UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

CAROLINA MERHEB DINI

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE DE *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICAE* N31 E AVALIAÇÃO DE SUA APLICAÇÃO NA FABRICAÇÃO DE QUEIJO MATURADO

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Co-orientadora: Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto, SP

Outubro/2010

CAROLINA MERHEB DINI

Produção, Purificação e Caracterização da Protease de *Thermomucor Indicae-Seudaticae* N31 e Avaliação de sua Aplicação na Fabricação de Queijo Maturado

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto da Silva
Professor Adjunto Doutor
UNESP - São José do Rio Preto-SP
Orientador

Prof[a]. Dr[a]. Mirna Lucia Gigante
Professor Assistente Doutor
UNICAMP - Campinas-SP

Praf[a]. Dr[a]. Elza Iouko Ida
Professor Associado Doutor
UEL - Londrina-PR

Prof. Dr. Hamilton Cabral
Professor Doutor
USP - Ribeirão Preto-SP

Prof. Dr. Arni Raghuvir Krishnaswamy
Professor Titular Doutor
UNESP - São José do Rio Preto-SP

São José do Rio Preto, 22 de outubro de 2010

Dini, Carolina Merheb.
Produção, purificação e caracterização da protease de Thermomucor indicae-seudaticae N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado / Carolina Merheb Dini. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.
130 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Roberto da Silva
Co-orientador: Ana Lúcia Barretto Penna
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos – Aplicações industriais. 3. Enzimas proteolíticas – Aplicações industriais. 4. Queijo prato. I. Silva, Roberto da. II. Penna, Ana Lúcia Barretto. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.15

Aos meus pais, Ney e Lisete,
pelo apoio, dedicação e,
principalmente, pelo amor incondicional;
Ao meu marido, David,
pelo incentivo, compreensão, companheirismo
e acima de tudo pelo grande amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Roberto da Silva, pela amizade, confiança e ensinamentos durante esses 8 anos e pela orientação deste trabalho;

À Profa. Ana Lúcia Barretto Penna pela orientação durante a produção e análise dos queijos;

À Profª. Eleni Gomes e aos colegas de laboratório, Aline, Ana Flávia, André, Andréia, Ana Lúcia, Ariane, Bárbara, Bárbara, Carol, Dani, Denise, Ellen, Érica, Fabiana, Fernanda, Gisele, Heloíza, Larissa, Marcelo, Márcia, Mayara, Milla, Natália, Paula, Paula, Ricardo, Rodolfo, Rodrigo, Ruan, Tássia, Thiago pelas trocas de idéias e momentos agradáveis; às colegas do laboratório de Leite e Derivados, Íris, Tatiane, Janaína, Aline, Sabrina, Luana, Michele, Vicky, Nina;

À amiga Graziele por ter me ensinado a fabricação do queijo Prato e todas as análises;

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (processo número 06/06573-9);

Às amigas e companheiras de república Aline e Thaís, com quem compartilhei alegrias, frustrações e vitórias;

À amiga Larissa por me hospedar nas idas à Rio Preto no final do doutorado;

Ao amigo Hamilton Cabral, pela amizade, pelas dicas e por estar sempre disposto a ajudar;

Aos professores da banca do Exame de Qualificação, Prof. Hamilton Cabral e Prof. Carlos Alberto Ceron, pelas sugestões ao trabalho;

Aos professores da banca de defesa do Doutorado, pela contribuição ao trabalho;

Ao professor Maurício Boscolo pelo uso dos cromatógrafos e aos amigos Ricardo e Ana Lúcia por me ensinarem a usar o equipamento;

À Chr-Hansen por fornecer as amostras de coagulantes;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do IBILCE-UNESP, pelos conhecimentos transmitidos;

Aos técnicos do DETA Ginaldo, Luiz e Newton;

Ao meu irmão, Eduardo, por estar sempre presente em todos os momentos e novas etapas da minha vida;

Às famílias Wingeter, Merheb e Dini, pela torcida, interesse e reconhecimento;

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Proteases coagulantes microbianas catalisam a coagulação do leite, podendo substituir o coalho de bezerro. O objetivo deste trabalho foi estudar a protease do extrato enzimático do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, obtido por fermentação em estado sólido (FES), e avaliar sua aplicação na fabricação de queijo maturado. Para avaliar a biomassa do fungo *T. indicae-seudaticae* N31 na FES foi utilizado o ergosterol como biomarcador. A biomassa, variou de 21,92 a 48,63 mg/g meio sólido na fermentação com farelo de trigo e de 30,18 a 81,67 mg/g meio sólido na fermentação com farelo de trigo e caseína. A condição de FES que resultou num extrato enzimático com alta atividade coagulante (AC) e baixa atividade proteolítica (AP) foi em 24 horas utilizando farelo de trigo como substrato. A AC deste extrato foi máxima em pH 5,7 e a 70°C; permaneceu estável na faixa de pH de 3,5 a 4,5 e foi termoestável até 45°C por 1 hora. A AP foi máxima em pH 5,5 e a 65°C, manteve aproximadamente 70% de estabilidade na faixa de pH de 5,0 a 7,0 e foi termoestável até 45°C por 1 hora. Dentre os inibidores de protease, o composto que mais afetou as atividades foi Pepstatin A. O extrato enzimático bruto foi concentrado por precipitação com álcool e foi cromatografado em resinas de filtração em gel (Sephadex G75) e troca iônica (Q Sepharose). AC e AP foram purificadas 43 e 16 vezes e exibiram recuperação de 1,3 e 0,5% das atividades iniciais, respectivamente. A AC da enzima purificada foi máxima em pH 5,3 e a 75°C, permaneceu estável na faixa de pH de 3,5 a 4,5 e foi termoestável até 60°C por 1 hora. Os íons cobre e níquel causaram maior perda de AC com 40 e 65% de inibição, respectivamente. As atividades foram novamente mais afetadas pela Pepstatin A. A AP da enzima purificada foi máxima em pH 5,5 e a 65°C, manteve aproximadamente 75% de estabilidade na faixa de pH de 3,5 a 5,0 e foi aproximadamente 90% estável até 65°C por 1 hora. A enzima apresentou ponto isoelétrico em pH 3,5. O padrão de ação hidrolítico tanto do extrato enzimático bruto quanto da enzima purificada sobre a caseína analisado por uréia-PAGE e RP-HPLC revelaram baixa ação proteolítica em relação às frações de caseína e o perfil de peptídeos foi similar ao obtido com a protease coagulante comercial de *Rhizomucor miehei* (Hannilase, Chr-Hansen). A protease do fungo *T. indicae-seudaticae* N31 foi aplicada na etapa de coagulação para produção de queijo Prato em comparação a um coagulante comercial (Ha-la, Chr-Hansen). Periodicamente, durante 60 de maturação, os queijos foram caracterizados através das seguintes análises; gordura; acidez;

umidade; cinzas; sal; pH; nitrogênio total; nitrogênio solúvel em pH 4,6; nitrogênio solúvel em TCA 12%; índices de extensão da maturação (IEM) e de profundidade da maturação (IPM); capacidade de derretimento; propriedades de textura; eletroforese e RP-HPLC das caseínas. Os resultados foram analisados estatisticamente e revelaram que não houve diferença entre os tratamentos. O conjunto de dados obtidos sugere fortemente que o extrato enzimático do fungo *T. indicae-seudaticae* N31 apresenta potencial tecnológico para uso como coagulante de leite.

ABSTRACT

Microbial coagulant proteases catalyze milk clotting, and so they can substitute rennet. The aim of this work was to study the proteolytic activity of the enzymatic extract from the fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, obtained through solid state fermentation (SSF), and evaluate its application in the production of ripened cheese. To evaluate microbial biomass in SSF ergosterol was used as a biomarker. Biomass of the fungus *T. indicae-seudaticae* N31, varied between 21.92 to 48.63 mg/g solid medium in fermentation with wheat bran and between 30.18 to 81.67 mg/g solid medium in fermentation with wheat bran and casein. The condition for FES that resulted in an enzymatic extract with high milk-clotting activity (MCA) and low proteolytic activity (PA) was in 24 hours using wheat bran as substrate. MCA in this extract was maximum at pH 5.7, at 70°C, remained stable in pH range of 3.5 to 4.5, was thermostable up to 45°C for 1 hour. PA was maximum at pH 5.5 and at 65°C, kept approximately 70% of stability in the pH range of 5.0 to 7.0 and was thermostable up to 45°C for 1 hour. Among the protease inhibitors tested, the one that most affected the activities was Pepstatin A. The crude enzymatic extract was purified through precipitation with alcohol followed by gel filtration (Sephadex G75) and ion exchange (Q Sepharose) cromatographies. MCA and PA were purified 43 and 16-fold and exhibited 1.3 and 0.5% recovery of initial activities, respectively. MCA of the purified enzyme was maximum at pH 5.3 and at 75°C, remained stable in pH range of 3.5 to 4.5 and revealed high thermostability up to 60°C for 1 hour. Ions copper and nickel caused most loss of MCA with 40 and 65% of inhibition, respectively. The activities were again most affected by Pepstatin A. PA of purified enzyme was maximum at pH 5.5 and at 65°C, kept approximately 75% of stability in pH range of 3.5 to 5.0 and was approximately 90% thermostable up to 65°C for 1 hour. The enzyme presented isoeletric point at pH 3.5. The hydrolytic action pattern of the crude enzymatic extract and of the purified enzyme on casein analyzed by urea-PAGE and RP-HPLC revealed low proteolytic action towards casein fractions and a peptide profile similar to the one obtained with the commercial coagulant from *Rhizomucor miehei* (Hannilase, Chr-Hansen). Protease from *T. indicae-seudaticae* N31 was use in the milk-clotting step of Prato cheese making in comparison to a commercial coagulant (Ha-la, Chr-Hansen). Periodically, during 60 days of ripening, the cheeses were characterized by the following analysis: fat; acidity; moisture; ash; salt; pH; total nitrogen; pH 4.6 soluble nitrogen; TCA 12% soluble

nitrogen; melting capacity; texture properties; electrophoresis and RP-HPLC of caseins. The results were statistically analyzed and revealed that there were no differences among the treatments. The data collected strongly suggest that enzymatic extract of the fungus *T. indicae-seudaticae* N31 presents technological potential for use as milk coagulant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ergosterol. 22
Figura 2 - Corte transversal da micela de caseína no modelo de sub-micelas. 32
Figura 3 - O modelo de Holt (A) onde os círculos pretos são os *nanoclusters* de fosfato de cálcio e o modelo de Horne (B) onde as proteínas interagem pelas regiões hidrofóbicas (barras pretas retangulares), e as regiões hidrofílicas das proteínas (alças) que contém os *clusters* de fosfoserina se ligam aos *clusters* de fosfato de cálcio (triângulos) sendo que as moléculas de κ-CN limitam o crescimento micelar (letra K). 33
Figura 4 - Esquema mostrando os agentes proteolíticos em queijos, os compostos formados e os índices que os representam (NNC/NT*100, que reflete a extensão da maturação e NNP/NT*100, que reflete a profundidade da maturação). 36
Figura 5 - Fluxograma do processo de fabricação dos queijos. Adaptado de Garcia et al. (2009) 56
Figura 6 - Esquema mostrando os processamentos dos queijos Prato 57
Figura 7 - Esquema ilustrando a análise de derretimento. Adaptado de Spadoti et al. (2003b) 60
Figura 8 - Curva padrão obtida com Ergosterol (Sigma) 63
Figura 9 - Biomassa fúngica (■), determinada por peso seco, e conteúdo de ergosterol (□) na fermentação submersa de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 64
Figura 10 - Regressão linear para conteúdo de ergosterol total versus biomassa seca total obtidos na fermentação submersa de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 65
Figura 11 - Conteúdo de biomassa (□) de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 e de atividade coagulante (■) na fermentação em estado sólido utilizando 100% farelo de trigo como substrato. 67
Figura 12 - Conteúdo de biomassa (□) de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 e de atividade coagulante (■) na fermentação em estado sólido utilizando 80% farelo de trigo e 20% caseína como substrato. 68
Figura 13 - Efeito do armazenamento do extrato enzimático a 7°C (A) e a -20°C (B)

sobre as atividades coagulante (■) e proteolítica (□). A atividade residual representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade no dia da extração (tempo zero)..... 69

Figura 14 - Efeito do pH sobre as atividades proteolítica (A) e coagulante (B) do extrato enzimático 71

Figura 15 - Efeito da temperatura sobre as atividades proteolítica (□) e coagulante (■) do extrato enzimático 72

Figura 16 - Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade das atividades proteolítica (□) e coagulante (■) do extrato enzimático e da atividade coagulante da enzima comercial Ha-la (+)..... 73

Figura 17 - Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante do extrato enzimático 75

Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia (uréia-PAGE) mostrando a hidrólise da caseína pelo extrato enzimático de *T. indicae seudaticae* N31 **(A)** (coluna 1: leite de ensaio; coluna 2: extrato enzimático; colunas 3-7: caseínas após incubação por 2, 5, 10, 30, 60 minutos, respectivamente) e pelo coagulante comercial (Ha-la) **(B)** (coluna 1: extrato enzimático; coluna 2: leite de ensaio; colunas 3-7: caseínas após incubação por 5, 10, 20, 40 e 60 minutos, respectivamente)..... 78

Figura 19 - **(A)** Perfil de eluição da protease na cromatografia de filtração em gel na resina Sephadex G75. Abs 280 nm (×) e atividades coagulante (■) e proteolítica (□). **(B)** Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) a 12% de concentração do extrato enzimático de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 após as primeiras etapas de purificação. Coluna 1, marcadores de massa molecular: β-galactosidase, 116,0 kDa; BSA, 66,2 kDa; ovoalbumina, 45,0 kDa; lactato desidrogenase, 35,0 kDa; RE ase βsp 981, 25,0 kDa; Coluna 2, extrato enzimático bruto; Coluna 3, extrato enzimático precipitado; Coluna 4, amostra coletada após filtração em gel em resina Sephadex G75. A seta indica a possível protease do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31..... 81

Figura 20 - **(A)** Perfil de eluição da protease na cromatografia de troca iônica. Atividade coagulante (■), atividade proteolítica (□), Abs 280 nm (x), e gradiente salino fracionado (---). **(B)** Eletroforese em gel de poliacrilamida

contendo SDS (SDS-PAGE) a 12% de concentração da protease purificada. Coluna 1: amostra coletada após troca iônica e Coluna 2: marcadores de massa molecular: β galactosidase, 116 kDa; BSA, 66,2 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; lactato desidrogenase, 35 kDa; REase Bsp981, 25 kDa; β-lactoglobulina, 18,4 kDa. A seta indica a protease purificada do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 82

Figura 21 - Efeito do pH sobre as atividades proteolítica (A) e coagulante (B) da enzima purificada 84

Figura 22 - Efeito da temperatura sobre as atividades proteolítica (□) e coagulante (■) da enzima purificada 85

Figura 23 - Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade das atividades proteolítica (□) e coagulante (■) da enzima purificada 86

Figura 24 - Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante da enzima purificada 87

Figura 25 - Efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a atividade coagulante da enzima purificada 90

Figura 26 - Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação: duplo recíproco de Lineweaver-Burk (A) e curva de Michaelis-Menten (B), onde U.A. = Δ Abs $_{280\ nm}$ x 10 / 30 min 91

Figura 27 - Efeito da concentração de leite sobre o tempo de coagulação pela enzima purificada 92

Figura 28 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia (uréia-PAGE) mostrando a hidrólise da caseína pela enzima purificada de *T. indicae seudaticae* N31. Coluna 1: solução de leite; coluna 2: solução enzimática; colunas 3-7: caseínas após incubação por 2, 5, 10, 30, 60 minutos, respectivamente 93

Figura 29 - Perfil de eluição em RP-HPLC de caseinato de sódio bovino (20 mg/mL) (a) e seus hidrolisados gerados após 1 h de proteólise pelas proteases (b, c, d, e) 95

Figura 30 - Evolução dos índices de maturação, NS-pH 4,6/NT*100 **(A)** e NS-TCA 12%/NT*100 **(B)**, dos queijos fabricados com coagulante comercial (□) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (■) durante a

maturação. [a, b, c, d] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p > 0,05). 102

Figura 31 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (uréia-PAGE) da caseína. **(A)**: perfil eletroforético do leite (L), do caseinato de sódio bovino (NaCN) e dos primeiros dias de maturação do queijos Prato (H_1 e T_1). **(B)**: perfil de degradação da caseína dos queijos Prato durante 60 dias de maturação. H representa os queijos fabricados com coagulante comercial e T os queijos produzidos com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 104

Figura 32 - Perfil de eluição em RP-HPLC das frações nitrogenadas solúveis em pH 4,6 dos queijos fabricados com o coagulante comercial (H) e com a protease de *T. indicae-seudaticae* N31 (T) com 1 (a), 30 (b) e 60 (c) dias de maturação 106

Figura 33 - Capacidade de derretimento (%) durante a maturação dos queijos fabricados com o coagulante comercial (□) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (■). [a, b] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p > 0,05). 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de atividades coagulante e proteolítica, razão entre as atividades (R) e conteúdo de proteína durante o período de fermentação do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em meios contendo farelo de trigo (FT) e farelo de trigo com caseína (FTC)..... 62

Tabela 2 - Conteúdo de ergosterol e biomassa na fermentação em estado sólido de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 em meios contendo farelo de trigo (FT) e farelo de trigo com caseína (FTC) 66

Tabela 3 - Efeito da presença de inibidores de protease nas atividades proteolítica e coagulante do extrato enzimático. A atividade residual representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade obtido no ensaio realizado sem adição de inibidores 76

Tabela 4 - Precipitação do extrato enzimático 80

Tabela 5 - Resultados obtidos a partir dos processos de purificação da protease do extrato enzimático de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 83

Tabela 6 - Efeito de inibidores de protease nas atividades proteolítica e coagulante da enzima purificada. A atividade residual representa a porcentagem de atividade remanescente observada em relação ao valor de atividade obtido sem a adição dos inibidores (controle) 88

Tabela 7 - Efeito de íons metálicos, detergentes e outros agentes químicos na atividade coagulante da enzima purificada. A atividade residual representa a porcentagem de atividade remanescente observada em relação ao valor de atividade obtido sem a adição dos agentes (controle) 89

Tabela 8 - Análises dos leites utilizados na fabricação dos queijos. Os resultados representam a média dos valores encontrados para os lotes de leite A e B.... 97

Tabela 9 - Composição dos queijos fabricados com coagulante comercial (H) e com a protease de *T. indicae-seudaticae* N31 (T) durante a maturação..... 99

Tabela 10 - Efeito dos tratamentos e do tempo de maturação sobre os índices de extensão (IEM) e profundidade (IPM) da maturação 103

Tabela 11 - Efeito dos tratamentos e do tempo de maturação sobre a capacidade de derretimento 108

Tabela 12 - Parâmetros de textura durante a maturação dos queijos fabricados com coagulante comercial (H) e com a protease de *T. indicae-seudaticae* N31 (T)..... 109

Tabela 13 - Efeito dos tratamentos e do tempo de maturação sobre os parâmetros de textura 110

LISTA DE ABREVIATURAS

FES	fermentação em estado sólido
FSm	fermentação submersa
PMSF	fluoreto fenilmetilsulfonil
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
FCC	fosfato de cálcio coloidal
SDS	dodecil sulfato de sódio
NNC	nitrogênio não caseico
NS-pH 4,6	nitrogênio solúvel em pH 4,6
NNP	nitrogênio não proteico
NS-TCA 12%	nitrogênio solúvel em TCA 12%
NT	nitrogênio total
IEM	índice de extensão da maturação
IPM	índice de profundidade da maturação
TCA	ácido tricloroacético
Phe	fenilalanina
Met	metionina
FT	farelo de trigo
FTC	farelo de trigo com caseína
AC	atividade coagulante
UAC	unidade de atividade coagulante
ACE	atividade coagulante específica
AP	atividade proteolítica
UAP	unidade de atividade proteolítica
APE	atividade proteolítica especifia
R	razão entre as atividades coagulante e proteolítica
BSA	albumina de soro bovino
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
RP-HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência de fase revesa
E-64	*trans*-epoxisuccinil-L-leucilamida-(4-guanidino)-butano
HCl	ácido clorídrico

PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
IEF	focalização isoelétrica
DTT	ditiotreitol
TFA	ácido trifluoracético
CD	capacidade de derretimento
TPA	análise do perfil de textura

SUMÁRIO

1 **Introdução**..... 19
2 **Revisão de Literatura**..... 21
2.1 Enzimas microbianas e sua obtenção por fermentação..... 21
2.2 Determinação de crescimento celular na fermentação em estado sólido..... 22
2.3 Proteases: produção, purificação e sua aplicação na indústria láctica..... 24
2.3.1 ***Produção de coagulantes microbianos***..... 24
2.3.2 ***Purificação de coagulantes microbianos***..... 26
2.3.3 ***Propriedades catalíticas e mecanismos de ação de proteases***..... 29
2.3.3.1 *Coagulação do leite*..... 30
2.3.3.2 *Maturação de queijos*..... 35
2.3.4 ***Coalhos***..... 38
2.4 Queijo Prato..... 41
3 **Objetivos**..... 42
4 **Materiais e Métodos**..... 43
4.1 Microrganismo..... 43
4.2 Inóculo..... 43
4.3 Meios de fermentação, condições de cultura e extração enzimática..... 43
4.4 Determinação da atividade coagulante no leite (AC)..... 44
4.5 Determinação da atividade proteolítica (AP)..... 44
4.6 Determinação do teor de proteína..... 45
4.7 Determinação do crescimento celular..... 45
4.7.1 ***Fermentação submersa***..... 45
4.7.2 ***Determinação de ergosterol***..... 46
4.8 Determinação de toxinas no extrato enzimático..... 46
4.9 Caracterização das atividades coagulante e proteolítica do extrato enzimático bruto..... 47
4.9.1 ***Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade enzimática***..... 47
4.9.2 ***pH e temperatura ótimos***..... 47
4.9.3 ***pH e temperatura de estabilidade***..... 47

4.9.4. ***Efeito da concentração de $CaCl_2$ na coagulação do leite*** 48
4.9.5 ***Efeito de inibidores na atividade enzimática*** 48
4.9.6 ***Monitoramento da atividade proteolítica durante degradação da caseína: hidrólise de solução de leite e eletroforese*** 48
4.10 Purificação da protease coagulante 49
4.10.1 ***Concentração*** 49
4.10.2 ***Cromatografias*** 50
4.10.3 ***Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)*** 50
4.11 Caracterização das atividades coagulante e proteolítica da enzima purificada. 51
4.11.1 ***pH e temperatura ótimos*** 51
4.11.2 ***pH e temperatura de estabilidade*** 51
4.11.3 ***Efeito da concentração de $CaCl_2$ na coagulação do leite*** 52
4.11.4 ***Efeito de NaCl, surfactantes, íons metálicos e inibidores de protease na atividade enzimática*** 52
4.11.5 ***Cinética enzimática*** 53
4.11.6 ***Ponto isoelétrico*** 53
4.11.7 ***Monitoramento da atividade proteolítica durante degradação da caseína: hidrólise de solução de leite e eletroforese*** 53
4.11.8 ***Monitoramento da atividade proteolítica durante a degradação das caseínas: hidrólise enzimática da caseína e RP-HPLC*** 54
4.12 Aplicação da enzima para produção de queijo Prato 55
4.12.1 ***Processo de produção e amostragem do queijo Prato*** 55
4.12.2 ***Rendimento*** 57
4.12.3 ***Análises físico-químicas*** 58
4.12.4 ***Eletroforese em gel de poliacrilamida-uréia (uréia-PAGE)*** 58
4.12.5 ***Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa (RP-HPLC)*** 59
4.12.6 ***Capacidade de derretimento (CD)*** 60
4.12.7 ***Medidas de propriedades de textura*** 61
4.12.8 ***Análise estatística*** 61
5 **Resultados e Discussão** 61
5.1 Produção do extrato enzimático 61
5.2 Determinação do crescimento celular 63
5.3 Determinação de toxinas no extrato enzimático 69

5.4 Caracterização das atividades coagulante e proteolítica do extrato enzimático bruto 69
5.4.1 ***Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade enzimática*** 69
5.4.2 ***pH e temperatura ótimos*** 70
5.4.3 ***pH e temperatura de estabilidade*** 72
5.4.4 ***Efeito da concentração de $CaCl_2$ na coagulação do leite*** 75
5.4.5 ***Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática*** 76
5.4.6 ***Monitoramento da degradação da caseína do leite*** 77
5.4.7 ***Purificação da protease coagulante*** 79
5.5 Caracterização das atividades coagulante e proteolítica da enzima purificada. 83
5.5.1 ***pH e temperatura ótimos*** 83
5.5.2 ***pH e temperatura de estabilidade*** 85
5.5.3 ***Efeito da concentração de $CaCl_2$ na coagulação do leite*** 87
5.5.4 ***Efeito de NaCl, surfactantes, íons metálicos e inibidores de protease na atividade enzimática*** 87
5.5.5 ***Cinética enzimática*** 91
5.5.6 ***Ponto isoelétrico*** 92
5.5.7 ***Monitoramento da degradação da caseína do leite*** 93
5.5.8 ***Monitoramento da atividade proteolítica durante a degradação das caseínas: hidrolise enzimática da caseína e RP-HPLC*** 94
5.6 Produção dos queijos Prato 97
5.6.1 ***Rendimento e composição dos queijos*** 97
5.6.2 ***Avaliação da proteólise: evolução do nitrogênio solúvel*** 101
5.6.3 ***Avaliação da proteólise: uréia-PAGE e RP-HPLC*** 104
5.6.4 ***Capacidade de derretimento*** 107
5.6.5 ***Análises do perfil de textura*** 109
6 **Conclusões** 111
7 **Referências Bibliográficas** 112
8 **Produção científica, tecnológica, cultural e social proveniente da tese** 124
ANEXO I Laudo Análise Micotoxinas 127
ANEXO II MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA-SILVA, R. Production and characterization of a milk clotting protease in the crude

enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, p. 87-93, 2010 128

1. Introdução

Microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas devido a sua ampla diversidade bioquímica, por apresentarem rápido crescimento e pelo fato de, em geral, seus substratos para crescimento serem relativamente baratos (TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003; YU; CHOU, 2005). Fungos têm sido amplamente empregados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico como as enzimas. Geralmente as enzimas produzidas por fungos são extracelulares, o que facilita o processo de recuperação do meio de fermentação. (GERMANO et al., 2003).

