

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – ICF
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM



ANTONIO THOMÁS DA SILVA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES PROVENIENTE DE CEPAS
DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO INTESTINO DO INSETO ADULTO
RHYNCHOPHORUS PALMARUM

Maceió
2024

ANTONIO THOMÁS DA SILVA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES PROVENIENTE DE CEPAS
DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO INTESTINO DO INSETO ADULTO
RHYNCHOPHORUS PALMARUM

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos parciais para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Maceió

2024

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB-4/ 661

- S586o Silva, Antonio Thomás da.
Obtenção e caracterização de proteases proveniente de cepas de bactérias isoladas do intestino do inseto adulto *Rhynchophorus Palmarum* / Antonio Thomás da Silva. – 2024.
92 f. : il.
- Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.
Tese (doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular. Maceió, 2024.
- Bibliografia: f. 76-92.
1. Coagulantes do leite. 2. Caracterização enzimática. 3. Proteases microbianas.
4. *Enterococcus faecalis*. 5. *Klebsiella variicola*. I. Título.

CDU: 663.1:637.136



Ata de defesa de tese de doutorado

Aos **vinte e cinco do mês de abril de 2024**, às quatorze horas, reuniu-se, via videoconferência, a banca examinadora composta pelos docentes doutores, Francis Soares Goes, Hugo Juarez Vieira Pereira, Jorge Luiz da Cunha Moraes e Ticiano Gomes do Nascimento, para o **Exame de defesa** da tese de doutorado intitulada: **“Obtenção e caracterização de coagulantes do leite proveniente de colônias isoladas de *enterococcus faecalis* e *klebsiella variicola* retiradas do intestino do inseto adulto *rhynchophorus palmarum*”,** elaboradora pelo doutorando, **Antonio Thomás da Silva**, regularmente matriculado no Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, nível doutorado, sob a orientação do **Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo**. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 18 horas, os examinadores consideram a tese (**X**) **APROVADA** OU () **APROVADA COM RESTRIÇÃO**, emitindo o seguinte parecer: _____

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 18:30 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PMPBqBM-ICF, doutorado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pelo doutorando.

Maceió, 25 abril de 2024

Presidente (Orientador): Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO**
Data: 03/05/2024 14:22:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 **FRANCIS SOARES GOMES**
Data: 17/05/2024 14:50:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Interno: Prof. Dr. Francis Soares Goes

Documento assinado digitalmente
 **HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA**
Data: 16/05/2024 18:19:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Interno: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira

Documento assinado digitalmente
 **JORGE LUIZ DA CUNHA MORAES**
Data: 07/05/2024 11:24:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Interno: Prof. Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes

Documento assinado digitalmente
 **TICIANO GOMES DO NASCIMENTO**
Data: 19/05/2024 22:31:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Externo: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Doutorando: Antonio Thomás da Silva

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO THOMAS DA SILVA**
Data: 06/05/2024 15:22:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão deste trabalho principalmente à minha Mãe: Iolanda da Silva, por todo amor e carinho que me foi dado, pela educação, criação, por ser uma amiga, pelo apoio e compreensão, principalmente nos momentos mais necessários e difíceis da minha vida, sem ela, eu não teria conseguido chegar até aqui. Dedico também às minhas tias: Ana Maria, Conceição da Silva, Eliane da Silva, Iracema da Silva, Maria Cícera e ao meu tio Carlos Antonio, que foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele, nada seria possível. Sei que todas as coisas que aconteceram na minha vida foram provisões divinas e que me moldaram em um ser humano melhor. Para ele toda honra e glória!

Agradeço a minha mãe, Iolanda da Silva, por ter dado a mim todo o apoio e suporte necessário para que eu pudesse alcançar meus objetivos pessoais e profissionais.

Agradeço a todas as minhas tias Ana Maria, Conceição da Silva, Eliane da Silva, Iracema da Silva, Maria Cícera e ao meu tio Carlos Antonio que ajudaram em minha criação e deram todo o apoio familiar que eu preciso.

Agradeço à minha então companheira Jayanne Mayara Magalhães de Melo, por todo o apoio, carinho e incentivo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo por ter me dado a oportunidade de participar dos projetos científicos durante a graduação, por ter aceitado continuar me orientando durante o Mestrado, pela confiança que em mim foi depositada no Doutorado e pelos conhecimentos que me foram transmitidos. Deixo registrado o meu profundo agradecimento.

Gostaria de agradecer também aos Prof. Dr. Valter Alvino Da Silva e Prof. Dra. Lara Mendes de Almeida pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

*Agradeço aos amigos do Laboratório de Bioquímica metabólica: Camilla Camerino, João Carlos, Mariana De Macedo, Meirielly Holanda e em especial ao meu amigo Rodrigo Calumby. Agradeço também ao grupo paralelo denominado “**Apartamento Salvador**” composto por Thays Fontes, Erika Gilmará, Larissa Costa, Luana da Conceição, Ana Valéria, pelas boas conversas e conselhos. E um agradecimento mais que especial para meu amigo/companheiro de jornada/ professor/conselheiro Josiel Santos, que muitas vezes me ajudou sem pestanejar quando eu mais precisei.*

Agradeço também aos amigos que acabei fazendo em outros laboratórios: Elizabeth Costa, Marta Angelo, Vinicius Eduardo, João Lucas, Erica Caroline, Nícolas Menezes, Fabiana Albuquerque, Janaína Kívia, Alexsandra Ferreira, Tatiele Pereira, Camila Chicuta; Marcos Oliveira, Arthur Luy, Amanda Barbosa, Ariana Santos, Clinston Paulino, João Victor, Vacilaine Texeira, Juliana Almerino, Ingrid Vieira,

Rodolfo Arruda. Gostaria de deixar um agradecimento especial para Cledson Barros, Claudio Wilian, Kleyton Ritomar e Andréa Carla por todos os conselhos, por todas as conversas, por todo o apoio, vocês sempre me fizeram seguir em frente!

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Alagoas e aos órgãos de fomento capes, CNPq, FAPEAL pelo apoio a nossa pesquisa.

RESUMO

SILVA, A. T. **Obtenção e caracterização de proteases proveniente de cepas de bactérias isoladas do intestino do inseto adulto *Rhynchophorus palmarum*.** 2024. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2024.

A indústria de alimentos é um dos pilares da economia brasileira, com os laticínios se destacando como um dos setores mais relevantes. Nesse contexto, as enzimas desempenham um papel crucial na produção de laticínios, especialmente na coagulação do leite para a fabricação de queijos. A busca por alternativas às enzimas de origem animal tem impulsionado a pesquisa por coagulantes de origem microbiana, destacando a importância do estudo desses microrganismos para a produção de enzimas de interesse biotecnológico na indústria alimentícia. Nesse sentido, o presente estudo se propôs a utilizar cepas de *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella variicola* retiradas do intestino do inseto adulto *Rhynchophorus palmarum* para obtenção e caracterização de proteases capazes de coagular o leite. Foram preparados extratos enzimáticos das cepas bacterianas em tampão Tris-HCl 50mM, pH 8.0, e realizados ensaios de pH, temperatura, inibição, efeitos dos diferentes substratos, eletroforese, zimografia e coagulação do leite em pó desnatado. As cepas de *K. variicola* e *E. faecalis* apresentam diferenças em seus parâmetros bioquímicos, com atividades e características distintas. Enquanto *K. variicola* mostra atividade em AZOCASEÍNA e apresenta pH ótimo de 8 e temperatura ótima de 50°C, a cepa de *E. faecalis* exibe atividade em AZOCASEÍNA e SAAPFpNA, com pH ótimo entre 7, 8 e 9, e temperatura ótima de 50°C. Em relação aos inibidores, *K. variicola* é inibida por EDTA e DTT, enquanto *E. faecalis* é inibida por PMSF. Ambas as enzimas apresentam temperatura ótima de 50°C para atividade coagulante, mas diferem na concentração proteica mínima (0,5 µg para *K. variicola* e 10 µg para *E. faecalis*) e na concentração mínima de cálcio (2mM para *K. variicola* e 8mM para *E. faecalis*) para atividade coagulante. Dessa forma, o estudo conclui que é possível obter proteases proveniente de cepas bacterianas da microbiota do inseto adulto *R. palmarum* capazes de coagular o leite, destacando a viabilidade dessas fontes alternativas de coagulantes na indústria de laticínios.

Palavras-chaves: coagulantes do leite; caracterização enzimática, proteases microbianas, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella variicola*.

ABSTRACTS

SILVA, A. T. **Production and characterization of proteases from bacterial strains isolated from the gut of the adult insect *rhynchophorus palmarum***. 2024. Thesis (Ph.D.) – Institute of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió, 2024.

The food industry is a cornerstone of the Brazilian economy, with dairy products standing out as one of the most significant sectors. Within this context, enzymes play a crucial role in dairy production, particularly in the coagulation of milk for cheese manufacturing. The search for alternatives to animal-derived enzymes has propelled research into microbial coagulants, highlighting the importance of studying these microorganisms for the production of biotechnologically relevant enzymes in the food industry. In this regard, the present study aimed to use strains of *Enterococcus faecalis* and *Klebsiella variicola* extracted from the gut of the adult insect *Rhynchophorus palmarum* for the production and characterization of proteases capable of coagulating milk. Enzymatic extracts from bacterial strains were prepared in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and assays for pH, temperature, inhibition, effects of different substrates, electrophoresis, zymography, and coagulation of skimmed milk powder were conducted. The strains of *K. variicola* and *E. faecalis* displayed differences in their biochemical parameters, with distinct activities and characteristics. While *K. variicola* showed activity in AZOCASEIN and had an optimal pH of 8 and an optimal temperature of 50°C, the *E. faecalis* strain exhibited activity in AZOCASEIN and SAAPFpNA, with an optimal pH between 7, 8, and 9, and an optimal temperature of 50°C. Regarding inhibitors, *K. variicola* is inhibited by EDTA and DTT, whereas *E. faecalis* is inhibited by PMSF. Both enzymes have an optimal temperature of 50°C for coagulant activity, but differ in the minimum protein concentration (0.5 µg for *K. variicola* and 10 µg for *E. faecalis*) and minimum calcium concentration (2 mM for *K. variicola* and 8 mM for *E. faecalis*) for coagulant activity. Thus, the study concludes that it is possible to obtain proteases from bacterial strains of the microbiota of the adult insect *R. palmarum* capable of coagulating milk, underscoring the viability of these alternative sources of coagulants in the dairy industry.

Keywords: milk coagulants; enzymatic characterization; microbial proteases; *Enterococcus faecalis*; *Klebsiella variicola*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da estrutura da submicela e micela de caseína.....	24
Figura 2 - Representação da coagulação ácida por uma bactéria fermentadora de ácido láctico.	26
Figura 3 - Representação da coagulação enzimática do leite por uma protease.....	27
Figura 4 - Representação esquemática da atuação de endopeptidases e exopeptidases...	33
Figura 5 - Representação ilustrada do sítio ativo de uma Cisteínoprotease.	34
Figura 6 - Representação ilustrada do sítio ativo de uma aspárticoprotease.....	35
Figura 7 - Representação ilustrada do sítio ativo de uma metaloprotease.	36
Figura 8 - Representação ilustrada do sítio ativo de uma serinoprotease.	37
Figura 9 - Ilustração da simbiose entre cupins e protozoários flagelados celulolíticos.....	42
Figura 10 - Ilustração esquemática dos fatores de virulência e patogenicidade do gênero <i>Klebsiella</i> spp.....	45
Figura 11 - Imagem do microscópio eletrônico de <i>Enterococcus faecalis</i> apresentando arranjo de cocos isolados e diplococos.....	47
Figura 12 - Atividade hidrolítica dos extratos enzimáticos das cepas <i>Klebsiella variicola</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> . A) frente ao substrato azocaseína B) frente aos substratos enzimáticos BApNA , SAAPLpNA e SAAPFpNA	61
Figura 13 - Quantificação da atividade proteolítica dos EBacs de <i>Klebsiella variicola</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> frente ao substrato azocaseína em diferentes pH: tampão acetato (pH 4-5); tampão fosfato (6-7); tampão Tris-HCl (8) e tampão de glicina (9-11).	63
Figura 14 - Quantificação da atividade proteolítica dos EBacs de <i>Klebsiella variicola</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> frente ao substrato azocaseína em diferentes temperaturas (20 – 80°C).	64
Figura 15 - A e C representa eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 14% corado com prata dos EBac de <i>K. variicola</i> e <i>E. faecalis</i> respectivamente; B e D representa zimografia gel de poliacrilamida 14% (contendo SDS + 0.25% de caseína) corado com comassie blue dos EBacs de <i>K. variicola</i> e <i>E. faecalis</i> respectivamente.....	67
Figura 16 - Ensaio de coagulação em leite em pó desnatado Ebac <i>Klebsiella variicola</i> , usando diferentes concentrações proteicas do extrato. A) ensaio realizado a 37°C por 1 hora; B) ensaio realizado a 50°C por 1 hora.	69
Figura 17 - Ensaio de coagulação em leite em pó desnatado Ebac <i>Enterococcus faecalis</i> , usando diferentes concentrações proteicas do extrato A) ensaio realizado a 37°C por 1 hora; B) ensaio realizado a 50°C por 1 hora.	70
Figura 18 - A) ensaio de influência da concentração de cálcio para atividade coagulante de 0,5 µg de proteína do EBac <i>Klebsiella variicola</i> a 50°C por 1 hora; B) ensaio de influência da concentração de cálcio para atividade coagulante de 10µg de proteína do EBac <i>Enterococcus faecalis</i> a 50°C por 1 hora.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes encontrados no leite materno e bovino.	21
Tabela 2 - Conteúdo das frações de proteínas presentes no leite.	22
Tabela 3 - Microrganismos produtores de proteases.	38
Tabela 4 - Fracionamento salino do extrato de enzimas bacteriológicos <i>Enterococcus faecalis</i>	53
Tabela 5 - Sistema de Partição Trifásica do extrato de enzimas bacteriológicos <i>Enterococcus faecalis</i>	54
Tabela 6 - Atividade residual enzimática dos EBacs de <i>Klebsiella variicola</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> frente ao substrato azocaseína após a adição de diferentes inibidores.....	66
Tabela 7 - Resumo comparativo dos resultados obtidos com os EBacs das cepas de bactérias de <i>Klebsiella variicola</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BAPNA	N-a-benzoyl-L-Arginine-p-nitroanilide
DMSO	Dimetiusufóxido
DTT	Ditiotreitol
EBac	Extrato de enzimas bacteriológico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra – Acético
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
MAC	do inglês milk-clotting enzyme
min	Minutos
mg/mL	Miligrama/mililitro
mL	Mililitros
m/m	Razão massa/massa
NC-IUBMB	Comitê de Nomenclatura União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
pH	Cologaritmo da atividade de íons hidrônio
PIB	Produto Interno Bruto
PMSF	Fluoreto de Fenilmetil Sulfonil
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS – PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
UAC	Unidade de atividade coagulante
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E LATICÍNIOS	18
2.2 LEITE	19
2.2.1 ASPECTOS GERAIS	19
2.2.2 PROTEÍNA E OUTROS COMPONENTES DO LEITE	20
2.2.3 CASEÍNA	23
2.3 COAGULAÇÃO DO LEITE	25
2.4 COAGULANTES DO LEITE	28
2.4.1 COAGULANTES DE ORIGEM ANIMAL	29
2.4.2 COAGULANTE DE ORIGEM VEGETAL	30
2.4.3 COAGULANTE DE ORIGEM MICROBIANA	30
2.5 PROTEASES	32
2.5.1 CISTEÍNOPROTEASES	33
2.5.2 ASPÁRTICOPROTEASES	34
2.5.3 METALOPROTEASES	35
2.5.4 SERINOPROTEASES	37
2.6 PROTEASES MICROBIANAS	38
2.7 MICROBIOTA INTESTINAL DE INSETOS.....	41
2.8 ENTEROBACTÉRIAS	43
2.8.1 <i>KLEBSIELLA VARIICOLA</i>	44
2.9 ENTEROCOCCUS.....	46
2.9.1 <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	47
3 OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4 METODOLOGIA	50
4.1 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DO INSETO ADULTO <i>RYNCHOPHORUS PALMARUM</i>	50
4.2 CEPAS BACTERIANAS CULTIVÁVEIS DO TRATO DIGESTIVO DE <i>R. PALMARUM</i>	50
4.2.1 OBTENÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS	50
4.2.2 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE PROTEASES COM ATIVIDADE CASEINOLÍTICA.....	50
4.2.3. IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS SELECIONADAS.....	51
4.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	51
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA USANDO O SUBSTRATO AZOCASEÍNA	52
4.5 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS EXTRATOS DE ENZIMAS BACTERIOLÓGICAS	52

4.6 PRECIPITAÇÃO SALINA COM SULFATO DE AMÔNIO (NH₄)₂SO₄ E MÉTODO TRIFÁSICO (TPP) (ENTEROCOCCUS FAECALIS)	53
4.6.1 PRECIPITAÇÃO SALINA COM SULFATO DE AMÔNIO.....	53
4.6.2 MÉTODO SISTEMA DE PARTIÇÃO TRIFÁSICA (TPP)	54
4.7 ENSAIO DE CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	55
4.7.1 ENSAIO COM DIFERENTES SUBSTRATOS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.	55
4.7.2 INFLUÊNCIA DO PH.....	55
4.7.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	56
4.7.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO	56
4.8 ELETROFORESE SDS-PAGE E ZIMOGRÁFICA	57
4.8.1 GEL POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.....	57
4.8.2 ZIMOGRÁFICA.....	58
4.9 ENSAIO DE COAGULAÇÃO EM LEITE DESNATADO	58
4.9.1 ENSAIO DE PARÂMETROS MÍNIMOS IDEAIS PARA COAGULAÇÃO DE LEITE EM PÓ DESNATADO.	58
4.9.2 ENSAIO EFEITO DO CÁLCIO	59
4.9.3 CÁLCULO DA ATIVIDADE COAGULANTE.....	59
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 60
 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	60
5.1.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE AOS DIFERENTES SUBSTRATOS	60
5.1.2 INFLUÊNCIA DO PH.....	62
5.1.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	63
5.1.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.	65
5.2 ELETROFORESE SDS-PAGE E ZIMOGRÁFICA	66
5.3 ENSAIO DE COAGULAÇÃO	68
5.4 INFLUÊNCIA DO CÁLCIO	70
5.5 COMPILADO DOS RESULTADOS.....	72
 6 CONCLUSÃO	 74
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 76

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos é um pilar essencial da economia brasileira, sendo uma das cadeias produtivas mais consolidadas e vitais do país. Em 2017, o setor registrou um faturamento expressivo de aproximadamente R\$520,7 bilhões, correspondendo a 7,9% do PIB e a 20,1% do valor bruto da produção, demonstrando sua importância econômica (Viana, 2019). Entre os segmentos alimentícios, os laticínios se destacam como o terceiro setor mais relevante, superado apenas pelos derivados da carne e dos cereais e bebidas (ABIA, 2018; GDP, 2017).

O Brasil se posiciona como o quarto maior produtor mundial de leite *in natura*, alcançando 950 milhões de toneladas em 2022, segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), contribuindo significativamente para a produção agropecuária nacional (FAO, 2023). No entanto, a produção de laticínios não seria possível sem o papel crucial das enzimas na indústria, especialmente na produção de queijos, onde as enzimas coagulantes desempenham um papel fundamental (Silva; Cortez, 2021).

A busca por alternativas às enzimas de origem animal, como a quimosina, tem impulsionado a pesquisa por coagulantes de origem microbiana, tornando os preferidos pela indústria devido à sua semelhança na coagulação do leite (Mcsweeney *et al.*, 2017; Tabayehnejad; Castillo; Payne, 2012). Contudo, a pesquisa enfrenta desafios, como a menor especificidade dessas enzimas e alterações organolépticas nos queijos. Estudos com microrganismos, como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavo furcatise* e até mesmo *Escherichia coli*, têm buscado desenvolver enzimas coagulantes específicas para a indústria de laticínios, evidenciando o potencial dos fungos e bactérias, especialmente do gênero *Aspergillus* e *Bacillus*, como fontes de enzimas coagulantes (Kumar *et al.*, 2010; Mohanty *et al.*, 1999).

Por outro lado, a associação de insetos com microrganismos também é um fenômeno comum, sendo que cerca de 15 a 20% das espécies de insetos possuem alguma forma de associação com microrganismos em seu intestino (Muhammad *et al.*, 2019). O intestino e as funções digestivas dos insetos representam um modelo altamente informativo para compreender o seu metabolismo. Assim, a associação com os microrganismos acaba apresentando um ponto crucial na digestão e aproveitamento de nutrientes em dietas complexas, contribuindo para a adaptação e

sobrevivência dos insetos em diferentes ambientes (Hirose; Panizzi, 2009). O estudo desses microrganismos pode ser fundamental para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, abrindo portas para novas descobertas e aplicações na indústria alimentícia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Indústria de alimentos e laticínios

A indústria de alimentos sempre teve um papel fundamental para a economia do Brasil, sendo uma das cadeias produtivas mais tradicionais do nosso país. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Alimentação (ABIA, 2019), no ano de 2017, o setor alimentício brasileiro faturou cerca de R\$520,7 bilhões, o que corresponde a 7,9% do PIB daquele ano e a 20,1% do valor bruto da produção. Esse desempenho robusto destaca a importância e o impacto significativo que a indústria de alimentos tem na economia nacional (Viana, 2019). Também é o setor que mais consome enzimas com finalidade biotecnológica no mundo (Garg; Sehrawat; Yadav, 2016).

As enzimas são essenciais em várias etapas e setores da produção alimentícia, sendo amplamente utilizadas em panificação, em bebidas, suplementos dietéticos, entre outros produtos. Devido às características das enzimas em condições específicas (atividade catalítica, pH, temperatura, pressão) resultando em maior eficiência na conversão de produtos, a demanda por esse tipo de material vem aumentando ao longo dos anos (Fernandes; Carvalho, 2016).

Na indústria de alimentos, o setor de laticínios ocupa uma posição de destaque na economia brasileira, ficando em terceiro lugar, atrás apenas dos setores de derivados da carne, dos cereais e bebidas (chás e cafés), refletindo a importância do setor no panorama econômico do país (ABIA, 2018). Em 2022, o Brasil se destacou como o quarto maior produtor mundial de leite *in natura*, alcançando a marca de 950 milhões de toneladas (FAO, 2023). Essa produção manteve-se relevante, estando entre as seis atividades agropecuárias mais importantes, contribuindo com 5,15% do valor bruto da produção agropecuária nacional (MAPA, 2024). No contexto da indústria de laticínios, as enzimas desempenham um papel crucial, aproveitando as condições ideais para reações biológicas proporcionadas pela composição do leite (Justina; Justina, Skoronsk, 2018). Esses dados ressaltam a importância do setor de laticínios no Brasil e a importância das enzimas na sua cadeia produtiva.

O leite é uma das *commodities* agropecuárias mais importantes do Brasil e do mundo, estando entre os produtos mais comercializados, tanto em termos de quantidade quanto de valor agregado. Isso se deve ao fato do leite e seus derivados

estarem presente no cotidiano de milhões de pessoas em várias refeições do dia. cerca de um bilhão de pessoas dependem diretamente da cadeia produtiva do leite para sua sobrevivência, com cerca de 600 milhões delas trabalhando em fazendas leiteiras e indústrias de laticínios por todo o mundo. Isso significa que aproximadamente 10% da população global depende deste setor da agropecuária e indústria alimentícia (GDP, 2017).

O aumento na demanda por produtos lácteos tem impulsionado mudanças na gestão do setor para atender a um mercado mais exigente. Esse avanço foi possível graças a investimentos governamentais, em conjunto com o Ministério da Agricultura e as universidades, que proporcionaram suporte técnico e científico. Essas iniciativas resultaram na criação do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL), com o objetivo de elevar a qualidade dos produtos lácteos, garantir a saúde pública e aumentar a competitividade nos novos mercados (Silva; Cortez, 2021).

