



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

JAQUELINE DOS SANTOS MARINHO

**UTILIZAÇÃO DE REJEITO LÍQUIDO DA
INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA A PRODUÇÃO
DE PROTEASE POR AMOSTRAS DE
ASPERGILLUS spp. ISOLADAS DA CAATINGA
DE PERNAMBUCO**

Recife, 17 de junho de 2021

JAQUELINE DOS SANTOS MARINHO

**UTILIZAÇÃO DE REJEITO LÍQUIDO DA INDÚSTRIA
DE ALIMENTOS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE
POR AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS* spp. ISOLADAS
DA CAATINGA DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima

Recife, 17 de junho de 2021

Ficha Catalográfica

M338u Marinho, Jaqueline dos Santos
 Utilização de rejeito líquido da indústria de alimentos
 Para a produção de protease por amostras de *Aspergillus* spp.
 Isoladas da caatinga de Pernambuco, / Jaqueline dos Santos
 Marinho, 2021
 51 f.: il.

 Orientador: Carlos Alberto Alves da Silva
 Coorientador: Marcos Antônio Barbosa de Lima
 Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de
 Pernambuco. Programa de Pós-graduação em
 desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado
 em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2021.

1. Biotecnologia. 2. *Aspergillus*. 3. Resíduos agroindustriais
4. Enzimas. 5. Soro de leite. I. Título.

CDU 574.6

Luciana Vidal CRB-4/1338

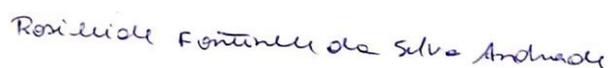
UTILIZAÇÃO DE REJEITO LÍQUIDO DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE POR AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS* spp. ISOLADAS DA CAATINGA DE PERNAMBUCO

JAQUELINE DOS SANTOS MARINHO

Examinadores:



Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva (Orientador)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



Profa. Dra. Rosileide Fontenele da Silva Andrade (Titular interno)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco (Titular externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Defendida em: 17/06/2021

Coordenadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a Deus, por todas as oportunidades e pelas pessoas que colocou em meu caminho, para que de alguma forma tornassem este sonho, uma realidade.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, porque sempre esteve comigo.

À minha família, especialmente meu marido Ednaldo, meus filhos Guilherme e Beatriz e a minha mãe Jane, pelo esforço e companheirismo nesse momento tão especial da minha vida. Dificilmente eu teria começado sem a ajuda deles.

A todos os docentes, discentes e funcionários da UNICAP, que de alguma maneira contribuíram com esse projeto de vida, pela lealdade e cumplicidade de fazer sempre o melhor, andando de mãos dadas, buscando cada vez mais conhecimento.

Em especial agradeço ao Professor Dr. Marcos Lima, que resignificou esse trabalho, doando tempo, atenção e conhecimento, todos obrigados seria pouco aqui para você. À Professora Dra. Rosileide Fontenele, pelo carinho e pela confiança, minha eterna admiração por você, como profissional, como amiga, como mãe, como mulher.

À Dra. Thayse Silva, por me proporcionar um divisor de águas que mudou a minha vida e me deu de presente novos amigos.

À Dra. Dayanne pela simpatia, e acolhimento sempre de sorriso aberto e pronta para ajudar. Obrigada de verdade.

À nossa coordenadora Professora Dra. Galba Takaki, por sempre acolher, ouvir e me ajudar. Ah!! Prof.^a a Senhora é uma inspiração.

Aos meus amigos, Uiara, Gilvanete, Eduardo, Ilka, Diego, Dra. Adriana e André por sempre estarem estendendo as mãos, nunca largaram na verdade, sempre por perto, enchendo meu coração de afeto e segurança. Sem vocês eu não teria conseguido.

À Instituição UNICAP na pessoa do Reitor Pe Pedro Rubens.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia – NPCIAMB pela oportunidade de trabalhar com uma equipe fantástica.

À Fundação de Amparo a Ciências e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE, pela confiança e oportunidade que a mim foi concebida.

À UFRPE, por ter aberto as portas para mim, em um momento tão difícil como esse. Por fim, agradecer a todas as outras pessoas que estiveram comprometidas comigo nesse desafio, como Isa Copiadora, maravilhosa sempre me socorria e me ajudava, Dona Graça que esperava eu largar, mas não me deixava sem lanchar, ao pessoal do estacionamento que sempre dava um jeitinho de arrumar uma vaga mesmo quando estava sem.

À todos vocês meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivo Específico	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Enzimas	16
3.2 Aplicação de Enzimas em Geral	18
3.3 Enzimas Proteolíticas	19
3.4 Fontes de Proteases	21
3.5 Valor Econômico das Proteases	22
3.6 Aplicação das Proteases Microbianas	22
4 GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i>	25
4.1 Características Gerais	25
4.2 Potencial Biotecnológico	27
5 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	29
5.1 Soro de Leite	29
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO II	42
RESUMO	43
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4 CONCLUSÃO	49
5 AGRADECIMENTOS	49
6 REFERENCIAS	50
CAPÍTULO III	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Mercado Mundial de Enzimas.....	18
Figura 2 - Estrutura e terminais amino e carboxila de uma cadeia peptídica.....	20
Figura 3 - Conidióforo de <i>Aspergillus</i> bisseriado e estruturas.....	26
Figura 4 - Produção de Leite no Brasil em 2019.....	30
Figura 5 – Comparativo trimestre produção de leite Estados 2019/2020.....	31
Figura 6 - Produção Mundial de Queijo tipo coalho.....	33

CAPÍTULO II

Figura 1 Diagrama de Pareto do efeito das variáveis independentes na atividade proteolítica (U/mL) do isolado <i>Aspergillus</i> sp. UCP 1290 em fermentação submersa, usando soro de leite como substrato, durante 96 h.....	46
Figura 2 Efeito do pH na atividade da protease produzida por <i>Aspergillus</i> sp. UCP 1290 em fermentação submersa utilizando soro de leite como substrato durante 96 h.....	47
Figura 3 Efeito da temperatura na atividade da protease produzida por <i>Aspergillus</i> sp. UCP 1290 em fermentação submersa utilizando soro de leite como substrato durante 96 hs	47

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Classes e relações das enzimas.....	17
Tabela 2 - Aplicações de proteases por setores.....	24
Tabela 3 - Produção de enzimas por <i>Aspergillus</i> spp.....	28
Tabela 4 - Composição do Soro de leite.....	32
Tabela 5 - Comparativo principais proteínas do soro.....	32

CAPÍTULO II

Tabela 1 Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2 ³ para produção de protease por <i>Aspergillus</i> sp. UCP 1290 em meio com soro de leite.....	43
Tabela 2 Atividade proteolítica e produção de biomassa por <i>Aspergillus</i> spp. UCP 0076, 1064, 1132, 1177, 1290, 1461 em meio convencional e alternativo. AP - Atividade Proteolítica.....	44
Tabela 3 Produção de protease por <i>Aspergillus</i> sp. UCP 1290 usando um planejamento fatorial 2 ³ por 96 h a 150 rpm em meio de cultura com soro de leite.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
CARG – Compound Annual Growth Rate

DAG – Diacilglicerol

E.C. – Enzyme comission

FACEPE - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

MAG – Monoacilglicerol

MEROPS – Banco de dados de Peptidases

MICS – Ministério da Indústria Comércio e Serviços
Kg – Quilograma

pH – Potencial Hidrogeniônico

SCALFFOLDS – Estrutura do tipo sustentação mecânica ao desenvolvimentocelular parecido com um andaime.

UHT - Ultra-high-temperature

RESUMO

Atualmente a enorme geração de resíduos pela indústria agroalimentar representa um significativo desafio ambiental. No entanto, a maioria desses resíduos são ricos em nutrientes e podem servir como matérias primas para a produção de produtos de valor agregado ou como fontes de energia renovável. Nesse contexto, o presente trabalho reutilizou o soro de leite da fabricação de queijo para a produção de protease por isolados de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. Seis isolados foram cultivados nos meios padrão (gelatina 1 %) e alternativo soro de leite (25 %) por um período de 96 horas, a 150 rpm e 28 °C para seleção do melhor produtor de protease. Posteriormente, um planejamento fatorial 2³ foi realizado para investigar a influencia das variáveis independentes temperatura, pH e concentração de soro de leite sobre a produção de protease em fermentação submersa pela cepa selecionada. *Aspergillus* sp. UCP 1290 foi selecionado por apresentar elevada atividade proteolítica de 28,75 e 37,33 (U/mL) nos meios padrão e alternativo, respectivamente. Com a realização do planejamento fatorial utilizando *Aspergillus* sp. UCP 1290 foi possível identificar a máxima atividade proteolítica (129,80 U/mL) na condição 4 (temperatura de 32 °C; pH 8,0 e concentração de soro de 20 %). A análise de variância demonstrou que todas as variáveis independentes testadas foram significativas para produção da protease. A concentração de soro de leite foi a variável independente mais significativa, porém influenciou negativamente a produção da enzima, indicando que menores concentrações de soro podem favorecer uma maior produção da enzima. Por outro lado, a temperatura foi a que mais influenciou na produção da protease. A enzima produzida apresentou elevada atividade catalítica em pH 7,0 e 60 °C, o que sugere ser uma protease neutra ativa em alta temperatura. Sendo assim, o soro de leite pode ser utilizado como único substrato por *Aspergillus* sp. UCP 1290 para produção de proteases neutras ativas em temperaturas utilizadas em bioprocessos industriais.

Palavras-chave: *Aspergillus* spp. Bioconversão. Bioprocessos. Enzimas. Soro de leite.

ABSTRACT

Currently, the huge generation of waste by the agrifood industry represents a significant environmental challenge. However, most of these residues are rich in nutrients and can serve as raw materials for the production of value-added products or as sources of renewable energy. In this context, the present work reused whey from cheese manufacturing for the production of protease by filamentous fungi isolates of the genus *Aspergillus*. A total of six isolates were cultivated in standard media (1% gelatin and 25% whey alternative) for a period of 96 hours, at 150 rpm and 28 °C to select the best protease producer. Subsequently, a 2³ factorial design was carried out to investigate the influence of the independent variables temperature, pH and whey concentration on the production of protease in submerged fermentation by the selected strain. According to the results *Aspergillus* sp. UCP 1290 was selected for its high proteolytic activity of 28.75 and 37.33 (U/mL) in standard and alternative media, respectively. By carrying out the factorial planning of the factorial planning with the selected isolate, it was possible to identify maximum proteolytic activity (129.80 U/mL) with *Aspergillus* sp. UCP 1290 in planning condition 4 (temperature of 32 °C; pH 8.0 and serum concentration of 20%.)

The analysis of variance showed that all independent variables tested were significant for the production of the protease. The whey concentration was the most significant independent variable, but it negatively influenced the enzyme production, indicating that lower whey concentrations can favor a higher enzyme production. On the other hand, the temperature was the one that most influenced the production of the protease. The enzyme produced showed high catalytic activity at pH 7.0 and at 60 °C, which suggests that it is a neutral protease active at high temperature. Thus, whey can be used as the only substrate for *Aspergillus* sp. UCP 1290 for the production of neutral proteases active at temperatures used in industrial bioprocesses.

Keywords: *Aspergillus* spp. Bioconversion. Bioprocesses. Enzymes. Cheese whey.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos, que possuem características particulares e podem ter diferentes aplicações na cadeia de suprimentos, como na indústria de cosméticos, na produção de solventes, ácidos orgânicos, aminoácidos, antibióticos, vitaminas, pigmentos, vacinas, proteínas terapêuticas, anticorpos monoclonais, inseticidas, dentre muitas outras aplicações (DIAS et al., 2021; ZIMMER et al., 2009).

O mercado global de enzimas é altamente promissor, sendo avaliado em aproximadamente \$ 5,9 bilhões em 2020 e com uma taxa de crescimento prevista de mais de 8,7 % até 2026. Nesse mercado, destacam-se as enzimas proteolíticas, as quais detêm uma fatia de 60 % do mercado total de enzimas, sendo as biomoléculas mais comercializadas e mais valiosas. A taxa de crescimento anual composta (CAGR) para as enzimas proteolíticas é de 5,8 % até 2026 (MARKETSANDMARKETS, 2020).

As proteases são o maior grupo de enzimas, com papel extraordinário em muitas indústrias, especialmente na área de alimentos, detergentes e em aplicações terapêuticas. As proteases microbianas tem vantagens frente as proteases de origem animal e vegetal, que vão desde maior disponibilidade no ambiente, facilidade de manipulação, independência de sazonalidade, assim como a possibilidade de utilizar substratos mais baratos (GNANADOSS; S. KANCHANA DEVI, 2021; BAJAJ et al., 2014).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* spp. são seguros e amplamente utilizados em processos biotecnológicos, tais como de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos e pesticidas, biorremediação de corpos hídricos, no desenvolvimento de nanopartículas por meio de rotas intra ou extracelulares, bem como para a produção de ácidos orgânicos, antibióticos, antitumorais, antifúngicos e enzimas (PRADO et al., 2021; FRIAS; SANTOS, 2020; BELI; MAGESTE; TAKETANI, 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

Algumas soluções vêm sendo empregadas para minimizar os danos ao meio ambiente, como o reaproveitamento dos resíduos agroindustriais, principalmente valorando-os com tecnologia sustentável, viabilizando os ciclos produtivos das cadeias de suprimentos e impactando de forma positiva os pilares da sustentabilidade, a partir do uso de tecnologia enzimática (GUEDES et al., 2021; ALVES, 2019).

