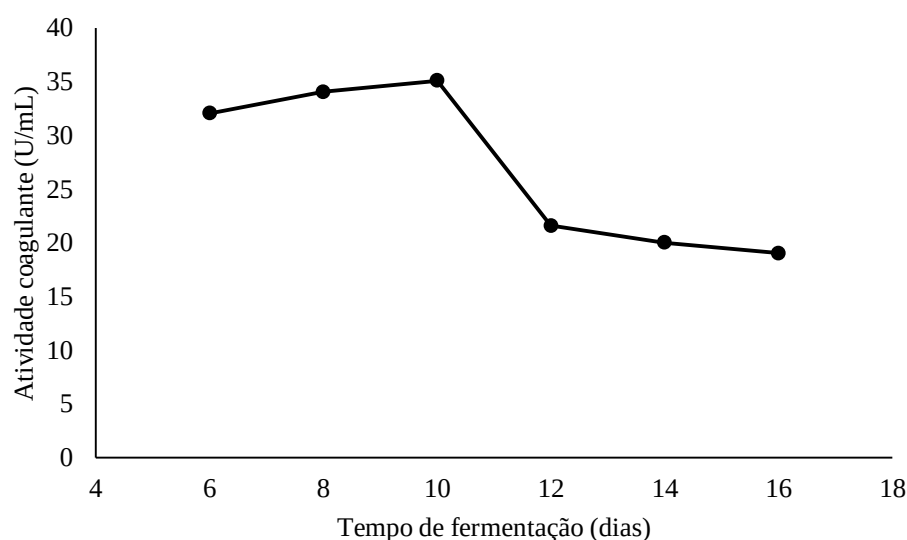


Figura 3. Efeito do tempo de fermentação na atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

O pH do meio de cultivo influencia na produção de coagulantes por diferentes espécies de fungos. Nas condições avaliadas, *P. albidus* excretou protease com significativa atividade coagulante (46,00 U/mL) em meio de cultivo com pH 6, conforme demonstrado na figura 4. Este valor de pH foi determinado como ótimo para síntese coagulante por *R. stolonifer* cultivado

em matriz sólida (Gais et al., 2009). Bano et al. (2016) verificaram significativa produção de protease por *P. eryngii* em pH 6,5. *A. niger* MTCC 281 produziu significativo quantitativo de protease quando cultivado em resíduo de *Punica granatum*, pH 5 (Santhi, 2014). As modificações de pH durante o bioprocesso interferem no crescimento do micro-organismo e na produção de enzimas, devido a alterações em processos catalíticos e de transporte de nutrientes pela membrana celular (Bensmail et al., 2015).

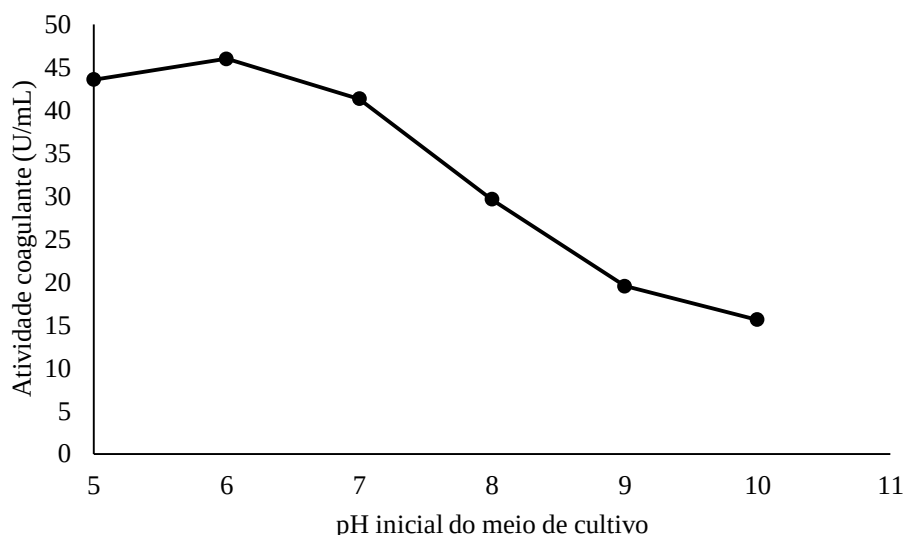


Figura 4. Efeito do pH inicial do meio de cultivo na atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

A idade do inóculo é outro fator biológico que afeta a síntese de protease por fungos filamentosos. Neste estudo, *P. albidus* excretou quantitativo significativo de coagulante, quando utilizado inóculo com 10 dias de idade (Figura 5). *R. arrhizus* M-26 cultivado em farinha de soja sintetizou maior quantitativo de proteases quando foi utilizado inóculo com 8 dias de idade (Irfan et al., 2011). Rani et al. (2012) e Prasad, Raju (2013) relataram que o inóculo de 4 dias de idade favoreceu a máxima produção de protease por *A. flavus* AS2 e *R. oligosporus* NCIM 1215, respectivamente.