2.2 Leite

2.2.1 Aspectos gerais

O leite é uma mistura complexa e homogênea contendo diversas substâncias, sendo reconhecido como um alimento de excepcional valor nutritivo para os seres humanos. Sua composição inclui lactose, gorduras, proteínas, sais minerais, vitaminas, enzimas, entre outros componentes. Alguns desses componentes estão em emulsão, como as gorduras e as substâncias associadas, enquanto outros estão em suspensão coloidal, como no caso das caseínas ligadas a sais minerais, e ainda há os que estão em solução verdadeira, como lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro e sais minerais (Pelczar Junior *et al*, 1997).

Devido a essa rica composição, o leite é considerado o mais nobre dos alimentos e é indispensável para a alimentação de crianças, adultos e idosos, sendo também, um meio de cultura riquíssimo (Müller *et al*. 2002; Calfe; Langoni, 2015). O leite por sua vez, é altamente suscetível a alterações físico-químicas e à deterioração por microrganismos de diversas fontes (Tavares, 1996). A qualidade final do leite pode ser influenciada por fatores intrínsecos, como a raça do animal, o período de lactação, a dieta e o estado de saúde do animal, além de fatores extrínsecos ao longo da cadeia de produção, como o manejo e higiene da ordenha, a velocidade e a temperatura de resfriamento, o transporte e o armazenamento adequado (Walstra *et al.*, 2005).

Devido a esses fatores, há uma preocupação por parte de acadêmicos, pesquisadores e autoridades ligadas à saúde e biotecnologia de alimentos em relação à qualidade do leite. Isso se deve principalmente aos riscos de veiculação de microrganismos patogênicos e deterioradores, o que pode comprometer a segurança alimentar (Maciel *et al*, 2003).

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal Brasil (1980), estabelece quais os padrões físico-químicos e microbiológicos que o leite deve ter quando destinado ao consumo, considerando impróprio todo e qualquer produto que não atenda a esses padrões. É importante salientar que o leite não deve ser consumido no seu estado cru/ *in natura*, pois pode conter microrganismos prejudiciais à saúde humana. Nesse sentido, a Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002, foi criada para estabelecer os padrões para o leite pasteurizado, classificando-o como tipo A, B e C, de acordo com o grau de higiene na ordenha, no resfriamento, no acondicionamento e no transporte do leite (De Moraes, 2002).

A pasteurização do leite tem como principal objetivo a destruição total da flora microbiana patogênica e da maioria dos agentes microbiológicos, sem alterar significativamente a constituição física, o equilíbrio químico, os elementos bioquímicos e as propriedades organolépticas normais do leite, garantindo assim a sua qualidade de conservação (Marth, 1985). Além disso, a obtenção higiênica do leite e as práticas adequadas de manipulação, resfriamento e transporte são fundamentais para manter a boa qualidade microbiológica e nutritiva do leite cru (Souza *et al.*, 1995).

2.2.2 Proteína e outros componentes do leite

O leite é considerado uma secreção das glândulas mamárias, sendo uma mistura viscosa de líquido e partículas em suspensão, formando uma emulsão natural que permanece estável em condições normais de temperatura ou refrigeração (Sgarbieri, 2004). Sua composição pode variar de acordo com a estação do ano, diferenças entre raças de animais, estágio de lactação e sistema de alimentação, contendo geralmente 87% de água e 13% de sólidos, dos quais aproximadamente 4,0% são gordura, 3,3% proteína, 4,6% lactose, além de minerais (0,7%) e vitaminas (Sgarbieri, 2005). Podemos então observar na tabela 1 a composição padrão do leite materno e do leite de vaca.

Tabela 1 - Componentes encontrados no leite materno e bovino.

Composição média	Leite materno	Leite bovino
Água (g/L)	870	870
Proteínas (g/L)	16	35
Caseínas (g/L)	5 a 7	27
Lipídios (g/L)	35	35 a 40
Ác. graxos essenciais(g/L)	3,5	1
Carboidratos (g/L)	76	51
Lactose (g/L)	70	49
Minerais (g/L)	2,1	7
Vitaminas		
C mg/100 mL	4	2,1
B1 µg/100 mL	16	40
B2 µg/100 mL	40	150
B12 µg/100 mL	0,18	0,5
A UI/100 mL	250	160
D UI/100 mL	0,4 a 5,0	0,3 a 4,0
E µg/100 mL	1.000	60 a 15

Fonte: *apud* Vidal; Netto (2018).

Esses componentes mantêm um equilíbrio estável entre si, essencial para a identificação de problemas que possam alterar a composição do leite. Uma redução significativa na concentração de lactose ou sólidos totais pode indicar adição fraudulenta de água após a ordenha, resultando em alterações detectáveis nas propriedades físicas do leite em laboratório. Essas variações afetam não apenas as características organolépticas, como cor, sabor, aroma e textura, mas também as propriedades nutricionais e tecnológicas, impactando a capacidade do leite de ser transformado em produtos lácteos seguros e de manter suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais ao longo de sua vida útil (Vidal; Netto, 2018).

As proteínas do leite desempenham um papel fundamental como veículos naturais de nutrientes essenciais, fornecendo cálcio, fósforo, aminoácidos e componentes do sistema imunológico, como imunoglobulinas e lactoferrina, ao recém-nascido (Livney, 2010). Elas constituem a fração nitrogenada do leite, sendo divididas em duas grandes classes: 80% de caseínas e 20% de proteínas do soro, como a β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina, enquanto o outro grupo é composto por substâncias nitrogenadas não proteicas como podemos ver na tabela 2 (Diaz Gonzalez; Durr; Fontaneli, 2001).

Tabela 2 - Conteúdo das frações de proteínas presentes no leite.

Proteína	Concentração (g/L)	% proteína total
Caseínas	24 – 28	80
αs-caseínas	15 – 19	42
αs1	12 – 15	34
αs2	3 – 4	8
β-caseínas	9 – 11	25
κ-caseínas	3 – 4	9
γ-caseínas	1 – 2	4
Proteínas do soro	5 – 7	20
β-lactoglobulinas	2 – 4	9
α-lactoalbuminas	1 – 1,5	4
Proteoses-peptonas	0,6 - 1,8	4
Proteínas do sangue	-	3
Albumina do soro	0,1 - 0,4	1
Imunoglobulinas	0,6 -1,0	2

Fonte: *apud* Vidal; Netto (2018).

As proteínas do soro são aquelas que permanecem solúveis no soro do leite após a precipitação da caseína a um pH de 4,6 e temperatura de 20°C (Farrell JR et al., 2006). Elas são predominantemente globulares, altamente hidrofóbicas e possuem cadeias peptídicas densamente dobradas. Os principais componentes das proteínas do soro são a α-lactoalbumina e a β-lactoglobulina (Phadungath, 2005).

Essas mesmas proteínas desempenham papéis essenciais na nutrição e no desenvolvimento do ser humano. A α-lactalbumina, segundo peptídeo mais abundante no leite bovino, representando de 15% a 25% do peptídeo do soro, é de fácil digestão e funciona como subunidade da enzima lactose-sintetase, precursora da biossíntese de lactose no tecido mamário. Além disso, ela possui a capacidade de se ligar a minerais, como cálcio e zinco, potencialmente melhorando sua absorção (Kelleher et al. 2003; Lönnardal, 2003).

Já a β-lactoglobulina, é considerada o peptídeo de maior quantidade do soro, compreendendo de 45% a 57%, sendo bastante resistente à ação de ácidos e enzimas proteolíticas no estômago, tem sua absorção no intestino delgado. Com cerca de 25,1% de aminoácidos de cadeia ramificada, a β-lactoglobulina é também uma importante transportadora de retinol materno para os filhotes (De Wit, 1998). Embora sua função exata seja desconhecida, ela desempenha um papel crucial na nutrição.

No entanto, quando não são totalmente digeridas, algumas proteínas do soro podem desencadear reações alérgicas, conhecidas como alergia às proteínas do leite, mais comumente associada à β -lactoglobulina (Monaci *et al.*, 2006).

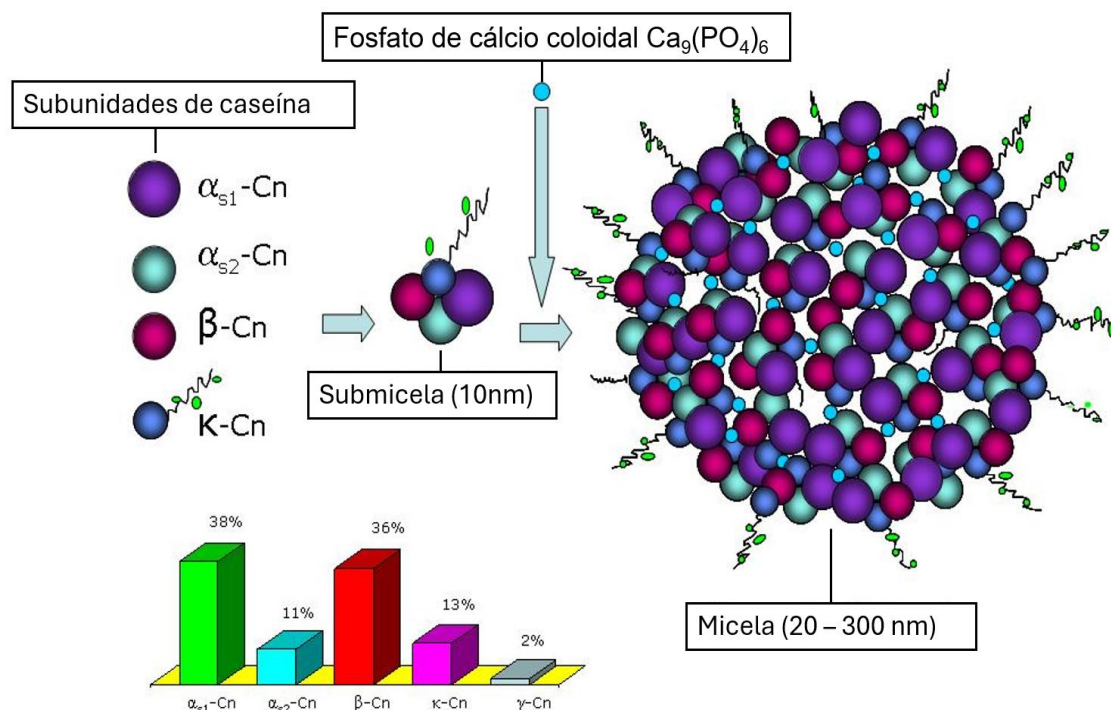
Além disso, as proteínas do soro incluem uma variedade de outras substâncias, como albumina, imunoglobulinas, peptonas de protease, enzimas e proteínas com funções metabólicas específicas, como lisozima e lactoferrina. Essas proteínas desempenham papéis essenciais no sistema imunológico, na digestão e na absorção de nutrientes, destacando a importância das proteínas do soro para a saúde e o desenvolvimento adequado (Walstra, 1999).

2.2.3 Caseína

As caseínas, presentes no leite, desempenham uma função crucial na glândula mamária ao transportar cálcio, fosfato e proteínas essenciais para os filhotes (De Kruif; Holt, 2003). Representando cerca de 80% das proteínas do leite, as caseínas são fosfoproteínas com uma estrutura aberta e flexível. Elas são relativamente hidrofóbicas e formam micelas com quatro subunidades principais (α s1-, α s2-, β - e κ -caseína), com diâmetros de 15 a 20 nm, conforme ilustrado na figura 1 (Silva *et al.*, 2019). Essas subunidades constituem aproximadamente 38%, 10%, 35% e 15% das caseínas, respectivamente. Cada uma delas é composta por um número específico de resíduos de aminoácidos (199, 207, 209 e 169, respectivamente), com pesos moleculares distintos (23, 25, 24 e 19kDa, respectivamente). Além disso, as caseínas contêm aproximadamente 8% de fosfato de cálcio coloidal (Dalglish, 2011).

Aproximadamente 95% da caseína presente no leite está na forma de micelas, que são partículas coloidais responsáveis pela estabilidade térmica do leite (Fox; Brodtkorb, 2008). Essas micelas são estruturas complexas, compostas principalmente por α s1-, α s2-, e β -caseína, nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal e κ -caseína, esta última localizada preferencialmente na superfície das micelas (Dalglish, 2011). O fosfato coloidal (CCP - colloidal calcium phosphate), que apesar do nome, não é composto apenas de fosfato cálcico, mas também de citrato, magnésio e outros elementos minerais. As micelas acabam adotando um formato esférico e um diâmetro que varia entre 40 μ m e 300 μ m ou mais, sendo também bastante hidratadas (Vidal; Netto, 2018).

Figura 1- Representação da estrutura da submicela e micela de caseína.



Fonte: Adaptado de Test Kappa, 2010.

O arranjo da estrutura micelar das subunidades de caseína é crucial para a digestão do leite no estômago e no intestino, além de conferir resistência aos tratamentos térmicos industriais e estabilidade aos derivados lácteos durante o armazenamento nas prateleiras do comércio varejista. Isso ocorre porque alterações, principalmente na concentração de κ -caseína e de cálcio iônico do leite, podem levar à formação de precipitados e perda dos produtos (Vidal; Netto, 2018).

A caseína α_{s1} e α_{s2} tende a precipitar em níveis muito baixos de cálcio, embora a α_{s2} caseína seja a mais sensível delas à precipitação pelo Ca^{2+} . Por outro lado, a κ -caseína, sendo uma glicoproteína com apenas um grupo fosfoserina, é estável na presença de íons de cálcio e desempenha um papel crucial na estabilidade da micela de caseína. Já a β -caseína, mais fosforilada que a κ -caseína, é mais sensível a altas concentrações de sais de cálcio, embora seja menos sensível à precipitação com cálcio do que as caseínas α_{s1} e α_{s2} (Walstra, 1999).

2.3 Coagulação do leite

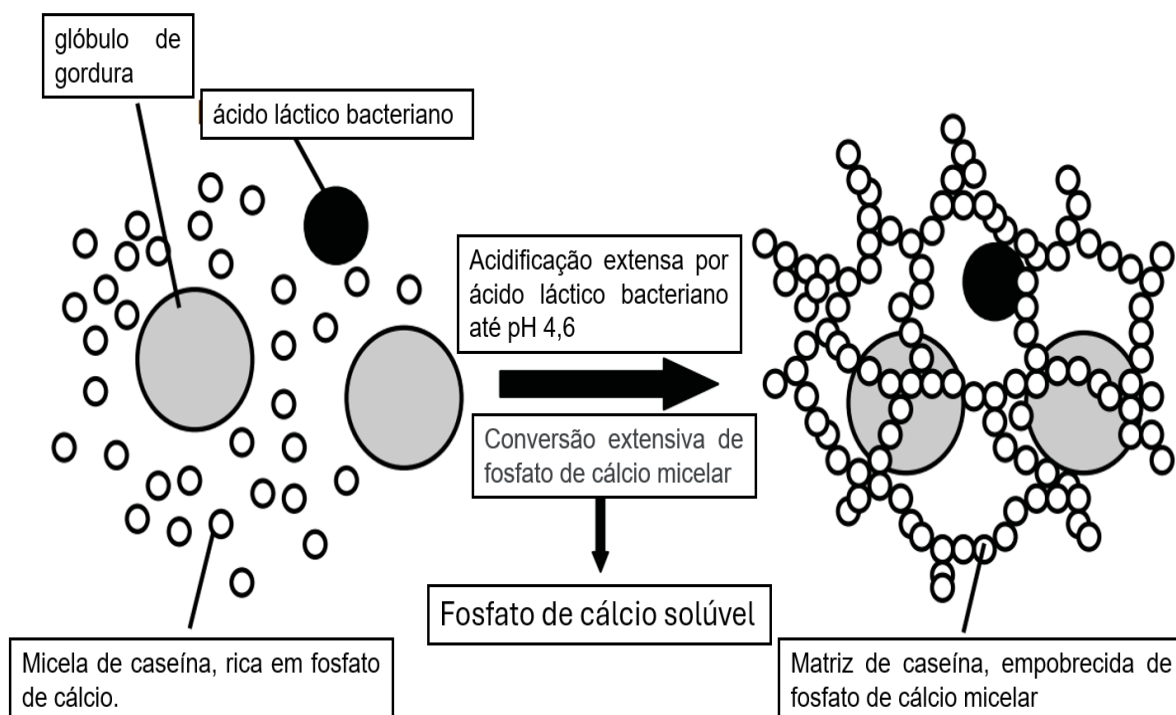
Quando a estrutura micelar se desfaz, as micelas se dissociam e a caseína se torna insolúvel, formando um coágulo gelatinoso, que é a base para a produção de produtos lácteos não fluídos. Durante esse processo, a caseína e a gordura são concentradas, enquanto os outros componentes são removidos com o soro. Essas mudanças ocorrem por meio de alterações físico-químicas nas micelas de caseína, que podem ser causadas por acidificação ou por ação enzimática (Troch *et al.*, 2017)

A coagulação por acidificação é um processo biológico que pode ser alcançado de duas maneiras. Uma delas é através da acidificação biológica, na qual microrganismos são adicionados ao leite para produzir enzimas que convertem a lactose em ácido láctico por meio da fermentação. A outra forma é pela adição direta de ácidos ao leite, como ácido láctico, ácido cítrico ou glucona- δ -lactona. Por outro lado, a coagulação por hidrólise das micelas de caseína ocorre pela adição de enzimas específicas, conhecidas como coalho ou coagulante, sendo esta última abordagem mais amplamente empregada em comparação à coagulação ácida. Os coagulantes são geralmente enzimas obtidas do estômago de ruminantes e contêm duas enzimas principais, a quimosina e a pepsina (De Paula; De Carvalho; Furtado, 2009; Phadungath, 2005)

A coagulação ácida é um processo em que o pH do leite é reduzido, afetando a solubilidade dos sais de cálcio nas micelas de caseína. Isso faz com que o cálcio e os fosfatos migrem para a fase do soro, resultando na dissociação do fosfato de cálcio coloidal das micelas (Perry, 2004). Esse processo continua até o ponto isoelétrico da caseína, que ocorre em pH 4,6, levando à desmineralização das caseínas (figura 2).

Em condições normais, o leite tem um pH de cerca de 6,6, o que faz com que as micelas de caseína tenham uma carga líquida negativa, causando repulsão eletrostática entre elas. Quando o pH é reduzido pela acidificação, os íons de hidrogênio (H⁺) neutralizam as cargas negativas, reduzindo a solubilidade das caseínas (Swaisgood, 2003; De Kruif; Holt, 2003).

Figura 2 - Representação da coagulação ácida por uma bactéria fermentadora de ácido láctico.

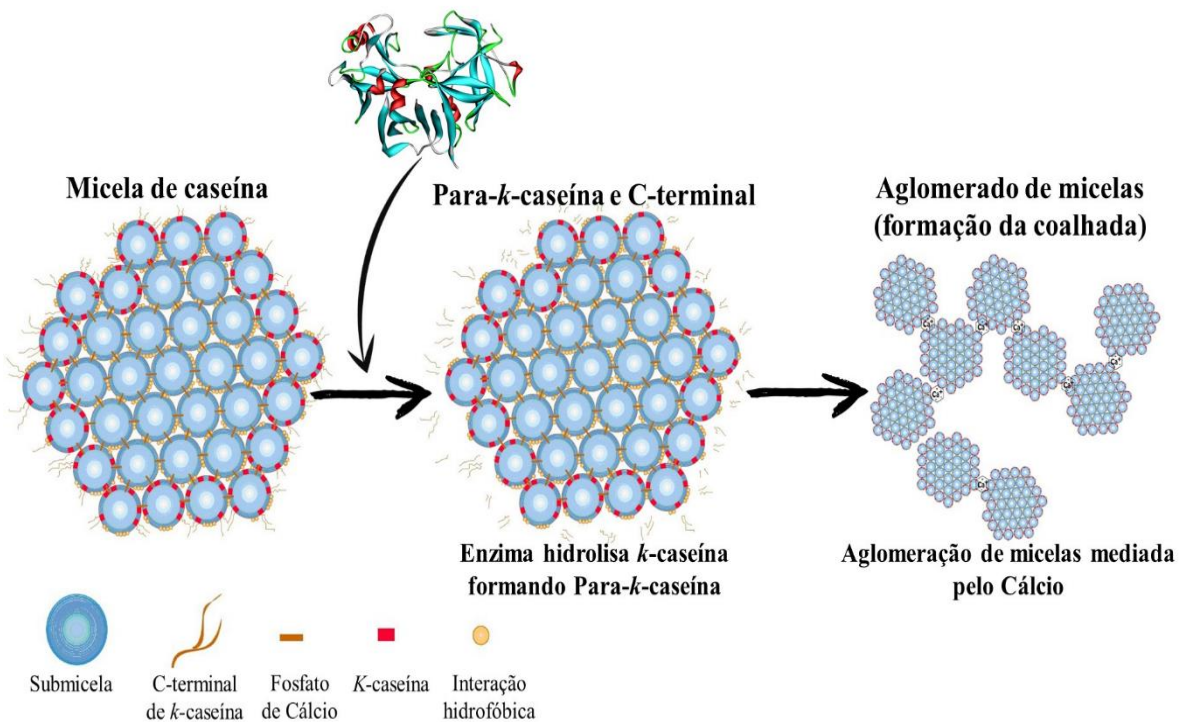


Fonte: Adaptado de Kindstedt (2014)

A coagulação do leite para a produção de queijos é um passo importante que envolve a adição de enzimas específicas, conhecidas como coalhos ou coagulantes. O termo coalho é uma preparação enzimática extraída do abomaso dos bezerros, que contém quimosina e pepsina. Outras enzimas usadas na coagulação do leite são chamadas de coagulantes, que podem ser de origem vegetal ou microbiana (Hachana; Aloui; Fortina, 2021).

A coagulação enzimática foca na quebra das ligações peptídicas na κ -caseína, especificamente entre fenilalanina (105) e metionina (106). Isso desestabiliza a estrutura das micelas, reduzindo a carga superficial negativa. Como resultado, forma-se a para- κ -caseína, uma porção hidrofóbica, e o glicomacropéptido ou caseínomacropéptido, uma porção hidrofílica. Isso aumenta as forças atrativas na superfície, levando à precipitação da caseína do leite (figura 3). Com isso, podemos dizer que o processo pode ser dividido em duas etapas, com a hidrólise enzimática seguida pela agregação das micelas (Ordóñez *et al.*, 2005; Law, *et. al.*, 2011).

Figura 3 - Representação da coagulação enzimática do leite por uma protease.



Fonte: Munhoz *et al.*, 2020.

Na etapa inicial, conhecida como etapa enzimática, ocorre a hidrólise da κ -caseína, principal proteína alvo do leite. Enzimas proteolíticas presentes no coalho ou em outros coagulantes enzimáticos quebram a ligação peptídica entre os aminoácidos Phe105 e Met106, liberando o caseinomacropeptídeo (CMP) para o soro (Martins, 1999). Com a liberação do CMP, ocorre uma redução significativa na carga das micelas de caseína para cerca de 10 mV e uma diminuição das forças de repulsão eletrostáticas que mantêm as micelas dispersas no leite. Isso desestabiliza as micelas, mas ainda não são observadas mudanças visíveis no leite. Aproximadamente 80 a 90% da κ -caseína precisa ser afetada para que a segunda fase tenha início (Brulé; Lenoir; Remeuf, 1997)

Na fase seguinte, chamada de fase de agregação micelar, as micelas de caseína desestabilizadas se agregam, resultando na coagulação do leite. Esse processo envolve mudanças físicas que aumentam gradualmente a viscosidade, formando um gel. Após a agregação das micelas, ocorre uma reorganização das mesmas, formando uma rede protéica chamada coalhada, na qual a fase aquosa fica aprisionada (Brulé; Lenoir; Remeuf, 1997; Martins, 1999).

