

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

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

DOI: <https://doi.org/10.31692/2764-3425.v4i2.525>

**<sup>1</sup> TIAGO DE OLIVEIRA SOUSA**

Doutor em Produção Vegetal, Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, Piauí, Brasil,  
[tiagoklista0803@gmail.com](mailto:tiagoklista0803@gmail.com)

**<sup>2</sup> ALAN VAGNER DA SILVA RAMOS**

Graduando em Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus – Piauí, Brasil,  
[alanvagner9961@gmail.com](mailto:alanvagner9961@gmail.com)

**<sup>3</sup> THALESRAM IZIDORO PINOTTI**

Graduando em Engenharia Agrônômica, Universidade Federal do Piauí. Bom Jesus, Piauí, Brasil,  
[thalesram@hotmail.com](mailto:thalesram@hotmail.com)

**<sup>4</sup> ALICE MARIA GONÇALVES SANTOS**

Doutora em Fitopatologia, Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, Piauí, Brasil, [alicemgsantos@ufpi.edu.br](mailto:alicemgsantos@ufpi.edu.br)

**<sup>5</sup> THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO**

Doutor em Biologia Aplicada a Saúde, Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, Piauí, Brasil,  
[thiagopajeu@ufpi.edu.br](mailto:thiagopajeu@ufpi.edu.br)



## RESUMO

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

**Palavras-chave:** Biotecnologia; enzima; microrganismo; queijo.

## ABSTRACT

The dairy industry has been growing in Brazil, especially cheese, a nutritious product rich in proteins, vitamins and minerals. And due to the scarcity of traditional animal rennet, microbial coagulant proteases have become a promising alternative in milk production. Among the protease-producing microrganismos, fungi are preferred for biotechnological and industrial applications, but they are still little explored, especially from Cerrado-Caatinga ecotone areas. Therefore, the objective of this work was to evaluate the isolate of *Trichoderma* sp. Isolated areas of Cerrado-Caatinga Piauí ecotone for the production of milk coagulant proteases and evaluate its protease activity and protein dosage. The production of proteases was carried out by Solid State Fermentation (SSF) using different agro-industrial residues (rice peel, orange peel, cassava peel, corn cob and soybean bran) being used as culture media for the inoculation of o fungo *Trichoderma*

sp. This filamentous fungus proved to be efficient for the production of proteases, with production varying according to the substrates used, ranging from 7.73 to 37.86 U/mL. As for milk coagulant activity, only cassava husk, soybean meal and rice husk substrates were effective, obtaining 133.33; 80.00 and 10.00 units, showing strong milk coagulation, which is when a distinct clot and abundant whey form. Thus, *Trichoderma* sp. presents potential for the production of milk coagulating proteases and proteases. Among the substrates tested, soybean meal, orange peel and cassava peel were efficient for the production of proteases, and cassava peel for the production of milk coagulant proteases, therefore the use of residues and agro-industrial co-products is an alternative efficient and biosustainable for the production of proteases of dairy interest.

**Keywords:** Biotechnology; enzyme; microorganism; cheese.

## INTRODUÇÃO

O queijo é um produto que pode ser descrito como o resultado parcial da separação do soro do leite, obtido por métodos como a ação física do coalho, a ação de enzimas e/ou bactérias específicas, entre outros. Pode ser definido como um produto fresco ou maturado, com a possibilidade de adição de aditivos e especiarias (SARAIVA *et al.*, 2023).

Devido à sua composição rica em nutrientes como proteínas, minerais e vitaminas, o queijo possui elevado valor nutricional, o que fortalece o potencial da cadeia produtiva do leite e de seus derivados (NEIVA, 2022). Nos últimos anos, o mercado global de queijo tem apresentado crescimento significativo, com previsão de uma Taxa de Crescimento Anual Composta (CAGR) de 6,8% entre 2020 e 2025, segundo o relatório da Mordor Intelligence (2022).

Tradicionalmente, a produção de queijo envolve o uso de enzimas coagulantes de origem animal, como a renina – uma protease extraída do estômago de bezerros. No entanto, esse método levanta preocupações éticas, biológicas e de sustentabilidade. Por isso, a busca por alternativas de coagulantes tornou-se um tema de crescente interesse científico.

