

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS PARA
PRODUÇÃO DE PROTEASES COAGULANTES DO LEITE POR
Trichoderma spp. ISOLADO DO CERRADO PIAUIENSE**

**USE OF AGROINDUSTRIAL WASTE AS SUBSTRATES FOR THE PRODUCTION
OF MILK COAGULANT PROTEASES BY *Trichoderma* spp. ISOLATED FROM
PIAUIENSE CERRADO**

**APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO
SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEASA COAGULANTE DE
LECHE POR *Trichoderma* spp. AISLADO DEL PIAUIENSE CERRADO**

Tiago de Oliveira Sousa¹; Alan Vagner da Silva Ramos²; Thalesram Izidoro Pinotti³; Alice Maria Gonçalves Santos⁴; Thiago Pajeú Nascimento⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0086>

RESUMO

A indústria de laticínios vem crescendo no Brasil, com destaque para os queijos, um produto nutritivo, rico em proteínas, vitaminas e minerais. E devido à escassez do coalho tradicional de origem animal, proteases coagulantes microbianas tem se tornado uma alternativa promissora na produção de leite. Entre os microrganismos produtores de proteases, os fungos são preferidos para aplicações biotecnológicas e industriais, mas ainda são pouco explorados sobretudo oriundos de áreas de ecótono Cerrado-Caatinga. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o isolado de *Trichoderma* spp. isolado de áreas de ecótono Cerrado-Caatinga piauiense quanto à produção de proteases coagulante do leite e avaliar sua atividade proteásica e dosagem de proteína. A produção de proteases foi realizado por Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando diferentes resíduos agroindustriais (casca de arroz, casca de laranja, casca de mandioca, sabugo de milho e farelo de soja) sendo utilizados como meios de cultura para a inoculação do o fungo *Trichoderma* spp. Esse fungo filamentososo se mostrou eficiente para a produção de proteases, apresentando variação de produção de acordo com os substratos utilizados variando de 7,73 a 37,86 U/mL. Já para atividade coagulante do leite apenas os substratos casca de mandioca, farelo de soja e casca de arroz foram efetivos obtendo 133,33; 80,00 e 10,00 unidades, apresentando uma forte coagulação do leite, que é quando ocorre a formação de um coágulo distinto e soro abundante. Dessa forma, o *Trichoderma* spp. apresenta potencial para produção de proteases e proteases coagulantes do leite. Dentre os substratos testados, farelo de soja, casca de laranja e casca de mandioca foram eficiente para produção de proteases, e a casca de mandioca para a produção de proteases coagulante do leite, sendo portanto o uso de resíduos e co-produtos agroindustriais uma alternativa eficiente e biosustentável para a produção de proteases de interesse lácteo.

Palavras-Chave: Proteases, cerrado, Piauí, resíduo agroindustrial.

RESUMEN

La industria láctea viene creciendo en Brasil, especialmente el queso, un producto nutritivo rico en proteínas, vitaminas y minerales. Y debido a la escasez del cuajo animal tradicional, las proteasas coagulantes microbianas se han convertido en una alternativa prometedora en la producción de leche. Entre los microorganismos productores de proteasas, los hongos son los preferidos para aplicaciones

¹ Doutor em Produção Vegetal, Universidade Federal do Piauí, tiagoklista0803@gmail.com

² Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, alanvagner9961@gmail.com

³ Engenharia Agrônômica, Universidade Federal do Piauí, thalesram@hotmail.com

⁴ Doutora em Fitopatologia, Universidade Federal do Piauí, alicemgsantos@ufpi.edu.br

⁵ Doutor em Biologia Aplicada em Saúde, Universidade Federal do Piauí, thiagopajeú@ufpi.edu.br

biotecnológicas e industriais, pero aún son poco explorados, especialmente de las áreas del ecotono Cerrado-Caatinga. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el aislamiento de *Trichoderma* spp. Ecotono de áreas aisladas de Cerrado-Caatinga Piauí para la producción de proteasas coagulantes de leche y evaluación de su actividad proteasa y dosificación proteica. La producción de proteasas se realizó por Fermentación en Estado Sólido (FES) utilizando diferentes residuos agroindustriales (cáscara de arroz, cáscara de naranja, cáscara de yuca, mazorca de maíz y salvado de soya) sirviendo como medios de cultivo para la inoculación del hongo *Trichoderma* spp. Este hongo filamentoso demostró ser eficiente para la producción de proteasas, variando la producción según los sustratos utilizados, entre 7,73 y 37,86 U/mL. En cuanto a la actividad coagulante de la leche, solo los sustratos de cascarilla de yuca, harina de soya y cascarilla de arroz fueron efectivos, obteniendo 133,33; 80,00 y 10,00 unidades, mostrando una fuerte coagulación de la leche, que es cuando se forma un coágulo distinto y abundante suero. Así, *Trichoderma* spp. presenta potencial para la producción de proteasas y proteasas coagulantes de la leche. Entre los sustratos probados, la harina de soya, la cáscara de naranja y la cáscara de yuca resultaron eficientes para la producción de proteasas, y la cáscara de yuca para la producción de proteasas coagulantes de la leche, por lo que el aprovechamiento de residuos y coproductos agroindustriales es una alternativa eficiente y biosostenible. para la producción de proteasas de interés lácteo.

Palabras Clave: Proteasas, cerrado, Piauí, residuos agroindustriales.

