

Proteases de uma espécie da família Trichocomaceae para aplicação na indústria de alimentos

Proteases from a species of the Trichocomaceae family for application in the food industry

Proteasas de una especie de la familia Trichocomaceae para su aplicación en la industria de alimentos

Recebido: 25/11/2022 | Revisado: 08/12/2022 | Aceitado: 10/12/2022 | Publicado: 17/12/2022

Gabriella de Azevedo Benchaya

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8634-0713>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: gabriellabenchaya@gmail.com

Ester Martins de França

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3002-0806>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: esterfranca00@gmail.com

Nathalia Colares Costa Alves da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6112-1429>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: Nathalia.colares61@gmail.com

Isabelly Ferreira Fernandes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3615-3469>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: isabellyferreiraf12@gmail.com

Samara Claudia Picanço Batista

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7430-6104>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: samara.claudia18@gmail.com

Laynah Pimenta

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9962-0397>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: laynah.pimenta7@gmail.com

Ana Kezia Pimentel de Brito

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7925-4908>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: anakeziapimentel@gmail.com

Elliza Emily Perrone Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-2629>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: elliza.perrone01@gmail.com

Romário da Silva Santana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1775-9991>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: romariosantana15@gmail.com

Tiara Sousa Cabral

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7430-6104>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: ttiara@gmail.com

Maria Francisca Simas Teixeira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0187-3498>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

Resumo

Proteases são enzimas de origem vegetal, animal e microbianos, de alto valor econômico e biotecnológico, e entre estes, tem destaque as produzidas por espécies de fungos. O presente estudo teve como objetivo analisar a produção de proteases por *Aspergillus clavato flavus* DPUA 929. A cultura matriz foi preparada em Ágar Sabouraud, com extrato de levedura 0,5% (p/v). O bioprocessamento foi conduzido durante 7 dias, 150 rpm a 25 °C. Para determinação da atividade proteolítica, como substrato foi utilizada solução de Azocaseína 1% (p/v). Nas análises de caracterização parcial foi avaliado o efeito do pH e temperatura na atividade das enzimas, conforme protocolo experimental. Os resultados revelaram que *Aspergillus clavato flavus* DPUA 929 produz proteases equivalente a 21,12 U/mL. E nos testes de caracterização foi determinada a máxima atividade proteolítica em pH 6,0 e a 50 °C. Estes dados

demonstram que *Aspergillus clavato flavus*, nas condições de análises, produz diferentes proteases com características de importância industrial.

Palavras-chave: Hidrolase; *Aspergillus*; Fermentação submersa; Bioprocesso; Atividade proteolítica.

Abstract

Proteases are plant, animal and microbial enzymes of high economic and biotechnological value. Among these, we can highlight proteases produced by fungal species. The present study aimed to analyze the production of proteases by *Aspergillus clavato flavus* DPUA 929. The matrix culture was prepared in Sabouraud Agar, with yeast extract 0.5% (w/v). The bioprocess was carried out for 7 days at 150 rpm at 25 °C. To determine the proteolytic activity, 1% Azocasein (w/v) was used as substrate. In analyses of partial characterization, the effect of pH and temperature were evaluated, according to the experimental protocol. The results revealed that *Aspergillus clavato flavus* 929 produce proteases equivalent to 21.12 U/ml, and in the enzyme characterization tests, the maximum proteolytic activity was determined at pH 6.0 and at 50 °C. These data demonstrate that *Aspergillus clavato flavus* produce different proteases of industrial importance in conditions analyzed here.

Keywords: Hydrolase; *Aspergillus*; Submerged fermentation; Bioprocess; Proteolytic activity.