Contudo vale ressaltar que os custos para uso de tecnologias enzimáticas ainda são onerosos

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

e estima-se que aproximadamente 30-40 % do custo envolvido na produção de enzimas são devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos isolados (CARVALHO et al., 2008).

Inúmeras agroindústrias têm realizado o reaproveitamento de seus resíduos na formulação de outros produtos, sendo a indústria alimentícia maior exemplo deste processo, como o coco verde (ALBUQUERQUE et al., 2021), reciclagem animal (SOUZA et al., 2021), bagaço de cana (SILVA et al., 2021), sabugo de milho (LERMEN et al., 2021), indústria de pescados (MORETO et al., 2021) e indústrias de laticínios reutilizando o soro lácteo na produção de outras bebidas fermentadas (ALBUQUERQUE et al., 2021).

Tendo em vista os altos custos com os processos produtivos, alta demanda por alimentos industrializados e o impacto ambiental pelo descarte de resíduos provenientes desses processos. É importante investigar a produção de biomoléculas de alto valor industrial, como as proteases, através do reaproveitamento de resíduos agroindustriais, especialmente o soro de leite, afim de elucidar esse gargalo que encontramos nos processos produtivos, agregando valor econômico e ambiental ao resíduo, assim promovendo economia circular e principalmente a sustentabilidade (SOARES; VENDRAMEL; SOUZA, 2021; ARAÚJO; SOUZA; FREITAS, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar a produção de proteases fúngicas por amostras de *Aspergillus* spp. isolados da Caatinga de Pernambuco em meio a base de soro de leite.

2.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar amostras de *Aspergillus* spp. isoladas da Caatinga de Pernambuco para a produção de proteases em meio convencional e alternativo.
- Investigar as melhores condições de produção de protease em meio alternativo a base de soro de leite pelo isolado de *Aspergillus* sp. selecionado;
- Investigar o efeito de diferentes temperaturas e pH na atividade da enzima.
- Validação dos resultados através da análise no Software Statistic.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos que participam de diversas reações bioquímicas, essenciais à vida, de origem proteica, estão ligadas por carboidratos, lipídeos e proteínas, e controlam principalmente os processos metabólicos acelerando ou retardando as reações entre moléculas através de enzimas específicas (BIBI et al., 2021).

De forma geral, enzimas são bioconversores que atuam precipitando diferentes processos entre moléculas, executando funções em diferentes condições, como diferentes faixas de pH e temperatura, podendo inclusive se autodestruir sem afetar outras enzimas (SILVA; BARBOSA, 2019; RESENDE, 2017).

Podem ser extraídas de animais, vegetais e de micro-organismos, são divididas em classes de acordo com as reações químicas que catalisam, destacando-se as hidrolases, que atuam nas moléculas através da hidrólise, quebrando cadeias maiores como as de proteínas, e transformando em moléculas menores como aminoácidos, possuindo uso consagrado dentre as enzimas (ZIMMER et al., 2009).

As enzimas têm uma relação muito particular com cada substrato, têm afinidades específicas, essa propriedade está ligada diretamente ao sítio ativo, local onde ocorre cada interação, as reações químicas variam e depende de quatro fatores, efeitos de proximidade e orientação, catalise por íons metálicos, catalise ácido-base geral, catálise covalente (WANDERLEY, 2011; MONTEIRO; SILVA, 2009).

Emil Fisher (1984) propôs a hipótese chave/fechadura, que discerne sobre a especificidade de uma enzima, como uma espécie de encaixe entre a enzima (fechadura) e do seu substrato (chave), formando o complexo, onde enzima-substrato, assumindo assim uma única forma, mais tarde Koshland, (1958), adotou um modelo mais flexível de encaixe levando a hipótese em que os sítios ativos encontram-se pré-formados, e qualquer indução entre a enzima e o substrato, leva a uma alteração conformacional entre eles com possíveis arranjos dos aminoácidos para um perfeito encaixe (MOTTA, 2011; MONTEIRO; SILVA, 2009).

As enzimas foram divididas em seis classes de acordo com o tipo de reações que catalisam (ORLANDELLI et al., 2012).

Tabela 1 - Classes e relações das enzimas

CLASSES	REAÇÕES QUE CATALISAM	EXEMPLOS	MODO DE ATUAÇÃO
Oxirredutases	Reações de oxidação-redução transferência de elétrons.	Desidrogenase oxidase	Remove e adiciona átomos de hidrogênio
Transferases	Transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil, entre moléculas.	Metiltransferase	Transfere grupos metil (CH ₃)
Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente.	Lipases e Proteases	Quebra lipídios e proteínas
Liasas	Adição de grupos ou remoção de duplas ligações.	Descarboxilase	Remove CO ₂
Isomerases	Reações de Inter-conversão entre isômeros óticos ou geométricos	Cis- Trans - Isomerases	Converte formas de cis e trans
Ligases	Condensação de duas moléculas, sempre à custa de energia, geralmente do ATP.	Síntese	Combina dois grupos

Fonte: Adaptado Orlandelli, (2012)

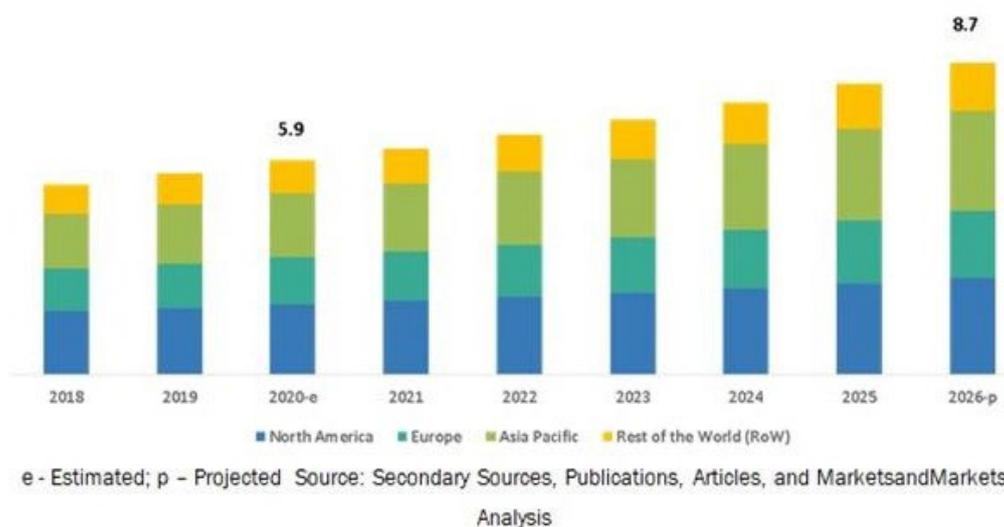
O mercado de enzimas industriais é estimado em \$ 5,9 bilhões em 2020 e deve atingir US \$ 8,7 bilhões em 2026, registrando um CAGR de 6,5% em termos de valor (MARKETSANDMARKETS, 2020).

O maior negócio de enzimas é expresso pela indústria de alimentos e bebidas, que movimenta 26% do comércio mundial, o que corresponderá a uma parcela de US \$ 1,5 bilhão em 2026, seguido por biocombustíveis e detergentes com 18% (\$ 969,3 milhões) e 14% (US\$754,4 milhões), respectivamente.

A demanda por essas enzimas industriais vêm em crescimento acelerado, e suas aplicações são diversificadas no ramo alimentício, que vão desde processamento de carne, laticínios, produtos de panificação, processamento de frutas, legumes, fabricação de cerveja, até processamento de óleo vegetal (MARKETSANDMARKETS, 2020).

Os principais investidores no mercado mundial de enzimas incluem BASF (Alemanha), DuPont (EUA), Novozymes (Dinamarca), estudos recentes apontam um mercado bilionário, nos mais variados segmentos, a exemplo da S-Biomedic NV que é uma empresa de Cosméticos que se concentra em encontrar potencial cosmético e terapêutico do microbiomacutâneo (MARKETSANDMARKETS, 2020)

Figura 1 - Mercado Mundial de Enzimas



Fonte: Market Research, (2020)

A DuPont, empresa líder no mercado americano que inclui Nutrição e Saúde, Biociências Industriais, Segurança e Proteção, através de pesquisas com diferentes bactérias, é líder mundial em soluções inovadoras e sustentáveis nas indústrias de alimentos, saúde, produtos farmacêuticos e biotecnológicos. A Novozymes (Dinamarca), líder mundial e está em todos os continentes, lançou seu novo produto desenvolvido para fabricantes de laticínios, o produto converte os açúcares existentes no leite, produzindo glicose usando lactose (MARKETSANDMARKETS, 2020).

3.2 Aplicação das enzimas no mercado mundial

Diferentes enzimas podem ser produzidas a partir de bioprocessos, destacando-se nas indústrias de celulose, têxteis, biocombustíveis, tratamento de resíduos, agrícolas e indústrias alimentícias. Esta última destaca-se as pectinases, amilases e proteases, aplicadas principalmente no domínio agroindustrial (ALMEIDA, 2021; MATKAWALA et al., 2019).

As pectinases são responsáveis pela decomposição de polissacarídeos complexos de tecidos vegetais, convertendo em cadeias mais simples, tendo uma gama de aplicações em processamento de alimentos, processos têxteis, desengorduramento de fibras ásperas de plantas e tratamento de águas residuais pécnicas. Na indústria de alimentos, são usadas na

produção de sucos de frutas e vinhos, quebrando a parede celular das frutas ((MATKAWALA et al., 2019).

A amilase também está entre as classes mais relevantes de enzimas, e são enzimas produzidas por diversos agentes como plantas, animais, e micro-organismos, utilizadas principalmente na indústria alimentícia, no processamento de amido, nos processos de fabricação de pães, de bebidas, ração animal, sacarificação do amido, além de outros segmentos como a produção de etanol, indústria têxtil, e indústrias de papel (BENASSI; ALMEIDA, 2019).

As proteases são verdadeiramente as mais utilizadas na indústria alimentícia, são empregadas nas diferentes aplicações, conhecidas por sua versatilidade (PRADO et al., 2021). Com versatilidade, as proteases são matéria prima na indústria de panificação, e processamento de derivados lácteos, exercem uma extraordinária função tanto para o melhoramento de queijos e derivados (RAZZAQ et al., 2019; JUSTINA; JUSTINA; SKORONSKI, 2018).

Na indústria de laticínios, as proteases estão presentes na produção de queijos e derivados, envolvidas nas etapas de coagulação do leite e na maturação de queijos, embora a quimosina obtida a partir do processo digestivo de bezerros, tomou-se o coagulante mais bem estabelecido nestes processos (FENG et al., 2020).

3.3 Enzimas Proteolíticas

As proteases são enzimas do grupo das hidrolases, que catalisam a hidrólise de proteínas em aminoácidos, devido à quebra das ligações peptídicas, tradicionalmente as siglas E.C. (Enzyme Commission) refere-se à classificação de enzimas, sendo as peptidases ainda conhecidas pelos números 3.4 que diz respeito à classe e subclasse respectivamente (PEIXOTO et al., 2021)

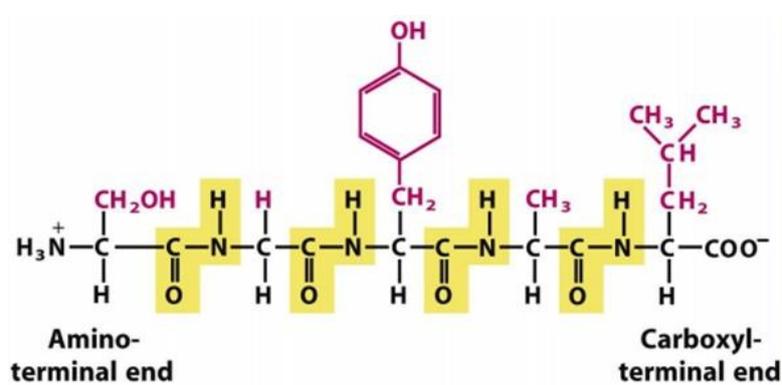
Proteases diferem entre si na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, embora tenham um sítio ativo e um mecanismo enzimático em comum, subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases, de acordo com seu sítio ativo, ou seja, clivando peptídeos terminais ou distantes destes (MURI, 2014).

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

Classificadas de acordo com a faixa de pH com maior atividade, podem ser ácidas, neutras e alcalinas, podem ser classificadas de acordo com o sítio ativo e são denominadas como serina proteases, proteases aspárticas, proteases de cisteína e metaloproteases, dependendo ainda da natureza do grupo funcional no local ativo (MASSUGA et al., 2020; LUKIN, 2019).

As exopeptidases são classificadas conforme atuação na região N- ou C-terminal da proteína, subdividindo-se ainda em aminopeptidases ou carboxipeptidases. As endopeptidases atuam sobre ligações peptídicas de regiões internas da cadeia polipeptídica (MURI, 2014).

Figura 2 - Estrutura e terminais amino e carboxila de uma cadeia peptídica



Fonte: (NELSON; COX, 2018)

As carboxipeptidases são subdivididas em serinas, metalos e cisteínas, no entanto as endopeptidases são subdivididas em maior número, como as serinas, cisteínas, ácidos aspárticos, treoninas e um grupo muito particular que são as metalopeptidases, porque contém íons metálicos envolvidos no sítio catalítico (STAEL et al., 2019; VILELA; RESENDE, 2014; RAWLINGS; BARRETT; BATEMAN, 2010; RAO et al., 1998).