ABSTRACT

The dairy industry has been growing in Brazil, especially cheese, a nutritious product rich in proteins, vitamins and minerals. And due to the scarcity of traditional animal rennet, microbial coagulant proteases have become a promising alternative in milk production. Among the protease-producing microorganisms, fungi are preferred for biotechnological and industrial applications, but they are still little explored, especially from Cerrado-Caatinga ecotone areas. Therefore, the objective of this work was to evaluate the isolate of *Trichoderma* spp. Isolated areas of Cerrado-Caatinga Piauí ecotone for the production of milk coagulant proteases and evaluate its protease activity and protein dosage. The production of proteases was carried out by Solid State Fermentation (SSF) using different agro-industrial residues (rice peel, orange peel, cassava peel, corn cob and soybean bran) being used as culture media for the inoculation of o fungus *Trichoderma* spp. This filamentous fungus proved to be efficient for the production of proteases, with production varying according to the substrates used, ranging from 7.73 to 37.86 U/mL. As for milk coagulant activity, only cassava husk, soybean meal and rice husk substrates were effective, obtaining 133.33; 80.00 and 10.00 units, showing strong milk coagulation, which is when a distinct clot and abundant whey form. Thus, *Trichoderma* spp. presents potential for the production of milk coagulating proteases and proteases. Among the substrates tested, soybean meal, orange peel and cassava peel were efficient for the production of proteases, and cassava peel for the production of milk coagulant proteases, therefore the use of residues and agro-industrial co-products is an alternative efficient and biosustainable for the production of proteases of dairy interest.

Keywords: Proteases, cerrado, Piauí, agroindustrial waste.

INTRODUÇÃO

O queijo é um produto que pode ser descrito como o resultado parcial da separação do soro do leite, utilizando-se métodos como a ação física do Coalho, enzimas e/ou bactérias específicas, dentre outros. Pode ser definido como um produto fresco ou maturado, além da possibilidade de agregação de aditivos e especiarias (SARAIVA et al., 2023).

Devido aos seus nutrientes como proteínas, minerais e vitaminas, possui um bom valor nutricional, o que proporciona o potencial da cadeia produtiva de leite e dos produtos derivados (NEIVA, 2022). Nos últimos anos, houve um aumento no mercado global de queijo, e está

previsto uma Taxa de Crescimento Anual Composta (CAGR) de 6,8% entre os anos 2020 e 2025, de acordo com o relatório da Mordor Inteligência (2022).

Entretanto, a forma tradicional de produção de queijo envolve o uso de enzimas coagulantes de origem animal (a renina, que pertence à classe das proteases, extraída do estômago de bezerros), o que pode resultar em problemas éticos, biológicos e de sustentabilidade. Diante disso, a busca por alternativas de coagulantes vem se tornando uma área de interesse científico para os pesquisadores.

Uma das alternativas de enzimas coagulantes é, a protease de origem microbiana, que faz parte de um grupo enzimático que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas (NASCIMENTO et al., 2021). Essas proteases fazem parte do grupo de biocatalisadores aplicados à produção industrial, desempenham um papel na produção de alimentos, cosméticos, medicamentos (SNYMAN et al., 2019). Os microrganismos são considerados como fonte preferencial dessas enzimas, representando aproximadamente 60% das vendas mundiais. Isso significa que mais de 50% das enzimas industriais são produzidas por fungos filamentosos e leveduras, 30% por bactérias, 8% por animais e apenas 4% por plantas (RIGO et al., 2021), sendo uma área biotecnológica em crescente expansão, que movimentará bilhões de dólares anualmente (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003; QUEIROZ et al., 2020).

De acordo com Papadaki et al. (2020), o mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 7,1 bilhões em 2017 e poderá alcançar US\$ 10,5 bilhões em 2024, apresentando uma taxa de crescimento anual de 5,7% entre 2018 a 2024, com destaque para o continente Europeu que representa 1/3 de produção global de enzimas no ano de 2017 e no mesmo ano, estimou-se que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era produzida por microrganismos.

As proteases produzidas por fungos filamentosos podem ser produzidas por meio de processos de Fermentação em Estado Sólido (FES) (Nascimento et al., 2021), com uso de subprodutos agroindústrias, tendo como vantagem a disponibilidade e custo barato para aquisição, além de gerar um reaproveitamento do mesmo (SILVA et al., 2009; HERNÁNDEZ e LÓPEZ, 2010). As enzimas oriundas desse processo podem ter várias aplicações, principalmente na indústria alimentícia (PATYSHAKULIYEVA, 2021), como por exemplo na produção de queijos, no processo de coagulação.

É notável o aumento da busca por parte das indústrias na utilização de fungos filamentosos para produção de proteases. Uma vez que produzem enzimas em grande quantidade e variedade e possuem facilidade em crescer ao natural em substratos sólidos, tendo uma excelente capacidade de fermentação. Dentre os microrganismos de interesse para a produção de proteases, destaca-se o fungo *Trichoderma* spp (WEISS, 2020), presente em áreas de ecótono

Cerrado-Caatinga, local onde a biodiversidade apresenta uma microbiota rica e promissora na produção de moléculas bioativas, com potencial natural para uso nos processos biotecnológicos.

Este gênero de fungo, amplamente utilizado como agente de controle biológico empregados na produção agrícola mundial, devido ao grande potencial de melhoramento do solo e plantas, além da inibição de desenvolvimento de fitopatógenos (MORAIS et al., 2022).

A bioprospecção de *Trichoderma* spp. como fonte de proteases coagulantes, oriundos do cerrado piauiense oferece a possibilidade de explorar os recursos naturais locais e reduzir a dependência de coagulantes de origem animal, contribuindo para o crescimento global da indústria queijeira (MAMO et al., 2020). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o isolado de *Trichoderma* spp. isolados de áreas de ecótono Cerrado-Caatinga piauiense quanto à produção de proteases coagulante do leite e avaliar sua atividade proteásica e dosagem de proteína.

REFERENCIAL TEÓRICO

Coalhos e Coagulantes

A coagulação é a etapa mais decisiva na produção de queijos, ocasionando modificações físico-químicas nas micelas de caseína, resultando na transformação do leite em estado líquido para gel, também conhecida como coalhada. Para que ocorra tal processo, é necessário a adição de coalhos ou coagulantes, que são enzimas fundamentais no processo de produção de queijos, responsáveis pela primeira etapa da coagulação enzimática do leite (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

A definição de coalho se refere as enzimas obtidas do quarto estômago de ruminantes (abomaso), onde age sobre a proteína do leite, como, por exemplo, o coalho bovino. Já os coagulantes representam todas as enzimas coagulantes do leite, obtidas por meio diferente do coalho, podendo ser adquiridas de vegetais e microrganismos (ANTUNES e SAITO 2011).