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, sendo utilizadas nas indústrias de detergente, carne e de laticínios, representando aproximadamente 60% do mercado total de enzimas (KUMAR et al., 2005).

Uma importante aplicação das proteases é no setor de laticínios. O primeiro passo da fabricação de queijos envolve a desestabilização das caseínas do leite por enzimas proteolíticas coagulantes. A fração κ-caseína desempenha um importante papel na estabilização da micela de caseína. A renina, também conhecida como quimosina, é capaz de romper a cadeia de amino ácidos da κ-caseína especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). As duas partes resultantes desta divisão são a para-κ-caseína insolúvel (resíduos de amino ácidos 1 a 105) que permanece associada à micela de caseína (paracaseína) e um peptídeo solúvel (glicomacropeptídeo; resíduos 106 a 169). No segundo passo, agora não enzimático, sem a ação estabilizadora da κ-caseína, a estrutura micelar residual (frações alfa, beta e para-κ-caseína) precipita na presença de cálcio, formando o paracaseinato de cálcio (CHITPINITYOL; CRABBE, 1997). A coagulação se dá quando aproximadamente 86% da κ-caseína foi hidrolisada; neste momento as micelas de paracaseína começam a agregar como resultado do *crosslinking* intermicelar via ligação do cálcio aos grupos fosfato-serina (GUINEE; WILKINSON, 1992).

Assim a renina é a principal enzima utilizada na produção de queijos (D'AMBROSIO et al., 2003; KUMAR et al., 2005). Ela está presente no coalho de animais ruminantes e é tradicionalmente obtida do 4° estômago de bezerros em lactação, porém devido à escassez de matéria prima, alto preço e crescimento da produção mundial de queijo, houve um aumento na busca por substitutos de mesma qualidade (NELSON, 1975). Um substituto adequado deve possuir intensa atividade coagulante e baixa atividade proteolítica

para minimizar a dissolução do coágulo (HASHEM, 1999). Outras proteases de origem diferente do abomaso de ruminantes, mas que também apresentam a capacidade de coagular o leite são denominados coagulantes (ANDRÉN, 2002; FOLEGATTI, 1994).

Além dos substitutos de coalho já existentes no mercado que incluem as quimosinas produzidas por fermentação, os coagulantes fúngicos, os extratos de plantas, e coalhos de outros animais (HARBOE; BUDTZ, 1999; ANDRÉN, 2002) vários estudos têm sido realizados na procura de proteases de origem microbiana (TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003; SHATA, 2005; KUMAR et al., 2005; HASHEM, 1999; CAVALCANTI et al., 2004; YU; CHOU, 2005; SRINIVASAN et al., 1964; ARIMA; YU; IWASAKI, 1970; FERNANDEZ-LAHORE et al., 1999; ABDEL-FATTAH; MABROUK; EL-HAWWARY, 1972; POZA et al., 2003; EL-BENDARY; MOHARAM, ALI, 2007; PREETHA; BOOPATHY, 1997; VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010; DUTT et al., 2009), animal (D'AMBROSIO et al., 2003; MOSCHOPOULOU et al., 2006; KUMAR et al., 2006) e de plantas (SENTHILKUMAR; RAMASAMY; SUBRAMANIAN, 2006; RAPOSO; DOMINGOS, 2008; VAIRO-CAVALLI et al., 2005; LLORENTE; BRUTTI; CAFFINI, 2004; SILVA; MALCATA, 2005; NOUANI et al., 2009 (a); AHMED et al., 2009; BRUNO et al., 2010) que possam ser aplicadas na indústria de laticínios para coagulação do leite. Entretanto, os substitutos de origem microbiana são mais interessantes tendo em vista da sua constante disponibilidade, baixo custo devido à possibilidade do uso de substratos de baixo custo para fermentação (YU; CHOU, 2005), ter maior aceitação entre pessoas cujos hábitos alimentares e crenças religiosas são contra o uso de produtos contendo derivados de animais sacrificados (SARDINAS, 1968; TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003).

Conhecendo a importância de proteases na indústria de alimentos, as informações sobre as características da enzima mostram-se interessantes não apenas do ponto de vista da pesquisa básica, mas também como parâmetros relevantes visando seu emprego na pesquisa aplicada. Neste trabalho serão apresentados a produção de uma protease fúngica por meio de um processo fermentativo; procedimentos para sua purificação, caracterização e estudos para investigar seu potencial de aplicação tecnológica como agente coagulante na produção de queijo Prato.

2. Revisão de Literatura

2.1 Enzimas microbianas e sua obtenção por fermentação

Fermentação é um processo que acompanha o desenvolvimento microbiano e é uma ferramenta importante na obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, vitaminas, hormônios, pigmentos, biosurfactantes, biopesticidas, etc. (SCHMIDELL et al., 2001; PANDEY, 2003).

De acordo com Germano et al. (2003); Pandey (2003), o sistema de fermentação em estado sólido (FES) oferece algumas vantagens em relação ao submerso (FSm) como, por exemplo: maior diversidade na utilização de resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, soja, arroz, bagaço de laranja, bagaço de cana, entre muitos outros; utiliza pouca quantidade de água o que permite uma produção mais concentrada dos metabólitos, diminuindo a formação de água residual e problemas de contaminação por bactérias durante o processo; e ainda, na maioria das vezes, com maior rendimento de produção de enzimas. A seleção do substrato adequado para FES é muito importante, pois este material sólido atua como suporte físico além de fornecer nutrientes ao microrganismo (PANDEY, 2003). FES possui ainda a vantagem de ser um processo estacionário, não acarretando em custos energéticos adicionais (SANDHYA et al., 2005).

Processos fermentativos FES e FSm têm sido utilizados com sucesso para estudar a produção de proteases fúngicas (MACCHIONE et al., 2008; MERHEB et al., 2007; MERHEB-DINI et al., 2010; MERHEB-DINI et al., 2009; SANDHYA et al., 2005; PREETHA; BOOPATHY, 1997; KUMAR et al., 2005; POZA et al., 2003; ABDEL-FATTAH; MABROUK; EL-HAWWARY, 1972; SARDINAS, 1968; FERNANDEZ-LAHORE et al., 1999; KHAN; BLAIN; PATTERSON, 1979; ARIMA; YU; IWASAKI, 1970; TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003; SHATA, 2005; GERMANO et al., 2003; GARCÍA et al., 2003; LI; YANG; SHEN, 1997; YU; CHOU, 2005; SRINIVASAN et al., 1964; SUMANTHA et al., 2005; HASHEM, 1999).

2.2 Determinação de crescimento celular na fermentação em estado sólido

Um dos problemas da FES é que a determinação da biomassa não pode ser feita de forma direta, pois os microrganismos se encontram intimamente ligados ao substrato formando uma matriz de difícil separação. Apesar das dificuldades encontradas na determinação do crescimento microbiano em FES, técnicas que utilizam a dosagem de biomarcadores como glicosamina (quitina) presente na parede celular de fungos e de ATP tem sido utilizadas (MILLE-LINDBLOM; VON WACHENFELDT; TRANVIK, 2004; RICHARDSON; LOGENDRA, 1997). Porém esses métodos podem apresentar baixa reprodutibilidade e esses marcadores podem estar presentes em outros componentes da amostra (RICHARDSON; LOGENDRA, 1997).

Dentre os biomarcadores, o ergosterol (24β-methylcholesta-5,7,*trans* 22-trien-3β-ol) (Figura 1) tem ganhado popularidade como um bom indicador quantitativo para biomassa fúngica (NEWELL; ARSUFFI; FALLON, 1988). O ergosterol é um constituinte abundante da membrana celular de fungos encontrado na camada fosfolipídica e atua controlando sua permeabilidade, microviscosidade e atividade de enzimas ligadas a mesma (DJAJAKIRANA; JOERGENSEN; MEYER, 1996). É encontrado apenas em fungos e em algumas microalgas e por isso vários autores tem preferido usar essa molécula como indicador de biomassa fúngica (NEWELL; MILLER; FALLON, 1987; SCHNÜRER, 1993; SEITZ et al., 1979).

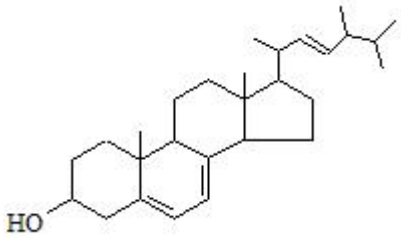


Figura 1. Ergosterol.

Basicamente, o ergosterol é recuperado da amostra de interesse por extração com metanol, seguido de saponificação e nova extração e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) já que a dupla ligação conjugada presente na molécula pode ser detectada pela medida da absorbância a 282 nm da luz UV em extratos lipídicos neutros (NEWELL; ARSUFFI; FALLON, 1988). A polaridade intermediária do ergosterol permite sua separação dos lipídeos da matriz tanto por CLAE de fase reversa quanto de fase normal.

Pode-se utilizar apenas metanol com fase móvel e a eluição ocorre de forma isocrática (GESSNER; NEWELL, 2002).

Entretanto, apenas o conhecimento das concentrações de ergosterol não permite concluir sobre a quantidade absoluta de fungo presente numa amostra. Para isso, fatores apropriados para converter valores de ergosterol em biomassa em termos de massa micelial seca são necessários. Tais fatores de conversão podem ser estabelecidos cultivando a espécie fúngica e medindo o conteúdo de ergosterol no seu micélio (GESSNER; CHAUVET, 1993). A quantidade de ergosterol no tecido fúngico não só depende da espécie, mas também pode variar com o estado fisiológico do fungo e, portanto pode depender de fatores como idade, estágio de desenvolvimento e condições gerais de crescimento (GESSNER; CHAUVET, 1993; NIEMENMAA; GALKIN; HATAKKA, 2008; NEWELL; MILLER; FALLON, 1987; CHARCOSSET; CHAUVET, 2001). Pasanen et al. (1999), ao estudar o conteúdo de ergosterol para culturas microbianas de 6 fungos filamentosos, 3 espécies de leveduras e um actinomiceto, indicou mais correlação entre o conteúdo de ergosterol e os fungos filamentosos do que ergosterol com fungos viáveis totais incluindo leveduras, sustentando a alegação de que o ergosterol é um bom indicador de concentrações fúngicas, particularmente para os fungos filamentosos. Ao estudar 9 espécies de fungos aquáticos, Bermingham; Maltby; Cooke (1995) perceberam que o conteúdo de ergosterol além de variar entre as espécies também variou com a idade do micélio, não seguindo nenhum padrão definido e que para apenas 3 fungos foi possível obter correlação significativa entre biomassa e conteúdo de ergosterol. Assim, no caso de estimar a biomassa em fermentações em estado sólido através da dosagem do ergosterol, o conteúdo de ergosterol e a biomassa fúngica devem ser experimentalmente validados para cada espécie de fungo (XUE; UPCHURCH; KWANYUEN, 2006) e que isso seja feito durante a fase exponencial de crescimento.

Vários estudos têm obtido sucesso na correlação entre a concentração de ergosterol e a biomassa fúngica. A determinação do teor de ergosterol foi usada para estimar biomassa fúngica em diferentes tipos de solos (DJAJAKIRANA; JOERGENSEN; MEYER, 1996; MONTGOMERY et al., 2000; STAHL; PARKIN, 1996;), em ambientes aquáticos (CHARCOSSET; CHAUVET, 2001; GESSNER; CHAUVET, 1993), para quantificar a colonização de sementes de soja por fungos patogênicos (XUE; UPCHURCH; KWANYUEN, 2006), para avaliar o grau de contaminação fúngica de grãos de milho armazenados (MORAES et al., 2003), para predizer o conteúdo de fungos endofíticos em amostras de sementes de gramíneas (RICHARDSON; LOGENDRA, 1997), para estimar contaminações fúngicas em materiais de edifícios danificados por água devido a vazamentos,

drenagem imprópria e falhas na construção (PASANEN et al., 1999), para correlacionar produção de enzimas com crescimento celular em substratos sólidos (SILVA; MACHUCA; MILAGRES, 2005) .

O ergosterol também tem sido sugerido para uso na quantificação de crescimento fúngico em substratos sólidos devido à boa correlação entre o conteúdo de ergosterol e o comprimento de hifas e entre a concentração total de ergosterol e massa micelial (NEWELL 1994; SCHNÜRER 1993). Porém, não existem muitos relatos na literatura sobre o uso da determinação do ergosterol para predizer crescimento celular em fermentações em estado sólido. Nout et al. (1987) concluíram em seu trabalho com FES em grãos de soja que para o fungo *Rhizopus oligosporus* não se pode predizer a biomassa em substratos naturais baseado no conteúdo de ergosterol em biomassa obtida de meios definidos de laboratórios. Essa correlação provavelmente é especifica para cada espécie fúngica e deve ser verificada para cada organismo de interesse.

2.3 Proteases: produção, purificação e sua aplicação na indústria láctica

2.3.1 Produção de coagulantes microbianos

A literatura traz alguns relatos de sucesso na tentativa de encontrar substitutos de renina produzidos por fungos em processos fermentativos.

Sardinas (1968) descobriu, dentre 381 bactérias e 540 fungos, um substituto de renina adequado produzido pelo *Endothia parasitica*. A enzima foi cristalizada e suas propriedades foram estudadas.

Arima; Yu; Iwasaki (1970) estudaram as características da enzima coagulante de *Mucor pusillus* var. *Lindt* após purificação e cristalização.

Abdel-Fattah; Mabrouk; El-Hawwary (1972) estudaram a produção da enzima coagulante por *Penicillium citrinum* e algumas de suas propriedades. Houve maior produção da enzima em meio contendo apenas água de maceração de milho.

Khan; Blain; Patterson (1979) estudaram a produção da enzima coagulante por *Mucor pusillus* e mostraram a existência de duas proteases no extrato após separação da atividade

coagulante da atividade proteolítica não especifica através de cromatografias de troca iônica e precipitação com sulfato de amônio.

Preetha; Boopathy (1994) estudaram a produção de protease coagulante por *Rhizomucor miehi* NRRL 3500 e *Rhizomucor pusillus* em FES e encontraram máxima produção utilizando farelo de trigo como substrato e em 5 dias de fermentação.

Channe; Shewale (1998) estudaram a obtenção de protease coagulante por *Aspergillus niger* MC4 em FSm por 4 dias e observaram produção máxima na presença de amido (como fonte de carbono) e peptona de carne (como fonte de nitrogênio).

Fernandez-Lahore et al. (1999) encontraram uma proteinase ácida com alta atividade coagulante produzida no quarto dia de FES utilizando farelo de trigo como substrato por uma linhagem mesofílica de *Mucor* sp. (M-105).

Hashem (1999) investigou a produção de enzimas coagulantes extracelulares por sete culturas fúngicas e determinou que *Penicillium oxalicum* foi o produtor mais promissor, em cultivo estacionário por 8 dias.

Tubesha; Al-Delaimy (2003) encontraram, dentre 20 linhagens de *Mucor* isoladas na Jordânia, um bom produtor de enzima coagulante, cujas condições ótimas de cultivo ocorreram em FES por quatro dias a 30°C, utilizando uma mistura fortificada de farelo de trigo como substrato. O extrato enzimático bruto foi aplicado na produção de queijo frescal e proporcionou mesmo rendimento quando comparado ao queijo produzido com renina comercial.

Yu; Chou (2005) estudaram a melhor condição para produção da enzima coagulante por *Amylomyces rouxii* em meio líquido de arroz.

Kumar et al. (2005) estudaram uma protease ácida com possíveis características de enzima coagulante produzida por *Rhizopus oryzae* em fermentação sólida a 30°C por dois dias, utilizando farelo de trigo como substrato.

Shata (2005) relatou as condições ótimas para extração de uma enzima coagulante produzida por *Aspergillus oryzae* em FES utilizando farelo de trigo como substrato.

Nos estudos de Silveira et al. (2005) estudou-se a produção de coagulante microbiano pelo zigomiceto *Mucor miehei*, um dos mais pesquisados para este tipo de síntese, via FES utilizando vários resíduos agroindustriais. Determinou-se que o farelo de trigo suplementado com caseína forneceu os melhores resultados de atividade coagulante.

Sathya et al. (2009) estudaram a produção de protease coagulante de *Mucor circinelloides* por FES utilizando vários resíduos agroindustriais e encontraram que a casca de feijão vermelho foi o melhor substrato.

Vishwanatha; Rao; Singh (2010) identificaram o *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 como o melhor produtor de protease coagulante dentre 16 espécies fúngicas. Os autores utilizaram FES com farelo de trigo, farinha de soja desengordurada e leite em pó desnatado para a máxima produção da enzima.

Nota-se que o farelo de trigo é um dos substratos mais utilizados nas fermentações, resultando em boas produções de atividade coagulante e que o tempo das fermentações é diferente para cada microrganismo e condição de cultura, variando de 2 a 8 dias.

2.3.2 Purificação de coagulantes microbianos

A purificação enzimática é um processo complexo que elimina constituintes indesejáveis do meio de cultivo como, por exemplo, a elevada proporção de água, moléculas orgânicas e inorgânicas constituintes do meio de cultura, outros metabólitos extracelulares que não a proteína de interesse, além de metabólitos intracelulares originados de células mortas e fragmentos celulares (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005). Assim, a enzima de interesse é isolada do meio e suas características específicas podem ser determinadas.

Geralmente não existe um protocolo definido para purificação de proteínas e no caso da obtenção de enzimas por fermentação isso ocorre devido às diferenças de cada produção enzimática (tipo de fermentação, tipo de meio de cultivo, microrganismo). Por isso é necessário desenvolver um protocolo específico, que geralmente engloba algumas etapas como: clarificação da amostra, geralmente por técnicas de filtração e/ou centrifugação, onde se obtém o extrato enzimático bruto; concentração da amostra, geralmente por ultrafiltração ou precipitação por sais ou solventes orgânicos; e, finalmente, através de técnicas cromatográficas ocorre a purificação de alta resolução (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005). O ideal é manter o processo simples e curto para que a recuperação da proteína em questão não seja muito prejudicada.

Muitos dos estudos mencionados anteriormente descrevem a purificação das proteases coagulantes e suas características.

Arima; Yu; Iwasaki (1970) purificaram a protease de *Mucor pusillus* var. *Lindt* através de cromatografias de filtração em gel (Amberlite CG50), troca iônica (DEAE-Sephadex A-50), precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de filtração em gel (Sephadex G100) e novamente precipitação com sulfato de amônio até obtenção de cristais da enzima. A

enzima apresentou maior estabilidade em pH 5,0; atividade proteolítica ótima em pH 3,5 e atividade coagulante ótima em pH 5,5.

Abdel-Fattah; Mabrouk; El-Hawwary (1972) purificaram parcialmente protease produzida por *Penicillium citrinum* através de precipitação com acetona. A enzima apresentou atividade coagulante ótima a 60°C e em pH 6,0; perdeu estabilidade ao ser aquecida a 55°C por 10 minutos.

Aceres et al. (1992) purificaram a protease de *Mucor bacilliformis* através de cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose). A enzima exibiu massa molecular de 32 kDa; pH ótimo para atividade proteolítica de 5,5 e estabilidade da atividade coagulante em pH 3,0-6,0; termoestabilidade de ambas atividades até 50°C e inibição por pepstatin A.

Preetha; Boopathy (1997) purificaram a protease produzida por *Rhizomucor miehei* através de cromatografias de troca iônica (DEAE-celulose) e de afinidade (Benzamidine-Sepharose), que apresentou massa molecular de 40,5 kDa; pH ótimo de 5,6 para atividade coagulante e 4,1 para proteolítica; termoestabilidade até 35°C para ambas atividades e inibição por pepstatin A.

Fernandez-Lahore et al. (1999) purificaram a proteinase de *Mucor* sp. (M-105) através de concentração por ultrafiltração e cromatografias de troca iônica (Q-Sepharose) e filtração em gel (Superose 12). A enzima exibiu massa molecular de 33 kDa; temperatura ótima para atividade coagulante de 30°C e inibição por pepstatin A.

Hashem (2000) purificou a protease produzida por *Penicillium oxalicum* através de precipitação alcoólica seguida de cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose). A enzima apresentou atividade coagulante ótima em pH 4,0 e a 65°C e perdeu atividade após tratamento a 55°C.

Kumar et al. (2005) purificaram a protease produzida por *Rhizopus oryzae* através de fracionamento com sulfato de amônio seguido de cromatografias de troca iônica (DEAE-celulose) e filtração em gel (Sephadex G100). A enzima apresentou massa molecular de 34 kDa; atividade coagulante ótima a 60°C e em pH 5,5; termoestabilidade de 30 a 45°C e inibição por pepstatin A.

Nouani et al. (2009) (b) purificaram a protease de *Mucor pusillus* utilizando cromatografias de troca iônica (QEAE-Sephadex A50) e filtração em gel (Sephadex G100) obtendo um rendimento final de 7,56% e fator de purificação de 18 vezes. A enzima apresentou massa molecular de 49 kDa; atividade coagulante ótima em pH 5 e a 50°C e permaneceu estável na faixa de temperatura de 30 a 50°C.

Existem também estudos com proteases de bactérias.

Mesrob; Stoeva; Vassileva (1978) purificaram a protease de *Bacillus mesentericus* 76 através de precipitação com etanol seguido de cromatografias de troca iônica (CM Sephadex C50) e filtração em gel (Sephadex G25).