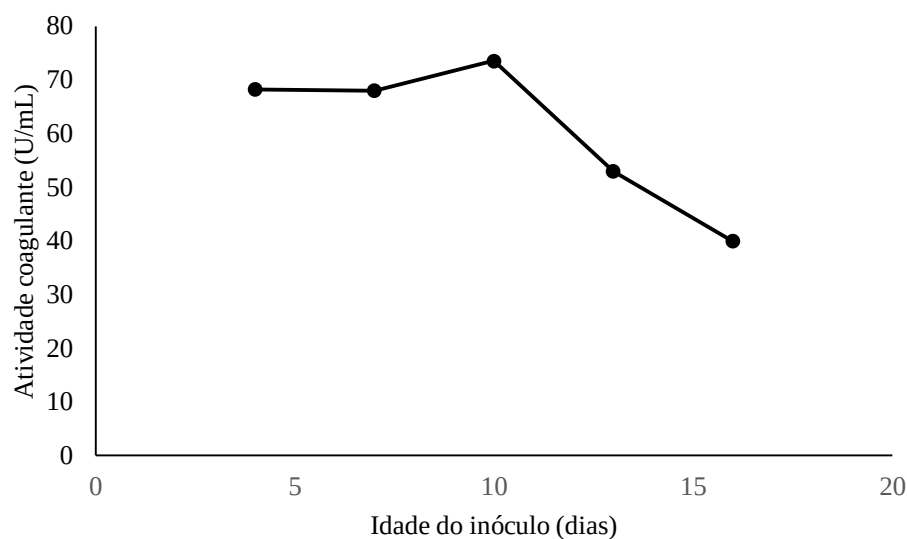


Figura 5. Efeito da idade do inóculo na atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

O coagulante obtido nas condições ótimas de cultivo foi caracterizado parcialmente quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e a temperatura, efeito de íons e inibidores. Nas condições avaliadas, a protease coagulante de *P. albidus* demonstrou atividade ótima em pH 5,0 (Figura 6). Houve decréscimo de atividade coagulante com a elevação dos valores do potencial hidrogeniônico. Em pH 9 o coagulante de *P. albidus* apresentou 39 % de atividade e em pH 10 a enzima foi completamente inibida. Lebedeva; Proskuryakov (2009), Yegin et al. (2012) e Majumder et al. (2015) verificaram que proteases coagulantes de *P. ostreatus*, *M. mucedo* DSM 809 e *T. clypeatus* MTCC 5091, respectivamente, também apresentaram atividade ótima em pH 5. Modificações no pH podem alterar as cargas elétricas de aminoácidos presentes no sítio ativo enzimático ou modificar as estruturas secundária ou terciária das enzimas, condições que afetam a ligação da enzima com o substrato, resultando em perda de atividade catalítica (Oueslati A, Mounirhaouala, 2014, Ahmed et al., 2016).

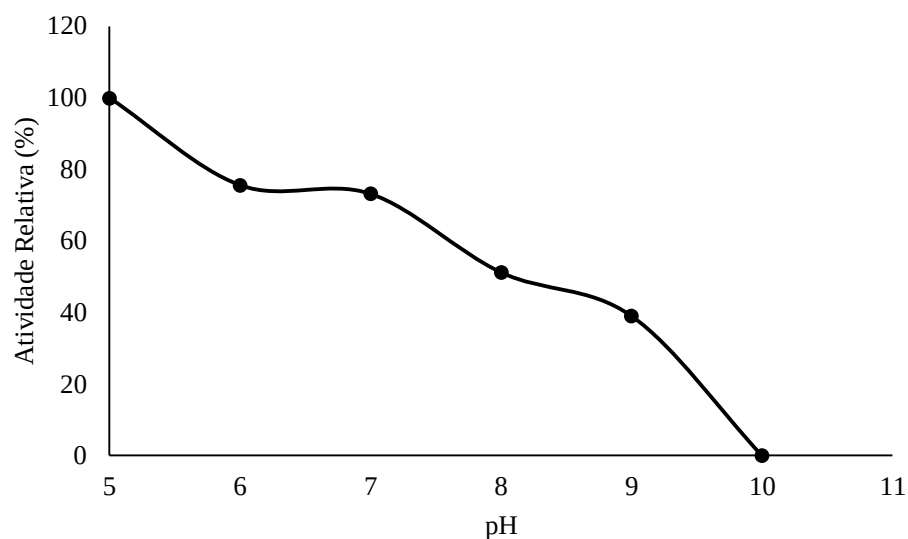


Figura 6. Efeito do pH na atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