O coalho de origem bovina é composto de uma mistura de duas proteínas: renina e pepsina. Entretanto, esta relação renina-pepsina pode variar de acordo com a identidade do animal, ou seja, quanto mais jovem o animal maior a proporção de renina, o que irá proporcionar uma maior atividade na coagulação da caseína. Além da idade, o manejo da adequação da alimentação antes do abate também poderá influenciar na proporção (LIMA et al., 2003).

Com o aumento mundial da produção de queijos nos últimos anos (MORDOR INTELIGÊNCIA, 2022) e a escassez de coalho, devido à baixa disponibilidade de animais jovens para abate (SILVA, 2013), tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas voltadas

para a produção de coagulantes do leite através de enzimas a partir de fontes alternativa, proveniente principalmente de plantas, fungos e leveduras.

As enzimas coagulantes utilizadas na produção do queijo, desempenha sua funcionalidade de acordo com o tipo de enzima empregada. Por isso, estudos voltados para avaliar o potencial de diferentes fontes produtoras de enzimas coagulantes, são importantes, uma vez que a produção de queijo o Brasil e no mundo está em crescente aumento, impulsionado pelo aumento da demanda em todo o mundo. Dessa forma, a adição de enzimas coagulantes do grupo das proteases podem ser uma alternativa com potencial na indústria do queijo.

Proteases

As proteases, também chamadas de peptidases ou proteinases, são classificadas de acordo com a Enzyme Commission of International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) dentro do grupo 3 (hidrolases) e subgrupo 4 (hidrolases de ligações peptídicas). Ou seja, são enzimas hidrolíticas, onde a presença de uma ou mais moléculas de água (H₂O) irão desencadear a quebra de outras moléculas, tendo como função a quebra de ligações peptídicas das proteínas (GOMES et al., 2019).

Essas enzimas podem ser caracterizadas de acordo com o seu local de ação (exopeptidases e endopeptidases), com as substâncias presentes em seu sítio ativo (aspártico, cisteína, glutâmico, metalo, asparagina, misto, serina, treonina e desconhecido) (MEROPS, 2019), e de acordo com o seu pH ótimo para melhor expressar sua ativação (proteases ácidas, neutras e alcalinas) (NASCIMENTO et al., 2021). E podem ser encontradas em diversos organismos, como plantas, animais e microrganismos (KERMASHA e ESKIN, 2021).

Nas plantas, estas enzimas comumente são encontradas no látex e nas sementes (ex. papaína em *Carica papaya*) (HAFID et al., 2020). Em animais, as proteases podem ser encontradas dentro dos organismos (ex. renina bovina) ou nas peçonhas de animais peçonhentos (ex. metaloproteases presentes na peçonha de *Echis pyramidum*) (El-YAMANY et al., 2020). Outra fonte de proteases são os microrganismos (vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos), como é o caso da protease ácida produzida com *Aspergillus* sp. (CHIMBEKUJWO, et al. 2021), serina protease com *Bacillus* sp. (YANG et al., 2021), protease aspártica com *Penicillium* sp. (GUO et al., 2021).

Proteases microbianas

Dentre as fontes de produção de proteases (plantas, animais e microrganismos), a produção por via microbiana tem sido a alternativa mais utilizada, por serem obtidas através de processos simples, rápidos e economicamente mais viável (NASCIMENTO et al., 2021), sendo capaz de atender com maior eficiência a demanda do mercado mundial, uma vez que, as demais fontes de produção podem ser afetadas pelas condições climáticas e animais suficientes para o abate (devendo seguir as normas das políticas agropecuárias e governamentais) (SOUZA, 2015).

A produção das proteases microbianas se dá por meio de processos fermentativos (fermentação submersa e a fermentação em estado sólido). Dentre esses processos, a fermentação em estado sólido tem se destacado pela possibilidade de utilizar apenas um substrato (podendo ser de origem de resíduos e coprodutos do setor agroindustrial) e condições adequadas para o desenvolvimento dos microrganismos e a produção de biomoléculas (Nascimento et al., 2021). De acordo com Oliveira e Rodrigues, (2016), esse processo tem a vantagem de necessitar de um teor reduzido de água, principalmente para proteases fúngicas, produzindo metabólitos de forma concentrada.

Além do mais, os microrganismos possuem uma grande diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética. A partir disso, a diversidade microbiana tem sido explorada na finalidade de identificar-se microrganismos potenciais na produção de proteases (CLERICI et al., 2021). Dentre os microrganismos produtores de proteases, os fungos filamentosos são os mais utilizados (RIGO et al., 2021).

Ao realizar uma breve pesquisa em bancos de dados científicos, foi observado que as espécies de fungos mais utilizadas na produção de enzimas pertencem ao gênero *Aspergillus*, como *A. niger*, *A. fumigatus*, e *A. oryzae*, conhecidos por secretar uma grande variedade de enzimas e proteínas extracelulares com aplicabilidade em diversas áreas (Bianco e Perrotta, 2015), entretanto existe uma grande diversidade de espécies ainda pouco explorados para a produção de enzimas de interesse industrial., como é o caso dos *Trichoderma* spp.

Este gênero de fungo já é bem conhecido no setor agrícola pela sua capacidade de atuar como agente de controle biológico (MORAIS et al., 2022) presentes em áreas de ecótono Cerrado-Caatinga, região que compreende a terceira maior área ecotonal do Brasil. Os ecótonos são áreas resultante do contato entre dois ou mais biomas, refletindo mudanças locais e regionais nas condições abióticas e bióticas (Oliveras; Malhi, 2016), apresentando biodiversidade com microbiota rica e promissora na produção de moléculas bioativas, com potencial natural para uso nos processos biotecnológicos.