Poza et al. (2003) purificaram parcialmente a protease de *Myxococcus xanthus* 422 através de cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S200). A enzima exibiu atividade coagulante ótima em pH 6,0 e a 37°C e perdeu 100% de sua atividade a 65°C após 12 minutos.

Cavalcanti et al. (2004) purificaram parcialmente a protease de *Nocardiopsis* sp. através de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose). A enzima apresentou atividade coagulante ótima em pH 7,5 e a 55°C e foi inativada a 75°C após 30 minutos.

El-Bendary; Moharam; Ali (2007) purificaram parcialmente a protease de *Bacillus sphaericus* através de precipitação com acetona, cromatografias de troca iônica (DEAE-Sephadex A25) e de filtração em gel (Sephadex G100). A enzima exibiu atividade máxima em pH 6,0-7,5 e a 55°C e perdeu toda atividade a 70°C após 10 minutos.

Ageitos et al. (2007) purificaram a protease de *Bacillus licheniformis* USC13 através de precipitação com sulfato de amônia 60% seguido de cromatografias de troca iônica (DEAE-Biogel A) e filtração em gel (Sephacryl S200).

Outros autores purificaram proteases de animais e plantas.

Kumar et al. (2006) purificaram a protease de cabra (*Capra hircus*) através de ultrafiltração, cromatografias de troca iônica (DEAE-celulose), filtração em gel (Superose 12) e troca iônica (Mono Q). A enzima apresentou massa molecular de 36 kDa; atividade coagulante ótima em pH 5,5 e a 60°C e estabilidade até 55°C por 15 minutos.

Senthilkumar; Ramasamy; Subramanian (2006) purificaram a protease da planta *Streblus asper* através de precipitação com etanol e cromatografias de troca iônica (DEAE-celulose) e filtração em gel (Sephadex G200). A enzima exibiu massa molecular de 55 kDa; atividade coagulante ótima em pH 5,5 e a 55°C; estabilidade na faixa de 30-40°C por 1 hora e entre pH 5,0-6,0 e inibição por pepstatin A.

Raposo; Domingos (2008) purificaram a protease da planta *Centaurea calcitrapa* através de precipitação com sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica (DEAE-Sepharose), de interação hidrofóbica (Econo-Pac t-butyl HIC) e troca iônica (Mono Q). A enzima apresentou massa molecular de 50 kDa e inibição por pepstatin A.

Nouani et al. (2009) (a) purificaram a protease de flores de alcachofra (*Cynara scolymus*) e do látex de árvore de figo (*Ficus carica*) utilizando cromatografia de filtração em

gel (Sephacryl S200) seguido de um tratamento para remoção de pigmentos em Sephadex G50. As enzimas exibiram ação em meio ácido e a altas temperaturas do leite (80°C) revelando-se termofílicas.

Ahmed et al. (2009) purificaram parcialmente a protease de sementes de *Solanum dubium* através de fracionamento com sulfato de amônia.

É possível notar que os procedimentos de purificação para cada enzima de cada organismo são variados, mostrando que o protocolo depende da amostra além das condições e materiais disponíveis no laboratório.

2.3.3 Propriedades catalíticas e mecanismos de ação de proteases

As proteases catalisam a mesma reação química, hidrólise de ligações peptídicas de proteínas, porém exibem preferências de acordo com os grupos presentes nas proximidades dessas ligações. Assim, tem-se exopeptidases, que exibem preferência pelas extremidades C- ou N- terminais da cadeia peptídica, sendo específicas pelos grupos carboxila ou amino livres; e endopeptidases, que atuam internamente na cadeia peptídica e cuja especificidade depende das cadeias laterais de aminoácidos encontradas na vizinhança do sítio de hidrólise (POLGÁR, 1989).

Outro critério de classificação, além da especificidade, é em relação ao mecanismo catalítico. Atualmente, a disponibilidade de informações sobre estrutura e mecanismos das proteases proporcionou novos esquemas de classificação. Baseado no mecanismo de catálise, as proteases são classificadas em 6 classes distintas, aspárticas, glutâmicas e metaloproteases, cisteíno, serino e treonino. As 3 primeiras utilizam uma molécula de água ativada como nucleófilo para atacar a ligação peptídica do substrato, sendo que nas outras 3 o nucleófilo é um resíduo de aminoácido (cisteína, serina ou treonina, respectivamente) localizados no sítio ativo, que é de onde derivam as nomenclaturas (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). O mecanismo catalítico pode ser determinado diretamente através da reatividade da enzima em relação a inibidores de resíduos de aminoácidos na região do sítio ativo (LI, YANG, & SHEN, 1997).

De acordo com Rao et al. (1998), as serino-proteases que são caracterizadas pela presença de um grupo serino no seu sítio ativo e são reconhecidas pela inibição irreversível por PMSF, entre outros; proteases aspárticas, comumente conhecidas como proteases ácidas, que são endopeptidases que dependem de resíduos de ácidos aspárticos para sua atividade

catalítica e são inibidas por Pepstatin A; cisteíno-proteases que possuem sua atividade dependente de um par catalítico contendo resíduos cisteína e histidina e geralmente são ativas somente na presença de agentes redutores como a cisteína; metaloproteases que constituem o tipo catalítico mais diverso das proteases e são caracterizados pela necessidade de um íon metálico divalente para sua atividade e por isso são inibidas por quelantes de metais como o EDTA.

É interessante ressaltar que o critério baseado no mecanismo de ação garante uma melhor classificação inicial das proteases, já que uma mesma protease pode atuar tanto como exo- quanto como endopeptidases (POLGÁR, 1989).

2.3.3.1 Coagulação do leite

Uma importante aplicação de proteases é na produção de queijos. O leite é uma emulsão de gorduras em água estabilizada por uma dispersão coloidal de proteína. Durante a fabricação de queijos, é necessário provocar a desestabilização dessas proteínas para que ocorra a formação do coágulo.

As caseínas são fosfoproteínas insolúveis em pH 4,6 e existem no leite na forma de estruturas coloidais, as micelas, cuja principal função é fluidizar as moléculas de caseína e solubilizar cálcio e fosfato (FARRELL et al., 2006). A micela é uma complexa formação de várias unidades de caseínas que podem ser subdivididas nas seguintes classes: α- (αs_1 e αs_2), β-, γ- e κ-caseínas, sendo que a γ-caseína resulta da proteólise da β-caseína (ROBINSON; WILBEY, 1998). As frações α_{s1}-CN contêm de 7 a 9 resíduos fosfato-serina por mol, a α_{s2}-CN de 10 a 13 e a β-CN 5. Estes resíduos são concentrados em "*clusters*" e são responsáveis pela existência de áreas hidrofílicas com forte carga negativa. Devido à presença de fósforo nas frações α_{s1}, α_{s2} e β, elas poderiam se ligar fortemente ao cálcio e precipitarem. Entretanto, a κ-caseína, que possui apenas um resíduo fosfato por mol, é solúvel em altas concentrações de Ca^{2+} e, por interagir hidrofobicamente com as frações α e β, consegue estabilizá-las contra a precipitação no leite (LAW, 1997). A fração κ também difere da α e β por conter uma região glicosilada, composta por três monossacarídeos (galactose, N-acetil-galactosamina ou ácido N-acetil neuramínico), formando tri ou tetrassacarídeos, ligados aos resíduos treonil 131, 133, 135 ou 136 (SGARBIERI, 2005). O fosfato de cálcio e as α- e β-caseínas são

unidos pelo envolvimento dos resíduos fosfato-serina na estrutura do fosfato de cálcio. Por muitos anos, uma explicação muito utilizada para descrever a estrutura micelar, que compreende o modelo de sub-micelas, é a de que a κ-caseína estaria localizada próximo à superfície da micela com a ligação $Phe_{105} - Met_{106}$, sensível à quimosina, projetando-se a partir dela. A parte hidrofóbica da molécula da κ-caseína estaria atada ao núcleo da micela, composto por sub-micelas que são agregados de moléculas de caseína unidas por interação hidrofóbica e pontes salinas e as sub-micelas por sua vez são unidas por fosfato de cálcio coloidal, enquanto que o glicomacropeptídeo hidrofílico formaria uma camada de filamentos altamente hidratados, que estariam projetados para a fase aquosa. Esses filamentos seriam responsáveis pela estabilização estérica das micelas de caseína (WALSTRA, 1990; VARNAM; SUTHERLAND, 2001).

Porém, a estrutura da micela de caseína ainda é motivo de discussão na comunidade científica. Ha décadas, vários modelos têm sido propostos para descrevê-la e o trabalho de Phadungath (2005) mostra uma excelente revisão geral sobre o assunto. Basicamente, os modelos se encaixam em 3 categorias: modelos *coat-core* (as micelas seriam esferas rígidas cobertas com uma camada de filamentos protéicos, a κ-CN), modelos de sub-unidades (sub-micelas) e modelos de estrutura interna, sendo que todos discutem sobre a composição e organização das β-CN, α-CN e κ-CN no interior e exterior da micela, sobre a localização e função do fosfato de cálcio e sobre como toda a estrutura é estabilizada.

Vários pesquisadores contribuíram para o desenvolvimento desses modelos. Por exemplo, no caso dos modelos de sub-micelas estão envolvidos Morr, Slattery, Schmidt e Wasltra (WALSTRA 1999), entre outros. O modelo de sub-micelas evoluiu e Walstra (1999) mostra uma nova figura, onde o fosfato de cálcio está presente como pacotes dentre as sub-micelas (Figura 2).

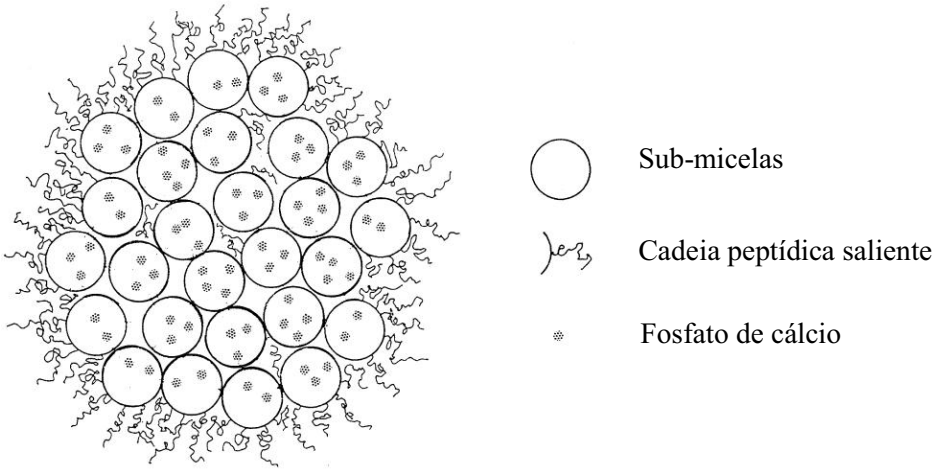


Figura 2. Corte transversal da micela de caseína no modelo de sub-micelas. (Walstra, 1999).

Apesar de o modelo de sub-micelas, atualizado por Walstra (1999), ter aceitação na comunidade cientifica, modelos alternativos, inseridos na categoria de modelos de estrutura interna, foram propostos por Holt em 1992 e por Horne em 1998 (PHADUNGATH, 2005), os quais aceitam a existência da camada externa estabilizadora de κ-CN e papel cementante do fosfato de cálcio coloidal, mas não aceitam a organização das caseínas em sub-micelas. No modelo de Holt, ilustrado na Figura 3A, a micela é considerada como um gel mineralizado composto por proteínas unidas por ligações cruzadas, onde *nanoclusters* de fosfato de cálcio coloidal são os agentes responsáveis por essas ligações cruzadas e por manter o *network* unido (HORNE, 1998). Aqui, a peça central da estrutura da micela são os *nanoclusters*. O modelo proposto por Horne (1998) vê o fosfato de cálcio micelar não apenas como promotor de ligações cruzadas, mas também como agente neutralizante, o qual, sendo carregado positivamente, se liga aos *clusters* de fosfoserina negativamente carregados reduzindo a carga protéica até o nível em que interações atrativas entre as regiões hidrofóbicas das caseínas passam a dominar. Assim o modelo sugere que as proteínas nas micelas são unidas por dois tipos de ligação sendo um equilíbrio entre interações hidrofóbicas e repulsão eletrostática (PHADUNGATH, 2005). De acordo com Horne (1998), pelas interações hidrofóbicas, duas ou mais regiões hidrofóbicas de diferentes moléculas formam um *cluster* unido. O crescimento desses polímeros é inibido pelos resíduos protéicos com carga cuja repulsão aumenta a energia livre da interação. A neutralização entre dois *clusters* de fosfoserina negativamente carregados de diferentes moléculas de caseína pela formação de pontes com o fosfato de cálcio coloidal diminui essa energia livre assim como produz o segundo tipo de pontes de ligação cruzada, já que se considera que 4 ou mais clusters de fosfoserina de diferentes moléculas de caseína podem ser acomodados em cada *nanocluster* de fosfato de

cálcio. Ainda de acordo Horne (1998), apesar de as moléculas de κ-CN poderem interagir através dos seus domínios hidrofóbicos com as regiões hidrofóbicas de outras caseínas, o crescimento além da κ-CN não é possível já que ela não possui nem um *cluster* de fosfoserina para ligar via fosfato de cálcio coloidal, nem outro ponto hidrofóbico para extender a cadeia. Assim a κ-CN age como um finalizador do crescimento da micela e faz parte da sua estrutura superficial. O modelo de Horne está ilustrado na Figura 3B.

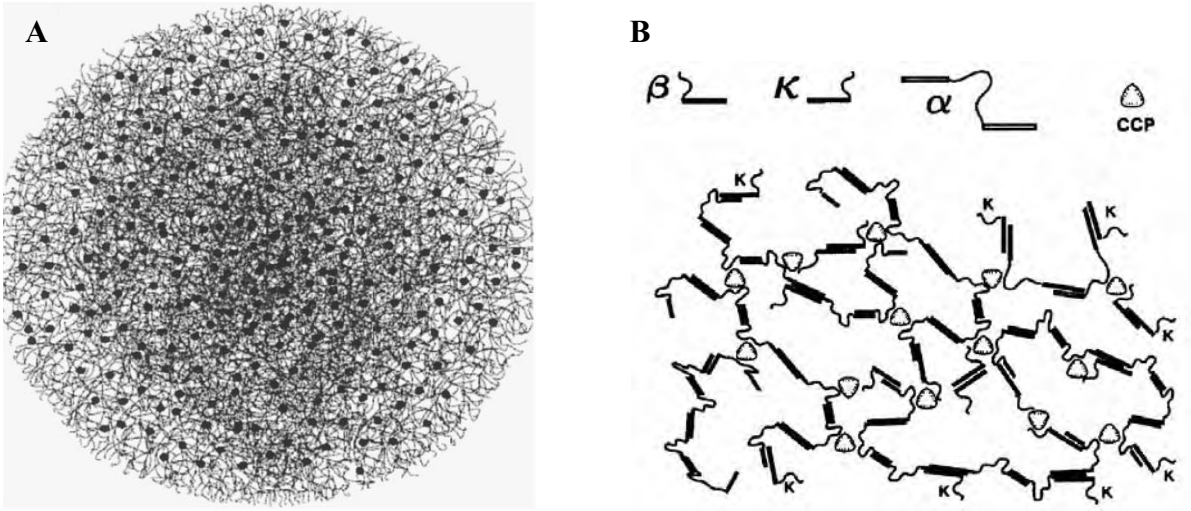


Figura 3. O modelo de Holt (A) onde os círculos pretos são os *nanoclusters* de fosfato de cálcio e o modelo de Horne (B) onde as proteínas interagem pelas regiões hidrofóbicas (barras pretas retangulares), e as regiões hidrofílicas das proteínas (alças) que contém os *clusters* de fosfoserina se ligam aos *clusters* de fosfato de cálcio (triângulos) sendo que as moléculas de κ-CN limitam o crescimento micelar (letra K). (Farrell et al., 2006)

Mais recentemente, Dalgleish; Spagnuolo; Goff (2004), a partir de micrografias obtidas de microscópio eletrônico de varredura, reportaram novas informações estruturais, como a superfície da micela sendo, na verdade, mais complexa e flexível do que apenas filamentos atados a uma esfera, e consistindo de pequenos tubos de caseína cujas extremidades protuberam a partir da massa interior, sendo que na extremidade desses tubos se situa a k-caseína, o que implica em maior área superficial, e ainda que parecem existir entradas ou fendas, sugerindo que o interior da micela é acessível à pequenas moléculas como as enzimas.

Já as propriedades gerais da micela de caseína são amplamente aceitas pelos pesquisadores da área. De acordo com Fox; Brodkorb (2008) algumas dessas propriedades são o fato de a k-caseína, que é solúvel na concentração de cálcio existente no leite e que compõe

aproximadamente 12% do total da caseína, pode estabilizar aproximadamente 10 vezes sua massa de caseínas sensíveis ao cálcio (α_{s1}, α_{s2} e β). A organização mais óbvia que permitiria isso é um interior composto por caseínas sensíveis ao cálcio envoltos por uma camada de k-caseína, análogo à estabilização de lipídeos por emulsificantes. A k-caseína é prontamente hidrolisada pela quimosina, que exibe massa molecular de aproximadamente 35 kDa, e reage via interações sulfidril-dissulfeto com a β-lactoglobulina, um dímero de aproximadamente 36 kDa, durante aquecimento do leite. Ambas as reações sugerem que ou a k-caseína está exposta na superfície da micela ou que as micelas são muito porosas para que moléculas destes tamanhos possam difundir por elas. Porém, como apontado pelos autores, sabe-se que o leite não é coagulado por reninas imobilizadas, sugerindo que a k-caseína não está tão exposta; e ainda que aminopeptidases super-polimerizadas, que não conseguem difundir dentro da micela, liberam o resíduo N-terminal de todas as quatro caseínas, sugerindo que a superfície da micela não é coberta exclusivamente com k-caseína e que um pouco das quatro caseínas está localizado na superfície. Com a remoção do fosfato de cálcio coloidal (FCC), com um agente quelante, por exemplo, as micelas dispersam em partículas menores, sugerindo que o FCC exerce um papel de integração nas micelas. Entretanto, as micelas também são dispersas por uréia, SDS, pH alto ou etanol, indicando que pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas também são envolvidas na integridade da micela. Até 50% de β-caseína, a mais hidrofóbica de todas as frações, se dissocia reversivelmente da micela com resfriamento, indicando a importância de interações hidrofóbicas e sugerindo que a micela é suficientemente porosa para permitir que a β-caseína se difunda fora da micela.

A presença dos filamentos da extremidade C-terminal da k-caseína na superfície da micela previne a agregação de mais sub-micelas, finalizando o crescimento micelar, e é também responsável pela estabilidade da micela contra floculação no leite devido à repulsão eletrostática e impedimento estérico (WALSTRA, 1999).

A desestabilização da estrutura micelar das caseínas do leite, por enzimas proteolíticas coagulantes, é o primeiro passo para a fabricação de queijos obtidos por coagulação enzimática. Uma importante característica da fração κ-caseína neste processo é que a enzima quimosina é capaz de clivar sua cadeia de amino ácidos especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). As duas partes resultantes são a para-κ-caseína insolúvel (resíduos de amino ácidos de 1 a 105) que permanece associada à micela de caseína e um peptídeo solúvel (glicomacropeptídeo; resíduos 106 a 169) (ROBINSON; WILBEY, 1998). Com isso, a para-κ-caseína não mais estabiliza a estrutura micelar e as frações alfa e beta

podem precipitar, na presença de cálcio, formando o paracaseinato de cálcio (NAGODAWITHANA; REED, 1993). O cálcio ajuda na coagulação por criar condições isoelétricas e por agir como uma ponte entre as micelas.

2.3.3.2 Maturação de queijos

As primeiras 24 horas que seguem após a coagulação do leite são as mais importantes para a bioquímica da maturação do queijo. Durante este período, a temperatura do queijo diminui, em relação à temperatura relativamente alta da etapa de coagulação (aproximadamente 35°C), para a baixa temperatura da etapa de maturação (aproximadamente 12°C); temperaturas ótimas para desenvolvimento de atividade proteolítica pelas enzimas coagulantes se situam nesse intervalo. Alterações na micela de caseínas continuam ocorrendo durante as fases iniciais de maturação. A micela é compactada, perde-se água ao mesmo tempo em que glóbulos de gordura são englobados e comprimidos. Esses fatores são determinantes para a estrutura e composição do produto final (SILVA; MALCATA, 2004). Se a degradação das caseínas resultar na formação de peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos na extremidade N-terminal, haverá produção de sabor amargo, principalmente se a formação desses peptídeos for mais rápida do que sua hidrólise, realizada pelas peptidases de culturas lácticas (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

Algumas variedades de queijos, principalmente os obtidos por coagulação ácida (cottage, ricota) são consumidos frescos, entretanto que a maioria dos queijos obtidos por coagulação enzimática são maturados por períodos de tempo variando de 2 semanas (mussarela), 4 semanas (gorgonzola), 6 meses (parmesão) e a um ou mais anos (Parmigiano-Reggiano, Cheddar extra-maturado). Durante a maturação, várias mudanças químicas e bioquímicas ocorrem envolvendo os principais constituintes do queijo como as proteínas, os lipídeos e a lactose residual, que são degradados a produtos primários e posteriormente a produtos secundários. Alguns desses produtos inclui peptídeos, aminoácidos, ácidos, aminas, tióis, tioésteres – originados de proteínas; ácidos graxos, metilcetonas, lactonas e ésteres – originados de lipídeos; ácidos orgânicos (láctico, acético e propiônico), dióxido de carbono, ésteres e alcoóis – originados da lactose. Na combinação correta, esses compostos são responsáveis pelo sabor e aroma dos queijos (FOX, 1989; McSWEENEY, 2004).

Como mostra a Figura 4, os principais agentes proteolíticos envolvidos na maturação de queijos são o coagulante residual; enzimas naturais do leite, como a plasmina; as bactérias do fermento láctico (cultivo iniciador) e suas enzimas, que são liberadas após lise celular; as bactérias contaminantes, que não são do fermento láctico, representadas pelos organismos que sobreviveram à pasteurização do leite ou que tiveram acesso ao leite pasteurizado ou ao coágulo durante a fabricação do queijo e que, com a morte celular, liberam enzimas (FOX, 1989).

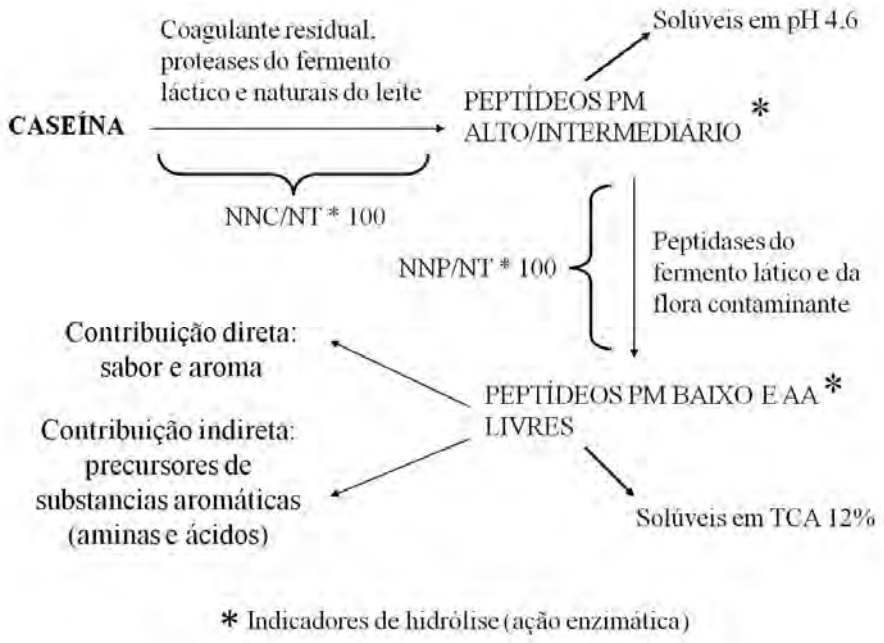


Figura 4. Esquema mostrando os agentes proteolíticos em queijos, os compostos formados e os índices que os representam (NNC/NT*100, que reflete a extensão da maturação e NNP/NT*100, que reflete a profundidade da maturação).