Uma dessas alternativas são as proteases de origem microbiana, pertencentes a um grupo enzimático que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Essas proteases são biocatalisadores amplamente aplicados na produção industrial, desempenhando papéis essenciais na fabricação de alimentos, cosméticos e medicamentos (SNYMAN *et al.*, 2019).

Microrganismos são a principal fonte dessas enzimas, representando cerca de 60% das vendas mundiais. Mais de 50% das enzimas industriais são produzidas por fungos filamentosos e leveduras, 30% por bactérias, 8% por fontes animais e apenas 4% por plantas (RIGO *et al.*, 2021). Essa área biotecnológica em rápida expansão movimenta bilhões de dólares anualmente (QUEIROZ *et al.*, 2020).

De acordo com Papadaki *et al.* (2020), o mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 7,1 bilhões em 2017 e tem previsão de alcançar US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% entre 2018 e 2024. O continente europeu lidera, representando um terço da produção global de enzimas em 2017, ano em que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era atribuída a micro-organismos.

As proteases produzidas por fungos filamentosos podem ser obtidas por meio de Fermentação em Estado Sólido (FES), definida como o crescimento de micro-organismos em substratos sólidos na ausência de água livre (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Esse processo utiliza

subprodutos agroindustriais, proporcionando vantagens como alta disponibilidade, baixo custo e reaproveitamento de resíduos, promovendo a sustentabilidade. As enzimas obtidas por esse método têm aplicações variadas, especialmente na indústria alimentícia, com destaque para a coagulação do leite na produção de queijos (PATYSHAKULIYEVA, 2021).

O interesse industrial pelo uso de fungos filamentosos para a produção de proteases tem crescido, devido à sua capacidade de produzir enzimas em grande quantidade e variedade, além da facilidade de crescimento em substratos sólidos, com alta eficiência fermentativa. Entre os microrganismos de destaque para a produção de proteases está o fungo *Trichoderma* sp. (WEISS *et al.*, 2020), encontrado em áreas de ecótono Cerrado-Caatinga, amplamente utilizado como agente de controle biológico na agricultura mundial (MORAIS *et al.*, 2022).

A bioprospecção de *Trichoderma* sp. como fonte de proteases coagulantes no cerrado piauiense oferece oportunidades para explorar recursos naturais locais e reduzir a dependência de coagulantes de origem animal, contribuindo para o crescimento sustentável da indústria queijeira (MAMO *et al.*, 2020). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar isolados de *Trichoderma* sp. provenientes de áreas de ecótono Cerrado-Caatinga no Piauí quanto à produção de proteases coagulantes do leite, bem como analisar sua atividade proteásica e concentração proteica.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### *Coalhos e Coagulantes*

A coagulação é a etapa mais decisiva na produção de queijos, ocasionando modificações físico-químicas nas micelas de caseína e transformando o leite de um estado líquido para um gel, conhecido como coalhada. Para que esse processo ocorra, é necessária a adição de coalhos ou coagulantes, que são enzimas essenciais na produção de queijos, responsáveis pela primeira etapa da coagulação enzimática do leite (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

O termo "coalho" refere-se às enzimas obtidas do quarto estômago de ruminantes (abomaso), que atuam sobre a proteína do leite, como o coalho bovino. Já os coagulantes englobam todas as enzimas coagulantes do leite que não são obtidas a partir do coalho, podendo ser derivadas de vegetais ou micro-organismos (ANTUNES; SAITO, 2011).

O coalho de origem bovina é composto por uma mistura de duas proteínas: renina e pepsina. Entretanto, a proporção entre renina e pepsina pode variar conforme a idade do animal. Animais mais jovens apresentam uma maior proporção de renina, o que resulta em maior eficiência na coagulação da caseína. Além disso, o manejo alimentar adequado antes do abate também influencia essa proporção (ANDRÉN, 2021).