A atividade coagulante de *P. albidus* aumentou com o incremento da temperatura. O valor significativo de atividade coagulante (222 U/ mL) foi verificado em 55 °C. Na temperatura de 50 °C o coagulante de *P. albidus* apresentou 62,76 % de atividade relativa e em 60 °C a atividade foi completamente inibida (Figura 7). Merheb-Dini et al. (2010) verificaram elevação da atividade coagulante das proteases de *T. indicae-seudaticae* N31 com incremento da temperatura até 70 °C. O coagulante de *C. lagopides* exibiu atividade ótima na faixa de 34-37 °C (Shamtsyan et al., 2014). A atividade coagulante máxima de *P. soloniensis* foi verificada entre 35-40 °C, conforme descrito por El-Baky et al. (2011). As proteases de *T. clypeatus* MTCC 5091 exibiram atividade máxima em 45 °C de acordo com a pesquisa realizada por Majunder et al. (2015). Segundo Ahmed et al. (2016) a taxa de agregação proteica e a dureza do gel são afetadas com a elevação da temperatura.

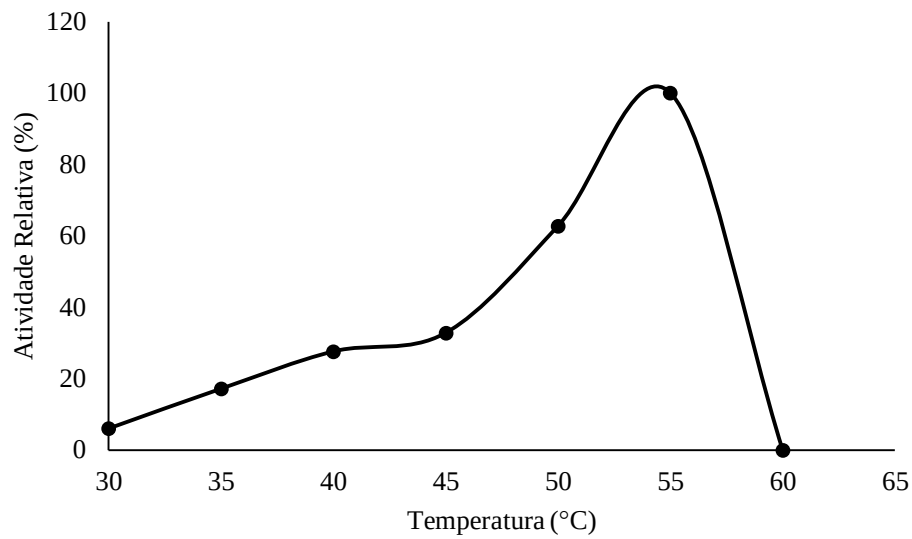


Figura 7. Efeito da temperatura na atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

O estudo da estabilidade enzimática é importante porque auxilia no conhecimento da estrutura da enzima, indica sua aplicação industrial e influencia na escolha do processo biotecnológico para escalonamento de produção a nível industrial (Jurado et al., 2004). As proteases coagulantes de *P. albidus* apresentaram redução de atividade com a elevação do pH. A atividade coagulante significativa de 100 % foi verificada em pH 5. Em pH 6, 7 e 8 a enzima reteve atividade coagulante superior a 50 %. Em pH 10 não foi verificada atividade coagulante (Figura 8). Kumar et al. (2005) relataram que a peptidase coagulante de *R. oryzae* manteve 96 % de estabilidade na faixa de pH 5,5 a 7,5. As proteases de *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* retiveram atividade na faixa de pH 2-8 (Sun et al., 2014). *A. flavo furcatis* produziu proteases com estabilidade de 76-88 % na faixa de pH entre pH 4.0 e 6.0, conforme verificado por Alecrim et al. (2015).