A Figura 4 também mostra que os produtos liberados após ação dos agentes proteolíticos podem ser usados como índices de proteólise, ou seja, a presença deles no queijo indica ação enzimática. Dessa forma têm-se os índices de proteólise:

- *Índice de Extensão da Maturação, IEM, (NNC/NT*100)*, representado pela presença de peptídeos de peso molecular alto/intermediário que foram produzidos devido à ação do coagulante residual, proteases do fermento e da plasmina sobre a caseína, conhecida como proteólise primária. Esses peptídeos são solúveis em pH 4,6 e portanto se diferenciam da caseína, que é insolúvel. Assim o IEM é medido pela dosagem de nitrogênio dos compostos solúveis após precipitação isoelétrica da caseína (pH 4,6), denominado nitrogênio não caseico (NNC), e é relacionado com o conteúdo de nitrogênio total (NT).

- *Índice de Profundidade da Maturação, IPM, (NNP/NT*100)*, representado pela presença de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres que foram produzidos devido à ação de peptidases do fermento láctico e da microbiota contaminante sobre os peptídeos de massa molecular alta/intermediária. Esses peptídeos menores e os aminoácidos livres são solúveis em TCA 12%, ácido que precipita proteínas, e, portanto se diferenciam dos peptídeos maiores, que são insolúveis. Assim o IPM é medido pela dosagem de nitrogênio dos compostos solúveis após precipitação com TCA 12%, denominado nitrogênio não protéico (NNP), e é relacionado com o conteúdo de nitrogênio total (NT).

Durante o período inicial de maturação, a α_{s1}-CN é hidrolisada na ligação Phe_{23}-Phe_{24} pela quimosina residual no queijo formando um peptídeo maior (α_{s1}-CN f24-199 ou α_{s1}-I-caseína) que é relativamente resistente à hidrólise posterior (BALDINI, 1998) e outro menor (α_{s1}-CN f1-23) (FARKYE; FOX, 1990; SILVA; MALCATA, 2004). A β-CN permanece mais estável do que a α_{s1}-CN, mas também é degradada (BALDINI, 1998; SILVA; SINGH; DRAKE; CADWALLADER, 2003; MALCATA, 2004). A estrutura primária da β-caseína é susceptível à hidrólise pela protease plasmina, nas ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos 28-29, 105-106, e 107-108, produzindo os fragmentos peptídicos γ [γ1- (β-CN f29-209), γ2-(β-CN f106-209) e γ3-(β-CN f108-209)], representando a região C-terminal e 5 proteose-peptonas, representando a região N-terminal (FOX, 1989; SINGH; DRAKE; CADWALLADER, 2003; SGARBIERI, 2005). Essas proteose-peptonas são soluveis em pH 4,6 afetando o IEM, porém essa contribuição é muito pequena (McSWEENEY; FOX, 1997). De acordo com Singh; Drake; Cadwallader (2003), as γ-CN parecem acumular em queijo Cheddar durante a maturação, mas as proteose-peptonas são extensivamente hidrolisadas pelas peptidases e proteinases das culturas iniciadoras a pequenos peptídeos e aminoácidos livres, afetando o IPM. A β-CN sofre pouca proteólise pela quimosina residual no queijo, mas quando essa proteólise ocorre, ela tem sido associada ao acúmulo de peptídeos amargos (LUCEY; JOHNSON; HORNE, 2003).

A proteólise em queijos pode ser monitorada quantitativamente e qualitativamente explorando-se diversas técnicas como solubilização de proteínas em diferentes solventes; determinação de grupos funcionais liberados; técnicas de cromatografia e eletroforese (FOX, 1989; McSWEENEY; FOX, 1997) no intuito de detectar e quantificar os produtos de degradação e expressar o nível de maturação do queijo. De acordo com Sousa, Ardo, McSweeney (2001), se o objetivo do estudo aborda a investigação do efeito de algum agente proteolítico em particular, como os diferentes tipos de coagulantes, a metodologia deve ser

escolhida de modo a emfatizar o nível de proteólise causada por esse agente. Por exemplo, a evolução da proteólise pode ser acompanhada pela eletroforese em gel uréia-poliacrilamida (uréia-PAGE), que possibilita a visualização da integridade das frações de caseína durante a maturação, e os perfis de peptídeos da fração de nitrogênio solúvel em 4,6 devem ser determinados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC).

Além de contribuir para o sabor e aroma de queijos maturados, uma degradação balanceada das proteínas em peptídeos e aminoácidos também é necessária para desenvolvimento das características de textura em queijos (SINGH; DRAKE; CADWALLADER, 2003). Por exemplo, a hidrólise da ligação Phe_{23}-Phe_{24} de aproximadamente 20% das α_{s1}-CN causa uma mudança rápida na textura borrachenta de queijo Cheddar que se torna um produto mais homogêneo e suave e por isso está associada ao amaciamento do queijo (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987; SINGH; DRAKE; CADWALLADER, 2003).

A textura de queijos é muito importante e influencia sua aceitação pelo consumidor (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). A textura pode ser avaliada através de métodos instrumentais que se baseiam em testes de força de compressão e quantificam os parâmetros mecânicos a partir do registro de curvas da força de deformação, simulando a compressão do queijo entre os molares durante a mastigação. Nesse sistema, a força de deformação comprime duas vezes o alimento e é registrada em gráficos. A partir da obtenção e análise da curva força-tempo é possível determinar sete parâmetros de textura, fraturabilidade, dureza, coesividade, adesividade, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade (AUGUSTO, 2003).

2.3.4 Coalhos

Coalhos e coagulantes são preparações de enzimas proteolíticas que têm sido usadas na indústria de queijos há muitos anos, sendo esta a aplicação mais antiga que se conhece de enzimas. Por definição, coalho é o extrato de abomaso de animais ruminantes e do nome coalho derivou a palavra renina para a enzima que coagula o leite, que hoje conhecemos como quimosina (EC 3.4.23.4) (ANDRÉN, 2002). O coalho extraído do abomaso de bezerros contém aproximadamente 80% de quimosina e 20% de pepsina bovina. Quando o coalho é extraído de animais adultos, essa proporção se inverte, e ocorre predominância de pepsina em detrimento da quimosina (FOLEGATTI, 1994). Devido à sua especificidade pela ligação

Phe_{105}-Met_{106} da κ-caseína, a quimosina se mostra mais adequada para utilização na coagulação do leite e produção de queijos do que a pepsina, que apresenta ação proteolítica generalizada (VISSER, 1993), colocando em risco o rendimento e o sabor e aroma do queijo. As demais proteases de outras origens, que também apresentam capacidade de coagular o leite sob condições adequadas, são denominadas coagulantes (ANDRÉN, 2002; FOLEGATTI, 1994). Os coagulantes são representados pelas quimosinas produzidas por fermentação, que são 100% quimosina de bezerro produzidas pela tecnologia do DNA recombinante, envolvendo *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis* ou *Escherichia coli* (ANDRÉN, 2002); pelas enzimas vegetais, sendo o extrato aquoso obtido de flores de *Cynara cardunculus* o mais popular e bem-sucedido em Portugal (SOUSA; MALCATA, 1998); e por diferentes coagulantes microbianos, especialmente os de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* e *Cryphonectria parasitica* (NELSON, 1975; ANDRÉN, 2002; SARDINAS, 1968).

Um grande problema envolvendo o coalho é o fato de que o abate de bezerros diminuiu há muito tempo, como já mostrava Nelson (1975) em seu estudo sobre o impacto de novos coagulantes na tecnologia de queijos. O autor apontou uma queda no abate de 8 milhões de cabeças em 1960 para 2 milhões em 1973 nos Estados Unidos, o que além de provocar escassez do coalho de bezerro também acabou encarecendo esse agente. Além disso, preocupações éticas associadas com a produção de coalhos de tais animais também têm levado à busca por substitutos (SOUZA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001).

Aliado à escassez do coalho, de acordo com dados fornecidos pela Embrapa Gado de Leite, a quantidade de queijos produzidos no mundo aumentou 17% de 2000 a 2008 sendo que no Brasil houve um aumento de 43%. Os dados também mostram que entre 1991 e 2004 notou-se um aumento no total da produção de queijos no Brasil de 180%, sendo os queijos Mussarela e Prato os mais importantes, cujas produções aumentaram 141% e 131%, respectivamente. Dentre os queijos obtidos por coagulação enzimática, além da Mussarela e do Prato, tem-se o Minas Frescal, cuja produção também aumentou em cerca de 93%. Assim, percebe-se que os queijos têm um papel econômico muito importante no mundo e no Brasil e ainda que a produção de queijos obtidos por coagulação enzimática tende a continuar crescendo, ou seja, a demanda por coagulantes é crescente.

Dentre as proteases coagulantes, as obtidas de *Rhizomucor miehi* (Hannilase, CHR Hansen; Fromase, DSM Food Specialties), *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica* (Suparen, DMS Food Specialties), *Aspergillus niger* (Chymogen – quimosina recombinante, desenvolvida por Genencor International e comercializada pela CHR Hansen), *Escherichia coli* (Chy-Max – quimosina recombinante, desenvolvida pela Pfizer e comercializada pela

CHR Hansen) e *Kluyveromyces lactis* (Maxiren – quimosina recombinante, DSM Food Specialties) têm substituído a quimosina em processos comerciais. Embora esses coagulantes microbianos já sejam comercializados por multinacionais, o isolamento de novas culturas que produzam enzimas capazes de exibir altos valores para a razão entre as atividades coagulante e proteolítica ainda é uma importante área de investigação científica, principalmente tendo em vista o desenvolvimento de biotecnologia nacional.

A razão entre as atividades coagulante e proteolítica é um índice utilizado para caracterizar substitutos de coalho. A atividade coagulante representa a especificidade da atividade proteolítica, ou seja, está relacionada com a clivagem da ligação Phe_{105}-Met_{106} da caseína. Já a atividade proteolítica representa a capacidade de hidrólise de qualquer ligação peptídica da caseína que o coagulante possa apresentar, e por isso é considerada uma atividade generalizada, inespecífica. Assim, o valor da razão entre as atividades coagulante e proteolítica deve ser sempre alto, ou seja, o coagulante deve exibir maior afinidade pela ligação Phe_{105}-Met_{106} durante a etapa de coagulação do leite, o que implica em evitar proteólise inespecífica excessiva durante a produção de queijos e com isso prevenir estruturas de gel fracas, alta perda de proteína/gordura para o soro e baixo rendimento de matéria seca nos queijos. Além disso, também previne hidrólise excessiva durante a maturação assegurando uma correta relação entre proteína intacta e peptídeos e conseqüentemente sabor, aroma, corpo e características funcionais típicos do queijo maturado (GUINEE; WILKINSON, 1992). Em todas as variedades de queijos, as α_{s1}-CN é o alvo principal para proteólise em queijos produzidos com coalhos comerciais e um critério para seleção de coalhos está baseado na baixa atividade sobre a β-CN (FOX, 1989). Alta atividade proteolítica pode resultar em sabor amargo em queijos maturados, produzido principalmente pela hidrólise de seqüências altamente hidrofóbicas da caseína, inicialmente da fração β-CN, levando à formação de peptídeos extremamente hidrofóbicos, cujo acúmulo provoca amargor (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001). Como as proteases de origem microbiana geralmente apresentam maior atividade proteolítica, quanto menor atuação sobre a β-CN mais adequado para substituir a renina na produção de queijos.

A literatura traz alguns relatos de sucesso na tentativa de encontrar substitutos de coalho produzidos por fungos como *Endothia parasitica* (SARDINAS, 1968), *Mucor pusillus* var. *Lindt* (ARIMA; YU; IWASAKI, 1970), *Penicillium citrinum* (ABDEL-FATTAH; MABROUK; EL-HAWWARY, 1972), *Mucor pusillus* (KHAN; BLAIN; PATTERSON, 1979; NOUANI et al., 2009 (b)), *Rhizomucor miehi* NRRL 3500 (PREETHA; BOOPATHY,

1997), *Aspergillus niger* MC4 (CHANNE; SHEWALE, 1998), *Mucor sp*. M-105 (FERNANDEZ-LAHORE et al., 1999), *Penicillium oxalicum* (HASHEM, 1999), *Mucor* (TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003), *Amylomyces rouxii* (Yu; Chou, 2005), *Rhizopus oryzae* (KUMAR et al., 2005), *Aspergillus oryzae* (SHATA, 2005), *Mucor miehei* (SILVEIRA et al., 2005), *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010). Porém, nem sempre o padrão de ação destas proteases sobre a caseína é esclarecido já que na maioria dos casos não são feitos estudos de aplicação tecnológica e com isso ficam dúvidas sobre o perfil hidrolítico e o real potencial para aplicação industrial dessas enzimas como coagulantes.

Além de atuar na coagulação do leite, a função dos coagulantes na maturação dos queijos também é muito importante. A maioria do coagulante adicionado ao leite perde-se no soro após a fabricação do queijo. A retenção do coagulante no queijo depende de fatores como: as condições de fabricação (pH do gel no momento do corte, pH do coágulo durante a dessora, temperatura de cozimento); a variedade do queijo, em queijos de massa altamente cozida como o Suíço a retenção é praticamente nula, já em variedades de alta umidade como o Camembert a retenção é de aproximadamente 50% e em queijo Gouda é de aproximadamente 15%; o tipo de coagulante utilizado. Dentro de um mesmo tipo de queijo, mesmo com as etapas de processo bem definidas, alguns fatores afetam a atividade do coagulante residual como mudanças de pH do leite devido à sazonalidade, mudança na relação coagulante-caseína devido à mudanças na composição do leite, variações da fonte de coagulante, variações na temperatura de cozimento e no tamanho dos grãos durante o corte (GUINEE; WILKINSON, 1992; BANSAL; FOX; MCSWEENEY, 2007). O coagulante residual afeta o tipo e nível de proteólise durante a maturação, e conseqüentemente o desenvolvimento de sabor e aroma, de textura, das características funcionais de alguns queijos (derretimento e elasticidade da mussarela) e a taxa de maturação (GUINEE; WILKINSON, 1992).

2.4 Queijo Prato

Dos produtos lácteos fabricados no Brasil, o queijo é o mais tradicional (GOROSTIZA et al., 2004), absorvendo a maior fatia do leite produzido no país, e dentre os queijos, o tipo Prato é o segundo mais produzido (Embrapa, 2010). Este queijo faz parte do grupo de queijos comuns no Brasil, os quais possuem maior demanda pelos consumidores basicamente por poderem ser utilizados como ingredientes em pizzas, sanduiches, em pratos de massa

(GOROSTIZA et al., 2004) além de poderem ser consumidos diretamente como petisco ou num lanche da tarde.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Prato, defini-se o Queijo Prato como o "queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulante apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas". Ele é classificado como um queijo gordo (45 a 59,9% de gordura no extrato seco) e de média umidade (36 a 45,9%), de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Pode ser encontrado nas variedades Lanche, Cobocó e Bola, diferindo quanto ao formato e peso. Possui consistência semidura e elástica, textura compacta, lisa, fechada, com alguns olhos pequenos arredondados e/ou algumas olhadura mecânicas, cor amarelada, sabor e odor característicos, podendo ter crosta fina, lisa e sem trincas e algumas olhaduras pequenas, bem distribuídas (BRASIL, 1997).

As principais etapas da elaboração do queijo Prato envolvem a obtenção de uma massa semicozida, remoção parcial do soro, lavagem por adição de água quente, moldagem sob soro, prensagem, salga e maturação pelo tempo necessário para conseguir suas características específicas (SPADOTI et al., 2003a). O procedimento de lavagem da massa promove a delactosagem do grão, regulagem do pH e controle da acidificação. Conseqüentemente, os queijos apresentam sabor e textura suave (AUGUSTO, 2003). É na etapa de maturação que ocorrem os eventos lipolíticos, glicolíticos e proteolíticos responsáveis por contribuir para o desenvolvimento de propriedades peculiares do queijo Prato.

3. Objetivos

- Produzir e caracterizar bioquimicamente a protease no extrato enzimático bruto obtido do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 por FES;

- Determinar a biomassa durante a FES;

- Purificar a protease e caracterizá-la bioquimicamente;

- Aplicar a protease na fabricação de queijo Prato para avaliar seu potencial tecnológico para uso como substituto de coalho.

4. Materiais e Métodos

4.1 Microrganismo

O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, obtido da coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP, foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250 mL inclinados contendo 50 mL do meio Sabouraud com 0,2% de caseína e cresceu em estufa a 45°C por dois dias. Após este período de crescimento permaneceu armazenado à temperatura ambiente.

4.2 Inóculo

A cada frasco contendo o fungo foi adicionado 100 mL de solução salina esterilizada, composta dos seguintes sais: sulfato de amônia [$(NH_4)_2SO_4$], sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$) e nitrato de amônia (NH_4NO_3), na concentração de 0,1% para cada sal. A superfície do meio foi raspada delicadamente obtendo-se uma suspensão de micélios, que foi utilizada para inocular os meios de fermentação.

4.3 Meios de fermentação, condições de cultura e extração enzimática

Foram preparados e esterilizados (120°C/20min), em frascos Erlenmeyer de 250 mL, meios contendo 100% farelo de trigo (FT) ou 80% farelo de trigo e 20% caseína (FTC), totalizando 5 g de substrato. O experimento foi realizado em triplicata.

Os meios FT e FTC foram inoculados com 6,75 mL e 6,8 mL, respectivamente, da suspensão micelial, obtendo-se 60% de umidade inicial, e foram incubados a 45°C estacionariamente. Amostras foram tomadas a cada 24 h, durante 192 h, para estabelecer o perfil de produção enzimática e conseqüentemente determinar as condições de cultivo que

proporcionem produção máxima de atividade coagulante e mínima de atividade proteolítica. Para a extração enzimática, 40 mL de água destilada foram adicionados aos meios. Os frascos foram agitados a 100 rpm / 30 minutos, o conteúdo foi filtrado e centrifugado a 30996 x *g* 20 minutos a 5°C. A solução obtida, denominada extrato enzimático bruto, foi congelada e posteriormente utilizada para os ensaios enzimáticos.

4.4 Determinação da atividade coagulante no leite (AC)

A atividade coagulante foi determinada de acordo com Arima et al. (1970), com modificações. Cinco mL de solução de leite desnatado (Itambé) reconstituído a 10% (p/v) com $CaCl_2$ 0,01 M foi pré incubada a 35°C por 10 minutos. Foi adicionado 0,5 mL de solução enzimática e iniciou-se a contagem do tempo. A formação do coágulo foi observada enquanto rodava-se continuamente o tubo de ensaio manualmente. O tempo em que as primeiras partículas são formadas foi medido. Uma unidade de atividade coagulante (UAC) foi definida como a quantidade de enzima necessária presente em 1 mL de extrato que coagulou 10 mL de substrato em 40 minutos e foi calculada de acordo com Shata (2005): UAC/mL = 2400/T x S/E, onde T é o tempo necessário para formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume de enzima.

4.5 Determinação da atividade proteolítica (AP)

A atividade proteolítica foi determinada de acordo com Merheb et al. (2007), com modificações. A mistura da reação foi composta de 0,4 mL de caseína (Sigma) 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,2 M pH 5,5 como substrato; 0,4 mL tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e 0,2 mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a 35°C e ao final de 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 10%. As amostras foram centrifugadas a 2300 x *g* / 5 minutos. Um controle foi preparado, onde o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Fez-se a leitura da absorbância a 280 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (UAP) é definida arbitrariamente como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância a 280 nm, nas condições do

ensaio. A atividade proteolítica foi calculada da seguinte maneira: UAP/mL = (Δ Abs $_{280nm}$ x 10 x fator de diluição) / (E x t), onde E é o volume de enzima e t é o tempo da reação. A atividade específica foi expressa como unidades de atividade enzimática por mg de proteína.

4.6 Determinação do teor de proteína do extrato enzimático

O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Hartree (1972), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.7 Determinação do crescimento celular

A biomassa fúngica por peso de substrato foi estimada pela medida do conteúdo de ergosterol, de acordo com Silva; Machuca; Milagres (2005) com modificações. A massa micelial (*X*) na fermentação em estado sólido foi calculada dividindo o conteúdo de ergosterol no meio sólido (*P*) pelo fator (f_c) encontrado na fermentação submersa a partir da curva de regressão linear, que representa o conteúdo médio de ergosterol para o organismo em questão. Utilizou-se a equação $X = P / f_c$, onde *X* é mg de micélio seco/g meio sólido seco na fermentação em estado sólido, f_c é μg de ergosterol/mg micélio seco, obtido da fermentação submersa e *P* é μg de ergosterol/g meio sólido fermentado seco, obtido na fermentação em estado sólido.

4.7.1 Fermentação submersa

Para a fermentação submersa, que foi realizada de acordo com Silva; Machuca; Milagres (2005), foram esterilizados (120 °C/40min) meios contendo 50 mL de meio nutriente composto por 2% de extrato de malte, em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Os meios foram inoculados com inóculo micelial (1 mm de diâmetro) tomado da margem de uma colônia em agar extrato de malte 2%. A produção de massa micelial e a quantidade de

ergosterol foram determinadas após obtenção do micélio por filtração em papel de filtro (Whatman No. 1). A biomassa foi determinada por peso seco. O experimento foi realizado em triplicata. O micélio foi analisado e o conteúdo de ergosterol foi expresso em microgramas por miligramas de micélio seco (f_c).

4.7.2 Determinação de ergosterol

Para determinação do conteúdo de ergosterol, que foi realizada de acordo com Silva; Machuca; Milagres (2005), 20 mg de micélio fúngico da fermentação submersa foram tratados com 2 mL de metanol e 0,5 mnL de NaOH 2 mol/L em tubos com rosca. Os tubos foram colocados em forno microondas doméstico operando a potência média por 18 segundos. Após resfriamento por 15 minutos, os tubos foram novamente irradiados por 17 segundos. Após resfriamento, o conteúdo foi neutralizado com HCl 1 mol/L, agitados vigorosamente em vortex e o ergosterol foi extraído com hexano (3 x 2 mL) que foi posteriormente evaporado sob fluxo de nitrogênio. Os resíduos foram adicionados de metanol até volume final de 200 μL antes da análise em HPLC. As amostras foram filtradas (0,22 μm) e 20 μL foram usados para a análise. Uma bomba Dionex P680 foi ajustada à coluna de fase reversa Dionex 201SP C18 e ao detector UV a Abs 282 nm. A amostra foi eluída com 100% metanol a 1,0 mL/min. A concentração de ergosterol presente na amostra foi determinada através de uma curva de calibração construída com solução padrão de ergosterol (Sigma). As concentrações de ergosterol foram expressas como microgramas de ergosterol por miligrama de micélio fúngico seco e microgramas de ergosterol por gramas de meio sólido.

4.8 Determinação de toxinas no extrato enzimático

A análise de micotoxinas foi realizada pelo Laboratório de Micotoxinas do departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição da Esalq-USP. As toxinas analisadas foram: Aflatoxina B1, B2, G1 e G2; Ocratoxina A e Zearalenona.

4.9 Caracterização das atividades coagulante e proteolítica do extrato enzimático bruto

4.9.1 Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade enzimática

O extrato enzimático obtido da fermentação foi armazenado durante 10 semanas a 7°C, com adição de 0,2% de azida sódica para prevenir crescimento microbiano, e a –20°C. A cada semana foram determinadas as reações enzimáticas para determinar a estabilidade da enzima durante a estocagem.