Por isso, a bioprospecção de fungos presentes nessas áreas, com fins de

biodegradabilidade de resíduos orgânicos tem um enorme potencial para a produção de enzimas, visto que, por meios de técnicas de fermentações, podem ser aproveitados resíduos e coprodutos do setor agroindustrial, apresentando vantagens tanto dos pontos de vista econômicos quanto ambientais. Dessa forma, é de suma importância a utilização de tecnologias que aproveitem o crescente volume de resíduos gerados para obtenção de diversas moléculas com alto valor agregado, sobretudo proteases coagulantes que possam ser utilizadas na indústria de produção de queijo.

Aplicação de resíduos agroindustriais para produção de enzimas

O Brasil, apresenta uma economia fortemente ligada à agricultura, o que acaba gerando uma grande quantidade de resíduos da agroindústria. Esses resíduos, em geral, abrangem os subprodutos gerados durante o processamento industrial de produtos agrícolas ou animais ou obtidos de atividades agrícolas (SANTOS et al., 2018), como é o caso da casca de arroz, casca de laranja, sabugo de milho, casca de mandioca e muitos outros. E por muitas vezes não haver um aproveitamento direto desses resíduos, devido ao baixo ou nenhum valor comercial ser atribuído a eles. Por isso, há uma grande preocupação em relação aos problemas que esses resíduos podem gerar, se descartado de forma errada.

Esses resíduos, normalmente são ricos em açúcares fermentáveis e nutrientes, o que favorece o crescimento de microrganismos, podendo gerar produtos com grande aplicabilidade na indústria (PANDA et al., 2016), uma vez que, através do processo de fermentação, é possível a biotransformação ou síntese de uma substância a partir de um substrato pela ação de um microrganismo, como é o caso das enzimas (ROVEDA et al., 2010).

Isso enfatiza a importância de desenvolver biotecnologias que use os resíduos agroindustriais em substituição aos substratos convencionais e não renováveis usados em bioprocessos, pois, além de manter o rendimento e reduzir os custos de produção, proporciona o reaproveitamento desses resíduos, contribuindo para a redução do acúmulo desses materiais no meio ambiente, que é considerado um problema ambiental atual.

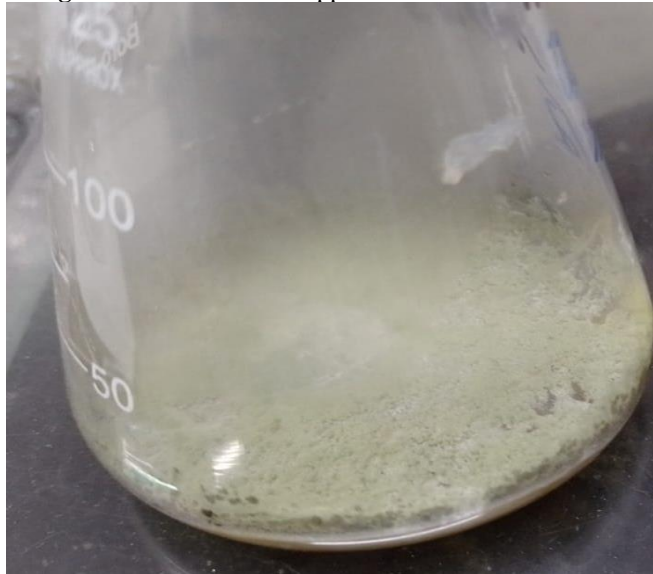
METODOLOGIA

Isolamento dos fungos filamentosos

Foi utilizado o fungo do gênero de *Trichoderma* spp. (Figura 01) isolado de um ecótono Caatinga-Cerrado piauiense coletado de fragmentos de áreas de reserva nas regiões próximas ao município de Bom Jesus – PI, (8°51'7,48" S e 44°11'39,95" W), em áreas preservadas e

agricultáveis. As amostras de folhas e do caule de plantas, assim como amostras de solo e serapilheira, foram acondicionadas em sacos plásticos previamente esterilizados e transportados até o Laboratório de Fitopatologia da UFPI, no campus Professora Cinobelina Elvas-Bom Jesus - PI, para análise. Após a identificação do fungo, o mesmo foi mantido em meio de cultura batata dextrose agar (BDA) (Himedia) a 25°C por 7 dias até ocorrer esporulação.

Figura 01: *Trichoderma* spp crescido em meio BDA



Fonte: Própria (2023).

Seleção dos Substratos para a produção de proteases e proteases coagulante do leite por Fermentação em Estado Sólido (FES)