Com o aumento global da produção de queijos nos últimos anos (MORDOR INTELIGÊNCIA, 2022) e a escassez de coalho devido à baixa disponibilidade de animais jovens para abate, têm sido estimuladas pesquisas voltadas para a produção de coagulantes alternativos. Esses coagulantes podem ser obtidos de fontes como plantas, fungos e leveduras.

As enzimas coagulantes utilizadas na produção de queijo desempenham suas funções conforme o tipo de enzima empregado. Por isso, estudos que avaliem o potencial de diferentes fontes produtoras de enzimas coagulantes são fundamentais. A crescente demanda por queijos no Brasil e no mundo impulsiona a necessidade de alternativas viáveis para atender à indústria. Nesse contexto, a adição de enzimas coagulantes do grupo das proteases surge como uma alternativa promissora para a indústria queijeira.

### *Proteases*

As proteases, também chamadas de peptidases ou proteinases, são classificadas de acordo com a Enzyme Commission of International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) dentro do grupo 3 (hidrolases) e subgrupo 4 (hidrolases de ligações peptídicas). Ou seja, são enzimas hidrolíticas, onde a presença de uma ou mais moléculas de água (H<sub>2</sub>O) irão desencadear a quebra de outras moléculas, tendo como função a quebra de ligações peptídicas das proteínas (GOMES *et al.*, 2019).

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

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

### *Proteases microbianas*

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

A produção das proteases microbianas se dá por meio de processos fermentativos (fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES)). A FES proporciona uma redução significativa de custos e eficiência de recursos sobre fermentação submersa convencional (HANSEN *et al.*, 2015; TEIGISEROVA *et al.*, 2021). Esse processo tem se destacado pela possibilidade de utilizar apenas um substrato, que pode ser de origem de resíduos e coprodutos do setor agroindustrial, que estão disponíveis em grandes quantidades tanto a nível local como global, atingindo centenas de milhões de toneladas (FAOSTAT, 2019), se tornando uma fonte ideal de substrato para o desenvolvimento dos microrganismos e a produção de biomoléculas (NASCIMENTO *et al.*, 2021). De acordo com Oliveira e Rodrigues, (2016), esse processo tem a vantagem de necessitar de um teor reduzido de água, principalmente para proteases fúngicas, produzindo metabólitos de forma concentrada.

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

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

Este fungo já é bem conhecido no setor agrícola pela sua capacidade de atuar como agente de controle biológico (MORAIS *et al.*, 2022) presentes em áreas de ecótono Cerrado-Caatinga, região que compreende a terceira maior área ecotonal do Brasil. Os ecótonos são áreas resultante do contato entre dois ou mais biomas, refletindo mudanças locais e regionais

nas condições abióticas e bióticas (ORTIZ-COLIN; HULSHOF, 2024), apresentando biodiversidade com microbiota rica e promissora na produção de moléculas bioativas, com potencial natural para uso nos processos biotecnológicos.

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

### *Aplicação de resíduos agroindustriais para produção de enzimas*

O Brasil apresenta uma economia fortemente ligada à agricultura, o que gera uma grande quantidade de resíduos agroindustriais. Esses resíduos incluem subprodutos gerados durante o processamento industrial de produtos agrícolas ou animais, ou provenientes de atividades agrícolas (SANTOS *et al.*, 2018). Exemplos comuns são casca de arroz, casca de laranja, sabugo de milho, casca de mandioca, entre outros. Muitas vezes, esses resíduos não têm um aproveitamento direto devido ao baixo ou nenhum valor comercial a eles atribuído, o que gera preocupações sobre os problemas ambientais decorrentes do descarte inadequado.

Esses resíduos são geralmente ricos em açúcares fermentáveis e nutrientes, características que favorecem o crescimento de micro-organismos. Isso possibilita a produção de produtos com alta aplicabilidade industrial (PANDA *et al.*, 2016). Por meio do processo de fermentação, é viável realizar a biotransformação ou síntese de substâncias a partir de substratos, com a ação de micro-organismos, como ocorre na produção de enzimas (ALENCAR *et al.*, 2020).