4.9.2 pH e temperatura ótimos

Para determinação do pH ótimo, a atividade coagulante foi determinada a 35°C em diferentes valores de pH utilizando soluções tampão 0,2 M: acetato (5,7 a 6,0); Mes (5,8 a 6,9) e Taps (7,3). A atividade proteolítica foi determinada a 35°C em diferentes valores de pH utilizando soluções tampão 0,2 M: acetato (3,5 a 5,5); Mes (5,5 a 7,0) e Taps (7,5 a 9,5).

A temperatura ótima para as atividades coagulante e proteolítica foi determinada incubando-se a mistura da reação em diferentes temperaturas (30 a 75°C, com variação de 5°C) no pH determinado como ótimo.

4.9.3 pH e temperatura de estabilidade

Para determinação do pH de estabilidade, a enzima foi dispersa (1:1) em soluções tampão 0,2 M: acetato (3,5 a 5,5); Mes (5,5 a 7,0) e Taps (7,5 a 9,5) e mantida a 25°C por 24 horas. Após esse período, foram tomadas as amostras de cada pH para ensaiar as atividades coagulante e proteolítica residuais, nas condições ótimas de pH e a 35°C.

A temperatura de estabilidade da enzima foi determinada incubando-se a enzima em diferentes temperaturas (35 a 80°C, com variação de 5°C) por uma hora. Após a incubação as atividades coagulante e proteolítica residuais foram medidas nas condições ótimas de pH e a 35°C.

4.9.4 Efeito da concentração de $CaCl_2$ na coagulação do leite

O efeito da concentração de $CaCl_2$ na coagulação do leite foi determinado como descrito no item 4.4, porém utilizando concentrações crescentes de cloreto de cálcio (0; 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 M).

4.9.5 Efeito de inibidores na atividade enzimática

A 0,2 mL de extrato enzimático foram adicionados diferentes inibidores específicos de protease incluindo inibidor de serino-proteases (fluoreto de fenilmetilsulfonila, PMSF, 10 mM), inibidor de metalo-proteases (ácido etilenodiaminotetraacético, EDTA, 10 mM), inibidor de proteases aspárticas (Pepstatin A, 20 μM) e inibidor de cisteíno-proteases (E-64, 10 μM). As amostras foram incubadas a 35°C por 10 minutos e as atividades coagulante e proteolítica residuais foram determinadas e comparadas ao controle, que foi incubado na ausência dos inibidores e que corresponde a 100% de atividade.

4.9.6 Monitoramento da atividade proteolítica durante degradação da caseína: hidrólise de solução de leite e eletroforese

A hidrólise enzimática foi realizada de acordo com Merheb et al. (2007), com pequenas modificações. Adicionou-se 0,1 mL de solução enzimática, com atividade coagulante específica de 38,6 U/mg proteínas, a 0,9 mL de solução 10% (p/v) de leite em pó

desnatado em $CaCl_2$ 0,01 M. As misturas foram incubadas a 35°C por diferentes tempos (2, 5, 10, 30 e 60 minutos) e ao final de cada período foram fervidas por 6 minutos para inativação enzimática. Após centrifugação (5.000 rpm/5 min) o precipitado foi utilizado para monitorar a proteólise: incubou-se 20 mg do precipitado em tubos eppendorf com 0,4 mL de tampão Tris-HCl 0,062 M pH 6,7 contendo 42% de uréia (p/v) a 37°C por 1 hora. Ao final desse período foram adicionados 10μL de β-mercaptoetanol e reincubou-se por mais 45 minutos e finalmente adicionou-se uma gota de azul de bromofenol (SHALABI; FOX, 1987). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia (uréia-PAGE), de acordo com Shalabi; Fox (1987), a 80 V e os géis foram corados "*overnight*" com *Coomassie Brilliant Blue G-250* e descorados com solução de metanol/ácido acético/água 3:1:6.

4.10 Purificação da protease coagulante

4.10.1 Concentração

A concentração da amostra foi realizada empregando-se métodos de precipitação protéica, utilizando-se sal (sulfato de amônia) ou solventes orgânicos (etanol ou acetona).

No caso do emprego de sal, a solução enzimática acrescida de sulfato de amônio foi deixada em repouso por aproximadamente 12 horas, a 4ºC. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 10000 rpm / 20 minutos, a 2 ºC e o precipitado, ressuspendido em tampão acetato 50 mM, pH 4,5 e dialisado em membrana de celulose no mesmo tampão durante 24 horas, com agitação a 4ºC.

No caso do emprego de solventes orgânicos, procedeu-se como descrito acima, porém sem a etapa de diálise.

4.10.2 Cromatografias

A enzima concentrada foi submetida à cromatografia de filtração em gel utilizando resinas Sephadex G75 ou G50 (Pharmacia) em coluna aberta (100 m x 3 cm) da Pharmacia, contendo 600 mL de resina equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 4,5. A enzima foi eluída com o mesmo tampão, com um fluxo de 0,3 mL/min. Amostras de 4,0 mL do líquido eluído foram coletadas, em tubos, utilizando o coletor de frações 2110 Fraction Collector (Bio Rad). Em todos os tubos foram dosadas as AP e AC e fez-se a leitura a 280 nm.

As frações que apresentaram AC foram combinadas e submetidas à cromatografia de troca iônica utilizando resina Q Sepharose (Pharmacia) em coluna aberta (10 cm x 0,5 cm), contendo 2 mL de resina equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 4,0. A eluição foi realizada usando um gradiente escalonado de NaCl (0 - 0,35 M) em tampão acetato 50 mM, pH 4,0, a 0,26 mL/min. Amostras de 1,0 mL do líquido eluído foram coletadas, em tubos, utilizando o coletor de frações 2110 Fraction Collector (Bio Rad). Em todos os tubos foram dosadas as AP e AC e fez-se a leitura a 280 nm. As frações que apresentaram AC foram combinadas e dialisadas em membrana de celulose em tampão acetato 50 mM pH 4,5 durante 48 horas, com agitação a 4ºC.

Após cada etapa de purificação determinaram-se as AP e AC e o teor de proteína nas frações combinadas para estabelecer rendimento e fator de purificação, como descrito a seguir:

$$\text{Rendimento AC} = \text{AC}_{\text{etapa}} / \text{AC}_{\text{extrato bruto}} \times 100$$

$$\text{Fator purificação AC} = \text{AC específica}_{\text{etapa}} / \text{AC específica}_{\text{extrato bruto}}$$

$$\text{Rendimento AP} = \text{AP}_{\text{etapa}} / \text{AP}_{\text{extrato bruto}} \times 100$$

$$\text{Fator purificação AP} = \text{AP específica}_{\text{etapa}} / \text{AP específica}_{\text{extrato bruto}}$$

4.10.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras dos extratos bruto e concentrado e as coletadas após as cromatografias foram analisadas por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas por fervura a 100°C por 5 minutos em tampão de amostra composto por tris-HCl

0,1 M, pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, DTT a 0,1M e azul de bromofenol a 0,001 M. O gel concentrador foi preparado na concentração de 4% e o gel fracionador na concentração de 12% como indicado em Sambrook e Russel (2001). Para a revelação do gel foi utilizado o método com reagente de prata de acordo com Blum et al. (1987).

4.11 Caracterização das atividades coagulante e proteolítica da enzima purificada

4.11.1 pH e temperatura ótimos

Para determinação do pH ótimo, a atividade coagulante foi determinada a 35°C em diferentes valores de pH utilizando soluções tampão 0,2 M: acetato (5,3 a 5,8); Mes (6,1 a 6,8) e Taps (7,0 a 8,8). A atividade proteolítica foi determinada a 35°C em diferentes valores de pH utilizando soluções tampão 0,2 M: acetato (3,5 a 5,5); Mes (5,5 a 7,0) e Taps (7,5 a 9,5).

A temperatura ótima para as atividades coagulante e proteolítica foi determinada incubando-se a mistura da reação em diferentes temperaturas (30 a 75°C, com variação de 5°C) no pH determinado como ótimo.

4.11.2 pH e temperatura de estabilidade

Para determinação do pH de estabilidade, a enzima foi dispersa (1:1) em soluções tampão 0,2 M: acetato (3,5 a 5,5); Mes (5,5 a 7,0) e Taps (7,5 a 9,5) e mantida a 25°C por 24 horas. Após esse período, foram tomadas as amostras de cada pH para ensaiar as atividades coagulante e proteolítica residuais, nas condições ótimas de pH e a 35°C, e foram comparadas às atividades coagulante e proteolítica controle, que foram determinadas com a enzima sem ter sofrido tratamento e que correspondem a 100% de atividade.

A temperatura de estabilidade da enzima foi determinada incubando-se a enzima em diferentes temperaturas (30 a 75°C, com variação de 5°C) por uma hora. Após a incubação as

atividades coagulante e proteolítica residuais foram medidas nas condições ótimas de pH e a 35°C, e foram comparadas às atividades coagulante e proteolítica controle, que foram determinadas com a enzima sem ter sofrido tratamento e que correspondem a 100% de atividade.

4.11.3 Efeito da concentração de $CaCl_2$ na coagulação do leite

Realizado com descrito no item 4.9.4.

4.11.4 Efeito de NaCl, surfactantes, íons metálicos e inibidores de protease na atividade enzimática

O efeito de NaCl sobre a atividade coagulante foi investigado utilizando diferentes concentrações do sal (0; 0,25; 0,5; 1 e 3%) na mistura de reação. Também foi investigado o efeito de alguns surfactantes (Tween 20, Tween 80, Triton X100 e SDS) todos na concentração de 0,5% sobre a atividade coagulante além de outros compostos como uréia e β-mercaptoetanol A atividade coagulante foi determinada e comparada ao controle, que foi incubado na ausência dos agentes e que corresponde a 100% de atividade.

O efeito de vários íons metálicos divalentes (5 e 10 mM) na atividade coagulante foi estudado utilizando diferentes sais incluindo $MnCl_2$, $MgCl_2$, $BaCl_2$, $HgCl_2$, $CaCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, $ZnCl_2$, AgCl. As amostras foram incubadas por 5 minutos, à temperatura ambiente, e a atividade coagulante foi determinada e comparada ao controle, que foi incubado na ausência dos íons e que corresponde a 100% de atividade.

No intuito de classificar a protease, a 0,2 mL de extrato enzimático foram adicionados diferentes inibidores específicos de protease incluindo inibidor de serino-proteases (fluoreto de fenilmetilsulfonila, PMSF, 10 mM), inibidor de metalo-proteases (ácido etilenodiaminotetraacético, EDTA, 10 mM) e inibidor de proteases aspárticas (Pepstatin A, 20 μM). As concentrações utilizadas foram de acordo com instruções do fabricante (Sigma) para este tipo de análise. As amostras foram incubadas a 35°C por 10 minutos e as atividades

coagulante e proteolítica residuais foram determinadas e comparadas ao controle, que foi incubado na ausência dos inibidores e que corresponde a 100% de atividade.

4.11.5 Cinética enzimática

Para a determinação do parâmetro cinético K_m, a atividade proteolítica da enzima purificada foi analisada em diferentes concentrações de caseína variando de 0,025 a 0,55%. A constante cinética foi determinada por regressão não linear usando como modelo a equação descrita por Michaelis-Menten no programa GraFit 5.0 (LEATHERBARROW, 1992).

O efeito da concentração de substrato também foi estudado para a atividade coagulante, variando-se a concentração de leite de 0,4 a 14%.

4.11.6 Ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico da enzima foi determinado através de focalização isoelétrica (IEF-PAGE), utilizando o sistema Ettan IPGphor II (Amersham Bioscience), conduzida em tiras contendo gradiente imobilizado de pH linear de 3,0 a 10,0 em gel de poliacrilamida (Amersham Bioscience) contendo Pharmalito 0,5%, de acordo com as instruções do fabricante. Após a IEF, as tiras foram submetidas à segunda dimensão em eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli, (1970). Para a revelação do gel foi utilizado o método com reagente de prata de acordo com Blum et al. (1987).

4.11.7 Monitoramento da atividade proteolítica durante degradação da caseína: hidrólise de solução de leite e eletroforese

Realizado como descrito no item 4.9.6.

4.11.8 Monitoramento da atividade proteolítica durante a degradação das caseínas: hidrólise enzimática da caseína e RP-HPLC

A hidrólise e as análises em RP-HPLC foram realizadas de acordo Gallagher; Kanekanian; Evans (1994), com algumas modificações. Uma solução 2% de caseína (Sigma) em tampão acetato 50 mM pH 5,5 foi submetida à hidrólise a 35 °C, que foi iniciada pela adição de 0,1 mL de solução enzimática a 0,9 mL da solução de substrato. As soluções enzimáticas (*T. indiae-seudaticae* N31 e *Rhizomucor meihei* – Hannnilase, Chr-Hansen) foram padronizadas para a mesma atividade coagulante (3 min) pelo método descrito no item 4.4. A reação foi paralisada ao final de 1 hora através de fervura por 6 min. Uma alíquota foi filtrada em filtros de 0,22 μm antes das análises de HPLC para remover qualquer material protéico particulado nos hidrolisados. Para as análises de HPLC, uma bomba Dionex P680 foi ajustada à coluna de fase reversa Dionex 201SP C_{18} (4,6 x 250 mm, 5 μm) e ao detector UV a Abs 220 nm para detecção dos peptídeos. Cada amostra (20 μL) foi injetada e eluída com 0,06% ácido trifluoracético (TFA)/água, a 0,7 mL/min. A concentração do modificador da fase móvel (0,056% TFA/metanol) foi aumentada linearmente de 0 a 91% por 100 min e mantido a 91% por mais 10 min.

4.12 Aplicação da enzima para produção de queijo Prato

Estes estudos foram realizados no laboratório de laticínios do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos sob orientação da Profª. Drª Ana Lúcia Barretto Penna.

4.12.1 Processo de produção e amostragem do queijo Prato

Os queijos foram fabricados a partir de 15 L de leite pasteurizado tipo B (Laticínio Saboroso, São José do Rio Preto-SP), de acordo com o método de Silva (1998), conforme fluxograma descrito na Figura 5 em recipientes de aço inox, com a utilização dos seguintes coadjuvantes técnicos: c*oagulante:* para a coagulação do leite utilizou-se coagulante comercial Ha-la, fornecido pela Chr Hansen (Processo H) e o extrato enzimático do *T. indicae-seudaticae* N31 (Processo T); a quantidade das enzimas adicionadas foi padronizada pelo tempo de coagulação de aproximadamente 45 minutos; corante: foram utilizados 1,05 mL de corante vegetal comercial extraído do urucum; *cultura lática:* foram utilizados 12 mL de cultura lática: *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (LL50 A); c*loreto de cálcio:* foram utilizados 7,5 ml de cloreto de cálcio em solução a 50%; á*cido sórbico:* foi utilizada solução de ácido sórbico (1,8 g em 90 ml de água destilada), fornecido pela Clariant S.A., como conservante, conforme permitido pela legislação; c*loreto de sódio:* a salmoura foi preparada com cloreto de sódio comercial em concentração de 18%, seguida de pasteurização por 72ºC por 4 minutos. Em seguida foi resfriada e filtrada em dessorador e o pH ajustado para 5,2.

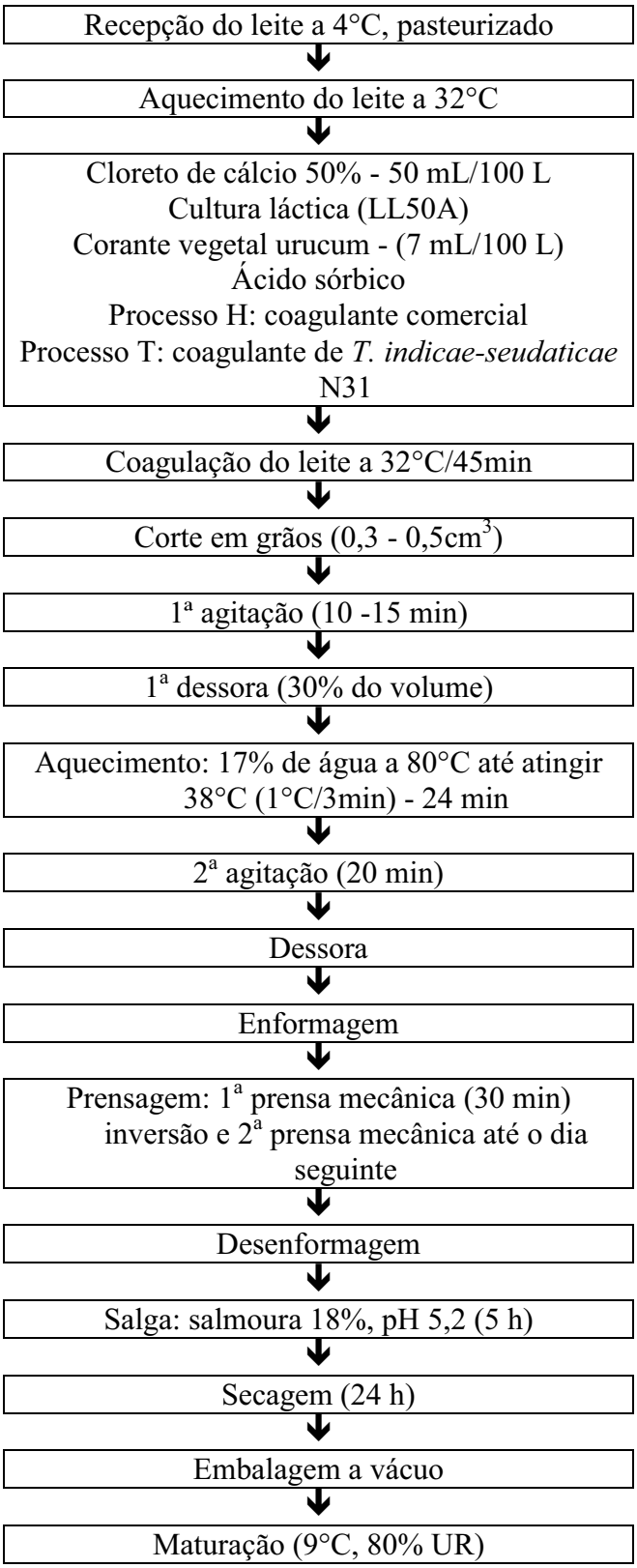


Figura 5. Fluxograma do processo de fabricação dos queijos. Adaptado de Garcia et al. (2009).

Como mostra a Figura 6, foram realizados dois processos, um utilizando coagulante comercial que foi usado como processo controle e outro substituindo o coagulante comercial pela protease coagulante de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. Duas réplicas foram realizadas, A e B, com lotes diferentes de leite integral tipo B e um queijo produzido com cada tipo de coagulante foi tomado ao acaso para as análises com 1, 15, 30, 45 e 60 dias de fabricação, totalizando 20 queijos. Os queijos foram triturados e homogeneizados para realização das análises de caracterização físico-química.

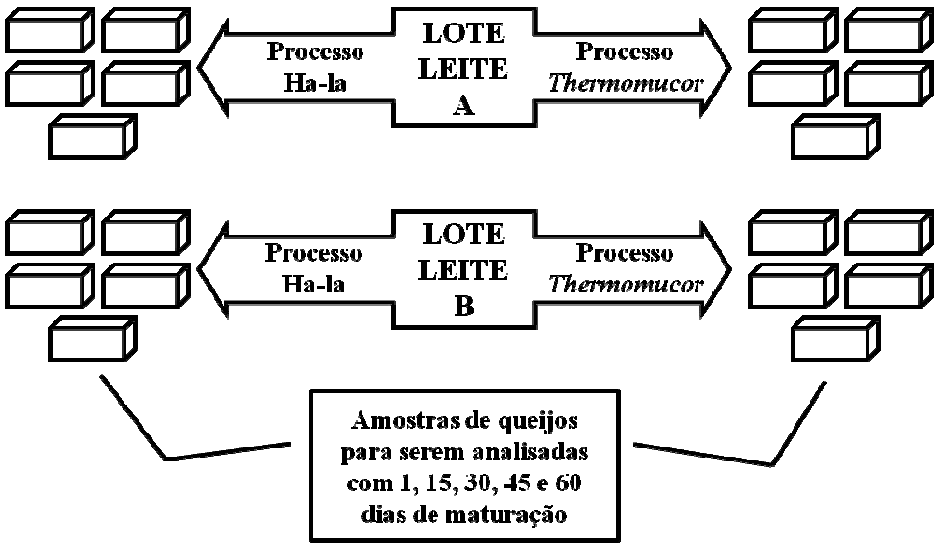


Figura 6. Esquema mostrando os processamentos dos queijos Prato.

4.12.2 Rendimento

O rendimento de cada queijo (controle e com protease coagulante) foi estimado em litros de leite necessários para a elaboração de um quilo de queijo (L/kg) (NEVES-SOUZA; SILVA, 2005).

4.12.3 Análises físico-químicas

Para a caracterização do leite pasteurizado tipo B utilizado na fabricação dos queijos foram feitas análises físico-químicas, em triplicata, no aparelho Ekomilk milk analyser Milkana Kam 98-2A que fornece resultados de teor de gordura, proteína, sólidos totais, densidade, água e ponto de congelamento.

Para caracterização das amostras de queijos foram realizadas as seguintes análises físico-químicas, em triplicata: gordura pelo método de Gerber-Van Gulik (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985); acidez por titulação com NaOH 0,1 N (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985); umidade por secagem em estufa a vácuo a 70°C/24 h (CASE et al., 1985); cinzas por incineração em mufla a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985); sal (SERRES; AMARIGLIO; PETRANSXIENE, 1973); o pH foi medido através de leitura em pHmetro (SILVA et al., 1997). Para avaliação da proteólise, o teor de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de micro – Kjeldahl. O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o valor de NT por 6,38 (AOAC, 1997). O teor de nitrogênio não caseico (NNC), representado pelo nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS-pH 4,6), foi determinado pela dosagem do nitrogênio total no filtrado obtido após a precipitação isoelétrica das caseínas (SILVA et al., 1997). O teor de nitrogênio não protéico (NNP), representado pelo nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS-TCA 12%), foi determinado pela dosagem de nitrogênio total no filtrado obtido após precipitação das proteínas em presença de ácido tricloroacético (TCA) 12% (SILVA et al., 1997). Os índices de extensão da maturação (IEM) e de profundidade da maturação (IPM) foram expressos como porcentagem do nitrogênio total da seguinte maneira: %IEM = NNC/NTx100 e %IPM = NNP/NTx100, respectivamente (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

4.12.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida-uréia (uréia-PAGE)

A proteólise dos queijos maturados foi monitorada como descrito por Shalabi; Fox (1987) da seguinte maneira: 20 mg de cada amostra de queijo foi incubada em 0,4 mL de tampão Tris-HCl 0,062 M pH 6,7 contendo 42% de uréia (p/v) a 37°C por 1 hora. Ao final desse período foram adicionados 10 μL de β-mercaptoetanol e incubou-se novamente por

mais 45 minutos e finalmente adicionou-se uma gota de azul de bromofenol e glicerina. Essas amostras tratadas foram então submetidas à eletroforese utilizando um sistema vertical Mini Protean 3 Cell (Bio Rad). A uréia-PAGE foi realizada a voltagem constante de 80V utilizando Tris-glicina 0,046 M pH 6,7 como tampão de corrida. Os géis foram corados *overnight* com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorados com solução de metanol/ácido acético/água 3:1:6.