O tempo de coagulação ou floculação é o período necessário para que os primeiros flocos se formem no leite após a adição do coagulante. Esses flocos ainda não são visíveis a olho nu, mas representam o início da agregação das micelas de caseína desestabilizadas pela ação enzimática. Isso resulta em um aumento de viscosidade devido à expulsão espontânea do soro conforme o gel se torna mais rígido, marcando o início da próxima etapa do processo de fabricação do queijo, o dessoramento (Guiama *et al.*, 2010).

2.4 Coagulantes do leite

As enzimas coagulantes desempenham um papel fundamental na fabricação de queijos, pois impactam e regulam as propriedades de coagulação do leite. É importante conhecer a atividade de coagulação do leite de cada tipo de coagulante, o que permite ao fabricante de queijos selecionar a enzima mais adequada para cada tipo de queijo e ajustar a proporção dessas enzimas para controlar a coagulação. Isso otimiza o rendimento e a qualidade do queijo produzido (Tabayehnejad; Castillo; Payne, 2012).

Devido ao alto custo, escassez e questões éticas e religiosas associadas à obtenção do coalho de origem animal, bem como às preferências dietéticas e à proibição de quimosina recombinante em alguns países, a pesquisa de novas enzimas coagulantes tem se intensificado. Isso ocorre especialmente devido ao aumento na produção mundial de queijos e à busca por sabores, texturas e características especiais. Embora várias preparações de plantas tenham demonstrado capacidade de coagular o leite, muitas são inadequadas para a produção de queijo devido ao seu caráter excessivamente proteolítico. Isso não só reduz o rendimento do queijo, mas também pode resultar em sabores amargos no produto (Silva; Malcata, 2005)

Além da quimosina recombinante, existem no mercado pepsina bovina, pepsina de frango, pepsina suína e proteases de origem microbiana produzidas por diferentes fungos. No entanto, encontrar uma alternativa viável para a quimosina tem sido difícil devido à atividade proteolítica fraca dessas enzimas em comparação com outras enzimas proteolíticas. A taxa de coagulação do leite é um parâmetro crítico na seleção de proteases como substitutos da quimosina (Alavi; Momen, 2020).

2.4.1 Coagulantes de origem animal

O uso de extrato enzimático de origem animal foi o primeiro método de coagulação do leite usado na produção de queijo e foi amplamente utilizado em todo o mundo por séculos, com registros de uso há aproximadamente 5000 anos A.C. É sugerido que, naquela época, o leite era armazenado em bolsas feitas de peles ou estômagos de animais, o que permitia que o leite entrasse em contato com enzimas coagulantes presentes no tecido animal e iniciasse o processo de coagulação durante o armazenamento (De Paula *et al.*, 2009).

A coalhada é formada por substâncias presentes no quarto compartimento do estômago dos ruminantes lactentes, o abomaso, que possui um alto teor de quimosina. O coalho é composto pelas enzimas ácidas proteolíticas, quimosina e pepsina, em proporções que variam com a idade e o tipo de alimentação do animal. O coalho derivado de bezerros jovens contém cerca de 80% de quimosina e 20% de pepsina (Júnior *et al.*, 2018). O coalho é uma mistura de diferentes espécies moleculares e variantes genéticas da quimosina, uma protease aspártica. Quanto mais jovem o animal, maior o teor de quimosina no coalho (Mcsweeney *et al.* 2017; Rodrigues, 2014).

A quimosina é a enzima mais usada na indústria de laticínios devido à sua alta especificidade para a κ -caseína, o que a torna a melhor escolha para coagular o leite. Por outro lado, a pepsina, embora menos específica, pode quebrar ligações com resíduos Phe, Tyr, Leu ou Val, liberando peptídeos com sabores amargos (Jacob *et al.*, 2011; Fernandes, 2013). A quimosina atinge sua máxima atividade de coagulação em pH 5,5, é estável termicamente até 55°C e tem maior atividade proteolítica a 30°C (Mcsweeney *et al.*, 2017).

Contudo, a disponibilidade de enzimas de origem animal tem se tornado limitada devido ao aumento da demanda global por queijos, com um crescimento de 4% ao ano. A redução no abate de bezerros, devido à baixa produção de sua carne, também contribui para a escassez desse tipo de coalho (Júnior *et al.*, 2018). Atualmente, existem três tipos de substitutos para o coagulante de origem animal: os de origem microbiana, vegetal e a quimosina produzida por fermentação (Mcsweeney *et al.*, 2017).

2.4.2 Coagulante de origem vegetal

Os coagulantes vegetais são uma alternativa ao coalho de origem animal, pois contém proteases que podem ser facilmente encontradas em diferentes partes das plantas, como folhas, flores, frutos, raízes, caules e sementes (Laguna; Do Egito, 2001; Roseiro *et al.*, 2003). Desde a antiguidade, extratos vegetais são usados na coagulação do leite, como evidenciado por relatos datados de 50 A.C. por Columella, que utilizou várias plantas, como o cártamo (*Cynara cardunculus L.*), alcachofra (*Cynara scolymus*) e *Citrus aurantium* (Scott; Robinson; Wilbey, 1998; Grozdanovic; Burazer; Gavrovic-Jankulovic, 2013).

Esses extratos vegetais são ricos em proteases aspárticas, como as cardosinas ou cinarases, encontradas em plantas como *Cynara* sp, *Calotropis procera*, *Withania coagulans* e *Streblus asper* (Ordiales *et al.*, 2012). Atualmente, os queijos feitos com proteases vegetais são geralmente produzidos em pequenas queijarias artesanais, principalmente em países do Mediterrâneo, Oriente Médio, África Ocidental e Sul da Europa (Roseiro *et al.*, 2003).

As proteases vegetais têm a capacidade de hidrolisar as caseínas do leite em diferentes pH e temperaturas, sendo classificadas em grupos como proteases aspárticas, serinoproteases e cisteínoproteases. Essas alternativas vegetais são valorizadas pela sua fácil disponibilidade e processos simples de obtenção e purificação (Nicosia *et al.*, 2022; Nitu; Geicu-Cristea; Matei, 2005; Ben Amira *et al.*, 2017).

2.4.3 Coagulante de origem microbiana

Os coagulantes de origem microbiana são preferidos pelo público ovolactovegetariano, pois suas enzimas não são derivadas de tecidos de animais ruminantes. Essas proteases extracelulares são produzidas por microrganismos não geneticamente modificados e têm a capacidade de coagular e gelificar o leite de forma semelhante a quimosina (Jacob *et al.*, 2011; Andrén, 2011).

Embora tais proteases sejam menos específicas que a quimosina, a relação entre a atividade de coagulação e a atividade proteolítica geral, normalmente, é menor. A fração da enzima ativa que permanece no queijo pode contribuir para a

proteólise durante a maturação, resultando na formação de pequenos peptídeos hidrofóbicos que podem causar um sabor amargo (Mcsweeney *et al.*, 2017).

Alguns microrganismos, como *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Cryphonectria parasitica*, *Aspergillus oryzae* e *Lrpex lactics*, são amplamente utilizados para produzir proteases usadas como coagulantes de leite em grande escala (Vasconcelos; Araujo; Verruma-Bernardi, 2004). Entre eles, o coagulante produzido por *C. parasitica* é menos comum e menos caracterizado devido à sua alta atividade proteolítica, especialmente na hidrólise da β -caseína. Apesar de suas variações de sensibilidade à temperatura, pH ótimo e resposta ao cálcio, é inegável que a estabilidade térmica desses coagulantes é superior à do coalho de bezerros, resultando em uma maior quantidade de coagulante ativo durante a maturação do queijo, especialmente para a coalhada em larga escala (Mcsweeney *et al.*, 2017).

Os coagulantes microbianos apresentam várias vantagens, como baixo custo de produção e conformidade com os princípios alimentares (religiosos ou dietéticos). No entanto, suas principais desvantagens incluem baixa especificidade, alta estabilidade térmica, menor relação entre a atividade de coagulação do leite e a atividade proteolítica em comparação com o coalho de bezerro, e maior propensão a causar amargor no queijo (Nicosia *et al.*, 2022).

Vários estudos com microrganismos produtores de coagulantes têm sido desenvolvidos, como exemplo os estudos com *Aspergillus oryzae* mostram sua alta atividade coagulante, alta especificidade e baixa atividade proteolítica, tornando-a ideal para a indústria de queijos (Vishwanatha; Appu Rao; Singh, 2010). Outros estudos avaliaram *Aspergillus flavo furcatis* e observaram que ele pode produzir a enzima coagulante do leite sem gerar toxinas, sendo promissor para a indústria queijeira (Alecrim *et al.*, 2017). Estudos com seis espécies de cogumelos comestíveis e encontraram em *Pleurotus albidus* a maior atividade coagulante, destacando-a como um potencial fonte de enzima para a fabricação de queijos (Martim *et al.*, 2017). Estudos também demonstraram que o fungo *Penicillium camemberti* é um bom produtor de enzima coagulante do leite em diferentes substratos (Shellomith; Preetha, 2018).

Além da produção natural desses coagulantes por microrganismos, é possível obter a quimosina geneticamente modificada, os genes da quimosina de ruminantes podem ser inseridos em microrganismos como *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger var awamori* e *Escherichia coli*. Uma vez inserido, esse gene iniciará a produção da

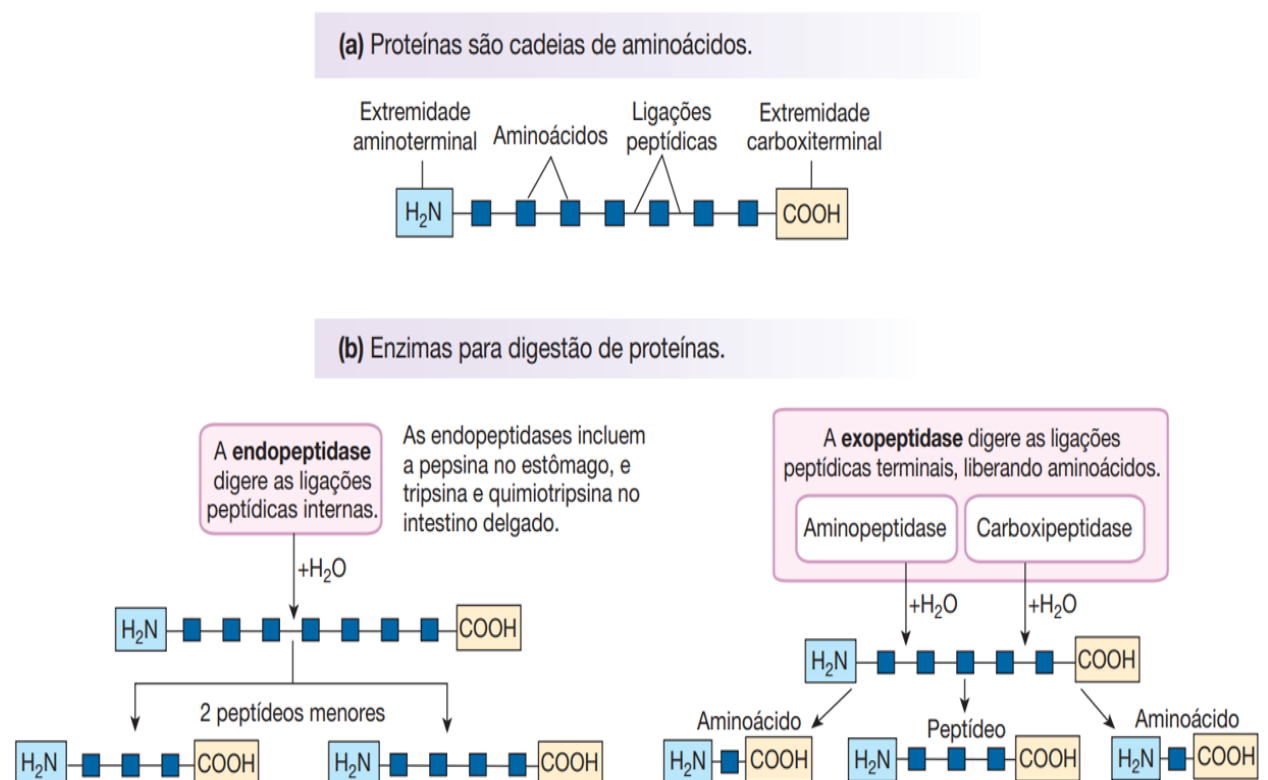
quimosina no microrganismo hospedeiro. Por meio dessa tecnologia de DNA recombinante, a quimosina obtida é 100% pura, ao contrário da obtida do abomaso dos bezerros, que também contém pepsina (Kumar *et al.*, 2010; Mohanty *et al.*, 1999). No entanto, o uso dessa enzima enfrenta restrições ao consumo devido à legislação europeia que proíbe a participação de organismos geneticamente modificados na fabricação de queijos (Soares *et al.*, 2015).

2.5 Proteases

Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (1992), as proteases pertencem à classe das hidrolases, especificamente à subclasse 3.4, também conhecida como peptídeo-hidrolases ou peptidases (Vermelho *et al.*, 2008). Essas enzimas desempenham um papel crucial ao catalisar a quebra das ligações peptídicas presentes em proteínas e peptídeos. Esse processo resulta na formação de aminoácidos livres e outras estruturas de menor complexidade estrutural. Dependendo da região onde ocorre a quebra das ligações peptídicas, as proteases podem ser classificadas como endopeptidases (EC 3.4.21-24), que atuam no interior da cadeia polipeptídica, ou exopeptidases (EC 3.2.4.11-19), que atuam nas extremidades da cadeia (figura 4) (Silverthorn, 2010).

Em relação ao ponto de clivagem dessas enzimas, temos as exopeptidases que são enzimas que atuam nas extremidades da cadeia polipeptídica, permitindo a quebra das ligações peptídicas para formar aminoácidos e peptídeos livres. Aquelas que agem na extremidade carboxílica são chamadas de carboxipeptidases, liberando um único aminoácido ou um dipeptídeo (peptídeo dipeptidase E.C. 3.4.13) na região C-terminal da cadeia polipeptídica. Por outro lado, as endopeptidases são caracterizadas pela capacidade de hidrolisar as ligações peptídicas no interior das cadeias polipeptídicas. Essas proteases são mais importantes na indústria do que as exopeptidases, e sua classificação é baseada na especificidade do substrato, no mecanismo catalítico, na estrutura tridimensional e nos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo (Sumantha; Larroche; Pandey, 2006).

Figura 4 - Representação esquemática da atuação de endopeptidases e exopeptidases.



Fonte: adaptado de Silverthorn, 2010.

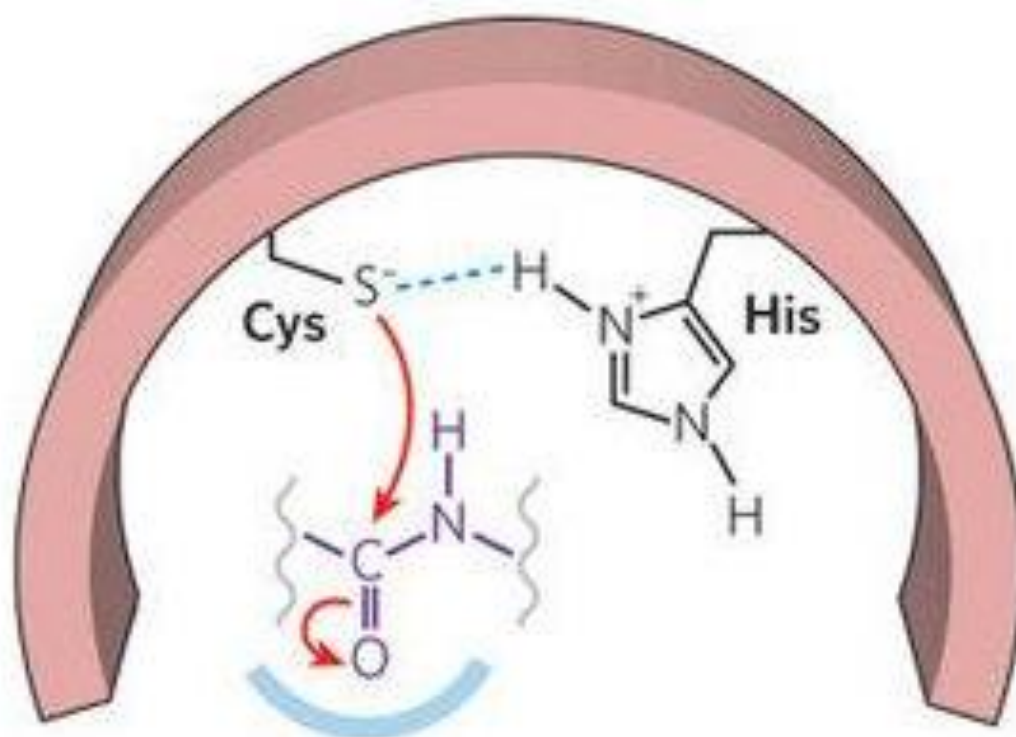
As proteases podem ser classificadas em diferentes grupos com base em características específicas. Essas características incluem o pH em que essas enzimas têm sua atividade ótima, os aminoácidos presentes no sítio catalítico, o tipo de ligações moleculares que são quebradas por cada protease e em qual região específica dessas ligações ocorre a quebra (Kermasha; Eskin, 2020). Esses critérios de especificidade são utilizados para identificar enzimas individuais dentro dessas subclasses. Dentro da categoria de proteases, temos as cisteínoproteases (EC 3.4.22), as aspárticoproteases (EC 3.4.23), as metaloproteases (EC 2.3.24) e as serinoproteases (EC 3.4.21) (Terra *et al.*, 1996).

2.5.1 Cisteínoproteases

As cisteínoproteases, também conhecidas como tiol-proteases, são enzimas proteolíticas que atuam nas ligações peptídicas por meio de um ataque nucleofílico do ânion sulfeto presente em seu sítio catalítico (Kunakbaeva; Carrasco; Rozas, 2003). A tríade catalítica dessas enzimas é composta pelos resíduos dos aminoácidos

cisteína e histidina (figura 5). Com massa molecular variando de 21 a 30 kDa, as cisteínoproteases apresentam pH ótimo neutro e um mecanismo de ação análogo ao das serinoproteases e (Rao *et al.*, 1998).

Figura 5 - Representação ilustrada do sítio ativo de uma Cisteínoprotease.



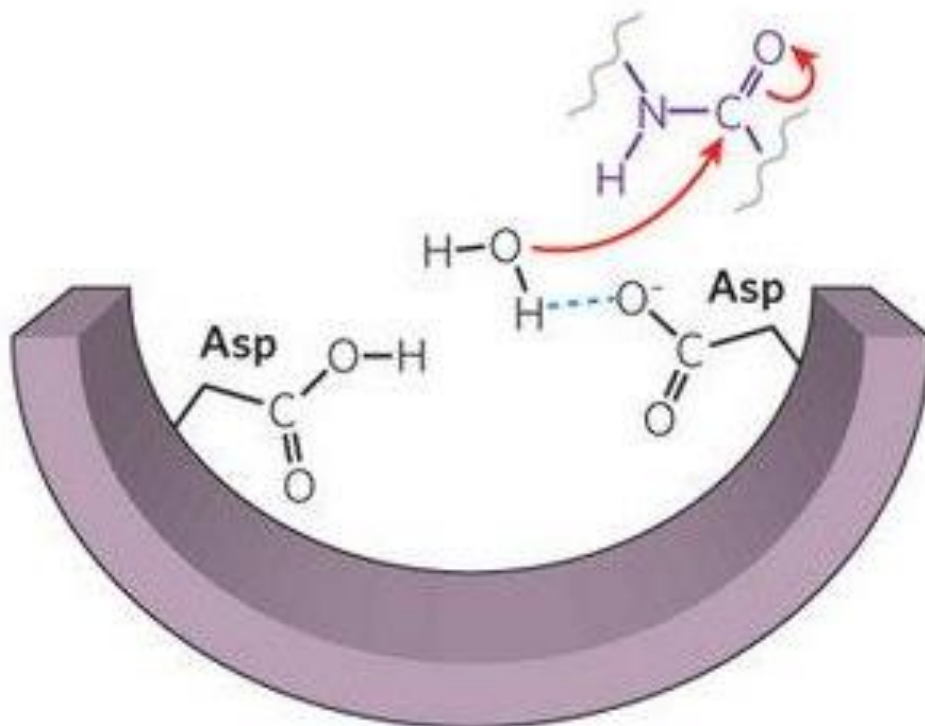
Fonte: adaptado de Erez; Fass; Bibi, 2009.

Essas proteases estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em bactérias, fungos, protozoários, animais e plantas (Grzonka *et al.*, 2007; Shah; Mir; Paray, 2014). O mecanismo catalítico dessas enzimas envolve um grupo de cisteína no sítio ativo. A clivagem da ligação peptídica depende de um par de íons tiolatoimidazólio, fornecido pelos resíduos de cisteína e histidina no sítio ativo. O ataque nucleofílico ao grupo carbonila leva à formação de um intermediário oxigênio tetraédrico, que aceita um próton do grupo imidazólio, formando um intermediário enzimático acil e liberando a porção C-terminal do substrato. Posteriormente, uma molécula de água promove o ataque nucleofílico ao intermediário enzima-acila, liberando o substrato (Buttle; Mort, 2013; Verma; Dixit; Pandey, 2016).

2.5.2 Aspárticoproteases

As aspárticoproteases são endopeptidases que utilizam uma molécula de água, ativada por dois resíduos de aminoácidos aspartato, como nucleófilo para atacar as ligações peptídicas (figura 6). Sendo bastante encontradas em diversos organismos, como vertebrados, plantas e vírus (Northrop, 1930). A maioria das aspárticoproteases apresentam máxima atividade em pH ácido (3-4) e possuem massas moleculares que variam de 30 a 45 kDa (RAO *et al.*, 1998).

Figura 6 - Representação ilustrada do sítio ativo de uma aspárticoprotease.



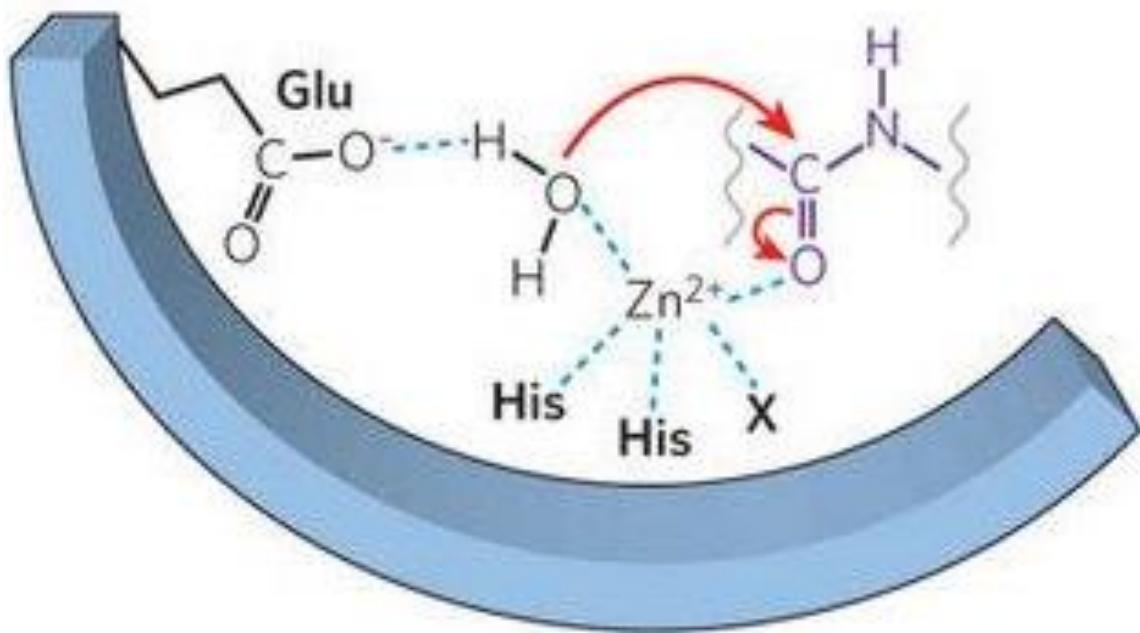
Fonte: adaptado de Erez; Fass; Bibi, 2009.