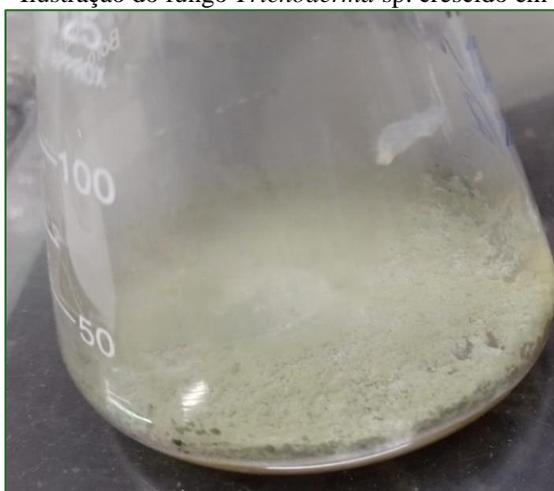
Dessa forma, enfatiza-se a importância do desenvolvimento de biotecnologias que utilizem resíduos agroindustriais em substituição aos substratos convencionais e não renováveis utilizados em bioprocessos. Essa abordagem, além de manter o rendimento e reduzir os custos de produção, promove o reaproveitamento desses resíduos e contribui para a diminuição do acúmulo de materiais no meio ambiente, um problema ambiental significativo nos dias atuais.

## **METODOLOGIA**

### *Isolamento dos fungos filamentosos*

Foi utilizado o fungo *Trichoderma sp.* (Figura 01), isolado de um ecótono Caatinga-Cerrado no Piauí, coletado em fragmentos de áreas de reserva nas proximidades do município de Bom Jesus – PI (8°51'7,48" S e 44°11'39,95" W), em regiões preservadas e agricultáveis. Amostras de folhas e caules de plantas, assim como amostras de solo e serapilheira, foram acondicionadas em sacos plásticos previamente esterilizados e transportadas até o Laboratório de Fitopatologia da UFPI, no campus Professora Cinobelina Elvas, em Bom Jesus – PI, para análise. Após a identificação do fungo, o mesmo foi mantido em meio de cultura batata dextrose agar (BDA) (Himedia) a 25 °C por 7 dias, até ocorrer a esporulação.

Figura 01 - Ilustração do fungo *Trichoderma sp.* crescido em meio BDA.



Fonte: Própria (2023).

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

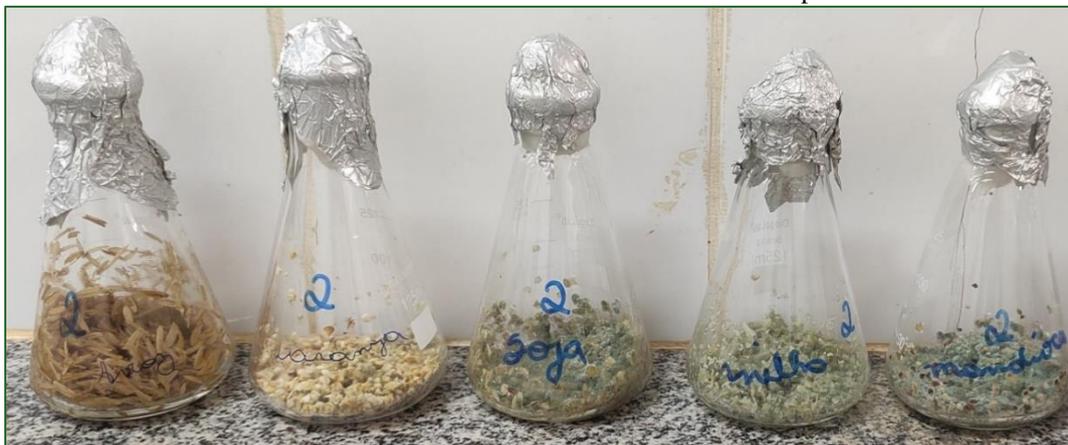
*Trichoderma sp.* foi inoculado na concentração final de  $10^7$  esporos/mL em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 3 gramas de resíduos agroindustriais (autoclavados a 121 °C por 20 minutos): casca de arroz, casca de laranja, casca de mandioca, sabugo de milho e farelo de soja, padronizados com tamiz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

### *Preparação do Inóculo*

Os esporos do fungo foram coletados por meio de uma solução nutritiva composta por extrato de levedura a 0,5% (p/v) e glicose a 1% (p/v), diluída em tampão fosfato de sódio 245 mM, com pH 7,0, previamente esterilizada. Os esporos foram contados em câmara de Neubauer

até atingir uma concentração final de  $10^7$  esporos/mL. Em seguida, foi realizada a inoculação dos esporos em frascos Erlenmeyer contendo os resíduos agroindustriais autoclavados para a produção de proteases em FES (Figura 02).