4.12.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa (RP-HPLC)

O extrato solúvel em água dos queijos foi preparado de acordo Kuchroo; Fox (1982). As amostras de queijo foram liofilizadas para eliminar possíveis interferências causadas por diferenças no conteúdo de umidade. Homogeneizou-se 1 parte de queijo para 2 partes de água destilada por 5 minutos em Stomacher. A solução resultante foi mantida a 40°C por 1h. Para obter as frações de nitrogênio solúveis em pH 4,6 utilizou-se HCl 1 N para ajustar o pH da solução para 4,6. As amostras foram então centrifugadas a 3,300x *g* por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro e, em seguida, em papel Whatman n°1 e assim obteve-se a fração nitrogenada solúvel em pH 4,6. As amostras foram liofilizadas para posterior análise de RP-HPLC.

As análises de RP-HPLC foram realizadas de acordo com Baldini (1998). Uma bomba Dionex P680 foi ajustada à coluna de fase reversa Dionex 201SP C_{18} (4,6 x 250 mm, 5 μm) e ao detector Jasco UV-975 a Abs 214 nm para detecção dos peptídeos. Os solventes utilizados foram: A: ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% (v/v) em água; B: TFA a 0,1% (v/v) em acetonitrila grau HPLC. Uma alíquota de 10 mg de amostra liofilizada foi dissolvida em 1 mL de A, centrifugada a 13.000 rpm/20 min, filtrada (0.22 μm) e 20 μL foram injetados e inicialmene eluídos com 100% A e então, com um gradiente linear de 0 a 50% de B por 55 min, seguido por gradiente linear de 60% B por 4 min e finalmente com 60% B por 3 min. O fluxo foi mantido a 0,75 mL/min.

4.12.6 Capacidade de derretimento (CD)

A capacidade de derretimento foi determinada pelo método de Schreiber conforme descrito por Kosikowski; Mistry (1997), sendo realizadas cinco repetições, após 1, 30 e 60 dias de maturação.

O teste consistiu em retirar, da peça de queijo, fatias de 3,6 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura. Cada fatia é colocada em uma placa de petri, devidamente dividida em 8 áreas iguais através de diâmetros. Foram medidos 4 diâmetros de cada amostra (D_i) e então, as placas foram dispostas em estufa a 130°C por 10 min (NONOGAKI; MONTEIRO; GIGANTE, 2007), de acordo com a Figura 7. Posteriormente, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 min e mediu-se novamente os diâmetros de cada amostra (D_f). A capacidade de derretimento é expressa pelo aumento do diâmetro da fatia de queijo após a aplicação do teste e é calculada de acordo com a seguinte equação: $CD\ (\%) = (D_f - D_i / D_i) \times 100$. A capacidade de derretimento de cada queijo é dada pela média dos valores de CD das 5 fatias de cada amostra.

Figura 7. Esquema ilustrando a análise de derretimento. Adaptado de Spadoti et al. (2003b).

4.12.7 Medidas de propriedades de textura

A analise do perfil de textura (TPA) dos queijos foi avaliada após 1, 30 e 60 dias de maturação utilizando-se o texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems). Duas amostras de cada queijo foram cortadas em formato cilíndrico (2,5 cm de diâmetro; 2,0 cm de altura). O procedimento adotado foi o de dupla compressão, utilizando-se um cilindro de acrílico (probe) de 4,5 cm de diâmetro, com velocidade de deslocamento de 2,0 mm/s e distância percorrida de 6,0 mm. Foram determinados os parâmetros: dureza, elasticidade, coesividade, mastigabilidade, gomosidade e adesividade (GONZÁLEZ et al., 1998).

4.12.8 Análise estatística

Para estabelecer diferenças estatísticas para os dados das análises físico-químicas, capacidade de derretimento e TPA de acordo com o tipo de coagulante utilizado, o tempo de maturação e a interação entre esses fatores (tratamentos x tempo), os dados foram avaliados através do programa ESTAT (Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0, Departamento de Ciências Exatas, UNESP, Jaboticabal), abrangendo a análise descritiva dos dados pela análise de variância do teste F e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5. Resultados e Discussão

5.1 Produção do extrato enzimático

A Tabela 1 mostra os resultados referentes à produção das atividades enzimáticas pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 durante 8 dias de fermentação em estado sólido em meios contendo farelo de trigo e farelo de trigo com caseína. O microrganismo foi capaz de se desenvolver em condições estacionárias e secretar extracelularmente as enzimas proteolíticas,

em curto período de tempo (24 horas), mostrando-se então promissor para este processo fermentativo.

Tabela 1. Produção de atividades coagulante e proteolítica, razão entre as atividades (R) e conteúdo de proteína durante o período de fermentação do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em meios contendo farelo de trigo (FT) e farelo de trigo com caseína (FTC).

Tempo (dias)	FT				FTC			
	AC (U/mL)	AP (U/mL)	R	Proteína (mg/mL)	AC (U/mL)	AP (U/mL)	R	Proteína (mg/mL)
1	160,3 ± 11,8	2,1 ± 0,1	76	3,3 ± 0,4	1676 ± 0,0	2,6 ± 0,1	64	10,7 ± 0,4
2	145,6 ± 1,2	1,9 ± 0,2	77	2,3 ± 0,5	134,4 ± 2,5	2,3 ± 0,2	58	8,5 ± 0,9
3	80,2 ± 1,6	1,3 ± 0,1	62	1,6 ± 0,4	93,7 ± 5,4	1,6 ± 0,1	59	8,2 ± 0,3
4	46,4 ± 3,4	0,7 ± 0,2	66	1,3 ± 0,6	44,7 ± 0,6	1,0 ± 0,3	45	6,9 ± 1,2
5	49,3 ± 0,7	0,6 ± 0,0	82	1,3 ± 0,5	100,0 ± 23,6	1,3 ± 0,2	77	7,2 ± 0,4
6	67,6 ± 1,3	1,0 ± 0,0	68	1,3 ± 0,3	85,2 ± 4,2	1,5 ± 0,3	57	5,8 ± 1,2
7	45,4 ± 4,9	0,7 ± 0,1	65	1,3 ± 0,2	69,4 ± 9,5	1,1 ± 0,3	63	6,0 ± 1,1
8	55,6 ± 3,2	0,6 ± 0,3	93	1,0 ± 0,6	45,9 ± 1,1	0,8 ± 0,2	57	5,4 ± 1,3

AC: Atividade Coagulante, AP: Atividade Proteolítica, R: AC/AP

A caseína foi adicionada com a intenção de induzir a produção de maior quantidade das atividades, mas os valores obtidos mostraram que o farelo de trigo por si só foi um bom substrato para a produção de atividade coagulante (aproximadamente 160 UAC/mL) e que a adição da caseína não aumentou significativamente a atividade (aproximadamente 168 UAC/mL). Bons resultados utilizando-se farelo de trigo também foram constatados por outros autores ao estudar outros fungos (ARIMA; YU; IWASAKI, 1970; FERNANDEZ-LAHORE et al., 1999; TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003; SHATA 2005; KUMAR et al. 2005)

De acordo com Abdel-Fattah; Mabrouk; El-Hawwary (1972), todas as enzimas proteolíticas conseguem coagular leite, mas o melhor agente desta ação, em função das características que proporciona, é a renina. A renina ou seu substituto adequado para produção de queijo são caracterizados por possuírem alta atividade coagulante e baixa atividade proteolítica. Sendo assim, investigou-se o padrão de produção das atividades coagulante e proteolítica nos extratos obtidos após fermentação pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 durante 8 dias no intuito de obter uma condição de produção de alta atividade coagulante e

baixa atividade proteolítica. A razão entre atividade coagulante e proteolítica (R) é usada como um índice para justificar a adequabilidade de um extrato enzimático para uso como substituto de coalho (HASHEM 1999) e quanto maior o seu valor, melhor. A Tabela 1 também mostra os resultados obtidos para as determinações de R durante o processo fermentativo. Nota-se que em todos os tempos de produção R foi maior que 1, ou seja, a atividade coagulante foi maior que a proteolítica e que os maiores valores de R para o meio FT ocorreram nos dias 1, 2, 5 e 8 e para FTC nos dias 1, 5 e 7.

5.2 Determinação do crescimento celular

Como o ergosterol tem sido sugerido para uso na quantificação de crescimento fúngico em substratos sólidos (NEWELL, 1994; SCHNÜRER, 1993), a determinação deste composto foi utilizada neste trabalho para estimar crescimento celular na FES.

O conteúdo de ergosterol (Sigma) foi calculado através de curva padrão construída com concentrações conhecidas de ergosterol, 5, 10, 50 100, 200, 500 μg/mL (Figura 8).

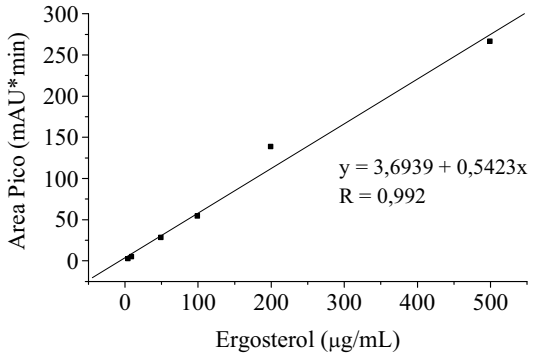


Figura 8. Curva padrão obtida com Ergosterol (Sigma).

O tempo de retenção do ergosterol varia muito (3,6 a 15 minutos) de acordo com o método cromatográfico utilizado, dependendo da fase, do tipo e dimensões da coluna, da fase móvel, do fluxo e da temperatura (GESSNER; NEWELL, 2002). O tempo de retenção deste composto na nossa análise em HPLC foi de aproximadamente 5 minutos.

Foi observado crescimento celular, com produção de 30 a 62 mg de biomassa, concomitantemente com produção de ergosterol, cujo conteúdo variou de 3,5 a 82 μg (Figura 9).

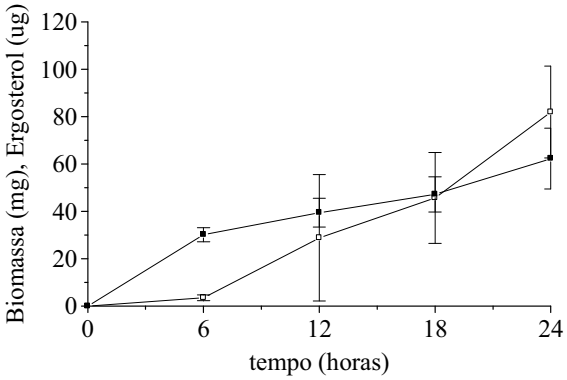


Figura 9. Biomassa fúngica (■), determinada por peso seco, e conteúdo de ergosterol (□) na fermentação submersa de *Thermomucor indicae seudaticae* N31.

A partir do cálculo do coeficiente de correlação entre o ergosterol e a biomassa (Figura 10), foi possível concluir que esses dois parâmetros se correlacionaram bem. O coeficiente R^2 de 0,87 ($P < 0,0002$), foi similar ao coeficiente encontrado por Silva; Machuca; Milagres (2005) ao estudar o crescimento de *Lentinula edodes*, e a tangente da regressão na Figura 10 indica a média do conteúdo de ergosterol total de 2,03 μg/mg de biomassa para o *T. indicae seudaticae* N31, o que está próximo à faixa de concentração de ergosterol para outros fungos descritos na literatura como 2,6-5,1 μg/mg para espécies de solo e plantas (MONTGOMERY et al., 2000) e 0,35-2,2 μg/mg para espécies de hifomicetos aquáticos (BERMINGHAM; MALTBY; COOKE, 1995).

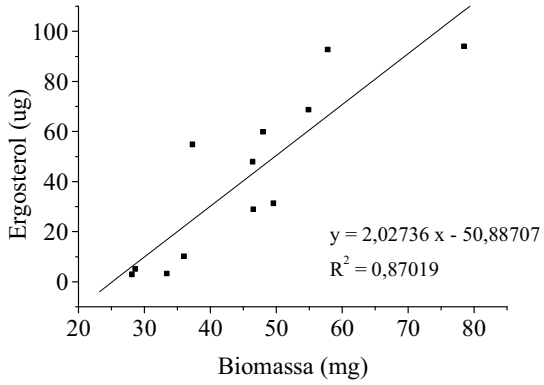


Figura 10. Regressão linear para conteúdo de ergosterol total versus biomassa seca total obtidos na fermentação submersa de *Thermomucor indicae seudaticae* N31.

O conteúdo de ergosterol foi determinado nas fermentações em estado sólido. A análise de ergosterol detectou a presença do fungo logo nas primeiras 24 horas após o inóculo. Como mostrado na Tabela 2, na fermentação com farelo de trigo, o conteúdo de ergosterol variou de 44,44 a 98,59 μg/g meio sólido e na fermentação com farelo de trigo e caseína, o conteúdo variou de 61,17 a 165,57 μg/g meio sólido. No trabalho de Silva; Machuca; Milagres (2005), foram encontrados valores de ergosterol entre 4,3 a 82,9 μg/g meio sólido em fermentações em estado sólido de 9 linhagens de *Lentinula edodes* por 30 dias em resíduo de eucalipto e farelo de arroz com 70% de umidade. Nout et al. (1987) encontraram valores de ergosterol de 420, 1940 e 3230 μg/g meio sólido em 24, 48 e 72 horas de fermentações em estado sólido de *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 em resíduo de soja, mostrando que existe variação do conteúdo de ergosterol durante a fermentação dependendo do tipo de fungo e do tempo de cultivo.

Tabela 2. Conteúdo de ergosterol e biomassa na fermentação em estado sólido de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 em meios contendo farelo de trigo (FT) e farelo de trigo com caseína (FTC).

Dia	FT		FTC	
	Ergosterol (μg/g meio sólido)	Biomassa (mg/g meio sólido)	Ergosterol (μg/g meio sólido)	Biomassa (mg/g meio sólido)
1	44,44 ± 2,25	21,92 ± 1,11	76,78 ± 7,15	37,87 ± 3,52
2	52,30 ± 9,38	25,80 ± 4,63	66,87 ± 16,86	32,99 ± 8,32
3	61,40 ± 16,37	30,28 ± 8,07	61,17 ± 2,14	30,18 ± 1,06
4	77,76 ± 0,41	38,36 ± 0,21	126,11 ± 41,27	62,21 ± 2,54
5	58,76 ± 0,00	28,98 ± 0,00	165,57 ± 30,85	81,67 ± 15,22
6	66,18 ± 9,43	32,65 ± 4,66	113,48 ± 34,56	55,97 ± 7,69
7	81,78 ± 9,01	40,34 ± 4,45	115,04 ± 11,34	56,74 ± 5,60
8	98,59 ± 8,08	48,63 ± 3,99	148,19 ± 13,42	73,10 ± 6,62

Com os valores de ergosterol na fermentação em estado sólido e conhecendo o valor de f_c para o *T. indicae seudaticae* N31 (2,03 μg de ergosterol/mg de biomassa) foi possível encontrar os valores de biomassa na fermentação em estado sólido, como mostra a Tabela 2. Na fermentação com farelo de trigo, a biomassa variou de 21,92 a 48,63 mg/g meio sólido e na fermentação com farelo de trigo e caseína, variou de 30,18 a 81,67 mg/g meio sólido.

A Figura 11 mostra a produção de biomassa fúngica junto com a produção de atividade coagulante pelo *T. indicae seudaticae* N31 na fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato. Observa-se que há aumento da biomassa até o quarto dia onde, no mesmo período, verifica-se queda da atividade coagulante. Como o pico de produção da enzima foi com 1 dia de fermentação, o fungo deve ter se desenvolvido nas primeiras 24 horas e secretado grande quantidade de enzima que possibilitou seu rápido crescimento posterior. Após o quarto dia, houve uma queda na biomassa e constância na produção da enzima. No quinto dia o fungo voltou a crescer e também a liberar mais enzima.

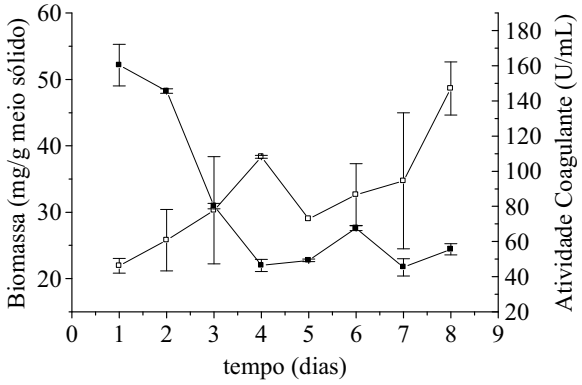


Figura 11. Conteúdo de biomassa (□) de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 e de atividade coagulante (■) na fermentação em estado sólido utilizando 100% farelo de trigo como substrato.

Os desvios-padrões da biomassa (Figura 11 e 12) representam as variações que podem existir no conteúdo de ergosterol em cada erlenmeyer durante a fermentação. Alguns fatores responsáveis pelas variações são idade, taxa de crescimento, disponibilidade de nutriente e carbono, temperatura e principalmente oxigênio, já que a síntese de ergosterol em fungos requer oxigênio molecular (GESSNER; NEWELL, 2002). Como o experimento foi realizado partindo-se do mesmo inóculo, com o mesmo meio de cultivo e na mesma estufa (mesma temperatura) sugere-se que as variações no conteúdo de ergosterol podem ter ocorrido por variações na concentração de O_2. Problemas de difusão de gás podem ocorrer em fermentações estáticas, que é o caso da fermentação em estado sólido. A porção de hifas fúngicas penetradas no substrato sólido pode estar privada de oxigênio (LONSANE et al., 1992) o que pode ter refletido nas variações de biomassa observadas durante a fermentação em estado sólido do *T. indicae seudaticae* N31 (Tabela 2, Figuras 11 e 12).

A Figura 12 mostra a produção de biomassa fúngica junto com a produção de atividade coagulante pelo *T. indicae seudaticae* N31 na fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo com caseína como substrato. Observa-se que o fungo também secretou grande quantidade de enzima no início do seu crescimento e que a produção da enzima acompanhou o desenvolvimento do fungo até o sétimo dia.

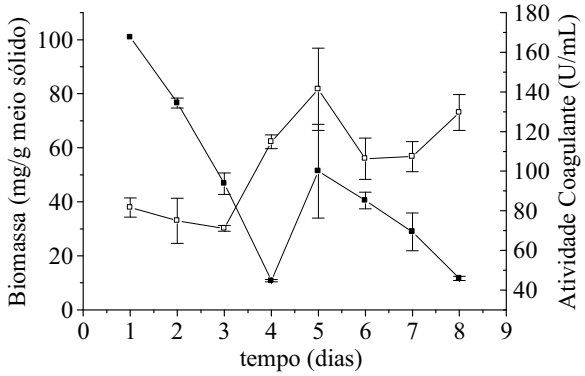


Figura 12. Conteúdo de biomassa (□) de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 e de atividade coagulante (■) na fermentação em estado sólido utilizando 80% farelo de trigo e 20% caseína como substrato.

A síntese e secreção de proteases são induzidas por peptídeos ou outros substratos protéicos (CAVALCANTI et al., 2005) como o farelo de trigo e a caseína. Dependendo da natureza e nível do peptídeo, a síntese e secreção de protease pode ser induzida ou reprimida (CAVALCANTI et al., 2005). Observa-se que o fungo exibiu um perfil de produção da enzima similar para os dois meios de fermentação: máxima produção no primeiro dia seguido de queda até o quarto dia, depois ele voltou a secretar a enzima, mais intensamente no meio com caseína, seguido de queda novamente após o sexto dia sendo que no meio com apenas farelo de trigo houve uma leve recuperação da produção no oitavo dia. Talvez a presença da caseína junto ao farelo de trigo tenha facilitado a oxigenação do meio possibilitando uma melhor utilização dos nutrientes pelo fungo, favorecendo seu crescimento.

Apesar de o *T. indicae-seudaticae* N31 ter crescido melhor no meio FTC do que no meio FT, o extrato enzimático obtido pela fermentação em FT em 24 horas apresentou alta atividade coagulante e baixa atividade proteolítica; menor conteúdo protéico do que o extrato correspondente obtido em FTC, o que será melhor para o processo de purificação enzimática; e a fermentação em FT é mais barata que FTC por não acarretar na adição da caseína, por isso essa condição de fermentação (meio FT / 24 horas) foi escolhida para produção do extrato enzimático para dar continuidade aos estudos de caracterização enzimática, purificação e aplicação.

5.3 Determinação de toxinas no extrato enzimático

De acordo com o laudo, apresentado no Anexo I, não foi verificada a presença das toxinas Aflatoxina B1, B2, G1 e G2; Ocratoxina A e Zearalenona.

5.4 Caracterização das atividades coagulante e proteolítica do extrato enzimático bruto

5.4.1 Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade enzimática

A inativação de enzimas durante a estocagem é um fator limitante para sua aplicação industrial. As Figuras 13 A e B mostram o efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade proteolítica e coagulante, a fim de obter mais conhecimento sobre o comportamento da enzima durante a estocagem.

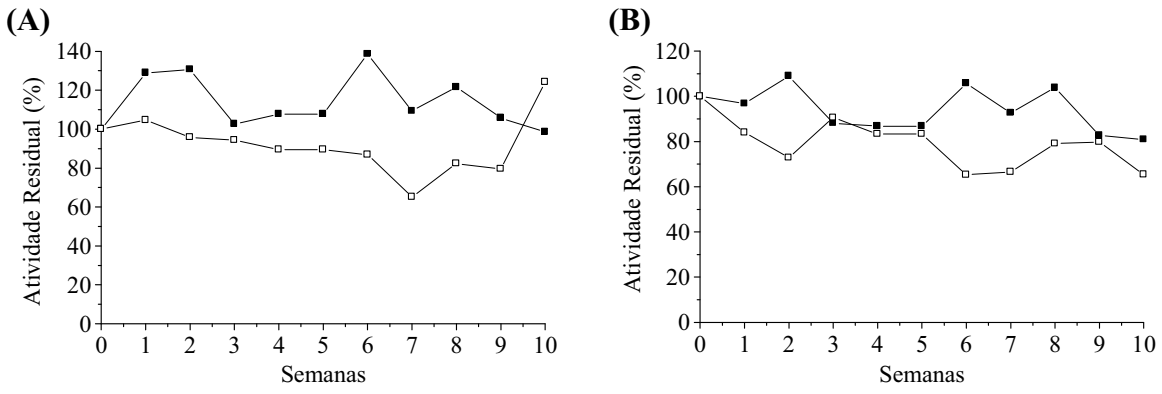


Figura 13. Efeito do armazenamento do extrato enzimático a 7°C **(A)** e a -20°C **(B)** sobre as atividades coagulante (■) e proteolítica (□). A atividade residual representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade no dia da extração (tempo zero).

Observa-se que as amostras conservadas em temperatura de refrigeração e congelamento, apresentaram algumas variações (no máximo 30%) nas atividades coagulante e proteolítica, mas permaneceram praticamente 100% ativas nas condições testadas mostrando

que ambas as temperaturas de armazenamento se mostraram adequadas para preservar a atividade coagulante, assegurando em torno de 100% a sua durabilidade por, no mínimo, 10 semanas. As variações podem refletir erros experimentais durante as dosagens das atividades.

Ainda assim, pode-se dizer que o armazenamento a 7°C foi o que melhor conservou as atividades enzimáticas e que ainda provocou aumento da atividade coagulante, talvez por ter ocorrido alguma mudança conformacional na molécula protéica causada pelo resfriamento facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. No caso do armazenamento a -20°C, provavelmente houve formação de cristais de gelo durante o congelamento que podem ter afetado a estrutura da proteína levando à menor conservação das AC e AP.

Nouani et al. (2009) (a) ao estudar a estabilidade da protease de *Cynara scolymus* e de *Ficus carica* encontraram que, quando armazenadas a 4°C, as enzimas perderam 80% de atividade coagulante com 20 dias de estocagem. A protease do *T. indicae-seudaticae* N31 apresentou praticamente 100% de atividade coagulante no mesmo período, sendo então mais estável.