Resumen

Las proteasas son enzimas de origen vegetal, animal y microbiano, con elevado valor económico y biotecnológico, de estos microorganismos, se destacan aquellos producidos por especies de hongos. El objetivo de este trabajo fue analizar la producción de proteasas por *Aspergillus clavato flavus* DPUA 929. La matriz del cultivo se ha preparado en agar Sabouraud, a base de extracto de levaduras en 0,5% (p/v). El bioproceso fue realizado durante 7 días a 150 rpm a 25 °C. Para la determinación sobre la actividad proteolítica, y se utilizó de sustrato la Azocaseína a 1% (p/v). Al realizar los análisis de caracterización parcial, se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática, atendiendo el protocolo experimental. Estos resultados revelaron que *Aspergillus clavato flavus* DPUA 929 produce proteasas equivalentes a 21,12 U/mL. En los experimentos de caracterización, la actividad proteolítica máxima se determinó en pH 6,0 y en 50 °C. Estos datos demuestran que el *Aspergillus clavato flavus*, en las condiciones analizadas, producía diferentes proteasas con propiedades de importancia industrial.

Palabras clave: Hidrolasa; *Aspergillus*; Fermentación en estado líquido; Bioproceso; Actividad proteolítica.

1. Introdução

As enzimas estão presentes em etapas essenciais do metabolismo e das reações químicas de diversos organismos, funcionando como moléculas biocatalisadoras orgânicas (Beli et al., 2019). Essas moléculas de origem proteica vêm despertando o interesse de diversas áreas da ciência, principalmente no campo biotecnológico, por serem normalmente de fácil manipulação de suas características, exigindo pouco tempo e permitindo produções em larga escala (Coelho et al., 2018). Enzimas são aplicadas em diversas áreas, como no processamento de alimentos, papel e biocombustíveis, assim como em atividades industriais e no campo da medicina e farmácia (Suryawanshi & Pandya, 2017; Pimenta et al., 2021; Bazzo et al., 2022).

Dentre os microrganismos mais utilizados na produção de enzimas em larga escala estão os fungos, ocupando cerca de 50% dessa produção quando comparados a outros organismos. As enzimas sintetizadas por fungos também se dividem em várias classes, como proteases, celulasas, lipases e amilases (Alves et al., 2020). Apesar dessa grande variedade, cerca de 65% das vendas mundiais estão relacionadas às proteases, um grupo complexo de enzimas (Barbosa et al., 2020; Batista et al., 2021).

Fungos filamentosos vêm sendo utilizados na síntese de proteases devido à ampla diversidade bioquímica que possuem, possibilitando menores custos e tempo de produção, acompanhados de uma alta produtividade e alta capacidade de modificação externa, seguindo os resultados desejados (Souza et al., 2015). Muitas dessas aplicações estão relacionadas à indústria de alimentos, como em processos de coagulação do leite, clarificação de bebidas alcoólicas e não-alcoólicas, no processamento de molho de soja e na panificação (Kumari et al., 2012; da Rocha Lima et al., 2018; Guo et al., 2018). Além disso, proteases também são utilizadas na indústria de detergentes ecologicamente sustentáveis (Al-Ghanayem & Joseph, 2020)

Muitos fungos filamentosos produzem proteases, especialmente *Aspergillus* e *Penicilium*, ambos conhecidos pela alta capacidade de síntese enzimática (Benmrad et al., 2018; Chimbekujwo & Adeyemo, 2020; Shu et al., 2020). Recentemente foram estudadas proteases de diversas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, como: proteases alcalinas de *A. ochraeus*, utilizadas em detergentes (El-Khonezy et al., 2021); otimização de proteases de *A. niger*, conhecido pela alta capacidade de síntese de proteínas (Ooi et al., 2021) e proteases de *A. oryzae*, com potencial aplicabilidade na indústria de queijos (Prado et al., 2021).

Apesar disso, não existem muitos estudos direcionados especificamente para a capacidade de produção de proteases de *A. clavato flavus*, encontrando-se na maioria das vezes descrições em conjunto com pesquisas para outras espécies (Prado et al., 2021). Encontram-se estudos relacionados a outros produtos secretados pela espécie, como alguns peptídeos antimicrobiais e nanopartículas (Zamani et al., 2021; Rai et al., 2022). Dessa forma, este estudo tem como objetivos analisar a capacidade de produção de proteases por *Aspergillus clavato flavus* DPUA 929.

