

Produção e caracterização parcial de proteases aspárticas sintetizadas por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 (Polyporaceae)
Production and partial characterization of aspartic proteases synthesized by *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 (Polyporaceae)

Erica Caroline de Matos Brito^I  | Rodrigo da Silva Braga^I  |

Maria Francisca Simas Teixeira^{II}  | Salomão Rocha Martim^I 

^IFaculdade Estácio do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil

^{II}Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil

Resumo: As proteases têm elevada aplicação industrial e, nos últimos anos, os cogumelos têm se destacado como fontes naturais e renováveis destes biocatalisadores. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a produção e caracterizar as proteases sintetizadas por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693. A cultura matriz, preparada em ágar batata dextrose, suplementado com 0,5% (p/p) de extrato de levedura, foi mantida por 8 dias a 25 °C. Em seguida, *L. crinitus* foi cultivado em uma mistura de farelo de arroz e semente de tucumã durante 15 dias a 25 °C. As proteases foram extraídas em água destilada esterilizada e, no extrato bruto, foi determinada a atividade proteolítica, utilizando-se como substrato azocaseína 1% (p/v). As condições que favoreceram a síntese destas enzimas foram: pH inicial do meio de cultivo (8,0), tempo de fermentação (12 dias), idade do inóculo (seis dias) e tamanho do inóculo (10%). As proteases demonstraram as seguintes características bioquímicas: pH ótimo (6,0), temperatura ótima (50 °C), estabilidade na faixa de pH (5,0-6,0) e temperatura (30-50 °C). As proteases foram estimuladas por íons Mn²⁺ e classificadas como aspártico proteases. Estes biocatalisadores têm potencial para produção de queijos, pães e bebidas.

Palavras-chave: Cogumelo. Bioprocesso. Peptidases. Resíduos lignocelulósicos.

Abstract: Proteases have high industrial application and, in recent years, mushrooms have stood out as natural and renewable sources of these biocatalysts. The objective of this research was to evaluate the production and characterization of the proteases synthesized by *Lentinus crinitus* Fr. 1852 DPUA 1693. The matrix culture was prepared in potato dextrose supplemented with 0.5% (w/w) yeast extract and maintained for 8 days at 25 °C. Then, *L. crinitus* was cultivated in a mixture of rice bran and tucumã seed, for 15 days at 25 °C. The proteases were extracted in sterile distilled water, and proteolytic activity was determined in the crude extract using azocasein 1% (w/v) as substrate. The conditions favoring the synthesis of these enzymes were: initial pH of the culture medium (8.0), fermentation time (12 days), inoculum age (six days), and inoculum size (10%). The proteases showed the following biochemical characteristics: optimum pH (6.0), optimum temperature (50 °C), stability in pH range (5.0-6.0), and temperature (30-50 °C). Proteases were stimulated by Mn²⁺ ions and classified as aspartic proteases. These biocatalysts have the potential to produce cheese, breads, and beverages.

Keywords: Mushroom. Bioprocess. Peptidases. Lignocellulosic residues.

BRITO, E. C. M., R. S. BRAGA, M. F. S. TEIXEIRA & S. R. MARTIM, 2019. Produção e caracterização parcial de proteases aspárticas sintetizadas por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 (Polyporaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 14(3): 463-472.

Autora para correspondência: Erica Caroline de Matos Brito. Faculdade Estácio do Amazonas. Av. Constantino Nery, 3693 – Chapada. Manaus, AM, Brasil. CEP 69025-315 (ericacarolinemb@gmail.com).

Recebido em 23/01/2019

Aprovado em 12/06/2019

Responsabilidade editorial: Fernando da Silva Carvalho Filho



INTRODUÇÃO

Proteases catalisam reações de hidrólise das ligações peptídicas nas proteínas. Estes biocatalisadores são utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética, de limpeza, de alimentos, no beneficiamento do couro (Lanka *et al.*, 2017) e, devido às diversas aplicabilidades, representam cerca de 70% das enzimas comercializadas (Kumar *et al.*, 2016).

As enzimas proteolíticas são extraídas de animais, vegetais e microrganismos, entretanto, a obtenção de proteases de origem animal é uma prática bastante contestada, pois envolve o abate dos animais, além de exigir políticas públicas e agrícolas bem estabelecidas (Rani *et al.*, 2012a). Por outro lado, o processo de aquisição de proteases de origem vegetal é muito demorado, uma vez que depende da disponibilidade de terras para o cultivo e de condições climáticas favoráveis (Singh *et al.*, 2016).

Os microrganismos são largamente utilizados para produção de proteases porque apresentam características fisiológicas e tecnológicas vantajosas, como capacidade de cultivo em grande escala, diversidade bioquímica, susceptibilidade à manipulação genética e, geralmente, sintetizam enzimas extracelulares estáveis em amplas faixas de pH e de temperatura (Majumder *et al.*, 2014; Silva, 2017). A literatura científica reporta a síntese de proteases por diferentes espécies de bactérias e fungos (Suganthi *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2014; Santhi, 2014; Vijayaraghavan *et al.*, 2014; Alecrim *et al.*, 2015; Hang *et al.*, 2016).