5.4.2 pH e temperatura ótimos

A Figura 14A mostra o efeito do pH na atividade proteolítica. Nota-se um aumento na atividade a partir de pH 4,5 até atingir máxima taxa de reação em pH 5,5 e diminuição até pH 7,5. Houve um ligeiro aumento de atividade entre pH 7,5 e 9,0 talvez devido ao fato de a caseína, por ser um substrato protéico, também sofrer alguma modificação em seus grupos ionizáveis com a variação do pH nesses valores mais alcalinos, afetando sua interação com a enzima (GARCÍA et al., 2003). Além disso, esse segundo pico de atividade proteolítica pode indicar a presença de outra protease no extrato bruto, já que ele não aprece no gráfico de pH ótimo da enzima purificada (mostrado mais adiante na página 87), ou seja, essa outra protease foi eliminada durante o processo de purificação. Esse comportamento corresponde ao esperado, já que enzimas proteolíticas fúngicas (REED; NAGODAWITHANA, 1993) apresentam atividade máxima em valores de pH mais ácido, como a protease de *Thermoascus aurantiacus*, estudada por Merheb et al. (2007), que também apresentou pH ótimo em 5,5.

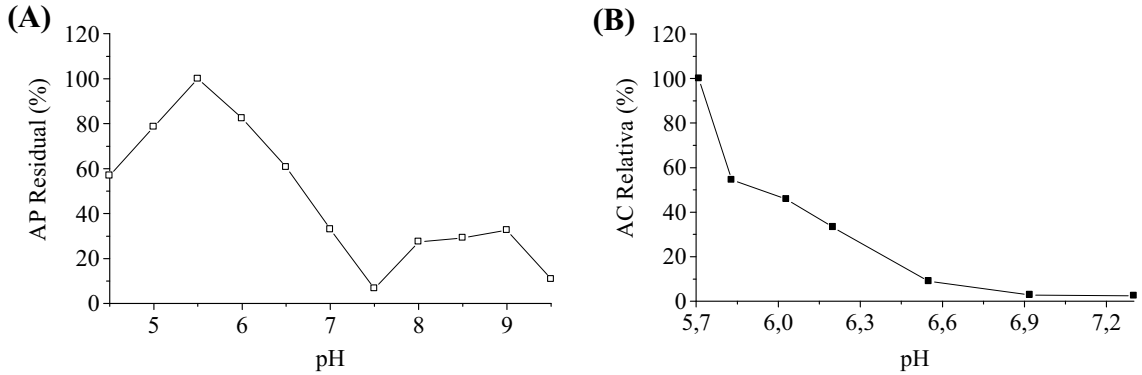


Figura 14. Efeito do pH sobre as atividades proteolítica **(A)** e coagulante **(B)** do extrato enzimático.

A Figura 14B mostra o efeito do pH na atividade coagulante. Nota-se máxima atividade em pH 5,7, seguido de queda até pH 7,3. Esse comportamento é interessante, pois enzimas empregadas comercialmente para promover a coagulação do leite são aspárticas, as quais são caracterizadas por serem mais ativas em pHs mais ácidos (LLORENTE; BRUTTI; CAFFINI, 2004) mas também costumam apresentar alta atividade em pH neutro (6.5) (ANDRÉN, 2002). Apresentaram comportamento similar ao extrato de *T. indicae-seudaticae* N31 o extrato bruto de *Mucor pusillus* var. *Lindt*, estudado por Arima; Yu; Iwasaki (1970), que exibiu coagulação do leite mais rápida em pH 5,5 e extremamente lenta em pH 7,0 e o extrato precipitado de *Penicillium citrinum*, estudado por Abdel-Fattah, Mabrouk, El-Hawwary (1972), que exibiu atividade ótima em pH 6,0.

A quimosina apresenta a mesma dependência em relação ao pH sendo mais fraca em condições alcalinas do que ácidas (Richardson; Nelson, 1967). O pH ótimo para atividade proteolítica geral da quimosina é de aproximadamente 4,0, mas ela apresenta alta atividade coagulante no pH do leite, 6,7 (ANDRÉN, 2002). Nossos resultados foram um pouco diferentes já que o extrato do *T. indicae-seudaticae* N31 exibiu baixa atividade coagulante em pH 6,7. Mas na maioria dos processos de produção de queijos é comum adicionar ao leite bactérias acido lácticas, conhecidas também como cultivos iniciadores, as quais são responsáveis por desenvolver acidez no leite, diminuindo o pH (ESTEVES et al., 2003), o que acarretaria num aumento da atividade coagulante do extrato do *T. indicae-seudaticae* N31.

A Figura 15 mostra o efeito da temperatura nas atividades coagulante e proteolítica. Observa-se que o extrato enzimático atingiu máxima atividade coagulante a 70°C e proteolítica a 65°C. Geralmente, o cálcio exerce um efeito ativador em enzimas (MEDYANTSEVA; VERTLIB; BUDNIKOV, 1998). Talvez a presença de cálcio do leite

durante a determinação da atividade coagulante tenha causado esse efeito na enzima, fazendo com que ela atingisse máxima atividade a 70°C, o que não ocorreu para atividade proteolítica, cuja determinação é realizada sem adição de cálcio.

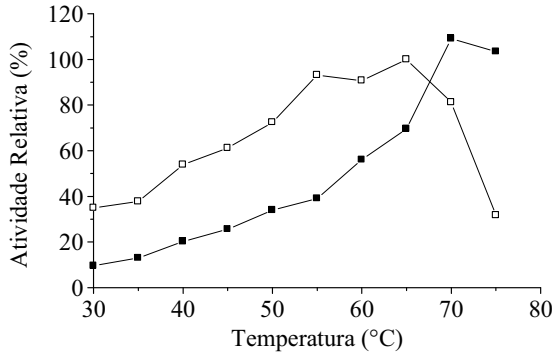


Figura 15. Efeito da temperatura sobre as atividades proteolítica (□) e coagulante (■) do extrato enzimático.

O extrato enzimático bruto dos fungos termofílicos *Thermoascus aurantiacus*, estudado por Merheb et al. (2007), e *Thermomyces lanuginosus*, estudado por Li; Yang; Shen (1997), também apresentaram atividade proteolítica ótima a temperaturas elevadas (60 e 70°C, respectivamente). A protease aspártica 'cynarase A' purificada da flor *Cynara scolymus* L., também apresentou atividade coagulante ótima a 70°C (SIDRACH et al. 2005). Já o extrato bruto de *Penicillium oxalicum*, pesquisado por Hashem (1999), o extrato precipitado de *Penicillium citrinum*, estudado por Abdel-Fattah, Mabrouk, El-Hawwary (1972) e a protease purificada de *Rhizopus oryzae*, no trabalho de Kumar et al. (2005), exibiram temperatura ótima para coagulação do leite a 60°C, temperatura na qual o extrato de *T. indicae-seudaticae* N31 apresentou apenas 50% de atividade.

5.4.3 pH e temperatura de estabilidade

A Figura 16A mostra a estabilidade do extrato enzimático frente a diferentes valores de pH. Observa-se que para a atividade coagulante não há uma ampla faixa de estabilidade, mas sim alta atividade residual de pH 3,5 a 4,5 e depois aproximadamente 75% de estabilidade entre 5,0 e 6,0. Resultado muito semelhante foi relatado por Channe; Shewale (1998), onde a atividade coagulante do extrato enzimático de *Aspergillus niger* MC4

apresentou máxima estabilidade em pH 4,0. Resultado parecido foi mostrado por Arima; Yu; Iwasaki (1970), ao estudar o extrato obtido de *Mucor pusillus* var. *Lindt*, o qual se mostrou mais estável em pH 5,0. Em outro estudo, esses autores também relataram estabilidade em faixa similar de pH para a renina de bezerro (ARIMA; YU; IWASAKI; TAMURA, 1968). A atividade proteolítica apresentou estabilidade somente entre pH 5,0 e 7,0 com aproximadamente 65-70% de atividade residual. Foi menos estável que a protease do *Thermoascus aurantiacus*, estudada por Merheb et al. (2007), que manteve alta estabilidade de pH 3,0 a 9,5.

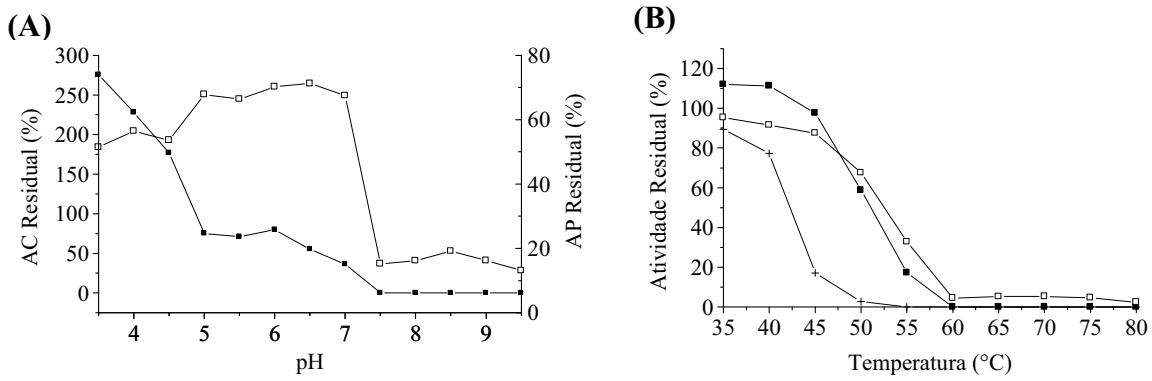


Figura 16. Efeito do pH **(A)** e da temperatura **(B)** sobre a estabilidade das atividades proteolítica (□) e coagulante (■) do extrato enzimático e da atividade coagulante da enzima comercial Ha-la (+).

A Figura 16B mostra a estabilidade das atividades coagulante e proteolítica em diferentes temperaturas por 1 hora. Ambas as atividades permaneceram estáveis até 45°C, apresentaram aproximadamente 60-70% de atividade residual após incubação a 50°C e perderam atividade a partir de 60°C. A figura também mostra a termoestabilidade da atividade coagulante da enzima comercial (Ha-la), que manteve 80% de atividade até 40°C seguido de 80% de perda de estabilidade a 45°C e inativação após 50°C. Observa-se que a atividade coagulante do extrato enzimático do *T. indicae-seudaticae* N31 é mais estável que a da enzima comercial nas temperaturas de processo de coagulação do leite (35-45°C) o que é interessante para a produção de queijos.

Os resultados indicam que a atividade proteolítica do extrato bruto de *T. indicae-seudaticae* N31 é mais sensível ao calor do que aquelas obtidas de outros fungos termofílicos como a protease de *Thermoascus aurantiacus*, estudada por Merheb et al. (2007), que exibiu 100% de estabilidade até 60°C por 1 hora; como a protease de *Thermomyces lanuginosus*, estudada por Li; Yang; Shen (1997), que exibiu mais de 90% de estabilidade até 60°C por 1

hora e que apresenta termoestabilidade similar às obtidas de mesofilicos como a protease de *Aspergillus oryzae* NRRL 2217, estudada por Sumantha et al. (2005), que manteve 76% de estabilidade até 50°C por 1 hora e do extrato da flor *Cynara scolymus* L., estudado por Llorente, Brutti, Caffini (2004), que apresentou 90% de estabilidade somente até 45°C por 1 hora. Em um estudo comparativo entre enzimas coagulantes, apresentado no trabalho de Preetha, Boopathy (1997), observou-se que a renina comercial de bezerro apresentou 4,5% de atividade proteolítica residual após incubação a 65°C por 30 minutos, o que é muito semelhante ao comportamento do extrato enzimático do *T. indicae-seudaticae* N31, que exibiu 5,3% de atividade proteolítica residual após incubação a 65°C por 1 hora.

Existe pouca informação na literatura sobre termoestabilidade de enzimas coagulantes no extrato bruto. Entretanto, sabe-se que as enzimas coagulantes disponíveis comercialmente, de origem animal, microbiana e as recombinantes, possuem termoestabilidade variada e ainda que dentre as microbianas, as de *Rhizomucor miehei* são as mais resistentes, com alta estabilidade até 60°C e as de *Cry. Parasitica* são as mais sensíveis, com estabilidade até 50°C (WALSH; LI, 2000). Moschopoulou et al. (2006), ao fazer um estudo comparativo entre renina e pepsina de cabra e renina de bezerro quanto à temperatura de inativação, mostrou que a renina de bezerro tornou-se inativa a partir de 56°C, resultado similar ao obtido para o extrato de *T. indicae-seudaticae* N31. Já o extrato enzimático produzido por *Aspergillus niger* MC4, estudado por Channe; Shewale (1998) apresentou maior estabilidade, pois a atividade coagulante só foi inativada quando aquecida a 60°C por 80 minutos. Portanto, pode-se sugerir que a atividade coagulante do extrato bruto de *T. indicae-seudaticae* N31 apresenta baixa termoestabilidade, a qual se mostrou similar ao extrato bruto de *Mucor* sp. J20, estudado por Tubesha; Al-Delaimy (2003), que exibiu completa inativação da atividade coagulante a 60°C após 20 minutos; ao extrato precipitado obtido do mesofílico *Penicillium citrinum*, estudada por Abdel-Fattah; Mabrouk; El-Hawwary (1972), cuja atividade foi destruída quando aquecida a 55°C por 10 minutos e ao extrato bruto de *Penicillium oxalicum*, no trabalho de Hashem (1999), que manteve 52% de atividade coagulante a 50°C por 30 minutos e exibiu perda expressiva a 60°C, o que é uma característica relevante para produção de queijos.

A maioria da atividade enzimática do coagulante adicionado ao leite durante a fabricação de queijos é perdida no soro e somente 0 a 15% da atividade permanece no coágulo (WILKINSON; KILCAWLEY, 2005). Entretanto, esse coagulante retido no coágulo, que também possui ação proteolítica, é um dos principais agentes responsáveis pela quebra das caseínas durante a maturação do queijo, processo chamado de proteólise primária,

principalmente durante as primeiras 24 horas depois de ocorrida a coagulação (SILVA; MALCATA, 2004). Assim, fatores que afetam a retenção e a atividade do coagulante no coágulo são importantes e por isso, o uso de coagulantes com estabilidade ao calor mais prolongada do que a renina deve ser evitado, senão o excesso de atividade proteolítica ativa no coágulo após o cozimento pode resultar em proteólise e amargor demasiados durante a etapa de maturação (SOUSA, ARDO, MCSWEENEY, 2001). O comportamento térmico do extrato enzimático bruto de *T. indicae-seudaticae* N31, representado pela inativação da atividade proteolítica com aquecimento moderado, é um bom indicativo para seu uso na produção de queijos.

5.4.4 Efeito da concentração de $CaCl_2$ na coagulação do leite

O cálcio tem sido descrito como uma substância importante na formação do gel durante a coagulação do leite, o que ocorre quando sua concentração é suficientemente alta (ANEMA; LEE; KLOSTERMEYER, 2005). A adição de cálcio solúvel provoca um aumento no nível de fosfato de cálcio coloidal, que parece ser um fator determinante na coagulação do leite pelos coalhos e coagulantes, e acaba diminuindo o tempo de coagulação.

A Figura 17 mostra o efeito de diferentes concentrações de $CaCl_2$ na atividade coagulante do extrato enzimático. Observa-se atividade máxima a 0,04 M de $CaCl_2$.

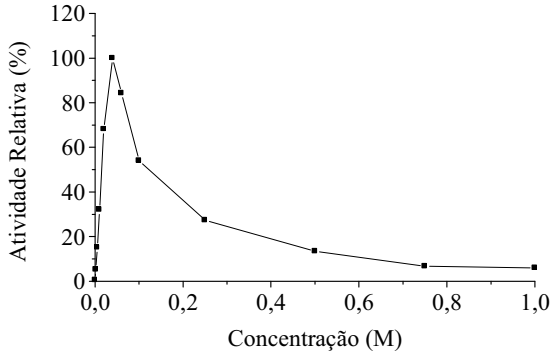


Figura 17. Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante do extrato enzimático.

O cálcio exerce função na agregação das caseínas durante a segunda etapa (não enzimática) da coagulação do leite, causada pela neutralização dos resíduos negativos das

micelas de caseína (grupos fosfoserina e carboxílicos) por Ca^{2+} e complexos fosfato-cálcio (PIRES; ORELLANA; GATTI, 1999) e que, assim, o aumento da sua concentração aumenta a taxa de coagulação (ARIMA; YU; IWASAKI, 1970; KUMAR et al. 2005; EL-BENDARY; MOHARAM; ALI, 2007). Nota-se que a atividade decresceu com concentrações maiores que 0,04 M, provavelmente devido ao aumento da força iônica ou pela saturação dos resíduos negativos das micelas com a crescente concentração de Ca^{2+} no meio. Comportamento similar foi relatado por Vairo-Cavalli et al. (2005), Preetha, Boopathy (1997) e por Nouani et al. (2009) (b), ao estudar proteases que apresentaram a mesma resposta ao aumento da concentração de cálcio (aumento inicial de atividade coagulante, seguido de queda), com máxima atividade a 0,03; 0,4 e 0,02 M de $CaCl_2$, respectivamente. Sardinas (1968) ao estudar o efeito da concentração de $CaCl_2$ no leite sobre a atividade da renina microbiana produzida por *Endothia parasitica*, também encontrou um pico de máxima coagulação a 0,04 M de $CaCl_2$.

5.4.5 Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática

A Tabela 3 mostra a susceptibilidade do extrato enzimático a inibidores de serino-proteases (PMSF), cisteíno-proteases (E-64), metaloproteases (EDTA) e proteases aspárticas (Pepstatin A).

Tabela 3. Efeito da presença de inibidores de protease nas atividades proteolítica e coagulante do extrato enzimático. A atividade residual representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade obtido no ensaio realizado sem adição de inibidores.

Inibidores	Atividade Proteolítica Residual (%)	Atividade Coagulante Residual (%)	Classe de enzimas inibidas
Controle (sem inibidor)	100,00	100,00	
PMSF (10 mM)	70,02	81,79	Serino
E-64 (10 μM)	97,43	96,87	Cisteíno
EDTA (10 mM)	83,52	170,33	Metalo
Pepstatin A (20 μM)	40,66	25,83	Aspártica

O extrato enzimático bruto reteve aproximadamente 82 e 97% de atividade coagulante na presença de PMSF e E-64, respectivamente e exibiu 70% de aumento na presença de EDTA. Entretanto, nota-se que o composto que exerceu maior influência na atividade coagulante foi Pepstatin A, com aproximadamente 74% de inibição. Esses resultados sugerem a presença de uma protease aspártica, classe de proteases que apresentam resíduos aspárticos no sítio ativo, exibem atividade ótima a baixos valores de pH e que são inibidas por Pepstatin A (LLORENTE et al., 2004; FERNANDEZ-LAHORE et al., 1999; VARÓN et al., 2006). A maioria das proteases utilizadas comercialmente na coagulação do leite pertence a essa classe, sendo a renina a mais tradicional (RAPOSO; DOMINGOS, 2008). Os resultados sugerem ainda a existência de algum metal/íon no extrato enzimático bruto que possa estar interferindo negativamente na atividade coagulante já que houve aumento da atividade coagulante na presença do quelante de metais.

Como o PMSF provocou inibição de 30% da AP, sugere-se que o pico observado na faixa alcalina da Figura 13A (página 74) represente uma serino-protease.

5.4.6 Monitoramento da degradação da caseína do leite

Para este experimento, foi utilizado o leite do ensaio da atividade coagulante para simular condições reais de coagulação. No intuito de promover uma comparação, fez-se o mesmo procedimento utilizando um coagulante comercial (Ha-la). Os resultados são mostrados na Figura 18.

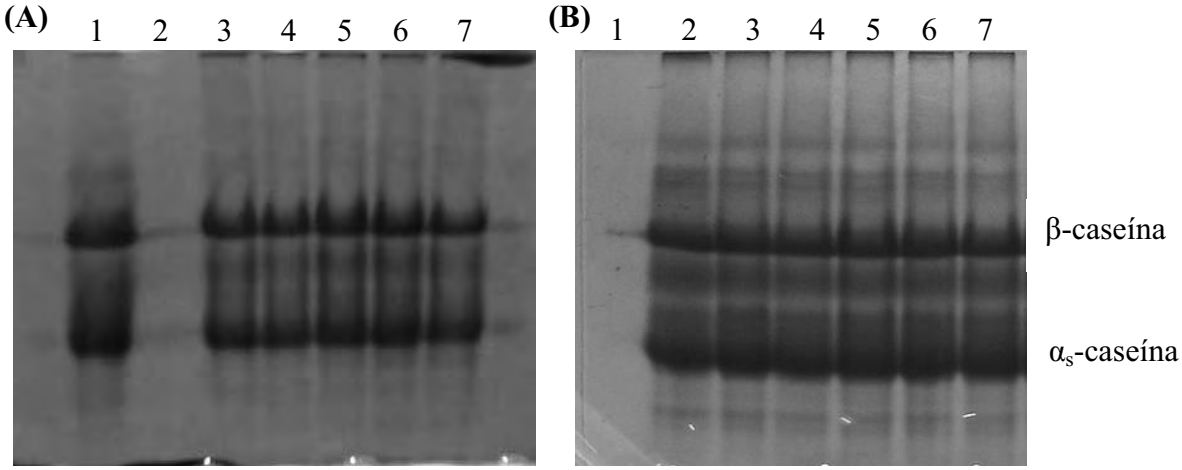


Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia (uréia-PAGE) mostrando a hidrólise da caseína pelo extrato enzimático de *T. indicae-seudaticae* N31 **(A)** (coluna 1: leite de ensaio; coluna 2: extrato enzimático; colunas 3-7: caseínas após incubação por 2, 5, 10, 30, 60 minutos, respectivamente) e pelo coagulante comercial (Ha-la) **(B)** (coluna 1: extrato enzimático; coluna 2: leite de ensaio; colunas 3-7: caseínas após incubação por 5, 10, 20, 40 e 60 minutos, respectivamente).

Dois grandes grupos de caseínas foram identificados no URÉIA-PAGE: α_s-caseína, com maior mobilidade e β-caseína, com menor mobilidade eletroforética (SILVA; MALCATA, 2004). Observa-se que as frações de caseína continuam intactas até os 60 minutos de hidrólise, onde nota-se um suave início de degradação da α_s-CN (Figura 18A). O perfil de hidrólise assemelha-se ao obtido pelo coagulante comercial (Figura 18B), onde as frações α_s-CN e β-CN também se apresentam íntegras até os 60 minutos. Durante esse experimento, após 5 minutos de incubação com o extrato do *T. indicae-seudaticae* N31, o leite já se apresentava coagulado, assim como no caso do coagulante comercial. Isto denota alta especificidade em relação à κ-CN, pois a enzima promoveu a coagulação do leite sem agir sobre as outras frações, que são visualizadas até os 60 minutos de incubação.

O comportamento hidrolítico do extrato enzimático de *T. indicae-seudaticae* N31 é diferente do observado para outro fungo termofilico, *Thermoascus aurantiacus*, estudado por Merheb et al. (2007), onde aos 60 minutos de hidrólise, as frações de caseína já apresentavam-se extensivamente degradadas, principalmente a fração β-CN. O estudo de Merheb et al. (2007) nos serve de referência para mostrar um comportamento proteolítico inespecífico e oposto do que se busca para substitutos de coalho.

5.5 Purificação da protease coagulante

Para dar início aos testes de purificação, fez-se um estudo buscando a melhor técnica para precipitação do extrato enzimático bruto, investigando a ação de solventes orgânicos (álcool e acetona) e de sal (sulfato de amônio), que são compostos tradicionais usados por vários autores para esta finalidade (ARIMA; YU; IWASAKI, 1970; SENTHILKUMAR; RAMASAMY; SUBRAMAINAN, 2006; HASHEM, 2000; KHAN; BLAIN; PATTERSON, 1979; SARDINAS, 1968; ABDEL-FATTAH; MABROUK; EL-HAWWARY, 1972; KUMAR et al., 2005; EL-BENDARY; MOHORAM; ALI, 2007; CAVALCANTI et al., 2004; RAPOSO; DOMINGOS, 2008; AGEITOS et al., 2007).