Os estudos sobre proteases são considerados extensos e complexos, sendo criado um banco de dados, denominado MEROPS (Banco de dados de peptidases) e traz uma classificação hierárquica, baseada em estrutura das proteinases, cada peptidase é atribuída a uma família com base em similaridades significativas e na sequência de seus aminoácidos, podendo ser acessado através da página da web (<http://merops.sanger.ac.uk>) (STAEL et al., 2019; RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2016).

3.4 Fontes de Proteases

Proteases podem ser de origens vegetais, animais e microbianas, o uso de plantas como fonte de proteases, apresenta vários fatores limitantes que podem interferir no processo de produção, por exemplo, o fator tempo x espaço e disponibilidade de área para cultivo, contudo as proteases vegetais ainda são utilizadas em alguns processos como a papaína, extraídas do látex do mamoeiro e a bromelina, obtidas do caule do abacaxi (PRADO et al., 2021; BELI; MAGESTE; TAKETANI, 2019; RAO et al., 1998). Proteases animais também apresentam limitações, por exemplo, geralmente estão associadas às condições de sua natureza, ou seja, temperatura e faixa de pH ideal, em torno de 37° C e faixa de pH 7,4, respectivamente, sendo a temperatura um fator determinante, qualquer alteração leva desnaturação da enzima, inviabilizando o processo de produção (RAVEENDRAN et al., 2018).

Ainda proteases animais são encontradas, no pâncreas, no intestino de animais e sua produção depende da disponibilidade de animais para abate, sendo que não supri a demanda de mercado, devido essa fonte depender de políticas públicas e agrícolas, inviabilizando o processo de produção. Sendo assim, a incapacidade das proteases vegetais e animais de atender as demandas mundiais atuais levaram a um crescente interesse pelas proteases microbianas (RAVEENDRAN et al., 2018; RAO et al., 1998).

Dentre as fontes de proteases existentes, os micro-organismos se destacam devido a sua elevada capacidade fisiológica de reprodução, podendo operar em diferentes temperaturas, pH e meios de cultivo com elevado potencial biotecnológico (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Proteases microbianas correspondem a uma classe de enzimas versáteis no que diz respeito às suas aplicações e funções fisiológicas, que as colocam em uma posição privilegiada em relação a outras (GUPTA et al., 2021; PIMENTA et al., 2021; RAO et al., 1998).

São responsáveis por realizar modificações altamente específicas e seletivas, como coagulação sanguínea e lise de fibrina, processamento e transporte de proteínas em todas as membranas, além de executar outras funções que se estendem desde o nível celular, até o nível de órgãos e organismos, produzindo um sistema em cascata (GUPTA et al., 2021; RAO et al., 1998).

Estudos apontam que proteases vêm sendo utilizadas na medicina em processos para regeneração de tecidos e ossos, através da interação proteases-Scaffolds (estrutura do tipo sustentação mecânica ao desenvolvimento celular parecido com um andaime), que nada mais são que estruturas tridimensionais porosas utilizadas como suporte para matrizes celulares

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

(GEBAUER; SKERRA, 2020).

Além de estarem associadas à transformação de proteínas, altamente específicas e seletivas, como a ativação de formas zimogênicas, coagulação sanguínea e processamento e transporte de proteínas secretoras através das membranas (LUKIN, 2019; RAO et al., 1998).

3.5 Valor Econômico das Proteases

O mercado global de proteases pode ultrapassar US \$ 3 bilhões em 2024, com ganhos de mais de 6,1% CAGR. É surpreendente o crescimento na área de tecnologia e engenharia de proteases. Com iniciativas governamentais aderentes, podem fomentar ainda mais a demanda global por produtos como as proteases. Desde o uso de detergente para fins domésticos a limpeza de lentes ou dentaduras. As proteases são o maior grupo de enzimas, com uma fatia de mercado que chega a responder por 60% de todo mercado de enzimas (NAVEED et al., 2021; MARKETSANDMARKETS, 2020).

3.6 Aplicação das Proteases Microbianas

As proteases microbianas podem ser utilizadas nos mais variados setores da indústria, e nos mais diferentes segmentos, que vão desde a indústria de cosméticos, bem como na eliminação de poluentes contendo enxofre, e na substituição de reagentes químicos que geram poluentes tóxicos (ZHAVORONKOV et al., 2020; EL-TANBOLY; EL-HOFI; KHORSHID, 2017; MURI, 2014).

Segundo (WAJEEHA et al., 2021; NAVEED et al., 2021; DEMAINE; ADRIANO, 2008) o uso de proteases nas indústrias de limpeza e saneantes está ligado ao uso de produtos para desinfecção, descontaminação, desinfestação e soluções de higienização que incluem materiais cirúrgicos e membranas filtrantes, bem como nos processos de descontaminação de águas para abastecimento humano.

Os detergentes para roupa, por exemplo, são responsáveis por aproximadamente 25% das vendas mundiais totais de enzimas, pois melhoram o desempenho na remoção de manchas, preservando a cor dos tecidos, desestabilizando e promovendo a quebra de partículas específicas em porções menores solúveis em água, removendo assim a sujeira (WAJEEHA et al., 2021; SOUZA et al., 2017).

Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas na produção de trombolíticos que auxiliam na cicatrização de feridas e ainda na produção de antibióticos semissintéticos, já na

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

indústria de cosméticos auxilia nos processos de cicatrização, depilação e limpeza de pele (NAVEED et al., 2021; SOUZA et al., 2017; SINGH et al., 2016; RAY, 2012).

Na indústria têxtil no tratamento de couro, lã e seda, indústria fotográfica recuperação de prata, e principalmente na indústria alimentícia, com grandes contribuições na panificação, bebidas, laticínios, processamento de carne, suplementos dietéticos, coagulação de leite e preparo de bebidas protéicas (NAVEED et al., 2021; SANTOS et al., 2003; SINGH et al., 2016).

O uso de proteases na medicina, vai desde a regeneração de tecidos, scaffolds, criação de sensores, interruptores, transdutores e seus compostos circuitos de sinalização, até a construção de sistemas sensoriais complexos, para uma variedade de aplicações biomédicas, denominada engenharia de tecidos, promovendo também a regeneração dos tecidos em processos de cicatrização (BELI; MAGESTE; TAKETANI, 2019; RAZZAQ et al., 2019).

O setor de alimentos vem empregando enzimas em panificação, bebidas, suplementos dietéticos, e processamento de leite, especificamente na indústria de laticínios as enzimas exercem uma extraordinária função tanto para o melhoramento obtendo resultados benéficos como para a degradação de produtos de origem láctea, isso se deve a composição do leite, que oferece condições ideais para reações biológicas, como as catalisadas por enzimas (RAZZAQ et al., 2019; JUSTINA; JUSTINA; SKORONSKI, 2018).

Na indústria de laticínios, as proteases estão presentes na produção de queijos e derivados, envolvidas nas etapas de coagulação do leite e na maturação de queijos, embora a quimosina obtida a partir do estômago de bezerros seja o coagulante mais bem estabelecido nesses processos, as proteases microbianas recombinantes, se destacam como alternativas por apresentarem características diferenciadas (FENG et al., 2020).

Tabela 2 - Aplicações de Proteases por Setores

SETOR	ENZIMAS	APLICAÇÃO
Panificação	Peptidase neutra	Condicionador de massa
Produção de bebidas	Papaína	Remoção da turvação em bebidas
Indústria de laticínios	Peptidases fúngicas, quimosina, outras peptidases	Substituição do uso da renina de bezerros, processamento das proteínas do soro do leite.
Processamento de alimentos	Várias peptidases	Modificação de materiais ricos em proteína, como proteínas da soja ou glúten.
Indústria do couro	Tripsina, outras peptidases	Amaciamento do couro
Indústria de carne e peixe	Papaína, outras peptidases	Amaciamento da carne, recuperação de proteínas de ossos e restos de peixe
Medicina	Tripsina	Remoção de tecidos necrosados, agente fibrinolítico
Indústria fotográfica	Várias peptidases	Recuperação da prata usada em filmes fotográficos e de raios X
Produção de adoçantes	Termolisina	Hidrólise reversa durante a síntese do] aspartame
Engenharia de Tecidos	Proteases	Atua como regenerador de tecidos

Fonte: Adaptado de Zanoelo; Giannesi; Cabral, (2013).

4. GÊNERO *ASPERGILLUS*

O gênero *Aspergillus* é diverso e ocorre em abundância na natureza e em toda parte do mundo, foi descrito pela primeira vez em 1729, pelo padre italiano e biólogo Pier Antonio Micheli, que o comparou a um borrifador de água benta, artefato utilizado pela igreja católica.

Sua classificação é baseada em características morfológicas, fisiológicas e moleculares com alto impacto econômico e social, são conhecidos por deteriorar alimentos, produzir micotoxinas e são frequentemente descritos como patógenos animais e humanos (SAMSON et al., 2014; KLICH, 2002).

Está associada à deterioração da matéria orgânica, a podridão e ao mofo em alimentos, a maioria de suas espécies são utilizadas para a produção de enzimas, com a biossíntese química e na transformação de compostos (SAMSON et al., 2014)

4.1 Características gerais

A classificação e identificação de *Aspergillus* têm sido um desafio, estudos indicam que é tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos, apresentam 18 grupos, dos quais cinco subgêneros distribuídos em 16 seções, pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e família Trichocomaceae (SAMSON et al., 2014).

As espécies são divididas em seções *Candidi*, *Cervini*, *Circumdati*, *Clavatis*, *Cremeri*, *Flavi*, *Flavipedes*, *Fumigati*, *Nidulantis*, *Nigri*, *Restricti*, *Sparsi*, *Terrei*, *Usti*, *Versicolores*, e *Wentii*, sendo as seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigrii* mais estudadas (KLICH, 2002).

Quanto à morfologia, microscopicamente são anamórficos, sugerem múltiplos núcleos, com hifas hialinas especializadas, septadas, aéreas, que se ramificam, formando um micélio reprodutivo, dando origem a estruturas reprodutivas, chamados conídios.

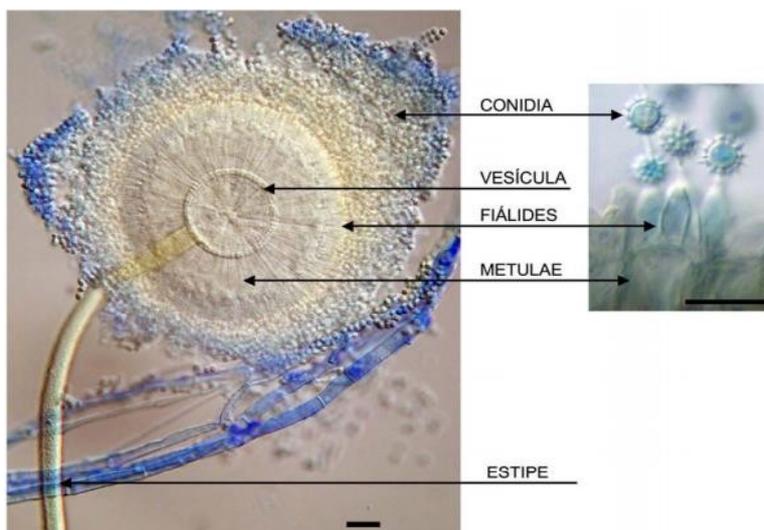
As espécies produzem um conidióforo em forma de “T” ou de “L”, que encontra-se na parte basal, essa estrutura estende-se alguns milímetros, no qual é chamado de estipe, até formar uma vesícula com células conidogênicas chamadas de filíades e métulas, quando os conídios estão ligados diretamente a filíades são denominadas unisseriadas, entretanto a presença de estruturas especializadas entre a vesícula e filíades, as métulas, sugere que são bisseriadas (KLICH, 2002; KLICH; PITT; PROCESSING, 1988).

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

Macroscopicamente a morfologia das colônias é sua principal identidade, as colônias geralmente têm cores diferentes marrom, branco ou preto, verde/amarelado e sua observação incluem taxas de crescimento, textura, grau de esporulação, produção de escleródio, cores de micélios, esporulação, pigmentos solúveis, reversões de colônias.

Além de suas propriedades microscópicas terem estruturas importantes, que incluem as características dos conidióforos, que podem variar desde o formato das cabeças dos conídios, a presença ou ausência de métulas entre vesículas e fiálides (isto é, unisseriado ou bisseriado), cor dos estipes e dimensão, forma e textura dos estipes, vesículas, métulas (quando presentes), fiálides produzem os conídios e células Hülle (quando presentes), os conídios podem ter diferentes colorações e ornamentações (SAMSON, 2009).

Figura 3 - Conidióforo de *Aspergillus* sp. bisseriado e estruturas



Fonte: FASANELLA, (2008)

Fisiologicamente seu crescimento depende de fatores ambientais, como temperatura, faixas de pH, são saprófitos, alimentando-se de matéria orgânica morta, heterotróficos, absorvem seus nutrientes através da secreção de várias enzimas, produzindo ou não metabolitos secundários, à reprodução pode ser sexuada ou assexuada, são capazes de produzir em condições naturais e também em laboratório. (SAMSON et al., 2014; KLICH, 2002).

4.2 Potencial Biotecnológico

O gênero *Aspergillus* spp. em particular, possui a capacidade de produzir diferentes enzimas, com diferentes aplicações, além de ser apreciado por sua ubiquidade (DOI et al., 2018). São conhecidos como excelentes produtores de metabolitos como ácidos orgânicos, medicamentos como antibióticos, tratamento biológico de efluentes sanitários, em refinarias de petróleo, este último degradando compostos xenobióticos, que em geral são de difícil degradação, produzindo enzimas extracelulares oxidativas, capazes de quebrar compostos policíclicos aromáticos, o gênero tem eficiência comprovada na degradação de compostos recalcitrantes, utilizado também em tratamento de efluentes da indústria farmacêutica, (TAVAKOL NOORABADI et al., 2020; SILVA; SOBRAL, 2015; SANTAELLA et al., 2009).