Elas realizam a clivagem das ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos responsáveis pela atividade catalítica. Um resíduo de aspartato facilita a adição de uma molécula de água à carbonila da amida do substrato por meio de um ataque nucleofílico, formando um intermediário tetraédrico. Posteriormente, ocorre a quebra da ligação C-N, resultando na formação de um ácido carboxílico e uma amina primária (Sodero; De Simone, Silva-Jr, 2009; Muri, 2014).

5.2.3 Metaloproteases

As metaloproteases constituem uma família de endopeptidases com a maior diversidade proteolítica entre as enzimas (Barrett, 1994). Essas enzimas são caracterizadas pela necessidade de um íon metálico bivalente, como Zn^{2+} ou Mn^{2+} , em seu sítio catalítico e são conhecidas por sua capacidade de degradar a matriz extracelular, sendo também chamadas de matrixinas (figura 7) (Woessner Jr, 1991).

Figura 7 - Representação ilustrada do sítio ativo de uma metaloprotease.



Fonte: adaptado de Erez; Fass; Bibi, 2009.

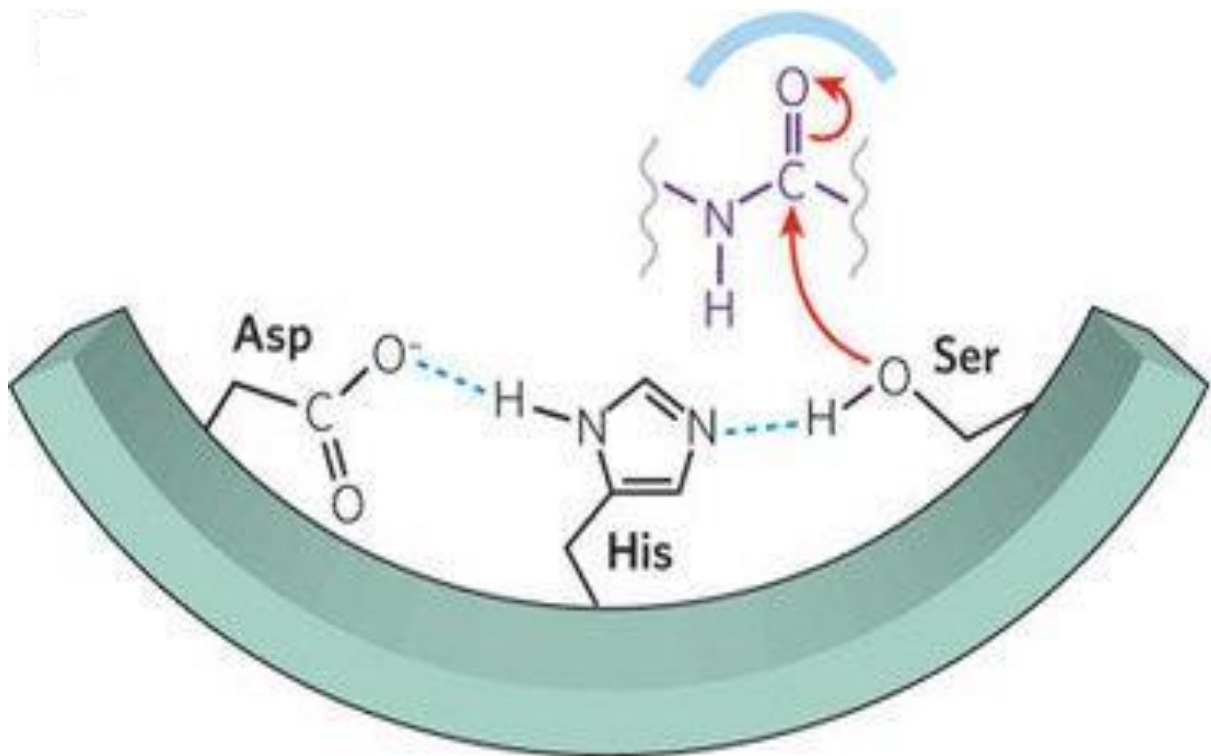
A família das metaloproteases pode ser dividida em várias subcategorias, incluindo collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas e metaloproteases tipo membrana. Todos os membros dessa família são inicialmente secretados como proenzimas. Essas proenzimas são liberadas por diferentes tipos de células, como neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos, podendo eventualmente, ser secretadas por células tumorais em resposta a vários estímulos (Visse; Nagase, 2003).

A participação das metaloproteases em diversos eventos biológicos é significativa, pois elas têm o potencial de influenciar o comportamento celular de várias maneiras. Isso inclui a clivagem de proteínas envolvidas na adesão célula-célula, a liberação de moléculas bioativas na superfície celular e a clivagem de moléculas que transmitem sinais no ambiente extracelular (Araújo *et al.*, 2011).

2.5.4 Serinoproteases

As serinoproteases são enzimas que possuem um resíduo de serina em seu centro ativo. Elas são amplamente estudadas e encontradas em diversos organismos, como vírus, plantas, bactérias e eucariotos, o que sugere que desempenham um papel importante no metabolismo desses organismos. Essa subclasse de enzimas apresenta muita homologia de sequência e similaridade estrutural (Fersht, 1999). A principal característica em comum entre essas enzimas é a presença da "tríade catalítica", que é formada pelos resíduos dos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico (figura 8).

Figura 8 - Representação ilustrada do sítio ativo de uma serinoprotease.



Fonte: adaptado de Erez; Fass; Bibi, 2009.

O mecanismo básico de ação das serino proteases envolve a transferência da porção acila do substrato para um grupo funcional da enzima. Primeiramente, ocorre a formação de um éster entre o átomo de oxigênio da serina e a porção acila do substrato, resultando na formação de um intermediário tetraédrico. Esse intermediário desloca um par de elétrons para o oxigênio do grupo carbonil, tornando-o parcialmente negativo. Quando a dupla ligação do grupo carbonil é restaurada por rearranjo

eletrônico, ocorre o rompimento da ligação peptídica, liberando a parte amina do substrato. Em seguida, a água ataca o intermediário acil-enzima, decompondo-o e liberando o produto ácido, regenerando a enzima (Antão; Malcata, 2005).

Essas enzimas desempenham diversas atividades fisiológicas importantes. Elas estão envolvidas na digestão, como é o caso da tripsina, quimotripsina e elastase. Além disso, atuam na ativação de outras enzimas específicas, como descrito em sua participação na cascata de coagulação sanguínea, no sistema imunológico de insetos e plantas, e no processo de desenvolvimento de peptídeos biologicamente ativos (Bode *et al.*, 1989; Gill *et al.*, 1996; Gorman; Andreeva; Paskewitz, 2000; Russo, 2006; Wilson; Vogel; Somerville, 1997).

2.6 Proteases microbianas

No organismo, as proteases desempenham papéis essenciais em uma série de processos, incluindo a digestão de alimentos, a ativação de enzimas, a coagulação sanguínea e o transporte de proteínas através da membrana. Por serem enzimas muito versáteis e vitais, são amplamente encontradas em uma grande variedade de fontes na natureza, incluindo plantas, animais e micro-organismos (RAO *et al.* 1998).

Nesse contexto, as proteases microbianas têm sido amplamente exploradas na produção de hidrolisados de proteínas de alto valor. Esses hidrolisados são utilizados em uma variedade de aplicações, como formulações de alimentos, produtos alimentares terapêuticos, fortificantes de bebidas, além de serem empregados como aditivos alimentares funcionais (Aguilar; Sato, 2018). A tabela 3 apresenta alguns exemplos de microrganismos produtores de proteases isolados de diferentes fontes.

Tabela 3 - Microrganismos produtores de proteases.

Microrganism o produtor	Fonte de isolamento/AT CC	Método de produção	Possível Aplicação	Referênci as
Proteases				
<i>Bacillus subtilis</i> FBL-1 (KCCM 43196)	Solo	<i>In vitro</i> (extrato de levedura, KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄)	Hidrólise de Caseína (liberação de tirosina)	Si <i>et al.</i> (2018)
<i>Lentinus crinitus</i> (L.) Fr. 1825 DPUA 1693	Cedida pela Coleção de Culturas do Departamento	Fermentação Submersa	Uso potencial em indústrias de alimentos, bebidas e	Magalhães <i>et al.</i> (2019)

	de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas		produtos farmacêuticos	
<i>Streptomyces</i> sp. Al-Dhabi- 82	Solo	Fermentação o submersa utilizando meio basal	Hidrólise de pena de frango	Al-Dhabi <i>et al.</i> (2019)
<i>Exiguobacteri- um profundam sp.</i>	Solo	<i>In vitro</i> (Agar Leite Desnatado)	Atividade de gelatinase	Sudha <i>et al.</i> (2018)
<i>Sapindus saponaria Br</i>	Plantas do cerrado	Fermentação Submersa	Atividade queratinolítica, colagenolítica, anticoagulante no leite; uso em detergentes para roupas	Werneck (2016)

Fonte: adaptado de Rigo *et al.* 2021.

As proteases pertencem a um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, dominando cerca de 60% do mercado. O comércio global desses biocatalisadores movimenta anualmente entre US\$ 300-600 milhões, sendo que 75% desse valor é representado por enzimas hidrolíticas, e dois terços delas são proteolíticas (Savitha *et al.*, 2011). A produção de mais da metade das enzimas industriais é realizada por leveduras e fungos filamentosos, enquanto cerca de 30% são produzidas por bactérias, as de origem animal corresponde a apenas 8%, e plantas representam apenas 4% da produção total (Rigo *et al.*, 2021).

As proteases industriais provenientes de fontes vegetais, como papaína, bromelina e ficina, e de fontes animais, como proteases digestivas, não têm sido capazes de atender completamente às demandas do mercado. Como resultado, as proteases de origem microbiana estão ganhando cada vez mais destaque na indústria (Vermelho *et al.*, 2008). Além disso, há uma variedade de fontes microbianas capazes de produzir essas enzimas de maneira eficiente (RIGO *et al.*, 2021).

Essas fontes microbianas são economicamente vantajosas, pois o cultivo é simples e não está sujeito a restrições relacionadas a tempo e espaço, ao contrário de outras fontes. Além disso, as tecnologias avançadas permitem o sequenciamento

eficiente dos genomas de microrganismos, o que possibilita a identificação de muitas novas sequências de genes que codificam variantes de enzimas (Srivastava, 2019).

Há uma ampla gama de estudos voltados para a produção de enzimas por microrganismos, abrangendo diversos tipos de bactérias e outros micro-organismos isolados de diferentes ambientes (Rigo *et al.* 2021). Entre as bactérias que secretam proteases, destacam-se os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus (vulgaris)*, *Clostridium sp.* e alguns outros de característica anaeróbia.

Essas proteases podem ser classificadas de acordo com seu pH ótimo, sendo neutras, ácidas ou alcalinas. Proteases bem caracterizada e amplamente utilizada são as proteases alcalinas, produzida pelo gênero *Bacillus* (como *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*), que é ativa em um pH entre 8 e 11. Já as proteases neutras, secretadas por *B. megaterium* e *P. aeruginosa*, são instáveis e inativadas rapidamente em condições ácidas ou alcalinas. Por sua vez, as proteases ácidas, com pH ótimo entre 4 e 6, são produzidas por *Aspergillus sp.* (Gottschalk, 1985).

Fontes microbianas, como os fungos, são cada vez mais estudadas devido à sua grande diversidade bioquímica e à facilidade de manipulação genética (Alecrim *et al.*, 2015). Estudos com cepas fúngica *Aspergillus oryzae* como produtora de uma enzima com maior atividade coagulante, apresentando alta atividade específica, baixa atividade proteolítica e menor termoestabilidade em comparação com os coalhos microbianos existentes, tornando-a ideal para uso nas indústrias de fabricação de queijos tem sido realizado (Vishwanatha; Appu Rao; Singh, 2010).

Outro estudo, realizado por Alecrim *et al.* (2017), avaliou a capacidade de produção de protease coagulante do leite e a produção de aflatoxina por *Aspergillus flavo furcatis* em fermentação submersa e em estado sólido. Os resultados mostraram que essa espécie apresenta capacidade de produção da enzima coagulante em ambos os meios de fermentação utilizados e não produz toxinas, o que a torna um potencial fonte de enzima coagulante na fabricação de queijos.

Assim, os crescentes estudos com microrganismo evidenciam o potencial dos fungos e bactérias, especialmente do gênero *Aspergillus* e *Bacillus*, como fontes de enzimas coagulantes para a indústria de laticínios, devido à sua eficiência e segurança no processo de fabricação de queijos.

2.7 Microbiota intestinal de insetos

É extremamente normal e comum na natureza a associação de organismos superiores e com os microrganismos (bactérias, protozoários, fungos e vírus). Assim como acontece em vertebrados, diversos grupos de microrganismos também colonizam o intestino dos insetos, formando sua microbiota intestinal (Muhammad *et al.*, 2019). Estimativas apontam que cerca de 15 a 20% das espécies de insetos estudadas possuem algum tipo de associação com alguns microrganismos (Baumann, 2005; Douglas, 1998).

A caracterização dessa microbiota é crucial para uma compreensão mais detalhada das relações entre os microrganismos simbiotes e seus hospedeiros, pois partir dessa interação ecológica, os organismos podem afetar-se mutuamente, em um espectro que abrange o parasitismo, comensalismo e mutualismo, sendo este último caracterizado pelo benefício mútuo entre ambas as espécies (Begon, Townsend, 2023; Klepzig *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2020.) como o exemplo da figura 9 que representa o aspecto simbiote de um protozoário com um inseto.

Nos organismos de animais e plantas, encontramos comunidades de microrganismos em vários tecidos e órgãos. Nos insetos, as bactérias são predominantemente encontradas no lúmen do intestino médio e em ambientes intracelulares, divertículos, glândulas salivares, túbulos de Malpighi, ovários e carapaças. Surpreendentemente, a informação genética do total desses microrganismos pode ser igual ou até superior à quantidade de células e ao genoma do próprio hospedeiro (Sender; Fuchs; Milo, 2016).

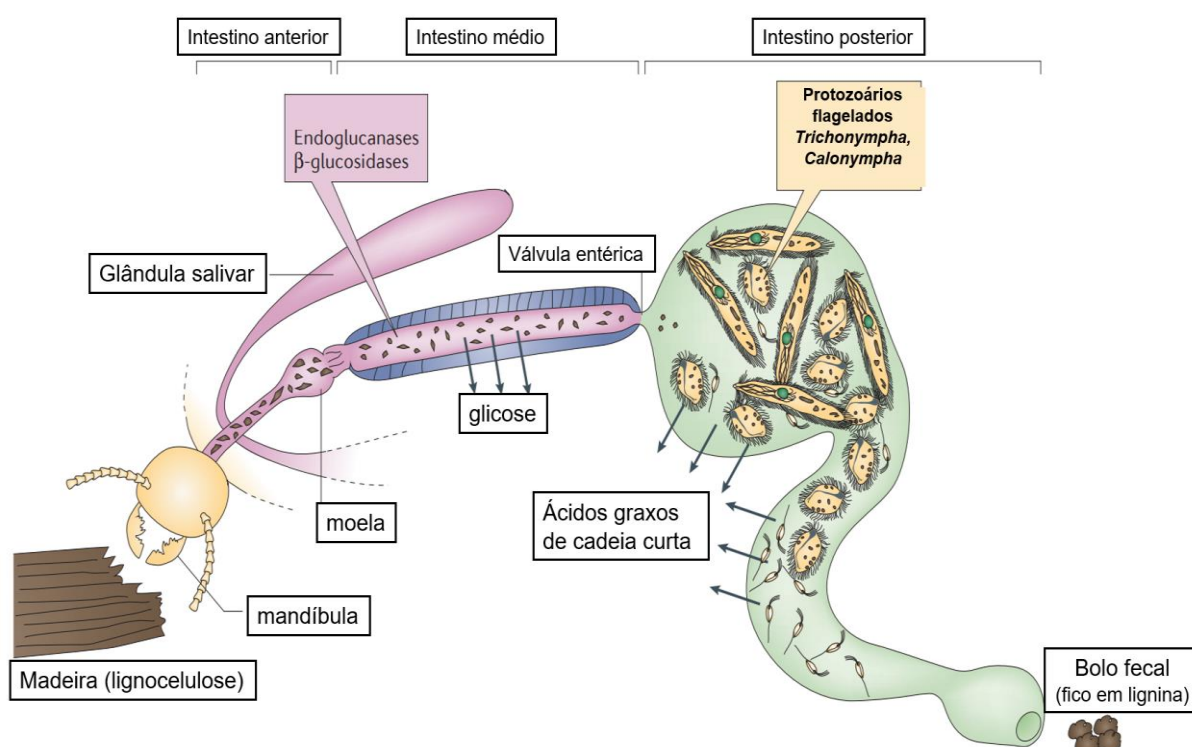
A colonização do intestino de alguns insetos se inicia logo após o nascimento, quando as larvas acabam ingerindo a camada externa do ovo, que contém microrganismos. Essa camada é depositada pela fêmea quando ela põe os ovos, permitindo que a microbiota seja transmitida de uma geração para outra. Além disso, os insetos podem adquirir a microbiota do ambiente em que vivem ou dos alimentos que consomem (Rinke, 2009).

Esse processo é especialmente importante em insetos que se alimentam de dietas com moléculas complexas ou toxinas. Os microrganismos presentes nesses insetos são capazes de degradar essas substâncias, o que os torna essenciais para a digestão e aproveitamento dos nutrientes dessas dietas (Hirose; Panizzi, 2009). Ao fornecer nutrientes essenciais para os insetos que se alimentam de dietas

desbalanceadas, como a seiva das plantas e o sangue, esses microrganismos acabam por disponibilizar aminoácidos, vitaminas, lipídeos e cofatores que podem estar em falta na dieta do inseto, contribuindo assim para o seu desenvolvimento saudável (Wu *et al.*, 2006).

Além disso, esses microrganismos auxiliam na digestão de materiais difíceis de serem degradados, como celulose e lignina, presentes em plantas (Ayres *et al.*, 2000; Bridges, 1981). Também são capazes de fixar nitrogênio, fornecendo uma fonte essencial desse nutriente para os insetos. Além disso, participam da reciclagem de compostos, como o ácido úrico, e estão envolvidos em processos metabólicos como a metanogênese e acetogênese a partir de H_2 e CO_2 . Essas contribuições nutricionais são cruciais para a sobrevivência e adaptação dos insetos em diversos ambientes (AYAYEE *et al.*, 2014 e REN *et al.*, 2022).

Figura 9 - Ilustração da simbiose entre cupins e protozoários flagelados celulolíticos.



Fonte: adaptado de brune, 2014.

Os simbiotes dos insetos também desempenham um papel crucial na defesa contra inimigos naturais e condições adversas, como o estresse térmico (Flórez *et al.*, 2015; Krams *et al.*, 2017). Insetos enfrentam uma variedade de ameaças naturais, incluindo patógenos, predadores e parasitóides. As bactérias intestinais, por exemplo,

têm a capacidade de produzir compostos tóxicos em resposta a ataques de patógenos. Isso significa que insetos que possuem essa associação com simbioses podem receber uma proteção adicional contra seus inimigos naturais (Müller, 2013).

A composição da comunidade bacteriana no trato digestivo dos insetos pode ser fortemente influenciada pelo tipo de alimento consumido pelo hospedeiro, devido às diferenças em sua composição química (Engel; Moran, 2013; Pinto-Tomás *et al.*, 2011). Por exemplo, a mosca-das-frutas *A. fraterculus* ataca uma variedade de frutas com teores protéicos diversos. Enquanto as maçãs, *Malus doméstica*, possuem apenas 0,045% de proteína total, os mamões, *Carica papaya*, apresentam 0,5% de proteína total. Portanto, é de se esperar que as comunidades de simbioses no intestino das moscas que se alimentam de frutas diferentes sejam distintas em sua composição, frequência ou capacidades metabólicas (Valderrama; Marangoni; Clemente, 2001).

Portanto, é evidente que diversos fatores, como habitat do inseto, seu tipo de alimentação, sexo e estágio de desenvolvimento, exercem influência direta sobre a composição da microbiota do animal. Essa influência faz com que espécies diferentes, com hábitos distintos, acabem desenvolvendo microbiotas únicas. Nesse sentido, o mapeamento desses microrganismos se torna uma ferramenta fundamental para uma compreensão mais completa do ecossistema no qual o inseto está inserido (VALERI & ENDRES, 2021; MARTÍNEZ-SOLÍS *et al.*, 2020 e MALACRINÒ, 2022).

O intestino e as funções digestivas dos insetos representam um modelo altamente informativo para compreender o metabolismo desses organismos. Eles fornecem um excelente modelo de estudo para diferentes microrganismos, especialmente devido à adaptação de diferentes espécies a uma ampla variedade de habitats e hábitos alimentares (Bédikou *et al.*, 2010). Nesse contexto, as bactérias seriam excelentes fontes de estudo.

2.8 Enterobactérias

As enterobactérias constituem um grupo bastante heterogêneo amplamente distribuído na natureza, sendo habitualmente encontradas no trato gastrointestinal de animais como comensais, representando cerca de 80% dos isolados Gram-negativos. Elas abrangem uma grande diversidade de gêneros e espécies, algumas são móveis e possuem flagelos, enquanto outras não (Koneman *et al.* 2012). A capacidade de

motilidade e a presença de flagelos variam de acordo com a espécie, assim como sua capacidade de serem aeróbias ou anaeróbias facultativas. Além disso, as enterobactérias têm a capacidade de fermentar açúcares e crescer em uma variedade de meios sólidos (Alvim; Couto; Gazzinelli, 2019; Nordmann; Naas; Poirel, 2011).

Essas bactérias despertaram a atenção da comunidade científica devido à sua capacidade de causar uma série de infecções em seres humanos. Entre as doenças associadas a essas bactérias estão a pneumonia, sepse, peritonite, diarreia, meningite, cistite e infecções relacionadas a dispositivos invasivos. Os gêneros e espécies mais comuns que afetam os seres humanos incluem *Escherichia spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Yersinia spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, e outros (Auer; Weibel, 2017). Essas bactérias são altamente transmissíveis por meio do contato direto e da ingestão de água e alimentos contaminados (Silva, 2009). É importante observar que, como parte da microflora intestinal, essas bactérias podem estar presentes sem causar doenças, representando colonização em vez de infecção verdadeira (Paterson, 2011).

Considerando que a mucosa intestinal é o ambiente mais densamente colonizado por microrganismos da família Enterobacteriaceae (Andreatti; Da Silva; Curi, 1997), ao analisar o intestino e as fezes, é possível detectar a presença dessas bactérias nos animais. Espécies silvestres e animais criados extensivamente podem ser fontes desses microrganismos, os quais podem ser isolados e cultivados para estudo (Silva *et al.*, 2014).

2.8.1 *Klebsiella Variicola*

As bactérias do gênero *Klebsiella*, fazem parte da família Enterobacteriaceae, são bacilos gram-negativos que frequentemente apresentam cápsula. Com dimensões variando de 0,5 a 5,0 μm , esses microrganismos são anaeróbios facultativos, não possuem flagelos e são oxidase-negativos. Amplamente distribuídas na natureza, essas bactérias são ubíquas, encontradas em ambientes como água, esgoto, solo e plantas. Além disso, elas têm a capacidade de colonizar mucosas de mamíferos, incluindo humanos, cavalos e suínos (Drancourt *et al.*, 2001; Podschun; Ullmann, 1998) (figura 10).

crescimento entre 11 e 41°C (Lin *et al.*, 2012). Esta espécie foi descrita em 2004, inicialmente isolada da superfície de vegetais e ambientes hospitalares, mas posteriormente encontrada em uma variedade de ecossistemas vegetais, onde desempenha um papel na fixação de nitrogênio e no estímulo ao crescimento das plantas (Lin *et al.*, 2012; Reyna-Flores *et al.*, 2018). Além disso, *K. variicola* foi detectada em várias outras fontes ambientais e identificada como patógeno humano em casos de septicemia, aspiração traqueal, infecções do trato respiratório e urinário, e feridas cirúrgicas, causando infecções graves (RODRÍGUEZ-MEDINA *et al.*, 2019; Rosenblueth *et al.*, 2004).