Entre os fungos, os cogumelos destacam-se como fonte de proteases com diferentes aplicações industriais, pois colonizam uma variedade de resíduos lignocelulósicos, com consequente síntese e excreção de elevadas quantidades de enzimas proteolíticas, a baixo custo de produção (Inácio *et al.*, 2014). Os cogumelos *Pleurotus albidus* (Berk.) Pegler 1983 DPUA 1692, *P. eryngii* (DC.) Quél. 1872, *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. 1828 2425, *Hericium erinaceum* (Bull.) Pers. (1797) NBRC 100328 e *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo 1971 têm sido estudados como fontes de enzimas proteolíticas, conforme descrito por Martim *et al.* (2017),

Bano *et al.* (2016), Chemeris *et al.* (2016), Nakamura *et al.* (2014), Geng *et al.* (2016), respectivamente.

A tecnologia da fermentação semissólida (FSS) ou em estado sólido (FES) é um processo utilizado para obtenção de proteases sintetizadas por fungos filamentosos, e consiste no crescimento de microrganismos em substratos com umidade suficiente para promover e sustentar o desenvolvimento microbiano (Novelli *et al.*, 2016). A FES apresenta vantagens como elevada produtividade, baixa geração de efluentes, risco reduzido de contaminação do meio, pouca exigência de água e energia, além da utilização de resíduos lignocelulósicos como substratos para crescimento dos fungos e produção de proteases (Bensmail *et al.*, 2015; Al-Jammas *et al.*, 2016).

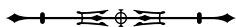
Resíduos lignocelulósicos disponíveis na Amazônia, como exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex-Spreng Schum), semente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e farelo de arroz (*Oryza sativa* L.), são utilizados para crescimento e produção de proteases por espécies de cogumelos pertencentes aos gêneros *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. 1871 (Souza *et al.*, 2016) e *Lentinus* Fr. 1825 (Machado *et al.*, 2016). Os resíduos agroindustriais do tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) também possuem potencial para serem utilizados como matriz sólida para o crescimento e a síntese de proteases por cogumelos (Behera & Gupta, 2015; Kieling *et al.*, 2019).

Considerando-se que as fontes atuais de proteases não suprem à crescente demanda comercial e há necessidade de novas fontes de enzimas proteolíticas com elevada estabilidade catalítica, o objetivo deste artigo foi avaliar a produção e as características bioquímicas de proteases sintetizadas por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693, cultivado em resíduos lignocelulósicos amazônicos.

MATERIAL E MÉTODOS

COGUMELO

Neste estudo, foi utilizado o macrofungo *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693, preservado sob óleo mineral,



proveniente do acervo da Coleção de Culturas, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA). Da cultura mantida em óleo mineral, foram retirados fragmentos miceliais, inoculados em caldo glicosado (Lacaz *et al.*, 2002). Para obtenção de cultura viável, fragmentos da massa micelial foram transferidos para BDA [ágar batata dextrose suplementado com extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placas de Petri, mantidos a 25 °C por oito dias, para posterior processamento e utilização nos experimentos subsequentes.

PRODUÇÃO DE PROTEASE POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA

Para o bioprocesso em matriz sólida, foi utilizada a mistura [farelo de arroz: semente de tucumã (60:40, p/p)], com umidade a 60% e pH 6,0, que, adicionada em frascos Erlenmeyer, foi esterilizada por uma hora, durante dois dias consecutivos. Para determinar as condições ótimas de produção de proteases por *L. crinitus*, foram avaliados os seguintes parâmetros: idade do inóculo (6, 8, 10, 12 e 14 dias), tamanho do inóculo (1,0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10%), pH inicial do meio de cultivo (4, 5, 6, 7 e 8) e tempo de fermentação (12, 14, 16, 18 e 20 dias).

EXTRAÇÃO DAS PROTEASES

As peptidases foram extraídas em água destilada esterilizada [1:5, (substrato: água, p/v)], a 30 °C, a 180 rpm, por 30 minutos, e recuperadas por filtração sob vácuo em papel de filtro Whatman n° 1, seguindo as filtrações em membrana de éster de celulose (0,45 µm) e em membrana polietersulfônica (0,22 µm), respectivamente. No extrato bruto, foi determinada a atividade proteolítica.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Leighton *et al.* (1973), utilizando-se solução de azocaseína 1% (p/v) como substrato enzimático. Uma unidade de atividade de

proteases foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorbância igual a 0,01 em 60 minutos.

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PROTEASES

As proteases obtidas nas condições ótimas de fermentação foram caracterizadas quanto ao pH e à temperatura ótimas, à estabilidade ao pH e à temperatura, ao efeito de íons e de inibidores.

DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO PH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA PROTEASE

Para ensaio do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada a 25 °C em diferentes valores de pH, utilizando-se as seguintes soluções-tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e glicina-NaOH (9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em diferentes temperaturas (30 a 70 °C). Para estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:1) nas seguintes soluções-tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e glicina-NaOH (9 e 10), mantido a 25 °C por uma hora. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado em diferentes temperaturas (30 a 70 °C), por uma hora (Martim *et al.*, 2017).

EFEITO DE INIBIDORES DE PROTEASES E ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi investigado utilizando-se, na mistura reacional, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), ácido iodoacético (10 mM) e pepstatina (0,1 mM). Os íons metálicos utilizados na concentração de 10 mM, na mistura reacional, foram CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl. As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura; a atividade enzimática residual foi comparada com o controle incubado sem os inibidores e os íons metálicos, e correspondeu a 100% de atividade (Martim *et al.*, 2017).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de todos os experimentos, realizados em triplicata, foram submetidos à análise de variância e às médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) por meio do programa Minitab, versão 16.0 (Minitab, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PADRONIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES

A composição química dos meios de cultivos e as condições físico-químicas utilizadas em processos fermentativos interferem diretamente na produção de proteases por cogumelos. Na literatura científica, há poucos estudos reportando a influência dos parâmetros de fermentação em meio sólido na síntese de proteases por macrofungos. Neste estudo, foi verificado que o aumento da idade do inóculo causou redução da síntese de proteases por *L. crinitus* DPUA 1693. O inóculo com seis dias estimulou a produção e a excreção de proteases (79,11 U/mL), enquanto que a utilização de inóculo com 14 dias reduziu em 32% a síntese de proteases (Figura 1). Martim *et al.* (2017) verificaram síntese máxima de proteases por *P. albidus* DPUA 1692, utilizando inóculo de cinco dias. Priyanka & Raju (2013) e Rani *et al.* (2012b) observaram que *Rhizopus oligosporus* Saito 1905 NCIM 1215 e *Aspergillus flavus* Link 1809 AS2 produziram e excretaram quantidades significativas de proteases quando utilizaram inóculo com quatro dias. Boukhalfa-Lezzar *et al.* (2014) relataram que a idade do inóculo é um dos parâmetros mais importantes em processos fermentativos, sendo que o desenvolvimento microbiano é muito variável e está ligado diretamente às características fisiológicas e genéticas dos microrganismos.

Neste estudo, foi verificado incremento na síntese de proteases com a elevação do tamanho do inóculo (Figura 2). As produções máxima e mínima de enzimas proteolíticas foram observadas com os inóculos de 10% e

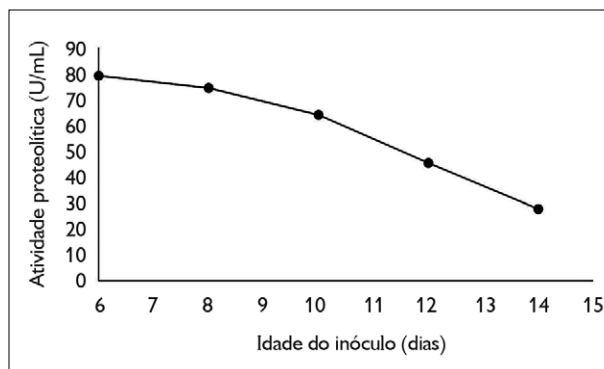


Figura 1. Influência da idade do inóculo na produção de proteases por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693.

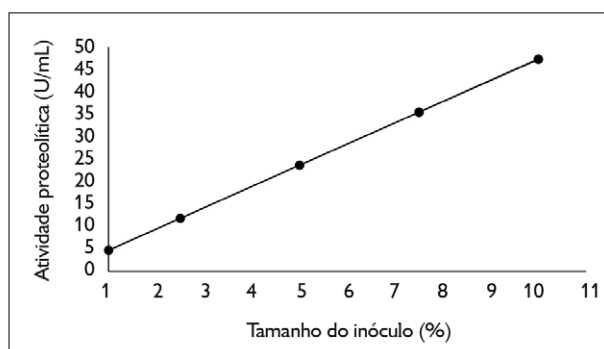


Figura 2. Influência do tamanho do inóculo na produção de proteases por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693.

1%, que resultaram em atividade de 47,33 U/mL e 25,11 U/mL, respectivamente. Martim *et al.* (2017) também observaram que o inóculo de 10% estimulou a síntese de proteases por *P. albidus* DPUA 1692. Daudi *et al.* (2015) e Ravikumar *et al.* (2012) verificaram que a produção significativa de proteases por *Mucor pusillus* Lindt 1886 IHS 6 e *P. sajor-caju* (Fr.) Singer 1951 foi determinada com a utilização de inóculos de 1% e 3%, respectivamente. Bensmail *et al.* (2015) relataram que a utilização de inóculo concentrado favorece a produção excessiva de biomassa, resultando em rápida degradação dos nutrientes do meio de cultivo, enquanto que, em reduzidas concentrações, ocorrem baixas produções de biomassa e de proteases.