Aspergillus são excelentes produtores de ácidos orgânicos, como ácido cítrico glucônico, láctico e importantes enzimas como amilase, fitase e protease. como antibióticos, ácidos orgânicos, medicamentos, além da produção de enzimas, (TAVAKOL NOORABADI et al., 2020; SAMSON et al., 2014), por sua especificidade, tornam-se melhores produtores de acordo com o substrato que tiverem afinidades (MAGALHÃES et al., 2019).

Eles tem inúmeras potencialidades, tais como, degradação de amido (SOARES et al., 2010), degradação de óleo diesel (ARRUDA, 2011), como biossurfactante (CASTIGLIONI; BERTOLIN; COSTA, 2009), como decompositores da biomassa lignocelulósica, (CHAN; COHEN; DE MOURA BELL, 2018), em descontaminação ambientes aquáticos, produzidos por agrotóxicos herbicidas (MARINHO et al., 2018), na indústria de cosméticos, na indústria farmacêutica e indústria química, (NASCIMENTO et al., 2014; MACEDO; MATSUDA; BATTESTIN, 2005)

O gênero *Aspergillus* spp. são considerados como excelente produtores de enzima, superando os demais gêneros, utilizados principalmente na indústria de alimentos, (IANDOLO et al., 2011).

Segundo (SANTAELLA et al., 2009), os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* tem eficiência comprovada na produção de enzimas extracelulares oxidativas como celulasas, ligninases, lactases, na indústria farmacêuticas, indústria de azeite de oliva, indústria de castanha de caju, cervejarias, refinarias de petróleo e em água para remoção do pesticida agrícola, além de apresentar a excelente capacidade de produzir protease.

Segundo (BENASSI; ALMEIDA, 2019), *Aspergillus niger* por exemplo, produziu proteases em todas as condições experimentais, proposta por ele em seu experimento, utilizando

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

substratos agroindustriais se mostraram eficientes em diferentes condições de faixa de pH e tempo, corroborando a utilização de isolados do gênero *Aspergillus* e substratos agroindustriais para produção de enzimas como proteolíticas.

Tabela 3 - Produção de enzimas por *Aspergillus* spp.

ISOLADOS	RESÍDUO AGROINDUSTRIAL	ENZIMAS	PRODUTO / PROCESSO	FONTE
<i>Aspergillus oryzae</i>	Torta de canola	Protease	Proteases	(ARAÚJO; SOUZA; FREITAS, 2020)
<i>Aspergillus spp.</i>		Amilase	Amilase	(BENASSI; ALMEIDA, 2019)
<i>Aspergillus niger</i>	Amostras de serrapilheira	Fitase	Fitase	(DE DONATO et al., 2019)
<i>Aspergillus niger</i>	Soro de Leite e Sorvete	Proteases	Ácido Cítrico	(AMARAL et al., 2018).
<i>Aspergillus niger</i>	Cascas de laranja, uva, café e melão.	Lacase	Produção Lacase	(MELO; MELO; ALVES, 2017)
<i>Aspergillus spp.</i>	Cascas de café, tangerina e Uva.	Tanase	Tanase	(NASCIMENTO et al., 2014)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de Cacau	Celulase		(SANTOS et al., 2013)
<i>Aspergillus terreus,</i>	Sementes de Pepino		Degradação de óleos diesel	(ARRUDA, 2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Casca de farelo de arroz		Biosurfactante	(CASTIGLIONI; BERTOLIN; COSTA, 2009)
<i>Aspergillus niger</i>		Proteases	Tratamento Efluentes petróleo	(SANTAELLA et al., 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	Pera espinhosa (Nopalea cochenillifera L.)	Celulase	Celulase	(SANTOS et al., 2003)

Fonte: Autor, (2021)

5. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Com o crescimento populacional, há uma crescente demanda mundial por alimentos, e com isso toneladas de resíduos são descartados no meio ambiente, sem o devido tratamento, causando grandes perdas para a sociedade. Estima-se que cerca de 1/3 da produção mundial de alimentos são desperdiçados anualmente em todo mundo, isso equivale a quase 1,3 bilhões de toneladas (CANOSO, 2021).

Os resíduos agroindustriais vêm transformando a maneira como as indústrias lidam com seus insumos, considerando seu impacto nos processos produtivos, além da possibilidade de contribuir para um problema significativo de poluição ambiental. Esses resíduos podem transformasse em subprodutos com aplicações biotecnológicas de alto valor agregado, sobretudo contribuindo para a minimização do desperdício, valorização da cadeia produtiva e descarte indevido no meio ambiente (SHIRAHIGUE; CECCATO-ANTONINI, 2020).

No contexto mundial a indústria alimentícia representa um dos maiores domínios, destacando-se em alguns países ou região como a principal economia de fabricação e transformação, com grandes contribuições no processamento de alimentos, gerando consequentemente uma quantidade considerada de resíduos, efluentes e insumos entre outros, que se mal gerenciados, podem ser prejudiciais ao homem e ao meio ambiente (SORIO, 2018).

A falta de tratamento e destinação correta dos resíduos agroindustriais tem gerado impactos sociais e ambientais, sem precedentes, afetando direta e indiretamente a sobrevivências das espécies, com destaque para agroindústria, no qual é uma grande geradora de resíduos, sobretudo, no setor de processamento de alimentos.

Agroindústrias, produzem quantidades abundantes de resíduos orgânicos ao longo de sua cadeia de suprimentos, os seus resíduos geralmente são descartados em aterros sanitários ou dispostos no ambiente sem qualquer tratamento, acarretando sérios problemas ambientais, quando considerarmos os pequenos produtores rurais (SILVA JUNIOR et al., 2020). Há uma enorme lacuna no que concerne o controle, tratamento e disposição final dos resíduos agroindustriais, algumas soluções vêm sendo discutidas para os resíduos gerados por essas atividades, sobretudo a indústria de beneficiamento de leite, possibilitando a transformação desses resíduos em uma nova matéria-prima, agregando, sobretudo valor econômico (SOUSA, 2021).

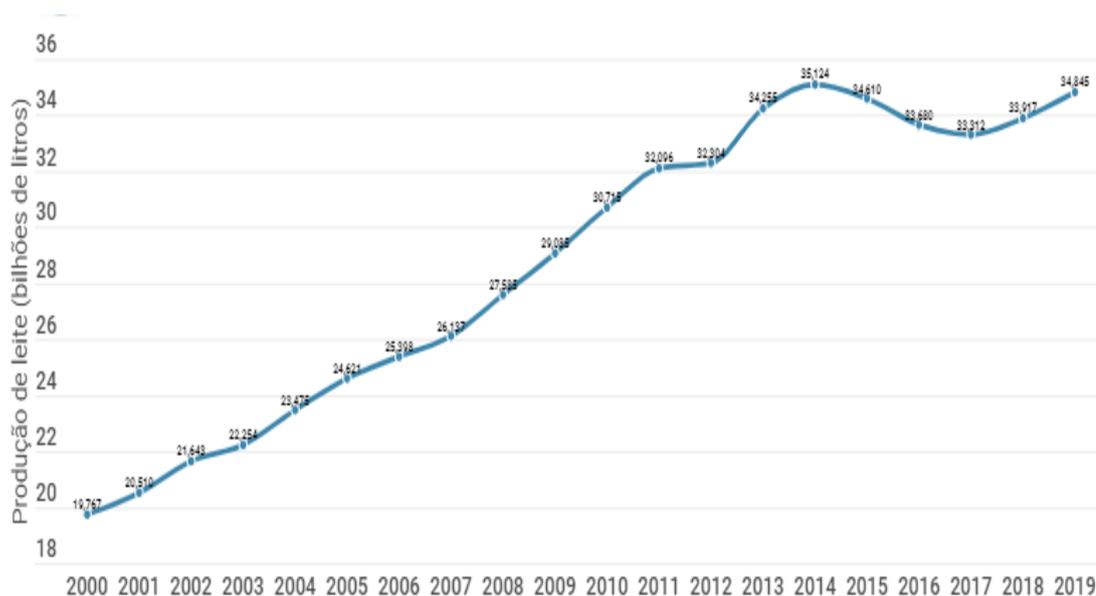
5.1. Soro de Leite

A produção global de leite atingiu quase 906 milhões de toneladas em 2020, e o Brasil ocupa o quarto lugar em produção total de leite, com produção de cerca de 33,84 bilhões de litros em 2018, e quase 1,3 milhão de produtores, distribuídos em 99% dos municípios (FAO, 2021; CARVALHO; ROCHA; CARNEIRO, 2018; EMBRAPA, 2018; SORIO, 2018; VILELA; RESENDE, 2014).

O tamanho do mercado global de produtos lácteos foi avaliado em US \$ 489,74 bilhões em 2020 com uma previsão de crescimento de USD 586,11 bilhões até 2027, enquanto no Brasil, a Balança Comercial de leite e derivados, girou neste mesmo ano, em torno de US \$ 250,00 milhões (FAO, 2021; EMBRAPA, 2020).

A revista, Gados de leite /EMBRAPA, publicou em sua edição anual 2020, as 13 maiores empresas de laticínios que somaram volume de 7,871 milhões de litros, o que corresponde a a um acréscimo de 4% da captação no mesmo período em 2018, sem considerar os pequenos produtores e produtores informais (EMBRAPA, 2020). É sabido que das 220 empresas de laticínios cadastradas na receita Federal em Pernambuco, apenas 20 (vinte) tem cadastro na Agência de defesa e fiscalização Agropecuária do Estado de Pernambuco, (ADAGRO, 2021). A região Sul do Brasil vem se destacando como maior produtor de leite, seguidos pela região Sudeste, destaque para região Nordeste, com o desempenho dos estados de Bahia, Ceará e Pernambuco, apresentou 10,13% aumento na produção, chegando 4,3 bilhões de litros de leite (EMBRAPA, 2020).

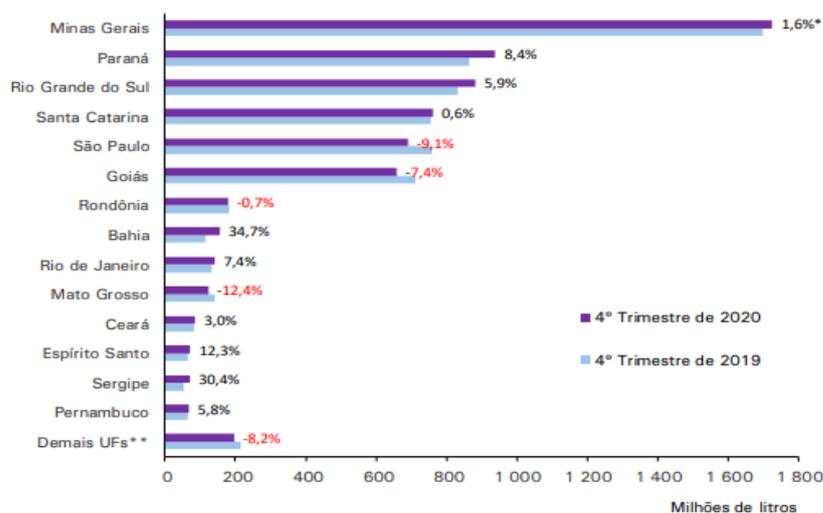
Figura 4 - Produção de Leite no Brasil em 2019



Fonte: IBGE (2019)

Na Região Nordeste destaque para o Estado de Pernambuco que aparece na 3ª posição do ranking regional com uma produção de 796 milhões de litros de leite, correspondendo a 20,4 % do volume de venda da região, em comparação ao Estado da Bahia que produziu 870 milhões de litros de leite ou 22,3% do volume total produzidono Nordeste, que chegou aos 3,89 Bilhões de litros de leite só no ano de 2017 (IBGE, 2020) como mostra o quadro 5.

Figura 5 – Comparativo produção de Leite Estados 2019/2020



Fonte: IBGE (2020)

Já produção de queijo segundo estimativas em 2020 movimenta no mundo em torno de 18 Bilhões, o universo do queijo – entre produção local e importação, o Brasil é quarto maior produtor de queijo, resultando em 1,5 milhões de toneladas produzidas de maneira formal, vale ressaltar que o consumo de queijos sem inspeção chega a cerca de 300 mil toneladas 200 mil toneladas são vendidos no mercado informal, ficando Pernambuco responsável pela produção de 1,4 mil toneladas de soro de leite, por exemplo (EMBRAPA, 2020).

O queijo é o alimento mais difundido na indústria láctea, o consumo de queijo no Brasil corresponde a 5,9 kg / hab / ano, paralelo a isso a produção de queijo, deixa uma grande quantidade de resíduo e efluente (TRINDADE et al., 2019).

O Soro do leite é um resíduo que tem origem a partir da coagulação do leite, presente na fabricação de queijos, é um resíduo gerado em abundância, responsável por uma grande demanda de resíduos agroindustriais (PESCUMA; DE VALDEZ; MOZZI, 2015).

Essa demanda por produtos lácteos, se dá devido a fatores como (terra, capital, trabalho e

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

tecnologia), além de estar inserido em um mercado em ascensão como o agronegócio, dos quais são responsáveis por gerar, derivados de alto valor nutritivo (JUNIOR et al., 2020; MOLLEA; MARMO).