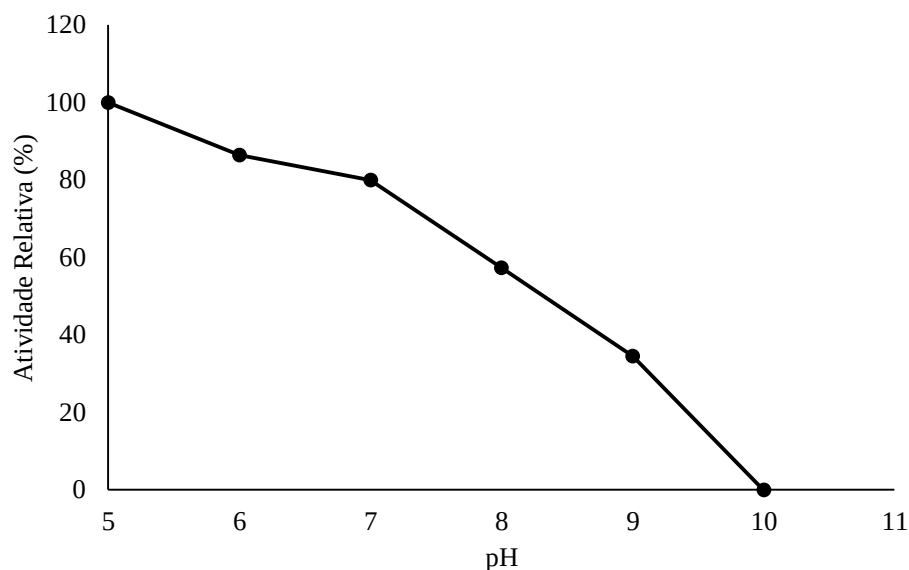


Figura 8. Efeito do pH na estabilidade da atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

As proteases coagulantes de *P. albidus* foram estáveis na faixa de 30 °C a 45 °C, exibindo atividade superior a 85 %. Na faixa de temperatura de 30-40 °C são produzidos diversos tipos de queijo: cheddar (31,11 °C), coalho (35 °C), Camembert (32 °C – 35 °C), prato (35 °C), gouda (31,6 °C), queijo azul (28,88-32,22 °C) e Minas frescal (34 °C - 38 °C). Nesta faixa de temperatura, o coagulante de *P. albidus* exibiu estabilidade media superior a 90 %, demonstrando o potencial do extrato deste cogumelo como fonte de proteases coagulantes para produção de diferentes tipos de queijo. Após incubação a 50 °C e 55 °C, por 1 hora, a enzima perdeu 67 % e 81 % de atividade, respectivamente. Na temperatura de 60 °C a enzima foi completamente inibida (Figura 9). As proteases coagulantes de *T. clypeatus* MTCC 5091 foram estáveis na faixa de 35 a 50 °C (Majunder et al., 2015). Sun et al. (2014) e El-Baky et al.(2011) relataram que as proteases de *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* e *P. soloniensis* se mantiveram estáveis até 40 °C por 30 minutos e foram inativadas a 55 °C e 60 °C, respectivamente.

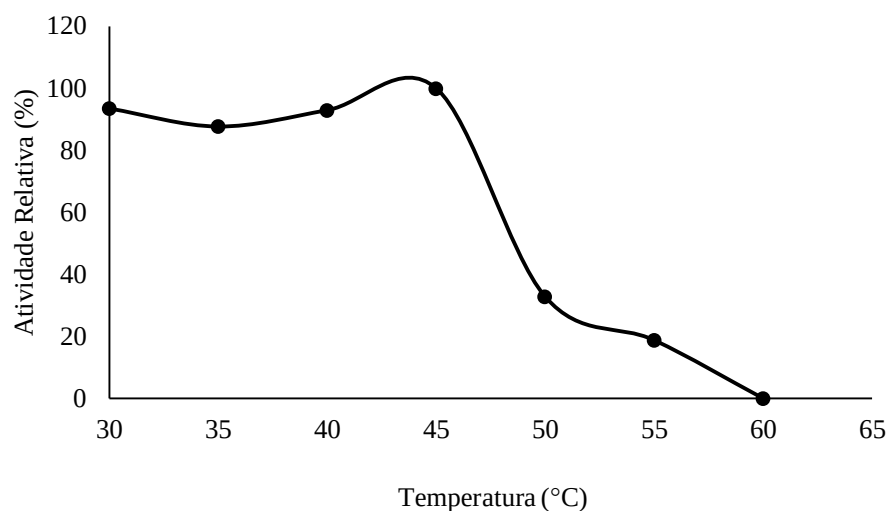


Figura 9. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

O efeito de íons e inibidores na atividade coagulante nas proteases de *P. albidus* obtidas por fermentação em matriz sólida estão demonstrados na tabela 3. Os íons Zn^{2+} e K^+ estimularam a atividade coagulante de *P. albidus* em 42 % e 5 %, respectivamente. Fe^{2+} e Mg^{2+} reduziram a atividade coagulante em 32 % e 11 %, respectivamente. Ca^{2+} e Mn^{2+} não afetaram a atividade enzimática. Os coagulantes de *Amylomyces rouxii* também foram estimulados na presença de Zn^{2+} e K^+ , conforme relatado por Yu; Chou (2005). Os íons Zn^{2+} estimularam em 12% a atividade coagulante das proteases de *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* (Sun et al., 2014). Segundo Merheb-Dini (2010) os íons podem se ligar aos resíduos de aminoácidos e alterar a conformação proteica resultando em alterações na atividade catalítica de proteases.