Nas condições avaliadas, o aumento do tempo de cultivo causou redução da síntese de enzimas proteolíticas. A produção significativa de proteases foi verificada quando

L. crinitus DPUA 1693 foi cultivado por 12 dias (54,67 U/mL). Aos 20 dias de cultivo em matriz sólida, a atividade catalítica foi 70% inferior (Figura 3). Ahmed & Abood (2017) e Ravikumar *et al.* (2012) observaram máxima produção de proteases por *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. 1895 e *P. sajor-caju* aos seis e quatro dias de fermentação, respectivamente. Foda *et al.* (2012) relataram que *Rhizomucor miehei* (Cooney & R. Emers.) Schipper 1978 NRRL 2034 sintetizou quantitativo significativo de proteases quando cultivado por três dias em matriz sólida. Priyanka & Raju (2013) citaram que a diminuição da síntese de proteases, com o incremento do tempo de cultivo, indica que estas enzimas são metabólitos primários produzidos durante a fase *lag* de crescimento dos fungos para a utilização de nutrientes proteicos, presentes no substrato sólido. Além disso, a presença de outras proteases constituintes também pode reduzir a produção das enzimas proteolíticas.

No presente estudo, o *L. crinitus* DPUA 1693 sintetizou o máximo quantitativo de proteases quando cultivado em pH 8 (65,78 U/mL) (Figura 4). Neste mesmo valor de pH, *Penicillium griseofulvum* Dierckx 1901 LCJ231 e *A. flavus* também produziram valores significativos de proteases, conforme descrito por Jenitta *et al.* (2015) e Chandrasekaran *et al.* (2015), respectivamente. Ravikumar *et al.* (2012) relataram produção máxima de proteases por *P. sajor-caju* em pH 7,0. O pH do meio de cultivo é um dos parâmetros mais estudados em processos de determinação das condições ótimas de produção enzimática, pois influencia diretamente a atividade de biocatalisadores essenciais para o transporte de nutrientes, bem como para o crescimento e a manutenção da estrutura morfológica dos fungos filamentosos (Priyanka & Raju, 2013; Rajput *et al.*, 2016).

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PROTEASES SINTETIZADAS POR *LENTINUS CRINITUS* DPUA 1693

O estudo das características bioquímicas das proteases é importante para determinar a viabilidade comercial destes

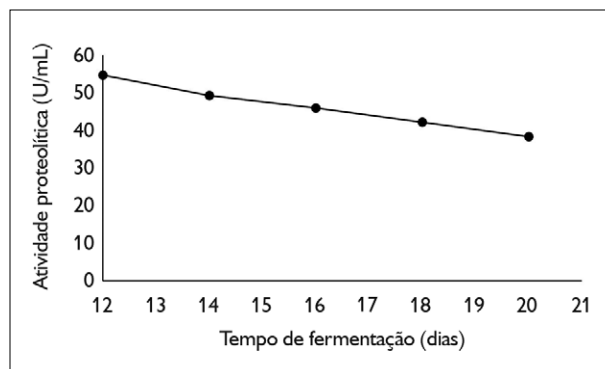


Figura 3. Influência do tempo de fermentação na produção de proteases por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693.

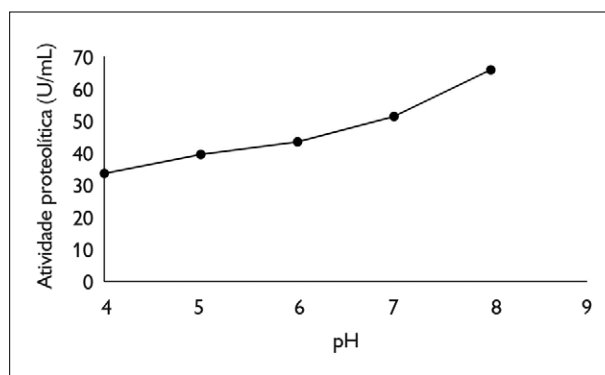


Figura 4. Influência do pH inicial do meio de cultivo na produção de proteases por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693.

biocatalisadores (Sharma *et al.*, 2017). O pH pode causar desnaturação na estrutura da enzima ou modificar o caráter iônico dos substratos, condições que reduzem a interação entre o substrato e a enzima, resultando em redução de atividade catalítica (Salwanee *et al.*, 2013). As proteases de *L. crinitus* DPUA 1693 demonstraram atividade catalítica máxima em pH 6,0 (77,64 U/mL), com decréscimo de atividade nos pH superiores (Figura 5). Fonseca *et al.* (2014) observaram que as proteases de *Pleurotus ostreatoroseus* Singer 1961 DPUA 1720 também agem em pH 6,0. Entretanto, as proteases de *Termitomyces clypeatus* R. Heim 1951 MTCC 5091 e *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo (1994) DPUA 1535 apresentaram atividades significativas em pH 5,0 e 7,0, conforme citado por Majumder *et al.* (2015) e por Machado *et al.* (2017), respectivamente.