Infecções causadas por *Klebsiella variicola* foram registradas em seres humanos em todo o mundo, embora sejam menos comuns em animais selvagens e de fazenda (Berry, Loeffelholz; Williams-Bouyer, 2015; Brisse; Van Duijkeren, 2005; Maatallah *et al.*, 2014). No entanto, alguns estudos sugerem que a verdadeira prevalência dessas infecções pode ser subestimada devido ao uso de métodos de identificação imprecisos. A falta de precisão na identificação dos membros do complexo *K. pneumoniae* tem limitado a compreensão de *K. variicola*, resultando em lacunas no conhecimento e nas implicações clínicas nos sistemas de saúde (Valiatti *et al.*, 2021).

Apesar de *K. variicola* ser considerada um patógeno oportunista e menos virulento em humanos do que *K. pneumoniae*, ela tem demonstrado importância na prática clínica (Brisse; Passet; Grimont, 2014).

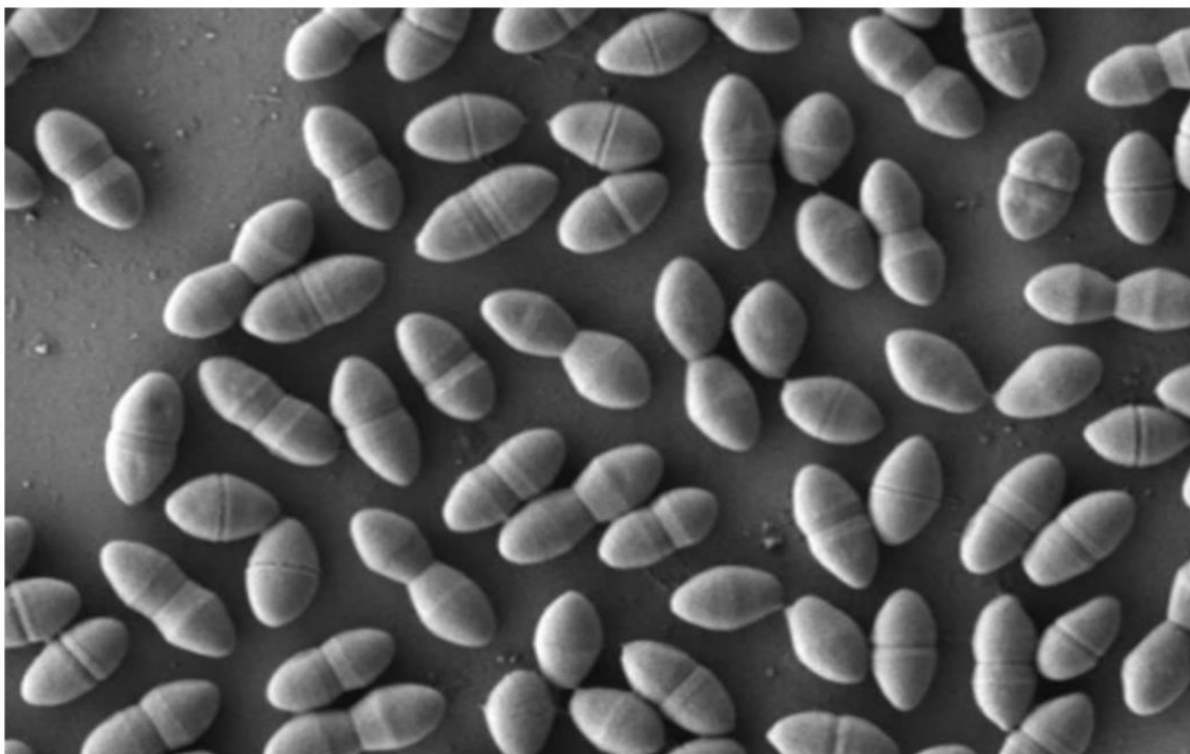
2.9 Enterococcus

Os *Enterococcus spp.* são bactérias comensais que pertencem à família *Enterococcaceae*, do filo *Firmicutes*, encontradas em uma variedade de ambientes naturais, incluindo solo, água e esgoto, além de serem parte da microbiota intestinal de animais. Essas bactérias se caracterizam por sua morfologia em cocos Gram-positivos não esporulados, que são observados frequentemente em arranjos de pares, cadeias curtas ou isolados (figura 11) (Murray, 1990; Williamson *et al.*, 2022).

São bactérias anaeróbias facultativas que apresentam teste de catalase negativo e são produtores de ácido láctico. Eles demonstram uma notável capacidade de tolerância a condições desfavoráveis, como elevada concentração de sais biliares (40%) e soluções salinas (6,5%). Sua faixa ideal de crescimento situa-se em um pH

de 7.5, porém, eles podem crescer em pHs variando entre 4.5 e 9.0 (De Souza *et al.*, 2012).

Figura 11 - Imagem do microscópio eletrônico de *Enterococcus faecalis* apresentando arranjo de cocos isolados e diplococos.



Fonte: adaptado de Matsumoto *et al.*, 2019.

Este gênero está bem adaptado às condições fisiológicas do corpo humano, sendo encontrado na cavidade oral, trato gastrointestinal e trato geniturinário. Os *Enterococcus* são considerados bactérias oportunistas, o que significa que, embora normalmente não causem doenças em indivíduos saudáveis, podem ser responsáveis por infecções em pessoas imunocomprometidas (Semedo-Lemsaddek; Barreto-Crespo; Tenreiro, 2012). Atualmente, mais de 50 espécies de *Enterococcus* são reconhecidas, com destaque para *Enterococcus faecalis*, uma das causadoras mais frequentes de infecções (Fisher; Phillips, 2009; Madsen *et al.*, 2017).

2.9.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis é uma das espécies mais comuns no trato gastrointestinal, representando aproximadamente 65% da composição da microbiota

relacionada ao filo Firmicutes (BRUNEAU *et al.*, 2017). Essa prevalência é atribuída, em parte, ao seu diversificado repertório de mecanismos de virulência, que lhe conferem uma capacidade única de permanecer e sobreviver em diferentes ambientes e situações no organismo do hospedeiro. Isso destaca sua notável adaptação fisiológica (Chattopadhyay *et al.*, 2021).

No trato gastrointestinal, essas bactérias mantêm uma relação de comensalismo com o corpo humano, contribuindo para o equilíbrio da microbiota e para a manutenção da homeostase do organismo. No entanto, em situações em que conseguem se disseminar sem controle, *Enterococcus faecalis* pode se tornar um patógeno oportunista, desencadeando ou favorecendo quadros inflamatórios inadequados em regiões do intestino, como o cólon e o reto, por meio de mecanismos ainda não totalmente compreendidos (Alhinai; Walton; Commane, 2019; Gagnière *et al.*, 2016).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Utilizar bactérias do intestino do inseto adulto *Rynchophorus palmarum* para produção de proteases com atividade caseinolítica e capazes de coagular leite.

3.2 Objetivos específicos

- ☐ Identificar as bactérias do intestino do inseto adulto *R. palmarum* capazes de produzir proteases com atividade caseinolítica.
- ☐ Cultivar as bactérias em meio Agar-caseína para produção de proteases de interesse.
- ☐ Extrair as enzimas e mensurar sua atividade caseinolítica.
- ☐ Caracterizar o perfil proteico e enzimático do extrato (pH e temperatura ótima e inibição).
- ☐ Submeter o extrato a um pré-purificação para melhorar a eficiência da atividade caseinolítica.
- ☐ Caracterizar os parâmetros mínimos para coagulação do leite.

4 Metodologia

4.1 Criação e manutenção do inseto adulto *Rhynchophorus palmarum*

A coleta dos espécimes adultos de *Rhynchophorus palmarum* utilizados neste estudo foi realizada por meio de armadilhas atrativas, seguindo o protocolo descrito por Duarte et al. (2003). As armadilhas foram instaladas nas adjacências da Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Maceió, AL (Latitude 9°33'22"S e Longitude 35°46'35"W). Após a captura, os insetos foram acondicionados em recipientes plásticos com volume aproximado de 30 cm³, mantidos em ambiente climatizado com temperatura ambiente e umidade relativa de 60 ± 10%, por um período não superior a sete dias. A dieta dos espécimes capturados consistiu em cana-de-açúcar, a qual foi substituída a cada 48 horas.

4.2 Cepas bacterianas cultiváveis do trato digestivo de *R. palmarum*

4.2.1 Obtenção das cepas bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas neste estudo foram cedidas pelos Laboratórios de Bioquímica Metabólica e de Microbiologia, ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). As cepas foram isoladas e caracterizadas em um estudo prévio realizado pelo grupo de pesquisa dos referidos laboratórios, cujos resultados culminaram na publicação de Calumby et al. (2022). O trabalho de Calumby et al. (2022) teve como objetivo a caracterização da microbiota intestinal cultivável de *Rhynchophorus palmarum*, resultando na elaboração de um catálogo contendo 147 cepas bacterianas.

4.2.2 Seleção das bactérias produtoras de proteases com atividade caseinolítica.

A fim de identificar as cepas bacterianas com potencial para produção de proteases com atividade caseinolítica, foi empregada uma metodologia adaptada de Cheeseman (1963). As cepas bacterianas foram cultivadas em meio de cultura sólido composto por ágar bacteriológico e caseína de leite bovino (2% p/v) como substrato. Para fins de controle negativo, as cepas também foram cultivadas em meio de cultura

contendo apenas ágar bacteriológico. As culturas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

A avaliação preliminar considerou o crescimento bacteriano satisfatório e a presença de alterações organolépticas, como modificações no odor e na coloração do meio de cultura, como indicadores de atividade proteolítica.

4.2.3. Identificação das cepas selecionadas

Após a etapa de seleção, 11 cepas bacterianas, exibindo potencial para a produção de caseínases, foram submetidas a um novo processo de identificação para confirmação do isolamento e autenticação da espécie bacteriana. As cepas foram encaminhadas ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (USP), utilizando meio de transporte bacteriológico Stuart. A identificação bacteriana foi realizada por espectrometria de massas MALDI-TOF (ionização por dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo), utilizando o espectrômetro de massas Microflex™ (Bruker Daltonik).

Os resultados obtidos corroboraram os achados de Calumby et al. (2022), confirmando a identidade das cepas inicialmente isoladas. Entretanto, seis cepas apresentaram contaminação, sendo necessário um novo processo de isolamento.

Para as etapas subsequentes, foram selecionadas duas cepas que demonstraram maior potencial, com base no crescimento bacteriano e nas alterações organolépticas observadas no meio de cultura. As cepas bacterianas *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella variicola*, isoladas do intestino do inseto adulto *Rhynchophorus palmarum*, foram então utilizadas na segunda etapa do estudo.

4.3 Preparação do extrato enzimático

O extrato enzimático foi preparado utilizando uma metodologia adaptada de Cheeseman (1963). Placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura composto por ágar bacteriológico e sal sódico de caseína de leite bovino como substrato foram utilizadas para o cultivo das cepas *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella variicola*, isoladas do intestino do inseto adulto *Rhynchophorus palmarum*. As cepas foram cultivadas separadamente e incubadas a 37 °C por 48 horas.

Após o período de incubação, procedeu-se à extração das enzimas secretadas na matriz sólida de ágar bacteriológico. Para cada grama de meio de cultura, foram adicionados 2 mL de tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 8. A maceração e homogeneização do meio de cultura com o tampão foram realizadas individualmente, utilizando gral e pistilo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante, contendo as enzimas bacterianas, foi coletado e denominado Extrato de Enzimas Bacterianas (EBac), sendo utilizado nos ensaios subsequentes.

4.4 Determinação da atividade enzimática usando o substrato azocaseína

A atividade enzimática dos extratos foi determinada por meio de um ensaio colorimétrico com azocaseína como substrato, utilizando uma metodologia adaptada de Alencar et al. (2003). O meio reacional foi composto por 50 µL de EBac, 50 µL de tampão TRIS-HCl 50 mM (pH 8) contendo Triton X-100 a 0,1% (p/v) e 150 µL de azocaseína a 0,6% (p/v). Após incubação a 37 °C por 1 hora, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v).

Um controle branco foi realizado em paralelo, utilizando os mesmos componentes do meio reacional, com a adição de TCA no início da incubação para interromper a reação enzimática imediatamente. Após a adição do TCA, as amostras foram mantidas em repouso por 10 minutos e posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos.

A hidrólise da azocaseína foi quantificada medindo-se a absorbância de 200 µL do sobrenadante em um comprimento de onda de 366 nm, utilizando o leitor de microplacas FlexStation 3.

4.5 Quantificação proteica dos extratos de enzimas bacteriológicas

A quantificação de proteínas nos extratos enzimáticos bacterianos (EBac) foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (ASB) como padrão em concentrações que variaram de 0,05 a 1 mg/mL. O meio reacional foi preparado adicionando-se 10 µL de EBac a 190 µL de reagente de Bradford. Após 5 minutos de incubação em ambiente escuro, a absorbância foi medida em 595 nm utilizando o leitor de microplacas FlexStation 3.

4.6 Precipitação salina com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e método trifásico (TPP) (*Enterococcus faecalis*)

4.6.1 Precipitação salina com sulfato de amônio

O extrato enzimático bacteriano (EBac) da cepa *Enterococcus faecalis* foi submetido a um processo de pré-purificação proteica por precipitação salina com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, utilizando uma metodologia adaptada de Hopkins e Pinkus (1898). Inicialmente, 20 mL de EBac foram preparados, dos quais 5 mL foram reservados como controle para posterior análise da eficiência do método. Os 15 mL restantes foram submetidos a fracionamentos salinos com concentrações crescentes de sulfato de amônio, variando de 20% a 100% (p/v). A adição do sal foi realizada de forma lenta e gradual (**conforme Tabela 4**), sob agitação constante em banho de gelo por 1 hora, para promover a solubilização do sal e a precipitação proteica.

Após cada etapa de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado no fracionamento subsequente, utilizando a próxima concentração superior de sulfato de amônio. O precipitado proteico foi ressuspenso em 0,5 mL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, pH 8).

As frações proteicas obtidas foram então submetidas a uma triagem para avaliar a atividade enzimática, utilizando um ensaio colorimétrico com azocaseína como substrato, adaptado de Alencar et al. (2003). A fração que apresentou maior atividade enzimática foi selecionada para as etapas subseqüentes da pesquisa.

Tabela 4 - Fracionamento salino do extrato de enzimas bacteriológicos *Enterococcus faecalis*.

Fração salina	Massa de sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ (m/v)	Atividade Enzimática (U)
EBac	-	0,036
0 – 20 %	1,59g	0,019
20 – 40 %	1,70g	0,022
40 – 60 %	1,80g	0,033
60 – 80 %	1,94g	0,189
80 – 100 %	-	0,012

Fonte: elaborado pelo autor.

4.6.2 Método sistema de partição trifásica (TPP)

Visando otimizar o processo de pré-purificação e aumentar o rendimento e a recuperação enzimática do EBac, foi empregado um sistema de precipitação trifásica (TPP), utilizando álcool t-butílico como fase orgânica e sulfato de amônio como agente precipitante. O método TPP, uma alternativa eficaz aos métodos cromatográficos de purificação de proteínas, destaca-se por sua versatilidade e viabilidade econômica (Gagaoua & Hafid, 2016).

De acordo com a metodologia adaptada de Rawdkuen, Vanabun e Benjakul (2016), 100 mL de EBac foram preparados, dos quais 10 mL foram reservados como controle para análise da eficiência do método. Aos 90 mL restantes, foi adicionado sulfato de amônio, conforme descrito na seção 4.7.1, até atingir a fração de saturação de 60-80%. Em seguida, álcool t-butílico foi adicionado na proporção de 0,5:1 (v/v) em relação ao volume de EBac. A mistura foi então submetida à agitação moderada em movimentos circulares em tubos Falcon (15 mL) e mantida em repouso por 1 hora à temperatura ambiente.

Após o período de repouso, a amostra foi centrifugada a 5.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. As fases formadas foram separadas e avaliadas quanto à atividade enzimática, conforme descrito na seção 4.4 e de acordo com a **Tabela 5**. A fase com maior atividade enzimática foi selecionada para os ensaios de coagulação do leite.

Tabela 5 - Sistema de Partição Trifásica do extrato de enzimas bacteriológicos *Enterococcus faecalis*.

Fração	Atividade Enzimática (U)
EBac	0,035
Orgânica	0,000
Aquosa	0,019
Precipitado	0,147

Fonte: Elaborado pelo autor

4.7 Ensaio de caracterização do extrato

4.7.1 Ensaio com diferentes substratos na atividade proteolítica.

A fim de determinar a presença de enzimas proteolíticas de interesse no complexo enzimático produzido pelas cepas bacterianas, foi realizado um ensaio enzimático utilizando os substratos sintéticos BApNA (N- α -benzoil-L-arginina-p-nitroanilida), SAAPLpNA (N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida) e SAAPFpNA (N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida). Os substratos foram previamente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração final de 50 mM. A hidrólise dos substratos libera p-nitroanilida, um produto cromogênico que permite a quantificação da atividade enzimática por meio da leitura da absorbância em 410 nm, utilizando o leitor de microplacas FlexStation 3.

O meio reacional foi composto por 10 μ L de EBac, 110 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e 30 μ L de solução reveladora (contendo 4 μ L do substrato a ser utilizado (50 mM) + 96 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Após incubação a 37 °C por 1 hora, a reação foi interrompida pela adição de 150 μ L de ácido cítrico a 20% (m/v). A absorbância foi então medida em 410 nm, utilizando 200 μ L do meio reacional no leitor de microplacas FlexStation 3.

4.7.2 Influência do pH

Visando avaliar a influência do pH na atividade caseinolítica do complexo enzimático produzido pelas cepas bacterianas, foi empregada a metodologia descrita por Alencar et al. (2003), com modificações. A atividade enzimática foi determinada em diferentes valores de pH, utilizando as seguintes soluções tampão: acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0), fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0), Tris-HCl (pH 8,0) e glicinato de sódio (pH 9,0; 10,0 e 11,0), todas em concentração de 100 mM.

O meio reacional consistiu em 50 μ L de EBac, 50 μ L da solução tampão correspondente contendo Triton X-100 a 0,1% (v/v) e 150 μ L de azocaseína 0,6% (p/v), previamente dissolvida no tampão específico para cada pH. Após incubação a 37 °C por 1 hora, a reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v). As amostras foram então mantidas em repouso por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos.

Para cada valor de pH testado, um controle branco foi incluído, no qual o TCA foi adicionado no início da reação. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A absorbância do sobrenadante foi medida em 366 nm, utilizando 200 µL do meio reacional no leitor de microplacas FlexStation 3. O pH que resultou na maior hidrólise da azocaseína foi considerado o pH ótimo para a atividade enzimática.

4.7.3 Influência da temperatura

Com o intuito de determinar a influência da temperatura na atividade caseinolítica do complexo enzimático produzido pelas cepas bacterianas, foi utilizada a metodologia descrita por Alencar et al. (2003), com modificações. A atividade enzimática foi avaliada nas seguintes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C.

O meio reacional foi composto por 50 µL de EBac, 50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo Triton X-100 a 0,1% (v/v) e 150 µL de azocaseína a 0,6% (p/v). Após incubação em cada temperatura por 1 hora, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v). As amostras foram então mantidas em repouso por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos.

Para cada temperatura avaliada, um controle branco foi incluído, no qual o TCA foi adicionado no início da reação. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A absorbância do sobrenadante foi medida em 366 nm, utilizando 200 µL do meio reacional no leitor de microplacas FlexStation 3. A temperatura que resultou na maior hidrólise da azocaseína foi considerada a temperatura ótima para a atividade enzimática.

4.7.4 Ensaio de inibição

Querendo investigar o efeito de diferentes inibidores enzimáticos na atividade caseinolítica do complexo enzimático produzido pelas cepas bacterianas, foi empregada a metodologia descrita por Alencar et al. (2003), com modificações. Os seguintes inibidores foram utilizados: fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (5 mM) para serinoproteases; 2β-mercaptoetanol (5 mM) para tiol-proteases; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (5 mM) para metaloproteases; ditioneitol (DTT) (5 mM) para cisteíno-proteases; e benzamidina (5 mM) como inibidor sintético de tripsina.

O meio reacional consistiu em 50 μL de EBac, 40 μL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo Triton X-100 a 0,1% (v/v), 10 μL da solução inibidora correspondente e 150 μL de azocaseína a 0,6% (p/v). A concentração final do inibidor no meio reacional foi de 3 mM. Após um período de pré-incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, as reações foram incubadas a 37 °C por 1 hora. A reação foi então interrompida pela adição de 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v). As amostras foram mantidas em repouso por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos.

Para cada inibidor testado, um controle branco foi incluído, no qual o TCA foi adicionado no início da reação. Um controle positivo, sem a adição de inibidores, foi utilizado como referência para 100% da atividade enzimática. A absorbância do sobrenadante foi medida em 366 nm, utilizando 200 μL do meio reacional no leitor de microplacas FlexStation 3.

4.8 Eletroforese SDS-PAGE e Zimografia

4.8.1 gel poliacrilamida SDS-PAGE

A análise do perfil proteico dos extratos enzimáticos bacterianos (EBac) foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). Utilizou-se um gel de empilhamento a 4% (m/v) e um gel de separação a 10% (m/v). As amostras foram preparadas em tampão contendo Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (p/v), e desnaturadas por aquecimento a 90 °C por 5 minutos antes da aplicação nos poços do gel.

A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 140 V, por aproximadamente 3 horas. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com uma solução contendo 0,4 g de AgNO_3 , NaOH 0,36% (p/v) e NH_4OH 21% (v/v) por 30 minutos. Em seguida, o gel foi lavado com solução reveladora, composta por 50 mL de água, 25 μL de formaldeído a 37% (v/v) e 25 μL de ácido cítrico a 10% (p/v), até a visualização das bandas proteicas.

4.8.2 Zimografia

A atividade proteolítica do EBac foi avaliada por zimografia em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), contendo caseína incorporada à matriz do gel. Foram utilizados géis de empilhamento (4% m/v) e de separação (14% m/v), ambos contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e caseína a 0,25% (p/v). As amostras foram preparadas em tampão contendo Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (p/v).

A eletroforese foi realizada a 140 V, por aproximadamente 3 horas, em banho de gelo. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado três vezes com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5% (v/v), com duração de 15 minutos cada lavagem. Em seguida, o gel foi incubado em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) por 48 horas a 37 °C para permitir a renaturação das enzimas e a atividade proteolítica sobre a caseína.

A revelação do zimograma foi realizada pela imersão do gel em solução corante de Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,2% (p/v) em solução aquosa de metanol (1:1 v/v) por 24 horas. O gel foi então lavado com solução fixadora contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) até a visualização das bandas claras, indicativas da atividade proteolítica, em um fundo azul escuro.

4.9 Ensaio de coagulação em leite desnatado

4.9.1 Ensaio de parâmetros mínimos ideais para coagulação de leite em pó desnatado.

A fim de determinar os parâmetros mínimos para a coagulação de uma solução de leite em pó desnatado pelos extratos enzimáticos bacterianos (EBac), foi empregada a metodologia descrita por Arima, Yu e Iwasaki (1970), com modificações. Os fatores investigados incluíram tempo, temperatura e concentração mínima de proteína com atividade coagulante.