Tabela 3. Efeito de íons e inibidores na atividade coagulante do extrato bruto de *P. albidus*.

Reagentes	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)
Controle	—	100 ± 0,01
Ca^{2+}	10	100 ± 0,03
Cu^{2+}	10	0,00 ± 0,00
Fe^{2+}	10	68 ± 0,01
K^+	10	105 ± 0,02
Mg^{2+}	10	89 ± 0,01
Mn^{2+}	10	100 ± 0,02
Na^+	10	95 ± 0,00
Zn^{2+}	10	142 ± 0,00
EDTA	10	87 ± 0,6
Ácido iodoaético	10	0,00 ± 0,00
PMSF	10	80 ± 0,9
Pepstatin A	1	62 ± 0,3

Baseado nos aminoácidos presentes no sítio ativo ou na necessidade de íons metálicos para atividade catalítica, as proteases podem ser classificadas em seis grupos principais: serinoprotease (serina), cisteínoprotease (cisteína), aspartatoprotease (ácido aspártico), treoninoprotease (treonina), glutaminoproteases (ácido glutâmico) e metaloprotease (íons metálicos) (Li et al., 2013; Hsiao et al. 2014). Segundo Kumar et al. (2005) os inibidores de protease são utilizados para verificar qual grupo está presente no sítio ativo da enzima. Dentre as substâncias inibidoras, ácido iodoacético reprimiu completamente as proteases coagulantes, sugerindo a presença de cisteíno proteases no sítio ativo da protease presente no extrato bruto de *P. albidus*. Na presença de EDTA, pepstatin A e PMSF foi observada inibição de 13 %, 38 % e 20 %, respectivamente. Estudos têm demonstrado que proteases coagulantes sintetizadas por cogumelos pertencem a diferentes grupos catalíticos. As peptidases coagulantes de *P. soloniensis* foram inibidas por pepstatin A e foram classificadas como peptidases aspárticas (El-Baky et al., 2011). Majunder et al. (2015) verificaram que as proteases coagulantes de *T. clypeatus* retiveram 11,9 % de atividade na presença de EDTA, sendo então classificadas no grupo das metaloproteases. Lebedeva e Proskuryakov (2009) relataram que as proteases coagulantes de *P. ostreatus* pertencem as classes das metalo proteases e serino proteases.

As composições centesimais dos queijos Minas frescal elaborados com coagulante comercial e com coagulante de *P. albidus* estão demonstradas na tabela 4. Nas condições analisadas, foi verificada diferença nos conteúdos de cinzas, carboidratos e no valor energético entre o queijo elaborado com o coagulante de *P. albidus* em comparação com o queijo obtido com o coagulante comercial. O queijo elaborado com coagulante de *P. albidus* apresentou 55 % de umidade, sendo classificado como de muita alta umidade, estando de acordo com a legislação vigente que preconiza valor igual ou superior a 55% de umidade. O quantitativo das demais frações centesimais foram, em ordem decrescente: lipídios (20%), proteínas (17,20 %), cinzas (4%) e carboidratos (3,80 %), sendo determinado o valor energético em 264 kcal/100g. Ricardo et al. (2011) verificaram valores de umidade de 68,96% a 34,66% em queijos Minas frescal comercializados em Londrina-PR. Magenis et al. (2014) reportaram valores de umidade (55,05%), lipídios (22,27%) e proteínas (16,79%) para amostras comerciais de queijo Minas frescal. Piazzon-Gomes et al. (2010) verificaram que os queijos Minas frescal elaborados com coagulante comercial apresentaram a seguinte composição centesimal: umidade (59,57%), proteínas (14,98%), lipídios (18,10%), cinzas (2,79%) e carboidratos (4,57%). Oliveira et al. (2014) relataram que a média do valor energético de queijo Minas frescal é de 218,4

(Kcal/100g), resultado inferior ao reportado para o mesmo produto elaborado com coagulante de *P. albidus*. De acordo com Brigido et al. (2004) as variações observadas na composição centesimal de queijos Minas frescal ocorrem devido a diferenças no processamento industrial relacionadas com a não padronização dos fermentos, da utilização de diferentes temperaturas de coagulação do leite e a utilização ou não de prensagem da massa coagulada.

Tabela 4. Composição centesimal do queijo Minas frescal produzido com coagulante de *P. albidus*.