A temperatura influencia diretamente na atividade catalítica de uma enzima, mas é considerada um dos parâmetros mais difíceis de serem controlados em bioprocessos em matriz sólida (Nascimento *et al.*, 2015). No presente estudo, foi verificada atividade catalítica máxima em 50 °C (152 U/mL), com declínio de 30% e 33% de atividade a 60 °C e 70 °C, respectivamente (Figura 6). As proteases de *Coprinosopsis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo 2001, *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo 1971 e *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall & Esllyn (1984) também apresentaram significativa atividade a 50 °C, conforme reportado por Zhang *et al.* (2018), Geng *et al.* (2016) e Silva *et al.* (2017), respectivamente.

As proteases de *L. crinitus* DPUA 1693 mantiveram maior estabilidade na faixa de pH 5,0 a 6,0. Em pH superiores, houve redução de atividade, entretanto as proteases demonstraram atividade relativa superior a 75%

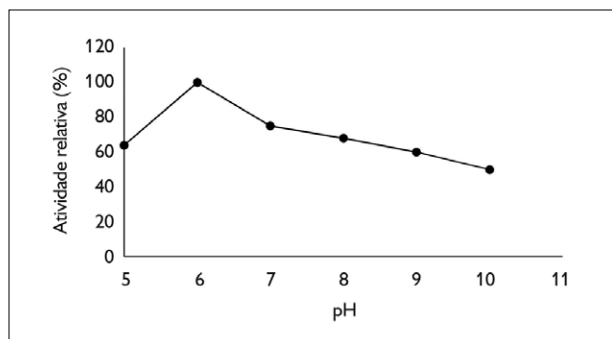


Figura 5. Efeito do pH na atividade proteolítica de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693.

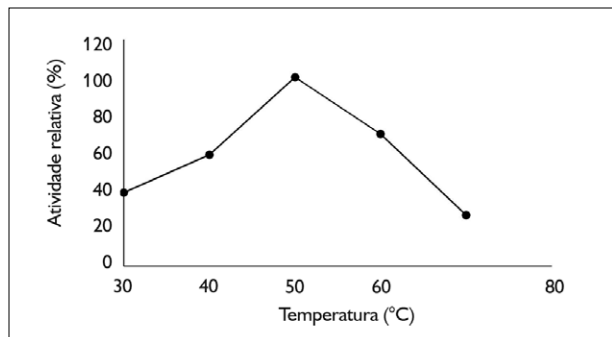


Figura 6. Efeito da temperatura na atividade proteolítica de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693.

(Figura 7). Martim *et al.* (2017) relataram que as proteases de *P. albidus* DPUA 1692 demonstraram estabilidade na faixa de pH 5,0 a 8,0. Silva *et al.* (2017) observaram que as proteases de *P. chrysosporium* mantiveram estabilidade superior a 80% na faixa de pH 3,0 a 8,0. Machado *et al.* (2017) reportaram que as proteases de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 possuem maior estabilidade em pH 8,0.

Nas condições analisadas, as proteases de *L. crinitus* DPUA 1693 mantiveram estabilidade na faixa de 30 °C a 60 °C, com atividades relativas superiores a 80% (Figura 8). Martim *et al.* (2017) também observaram estabilidade das proteases de *P. albidus* DPUA 1692 na faixa de 30 °C a 60 °C, resultados semelhantes aos observados no presente estudo. Machado *et al.* (2017) e Zhang *et al.* (2018) relataram que as enzimas proteolíticas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 e *C. atramentaria* mantiveram estabilidade até 50 °C e 40 °C, respectivamente.

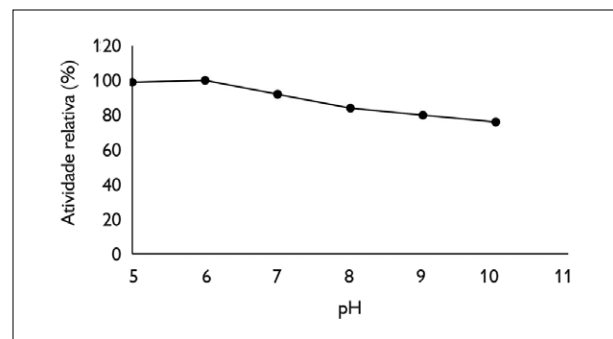


Figura 7. Efeito do pH na estabilidade das proteases de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693.