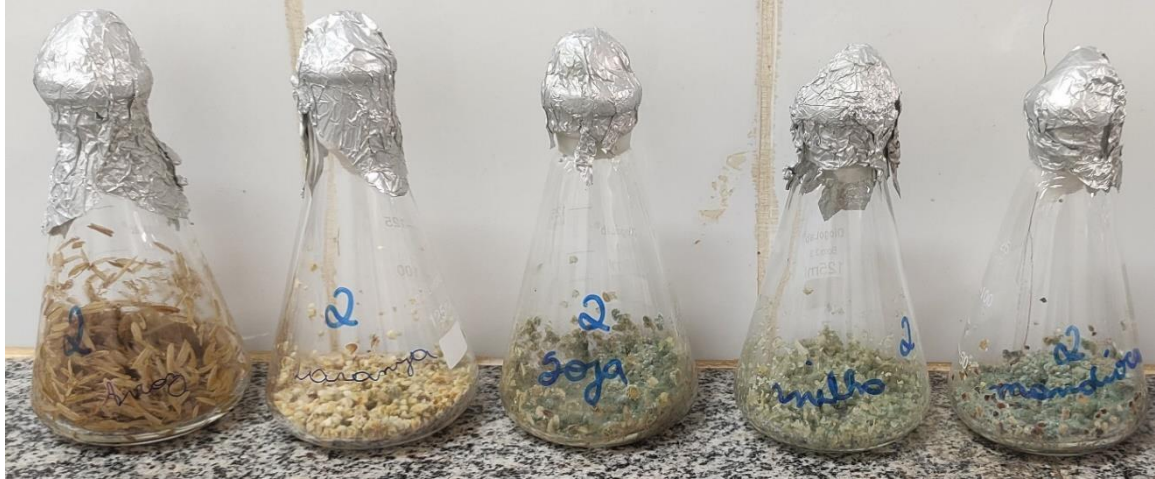
O *Trichoderma* spp foi inoculado na concentração final de 10^7 esporos/mL em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 3 gramas de resíduos agroindustriais (autoclavados a 20 min por 121°C): casca de arroz, casca de laranja, casca de mandioca, sabugo de milho, farelo de soja padronizados com tamiz de granulometria entre 1,0 a 2,0 mm. Os substratos foram secos até a completa desidratação e então armazenados em recipientes plásticos para uso posterior. Para cada situação, a quantidade de protease e protease coagulante do leite produzida foi avaliada.

Preparação do Inóculo

Os esporos do fungo foi coletado por meio de solução nutritiva composta por extrato de levedura 0,5% (p/v) e glicose 1% (p/v) diluído em tampão fosfato de sódio 245 mM e pH 7,0 previamente esterilizados: Os esporos foram contados em câmara de Neubauer até uma concentração final de 10^7 esporos/mL. Posteriormente foi realizado a inoculação dos esporos

em Erlenmeyers contendo os resíduos agroindustriais autoclavados para a produção de proteases em FES (Figura 02).

Figura 02: Ilustração de FES utilizando a casca de arroz, laranja, farelo de soja, sabugo de milho e casca de mandioca inoculadas com *Trichoderma* spp.



Fonte: Própria (2023).

Extração das Proteases

A extração da enzima foi realizada após 72 horas de fermentação. Após esse período, foi adicionado 7,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7 (245 mM) para cada 1 grama de substrato presente, posteriormente os Erlenmeyers foram colocados em um agitador orbital a 150 rpm por 60 min em temperatura ambiente (Figura 03) e o conteúdo filtrado com o auxílio de gazes e centrifugado a 8.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi denominado de extrato enzimático bruto e foi mantido em congelador e freezer, para ser utilizado posteriormente para determinações de análises bioquímicas.

Figura 03: Extração das proteases em agitador orbital.



Fonte: Própria (2023).

Determinação da atividade proteásica

A atividade proteásica foi determinada pelo método de GINTHER (1979). Amostras de 1 mL de ensaio contendo Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, 10⁻³ M de CaCl₂, 1,0% (p/p) de azocaseína e 150 µL da protease fibrinolítica foram incubadas a 28 °C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de 10% (p/v) solução de ácido tricloroacético. Após centrifugação em 3000xg durante 15 min, uma alíquota (0,8 mL) do sobrenadante foi adicionado a um segundo tubo contendo 0,2 mL de 1,8 N de NaOH. As amostras foram então homogeneizadas em um vórtex e a absorbância medida a 420 nm. A atividade foi definida como a quantidade de enzima responsável para o aumento de 0,1 na absorbância por hora.

Determinação de Proteína

O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976) (Figura 03) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Cada experimento foi realizado em triplicata e o valor médio foi então calculado após correção com o branco correspondente.

Figura 04: : Ilustração dos extrato enzimático brutos com o reagente de bradford para determinação de proteína.



Fonte: Própria (2023).

Atividade coagulante do leite

A atividade de coagulação do leite foi determinada de acordo com Merheb-Dini et al. (2010) usando 10% (p/v) desnatado leite em pó (Camponesa, Embaré, Centro, Lagoa da Prata, Minas Gerais, Brasil) em CaCl₂ a 0,05 M, como substrato. Resumidamente, 5 mL de solução

lácetea foram distribuídas em tubos de ensaio e pré-incubadas em banho-maria microprocessado (Quimis, Q215 Mmodelo 179, Cambridge, Reino Unido) a 50 °C por 15 min. O extrato enzimático (500 µL) foi adicionado ao leite e o tempo de contagem iniciado. Para uma melhor visualização da formação de coágulos, eram realizados manualmente movimentos giratórios do tubo de ensaio. O tempo em que as primeiras partículas foram formadas foi medido. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Uma unidade de atividade de coagulação do leite (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular 1 mL de substrato em 40 min a 50 °C. Atividade de coagulação do leite (U) (equação 1) e a razão (R) (equação 2) foram calculados usando as seguintes equações:

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

$$R = \frac{\text{Atividade de coagulação do leite}}{\text{Atividade proteolítica}} \quad (2)$$

onde 2400 é o tempo total da atividade de coagulação do leite (s), S é o volume de leite (mL), E é o volume da enzima (mL) e T é o tempo de formação da coagulação (s). Para selecionar uma cepa e caracterizar suas enzimas, as amostras foram agrupadas em três classes de acordo com a formação de coágulo de leite compacto e soro de leite separação no tubo de ensaio: forte coagulação do leite (coágulo distinto e soro abundante), fraca coagulação do leite (formação de coágulo sem clara separação do soro de leite) e leite sem coagulação (coágulo e soro de leite ausente).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de Protease Fibrinolítica por FES

A tabela 01 mostra à produção de proteases por *Trichoderma* spp. em diferentes fontes de substrato. Nas condições avaliadas, os substratos com maior teor de proteína, como farelo de soja, casca de laranja e casca de mandioca, foram os que apresentaram maior produção de protease. O farelo de soja e casca de laranja apresentaram atividades proteásicas de 37,867 U/mL e 37,000 U/mL, respectivamente, seguido da casca da mandioca (33,100 U/mL). Tais resultados são superiores aos encontrados por Prado et al., (2021), ao avaliar a produção de proteases com diferentes espécies de *Aspergillus* (32,00 U/mL).