Parâmetros	Queijo Minas frescal elaborado com coagulante comercial (g/100g)	Queijo Minas frescal elaborado com coagulante de <i>P. albidus</i> (g/100g)
Umidade	55,00 % ± 0,5 ^a	55,00 ± 0,2 ^a
Lipídios	20,00 ± 0,8 ^a	20,00 ± 1,3 ^a
Proteínas	18,05 ± 0,9 ^a	17,20 ± 0,20 ^a
Cinzas	4,20 ± 0,02 ^a	4,00 ± 0,05 ^b
Carboidratos	2,75 ± 0,08 ^b	3,80 ± 0,00 ^a
Valor calórico (Kcal/100g)	263,20 ± 0,05 ^b	264 ± 0,08 ^a

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P < 0.05)

De acordo com a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, o queijo Minas frescal deve apresentar as seguintes padrões de contagem microbiológica: coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva (máximo de $5,0 \times 10^2$ UFC/g), *Salmonella* sp (ausência/25g).

As análises microbiológicas do queijo Minas frescal produzido com coagulante de *P. albidus* demonstraram ausência de *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* coagulase positivo, mas foi verificada a presença de coliformes termotolerantes ($1,8 \times 10$ UFC/g), porém este valor está em conformidade com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira. Rossi et al. (2010) não observaram contaminação por *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijos Minas Frescal comercializados em supermercados da região Extremo-Oeste de Santa Catarina. Martins e Reis (2012) verificaram que 52,5% e 45,0% de amostras de queijos Minas frescal estavam em desacordo com a legislação para a contagem coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, respectivamente. Brant et al. (2007) relataram que 60% das amostras de queijo Minas frescal analisadas estavam em desacordo com a legislação.

CONCLUSÃO

Pleurotus albidus sintetiza protease com elevada razão coagulante quando cultivado em resíduo lignocelulósico (semente de açaí suplementada com farelo de arroz), utilizando inóculo com 10 dias de cultivo, pH 6, inóculo 2,5%, durante 10 dias de bioprocesso. O coagulante expressa atividade ótima em pH 5, a 55 °C, estabilidade a 45 °C, com predomínio de cisteíno proteases. Queijo Minas frescal foi elaborado com sucesso utilizando coagulante de *Pleurotus albidus*, demonstrando o potencial biotecnológico deste cogumelo comestível para aplicação na indústria de laticínios.

REFERÊNCIAS

- Ahmed SA, Wehaidy HR, Ibrahim OA, Hasan AS, El-Hofi MA (2016). Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.011>.
- Alecrim MM, Palheta RA, Teixeira MFS, Oliveira IMA (2015). Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. Int. J. Food Sci. and Technol. (50) 151-157.
- Alves LS, Merheb-Dini C, Gomes E, Da Silva R, Gigante ML (2013). Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. J. Dairy Sci. (96) 7490-7499.
- AOAC, 2005. Association of Official Analytical Chemists: Official method, 18, International, Washington, USA.
- Arima K, Yu J, Iwasaki S (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. Methods Enzymol. (19) 446-459.
- Ayana IAAA, Ibrahim AE, Saber WIA (2015). Statistical Optimization of Milk Clotting Enzyme Biosynthesis by *Mucor mucedo* KP736529 and its Further Application in Cheese Production. International Journal of Dairy Science (10) 61-76.
- Bano S, Dahot UM, Naqvi SHA (2016). Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. Pak. J. Biotechnol. (13) 193-198.
- Benlurvankar V, Jebapriya GR, Gnanadoss JJ (2015). Protease production by *Penicillium* sp. LCJ228 under solid state fermentation using groundnut oilcake as substrate. International of Journal of Life Science & Pharma Research. (5) 12-19.
- Bensmail S, Mechakra A, Fazouane-Naimi F (2015). Optimization of milk-clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus niger* FFB1 in solid-state fermentation. J Microbiol Biotech Food Sci, (4) 467-472.