A composição do soro de leite varia de acordo com as características do processo produtivo no qual o leite foi submetido durante sua produção e estocagem (OSTERTAG et al., 2021), mas de uma maneira geral a composição do soro de leite, corresponde as frações descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Composição Soro de Leite

COMPOSIÇÃO ENCONTRADA NO SORO DE LEITE (%)	
ÁGUA (H ₂ O)	93 a 94
LACTOSE	4,4 a 5
PROTEÍNAS	0,7 a 0,9
SAIS MINERAIS	0,6 a 1,0

Fonte: Adaptado OSTERTAG et al., (2021) e NUNES et al., (2018)

Quando comparados ao leite humano, podemos obter conforme tabela 5.

Tabela 5 - Comparativo principais proteínas do Leite Bovino X Leite Humano

PROTEÍNAS DE SORO (g/L)	LEITE BOVINO	LEITE HUMANO
β-lactoglobulina	3,2	Desprezível
A-lactalbumina	1,2	2,8
Soralbumina (BSA)	0,4	0,6
Imunoglobulinas	0,7	1,0
Lactoferrina	0,1	0,2
Lisozima	Desprezível	0,4

Fonte: Adaptado SGARBIERI (2004)

Bebida rica em lactose, proteínas, vitaminas, minerais e algumas frações de gordura, o soro de leite bovino é o principal subproduto da fabricação de queijos, extraído a partir de três técnicas distintas, precipitação da caseína, precipitação ácida e microfiltração, separando fisicamente as micelas de caseína da parte líquida (JUNIOR et al., 2020; SOUZA et al., 2019; PESCUA; DE VALDEZ; MOZZI, 2015).

Com elevado teor de proteínas e alto valor biológico, o soro de leite é amplamente utilizado no processamento de outros derivados, como probióticos, bebida láctea e

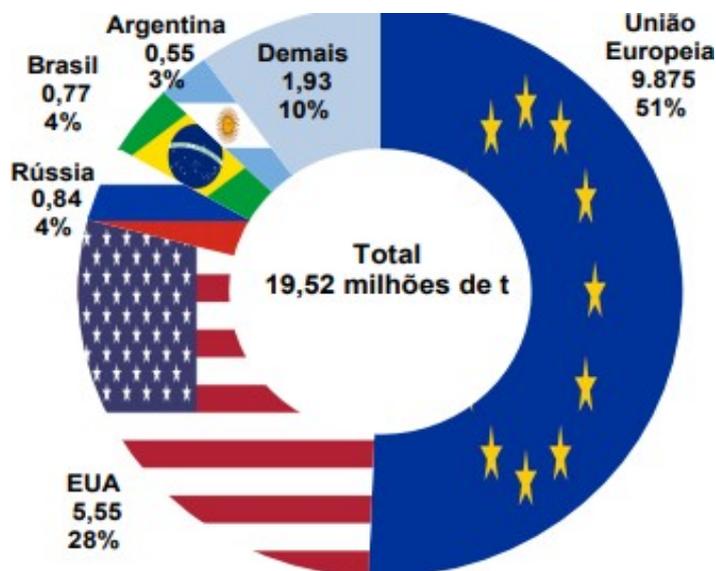
Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

iogurtes, além do consagrado uso de peptídeos bioativos, na indústria alimentícia como agente gelificante, estabilizante, emulsificante e espumante, ainda na panificação como ingrediente para pães, bolos e bebidas lácteas (JUNIOR et al., 2020; EL-TANBOLY; EL-HOFI; KHORSHID, 2017; PESCUA; DE VALDEZ; MOZZI, 2015).

Estima-se que no País 11 bilhões de litros de leite por ano são transformados em queijo, pelas indústrias de laticínios, sem considerar o mercado informal que transforma outros seis bilhões de litros/leite/ano, clandestinamente, ou seja, sem registro nos órgãos de vigilância sanitária, que é o principal responsável pelo destino correto do resíduo de soro de leite como efluente (AMARAL et al., 2020).

O volume de soro de leite descartado, na produção de queijo chega a 90% (noventa por cento), e estima-se que para cada kg (quilo) de queijo, nove litros de soro são produzidos, ou seja um volume relativamente alto de resíduos são gerados, com uma carga orgânica muito alta, (JUNIOR et al., 2020).

Figura 6 - Produção Mundial de Queijos do tipo Coalho 2018



Fonte: SORIO (2018)

A indústria de produtos lácteos exige um alto consumo de água, seus resíduos contém uma elevada carga orgânica, esses efluentes são gerados nas operações processamento de matéria prima, fabrico de derivados, limpeza, descarga, descarte, vazamentos e derramamentos, (BARBA, 2021; HUANG et al., 2014; SPALATELU, 2012).

Estima-se que 40% do soro produzido no Brasil são descartados indevidamente, por pequenas e médias empresas, contribuindo para o aumento da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio, causando danos ao ambiente, como acidificação dos solos, além de eutrofização dos corpos hídricos, consequentemente esgotamento dos sistemas tratamento de efluentes (TRINDADE et al., 2019).

Diante da proporção dos problemas gerados pelo descarte indevido do soro de leite, as indústrias e médios produtores, vem adotando alternativas “verdes”, aproveitando principalmente como ingrediente na fabricação de outros alimentos, que não necessitam de grandes investimentos, como ração animal (PESCUMA; DE VALDEZ; MOZZI, 2015), suplemento proteico (RYAN; WALSH, 2016), produção de bebidas lácteas, fertilizantes (TRINDADE et al., 2019; PAULA et al., 2011), mas vale ressaltar que existe uma excelente oportunidade até em processos biotecnológicos (BACHEGA et al., 2020).

O soro de leite é re utilizado como fonte de carbono e nitrogênio, na manutenção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse industrial, como as proteases, substituindo os meios de cultura sintéticos, (BACHEGA et al., 2020a; RYAN; WALSH, 2016).

Cerca de 60% do custo total de produção de enzimas, corresponde à escolha do meio de cultura, por essa razão a busca por substratos alternativos, aliados a produção de enzimas proteolíticas de interesse industrial, tem contribuído para redução dos custos, além de reduzir o valor final do produto ou processo (AFONSO et al., 2020).

Uma solução economicamente viável, que agrega e torna também uma ferramenta ambientalmente correta, contribuindo com a sustentabilidade da cadeia produtiva, principalmente na gestão dos recursos hídricos, além de produzir biomoléculas de interesse industrial, promovendo a gestão ambiental dos processos produtivos, principalmente na cadeia de laticínios, além de poder ser inserida a pequenos produtores rurais, (FAGUNDES; VEIGA; SOUZA, 2020; SILVA JUNIOR et al., 2020).

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

REFERÊNCIAS:

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n.1, p. 117–139, 2014.

AFONSO, L. et al. Aplicação de subprodutos agroindustriais como fontes de nitrogênio para a produção desoforolipídios por *Starmerella bombicola*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 14875–14887, 2020.

ALBUQUERQUE, J. G. M. DE et al. O Aproveitamento do Resíduo do Coco Verde para a Produção de Subprodutos em Aracajú. **RACE - Revista de Administração do Cesmac**, v. 9, p. 190–204, 2021.

ALMEIDA, D. K. C. DE. Emprego de lipases na resolução cinética de ésteres alquínílicos para produção dealquínílcabinóis quirais. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2021.

ALVES, R. R. **Sustentabilidade empresarial e mercado verde: A transformação do mundo em que vivemos**. 2019.

AMARAL, F. A. P. DA C. et al. Produção de Protease por *Aspergillus niger* (SIS 18) em Meios Contendo Resíduos Agroindustriais Utilizando Planejamento Fatorial. **Engevista**, v. 19, n. 5, p. 1320, 2018.

AMARAL, J. W. et al. Avaliação da qualidade de queijos de produção informal. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 27, p. e020016–e020016, 23 mar. 2020.

ARAÚJO, F. S. DE; SOUZA, I. H. DA S.; FREITAS, A. C. DE. Study of PH and temperature conditions for maximum protease activity of *Aspergillus oryzae* NRRL 1911. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 3077–3091, 2020.

ARRUDA, F. V. F. DE. **Degradação de óleo diesel por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune***. masterThesis. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1011>>. Acesso em: 14 jun. 2020.

BACHEGA, A. et al. Formulação de microcápsula de proteína de soro de queijo com potencial para hidrólise de lactose. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 10320–10336, 2020.

BAJAJ, B. K. et al. Optimization of fibrinolytic protease production from *Bacillus subtilis* I-2 using agro-residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 653–662, 2014.

BARBA, F. J. An Integrated Approach for the Valorization of Cheese Whey. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 564, 2021.

BELI, C. M.; MAGESTE, J. M.; TAKETANI, N. F. Bioprospecção de enzimas para cosmética: seu impacto na biotecnologia. **Revista Ensaios Pioneiros**, v. 3, n. 2, p. 10–24, 2019.

BENASSI, V. M.; ALMEIDA, A. Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e termofílicos de distintos materiais coletados no estado de Minas Gerais e análise de potenciais produtores de amilases. **Unimontes Científica**, v. 20, n. 1, p. 150–169, 2019.

BIBI, M. et al. Review on Cellular, Molecular and Industrial level Role of Microbial Enzymes. p. 6, 2021.

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

BIEGER, A.; LIMA, J. F. DE. Empresa e desenvolvimento sustentável: um estudo de caso da Sooro. **Revista da FAE**, v. 11, n. 2, 2008.

CANOSO, R. M. O Combate à fome e o desperdício de alimentos na região Nordeste |. **ÂNDÉ: Ciências e Humanidades**, v. 5, n. 1, p. 14, 2021.

CARVALHO, R. V. DE et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo Temofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 380–386, 2008.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de biosurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 292–295, 2009.

CHAN, L. G.; COHEN, J. L.; DE MOURA BELL, J. M. L. N. Conversion of Agricultural Streams and Food- Processing By-Products to Value-Added Compounds Using Filamentous Fungi. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 503–523, 2018.

DE DONATO, A. et al. Phytase producing mycobiota isolated from soil and litter of Cerrado Biome. **Ciencia Florestal**, v. 29, n. 3, p. 1270–1281, set. 2019.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 41, 2008.

DIAS, M. F. et al. Pré-Tratamento Enzimático De Efluente De Indústria De Laticínios Utilizando Lipases Microbianas. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 51–65, 2021.

DOI, S. A. et al. Density and diversity of filamentous fungi in the water and sediment of Araçá bay in São Sebastião, São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 18, n. 1, 2018.

EL-TANBOLY, E.; EL-HOFI, M.; KHORSHID, M. Recovery of cheese whey, a by-product from the dairy industry for use as an animal feed. **J. Nutr. Health Food Eng**, v. 6, n. 5, p. 148–154, 2017.

EMBRAPA. ANUÁRIO leite 2020: Leite de vacas felizes. **Edição Digital em embrapa.br/gado-de-leite**, 2020.

FAO. Dairy Market Review - Overview of Global Dairy Market Developments in 2020, p. 1-13, 2021. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em <<http://www.fao.org/3/cb4230en/cb4230en>>

FAGUNDES, C. M. C.; VEIGA, L. B. E.; SOUZA, S. L. Q. DE. Produção mais limpa em uma indústria de laticínios: boas práticas de gestão ambiental. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1, n. 2, p. 45–63, 2020.

FENG, N. et al. A novel catalytic material for hydrolyzing cow's milk allergenic proteins: Papain-Cu₃(PO₄)₂·3H₂O-magnetic nanoflowers. **Food Chemistry**, v. 311, p. 125911, maio 2020.

FRIAS, A. R. R. DE; SANTOS, E. DE O. Tecnologias comerciais para biorremediação de corpos hídricos. **Episteme Transversalis**, v. 11, n. 3, 2020.

GEBAUER, M.; SKERRA, A. Engineered Protein Scaffolds as Next-Generation Therapeutics.

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v. 60, n. 1, p. 391–415, 2020.

GNANADOSS, J. J.; S. KANCHANA D. Optimization of nutritional and culture conditions for improved protease production by *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, n. vol. 10, p. 518–523, 2021.

GUEDES, E. H. S. et al. Resíduos agroindustriais como substrato para a produção de lipases microbiana: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e30710212537–e30710212537, 2021.

GUPTA, S. et al. Application of Enzymes in Bioremediation of Contaminated Hydrosphere and Soil Environment. In: THATOI, H.; MOHAPATRA, S.; DAS, S. K. (Eds.). **Bioprospecting of Enzymes in Industry, Healthcare and Sustainable Environment**. Singapore: Springer, p. 1–28, 2021.

HUANG, J. et al. Water availability footprint of milk and milk products from large-scale dairy production systems in Northeast China. **Journal of Cleaner Production**, v. 79, p. 91–97, 2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Indicadores IBGE, **Estatística da Produção Pecuária**, 2020.

IANDOLO, D. et al. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *trametes versicolor* on tomato pomace. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 40–51, 2011.

JUNIOR, A. F. DA S. et al. Development of a thermogenic drink from whey/. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 5676–5696, 2020.

JUSTINA, M. D.; JUSTINA, M. B. D.; SKORONSKI, E. O uso das enzimas na indústria de laticínios: uma breve revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 3, p. 172–184, 2018.

KLICH, M. A. **Identification of common Aspergillus species** Center United States Agricultural Research Service Southern Regional Research Utrecht, Netherlands: Central bureau voor Schimmelcultures, 2002. Disponível em: <<https://trove.nla.gov.au/version/28745766>>. Acesso em: 24 maio. 2020.