A maior produção enzimática obtida utilizando farelo de soja, casca de laranja e casca de mandioca está relacionado com a maior disponibilidade de nutrientes presentes nesses

substratos para o crescimento do fungo. Uma vez que, o farelo de soja contém a maior parte de proteínas da soja, sendo um substrato rico em nutrientes e energia. A casca de laranja contém polissacarídeos insolúveis (pectina, celulose e hemicelulose) e carboidratos solúveis (glicose, sacarose e frutose) (Zhou et al., 2019), sendo um subproduto barato e com potencial para o crescimento de microrganismos, como observado neste trabalho. Já a casca da mandioca apresenta altos teores de amido e teores menores de proteína, gordura e fibra (Vieira et al., 2018).

Tabela 01: Produção de protease fibrinolítica por *Trichoderma* spp. usando diferentes substratos em FES.

Substrato	Atividade Proteásica (U/mL)	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (U/mg)
Casca de Arroz	7,733	0,109	70,948
Casca de Laranja	37,000	0,564	65,545
Casca de Mandioca	33,100	0,497	66,600
Sabugo de Milho	15,700	0,171	91,545
Farelo de Soja	37,867	1,533	24,693

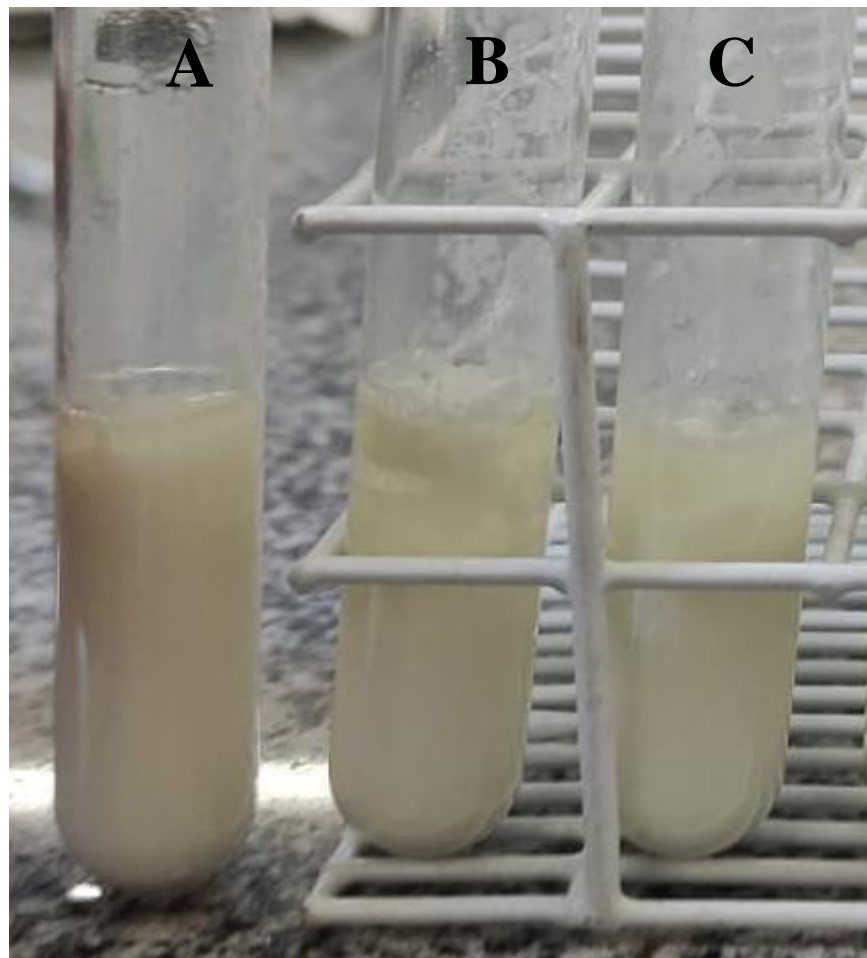
Fonte: Própria (2023).

Em relação a atividade específica das proteases (Tabela 01), os maiores valores foram observados no crescimento dos fungos em substratos de sabugo de milho e casca do arroz, 91,545 U/mg e 70,948 U/mg, respectivamente. Nos substratos de casca de laranja e casca de mandioca, os resultados foram semelhantes. Já o farelo de soja, foi que apresentou menor atividade específica, 73% mais baixo em relação ao sabugo do milho. Esses resultados indicam que mesmo produzindo uma menor quantidade de proteases, os sabugos de milho e a casca do arroz, produzem proteases com maior capacidade individual de quebra de proteínas.

Atividade coagulante do leite

Os resultados referente a fermentação do isolado *Trichoderma* spp em diferentes extratos para análise de atividade de coagulação do leite se encontra na tabela 02. Onde podemos observar maior atividade coagulante com a casca da mandioca (133,33 U), obtendo coagulação total em até 3 minutos, seguidos do farelo de soja (80,00 U) em 5 minutos e casca do arroz (10,00 U) em 40 minutos. Na figura 05 é possível observar a forte coagulação do leite nos 3 substratos anteriormente citados, apresentando a formação de coágulo distinto e soro abundante.

Figura 05: Determinação da atividade coagulante do leite – A- Casca de mandioca, B – farelo de soja e C – Casca de arroz.



Fonte: Própria (2023).

A casca de laranja e sabugo de milho não apresentaram atividade coagulante, em nenhum dos tempos de fermentação. Os resultados encontrados com a casca de mandioca e farelo de soja foram superiores aos encontrados por Prado et al., (2023) utilizando *Aspergillus melleus* DPUA (19,84 U), *Aspergillus oryzae* DPUA 541 (19,74 U) e *Aspergillus oryzae* DPUA 1624 (13,30 U).