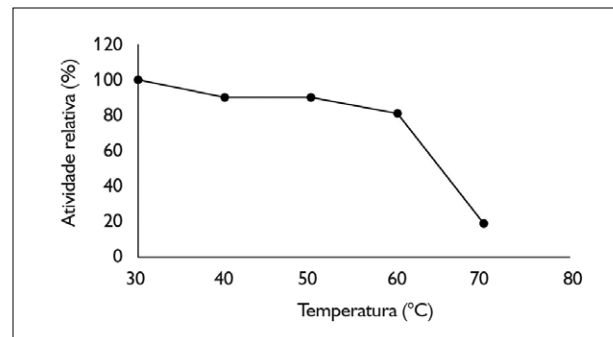


Figura 8. Efeito da temperatura na estabilidade das proteases de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693.

Sharma *et al.* (2017) relataram que diferentes substâncias químicas podem interferir na atividade catalítica das proteases microbianas. O efeito de íons metálicos e de inibidores na atividade das proteases de *L. crinitus* está demonstrado na Tabela 1. Em relação às substâncias inibidoras, pepstatina causou repressão de 57% na atividade proteolítica, sugerindo a presença expressiva de proteases aspárticas no extrato bruto de *L. crinitus* DPUA 1693. Na presença dos demais inibidores, as proteases mantiveram atividade superior a 50%. El-Baky *et al.* (2011), Hsiao *et al.* (2014) e Silva *et al.* (2017) também relataram a produção de proteases aspárticas por *Piptoporus soloniensis* (Dubois) Pilát 1937, *R. oryzae* e *P. chrysosporium*, respectivamente. As proteases aspárticas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos para produção de queijos, produtos de panificação, cervejas e vinhos (Mamo & Assefa, 2018).

No teste de estabilidade frente a íons metálicos, foi verificado que as proteases de *L. crinitus* DPUA 1693 foram estimuladas em 110% na presença de Mn^{2+} , e reprimidas em 98% por Cu^{2+} . Shirasaka *et al.* (2012) e Martim *et al.* (2017) relataram que íons Mn^{2+} estimularam em 54,1% e 16% a atividade proteásica de *A. oryzae* KSK-3 e *P. albidus*

DPUA 1692, respectivamente. Machado *et al.* (2017) e Zhang *et al.* (2018) reportaram que íons Cu^{2+} reprimiram as atividades proteolíticas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 e *C. atramentaria* em 95% e 88,3%, respectivamente.

CONCLUSÃO

O macrofungo *Lentinus crinitus* DPUA 1693 produz, de forma predominante, proteases aspárticas com atividade ótima em pH 6,0, a 50 °C, quando cultivado em farelo de arroz e semente de tucumã. A síntese destes biocatalisadores é influenciada pelo pH inicial do meio de cultivo, tempo de fermentação, idade e tamanho do inóculo. As enzimas proteolíticas de *L. crinitus* DPUA 1693 têm potencial para aplicação na indústria de laticínios, panificação e bebidas.

AGRADECIMENTOS

À Coleção de Culturas DPUA e ao Laboratório de Microbiologia Industrial e Médica, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por terem disponibilizado o macrofungo e todos os materiais e equipamentos necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A. & N. H. ABOOD, 2017. Effect of some growth factors on protease production by *Rhizopus oryzae*. **Al-Nahrain Journal of Science** 20(2): 90-95.
- ALECRIM, M. M., R. A. PALHETA, M. F. S. TEIXEIRA & I. M. A. OLIVEIRA, 2015. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonian fruit waste. **International Journal of Food Science and Technology** 50(1): 151-157. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.12677>.
- AL-JAMMAS, H. A. A., H. AL-FATHI, W. AL-KHALAF & A. TAIFOR, 2016. Study the influence of nitrogen on rennin production by fungi *Rhizomucor miehei* using solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Biological Sciences** 3(5): 193-200. DOI: <https://doi.org/10.21472/bjbs.030517>.
- BANO, S., M. U. DAHOT & S. H. A. NAQVI, 2016. Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. **Pakistan Journal of Biotechnology** 13(3): 193-198.
- BEHERA, S. & N. GUPTA, 2015. Utilization of vegetable waste for biomass production of some wild edible mushroom cultures. **Tropical Plant Research** 2(1): 5-9.

Tabela 1. Efeito de íons e inibidores na atividade proteolítica do extrato enzimático.

Íons e inibidores	Atividade relativa (%)
Controle	100
Ácido iodoacético	89
EDTA	54
PMSF	66
Pepstatina	43
$CaCl_2$	22
$CuSO_4$	2
$FeSO_4$	8
KCl	20
$MgSO_4$	87
$MnSO_4$	210
NaCl	26
$ZnSO_4$	5