Inicialmente, a concentração de proteína em cada EBac foi determinada pelo método de Bradford, conforme descrito na seção 4.5. Para o EBac de *K. variicola*, com concentração proteica de 0,163 µg/µL, foram avaliadas concentrações de 15 a 0,1 µg de proteína. Para o EBac de *E. faecalis*, com concentração de 0,304 µg/µL, foram testadas concentrações de 30 a 1 µg de proteína.

Uma solução de leite em pó desnatado a 10% (m/v) foi preparada com a adição de cloreto de cálcio a 10 mM e o pH ajustado para 6,5. Alíquotas de 1000 µL da solução de leite foram distribuídas em tubos de microcentrífuga (Eppendorf), e 100 µL de cada EBac foram adicionados aos respectivos tubos. Como controle, utilizou-se 100 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. O experimento foi conduzido em duas temperaturas (37 °C e 50 °C), com tempo de incubação de 1 hora. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 2 minutos e a coagulação foi avaliada visualmente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9.2 Ensaio efeito do cálcio

Visando determinar a influência do cloreto de cálcio na coagulação do leite mediada pelos extratos enzimáticos bacterianos (EBac), foram utilizadas concentrações de 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 mM de cloreto de cálcio no meio reacional. Uma solução de leite em pó desnatado a 10% (m/v) foi preparada e o pH ajustado para 6,5. Alíquotas de 1000 µL da solução de leite foram adicionadas a tubos de microcentrífuga (Eppendorf), juntamente com 100 µL do EBac e 100 µL da solução de cloreto de cálcio na concentração desejada. O controle consistiu em 1000 µL da solução de leite, 100 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, e 100 µL de água ultrapura.

As reações foram incubadas a 50 °C por 1 hora, utilizando a concentração mínima de proteína previamente determinada como eficaz para a coagulação do leite. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 2 minutos e a coagulação foi avaliada visualmente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9.3 Cálculo da atividade coagulante

O cálculo da atividade coagulante foi realizado com base na seguinte equação:

$$\text{MCA(U)/mL} = \left[\frac{2400 \times V}{T} \right] \times v$$

Em que “V” é o volume do leite (mL); “T” o tempo de coagulação em segundos e “v” o volume de extrato enzimático aplicado (mL). A equação foi adaptada de Tabayehnejad, Castillo e Payne (2012), considerando a quantidade de enzima necessária para coagular 10 mL de leite em 40 minutos (2400 segundos) a 37 °C.

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização dos extratos

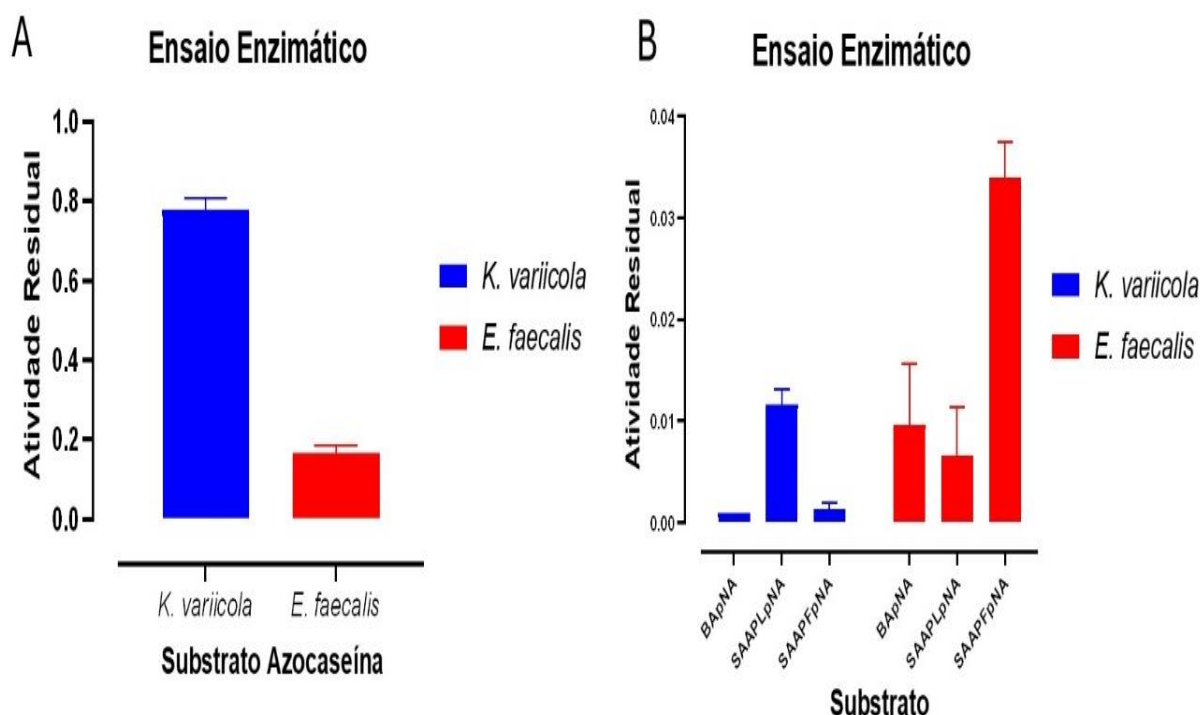
5.1.1 Atividade enzimática frente aos diferentes substratos

O meio de cultura, como descrito por Chi et al. (2007) e Sindhu, Suprabha e Shashidhar (2009), constitui uma ferramenta essencial para o cultivo de microrganismos, fornecendo os nutrientes necessários para o crescimento e produção de enzimas de interesse biotecnológico. Dentre os diversos substratos utilizados em meios de cultura, a caseína destaca-se como uma fonte rica em proteínas, sendo amplamente empregada para estimular a produção de proteases, enzimas que catalisam a quebra de proteínas. Essa estratégia é corroborada por estudos como os de Verma (2001) e Han, Kautto e Nevalainen (2017), que demonstraram a eficácia da caseína na indução da produção de proteases por diferentes microrganismos.

No presente estudo, o objetivo principal foi investigar a capacidade de duas cepas bacterianas, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella variicola*, isoladas do intestino do inseto *Rhynchophorus palmarum*, em produzir enzimas proteolíticas com diferentes especificidades, utilizando a caseína como substrato indutor. As enzimas de interesse incluíram tripsina, quimotripsina e elastase II, selecionadas devido à sua relevância em processos biotecnológicos, como a produção de detergentes, alimentos e fármacos. Para avaliar a presença dessas enzimas nos extratos bacterianos (EBac), foram empregados substratos sintéticos específicos: BApNA para tripsina, SAAPLpNA para elastase II e SAAPFpNA para quimotripsina. A atividade caseinolítica, por sua vez, foi determinada utilizando a azocaseína como substrato.

Os resultados obtidos revelaram que os extratos de ambas as cepas apresentaram baixa atividade frente aos substratos BApNA e SAAPLpNA, indicando uma produção limitada de tripsina e elastase II, respectivamente. Entretanto, o EBac de *E. faecalis* exibiu uma atividade detectável (0,034 U) com o substrato SAAPFpNA, sugerindo a presença de enzimas com especificidade semelhante à quimotripsina. Essa atividade, embora modesta, abre caminho para futuras investigações sobre a natureza e aplicação dessas enzimas. É importante salientar que a **Figura 12** ilustra graficamente esses resultados, permitindo uma visualização clara do perfil de atividade enzimática de cada cepa.

Figura 12 - Atividade hidrolítica dos extratos enzimáticos das cepas *Klebsiella variicola* e *Enterococcus faecalis*. A) frente ao substrato azocaseína B) frente aos substratos enzimáticos BApNA, SAAPLpNA e SAAPFpNA.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

Apesar da baixa atividade frente aos substratos sintéticos, o cultivo em ágar-caseína mostrou-se eficaz na indução da produção de enzimas com atividade caseinolítica por ambas as cepas bacterianas. Vale ressaltar que a cepa de *K. variicola* destacou-se neste aspecto, apresentando uma atividade específica de 0,09 U $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sem a necessidade de etapas adicionais de pré-purificação ou concentração do extrato enzimático. Em contrapartida, o EBac de *E. faecalis*, apesar de também exibir atividade caseinolítica, requereu pré-purificação e concentração para atingir uma atividade específica de 0,01 U $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Essa diferença na eficiência de produção enzimática entre as duas cepas pode ser atribuída a fatores como variações nas vias metabólicas, sistemas de secreção e mecanismos de regulação gênica envolvidos na biossíntese de proteases.

Em suma, o presente estudo demonstrou o potencial de cepas bacterianas isoladas do intestino de *Rhynchophorus palmarum* na produção de enzimas com atividade caseinolítica, abrindo perspectivas para a exploração dessas enzimas em diversas aplicações biotecnológicas, como a indústria alimentícia, farmacêutica e de

biocombustíveis. A identificação e caracterização detalhada dessas enzimas, bem como a otimização das condições de cultivo e produção, são etapas cruciais para o desenvolvimento de processos biotecnológicos eficientes e sustentáveis.

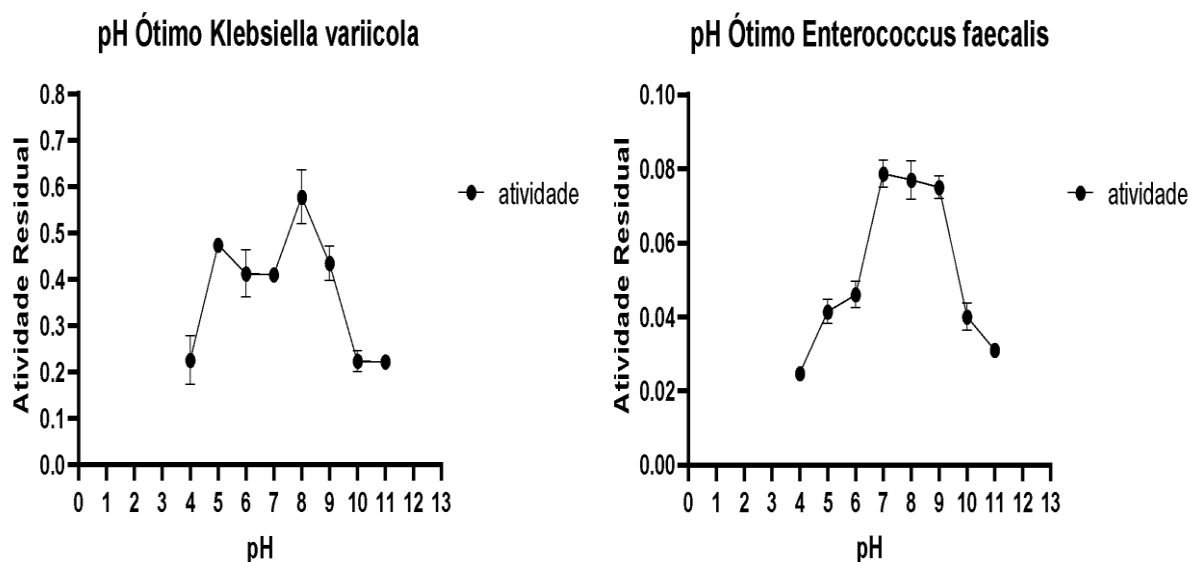
5.1.2 Influência do pH

A atividade catalítica de uma enzima é intrinsecamente dependente da manutenção de sua estrutura tridimensional nativa, a qual é sensível a diversos fatores físico-químicos, incluindo o pH do meio. Variações no pH podem alterar o estado de ionização dos aminoácidos constituintes da enzima, induzindo mudanças conformacionais que afetam diretamente sua capacidade catalítica, conforme descrito por Nelson e Cox (2022).

O valor de pH no qual a enzima exibe atividade máxima é denominado pH ótimo, sendo um parâmetro crucial na caracterização bioquímica de enzimas. A determinação do pH ótimo pode fornecer informações relevantes sobre as propriedades da enzima, como sua natureza ácida ou alcalina. Neste estudo, a análise do perfil de atividade enzimática em função do pH revelou que os extratos brutos de *Klebsiella variicola* e *Enterococcus faecalis* (EBac) exibiram atividade proteolítica máxima em condições alcalinas. O EBac de *K. variicola* apresentou pH ótimo de 8,0, enquanto o EBac de *E. faecalis* exibiu uma faixa ótima de pH entre 7,0 e 9,0 (**Figura 13**). A maior amplitude da faixa de pH ótimo observada para o EBac de *E. faecalis* sugere a presença de múltiplas enzimas com atividade caseinolítica e pHs ótimos distintos, atuando de forma sinérgica na degradação da azocaseína.

É interessante observar que os resultados obtidos neste estudo estão em consonância com diversos trabalhos científicos que relatam a produção de proteases alcalinas por diferentes microrganismos, como os de Shrinivas e Naik (2011), Asokan e Jayanthi (2010), Aguilar, De Castro e Sato (2019) e Mitra e Chakrabarty (2005), que descreveram a produção de proteases alcalinas por diversos microrganismos, com atividade máxima em faixas de pH entre 7,0 e 11,0. Essa convergência de resultados reforça a consistência das análises realizadas e confirma a natureza alcalina das proteases presentes nos EBac de *K. variicola* e *E. faecalis*.

Figura 13 - Quantificação da atividade proteolítica dos EBacs de *Klebsiella variicola* e *Enterococcus faecalis* frente ao substrato azocaseína em diferentes pH: tampão acetato (pH 4-5); tampão fosfato (6-7); tampão Tris-HCl (8) e tampão de glicina (9-11).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

5.1.3 Influência da temperatura

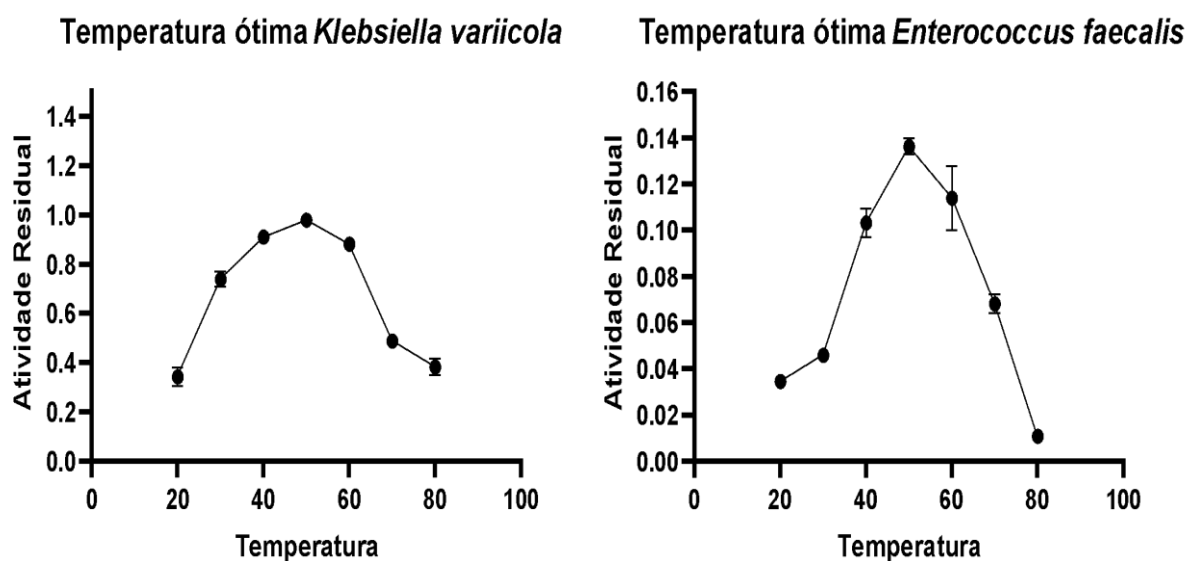
A temperatura proporciona o aumento da energia cinética das moléculas, fazendo com que a probabilidade de interação entre a enzima e o substrato se intensifique, porém, em temperaturas bastante elevadas, as enzimas podem sofrer desnaturação, deformando sua estrutura nativa e tornando-se inativas de forma irreversível Nelson e Cox (2022). A temperatura é considerada um dos parâmetros cruciais para o bom desempenho e funcionamento de uma enzima. A regulação desse parâmetro em ensaios enzimáticos é fundamental para garantir a máxima atividade catalítica e com isso possibilitar a redução da quantidade de enzima necessária para uma reação Herlet *et al.* (2017). Assim, conhecer como determinada enzima se comporta em diferentes temperaturas é um passo importante para possíveis aplicações biotecnológicas.

Compreender como as enzimas se comportam em diferentes temperaturas é essencial para o desenvolvimento de bioprocessos eficazes e robustos. No presente estudo, a análise da atividade enzimática em função da temperatura revelou que os extratos enzimáticos bacterianos (EBac) de *Klebsiella variicola* e *Enterococcus faecalis* compartilham um perfil de atividade semelhante, com temperatura ótima de 50 °C demonstrado na **figura 14**. Ambas as enzimas mantiveram níveis satisfatórios

de atividade em uma faixa relativamente ampla de temperatura, entre 40 °C e 60 °C, demonstrando certa flexibilidade em relação à temperatura de reação. No entanto, temperaturas mais elevadas, acima de 70 °C, levaram a uma diminuição drástica na atividade enzimática, evidenciando a ocorrência de desnaturação proteica.

Um resultado interessante foi a capacidade do EBac de *K. variicola* em manter uma atividade enzimática significativa mesmo a 80 °C. Essa característica, conhecida como termoestabilidade, é de grande interesse para aplicações biotecnológicas que requerem altas temperaturas, como a produção de biocombustíveis, o processamento de alimentos e o tratamento de resíduos industriais. A termoestabilidade do EBac de *K. variicola* abre caminho para sua utilização em processos industriais mais eficientes e econômicos, uma vez que a enzima pode ser utilizada em temperaturas mais elevadas, acelerando as reações e reduzindo o tempo de processamento.

Figura 14 - Quantificação da atividade proteolítica dos EBacs de *Klebsiella variicola* e *Enterococcus faecalis* frente ao substrato azocaseína em diferentes temperaturas (20 – 80°C).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

Os resultados obtidos neste estudo corroboram as observações de diversos trabalhos científicos que investigaram a influência da temperatura na atividade de proteases microbianas, especialmente aquelas com potencial aplicação na coagulação do leite, como observado em Vishwanatha; Appu Rao e Singh (2010), Da Silva et al. (2017), Saeed et al. (2023) e Liu et al. (2018) que encontram faixas de

temperatura ótima para suas respectivas atividades enzimáticas variando de 45 a 70°C. Essa convergência de resultados demonstra a importância da temperatura como fator crítico na atividade enzimática e reforça a necessidade de se considerar os parâmetros térmicos no desenvolvimento de aplicações biotecnológicas que envolvam o uso de enzimas.

5.1.4 Ensaio de Inibição da atividade enzimática.

A atividade enzimática pode ser modulada por substâncias conhecidas como inibidores enzimáticos. Estas moléculas interagem com as enzimas, diminuindo ou cessando a catálise. Os mecanismos de inibição são diversos, incluindo a ligação do inibidor à enzima livre, ao complexo enzima-substrato, ou a competição direta pelo sítio catalítico. Tais interações podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo da natureza da ligação enzima-inibidor e da possibilidade de dissociação do complexo, como descrito por Butterworth (1997) e Palmer e Bonner (2007).

A especificidade da interação enzima-inibidor permite inferir a classe enzimática presente em um sistema. Considerando a complementaridade entre o sítio catalítico e o substrato, e utilizando inibidores específicos para diferentes classes de enzimas, é possível realizar uma pré-identificação da classificação enzimática. Neste estudo, foram selecionados os seguintes inibidores: Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), para inibir serinoproteases; 2β-mercaptoetanol, para inibir tiol-proteases; Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para inibir metaloproteases; Ditioneitol (DTT), para inibir cisteíno-proteases; e benzamidina (3 mM), como inibidor sintético de tripsina.

Convergindo com essa perspectiva, diversos estudos, incluindo Saeed et al. (2023), Shaikh, Dixit e Shaikh (2018), Bíscola et al. (2016) e Souto, Branquinho e Santos (2018), investigaram a produção de extratos enzimáticos microbianos com atividade coagulante sobre o leite. Esses trabalhos, por meio de ensaios de inibição, identificaram a predominância de classes enzimáticas como metaloproteases, cisteinoproteases e serinoproteases, corroborando a associação dessas enzimas com a capacidade de coagulação do leite.

Os resultados da presente investigação revelaram perfis de inibição distintos entre os extratos bacterianos (EBac) de *K. variicola* e *E. faecalis*. O EBac de *K. variicola* exibiu maior sensibilidade ao DTT (91,22% de inibição) e ao EDTA (60,23%

de inibição), sugerindo a presença de cisteíno-proteases e metaloproteases. Em contraste, o EBac de *E. faecalis* apresentou maior suscetibilidade ao PMSF (87,5% de inibição), indicando a presença de serinoproteases como observado na **tabela 6**. Adicionalmente, a atividade enzimática do EBac de *E. faecalis* frente ao substrato SAAPFpNA (**Figura 12**) reforça a hipótese da presença de quimotripsina, uma serinoprotease com especificidade por esse substrato.

Tabela 6 - Atividade residual enzimática dos EBacs de *Klebsiella variicola* e *Enterococcus faecalis* frente ao substrato azocaseína após a adição de diferentes inibidores.

Inibidor	Concentração [mM]	% Atividade residual <i>K. variicola</i>	% Atividade residual <i>E. faecalis</i>
Controle	5mM	100	100
PMSF	5mM	75,55	12,5
2beta-mercaptoetanol	5mM	50,79	75,96
EDTA	5mM	39,77	61,53
DTT	5mM	8,78	100
benzamidina	5mM	100	100

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

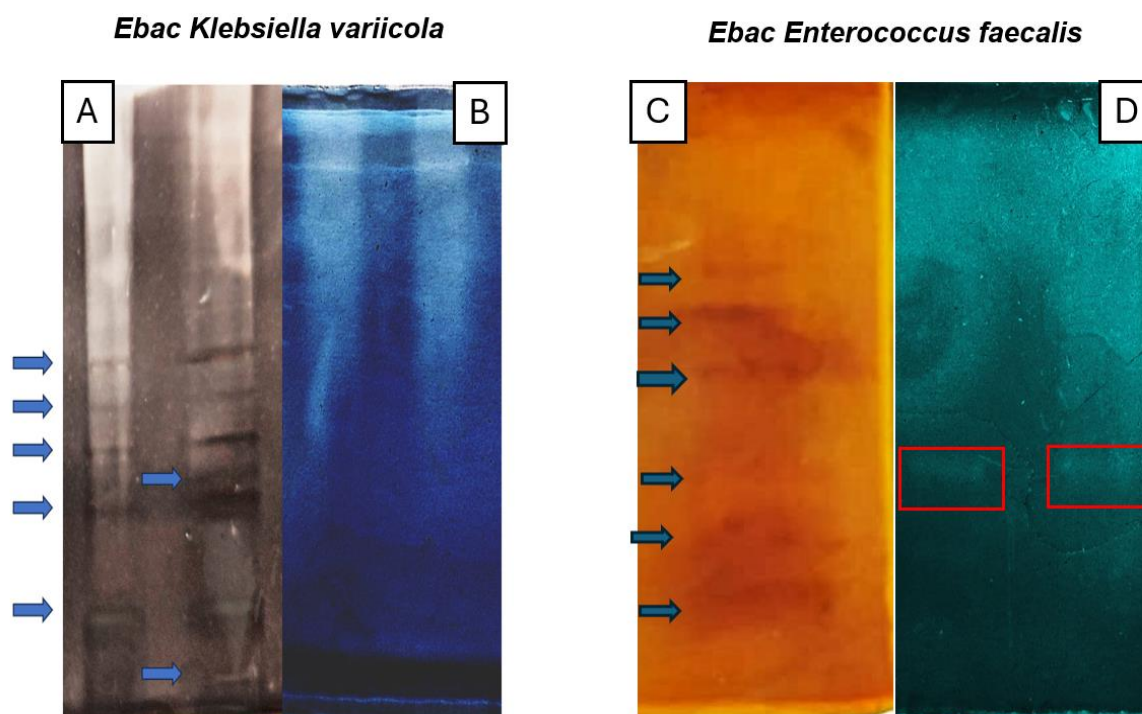
5.2 Eletroforese SDS-PAGE e Zimografica

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) constitui um método amplamente difundido na comunidade científica, o qual se baseia na migração de macromoléculas carregadas em um campo elétrico através de uma matriz porosa. No âmbito biotecnológico, as variantes nativa e desnaturante da PAGE demonstram-se ferramentas valiosas na análise de perfis proteicos e na purificação de biomoléculas, notadamente aquelas obtidas por técnicas de isolamento e fracionamento. Essa técnica possibilita a avaliação do grau de complexidade e pureza de proteínas presentes em uma amostra, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento científico e suas aplicações em diversas áreas (Silva Junior, 2004).