**Figura 02** - Ilustração do processo de FES utilizando a casca de arroz, laranja, farelo de soja, sabugo de milho e casca de mandioca inoculadas com *Trichoderma* sp.



Fonte: Própria (2023).

### *Extração das Proteases*

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

**Figura 03** - Ilustração dos Erlenmeyers no agitador orbital para o processo de extração das proteases.



Fonte: Própria (2023).

### *Determinação da atividade proteásica*

A atividade proteásica foi determinada pelo método de Ginther (1979). Amostras de 1 mL do ensaio, contendo Tris-HCl 0,2 M (pH 7,2),  $10^{-3}$  M de  $\text{CaCl}_2$ , 1,0% (p/p) de azocaseína e 150  $\mu\text{L}$  da protease fibrinolítica, foram incubadas a 28 °C por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético 10% (p/v). Após centrifugação a 3000xg por 15 minutos, uma alíquota de 0,8 mL do sobrenadante foi transferida para um segundo tubo contendo 0,2 mL de NaOH 1,8 N. As amostras foram então homogeneizadas em um vórtex, e a absorbância foi medida a 420 nm. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima responsável pelo aumento de 0,1 na absorbância por hora.

### *Determinação de Proteína*

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

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



Fonte: Própria (2023).

### *Atividade coagulante do leite*

A atividade de coagulação do leite foi determinada de acordo com Merheb-Dini et al. (2010), utilizando leite desnatado em pó a 10% (p/v) (Camponesa, Embaré, Centro, Lagoa da Prata, Minas Gerais, Brasil) e  $\text{CaCl}_2$  a 0,05 M como substrato. Resumidamente, 5 mL da solução láctea foram distribuídos em tubos de ensaio e pré-incubados em banho-maria microprocessado (Quimis, modelo Q215 M179, Cambridge, Reino Unido) a 50 °C por 15 minutos. O extrato enzimático (500  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado ao leite, e o tempo de contagem foi iniciado. Para uma melhor visualização da formação de coágulos, realizavam-se movimentos giratórios manuais nos tubos de ensaio. O tempo necessário para a formação das primeiras partículas foi registrado. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Uma unidade de atividade de coagulação do

leite (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular 1 mL de substrato em 40 minutos a 50 °C. A atividade de coagulação do leite (U) (equação 1) e a razão (R) (equação 2) foram calculadas usando as seguintes equações:

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

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

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

### *Análise estatística*

A análise dos resultados foi realizada através da utilização de análise descritiva de dados.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### *Produção de Protease Fibrinolítica por FES*

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

A maior produção enzimática obtida utilizando farelo de soja, casca de laranja e casca de mandioca está relacionada à maior disponibilidade de nutrientes presentes nesses substratos para o crescimento do fungo. O farelo de soja, por exemplo, contém a maior parte das proteínas da soja, sendo um substrato rico em nutrientes e energia. A casca de laranja, por sua vez,

apresenta polissacarídeos insolúveis (pectina, celulose e hemicelulose) e carboidratos solúveis (glicose, sacarose e frutose) (ZHOU *et al.*, 2019), configurando-se como um subproduto barato e com grande potencial para o crescimento de microrganismos, como observado neste trabalho. Já a casca de mandioca apresenta altos teores de amido e menores quantidades de proteína, gordura e fibra (VIEIRA *et al.*, 2018).