2. Metodologia

2.1 Fungo Filamentoso

Nesta pesquisa foi utilizado *Aspergillus clavato flavus* DPUA 929, espécie cedida pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Para obtenção de cultura viável, a espécie foi inoculada em ágar Sabouraud suplementado com extrato de levedura (CYA). Após oito dias, essas culturas foram usadas como inóculo para avaliação da produção de proteases e para caracterização parcial bioquímica das enzimas proteolíticas.

2.2 Fermentação

O cultivo inicial do microrganismo foi realizado em Erlenmeyer de 125mL contendo 50 mL de meio de fermentação GYP (glicose, extrato de levedura e peptona), em seguida manteve-se por cerca de 7 dias, em 150 rpm à 30°C. Decorrido esse tempo de incubação, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração sob vácuo. O pH do extrato bruto foi medido, sendo equivalente a 7. O extrato foi posteriormente utilizado para a determinação da atividade quantitativa e qualitativa das enzimas proteolíticas, assim como na determinação do pH e temperatura ótima para atividade das proteases.

2.3 Determinação da atividade qualitativa

Para determinação da atividade de proteases foram utilizados o extrato bruto e discos miceliais. No procedimento para determinação da atividade de proteases utilizando discos miceliais de 8 mm de diâmetro, foram retirados da cultura teste três discos miceliais, e inoculados na superfície do ágar leite. Para o procedimento de determinação da atividade das proteases utilizando extrato bruto, retirou-se 100µl do extrato enzimático e foram feitos “cup plates” de 8 mm de diâmetro do ágar para inoculação. Os cultivos foram mantidos a 37°C por 24 horas. A produção das enzimas foi observada pela formação dos halos enzimáticos, os quais foram medidos em seu diâmetro e os resultados expressos em mm. Para a determinação do Índice de Atividade Enzimática (IAE), utilizou-se a equação (1) abaixo, conforme descrita em Teixeira et al. (2011):

$$I = \text{diâmetro do halo (mm)} / \text{diâmetro do poço (mm)} \text{ equação (1)}$$

O microrganismo é considerado como um bom produtor de enzimas em meio sólido quando o valor do IAE é maior ou igual a 2,0 (Teixeira et al., 2011).

2.4 Determinação da atividade proteolítica quantitativa

O método utilizado para determinação da atividade da protease foi o descrito por Leighton et al. (1973) utilizando como substrato o composto azocaseína 1% p/v em solução tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6. Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,01 em 60 minutos.

2.5 Determinação do Efeito do pH e do efeito da temperatura na atividade proteolítica

Para determinação do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada a 25 °C em diferentes valores de pH, utilizando-se o substrato de azocaseína 1% (p/v) diluída em solução tampão composta por acetato de sódio (pH 5,0 e 6,0), Tris-HCl (pH 7,0 e 8,0), Glicina-NaOH (pH 9,0 e 10) (Martim, et al., 2017).

Para determinação da temperatura ótima de atividade das proteases, utilizou-se temperaturas de 30- 80 °C (Martim, et al., 2017).