- Brant LMF, Fonseca LM, Silva MCC (2007). Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* (59) 1570-1574.
- Brigido BM, Freitas VPS, Mazon EMA, Pisani B, Prandi MAG, Passos MHCR (2004). Queijo Minas Frescal: avaliação da Qualidade e Conformidade com a Legislação. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* (63) 177-85.
- Daudi S, Mukhtar H, Rehman Au, Haq IU (2015). Production of rennin-like acid protease by *Mucor pusillus* through submerged fermentation. *Pak. J. Bot.* (47) 1121-1127.
- El-Baky HA, Linke D, Nimtz M, Berger RG (2011). PsoP1, a Milk-Clotting Aspartic Peptidase from the Basidiomycete Fungus *Piptoporus soloniensis*. *J. Agric. Food Chem.* (59) 10311-10316.
- Fonseca TRB, Silva TA, Alecrim MM, Cruz Filho RF, Teixeira MFS (2015). Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. *African Journal of Microbiology Research.* (9) 1814-1822.
- Gais S, Fazouane F, Mechakra A (2009). Production of Milk Clotting Protease by *Rhizopus Stolonifer* through Optimization of Culture Conditions. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering.* (3) 340-344.
- Grozdanovic MM, Burazer L, Gavrovic-Jankulovic M (2013). Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agente. *International Dairy Journal.* (32) 46–52.
- Guleria S, Walia A, Chauhan A, Shirkot C K (2016). Optimization of milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. *Bioresour. Bioprocess.* (3) 1-9.
- Hang F, Wang Q, Hong Q, Liu P, Wu Z, Liu Z, Zhang H, Chen W (2016). Purification and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase from *Paenibacillus* spp. BD3526. *Int J Biol Macromol.* (85) 547-54.
- Hashem AM (1999). Optimization of milk-clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresour. Technol.* (70) 203-207.
- Hsiao N-W, Chen Y, Kuan Y-C, Lee Y-C, Lee S-K, Chan H-H, Kao CH (2014). Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. *Electronic Journal of Biotechnology.* (17) 89-94.
- Inácio FD, Ferreira RO, Araujo CVA, Peralta RM, Souza CGM (2015). Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. *Advances in Microbiology.* (5) 1-8.

- Irfan M, Rauf A, Syed Q, Nadeem M, Baig S (2011). Exploitation of Different Agro-residues for Acid protease Production by *Rhizopus* sp. in Koji Fermentation. International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences. (5) 43-52.
- Jurado E, Camacho F, Luzón G, Vicaria JM (2004). Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. Enzyme and Microbial Technology. (34) 33-40.
- Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: Purification and characterization. Process Biochem. (40) 1701-1705.
- Kumari M, Sharma A, Jagannadham MV (2012). Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. Food Chem. (131) 1295-1303.
- Lebedeva GV, Proskuriakov MT (2009). Purification and characterization of milk-clotting enzymes from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm.). Prikl Biokhim Mikrobiol. (45) 690-2.
- Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973). The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. (76) 103-122.
- Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL (2013). Commercial proteases: Present and future. FEBS Letters. (587) 1155-1163.
- Machado ARG, Teixeira MFS, Kirsch LS, Campelo MCL, Oliveira IMA (2016). Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. Saudi J Biol Sci. (23) 621-7.
- Magenis RB, Prudêncio ES, Fritzen-Freire CB, Stephan MP, Egito AS, Daguer H (2014). Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. Food Control. (45) 22-28.
- Majumder R, Banik SP, Khowala S (2015). Purification and characterisation of κ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. Food Chem. (173) 441-448.
- Martins ES, Reis NEV. Determinação de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas frescal (2012). Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. (6) 842- 851.
- Mazorra-Manzano MA, Perea-Gutiérrez TC, Lugo-Sánchez ME, Ramirez-Suarez JC, Torres-Llaneza MJ, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. Food Chem. (141) 1902-1907.
- Merheb-Dini C, Gomes E, Boscolo M, Silva R (2010). Production and characterization of a milk clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor*

indicae-seudaticae N31 (Milk clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). Food Chem. (120) 87-93.

Minitab (2010). Minitab statistical software. LEAD Technologies, Inc. Version 16.0, 2010.

Nakamura K, Kobayash N, Tanimoto M (2014). Screening of Edible Mushrooms Producing Milk-clotting Enzyme. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. (61) 444-447.

Narwal RK, Bhushan B, Pal A, Malhotra SP (2017). Optimization of upstream process parameters for enhanced production of thermostable milk clotting enzyme from *Bacillus subtilis* MTCC 10422. J Food Process Eng. (40) 1-11.

Nepa, 2006. Table of food composition. Center for Studies and Research in Food, 105, Unicamp, São Paulo, Brasil.

Okamura-Matsui T, Takemura K, Sera M, Takeno T, Noda H, Fukuda S, Ohsugi M (2001). Characteristics of a cheese-like food produced by fermentation of the mushroom *Schizophyllum commune*. J Biosci Bioeng. (92) 30-2.

Oliveira LE, Silva CO, Pascoal GB (2014). Comparação entre a composição nutricional dos rótulos e as análises laboratoriais de queijos minas frescal (tradicional e light). Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes. (4)280-288.

Oueslati A, Mounirhaouala (2014). Operating Conditions Effects Onenzyme Activity: Case Enzyme Protease. Int J Eng Res Appl. (4) 33-37.

Patil PM, Kulkarni AA, Kininge PT (2012). Production of Milk Clotting Enzyme from *Aspergillus oryzae* under Solid-State Fermentation using Mixture of Wheat Bran and Rice Bran. International Journal of Scientific and Research Publications. (2) 1-12.