Nesse contexto, o presente estudo propôs-se a analisar o perfil proteico expresso pelo extrato bruto bacteriano (EBac) de *Klebsiella variicola*, bem como a metodologia de pré-purificação do EBac de *Enterococcus faecalis*, visando à determinação do grau de complexidade dos extratos produzidos. Adicionalmente,

empregou-se a técnica de zimografia para avaliar a atividade proteolítica em matriz sólida de poliacrilamida contendo caseína como substrato (**Figura 15**).

Figura 15 - A e C representa eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 14% corado com prata dos EBac de *K. variicola* e *E. faecalis* respectivamente; B e D representa zimografia gel de poliacrilamida 14% (contendo SDS + 0.25% de caseína) corado com comassie blue dos EBacs de *K. variicola* e *E. faecalis* respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

Os resultados obtidos demonstram-se promissores, visto que os EBacs de *K. variicola* e *E. faecalis* não exibiram perfis proteicos de elevada complexidade. No caso do EBac de *K. variicola*, observaram-se sete bandas proteicas após coloração com prata, além de eficiente hidrólise da caseína incorporada à matriz de poliacrilamida. Para o EBac de *E. faecalis*, detectaram-se seis bandas proteicas utilizando a mesma metodologia de coloração. A zimografia evidenciou a atividade proteolítica na matriz de poliacrilamida, caracterizada por um padrão de hidrólise com arrasto inicial no gel e uma banda de hidrólise localizada na região mediana do gel.

A técnica de eletroforese demonstrou-se crucial para o estudo das enzimas produzidas pelas cepas bacterianas analisadas. Além de permitir a obtenção de um perfil proteico para as amostras, proporcionou uma caracterização preliminar

relevante. A zimografia em gel de poliacrilamida confirmou a presença de proteases nas amostras avaliadas, fornecendo indícios sobre suas propriedades proteolíticas.

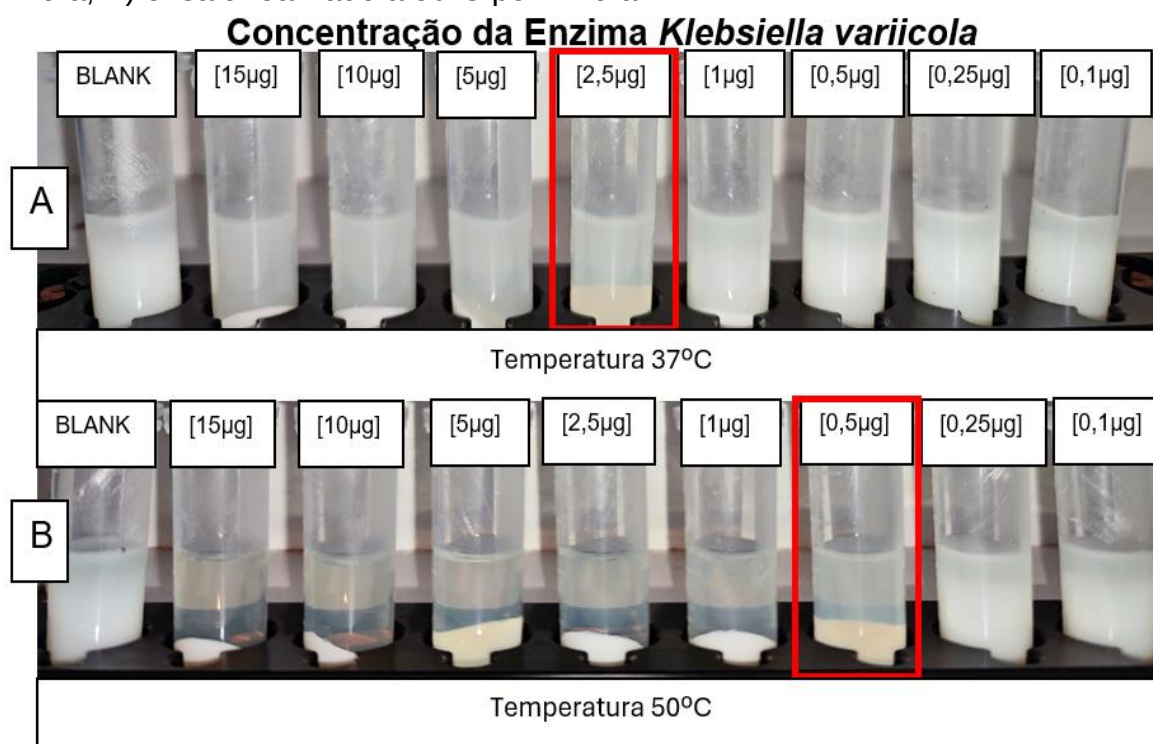
5.3 Ensaio de coagulação

O leite caracteriza-se como uma emulsão de lipídios em água, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteínas. As caseínas constituem a principal fração proteica do leite, representando aproximadamente 80% do total, e organizam-se em micelas compostas predominantemente pelas variantes α s1-, α s2-, β - e κ -caseína. A κ -caseína destaca-se por sua importância no processo de coagulação, sendo sua hidrólise essencial para a formação do coágulo. Este processo ocorre em duas etapas: inicialmente, a κ -caseína sofre hidrólise enzimática, gerando micelas de para- κ -caseína sensíveis ao cálcio; posteriormente, o cálcio induz a agregação dessas micelas, culminando na formação do coágulo (Guinee; Wilkinson, 1992).

O presente estudo objetivou avaliar a interação das enzimas presentes nos extratos brutos bacterianos (EBacs) de *Klebsiella variicola* e *Enterococcus faecalis* com leite em pó desnatado, estimando o potencial coagulante dos extratos e determinando os parâmetros mínimos para a ocorrência da coagulação. O ensaio foi conduzido com tempo mínimo de 1 hora, utilizando diferentes concentrações dos extratos em duas temperaturas distintas (37°C e 50°C).

Os resultados obtidos para o EBac de *K. variicola* demonstram-se promissores, com atividade específica (unidade de atividade coagulante - UAC) estimada em 400,2 UAC/mL de enzima. A análise do parâmetro temperatura revelou influência significativa na atividade coagulante, observando-se aumento substancial da eficiência em temperatura mais elevada. Enquanto a 37°C a concentração mínima para atividade coagulante efetiva foi de 2,5 μ g de proteína, a 50°C essa concentração reduziu-se para 0,5 μ g. Portanto, a 50°C, requer-se uma quantidade cinco vezes menor de proteína para alcançar o mesmo efeito em 1 hora de reação (**Figura 16**).

Figura 16 - Ensaio de coagulação em leite em pó desnatado Ebac *Klebsiella variicola*, usando diferentes concentrações proteicas do extrato. A) ensaio realizado a 37°C por 1 hora; B) ensaio realizado a 50°C por 1 hora.

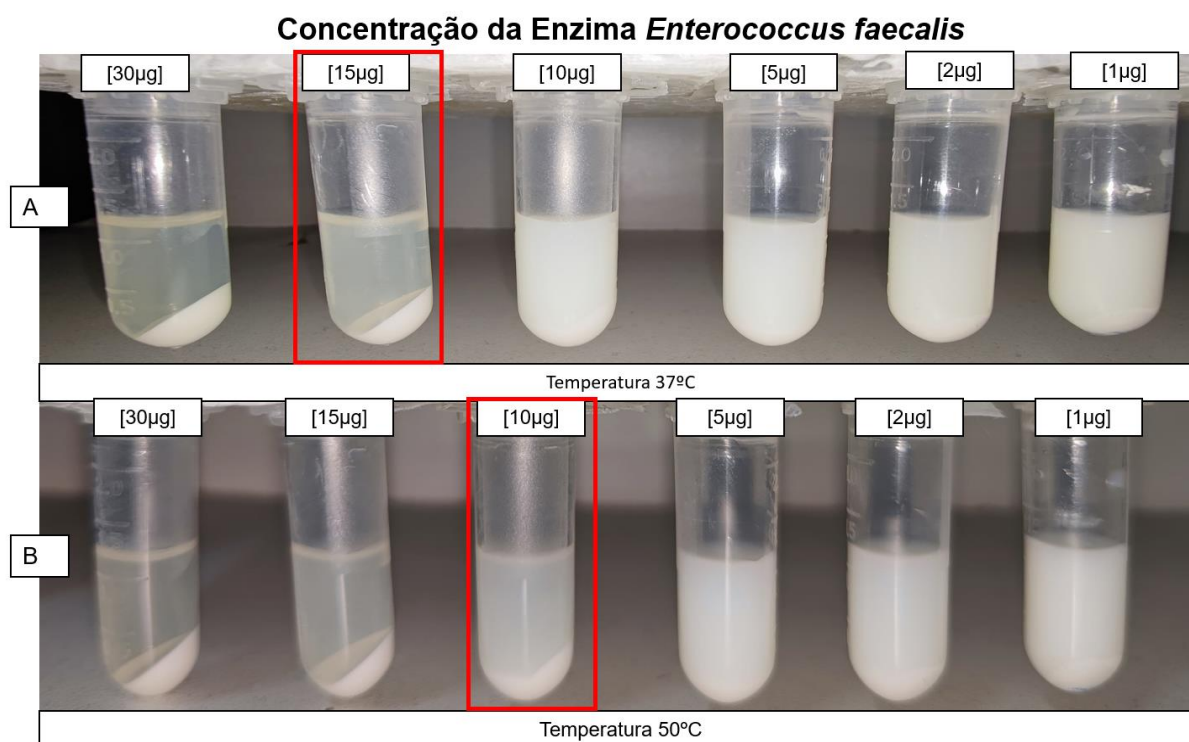


Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

O EBac de *E. faecalis* também apresentou resultados promissores, com atividade específica estimada em 200,1 UAC/mL de enzima. A temperatura influenciou a atividade coagulante, com redução da concentração mínima de proteína necessária para 10 μg a 50°C, representando 1,5 vezes menos proteína em comparação a 37°C, para o mesmo efeito em 1 hora de reação (**figura 17**). A comparação entre os dois EBacs permitiu evidenciar o superior potencial coagulante do EBac de *K. variicola*, o qual requer 20 vezes menos proteína para exercer a atividade coagulante a 50°C em 1 hora, em relação ao EBac de *E. faecalis*.

Estudos anteriores, como os conduzidos por Luo et al. (2018), Hang et al. (2016), Li et al. (2012) e Shieh, Thi e Shih (2009), também relataram elevadas unidades de atividade coagulante em microrganismos, com valores de 380, 6000, 200 e 650 MAC (Milk-Clotting Enzyme)/mL, respectivamente. Diversas pesquisas têm sido publicadas ao longo dos anos sobre proteases microbianas, visando à identificação de novos microrganismos produtores e ao desenvolvimento de enzimas mais eficientes para a coagulação do leite, impulsionando avanços biotecnológicos.

Figura 17 - Ensaio de coagulação em leite em pó desnatado Ebac *Enterococcus faecalis*, usando diferentes concentrações proteicas do extrato A) ensaio realizado a 37°C por 1 hora; B) ensaio realizado a 50°C por 1 hora.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os valores encontrados nas pesquisas supracitadas, evidenciando o potencial significativo dos extratos enzimáticos analisados.

5.4 Influência do Cálcio

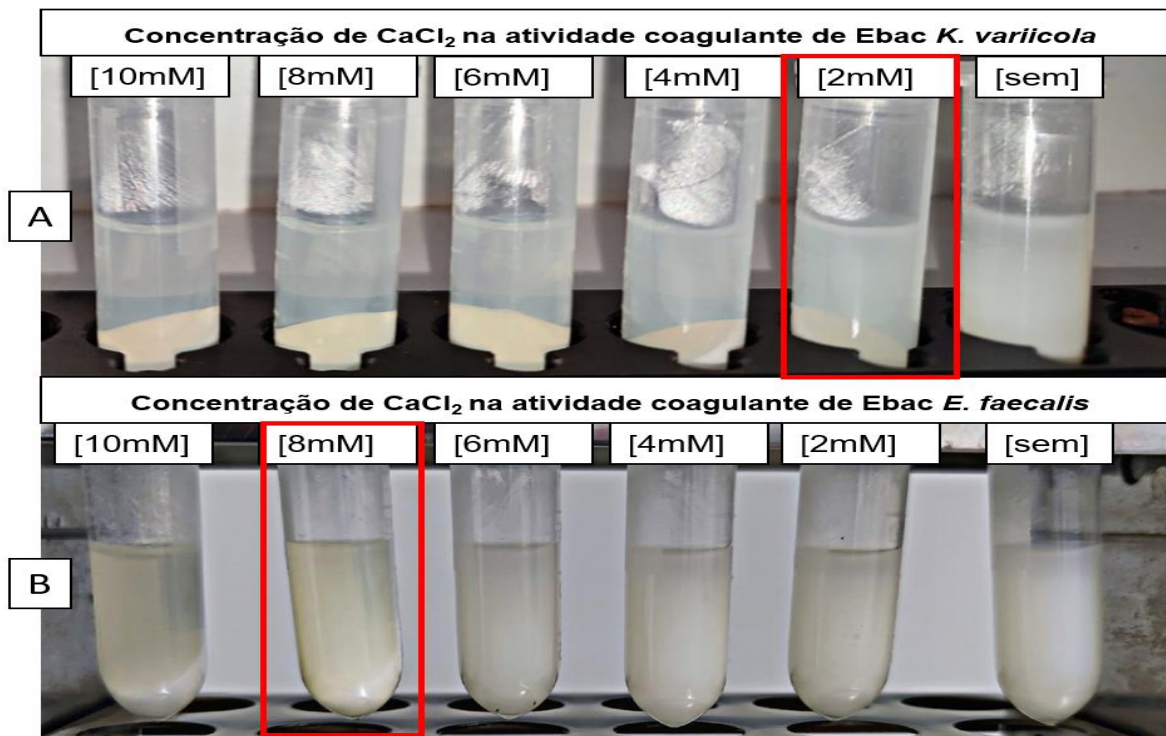
O cálcio desempenha um papel crucial na coagulação do leite, sendo capaz de reduzir significativamente a estabilidade estrutural da caseína. Esse efeito promove a desestabilização das micelas de caseína, aumentando sua hidrofobicidade e, consequentemente, favorecendo a agregação micelar (Philippe et al., 2003). Adicionalmente, a força iônica do meio ou a interação de íons específicos com os grupos carregados da proteína podem atenuar a repulsão eletrostática entre as moléculas, facilitando a agregação proteica (Mikheeva et al., 2003).

O presente estudo objetivou avaliar a influência do cálcio na atividade coagulante do leite. Com base na metodologia descrita no item 4.9.2, variou-se a concentração de cloreto de cálcio, utilizando a menor concentração proteica capaz de

induzir a coagulação do leite a 50°C em 1 hora. Dessa forma, buscou-se determinar a concentração mínima de cálcio necessária para influenciar positivamente a atividade coagulante dos extratos brutos bacterianos (EBacs) analisados.

Os resultados obtidos corroboram os dados presentes na literatura, confirmando o papel essencial do cálcio na coagulação do leite. Ambos os EBacs demonstraram-se incapazes de exercer atividade coagulante na ausência de cloreto de cálcio. No caso do EBac de *Klebsiella variicola*, as concentrações de cloreto de cálcio necessárias foram significativamente menores que as estipuladas na metodologia de Arima et al. (1970), sendo suficientes 2 mM para promover a coagulação. Em contraste, o EBac de *Enterococcus faecalis* apresentou resultados mais modestos, necessitando de 8 mM de cloreto de cálcio para exercer sua atividade coagulante (Figura 18).

Figura 18 - A) ensaio de influência da concentração de cálcio para atividade coagulante de 0,5 µg de proteína do EBac *Klebsiella variicola* a 50°C por 1 hora; B) ensaio de influência da concentração de cálcio para atividade coagulante de 10µg de proteína do EBac *Enterococcus faecalis* a 50°C por 1 hora.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

Estudos realizados com outros microrganismos, como os de He et al. (2011), Ding et al. (2012) e El-Bendary, Moharam e Ali (2007), demonstraram que o cálcio

potencializa a atividade coagulante de proteases microbianas. Esses estudos relataram elevadas atividades coagulantes em concentrações de cloreto de cálcio de 50 mM, mas indicaram redução significativa da eficiência em concentrações inferiores a 10 mM. Conforme mencionado, o cálcio isoladamente pode exercer potencial coagulante no leite, sendo necessário manter suas concentrações em níveis adequados para que a ação catalítica das enzimas de interesse atue de forma efetiva sobre as proteínas do leite.

Com base nos resultados, infere-se que os parâmetros mínimos para a atividade coagulante do EBac de *K. variicola* consistem em 0,5 µg de proteína para coagular 1 mL de leite em pó desnatado a 50°C, na presença de 2 mM de CaCl₂, em 1 hora. Para o EBac de *E. faecalis*, os parâmetros mínimos são 10 µg de proteína para coagular 1 mL de leite em pó desnatado a 50°C, na presença de 8 mM de CaCl₂, em 1 hora.

5.5 compilado dos resultados

O presente estudo desenvolveu-se utilizando duas cepas bacterianas isoladas da microbiota intestinal do inseto adulto *Rhynchophorus palmarum*: *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella variicola*. As cepas foram cultivadas em meio de cultura que propiciou a produção e extração de proteases com atividade caseinolítica e coagulante do leite. Ao longo da caracterização enzimática e aplicação biotecnológica na coagulação do leite, observaram-se semelhanças e diferenças entre os extratos enzimáticos obtidos a partir dessas cepas bacterianas, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Resumo comparativo dos resultados obtidos com os EBacs das cepas de bactérias de *Klebsiella variicola* e *Enterococcus faecalis*.

Parâmetros	<i>Klebsiella variicola</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Atividade em diferentes substratos	AZOCASEÍNA	AZOCASEÍNA e SAAPFPNA
pH ótimo	8	7, 8 e 9
Temperatura ótima	50°C	50°C
Inibidores	EDTA e DTT	PMSF

Temperatura ótima para atividade coagulante	50°C	50°C
Concentração proteica mínima para atividade coagulante	0,5 µg	10 µg
Concentração mínima de cálcio para atividade coagulante	2mM	8mM

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024

As diferenças observadas entre os extratos enzimáticos podem ser atribuídas à diversidade genética entre as cepas bacterianas, às condições de cultivo e aos métodos de extração empregados. É crucial salientar que a microbiota intestinal de insetos representa um reservatório de enzimas com potencial biotecnológico ainda pouco explorado.

Os resultados deste estudo, sintetizados na **Tabela 7**, demonstram o potencial de *E. faecalis* e *K. variicola* como fontes de proteases para aplicação na indústria láctea. As informações obtidas contribuem para o desenvolvimento de processos biotecnológicos inovadores e sustentáveis para a produção de queijos, explorando a biodiversidade microbiana e impulsionando avanços na área de alimentos.

6 Conclusão

O presente estudo teve como objetivo investigar o potencial biotecnológico de proteases extraídas de bactérias intestinais do inseto-praga *Rhynchophorus palmarum*. As enzimas proteolíticas, comumente denominadas proteases, desempenham um papel essencial em diversos processos biológicos e industriais, destacando-se, particularmente, na indústria alimentícia, onde são amplamente utilizadas na produção de queijos.

Duas cepas bacterianas, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella variicola*, foram isoladas do trato intestinal de *R. palmarum* e cultivadas em condições otimizadas para a produção de proteases. Os extratos brutos bacterianos (EBacs) foram submetidos a ensaios bioquímicos com o intuito de avaliar a atividade caseinolítica, determinar parâmetros cinéticos e caracterizar o perfil de inibição enzimática.

A atividade caseinolítica, indicativa da capacidade das enzimas em hidrolisar a caseína (principal proteína do leite), foi avaliada utilizando azocaseína como substrato. Ambos os EBacs exibiram atividade caseinolítica, confirmando a presença de proteases nos extratos. Adicionalmente, o EBac de *E. faecalis* demonstrou atividade hidrolítica sobre o substrato sintético SAAPFpNA, sugerindo a presença de uma enzima semelhante à quimotripsina.

A análise do pH ótimo para a atividade proteolítica revelou que ambos os EBacs apresentam atividade máxima em pH alcalino (pH 8). Contudo, o EBac de *E. faecalis* demonstrou maior estabilidade em uma faixa de pH mais ampla (pH 7–9), enquanto o EBac de *K. variicola* apresentou atividade mais restrita ao pH 8.

Quanto à temperatura ótima, ambos os EBacs exibiram atividade máxima a 50°C. No entanto, o EBac de *K. variicola* apresentou menor variação na atividade entre 40°C e 60°C, indicando maior termoestabilidade em relação ao EBac de *E. faecalis*.

A caracterização do perfil de inibição revelou diferenças significativas entre os EBacs. O EBac de *K. variicola* apresentou um perfil compatível com metaloproteases e cisteinoproteases, enquanto o EBac de *E. faecalis* exibiu características de serinoproteases.

Os ensaios de coagulação do leite demonstraram que ambos os EBacs possuem atividade coagulante a 50°C. Contudo, o EBac de *K. variicola* mostrou-se 20

vezes mais eficiente, necessitando de menor concentração de proteína para promover a coagulação do leite em comparação ao EBac de *E. faecalis*.

A influência do cálcio na atividade coagulante foi avaliada pela adição de cloreto de cálcio (CaCl_2). Ambos os EBacs demonstraram dependência de cálcio para exercer atividade coagulante. Entretanto, o EBac de *K. variicola* necessitou de uma concentração de CaCl_2 quatro vezes menor em relação ao EBac de *E. faecalis*.

Os resultados obtidos evidenciam o potencial biotecnológico das proteases extraídas de *E. faecalis* e *K. variicola* para aplicação na indústria láctea, especialmente na produção de queijos. As diferenças observadas entre os EBacs destacam a importância da seleção e caracterização de microrganismos para obtenção de enzimas com propriedades específicas, visando a otimização de processos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA - Associação Brasileira da Indústria de Alimentação. **Relatório anual Associação Brasileira da indústria de Alimentos**. 2018. Disponível em: <https://www.abia.org.br/vsn/temp/z2019422RelatorioAnual2018.pdf>. Acesso em: 26 de outubro de 2024.

AGUILAR, J. G. S.; DE CASTRO, R. JS; SATO, H. H. Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* LBA 46 in a bench reactor: effect of temperature and agitation. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 36, p. 615-625, 2019.

AGUILAR, J. G. S; SATO, H. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

ALAVI, F.; MOMEN, S. Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. **International Dairy Journal**, v. 107, p. 104709, 2020.

ALECRIM, M. M. *et al.* *Aspergillus flavo furcatis*: Aflatoxin test and milk-clotting protease production in submerged and solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 7, p. 312-318, 2017.

ALECRIM, M. M. *et al.* Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 151-157, 2015.

ALENCAR, R. B. *et al.* Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. **Braz J Food Technol**, v. 6, n. 2, p. 279-84, 2003.

ALHINAI, E. A.; WALTON, G. E.; COMMANE, D. I. M. The role of the gut microbiota in colorectal cancer causation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5295, 2019.

ALVIM, A. L. S.; COUTO, B. R. G. M.; GAZZINELLI, A. Epidemiological profile of healthcare-associated infections caused by Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 53, p. e03474, 2019.