2.6 Análises Estatísticas

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

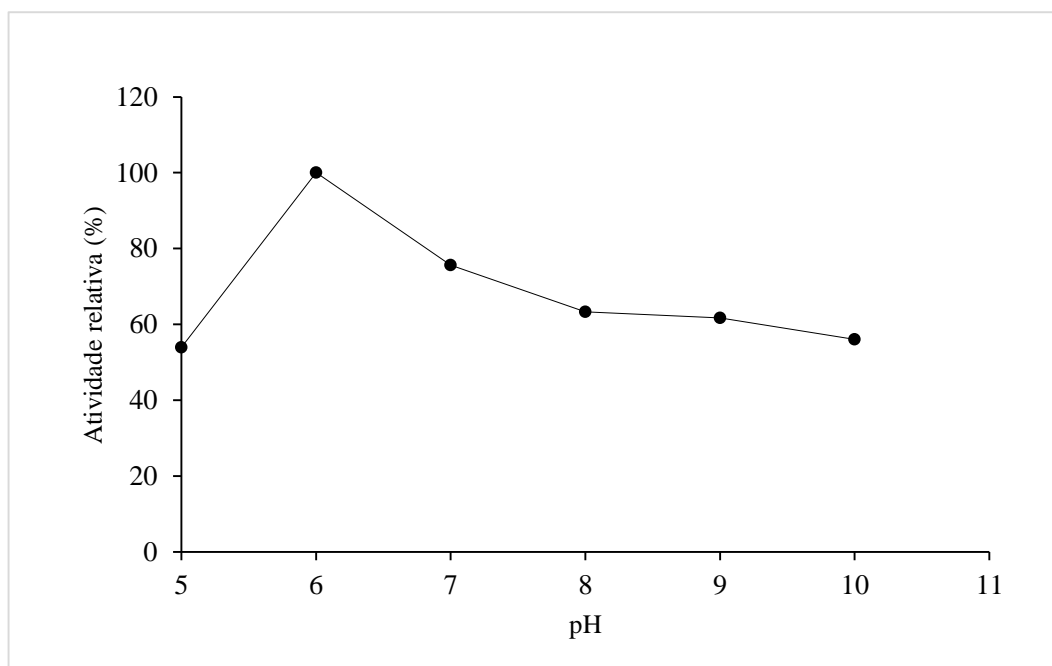
3. Resultados e Discussão

Na avaliação qualitativa, utilizando técnicas de blocos de gelose e perfuração por poços, os halos de degradação decorrentes da atividade proteolítica foram 20,83mm e 18,50mm, respectivamente. Com base nesses dados, observou-se atividade proteolítica significativa nos resultados obtidos pela técnica dos blocos de gelose, sendo 11,20% mais eficaz comparada a outra técnica utilizada. Para *Aspergillus clavato flavus*, o IAE (Índice de Atividade Enzimática) resultou em 2,5, indicando que essa espécie é uma boa produtora de enzimas (Teixeira et al., 2011). O índice observado foi semelhante ao de *Aspergillus niger*, um potencial produtor de enzimas utilizado em processos biotecnológicos e na indústria de alimentos (da Paz Junior et al., 2020). Os resultados aqui obtidos diferiram em relação aos resultados de Prado et al. (2021) para a mesma espécie, onde não foi observada atividade proteolítica. A formação de halos translúcidos assemelhou-se com o encontrado em outros estudos com *Aspergillus* (Suryawanshi & Pandya, 2017; da Paz Junior et al., 2020).

Na avaliação quantitativa, foi detectado 21,12 U/ml de síntese de proteases. Em outro estudo utilizando diversas espécies de *Aspergillus*, um valor inferior foi observado para *Aspergillus clavato flavus*, diferenciando-se dos resultados obtidos para esse estudo. Apesar disso, o valor detectado (21,12 U/ml) aproximou-se do valor da atividade proteolítica observada em *Aspergillus oryzae*, espécie conhecida por grande eficiência na produção de proteases e utilização na indústria alimentícia (Ram et al., 2018; Prado et al., 2021). *Aspergillus clavato flavus* DPUA 929 também apresentou uma atividade proteolítica quantitativa alta quando comparada com os resultados obtidos recentemente para outras espécies do mesmo gênero, *A. Niger* e *A. Terreus* (Mustafa & El Nady, 2022). Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* já são conhecidos por sua capacidade de produção de proteases e sucesso com aplicações em vários setores industriais (Souza et al., 2015). Já foi sugerido que a espécie *A. flavus* sintetizar protease alcalina, com utilização ecológica adequada na extração de pêlos de couro bovino na indústria de couro. Além do mais, a protease alcalina tem uma função potencial na fabricação de itens alimentícios hidrolisados, como farelo de soja, extrato de levedura e caseína por exemplo, sendo, portanto, altamente importante na indústria alimentícia (Chellapandi, P., 2010).