- BENSMAIL, S., A. MECHAKRA & F. FAZOUANE-NAIMI, 2015. Optimization of milk-clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus niger* FFB1 in solid-state fermentation. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences** 4(5): 467-472. DOI: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.5.467-472>.
- BOUKHALFA-LEZZAR, H., H. LEGHLIMI, E. COPINET, F. DUCHIRON & A. MECHAKRA-MAZA, 2014. Utilization of tomato pomace as a substrate for neutral protease production by *Aspergillus oryzae* 2220 on solid-state fermentation. **International Journal of Advanced Research** 2(11): 338-346.
- CASTRO, R. J. S., T. G. NISHIDE & H. H. SATO, 2014. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to diferente agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 3(4): 236-245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.06.001>.
- CHANDRASEKARAN, S., S. S. P. KUMARESAN & M. MANAVALAN, 2015. Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from Paddy soil in Thiruvavur District Tamilnadu. **Journal of Applied Biology and Biotechnology** 3(6): 66-69. DOI: <https://doi.org/10.7324/JABB.2015.3610>.
- CHEMERIS, O. V., V. V. RASHEVSKIY, K. A. GALKOVA & M. I. BOYKO, 2016. Strain variability of *Irpex Lacteus* Basidiomycetes in the synthesis of specific milk-clotting proteinases. **Moscow University Biological Sciences Bulletin** 71(4): 222-225. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0096392516040040>.
- DAUDI, S., H. MUKHTAR, A. U. REHMAN & I. U. HAQ, 2015. Production of rennin-like acid protease by *Mucor pusillus* through submerged fermentation. **Pakistan Journal of Botany** 47(3): 1121-1127.
- EL-BAKY, H. A., D. LINKE, M. NIMTZ & R. G. BERGER, 2011. PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus saloniensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 59(18): 10311-10316. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf2021495>.
- FODA, M. S., M. E. MOHARAM, A. RAMADAN & M. A. EI-BENDARY, 2012. Over production of milk clotting enzyme from *Rhizomucor miehei* through adjustment of growth under solid state fermentation conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** 6(8): 579-589.
- FONSECA, T. R. B., J. F. BARRONCAS & M. F. S. TEIXEIRA, 2014. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial** 8(1): 1227-1236. DOI: <https://doi.org/10.3895/S1981-36862014000100008>.
- GENG, X., R. TE, G. TIAN, Y. ZHAO, L. ZHAO, H. WANG & T. B. NG, 2016. Purification and characterization of a novel serine protease from the fruiting bodies of a rare edible medicinal mushroom, *Lyophyllum shimeji* (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms** 18(6): 547-554. DOI: <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i6.90>.
- HANG, F., P. LIU, Q. WANG, J. HAN, Z. WU, C. GAO, Z. LIU, H. ZHANG & W. CHEN, 2016. High milk-clotting activity expressed by the newly isolated *Paenibacillus* spp. strain BD3526. **Molecules** 21(1):1-14. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21010073>.
- HSIAO, N. W., Y. CHEN, Y. C. KUAN, Y. C. LEE, S. K. LEE, H. H. CHAN & C. H. KAO, 2014. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology** 17(2): 89-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.02.002>.
- INÁCIO, F. D., R. O. FERREIRA, C. A. V. ARAÚJO, T. BRUGNARI, R. CASTOLDI, R. M. PERALTA & C. G. M. SOUZA, 2015. Proteases of wood rot Fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International** 2015: 290161. DOI: <https://dx.doi.org/10.1155/2015/290161>.
- JENITTA, X. J., S. E. PRIYA & J. J. GNANADOSS, 2015. Optimization of culture conditions and inducers for improved protease production by *Penicillium griseofulvum* LCJ231 under submerged fermentation. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research** 6(2): 152-160.
- KIELING, A. C., G. P. SANTANA, M. C. SANTOS, H. C. C. JAQTINON & C. C. P. MONTEIRO, 2019. Cadeia do tucumã comercializado em Manaus-AM. **Scientia Amazonia** 8(2): 1-9.
- KUMAR, N. S., P. S. D. SREEJA & A. S. NAIR, 2016. A review on microbial proteases. **International Journal of Advanced Research** 4(7): 2048-2053. DOI: <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/1091>.
- LACAZ, C. S., E. PORTO, J. E. C. MARTINS, E. M. HEINSVACCARI & N. T. MELO, 2002. **Tratado de micologia médica**: 9. ed.: 1-1104. Savier, São Paulo.
- LANKA, S., C. H. ANJALI & M. PYDIPALLI, 2017. Enhanced production of alkaline protease by *Aspergillus niger* DEF 1 isolated from dairy form effluent and determination of its fibrinolytic ability. **African Journal of Microbiology Research** 11(11): 440-449. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2016-8379>.
- LEIGHTON, T. J., R. H. DOI, R. A. J. WARREN & R. A. KELLN, 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology** 76(1): 103-122. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90083-1).
- MACHADO, A. R. G., M. F. S. TEIXEIRA, L. S. KIRSCH, M. C. L. CAMPELO & I. M. A. OLIVEIRA, 2016. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences** 23(5): 621-627. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.002>.
- MACHADO, A. R. G., S. R. MARTIM, M. M. ALECRIM & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. **African Journal of Biotechnology** 16(46): 2160-2166. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16154>.