KLICH, M. A.; PITT, J. I.; PROCESSING, C. D. OF F. **A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs** North Ryde, N.S.W.: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 988. Disponível em: <<https://trove.nla.gov.au/version/45477844>>. Acesso em: 24 maio. 2020

LERMEN, A. M. et al. The use of agro-industrial waste for adsorption of the blue dye of methylene: a brief review. **Brazilian Applied Science Review**, v. 5, n. 1, p. 273–288, 2021.

LIMA, F. R.; rocha, I. De o. F. Aproveitamento do soro de leite proveniente da produção do queijo do serro para fabricação de doce de leite: viabilidade econômica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n.2, p. 83–93, 2016.

LUKIN, A. Application and comparison of proteolytic enzyme preparations in technology of protein hydrolyzates. **Food Science and Technology**, n. AHEAD, 2019.

- Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...
- MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Screening of tanase producing fungi present in rich tanninvegetable residues. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 4, p. 833–838, 2005.
- MAGALHÃES, N. et al. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 24, n. 1, p. 101–107, 2019.
- MARINHO, S. G. M. et al. Biodegradação de paraquat e produção de celulase em reatores inoculados com fungose resíduo lignocelulósico. **Biodegradação de paraquat e produção de celulase em reatores inoculados com fungos e resíduo lignocelulósico**, n. 211, 2018.
- MARKETSANDMARKETS. Enzymes in Industrial Applications Mercado de Enzimas Industriais por tipo, Global Markets for fonte, aplicação, região - Previsão global para 2026. **Mercado de Enzimas Industriais por tipo, fonte, aplicação, região - Previsão global para 2026**, n. FB2277, p. 42–46, 2020.
- MASSUGA, F. et al. Sustentabilidade versus capitalismo ou capitalismo sustentável? Uma revisão sistemática da tendência secular. **Revista Metropolitana de Sustentabilidade (ISSN 2318-3233)**, v. 9, n. 3, p. 194, 2020.
- MATKAWALA, F. et al. A novel thiol-dependent serine protease from *Neocosmospora* sp. N1. **Heliyon**, v. 5, n.8, p. e02246, 2019.
- MELO, T. L.; MELO, V. A.; ALVES, C. A. Produção de lacase utilizando planejamento fatorial em meios contendo resíduos agroindustriais. **Engevista**, v. 19, n. 3, p. 759–773, 2017.
- MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry. In: **Food industry**. [s.l.] IntechOpen, 2013.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. DO N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.
- MORETO, B. et al. Eficiência proteica de hidrolisados de subprodutos da indústria de carnes e pescados no desenvolvimento de ratos wistar. **Revista Cultivando o Saber**, v. 14, n. 1, p. 23–33, 2021.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica**. 2. ed. [s.l.] Medbook, 2011.
- MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 308–316, 2014.
- NASCIMENTO, K. B. DE M. et al. Utilização de Resíduos Agroindustriais para Produção de Tanase por *Aspergillus* sp. Isolado do Solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil. **e-xacta**, v. 7, n. 1, p. 95–103, 2014.
- NAVEED, M. et al. Protease - A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 2, p. 307–323, 2021.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger - **Artmed Editora**, 7.ed. [s.l.], 2018. NUNES, L. A. et al. O soro do leite, seus principais tratamentos e meios de valorização. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 301–326, 2018.
- OLIVEIRA, J. A. DOS S. DE et al. Síntese biológica de nanopartículas mediada por micro-

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

organismos endofíticos. **Revista Saber Científico**, v. 8, n. 1, p. 146–155, 2019.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas De Interesse Industrial: Produção Por Fungos e Aplicações. **SaBios-Revistade Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

OSTERTAG, F. et al. Development and validation of an RP-HPLC DAD method for the simultaneous quantification of minor and major whey proteins. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128176, 2021.

PAULA, L. DE et al. Crescimento e nutrição mineral de milho forrageiro em cultivo hidropônico com soro de leite bovino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 9, p. 931–939, 2011.

PEIXOTO, F. B. S. et al. Microrganismos isolados de ambientes aquáticos da Amazônia produtores de hidrolases de interesse industrial e biotecnológico. **Revista geintec-gestao inovacao e tecnologias**, v. 11, n. 1, p. 5795–5808, 2021.

PESCUMA, M.; DE VALDEZ, G. F.; MOZZI, F. Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 15, p. 6183–6196, 2015.

PIMENTA, L. et al. Eco-friendly process to select Lignocellulosic substrate for the production of acid peptidases. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 3469–3479, 2021.

PRADO, F. B. et al. 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.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RAVEENDRAN, S. et al. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16–30, 2018.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_1, p. D227–D233, 2010.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D343–D350, 2016.

RAY, A. Protease Enzyme- Potential Industrial Scope. **International Journal of Technology**, v. 2, n. 1, p. 01–05, 2012.

RAZZAQ, A. et al. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 2019.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. [s.l.] Editora Blucher, 2017.

RYAN, M. P.; WALSH, G. The biotechnological potential of whey. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, n. 3, p. 479–498, 2016.

- Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...
- SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.
- SANTAELLA, S. T. et al. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 1, p. 139–148, 2009a.
- SANTAELLA, S. T. et al. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 14, n. 1, p. 139–148, mar. 2009b.
- SANTOS, T. C. et al. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*), **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 65-71, 2013.
- SANTOS, T. C. D. et al. Produção e caracterização de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp. Durante a fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 222–233, 2003.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397–409, 2004.
- SHIRAHIGUE, L. D.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Resíduos agroindustriais como fontes de compostos bioativos para as indústrias de alimentos e de fermentação. **Ciência Rural**, v. 50, n. 4, 2020.
- SILVA, A. M. R. DA; SOBRAL, M. F. F. Um Estudo sobre a Indústria de Transformação de Leite no Município de Serra Talhada – Pernambuco. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 115–133, 2015.
- SILVA, T. G. DA; BARBOSA, F. C. R. Inibição enzimática: uma proposta de atividade experimental. **Experiências em Ensino de Ciências**, v. 14, n. 2, p. 523–530, 2019.
- SILVA JUNIOR, A. F. et al. Development of a thermogenic drink from whey. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 5676–5696, 2020.
- SILVA, M. et al. Efeito Das Cinzas Do Bagaço De Cana-De-Açúcar E Bambu Sobre Qualidade De Fibrocimentos Extrudados. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 18, n. 1, 2021.
- SINGH, R. et al. Microbial Proteases in Commercial Applications. **J Pharm Chem Biol Sci**, v. 4, n. 3, p. 365–74, 2016.
- SOARES, B. C. V.; VENDRAMEL, S. M. R.; SOUZA, S. L. Q. DE. Soro de leite: uma visão ambiental. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 2, n. 4, p. 31–40, 2021.
- SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 700–705, 2010.
- SORIO, A. Cadeia Agroindustrial do Leite no Brasil. **EMBRAPA**. p. 167, 2018.
- SOUSA, N. A. D. S. E. Gestão dos resíduos sólidos em uma granja leiteira de pequeno porte no município de Uberlândia - MG. 14 jan. 2021.
- SOUZA, C. et al. Reciclagem animal como alternativa sustentável à agroindústria: uma

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

revisão da literatura. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1, n. 11, p. 39–53, 2021.

SOUZA, J. B. et al. Atividade enzimática de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 05–22, 2019.

SOUZA, T. et al. Mapeamento Tecnológico Da Aplicação De Proteases Em Detergentes E Composições De Limpeza. **Cadernos de Prospecção**, v. 10, p. 226, 2017.

SPALATELU, C. Biotechnological valorisation of whey. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p.1, 2012.

STAEEL, S. et al. Plant proteases and programmed cell death. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 7, p.1991–1995, 2019.

TAVAKOL NOORABADI, M. et al. Isolation, Molecular Identification, and Mycotoxin Production of *Aspergillus* Species Isolated from the Rhizosphere of Sugarcane in the South of Iran. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 122, 2020.

TRINDADE, M. B. et al. Cheese whey exploitation in Brazil: a questionnaire survey. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 788–791, 2019.

VILELA, D.; RESENDE, J. C. Cenário Para A Produção De Leite No Brasil Na Próxima Década. **Cenário para a produção de leite no Brasil na próxima década**, p. 18, 2014.

WAJEEHA, A. W. et al. Production, Purification, and Characterization of Alkaline Protease from *Aspergillus flavus* and its Compatibility with Commercial Detergents. **BioResources**, v. 16, n. 1, p. 291–301, 2021.

WANDERLEY, M. D. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista CINTINO**, v. 1, n. 1, p. 44–50, 2011.

WHERRY, B.; BARBANO, D. M.; DRAKE, M. A. Use of acid whey protein concentrate as an ingredient in nonfat cup set-style yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 10, p. 8768–8784, 2019.

ZHAVORONKOV, A. et al. **Potential COVID-2019 3C-like Protease Inhibitors Designed Using Generative Deep Learning Approaches**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://chemrxiv.org/articles/Potential_2019-nCoV_3Cike_Protease_Inhibitors_Designed_Using_Generative_Deep_Learning_Approaches/11829102/2>. Acesso em: 17 maio. 2021.

ZIMMER, K. R. et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123–137, 2009.

CAPÍTULO II



SORO DE LEITE COMO SUBSTRATO SUSTENTÁVEL PARA PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *Aspergillus* sp. UCP 1290

Jaqueline dos Santos MARINHO^{1,2}, Galba Maria de Campos TAKAKI^{1,2},
Luciana de Oliveira FRANCO^{2,3}, Marcos Antonio Barbosa de LIMA^{1,2,3*},
Carlos Alberto Alves da SILVA^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50500-900, Recife-PE, Brasil.

²Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50500-900, Recife-PE, Brasil.

³Laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife-PE, Brasil.

* Autor correspondente: marcos.barbosalima@ufrpe.br

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de protease em fermentação submersa por *Aspergillus* spp. utilizando soro de leite como único substrato. Inicialmente foi realizada uma triagem com seis isolados de *Aspergillus* spp. para produção de protease em meio convencional contendo gelatina e alternativo a base de soro de leite. Por meio de um planejamento fatorial 2³ os efeitos principais e as interações das variáveis concentração de soro de leite, temperatura e pH na produção de protease foram avaliados. *Aspergillus* sp. UCP 1290 foi selecionado por apresentar elevada atividade proteolítica de 28,75 U/mL no meio convencional e 37,33 U/mL no meio contendo soro de leite. A maior produção de protease, 129,80 U/mL, por *Aspergillus* sp. UCP 1290 foi obtida com soro de leite na concentração de 20 %, pH 8,0 e temperatura de 32 °C, em fermentação submersa, a 150 rpm por 96 h. A temperatura e a concentração de soro de leite foram as variáveis independentes mais significativas para a produção da enzima. A atividade proteolítica foi melhorada pela interação entre baixa concentração de soro de leite e maior temperatura. A enzima produzida exibiu máxima atividade catalítica em 60 °C e pH 7,0, sendo caracterizada como uma protease neutra. Os resultados mostraram que *Aspergillus* sp. UCP 1290 foi um bom produtor de protease usando soro de leite como único substrato e a enzima produzida tem potencial de utilização em processos industriais

Palavras-chave: Enzimas proteolíticas, Agrosustrato, Bioconversão.

1. INTRODUÇÃO

As proteases são um importante grupo de enzimas multifuncionais de amplo uso pela indústria e representam quase 60 % do total das enzimas comercializadas no mundo. Estima-se que o mercado mundial de proteases alcance 3 bilhões de dólares a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6,1 % até 2024 [14,19]. As proteases microbianas são preferidas nas aplicações industriais em função de vantagens técnicas e econômicas. Neste cenário, as proteases fúngicas apresentam alta demanda industrial devido a boa relação custo-benefício, uma vez que a separação do micélio é mais fácil quando comparada as células bacterianas, apresentam estabilidade, ampla diversidade e especificidade de substrato. Além disso, os fungos são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) [14, 3, 24]. Entre os fungos, o gênero *Aspergillus* é amplamente utilizado em processos biotecnológicos e vêm demonstrando ser excelentes produtores de diferentes enzimas, inclusive proteases [12, 14]. No entanto, um dos principais desafios da produção industrial de enzimas é a redução do custo de produção que passa pela substituição dos meios sintéticos utilizados, os quais correspondem por cerca de 40 % do custo total [11].

Por outro lado, o soro é um subproduto da fabricação de queijo altamente poluente devido a sua alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO). Todavia, o soro é rico em proteínas, açúcares fermentáveis e nutrientes e pode ser reaproveitado em coprocessamentos [21, 16]. No Brasil, 13 % das indústrias de laticínios usam parcialmente o soro produzido para fabricação de outros produtos lácteos e 27 % descartam todo o soro produzido no sistema de tratamento de efluentes ou doam para ração animal [27]. Uma alternativa que tem sido utilizada para valorização do soro de leite é a sua bioconversão, por fungos e bactérias, em produtos de valor agregado, como biocombustíveis e bioplásticos, representando uma vantagem econômica e ambiental [21, 16].

Portanto, a demanda global por proteases impõe a pesquisa por novas espécies e cepas de microrganismos com alta capacidade de produção de protease, como também a busca por novos substratos sustentáveis e de baixo custo [18, 24]. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases por amostras de *Aspergillus* spp. em meio alternativo a base de soro de leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foram utilizados 06 (seis) isolados de *Aspergillus* spp. (UCP 0076, UCP 1064, UCP 1132, UCP 1177, UCP 1290, UCP 1461), catalogados no Banco de Culturas UCP, do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, registrado no World Federation for Culture Collection -WFCC. As culturas foram mantidas em meio ágar Sabouraud a 4 °C.

2.2 Resíduo agroalimentar

O soro de leite utilizado neste trabalho foi doado gentilmente por um pequeno produtor rural de queijo, do município de Cachoeirinha, Estado de Pernambuco.