A atividade proteolítica foi observada em todas as condições avaliadas, apresentando atividade catalítica ótima em pH 6,0 com redução da atividade em pH superiores (Figura 1). A partir dos dados obtidos, pode-se afirmar que a atividade proteolítica obtida em pH ótimo para *Aspergillus clavato flavus* superou em cerca de 46%, observado no pH 5,0. Com atividade significativa em pH 6, foi observado a presença de protease levemente ácida com importância na indústria alimentícia e cervejeira (Razzaq et al., 2019). Resultados semelhantes foram observados em *A. oryzae* (de Araújo et al., 2020).

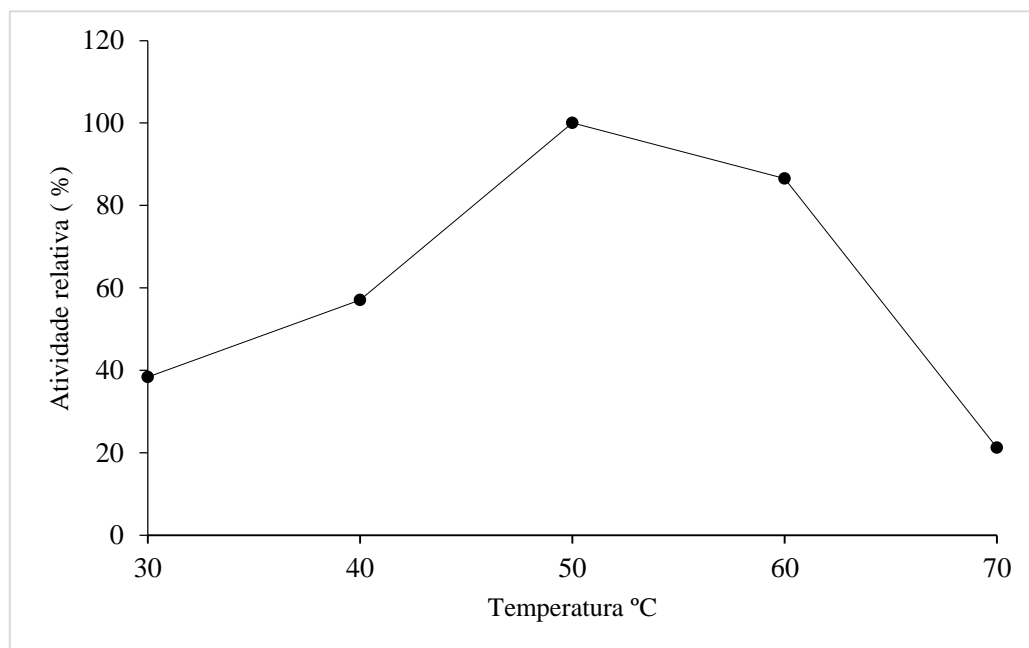
Figura 1 - Efeito do pH na atividade de proteases de *A. clavato flavus*.



Fonte: Autores.

A atividade proteolítica também foi observada em toda a faixa de temperatura testada (30°C - 70°C), com valor significativo a 50°C, tendo ocorrido redução da atividade em temperaturas superiores (Figura 2), atingindo cerca de 78,75% mais de eficácia quando comparada com a temperatura de menor atividade proteolítica, 70°C. Resultado similar foi descrito com *A. oryzae* por Prado et al (2021), com atividade ótima em 50 °C e Vishwanatha (2010) em 55 °C, como também em *A. awamori* e *A. clavatus* por Souza et al (2015).

Figura 2 - Efeito da temperatura na atividade de proteases de *A.clavato flavus*.



Fonte: Autores.