**Tabela 01** - Produção de protease fibrinolítica por *Trichoderma* sp. usando diferentes substratos em FES.

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

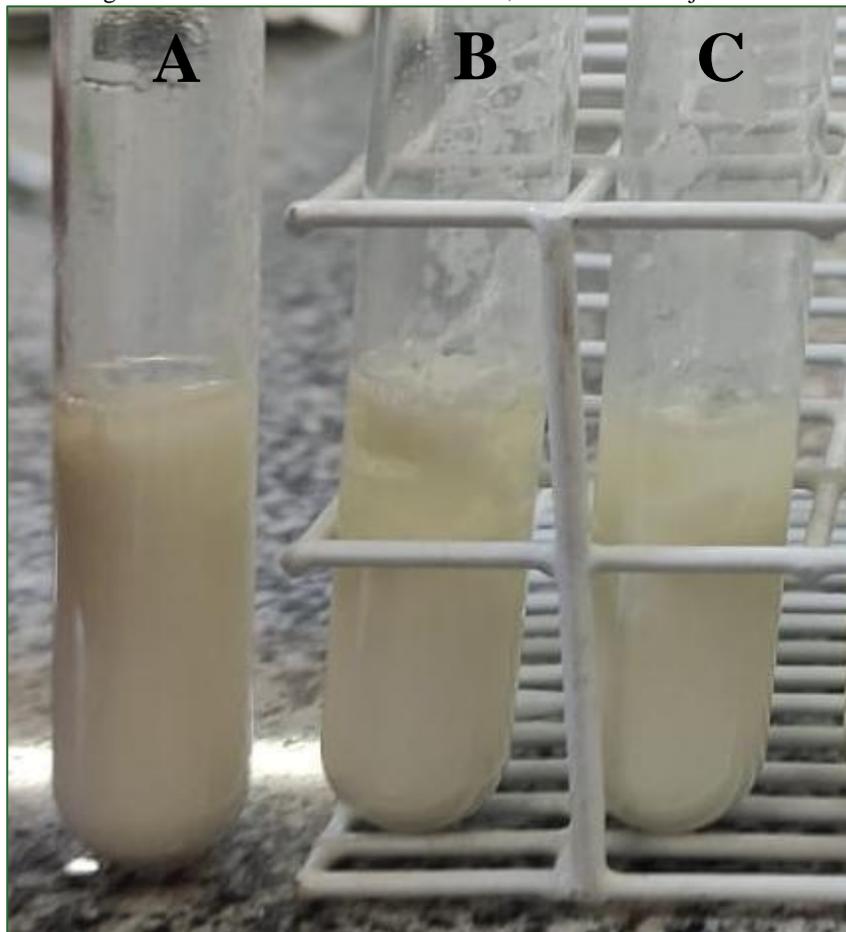
Fonte: Própria (2023).

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

### *Atividade coagulante do leite*

Os resultados referentes à fermentação do isolado *Trichoderma* sp. em diferentes extratos para análise da atividade de coagulação do leite estão na Tabela 02. Pode-se observar que a maior atividade coagulante ocorreu com a casca de mandioca (133,33 U), promovendo coagulação total em até 3 minutos, seguida pelo farelo de soja (80,00 U) em 5 minutos e pela casca de arroz (10,00 U) em 40 minutos. Na Figura 05, é possível observar a forte coagulação do leite nos três substratos mencionados, com a formação de coágulo distinto e soro abundante.

**Figura 05** - Determinação da atividade coagulante do leite de proteases produzidas por *Trichoderma* sp crescido em diferentes substratos agroindustriais: A- Casca de mandioca, B – farelo de soja e C – Casca de arroz.



Fonte: Própria (2023).

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

**Tabela 02** - Atividade coagulante do leite, nível de coagulação e atividade específica das proteases produzidas por *Trichoderma* sp. em diferentes substratos.

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

Fonte: Própria (2023).

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

A casca de arroz obteve a segunda maior atividade específica de coagulação (91,74 U/mg). Esse resultado pode ser atribuído à alta atividade específica das proteases na quebra de moléculas de proteínas, como observado na análise de produção de proteases. Já o substrato farelo de soja, embora tenha apresentado uma atividade coagulante superior à casca de arroz (Tabela 02), mostrou uma menor atividade específica de coagulação (52,17 U/mg). Esses resultados podem ser explicados pela alta concentração de proteína no farelo de soja (1,533 mg/mL), mas com uma menor atividade específica das proteases (24,693 U/mg) em comparação com os outros substratos.