- MAJUMDER, R., S. P. BANIK, L. RAMRAKHIANI & S. SKHOWALA, 2014. Bioremediation by alkaline protease (AkP) from edible mushroom *Termitomyces clypeatus*: optimization approach based on statistical design and characterization for diverse applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 90(10): 1886-1896. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.4500>.
- MAJUMDER, R., S. P. BANIK & S. KHOWALA, 2015. Purification and characterization of κ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. **Food Chemistry** 173: 441-448. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.027>.
- MAMO, J. & F. ASSEFA, 2018. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. **Journal of Food Quality** 2018: 7957269. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/7957269>.
- MARTIM, S. R., L. S. C. SILVA, M. M. ALECRIM, B. C. SOUZA, I. M. A. OLIVEIRA & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 12(3): 353-362.
- MINITAB, 2010. **Minitab statistical software**. Version 16.0. LEAD Technologies, Inc., [S. l.].
- NAKAMURA, K., N. KOBAYASHI & M. TANIMOTO, 2014. Screening of edible mushrooms producing milk-clotting enzyme. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi** 61(9): 444-447. DOI: <https://doi.org/10.3136/nskkk.61.444>.
- NASCIMENTO, T. P., A. E. SALES, C. S. PORTO, R. M. P. BRANDÃO, G. M. C. TAKAKI, J. A. C. TEIXEIRA, T. S. PORTO & A. L. F. PORTO, 2015. Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research** 3: 81-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/aer.2015.33009>.
- NOVELLI, P. K., M. M. BARROS & L. F. FLEURI, 2016. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry** 198: 119-124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.089>.
- PRIYANKA, P. & K. J. RAJU, 2013. Neutral protease production by *Rhizopus oligosporus* NCIM 1215 under solid state fermentation using mixed substrates of agroindustrial residues. **International Journal of Chemical Sciences** 11(1): 291-305.
- RAJPUT, K., S. CHANYAL & P. K. AGRAWAL, 2016. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from Gymnosperm tree- *Cupressus torulosa* D.DON. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 5(7): 1034-1054.
- RANI, K., R. RANA & S. DATT, 2012a. Review on latest overview of proteases. **International Journal of Current Life Sciences** 2(1): 12-18.
- RANI, R. M., N. N. PRASAD & K. R. S. SAMBASIVARAO, 2012b. Optimization of cultural conditions for the production of alkaline protease from a mutant *Aspergillus flavus* AS2. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences** 3(3): 565-576.
- RAVIKUMAR, G., D. GOMATHI, M. KALAISELVI & C. UMA, 2012. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*: production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 2(1): 411-417. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60198-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60198-1).
- SALWANEE, S., W. M. W. AIDA, S. MAMOT, M. Y. MASKAT & S. IBRAHIM, 2013. Effects of enzyme concentration, temperature, pH and time on the degree of hydrolysis of protein extract from viscera of tuna (*Euthynnus affinis*) by using alcalase. **Sains Malaysiana** 42(3): 279-287.
- SANTHI, R., 2014. Extracellular protease production by solid state fermentation using *Punica granatum* peel waste. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research** 4(6): 2706-2712.
- SHARMA, K. M., R. KUMAR, S. PANWAR & A. KUMAR, 2017. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** 15(1): 115-126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>.
- SHIRASAKA, N., M. NAITOU, K. OKAMURA, M. KUSUDA, Y. FUKUTA & T. TERASHITA, 2012. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience** 53(5): 354-364. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10267-011-0179-3>.
- SILVA, R. R., 2017. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 183(1): 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2427-2>.
- SILVA, R. R., L. C. G. OLIVEIRA, M. A. JULIANO, L. JULIANO, A. H. C. OLIVEIRA, J. C. ROSA & H. CABRAL, 2017. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Food Chemistry** 225: 45-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.009>.
- SINGH, R., A. MITTAL, M. KUMAR & P. K. MEHTA, 2016. Microbial proteases in commercial applications. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences** 4(3): 365-374.
- SOUZA, R. Á. T., T. R. B. FONSECA, L. S. KIRSCH, L. S. C. SILVA, M. M. ALECRIM, R. F. CRUZ FILHO & M. F. S. TEIXEIRA, 2016. Nutritional composition of bioproducts generated from semi-solid fermentation of pineapple peel by edible mushrooms. **African Journal of Biotechnology** 15(12): 451-457. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2015.14960>.
- SUGANTHI, C., A. MAGESWARI, S. KARTHIKEYAN, M. ANBALAGAN, A. SIVAKUMAR & K. M. GOTHANDAM, 2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** 11(1): 47-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.02.002>.

VIJAYARAGHAVAN, P., S. LAZARUS & S. G. P. VINCENT, 2014. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences** 21(1): 27-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.010>.

ZHANG, W., X. GENG, W. CHEN, H. WANG & T. B. NG, 2018. Purification and characterization of a novel protease from the inky cap mushroom, *Coprinopsis atramentaria* (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms** 20(4): 349-358. DOI: <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2018025810>.