4. Conclusão

Os resultados obtidos mostraram a eficiência de *Aspergillus clavato flavus* como fonte de proteases. Estas enzimas expressaram atividade ótima em pH 6,0 e temperatura a 50 °C. Esses dados indicam a aplicação dessas proteases na indústria de alimentos, sugerindo o seu grande potencial na produção de trabalhos futuros que englobem enzimas na indústria de panificação.

Agradecimentos

Aos órgãos federais e estadual pelo suporte financeiro e infraestrutura, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Fundação Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES).

Referências

- Alves, M. F., Vieira, M. P., Teixeira, J. M., Mota, K. I. A., & Carvalho, S. A. (2020). *Produção de enzimas por fungos filamentosos*. Fundamentos e atualidades em tecnologia e inspeção de alimentos.
- Al-Ghanayem, A. A., & Joseph, B. (2020). Current prospective in using cold-active enzymes as eco-friendly detergent additive. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(7), 2871-2882.
- Barbosa, E. E. P., Pimenta, L., Brito, A. K. P., Martim, S. R., & Teixeira, M. F. S. (2020). Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. *Brazilian Journal of Development*, 6(11), 92475-92485.
- Batista, S. C. P., Prado, F. B., de Brito, A. K. P., de Lima, M. D. P. S., Coelho, V., Castillo, T. A., ... & Teixeira, M. F. S. (2021). Biomassa residual do processamento de produtos hortícolas da Amazônia para crescimento micelial e produção de proteases por uma espécie de cogumelo comestível. *Research, Society and Development*, 10(3), e35310313393-e35310313393.
- Bazzo, V., Pardo, S. N. F., Hoffmann, E. C., de Lima, G., & Ribeiro, R. V. (2022). Bioprospecção e caracterização da atividade amilolítica de fungos filamentosos Bioprospection and characterization of the amylolytic activity of filamentous fungi. *Brazilian Journal of Development*, 8(5), 33314-33330.
- Benmrad, M. O., Moujehed, E., Elhoul, M. B., Mechri, S., Bejar, S., Zouari, R., ... & Jaouadi, B. (2018). Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicillium chrysogenum* strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. *International journal of biological macromolecules*, 119, 1002-1016.