2.3 Preparação do inóculo

As cepas de *Aspergillus* spp. foram cultivadas em meio ágar Sabouraud a 28 °C durante 72 h. Logo após, 20 discos de micélio de 10 mm foram coletados e usados como inóculo nos experimentos de seleção e planejamento fatorial.

2.4 Seleção dos fungos produtores de protease

A seleção foi realizada em meio convencional e alternativo em fermentação submersa. Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL do meio padrão contendo gelatina 1% segundo Manachini et al. (1987) [9] e alternativo preparado com soro de leite a 25 % e base salina (KH₂PO₄ 0,23 %, K₂HPO₄ 0,25 %, MGSO₄ 0,1 %, FESO₄ 0,1 %, pH 6,0) foram inoculados com 20 discos de micélio das cepas de *Aspergillus* spp. e incubados a 28 °C, 150 rpm por 96 h em triplicata. O sobrenadante das culturas foi

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

centrifugado a 10 000 rpm por 5 min a 4 °C, e o líquido metabólico livre de células foi utilizado para a determinação da atividade proteolítica.

2.5 Determinação da Atividade Proteolítica

A atividade da protease foi determinada conforme Leighton et al. (1973) [8], modificado. A reação foi iniciada pela mistura de 150 µL de extrato enzimático bruto e 250 µL de azocazeína a 1 % (p/v), dissolvida em tampão Tris-HCl (0,2 M; pH 7,2) e incubadas em banho maria a 40 °C por 30 min. A reação foi paralisada pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético 10 % (TCA), seguida de centrifugação a 15 000 rpm por 5 min a 4 °C. Posteriormente, 800 µL da reação foi adicionada de 1,4 mL NaOH 1 M. A intensidade da coloração produzida foi medida em espectrofotômetro a 420 nm. Para cada amostra foi preparado um branco adicionando-se o TCA 10% imediatamente à reação. O experimento foi realizado em triplicata. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade da enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,01 unidade em 1 hora, expressa em (U/mL).

2.6 Planejamento experimental

Um planejamento fatorial completo 2³ com 4 pontos centrais foi realizado para analisar os efeitos principais e as interações das variáveis independentes, pH, temperatura e concentração de soro de leite sobre a variável resposta, atividade proteolítica, em fermentação submersa, agitação de 150 rpm, durante 96 h. As variáveis independentes foram avaliadas em três níveis, mínimo (-1), central (0) e máximo (+1) conforme tabela 1.

Tabela 1 Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2³ para produção de protease por *Aspergillus* sp. UCP 1290 em meio com soro de leite.

Variáveis	Níveis			
	—	-1	0	+1
Soro de Leite (% v/v)		20	60	100
Temperatura (°C)		24	28	32
pH		4	6	8

2.7 Determinação do efeito do pH e temperatura na atividade proteolítica

A avaliação do pH e temperatura ideal para atividade catalítica da enzima foi realizada utilizando o extrato bruto, conforme Gimenez et al. (2018) [4], com modificações nas faixas de pH e temperatura. A reação enzimática foi realizada em diferentes valores de pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0) e temperaturas (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C). Diferentes tampões foram usados para manter o pH em diferentes valores: citrato-fosfato (pH 5,0), fosfato de sódio (pH 6,0), Tris-HCl (pH 7,0 e 8,0) e carbonato-bicarbonato (9,0 e 10,0). A determinação da atividade proteolítica foi realizada conforme o item 2.5.

2.8 Análise Estatística

O software Statistica® 12.0 da Statsoft, Inc. (Tulsa, Oklahoma, EUA) foi utilizado para análise dos resultados dos ensaios experimentais, bem como para analisar as interações e múltiplos efeitos, os quais foram considerados estatisticamente significativos para p < 0,05. A estimativa do erro experimental foi calculada com base nas quatro repetições do ponto central de cada planejamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de isolados de *Aspergillus* spp. produtores de proteases

A pesquisa por novos microrganismos e substratos de baixo custo eficientes na produção de enzimas é um processo contínuo [18, 24]. A triagem de 6 cepas de *Aspergillus* spp. para produção de protease

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

foi realizada em fermentação submersa usando meio convencional contendo gelatina como substrato indutor e meio alternativo a base de soro de leite (Tabela 2). Todos as cepas de *Aspergillus* spp. apresentaram atividade proteolítica em ambos os meios. No entanto, a atividade enzimática foi superior no meio alternativo a base de soro de leite. *Aspergillus* sp. UCP 1290 foi selecionado uma vez que apresentou maior atividade proteolítica de 37,33 U/mL no meio alternativo, contendo 25% de soro de leite. Radha et al. (2011) [17], observaram valores de 3,648 µ/ml para atividade proteolítica de *Aspergillus* spp. em meio contendo soro de leite e melaço e sugerem o uso de soro de leite como fonte de nitrogênio para produção de protease. Por sua vez, Gul et al. (2012) [5], demonstraram excelente produção de protease, sendo 659,20 (U/ml) duplicado a sua produção por *Rhizopus oryzae* em meio contendo soro de leite como único substrato, alcançando o número de .

Adicionalmente, pode-se observar que a produção de biomassa por todos as cepas de *Aspergillus* spp. foi maior no meio alternativo com soro de leite. Vamvakak et al. (2010) [28], observou marcante produção de biomassa de 301 mg / L, por espécies de zigomicetos durante crescimento em soro de leite suplementado apenas com sais. Por outro lado, Ibarruri e Hernández (2019) [6], também relataram a produção de biomassa por *Rhizopus* sp. em fermentação submersa usando soro de leite com baixo teor proteico indicando a necessidade de suplementação com fontes de nitrogênio e carbono.

O soro de leite O soro de leite pode ser considerada excelente fonte de carbono para crescimento do microorganismo *Aspergillus*, uma vez que possui elevado valor nutricional principalmente de lactose (4,5-5 % p/v), proteínas solúveis 0,6-0,8 % p/v), lipídios (0,4-0,5 % p/v) e sais minerais (8-10 % p/v do extrato seco), podendo suportar o crescimento e induzir boa atividade proteolítica [25]. Logo, é crucial a seleção de microrganismos capazes de fermentar o soro de leite, haja vista que nem todos tem a habilidade de utilizar a lactose como fonte de carbono para produção de enzimas em níveis utilizáveis [21, 16].

De acordo com os resultados da tabela 2 ocorreu relação da produção da enzima com o crescimento do isolado UCP 1290, tanto em meio alternativo como no meio convencional.

Tabela 2 Atividade proteolítica e produção de biomassa por *Aspergillus* spp. UCP 0076, 1064, 1132, 1177, 1290, 1461 em meio convencional e alternativo

Isolados	Meio alternativo		Meio convencional	
	AP (U/mL)	Biomassa (g/L)	AP (U/mL)	Biomassa (g/L)
UCP 0076	35,49 ±0,03	3,40 ±0,10	9,42 ±0,03	0,50 ±0,06
UCP 1064	7,48 ±0,00	1,62 ±0,07	3,96 ±0,01	0,52 ±0,02
UCP 1132	19,43 ±0,02	1,17 ±0,04	4,84 ±0,07	0,50 ±0,02
UCP 1177	14,19 ±0,01	0,88 ±0,05	13,75 ±0,10	0,52 ±0,05
UCP 1290	37,33 ±0,06	0,88 ±0,38	28,75 ±0,01	0,77 ±0,03
UCP 1461	10,78 ±0,03	1,52 ±0,04	6,67 ±0,01	0,44 ±0,04

AP - Atividade Proteolítica.

3.2 Produção de protease pelo isolado selecionado utilizando planejamento fatorial

Composição do meio de crescimento e fatores ambientais como temperatura, pH, tamanho do inóculo e tempo de incubação são fundamentais para indução e otimização da produção de proteases por microrganismos [3, 22, 24]. Foram investigados usando um planejamento fatorial 2³, conforme apresentados na Tabela 3, os efeitos combinados do pH, temperatura e concentração do soro de leite na produção de protease por *Aspergillus* sp. UCP 1290,. A melhor condição para atividade proteolítica foi verificada no ensaio 4 com pH 8,0, temperatura de 32 °C e concentração de soro de leite de 20%, a qual maximizou a atividade proteolítica de 37,33 U/mL para 129,80 U/mL, representando uma elevação na produção de 71,24%. Nascimento et al. (2015) [13], utilizando um planejamento fatorial 2³, obteve máxima produção de protease de 48,33 U/mL com *Mucor subullissimus* UCP 1262 usando farelo de trigo como substrato. Muito embora a condição ambiental ótima para produção enzimática dependa do microrganismo e do local de isolamento. O pH ótimo para produção de protease pela maioria dos fungos varia entre 7 e 7,5, já a temperatura ótima para produção de protease por fungos, varia de 28 °C a 30 °C [22]. Sudarkodi et al. (2015) [26], relataram máxima produção de protease para

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco... *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* em pH 8 com (30 U/ml) e pH 7 com (26 U/ml) e temperatura 30 e 35 °C, respectivamente. Logo, *Aspergillus* sp. UCP 1290 utilizada neste trabalho apresentou atividade proteolítica máxima em parâmetros ambientais semelhantes ao relatado na literatura.

A relação carbono e nitrogênio é essencial para o crescimento microbiano e produção enzimática máxima, destacando que o requerimento específico das fontes de carbono e nitrogênio difere entre as espécies microbianas e entre diferentes cepas da mesma espécie [22]. Neste sentido, o aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de proteases por espécies de *Aspergillus* tem sido usada como uma alternativa promissora às fontes de carbono e nitrogênio convencionais, [7, 18, 22]. Neste estudo demonstramos que *Aspergillus* sp. UCP 1290 produzida elevada atividade proteolítica de 129,8 U/mL em meio de cultura contendo soro de leite como única fonte de carbono e nitrogênio.

Portanto, pode-se inferir que esta cepa usou a lactose e as proteínas do soro de leite como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, para sustentar seu crescimento e produção de protease, sendo promissora no uso em bioprocessos de conversão do soro do leite em proteases pela indústria.

Tabela 3 Produção de protease por *Aspergillus* sp. UCP 1290 usando um planejamento fatorial 2³ durante 96 h a 150 rpm em meio de cultura, formulado com soro de leite

Ensaio	pH Inicial	Temperatura (°C)	Substrato (%)	Ativ. Proteolítica (U/mL)
1	4,0	24	20	47,15
2	8,0	24	20	20,09
3	4,0	32	20	106,33
4	8,0	32	20	129,80
5	4,0	24	100	35,93
6	8,0	24	100	30,95
7	4,0	32	100	26,18
8	8,0	32	100	23,03
9	6,0	28	60	28,16
10	6,0	28	60	23,98
11	6,0	28	60	22,81
12	6,0	28	60	20,97

A análise estatística mostrou que todas as variáveis e a interação entre elas foram significativas, quando analisadas no nível de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$) (Figura 1). No entanto, a concentração de soro de leite foi a variável mais significativa, mostrando a influência negativa na atividade proteolítica, indicando que a redução da concentração de soro de leite pode resultar em maior atividade da protease. Esses resultados estão de acordo com Arumugam et al. (2020) [2], que afirmam o aumento da produção de protease alcalina por *Aspergillus tamaris* em baixas concentrações de farelo de algodão, farelo de trigo, leite desnatado e farinha de soja. Soro de leite Ryan e Walsh, (2016) [21] e outros agrosustratos Kieliszek et al. (2020) [7], Marzo et al. (2019) [10], Ravindran et al. (2018) [18], podem ser usados para produção de biomassa e enzimas por microrganismos. Além disso, a temperatura apresentou efeito positivo na produção da protease. Temperatura é um fator crítico a ser controlado em bioprocessos e o seu valor ótimo para crescimento e produção enzimática varia de espécie para espécie [23, 22]. Por sua vez, a interação entre as variáveis independentes temperatura, no nível máximo, e a concentração do substrato, no nível mínimo, foi antagonista, influenciando negativamente na produção de protease. O pH também apresentou significância estatística, muito embora, nos níveis avaliados, tenha apresentado menor efeito na variável resposta produção de protease. Portanto, nas condições estudadas, o soro de leite é um resíduo que pode ser utilizado como substrato eficiente e promissor para a produção de protease em fermentação submersa.

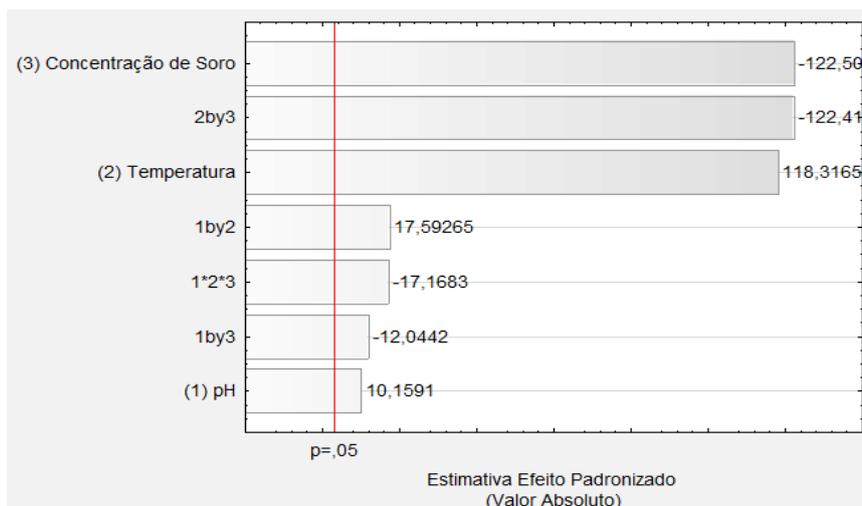


Figura 1 Diagrama de Pareto do efeito das variáveis independentes na atividade proteolítica (U/mL) do isolado *Aspergillus* sp. UCP 1290 em fermentação submersa, usando soro de leite como substrato, durante 96 h.