ANDREATTI, R. L.; DA SILVA, E. N.; CURI, P. R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*. 1997.

ANDRÉEN, A. Cheese: Rennets and Coagulants. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed., (pp. 574- 578). London:Elsevier Academic Press, 2011

ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 637-650, 2005.

ARAÚJO, R. V. S. *et al.* Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. 2011.

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. [30] Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1970. p. 446-459.

ASOKAN, S.; JAYANTHI, C. Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans*. **Journal of cell and Tissue Research**, v. 10, n. 1, p. 2119, 2010.

AUER, G. K.; WEIBEL, D. B. Bacterial cell mechanics. **Biochemistry**, v. 56, n. 29, p. 3710-3724, 2017.

AYRES, M. P. *et al.* Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. **Ecology**, v. 81, n. 8, p. 2198-2210, 2000.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1994. p. 1-15.

BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 59, p. 155-189, 2005.

BÉDIKOU, E. M. *et al.* α -Mannosidases from the Digestive Fluid of *Rhynchophorus Palmarum* Larvae as Novel Biocatalysts for Transmannosylation Reactions. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, p. 307-320, 2010.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Artmed editora, 2023.

BEN AMIRA, A. *et al.* Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. sup1, p. S76-S93, 2017.

BERRY, G. J.; LOEFFELHOLZ, M. J.; WILLIAMS-BOUYER, N. An investigation into laboratory misidentification of a bloodstream *Klebsiella variicola* infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2793-2794, 2015.

BÍSCOLA, V. *Et Al.* Proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* VB63F for reduction of allergenicity of bovine milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5144-5154, 2016.

BODE, W. *et al.* The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. **The EMBO journal**, v. 8, n. 11, p. 3467-3475, 1989.

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, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. 1980.

BRIDGES, J.R. Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles. *Microbial Ecology*, New York, v. 7, n. 2, p. 131-133, 1981.

BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. D. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt_9, p. 3146-3152, 2014.

BRISSE, S.; VAN DUIJKEREN, E. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. **Veterinary microbiology**, v. 105, n. 3-4, p. 307-312, 2005.

BRULÉ, G.; LENOIR, J.; REMEUF, F. La micelle de caséine et la coagulation du lait. **Dans le fromage: de la science à d'assurance qualité**. ECRA et gillis JC (Ed), Lavoisier TES. DOC, Paris, v. 89, 1997.

BRUNE, A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 168-180, 2014.

BRUNEAU, A. *et al.* Gut microbiota: What impact on colorectal carcinogenesis and treatment?. **Bulletin du Cancer**, v. 105, n. 1, p. 70-80, 2017.

BUTTERWORTH, P. J. The use of Dixon plots to study enzyme inhibition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 289, n. 2, p. 251-253, 1972.

BUTTLE, David J.; MORT, John S. Cysteine proteases. 2013.

CALLEFE, J. L. R.; LANGONI, H. Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 2, p. 151-162, 2015.

CALUMBY, Rodrigo JN et al. Characterization of cultivable intestinal microbiota in *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (Coleoptera: Curculionidae) and determination of its cellulolytic activity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 110, n. 2, p. e21881, 2022.

CHATTOPADHYAY, I. et al. Exploring the role of gut microbiome in colon cancer. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 193, p. 1780-1799, 2021.

CHEESEMAN, G. C. Action of rennet and other proteolytic enzymes on casein in casein-agar gels. **Journal of Dairy Research**, v. 30, n. 1, p. 17-22, 1963.

CHI, Z. et al. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 534-538, 2007.

DA SILVA, R. R. et al. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Food chemistry**, v. 225, p. 45-54, 2017.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. **Soft matter**, v. 7, n. 6, p. 2265-2272, 2011.

DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In: **Advanced dairy chemistry—1 proteins: part a/part b**. Boston, MA: Springer US, 2003. p. 233-276.

DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In: **Advanced dairy chemistry—1 proteins: part a/part b**. Boston, MA: Springer US, 2003. p. 233-276.

DE MORAES, M. V. P. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, DE 18 DE SETEMBRO DE 2002.

DE PAULA, J. C. J; DE CARVALHO, A.; FURTADO, M.. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367, p. 19-25, 2009.

DE SOUZA, M. A. et al. Enterococo resistente à vancomicina em um hospital universitário no centro-oeste do Brasil. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 41, n. 2, 2012.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 3, p. 597-608, 1998.

DIAZ GONZALEZ, F.; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. 2001.

DING, Z. *et al.* Production and characterization of milk-clotting enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* JNU002 by submerged fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 234, p. 415-421, 2012.

DOUGLAS, A. E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 17-37, 1998.

DRANCOURT, M. *et al.* Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 3, p. 925-932, 2001.

DUARTE, A. G.; LIMA, I. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) em armadilhas iscadas com feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, n. 1, p. 81-84, 2003.

EL-BENDARY, M. A.; MOHARAM, M. E.; ALI, T. H. Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Bacillus sphaericus*. **J Appl Sci Res**, v. 3, n. 8, p. 695-9, 2007.

ENGEL, Philipp; MORAN, Nancy A. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 699-735, 2013.

EREZ, E.; FASS, D.; BIBI, E.. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 371-378, 2009.

FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Milk and milk products**. 2023. Disponível: <https://www.fao.org/3/cc8589en/cc8589en_milk.pdf>. Acesso 26 de Março de 2024.

FARRELL JR, H. M. *et al.* Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 2-3, p. 135-147, 2006.

FERNANDES, J. Produção de queijo: origem dos coalhos. **Agrotec. Portugal**, n. 101, 2013.

FERNANDES, P.; CARVALHO, F. Enzymes in food processing. In: **Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production**. Academic Press, 2016. p. 173-199.

FERSHT, A. **Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding**. Macmillan, 1999.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.

FLÓREZ, L. V. *et al.* Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 904-936, 2015.

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

GAGAOUA, M.; HAFID, K. Three phase partitioning system, an emerging non-chromatographic tool for proteolytic enzymes recovery and purification. **Biosensors Journal**, v. 5, n. 1, p. 100134, 2016.

GAGNIÈRE, J. *et al.* Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 501, 2016.

GARG, G.; SEHRAWAT, N.; YADAV, M. Role of Enzymes in Food Industries. In: **Frontiers in Food Biotechnology**. In: SHARMA, C., SHARMA A. K., ANEJA, K. R. **Frontiers in Food Biotechnology**, 1^a ed. New York: Nova Publishers, 2016. cap. 9, p. 219-252.

GDP – Global Dairy Platform. Annual Review 2016. Disponível: <<https://www.globaldairyplatform.com/wp-content/uploads/2018/04/2016-annual-review-final.pdf>>. Acesso 26 de Março de 2024.

GILL, I. *et al.* Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 3, p. 162-183, 1996.

GORMAN, M. J.; ANDREEVA, O. V.; PASKEWITZ, S. M. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 1, p. 35-46, 2000.

GOTTSCHALK, G. Catabolic activities of aerobic heterotrophs. **Bacterial Metabolism**, p. 141-177, 1986.

GROZDANOVIC, M. M.; BURAZER, L.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M. Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) extract shows potential as a low-cost and efficient milk-clotting agent. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 1, p. 46-52, 2013.

GRZONKA, Z. *et al.* Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 1-20, 2001.

GUIAMA, V. D. *et al.* Milk-clotting potential of fruit extracts from *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* L. and *Solanum melongena*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 12, 2010.

GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. 1992.

HACHANA, Y.; ALOUI, O.; FORTINA, R. Use of caprifig tree extract as a substitute for calf rennet in goat's fresh cheese production. **Small Ruminant Research**, v. 199, p. 106382, 2021.

HAN, Z.; KAUTTO, L.; NEVALAINEN, H. Secretion of proteases by an opportunistic fungal pathogen *Scedosporium aurantiacum*. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169403, 2017.

HANG, F. *et al.* High milk-clotting activity expressed by the newly isolated *Paenibacillus* spp. strain BD3526. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 73, 2016.

HE, X. *et al.* Purification and properties of a milk-clotting enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* D4. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 203-208, 2011.

HERLET, J. *et al.* A new method to evaluate temperature vs. pH activity profiles for biotechnological relevant enzymes. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, p. 1-12, 2017.

HIROSE, E.; PANIZZI, A. R. Os simbioses e a nutrição dos insetos. 2009.

HOPKINS, F. G.; PINKUS, S. N. Observations on the crystallization of animal proteids. **The Journal of Physiology**, v. 23, n. 1-2, p. 130, 1898.

JACOB, M. *et al.* Measurement of milk clotting activity by rotational viscometry. **Journal of dairy research**, v. 78, n. 2, p. 191-195, 2011.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International journal of dairy technology**, v. 64, n. 1, p. 14-33, 2011.

JÚNIOR, B. R. C. L. *et al.* Milk-clotting activity of high pressure processed coagulants: Evaluation at different pH and temperatures and pH influence on the stability. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 47, p. 384-389, 2018.

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.

KELLEHER, S. L. *et al.* Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1261-1268, 2003.

KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. A. (Ed.). **Enzymes: Novel Biotechnological Approaches for the Food Industry**. Academic Press, 2020.

KINDSTEDT, P. S. The basics of cheesemaking. **Cheese and microbes**, p. 17-38, 2014.

KLEPZIG, K. D. *et al.* Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. **Environmental entomology**, v. 38, n. 1, p. 67-77, 2009.

KONEMAN, E. *et al.* Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. In: **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 2012. p. xxxv, 1565-xxxv, 1565.

KRAMS, I. A. *et al.* Microbiome symbionts and diet diversity incur costs on the immune system of insect larvae. *Journal of Experimental Biology*, v. 220, n. 22, p. 4204–4212, 2017.

KUMAR, A. *et al.* Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 243-258, 2010.

KUNAKBAEVA, Z.; CARRASCO, R.; ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cystein proteases: nucleophilic sulphur addition to Michael acceptors type compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 626, n. 1-3, p. 209-216, 2003.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAGUNA, L. E.; DO EGITO, A. S. Atividade coagulante de extratos vegetais no leite integral de caprino e bovino. 2001.

LAW, B. A.; TAMIME, A. (Ed.). **Technology of cheesemaking**. John Wiley & Sons, 2011.

LI, Yang et al. Purification and characterization of *Bacillus subtilis* milk-clotting enzyme from Tibet Plateau and its potential use in yak dairy industry. **European Food Research and Technology**, v. 234, p. 733-741, 2012.

LIMA, K. O. **Caracterização molecular e fenotípica de *Klebsiella* spp. produtoras de NDM**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LIN, L. *et al.* Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E. **Standards in Genomic Sciences**, v. 10, p. 1-7, 2015.

LIU, H. *et al.* The high expression of *Aspergillus pseudoglaucus* protease in *Escherichia coli* for hydrolysis of soy protein and milk protein. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 8, p. 725-733, 2018.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15 (1-2), p. 73–83, 2010.

LÖNNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1537S-1543S, 2003.

LUO, J. *et al.* Characterization and milk coagulating properties of *Cynanchum otophyllum* Schneid. proteases. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 4, p. 2842-2850, 2018.

MAATALLAH, M. *et al.* *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e113539, 2014.

MACIEL, J. F. *et al.* Qualidade microbiológica de leite pasteurizado comercializado em Itapetinga-BA. In: **CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS**. 2003. p. 131-134.

MADSEN, K. T. *et al.* Virulence factors associated with *Enterococcus faecalis* infective endocarditis: a mini review. **The open microbiology journal**, v. 11, p. 1, 2017.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Valor Bruto da Produção. 2024. Disponível: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria-vbp>> Acesso 26 de Março de 2024.

MARTH, E.H. Pathogens in milk and milk products. In: RICHARDSON, G.H., ed. *Standard methods for the examination of dairy products*. 15. ed. Washington, American Publish Health Association, 1985. acp.3. p.53-4.

MARTIM, S. R. *et al.* Pleurotus albidus: A new source of milk-clotting proteases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 17, p. 660-667, 2017.

MARTINS, A. P. L. **A flor de cardo (Cynara cardunculus L.) como agente coagulante no fabrico de queijo: caracterização e influência dos processos de conservação na actividade coagulante.** 1999.

MATSUMOTO, Y. *et al.* Enterococcus faecalis YM0831 suppresses sucrose-induced hyperglycemia in a silkworm model and in humans. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 157, 2019.

MCSWEENEY, P. L. H. *et al.* Cheese: chemistry, physics and microbiology. **(No Title)**, 2017.

MEHROTRA, S. *et al.* The production of alkaline protease by a Bacillus species isolate. **Bioresource Technology**, v. 67, n. 2, p.201-203, 1999.

MIKHEEVA, L. M. *et al.* Thermodynamics of micellization of bovine β -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir**, v. 19, n. 7, p. 2913-2921, 2003.

MITRA, P.; CHAKRABARTTY, P. K. An extracellular protease with depilation activity from Streptomyces nogalator. 2005.

MOHANTY, A. K. *et al.* Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 2-3, p. 205-217, 1999.

MONACI, L. *et al.* Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 149-179, 2006.

MUHAMMAD, A. *et al.* Intestinal microbiota confer protection by priming the immune system of red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 472143, 2019.

MÜLLER, E. E. *et al.* Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, v. 2, n. 2002, p. 206-217, 2002.

MÜLLER, F. A. **Microbiota intestinal de larvas e adultos de Anastrepha fraterculus (Wiedemann, 1830)(Diptera: Tephritidae): diversidade e efeito do alimento.** 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MUNHOZ, M. *et al.* (2020). **Enzimas: da obtenção à aplicação**. Disponível em: <https://www.bioquimicadealimentosunicamp.com/post/enzimas-da-obten%C3%A7%C3%A3o-%C3%A0-aplica%C3%A7%C3%A3o> Acesso em 26 de março de 2024.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptideomiméticos. **Química Nova**, v. 37, p. 308-316, 2014.

MURRAY, B. E. The life and times of the Enterococcus. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2022.

NICOSIA, F. D. *et al.* Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 871, 2022.

NITU, S.; GEICU-CRISTEA, M.; MATEI, F. Milk-clotting enzymes obtained from plants in cheesemaking-a review. **Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies**, v. 25, n. 1, 2021.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(10):1791-1798. doi:10.3201/eid1710.110655.

NORTHROP, J. H. Crystalline pepsin: I. Isolation and tests of purity. **The Journal of general physiology**, v. 13, n. 6, p. 739-766, 1930.

ORDIALES, E. *et al.* Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in “Torta del Casar” cheese-making. **Food chemistry**, v. 133, n. 1, p. 227-235, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A. *et al.* Características gerais do leite e componentes fundamentais. **Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 13-37, 2005.

PALMER, T.; BONNER, P. L. **Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry**. Elsevier, 2007.

PARTE, A. C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607-5612, 2020.

PASSET, V.; BRISSE, S. Description of *Klebsiella grimontii* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 1, p. 377-381, 2018.

PATERSON, D. L. Infections due to other members of the Enterobacteriaceae, including management of multidrug-resistant strains. 2011.

PELCZAR JUNIOR, M. J. *et al.* Microbiologia: conceitos e aplicações. In: **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 1997. p. xxix, 524-xxix, 524.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química nova**, v. 27, p. 293-300, 2004.

PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 201-212, 2005.

PHADUNGATH, C. The mechanism and properties of acid-coagulated milk gels. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, v. 27, n. 2, p. 433-448, 2005.

PHILIPPE, M. *et al.* Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. **Le lait**, v. 83, n. 1, p. 45-59, 2003.

PINTO-TOMÁS, A. A. *et al.* Comparison of midgut bacterial diversity in tropical caterpillars (Lepidoptera: Saturniidae) fed on different diets. **Environmental entomology**, v. 40, n. 5, p. 1111-1122, 2011.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

QASIM, Farhat *et al.* Production of a novel milk-clotting enzyme from solid-substrate *Mucor* spp. culture. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 10, p. 4348-4362, 2022.

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

RAWDKUEN, S.; VANABUN, A.; BENJAKUL, S. Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 12, p. 2566-2569, 2012.

REYNA-FLORES, F. *et al.* Draft genome sequences of endophytic isolates of *Klebsiella variicola* and *Klebsiella pneumoniae* obtained from the same sugarcane plant. **Genome Announcements**, v. 6, n. 12, p. 10.1128/genomea.00147-18, 2018.

RIGO, D. *et al.* Produção microbiológica de enzimas: Uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.

RINKE, R. Comparação da diversidade microbiana intestinal em larvas do campo e laboratório do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Cucurlionidae) 98f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós Graduação em Biotecnologia - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.

RODRIGUES, Ana Raquel Ferreira. Otimização do processo de fabrico de um queijo de ovelha amanteigado. 2014.

ROSEIRO, L. B. *et al.* Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 2, p. 76-85, 2003.

ROSENBLUETH, M. *et al.* *klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Systematic and applied microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2004.

RUSSO, C. C. Modelagem de serino-proteases e inibidores com emprego de ferramentas de bioinformática estrutural. 2006.

SAEED, K. *et al.* Characterization of alkaline metalloprotease isolated from halophilic bacterium *Bacillus cereus* and its applications in various industrial processes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20230014, 2023.

SAVITHA, S. *et al.* Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, n. 2, p. 298-304, 2011.

SCOTT, R.; ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A.. **Cheesemaking practice**. Springer Science & Business Media, 1998.

Semedo-Lemsaddek, T.; Barreto-Crespo, M. T.; Tenreiro, R. *Enterococcus* and safety. 2012.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 337-340, 2016.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHAH, M. A.; MIR, S. A.; PARAY, M. A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. **Dairy Science & Technology**, v. 94, p. 5-16, 2014.

SHAIKH, I. K.; DIXIT, P. P.; SHAIKH, T. M. Purification and characterization of alkaline soda-bleach stable protease from *Bacillus* sp. APP-07 isolated from Laundromat soil. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 273-279, 2018.

SHELLOMITH, A. S. S.; PREETHA, B. Production of milk clotting enzyme by *Penicillium camemberti* using whey medium. **IOSR J. Biotechnol. Biochem**, v. 4, n. 1, p. 33-40, 2018.

SHIEH, C.; THI, L. P.; SHIH, L. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 85-91, 2009.

SHRINIVAS, D.; NAIK, G. R. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2011.

SILVA JUNIOR, J. G. Cromatografia de proteínas: guia teórico e prático. **Interciência**, v. 1, p. 111, 2004.

SILVA, A. C. O.; CORTEZ, M. A. S. Tecnologia de leite e derivados lácteos. 2021.

SILVA, E. E. *et al.* Pesquisa de enterobactérias em patos domésticos (*Cairina moschata*) de propriedades localizadas em quatro municípios do Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 16-21, 2014.

SILVA, N. N. *et al.* Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. e2018185, 2019.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 19-26, 2005.

SILVA, Y. **Doenças transmitidas por alimentos no município do Rio de Janeiro: perfil epidemiológico e controle**. 2009. Tese de Doutorado.

SILVERTHORN, D. U. **Human Physiology: An Integrated Approach, Books a la Carte Edition**. Benjamin-Cummings, 2010.

SINDHU, R.; SUPRABHA, G. N.; SHASHIDHAR, S. Optimization of process parameters for the production of alkaline protease from *Penicillium godlewskii* SBSS 25 and its application in detergent industry. **Afr J Microbiol Res**, v. 3, n. 9, p. 515-522, 2009.

SOARES, E. F. *et al.* Potencial do latex da fruta pão (*Artocarpus altilis*) como agente coagulante do leite. **Ciência Rural**, v. 45, p. 149-154, 2015.

SODERO, A. C. R.; DE SIMONE, S. G.; SILVA-JR, F. P. Mecanismo catalítico e estado de protonação do sítio ativo de aspartil proteases pepsina-símiles. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 128-137, 2009.

SOUTO, X. M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Chymotrypsin-and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the *Candida haemulonii* complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20180735, 2019.

SOUZA, M. R. *et al.* Pasteurização do leite. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária**, v. 13, p. 85-93, 1995.

SRIVASTAVA, N. Production of food-processing enzymes from recombinant microorganisms. In: **Enzymes in food biotechnology**. Academic Press, 2019. p. 739-767.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211, 2006.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the caseins. In: **Advanced dairy chemistry—1 proteins: Part A/Part B**. Boston, MA: Springer US, 2003. p. 139-201.

TABAYEHNEJAD, N.; CASTILLO, M.; PAYNE, F. A. Comparison of total milk-clotting activity measurement precision using the Berridge clotting time method and a proposed optical method. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 4, p. 549-556, 2012.

TAVARES, S. G. **Avaliação das condições microbiológicas de leite pasteurizado tipos A, B e C, comercializados na cidade de Piracicaba, SP**. 1996. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TERRA, W. R. *et al.* Digestive enzymes. In: **Biology of the insect midgut**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996. p. 153-194.

TEST KAPPA. La k-caseina B: cosa è la k-caseina. 2009. Disponível em:< https://www.testkappa.com/Italiano/La_K_CaseinaB/Cosa_e_la_kcaseina.htm>. Acesso 26 de Março de 2024.

TROCH, T. *et al.* Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 21, 2017.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Food Science and Technology**, v. 21, p. 321-325, 2001.

VALIATTI, T. B. *et al.* Characterization of virulent *Klebsiella variicola* recovered from inpatients with intestinal and extraintestinal infections between 1987 and 1999. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 101, n. 3, p. 115482, 2021.

VASCONCELOS, M.; ARAUJO, K.; VERRUMA-BERNARDI, M. Efeito do ph de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 10, n. 4, 2004.

VERMA, R. Solid-state fermentation to produce alkaline protease by *Aspergillus fumigatus* B149. **Ind. J. Microbiol.**, v. 41, p. 111-114, 2001.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 193290, 2016.

VERMELHO, A. B. *et al.* Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. **Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e mercado**, p. 273-287, 2008.

VIANA, F. L. E. Indústria de alimentos. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 4, n.80, maio 2019.

VIDAL, A. M. C.; NETTO, A. S. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Pirassununga-SP. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP), 220p, 2018.

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

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation research**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist?. **International Dairy Journal**, 9(3-6), 189-192, 1999.

WALSTRA, P. *et al.* Dairy Science and Technology (2nd ed.). **CRC Press**, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781420028010>

WANG, S. *et al.* An insight into diversity and functionalities of gut microbiota in insects. **Current Microbiology**, v. 77, p. 1976-1986, 2020.

WILLIAMSON, A. J. *et al.* Enterococcus faecalis promotes a migratory and invasive phenotype in colon cancer cells. **Neoplasia**, v. 27, p. 100787, 2022.

WILSON, I.; VOGEL, J.; SOMERVILLE, S. Signalling pathways: a common theme in plants and animals?. **Current Biology**, v. 7, n. 3, p. R175-R178, 1997.

WOESSNER JR, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 8, p. 2145-2154, 1991.

WU, D. *et al.* Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. **PLoS biology**, v. 4, n. 6, p. e188, 2006.

RIGO, Diane *et al.* Produção microbiológica de enzimas: Uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.

AYAYEE, Paul *et al.* Gut microbes contribute to nitrogen provisioning in a wood-feeding cerambycid. **Environmental Entomology**, v. 43, n. 4, p. 903-912, 2014.

REN, Xueming *et al.* Gut symbiotic bacteria are involved in nitrogen recycling in the tephritid fruit fly *Bactrocera dorsalis*. **BMC biology**, v. 20, n. 1, p. 201, 2022.

VALERI, Francesco; ENDRES, Kristina. How biological sex of the host shapes its gut microbiota. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 61, p. 100912, 2021.

MARTÍNEZ-SOLÍS, María; COLLADO, María Carmen; HERRERO, Salvador. Influence of diet, sex, and viral infections on the gut microbiota composition of *Spodoptera exigua* caterpillars. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 527399, 2020.

MALACRINÒ, Antonino. Host species identity shapes the diversity and structure of insect microbiota. **Molecular Ecology**, v. 31, n. 3, p. 723-735, 2022.

RODRÍGUEZ-MEDINA, Nadia *et al.* *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. **Emerging microbes & infections**, v. 8, n. 1, p. 973-988, 2019.