- Beli, C. M., Mageste, J. M., & Taketani, N. F. (2019). Bioprospecção de enzimas para cosmética: Seu impacto na biotecnologia. *Revista Ensaios Pioneiros*, 3(2), 10-24.
- Chellapandi, P. 2010. Production and preliminary characterization of alkaline protease from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus*. *E-Journal of Chemistry*, 7, (2), p. 479-482.
- Chimbekujwo, K. I., Ja'afaru, M. I., & Adeyemo, O. M. (2020). Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African*, 8, e00398.
- Coelho, G. D., Sousa, J. P., de Azevedo Lima, C., & da Silva Lins, S. A. (2018). Potencial de fungos da Caatinga para produção de enzimas amilolíticas. *Revista Saúde & Ciência Online*, 7(2), 286-297.
- da Rocha Lima, A. D., de Farias, V. A., & de Oliveira, H. D. (2018). Prospecção Tecnológica de Patentes Relativas a Proteases na Produção de Queijos. *Cadernos de Prospecção*, 11, 1726-1726.
- da Paz Junior, F. B., da Costa, J. O. V., Freitas, L. R., Da Paz, E. S. L., Andrade Filho, L. R., Guarana, C. F. R., Silveira, A. C. B., & Rocha, H. G. (2020). Caracterização morfológica e proteolítica de *Aspergillus niger* isolado da biblioteca do IFPE-campus Recife. *Brazilian Journal of Development*, 6, (8), p. 63959-63966.
- de Araújo, F. S., Souza, I. H. S., & Freitas, A. C. 2020. Estudo das condições de PH e temperatura para máxima atividade de protease de *Aspergillus oryzae* NRRL 1911. *Brazilian Journal of Development*, 6, (1), p. 3077-3091.
- El-Khonezy, M. I., Elgammal, E. W., Ahmed, E. F., & Abd-Elaziz, A. M. (2021). Detergent stable thiol-dependant alkaline protease produced from the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus* BT21: Purification and kinetics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102046.
- Guo, Y., Tu, T., Yuan, P., Wang, Y., Ren, Y., Yao, B., & Luo, H. (2019). High-level expression and characterization of a novel aspartic protease from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and its potential application in juice clarification. *Food chemistry*, 281, 197-203.
- Kumari, M., Sharma, A., & Jagannadham, M. V. (2012). Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food chemistry*, 131(4), 1295-1303.
- Leighton. T. J., Doi, R. H., Warren, R. A. J., R. A. (1973). The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal Molucular Biology*, v. 76, p. 103- 122.
- Martim, S. R., Silva, L. S. C., Alecrim, M. M., Souza, B. C., Oliveira, I. M. A., & Teixeira, M. F. S. (2017). Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. *Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.* 12. (3), p. 353-362.
- Mustafa, M. M., & El Nady, G. H. (2022). Isolation and improvement of some proteolytic enzymes (lipase, amylase and protease) produced from local *Aspergillus* sp., *Arab Journal of Agricultural Sciences*5(14), 85-106.
- Ooi, C. K., Rasit, N., & Absullah, W. R. W. (2021). Optimization of protease from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation utilizing shrimp shell substrate. *Biointerface Res Appl Chem*, 11(6), 14809-14824.
- Pimenta, L., Barbosa, E. E. P., de Brito, A. K. P., Martim, S. R., & Teixeira, M. F. S. (2021). Processo eco-amigável para selecionar substrato Lignocelulósico para produção de peptidases ácidas. *Brazilian Journal of Development*, 7(1), 3469-3479.
- Prado, F. B., Batista, S. C. P., Martim, S. R., & Teixeira, M. F. S. (2021). Viabilidade da produção de proteases por espécies de *Aspergillaceae* e triagem de coagulantes do leite bovino. *Brazilian Journal of Development*, 7(2), p. 16356-16373.
- Rai, M., Gupta, I., Bonde, S., Ingle, P., Shende, S., Gaikwad, S., ... & Gade, A. (2022). Industrial Applications of Nanomaterials Produced from *Aspergillus* Species. In *The Genus Aspergillus-Pathogenicity, Mycotoxin Production and Industrial Applications*. IntechOpen.
- Ram, M. R., & Kumar, S. Production of alkaline protease from *Aspergillus oryzae* isolated from seashore of Bay of Bengal (2018). *Journal of Applied and Natural Science*, 10(4), p. 1210-1215.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110.
- Souza, P. M., Bittencourt, M. L. A., Caprara, C. C., Freitas, M., Almeida, R. P. C., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Ferreira Filho, E. X., Pessoa Junior, A., & Magalhães, P. O., (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, p. 337-346.
- Shu, L., Si, X., Yang, X., Ma, W., Sun, J., Zhang, J., ... & Gao, Q. (2020). Enhancement of acid protease activity of *Aspergillus oryzae* using atmospheric and room temperature plasma. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1418.
- Suryawanshi, H. K., & Pandya, N. D. Screening, Identification of Alkaline Proteases Producing Fungi from Soil of Different Habitats of Amalner Tahsil [Maharashtra] and Their Applications. (2017). *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(3), p. 397-402. DOI: 10.3126/ijasbt.v5i3.18304.
- Teixeira, M. F. S., Silva, T. A., Palheta, R. A., Carneiro, A. L. B., & Atayde, H. M. (2011). *Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada: (aplicações biotecnológicas)*. EDUA, Editora da Universidade Federal do Amazonas.
- Vishwanatha, K. S, Appu Rao, A. G & Singh, S. A Produção e caracterização de uma enzima de coagulação do leite de *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (2010). *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1849-1859.
- Zamani, E., Zargan, J., Honari, H., Hajizade, A., Mohammadi, A. H. N., Alikhani, H. K., & Pour, M. H. (2021). Immunological detection of AcAMP antimicrobial peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(2), 235.