3.3 Efeito do pH e temperatura na atividade da protease

Para avaliação do pH ótimo da protease de *Aspergillus* sp. UCP 1290, a atividade proteolítica foi determinada em diferentes tampões e valores de pH nas faixas de 5 a 10 (Figura 2). Proteases neutras são definidas como ativas em pH neutro, levemente alcalino ou ácido [19]. Neste estudo a atividade proteolítica máxima foi observada nos pH 7,0 e 8,0, com valores de 97,97 e 93,92 U/mL, respectivamente, sugerindo a presença de uma protease neutra. Da mesma forma, Wajeeha et al. (2021) [29], relataram maior atividade da protease de *Aspergillus flavus* na faixa de pH de 7,0 a 8,0. Ao et al. (2018) [1] relataram a obtenção de uma protease neutra produzida por *Aspergillus oryzae* Y1. Proteases neutras são muito valiosas na indústria de alimentos, pois geram menor amargor na hidrólise de proteínas. Adicionalmente, proteases neutras e alcalinas de fungos são importantes no processamento de molhos de soja e outros produtos de soja [19, 24].

Por outro lado, o efeito da temperatura na atividade da protease de *Aspergillus* sp. UCP 1290 é apresentado na Figura 3. A atividade proteolítica foi maior a 60 °C, com valor de 119,58 U/ml, enquanto nas temperaturas superiores a 60 °C ocorreu uma redução considerável da atividade. Proteases alcalinas de fungos exibem atividade ótima em temperaturas na faixa de 50-70 °C Sharma et al. (2019) [23] e Osman et al. (2014) [15] relataram que a temperatura ótima para protease produzida por *Aspergillus terreus* foi 55 °C. Por outro lado, Rukmi e Purwantisari (2020) [20], observaram maior atividade da protease de uma cepa de *Aspergillus flavus* nas temperaturas de 40 °C e 45 °C. Alta atividade catalítica e estabilidade térmica são características altamente requeridas para uso de proteases em escala industrial [14, 23]. A temperatura foi a variável que mais influenciou na atividade proteolítica, provocando um efeito positivo para a atividade.

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

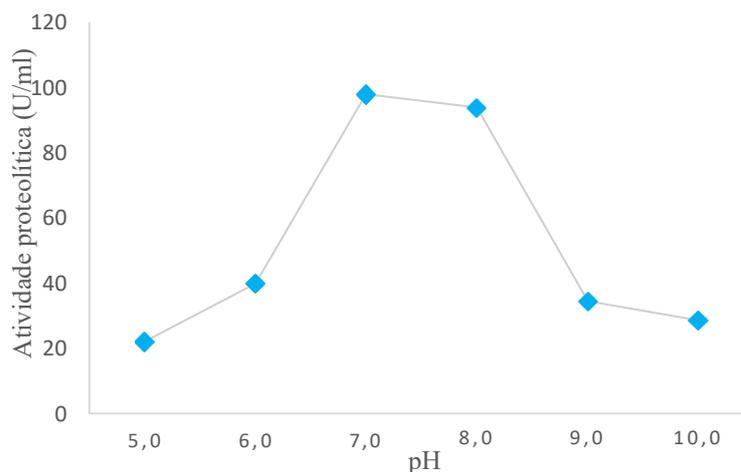


Figura 2. Efeito do pH na atividade da protease produzida por *Aspergillus* sp. UCP 1290 em fermentação submersa utilizando soro de leite como substrato durante 96 h.

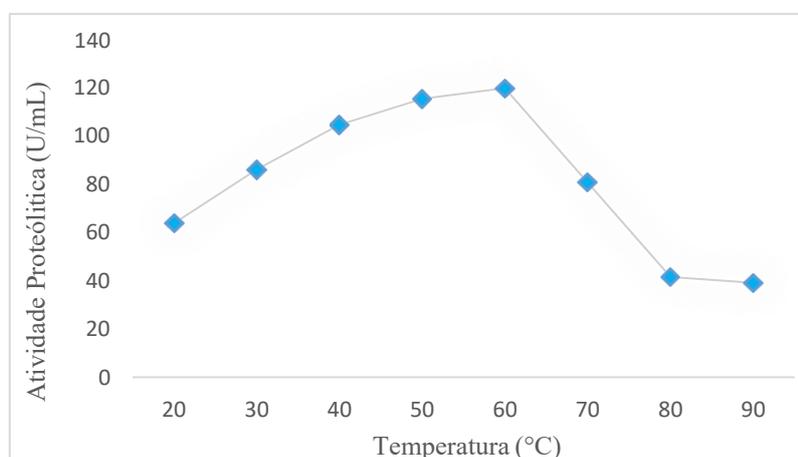


Figura 3. Efeito da temperatura na atividade da protease produzida por *Aspergillus* sp. UCP 1290 em fermentação submersa utilizando soro de leite como substrato durante 96 h.

Assim, os resultados demonstraram que a protease produzida por *Aspergillus* sp. UCP 1290 tem boa atividade proteolítica em temperatura relativamente alta sendo promissora para exploração em várias indústrias.

4. CONCLUSÃO

Aspergillus sp. UCP 1290 é um bom produtor de protease em meio de cultura a base de soro de leite. O planejamento experimental possibilitou um aumento da produção de protease por *Aspergillus* sp. UCP 1290, tendo a temperatura, concentração de soro de leite e a interação entre eles como as variáveis mais significativas para a produção. A protease neutra produzida é ativa em temperatura de 60 °C, a qual é favorável para aplicações em processos industriais. O soro de leite pode ser utilizado como substrato de baixo custo em substituição aos meios sintéticos para produção de protease em fermentação submersa.

5. AGRADECIMENTOS:

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco - FACEPE. Os autores também são gratos ao Núcleo

de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia – NPCIAMB da Universidade Católica de Pernambuco.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ao XI, Yu X, Wu, Dt. et al. Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans. *AMB Express*. 2018 Jun; 8:96, doi: 10.1186/s13568-018-0611-6
2. Arumugam N et al. Optimized production of extracellular alkaline protease from *Aspergillus tamarii* with natural by-products in a batch stirred tank bioreactor. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2020 Jun; 50. Doi: 10.1080/10826068.2020.1777426
3. Banerjee G. and Ray Ak. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2017; 33(2), 119-143. Doi: 10.1080/02648725.2017.1408256
4. Gimenes NC, Silveira E, Tambourgi EB. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Separation & Purification Reviews*. 2019; 1-21.
5. Gul A, et al. Efficient Utilization of Dairy Industry Waste for Hyper-Production and Characterization of a Novel Cysteine Protease. *Pakistan Journal of Zoology*. 2012; 44(3), 713-721. Available from: https://www.researchgate.net/publication/285955813_Efficient_Utilization_of_Dairy_Industry_Waste_for_Hyper-Production_and_Characterization_of_a_Novel_Cysteine_Protease
6. Ibarruri j, Hernández I. Valorization of cheese whey and orange molasses for fungal biomass production by submerged fermentation with *Rhizopus* sp. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2019; 42(8), 1285–1300. Doi: 10.1007/s00449-019-02127-4
7. Ieliszek M. et al. The aspects of microbial biomass use in the utilization of selected waste from the agro-food industry. *Open Life Sciences*. 2020;15(1), 787–796. Doi: 10.1515/biol-2020-0099
8. Leighton TJ. et al. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*. 1973; 76(1), 103–122. Doi: 10.1016/0022-2836(73)90083-1
9. Manachini PL, Fortina MG, Parini C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology letters*. 1987; 9(3), 219-224
10. Marzo C. et al. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management & Research*. 2019; 37(2), 149-156.
11. Matkawala F. et al. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2021; 37(4), 63. Doi: 10.1007/s11274-021-03036-z
12. Menezes BS. et al. Biomass of unconventional plants from Brazilian semiarid as substrate for hydrolytic enzymes production by *Aspergillus niger* under solid and submerged fermentation. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 2021; 43, e48257-48257. Doi: 10.4025/actascibiols.v43i1.48257.
13. Nascimento T. et al. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. *Advances in Enzyme Research*, 2015; 03, 81–91, 2015. Doi: 10.4236/aer.2015.33009
14. Naveed M, et al. Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. *Catalysis Letters*. 2021; 151(2), 307–323. Doi: 10.1007/s10562-020-03316-7.
15. Osman ME, Yasmin E, Khattab. *Aspergillus terreus* proteases: characterization and applications. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*. 2014; 4, 2333 –2346. Available from: https://www.researchgate.net/publication/266023660_Aspgillus_terreus_proteases_characterization_and_applications
16. Pescuma M, De Valdez GF, Mozzi F. Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015; 99(15), 6183–6196. Doi: 10.1007/s00253-015-6766-z

Marinho, J. dos S. Utilização de Rejeito Líquido da Indústria de Alimentos para a produção de Protease por Amostras de *Aspergillus* spp. Isoladas da Caatinga de Pernambuco...

17. Radha S. et al. Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. Arch Appl Sci Res. 2011; 3(2), 155–63. Available from: <https://www.tsijournals.com/articles/production-optimization-and-partial-purification-of-acid-protease-from-Aspergillus-spp-isolated-from-soil-contaminated-with-abattoir-waste-13774.html>
18. Ravindran R. et al. A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. Bioengineering. 2018; 5(4), 93. Doi: 10.3390/bioengineering_5040093
19. Razzaq A. et al. Microbial Proteases Applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2019; (7), 110. Doi: 10.3389/fbioe.2019.00110
20. Rukmi I, Purwantisari S. The production of alkaline protease from *Aspergillus flavus* DUCC K225 on rice bran containing medium. Journal of Physics: Conference Series. 2020; 1524(1), 012058. Doi: /1088/1742-6596/11524/1/012058
21. Ryan MP, Walsh G. The biotechnological potential of whey. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2016; 15 (3), 479–498. Doi: /10.1007/s11157-016-9402-1
22. Sharma KM. et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. Journal of Genetic Engineering & Biotechnology. 2017; 15(1), 115–126. Doi: 10.1016/j.jgeb.2017.02.001
23. Sharma KM. et al. A Review on Microbial Alkaline Protease: An Essential Tool for Various Industrial Approaches. Industrial Biotechnology. 2019; 15, 69–78. Doi: 10.1089/ind.2018.0032
24. Souza PM, et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. Brazilian Journal of Microbiology. 2015; 46(2), 337–346. Doi: /10.1590/S1517-838246220140359
25. Spalatel C. Biotechnological valorization of whey. Innovative Romanian Food Biotechnology. 2012; 10, 1. Available from: <https://pdfslide.net/reader/f/biotechnological-valorisation-of-10-1pdf-innovative-romanian-food-biotechnology>
26. Sudarkodi C, Sundar SK, Murugan M. Production and Optimization of Protease By Filamentous Fungus Isolated From Paddy Soil In Thiruvavur District Tamilnadu. J App Biol Biotech. 2015; 3(06), 066-069. Doi: 10.7324/JABB.2015.3610
27. Trindade MB, et al. Cheese whey exploitation in Brazil: a questionnaire survey. Food Science and Technology. 2019; 39(3), 788–791. Doi: /10.1590/fst.07419
28. Vamvakak IAN. et al. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. Engineering in Life Sciences. 2010; 10(4), 348–360. Doi: /10.1002/elsc.201000063
29. Wajeaha AW. et al. Production, Purification, and Characterization of Alkaline Protease from *Aspergillus flavus* and its Compatibility with Commercial Detergents. BioResources. 2021; 16(1), 291–301. Available from: https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_16_1_291_Wajeaha_Purification_characterization_Alkaline_Protease/8175

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados da seleção, dentre os seis isolados estudados, o UCP 1290 foi a que obteve melhor desempenho para a atividade proteolítica com importante produção enzimática em meio líquido com gelatina e soro de leite.

O planejamento foi uma ferramenta útil para identificar concentração, pH e temperatura ótima e demonstrou que as melhores condições para produção de protease por *Aspergillus* sp. UCP 1290 foram em pH 8,0; temperatura de 32 °C e concentração de soro de leite de 20 %.

O soro de leite pode ser utilizado como substrato único (fonte de carbono e nitrogênio) para produção de protease, por fungos filamentosos, em fermentação submersa, em alternativa aos meios convencionais de produção.

Dentre os fatores que tiveram relevância para a produção da enzima, foi possível concluir que a menor concentração do soro foi o mais relevante, seguidos da temperatura e pH.

A protease produzida por *Aspergillus* sp. UCP 1290 apresentou atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 60 °C.

O trabalho também contribuiu para o conhecimento do potencial biotecnológico de diferentes isolados do gênero *Aspergillus*, presentes na Caatinga do Estado de Pernambuco, para produção de biomoléculas.

Os resultados descritos neste trabalho fortalecem a utilização do gênero *Aspergillus* para produção de protease, sendo importante o aprofundamento deste trabalho, para aplicação no mercado de tratamento de resíduos e efluentes industriais, com a identificação da espécie estudada.

A reutilização de resíduos agroindustriais como o soro de leite como um substrato para produção de biomoléculas com elevado valor agregado, como as proteases, por fungos do gênero *Aspergillus* tem potencial de reduzir substancialmente os custos de produção na indústria, além de contribuir com o meio ambiente.