Tabela 02: Atividade coagulante e nível de coagulação e atividade específica das proteases produzidas por *Trichoderma* spp. em diferentes substratos.

Substrato	Atividade coagulante (U)	Coagulação	Atividade específica (U/mg)
Casca de Arroz	10,00	Total	91,74
Casca de Laranja	0,00	Não houve	0,00
Casca de Mandioca	133,33	Total	268,27
Sabugo de Milho	0,00	Não houve	0,00
Farelo de Soja	80,00	Total	52,17

Fonte: Própria (2023).

A casca da mandioca, além proporcionar uma maior atividade coagulante, apresentou maior atividade específica (268,27 U/mg). Dessa forma, a casca da mandioca inoculadas com *Trichoderma* spp. apresenta potencial biotecnológico na produção de proteases coagulantes do leite, sendo um resíduo pouco explorado, de fácil acesso, principalmente na região Nordeste e financeiramente viável, além de colaborar com a atenuação de problemas de poluição, que sua disposição poderia causar.

A casca de arroz obteve a segundo maior atividade específica de coagulação (91,74 U/mg). Esse resultado está atribuído a alta atividade específica das proteases na quebra de moléculas de proteínas, como observado na análise produção de proteases. Já no substrato farelo de soja, mesmo apresentando uma alta atividade coagulante maior que a casca de arroz (Tabela 02), apresentou uma menor atividade específica de coagulação (52, 17 U/mg). Esses resultados podem ser explicados devido o farelo de soja apresentar alta concentração de proteína (1,533 mg/ml), porém com menor atividade específica das proteases (24,693 U/mg) quando comparado com os demais substratos.

Esses resultados mostram que fungos *Trichoderma* spp é eficiente e promissor na produção de proteases, variando seu potencial de acordo com o teor de proteína do substrato. E que mesmo o substrato apresentando uma menor produção de proteases, a atividade específica pode ocasionar maior coagulação do leite.

CONCLUSÕES

O *Trichoderma* spp. apresenta potencial para produção de proteases e proteases coagulantes do leite. Dentre os substratos testados, farelo de soja, casca de laranja e casca de mandioca foram eficiente para produção de proteases, e a casca de mandioca para a produção de proteases coagulante do leite, sendo portanto o uso de resíduos e co-produtos agroindustriais uma alternativa eficiente e biosustentável para a produção de proteases de interesse lácteo.

REFERÊNCIAS

ALECRIM, M. M. Produção de enzimas coagulantes do leite por *Aspergillus flavo furcatis* em resíduos da agroindústria. Manaus, 2014. 66 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Amazonas, UFAM, 2014.

ANTUNES, L.; SAITO, M. M. **A evolução das enzimas coagulantes**. Food Ingredients Brasil, p.38, 2011.

BIANCO, L.; PERROTTA, G. **Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: From sample preparation to secretome analysis**. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, n. 3, p. 5803–5829, 2015.

Bradford, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. **Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2.** Scientific African, v. 8, e00398, 2020.

CLERICI, N. J.; LERMEN, A. M.; FREITAS, D. J. D. **Agro-industrial by-products as substrates for the production of bacterial protease and antioxidant hydrolysates.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 37, p. 1-11, 2021.

EL-YAMANY, M. F.; SAMY, E. M.; SALAMA, W. H.; SHAABAN, E. A.; ABD EL-LATIF, H. A. **Gamma irradiated protease from *Echis pyramidum* venom: A promising immunogen to improve viper bites treatment.** Toxicon, v. 188, p 108-116, 2020.

FARIA, L. A.; PELUZIO, J. M.; SANTOS, W. F.; SOUZA, C. M.; COLOMBO, G. A.; AFFÉRI, F. S. **Oil and protein content in the grain of soybean cultivars at different sowing seasons.** Brazilian Journal of Agricultural Sciences, v. 13, n. 2, 2018. doi: <https://doi.org/10.5039/agraria.v13i2a5518>.

FOOD INGREDIENTS BRASIL - **Dossiê Enzimas:** A evolução das enzimas coagulantes. Nº 16 - 2011. Disponível em <http://www.revista-fi.com/materias/164.pdf>. Acesso em: 14 jul 2023.

Gomes, B. K.; Cony, B. S. L.; Stella, L. **Enzimas exógenas na alimentação de suínos.** Revista Eletrônica: Nutritime, v. 16, n. 3, p. 1-11, 2019.

GUO, Y.; LI, X.; JIA, W.; HUANG, F.; LIU, Y.; ZHANG, C. **Characterization of an intracellular aspartic protease (PsAPA) from *Penicillium* sp. XT7 and its application in collagen extraction.** Food Chemistry, v. 345, 128834, 2021.

HAFID, K.; JOHN, J.; SAYAH, T. M.; DOMÍNGUEZ, R.; BECILA, S.; LAMRI, M.; DIB, A. L.; LORENZO, J. M.; GAGAOUA, M. **One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agente.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 146, 798-810, 2020.

HERNÁNDEZ, R.; LÓPEZ, C. **Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostratus* sobre diferentes residuos agroindustriales del Departamento de Cundinamarca.** Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia, 2010.

KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. **Enzymes.** In: Kermasha S, Eskin MN. Enzymes Novel Biotechnological Approaches for the Food Industry. 1 ed. Cambridge: Academic Press, cap 2, pág. 15-44, 2021.

LIMA, C. J. B.; RIBEIRO, E. J.; ARAUJO, E. H. **Obtenção de Coalho Através da Fermentação do Fungo Filamentoso *Mucor miehei* NRRL 3420.** Uberlândia, 2003.

MAMO, J.; KANGWA, M.; FERNANDEZ-LAHOURE, H. M.; ASSEFA, F. **Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP)**

from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 2, 571-584, 2020. doi: 10.1007/s42770-020-00243-y.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; SILVA, R. **Production and characterisation 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.