Esses resultados mostram que o fungo *Trichoderma* sp. é eficiente e promissor na produção de proteases, variando seu potencial de acordo com o teor de proteína do substrato. E que, mesmo que o substrato apresente uma menor produção de proteases, sua atividade específica pode resultar em maior coagulação do leite.

## CONCLUSÃO

*Trichoderma* sp. apresenta grande potencial para a produção de proteases, que podem ser utilizadas como coagulantes do leite. Dentre os substratos testados, farelo de soja, casca de laranja e casca de mandioca mostraram-se eficientes na produção de proteases. A casca de mandioca apresentou o maior potencial como substrato para a produção de proteases com capacidade de atuação como coagulante do leite, destacando-se como uma alternativa eficiente e biosustentável para a produção de proteases de interesse na indústria láctea.

## REFERÊNCIAS

ALENCAR, V. N. S.; BATISTA, J. M. S.; NASCIMENTO, T. P.; CUNHA, M. N. C.; LEITE, A. C. L. Resíduos agroindustriais: uma alternativa promissora e sustentável na produção de enzimas por microrganismos. In: Congresso Internacional Agroindústria. **Anais**. Instituto internacional Despertando Vocações, 2020. <https://doi.org/10.31692/ICIAGRO.2020.0478>.

ANDRÉN, A. Milk-Clotting Enzymes. In: KELLY, A. L.; LARSEN, L.B. (eds) Agents of change. Food Engineering Series. **Springer**, Cham, p. 349–362, 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_14).

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

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

Bradford, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

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

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

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

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

FOOD INGREDIENTS BRASIL - **Dossiê Enzimas**: A evolução das enzimas coagulantes. Nº 16 - 2011. Disponível em <http://www.revista-fi.com/materias/164.pdf>. Acesso em: 14 jul 2023. Gomes, B. K.; Cony, B. S. L.; Stella, L. Enzimas exógenas na alimentação de suínos. **Revista Eletrônica: Nutritime**, v. 16, n. 3, p. 1-11, 2019.

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

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

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

MAMO, J.; KANGWA, M.; FERNANDEZ-LAHOURE, H. M.; ASSEFA, F. Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, 571-584, 2020. doi: 10.1007/s42770-020-00243-y.

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

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

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

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

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

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

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

ORTIZ-COLIN, P.; HULSHOF, C. M. Ecotones como janelas para respostas em escala de organismos para biomas em florestas neotropicais. **Plants**, v. 13, n. 17, 2396, 2024 <https://doi.org/10.3390/plants13172396>.

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

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

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

PRADO, F. B.; BATISTA, S. C. P.; MARTIM, S. R.; TEIXEIRA, M. F. S. Viabilidade da produção de proteases por espécies de *Aspergillaceae* e triagem de coagulantes do leite bovino

/ Feasibility of protease production by *Aspergillaceae* species and screening of coagulants from bovine milk. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 16356–16373, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-317>.

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

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

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

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

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

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

SILVA, H. F.; SANTOS, A. M. G.; SANTOS, M. V. O. D.; BEZERRA, J. L.; LUZ, E. D. M. N. Seasonal variation in the occurrence of fungi associated with forest species in a Cerrado-Caatinga transition area. **Revista Árvore**, 44, 2020.

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

TEIGISEROVA, D. A.; BOURGINE, J.; THOMSEN, M. Closing the loop of cereal waste and residues with sustainable technologies: An overview of enzyme production via fungal solid-state fermentation. **Sustainable Production and Consumption**, v. 27, p. 845-857, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2021.02.010>.

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

YANG, X.; WANG, Z.; ZHANG, C.; WANG, L.; PANG, L.; ZHANG, D.; MAN, C.; JIANG, Y. Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of

ultra-high temperature-sterilized whole milk. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6577-6587, 2021.

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

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

Submetido em: 04/09/2024

Aceito em: 12/12/2024

Publicado em: 30/12/2024

Avaliado pelo sistema *double blind review*