Piazzon-Gomes J. Prudêncio SH, Da Silva RSSF (2010). Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. Ciênc. Tecnol. Aliment. (30) 77-85.

Prasad DSR, Raju KJ (2013). Studies on the production of Neutral Protease by *Rhizopus oligosporus* NCIM 1215 using *Lablab purpureus* seed powder under solid state fermentation. J. Chem. Bio. Phy. Sci. Sec. B. (1.3) 2772-2783.

Rani MR, Prasad NN, Sambasivarao KRS (2012). Optimization of cultural conditions for the production of alkaline protease from a mutant *Aspergillus flavus* AS2. Asian Journal of Experimental Biological Sciences. (3) 565-576.

Ravikumar G, Gomathi D, Kalaiselvi M, Uma C (2012). A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 411-417.

- Ricardo NR, Katsuda MS, Maia LF, Abrantes LF, Oshiro LM (2011). Análise físico-química de queijos Minas frescal artesanais e industrializados comercializados em Londrina-PR. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*. (2) 89-95.
- Rossi EM, Zilli, D, Scapin D, Roza-Gomes MF, Gelinski JMLN (2010). Avaliação da qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados em supermercados da região Extremo-Oeste de Santa Catarina, Brasil. *Evidência*. (10) 105-114.
- Santhi R (2014). Extracellular protease production by solid state fermentation using *Punica granatum* peel waste. *Indo American Journal of Pharm Research*. (4) 2706-2712.
- Sathya R, Pradeep BV, Angayarkanni J, Palaniswamy M (2009). Production of Milk Clotting Protease by a Local Isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using Agro-industrial Wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. (14) 788-794.
- Shamtsyan M, Dmitriyeva T, Kolesnikov B, Denisova N (2014). Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. *LWT - Food Sci. Technol*. (58) 343-347.
- Shamtsyan, M (2016). Potential to develop functional food products from mushroom bioactive compounds. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. (15) 51-59.
- Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
- Shata HM (2005). Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. *Pol. J. Microbiol*. (54) 241-247.
- Sher MG, Nadeem M, Syed Q, Irfan M, Baig S (2012). Protease Production from UV Mutated *Bacillus subtilis*. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res*. (47) 69-76.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010.
- Silva OS, Oliveira RL, Souza-Motta CM, Porto ALF, Porto TS (2016). Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation. *Advances in Enzyme Research* (4) 125-143.
- Sindhu R, Pandey A, Binod P (2015). Solid-state Fermentation for the Production of Poly(hydroxyalkanoates) *Chem. Biochem. Eng. Q*. (29) 173-181.
- Soares EF, Silva AC, Queiroz AESF, Gomes JEG, Herculano PN, Moreira K A (2015). Potencial do latex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite. *Ciência Rural*. (45) 149-154.

Sun Q, Wang XP, Yan QJ, Chen W, Jiang ZQ (2014). Purification and Characterization of a chymosin from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. *Appl Biochem Biotechnol.* (174) 174-185.

Yegin S, Goksungur Y, Fernandez-Lahore M (2012). Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. *Food Chem.* (133) 1312–1319.

Yu PJ, Chou CC (2005). Factors Affecting the Growth and Production of Milk-Clotting Enzyme by *Amylomyces rouxii* in Rice Liquid Medium. *Food Technol. Biotechnol.* (43) 283-288.

8. CONCLUSÃO

Das espécies de macrofungos avaliados, *Pleurotus albidus*, uma espécie de cogumelo comestível não tóxica, nativa do ecossistema amazônico, sintetiza coagulante do leite bovino com elevada razão coagulante, tanto em meio de cultivo líquido como em matriz sólida. Em meio líquido, o coagulante de *Pleurotus albidus* expressa atividade ótima em pH 6 a 60 °C e tem maior estabilidade em pH 4,0 a 40 °C, com predominínio de cisteíno-protease. Em matriz sólida, constituída por semente de açaí suplementada com farelo de arroz (90:10, p/p), pH 6,0, utilizando como inóculo com 10 dias de cultivo, discos miceliais equivalente a 2,5%, durante 10 dias, o coagulante apresenta atividade ótima em pH 5 a 55 °C, estabilidade a 45 °C, com predomínio de cisteíno proteases. O queijo Minas frescal elaborado com o coagulante de *Pleurotus albidus* apresenta características nutricionais semelhantes aos queijos do mesmo tipo disponíveis comercialmente, com qualidade microbiológica atendendo à legislação nutricional. *Pleurotus albidus* possui potencial biotecnológico para aplicação na indústria de laticínios.