MEROPS. **Families of Proteolytic Enzymes**. Disponível em: https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P. Acesso em 13 jul de 2023.

MORAIS, E. M.; SILVA, A. A. R.; SOUSA, F. W. A. D.; AZEVEDO, I. M. B. D.; SILVA H. F.; SANTOS A. M. G.; BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; CARVALHO, C. P.; EBERLIN, M. N.; PORCARI, A. M.; ARAÚJO, F. D. S. **Endophytic *Trichoderma* strains isolated from forest species of the Cerrado-Caatinga ecotone are potential biocontrol agents against crop pathogenic fungi**. *PLoS ONE*, v. 17, n. 4, e0265824, 2022.

MORDOR INTELIGÊNCIA. **Tendências do mercado de queijo, participação, relatório, crescimento 2023 - 2028**. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/cheese-market>. Acesso em: 29 jun. 2023.

NASCIMENTO, M. C.; ALENCAR, V. N. S.; NASCIMENTO, T. P.; BATISTA, J. M. S.; PORTO, A. L. F. **Proteases e suas aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícias**. In: Congresso Internacional Agroindústria. **Anais**. Instituto internacional Despertando Vocações, 2021. <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0076>.

NEIVA, R. **Setor lácteo deve crescer na próxima década, mas 2022 será de cautela**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/67714903/setorlacteo-deve-crescer-na-proxima-decada-mas-2022-sera-de-cautela>>. Acesso em: 29 jun. 2023.

OLIVEIRA, A. C. D.; RODRIGUES, M. L. F. **Produção, caracterização e aplicação de proteases de *penicillium* sp. obtidas por fermentação no estado sólido**. Universidade Tuiuti do Paraná, p. 1-10, 2016.

OLIVERAS, I.; MALHI, Y. **Many shades of green: the dynamic tropical forest-savannah transition zones**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, n. 371, p. 1-15, 2016.

PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYTESI, 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.

PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, N. K.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T. **Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acidenzymes production process**. *Bioresource Technology*, v. 309, 123317, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>.

PATYSHAKULIYEVA, A. **Fungal Proteases: Current and Potential Industrial Applications**. Reference Module in Life Sciences. 2021. doi: 10.1016/B978-0-12-819990-9.00025-1.

PRADO, F. B.; BATISTA, S. C. P.; MARTIM, S. R.; TEIXEIRA, M. F. S. **Viabilidade da produção de proteases por espécies de *Aspergillaceae* e triagem de coagulantes do leite bovino / Feasibility of protease production by *Aspergillaceae* species and screening of coagulants from bovine milk**. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 2, p. 16356–16373, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-317>

QUEIROZ, CIBELE.; SOUSA, A.; AMARAL, I. **Serino-protease produzida por *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae***. Novas Edições Acadêmicas p. 68, 2020.

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

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CAMERA, F. D.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T. **Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão**. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. **Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, p. 126–131, 2010.

SANTOS NETA, E. R.; VIEIRA, E. S.; ALVES, K. S.; GALVÃO, L. T. O.; LIMA, R. C.; ARAUJO, L. N. **Avaliação bromatológica de resíduos de mandioca para alimentação animal**. Congresso Brasileiro de Zootecnia. GO, Goiás. 2018.

SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA Jr., A. C. R.; ASSIS, F. G. V.; LEAL1, P. L. **Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática**. The Journal of Engineering and Exact Sciences, v. 04, n. 02, 2018.

SARAIVA, M. C.; DUTRA, S. Â.; BARROSO, A. B. **O controle de qualidade na produção de queijo de Coalho no Brasil: uma revisão**. Research, Society and Development, v. 12, n. 3, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i3.40534>.

SILVA, B. L. **Produção e caracterização da protease coagulante Obtida por fermentação submersa a partir do fungo Termofílico *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31**. 2013. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de São José do Rio Preto, 2013.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E.S.; CORTES, M.S.; MARTINS, E.S. **Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 3, p. 28-41. 2009.

SILVA, H. F.; SANTOS, A. M. G.; SANTOS, M. V. O. D.; BEZERRA, J. L.; LUZ, E. D. M. N. **Seasonal variation in the occurrence of fungi associated with forest species in a**

Cerrado-Caatinga transition area. Revista Árvore, 44, 2020.

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

SOUZA, P. M. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro. 2015. 125f. **Tese (doutorado).** Universidade de São Paulo. São Paulo.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELATORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMEROGOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. **Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system.** Biochemical Engineering Journal, v.13, n. 2, p.157-167, 2003.

WEISS, R.; EISCHER, A.; TADIC, T.; GRITSCH, S. M.; ORTNER, M.; PRALL, K.; NEUNTEUFEL, E.; F. PUTZ, R. F.; GUEBITZ, G. M.; NYANHONGO, G. S. **Valorisation of slaughter house and deinking paper waste streams for the production of enzyme by *Trichoderma reesei*.** Journal of Cleaner Production, v. 275, 122882, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122882>.

YANG, X.; WANG, Z.; ZHANG, C.; WANG, L.; PANG, L.; ZHANG, D.; MAN, C.; JIANG, Y. **Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of ultra-high temperature-sterilized whole milk.** Journal of Dairy Science, v. 104, n. 6, p. 6577-6587, 2021.

YU, P.J; CHOU, C. C. **Factores affecting the growth and production os milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid médium.** Food Technology and Biotechnology, v. 43, p. 283-288, 2005.

ZHOU, Y. M.; CHEN, Y.P.; GUO, J.S.; SHEN, Y.; YAN, P.; YANG, J.X. **Recycling of orange waste for single cell protein production and the synergistic and antagonistic effects on production quality.** Journal of Cleaner Production, v. 213, p. 384-392, 2019. 10.1016/j.jclepro.2018.12.168.