Pode-se notar, na Tabela 4, que o uso de solventes orgânicos foi melhor do que o uso de sal devido à baixa recuperação da atividade coagulante e baixo R proporcionado pelo último. Nota-se também que o uso de álcool ocasionou elevada recuperação da atividade coagulante, aumento na atividade coagulante específica e elevados valores R.

Tabela 4. Precipitação do extrato enzimático.

Etapa	Proteína total (mg/ml)	AC total (U/mL)	ACE (U/mg)	%AC	FP AC	AP total (U/mL)	APE (U/mg)	% AP	FP AP	R
Álcool										
Bruta	7,09	916,03	129,21	100,00	1,00	7,10	1,00	100,00	1,00	128,94
1:1	2,29	902,82	394,93	98,56	3,06	3,67	1,61	51,75	1,61	245,73
1:1,5	3,78	1068,49	282,65	116,64	2,19	4,11	1,09	57,95	1,09	259,69
1:2	3,39	1068,49	314,91	116,64	2,44	4,10	1,21	57,75	1,21	260,58
1:2,5	4,00	951,22	237,79	103,84	1,84	4,05	1,01	57,00	1,01	235,02
1:3	5,47	1233,20	225,55	134,62	1,75	7,45	1,36	104,98	1,36	165,46
1:3,5	7,48	1327,66	177,39	144,94	1,37	6,57	0,88	92,59	0,88	201,97
1:4	5,56	1186,31	213,43	129,51	1,65	6,39	1,15	89,93	1,15	185,79
Acetona										
Bruta	15,02	666,67	44,38	100,00	1,00	8,13	0,54	100,00	1,00	82,01
1:1	6,11	630,07	103,07	94,51	2,32	2,42	0,40	29,73	0,73	260,66
1:1,5	8,20	442,21	53,91	66,33	1,21	2,58	0,31	31,76	0,58	171,25
1:2	12,22	694,88	56,88	104,23	1,28	3,03	0,25	37,31	0,46	229,08
1:2,5	16,10	645,96	40,12	96,89	0,90	2,64	0,16	32,49	0,30	244,57
1:3	16,63	738,46	44,41	110,77	1,00	4,26	0,26	52,45	0,47	173,19
1:3,5	17,02	678,26	39,86	101,74	0,90	3,94	0,23	48,45	0,43	172,19
1:4	21,05	740,21	35,17	111,03	0,79	4,00	0,19	49,17	0,35	185,17
Sulfato de amônio										
Bruta	12,47	674,16	54,06	100,00	1,00	7,70	0,62	100,00	1,00	87,60
20%	-0,08	10,04	-130,96	1,49	-2,42	0,17	-2,23	2,22	-3,59	58,83
40%	0,40	20,03	50,09	2,97	0,93	0,74	1,86	9,67	3,00	26,90
50%	0,94	88,46	94,01	13,12	1,74	1,22	1,29	15,82	2,09	72,63
60%	2,28	500,91	219,70	74,30	4,06	3,04	1,33	39,45	2,15	164,89
70%	1,95	516,39	264,17	76,60	4,89	2,96	1,51	38,39	2,44	174,71
80%	1,97	475,92	241,76	70,59	4,47	2,64	1,34	34,32	2,17	180,10

Onde: ACE = Atividade Coagulante Específica; FP = Fator de Purificação; APE = Atividade Proteolítica Específica; R = razão entre AC/AP; (Extrato enzimático:Solvente).

Escolheu-se a precipitação com álcool comercial (96%) na proporção 1:2 de extrato enzimático bruto:álcool para iniciar o estabelecimento do protocolo de purificação da protease coagulante de *T. indicae-seudaticae* N31, a qual proporcionou, aproximadamente, recuperação de 116% de atividade coagulante, aumento de 244% na atividade coagulante específica (fator de purificação de 2,44 vezes), e alto valor R (aproximadamente 260).

Arima; Yu; Iwasaki (1970); Senthilkumar; Ramasamy; Subramainan (2006); Hashem (2000) também utilizaram precipitação com álcool para purificação da protease coagulante em seus trabalhos.

Em seguida, a fração enzimática precipitada foi submetida à cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G75. De acordo com o gráfico apresentado na Figura 19A, os tubos coletados contendo atividade coagulante foram reunidos para realizar o SDS-PAGE (Figura 19B). O conteúdo protéico do extrato enzimático bruto, do extrato precipitado e das amostras obtidas após a cromatografia de filtração em gel na resina Sephadex G75 pode ser visualizado no SDS-PAGE, onde é possível observar perfil protéico com três fortes bandas. Nossos resultados sugerem que a banda indicada, com aproximadamente 35 kDa, seja a da protease coagulante, pois foi visualizada no SDS-PAGE realizado com todos os tubos coletados do pico de atividade coagulante (não mostrado).

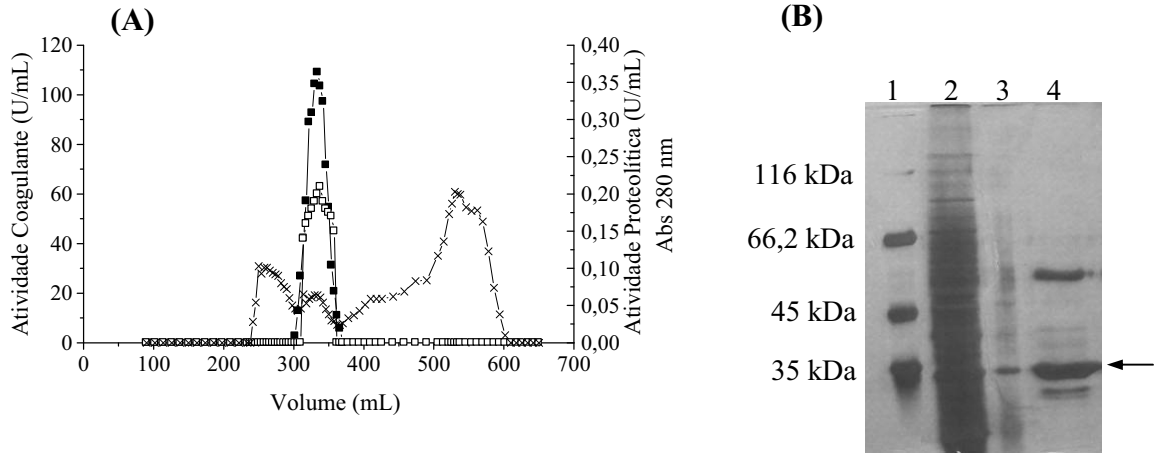


Figura 19. (A) Perfil de eluição da protease na cromatografia de filtração em gel na resina Sephadex G75. Abs 280 nm (×) e atividades coagulante (■) e proteolítica (□). **(B)** Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) a 12% de concentração do extrato enzimático de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 após as primeiras etapas de purificação. Coluna 1, marcadores de massa molecular: β-galactosidase, 116,0 kDa; BSA, 66,2 kDa; ovoalbumina, 45,0 kDa; lactato desidrogenase, 35,0 kDa; RE ase βsp 981, 25,0 kDa; Coluna 2, extrato enzimático bruto; Coluna 3, extrato enzimático precipitado; Coluna 4, amostra coletada após filtração em gel em resina Sephadex G75. A seta indica a possível protease do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

As frações com atividade coagulante obtidas após cromatografia de filtração em gel (Sephadex G75) foram combinadas e aplicadas numa coluna de troca iônica (Q Sepharose), cujo perfil de eluição pode ser observado na Figura 20A. Aplicou-se um gradiente salino escalonado no intuito de separar melhor a enzima de interesse das outras proteínas e assim conseguir melhor resolução cromatográfica. A enzima se ligou à resina e foi eluida, também num pico bem definido, logo no início do gradiente, a 0,1 M de NaCl, com ambas atividades enzimáticas. As frações deste pico foram combinadas, dialisadas e utilizadas para realizar a análise de eletroforese e para caracterização enzimática. A Figura 20B mostra o SDS-PAGE da enzima purificada após a cromatografia de troca iônica. Oberva-se uma única banda proteica com aproximadamente 34 kDa. Esse valor está de acordo com a literatura já que a quimosina e outras proteases aspárticas exibem massa molecular entre 32 e 39 kDa (CHITPINITYOL; CRABBE, 1997).

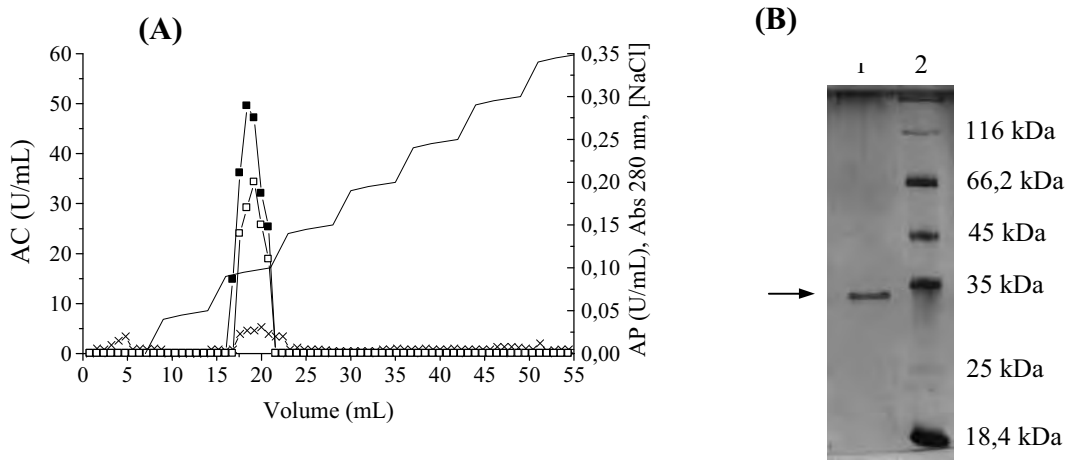


Figura 20. **(A)** Perfil de eluição da protease na cromatografia de troca iônica. Atividade coagulante (■), atividade proteolítica (□), Abs 280 nm (x), e gradiente salino fracionado (---). **(B)** Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) a 12% de concentração da protease purificada. Coluna 1: amostra coletada após troca iônica e Coluna 2: marcadores de massa molecular: β galactosidase, 116 kDa; BSA, 66,2 kDa; ovoalbumina, 45 kDa; lactato desidrogenase, 35 kDa; REase Bsp981, 25 kDa; β-lactoglobulina, 18,4 kDa. A seta indica a protease purificada do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

O protocolo estabelecido para a purificação da protease apresentou rendimento de 1,3% para AC com fator de purificação de 43 vezes (Tabela 5). Pode-se observar na tabela que o valor R aumentou durante o processo de purificação, de 93 para 253, o que é interessante para produção de queijos.

Tabela 5. Resultados obtidos a partir dos processos de purificação da protease do extrato enzimático de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

	PT (mg)	APT (U)	APE (U/mg)	% AP	FP AP	ACT (U)	ACE (U/mg)	% AC	FP AC	R
Bruta	627,0	352,0	0,6	100,0	1,0	32914,3	52,5	100,0	1,0	93,5
EP	191,3	203,0	1,1	57,7	2,2	29302,3	153,2	89,06	3,4	144,3
G75	1,2	11,5	9,6	3,3	20,1	2429,8	2038,0	7,4	44,7	211,4
Q	0,2	1,7	7,8	0,5	16,1	440,2	1965,1	1,3	43,1	253,6

Onde: EP = Extrato Precipitado; G75 = cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G75; Q = cromatografia de troca iônica em resina Q Sepharose; PT = Proteína Total; APT = Atividade Proteolítica Total; APE = Atividade Proteolítica Específica; ACT = Atividade Coagulante Total; ACE = Atividade Coagulante Específica; FP = Fator de Purificação; R = razão entre AC/AP.

5.5 Caracterização das atividades coagulante e proteolítica da enzima purificada

5.5.1 pH e temperatura ótimos

As Figuras 21 A e B mostram o comportamento da atividade proteolítica e coagulante, respectivamente, em relação ao efeito do pH. A enzima apresentou atividade proteolítica máxima em pH 5,5 e atividade coagulante máxima em pH 5,34. Esse resultado é interessante do ponto de vista industrial já que a coagulação do leite ocorre em pH 5,5-6,3; em valores acima desse pH o tempo de coagulação e a firmeza do coágulo diminuem e em valores abaixo a atividade hidrolítica é alta resultando em diminuição do rendimento (CHITPINITYOL; CRABBE, 1997). Comportamento similar foi observado para a protease de *Endothia parasitica* com atividade coagulante máxima em pH 5,1 e queda a partir de pH 6,5 (LARSON; WHITAKER, 1970), para a protease de *Rhizopus oryzae*, com atividade coagulante máxima em pH 5,5 com posterior queda e ausência de atividade em pH 8,0 (KUMAR et al., 2005) e para a protease de *Mucor pusillus*, com atividade máxima em pH 5,0 seguido de queda e perda de 97% de atividade em pH 7,0 (NOUANI et al., 2009 (b)). A atividade coagulante da protease de *Mucor pusillus* var. *Lindt*, estudada por Arima; Yu; Iwasaki (1970), também foi máxima em pH 5,5 com grande perda de atividade em pH 7,0 e a da protease de *Rhizomucor miehei* foi máxima em pH 5,6 (PREETHA; BOOPATHY, 1997).

A protease de *Mucor pusillus* também apresentou pH ótimo ácido (5,6) para atividade proteolítica (SOMKUTI; BABEL, 1968), assim como a protease de *Mucor bacilliformis*, que exibiu máxima atividade proteolítica na faixa de pH 2,5-5,5 (ACERES et al. 1993).

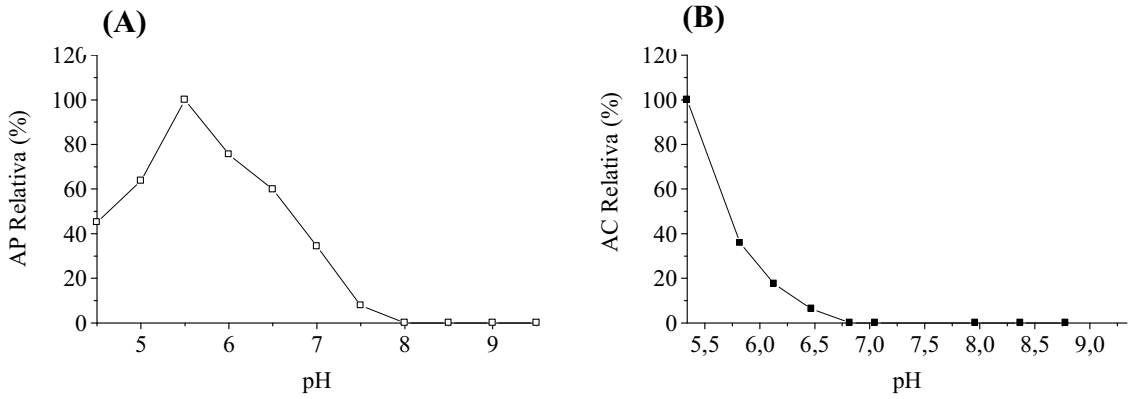


Figura 21. Efeito do pH sobre as atividades proteolítica **(A)** e coagulante **(B)** da enzima purificada.

Conforme discutido anteriormente, como o segundo pico de atividade proteolítica do extrato enzimático bruto, observado em pH alcalino, não aparece na Figura 21A, supõe-se que ele representava uma outra protease que foi eliminada durante o processo de purificação.

A Figura 22 mostra o efeito da temperatura sobre as atividades proteolítica e coagulante. Observa-se que a enzima apresentou atividade máxima em elevados valores de temperatura. A protease coagulante produzida por *Penicillium oxalicum* também apresentou atividade coagulante ótima em temperatura elevada, 65°C (HASHEM, 2000) assim como a obtida de *Rhizopus oryzae*, 60°C (KUMAR et al, 2005) e a obtida de *Bacillus sphaericus*, 55°C (EL-BENDARY; MOHARAM; ALI, 2007).

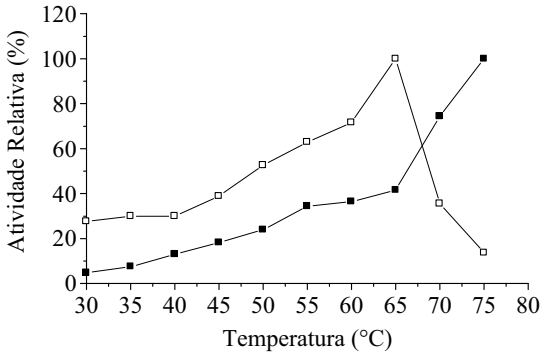


Figura 22. Efeito da temperatura sobre as atividades proteolítica (□) e coagulante (■) da enzima purificada.

5.5.2 pH e temperatura de estabilidade

A Figura 23A mostra o efeito do pH sobre a estabilidade da enzima durante 24 horas de incubação à temperatura ambiente. A atividade proteolítica apresentou aproximadamente 80% de estabilidade até pH 5,0 e a coagulante 100% de estabilidade em pH 3,5-4,0 e 55% em pH 5,0; ambas exibiram total perda da estabilidade em pH 8,0. Assim, a protease permaneceu estável em baixos valores de pH e não apresentou atividade residual após incubação em pHs alcalinos. Isso também foi observado para a protease de *Mucor pusillus*, que foi mais estável na faixa de pH entre 3,0 e 6,0 (Somkuti; Babel, 1968) assim como as proteases de *Mucor bacilliformis* (ARECES et al., 1993) e *Mucor* sp. (FERNADEZ-LAHORE et al., 1999) cujas atividades coagulante e proteolítica, respectivamente, foram mantidas também na faixa de pH entre 3,0 e 6,0. A renina de *Endothia parasitica*, estudada por Sardinas (1968), apresentou comportamento similar retendo mais de 90% de atividade entre pH 4,0 e 5,5 e exibindo máxima estabilidade em pH 4,5.

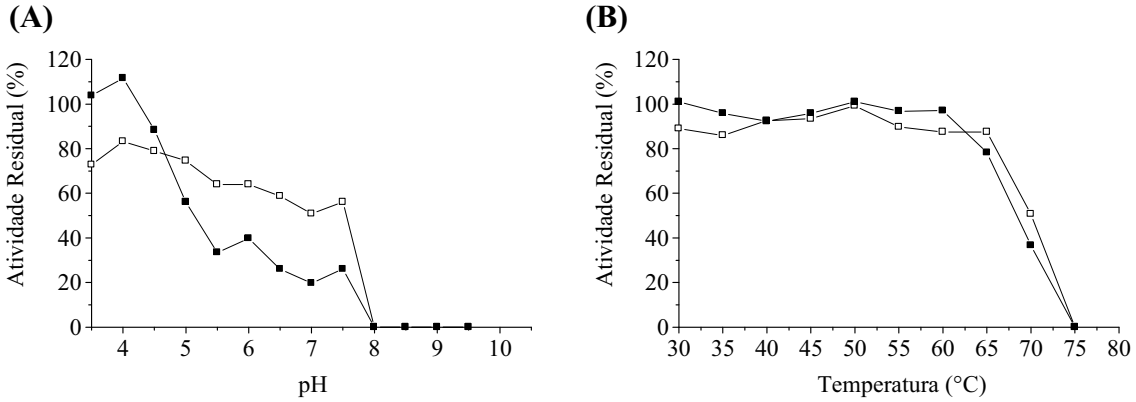


Figura 23. Efeito do pH **(A)** e da temperatura **(B)** sobre a estabilidade das atividades proteolítica (□) e coagulante (■) da enzima purificada.

A Figura 23B mostra o efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima durante 1 hora de incubação. As atividades coagulante e proteolítica exibiram estabilidade em temperaturas elevadas permanecendo 78% e 87% estáveis a 65°C e perdendo totalmente a estabilidade a 75°C. A protease apresentou termoestabilidade característica de enzimas obtidas de fungos termofílicos como a protease de *Mucor pusillus*, que manteve 100% de estabilidade até 55°C (SOMKUTI; BABEL, 1968) e a de *Mucor miehei*, como relataram Preetha e Boopathy (1997) e Aceres et al. (1992), mantendo 76% de atividade residual após incubação a 65°C e mais de 90% após incubação a 55°C, respectivamente.

O processo de purificação aumentou a termoestabilidade da enzima, já que a protease no extrato bruto começou a perder estabilidade a temperaturas a partir de 45°C e a protease purificada a partir de 65°C. Esse aumento da termoestabilidade após purificação também aconteceu para a protease coagulante de *Nocardiopsis* sp., que no extrato bruto apresentou 50%, 30% e 38% de estabilidade a 35°C, 45°C e 55°C, respectivamente e no extrato parcialmente purificado apresentou 100%, 82%, 36% e 11% de estabilidade a 35°C, 45°C, 55°C e 65°C, respectivamente (CAVALCANTI et al., 2004). O extrato bruto do *T. indicae-seudaticae* N31 foi obtido por fermentação sólida em farelo de trigo e por isso era rico em diferentes compostos como carboidratos, outras proteínas, minerais, etc. O aumento da termoestabilidade da enzima purificada pode estar relacionado à remoção de algum composto durante o processo de purificação que pudesse estar interagindo com a proteína contribuindo para que ela se desnaturasse a temperaturas mais baixas. Talvez, ainda, a enzima purificada, na ausência dos sais do extrato bruto, apresente interações hidrofóbicas mais fortes ou em

maior quantidade, o que reforçou a manutenção de sua estrutura enovelada a temperaturas mais elevadas.

5.5.3 Efeito da concentração de $CaCl_2$ na coagulação do leite

A Figura 24 mostra o efeito de diferentes concentrações de $CaCl_2$ na atividade coagulante da enzima purificada. Observa-se atividade máxima a 0,04 M de $CaCl_2$, mesmo comportamento da enzima no extrato enzimático bruto.

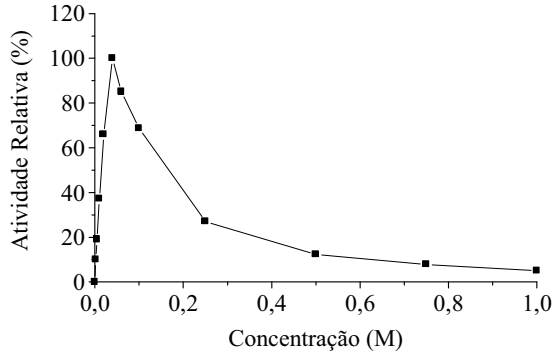


Figura 24. Efeito da concentração de cloreto de cálcio sobre a atividade coagulante da enzima purificada.

5.5.4 Efeito de NaCl, surfactantes, íons metálicos e inibidores de protease na atividade enzimática

A Tabela 6 mostra a susceptibilidade da enzima purificada aos inibidores de serino-proteases (PMSF), metaloproteases (EDTA) e proteases aspárticas (Pepstatin A).

Tabela 6. Efeito de inibidores de protease nas atividades proteolítica e coagulante da enzima purificada. A atividade residual representa a porcentagem de atividade remanescente observada em relação ao valor de atividade obtido sem a adição dos inibidores (controle).

Inibidores	Concentração (mM)	AP Residual (%)	AC Residual (%)
Controle		100,0	100,0
PMSF	10	68,4	62,8
EDTA	10	83,8	96,8
Pepstatin A	0,02	0	24,1

A protease reteve aproximadamente 63% e 97% de atividade coagulante na presença de PMSF e EDTA, respectivamente, e 68% e 84% de atividade proteolítica na presença dos mesmos compostos. Entretanto, nota-se que o composto que exerceu maior influência nas atividades catalíticas da enzima foi Pepstatin A, com aproximadamente 76% e 100% de inibição das atividades coagulante e proteolítica, respectivamente. Esses resultados sugerem que a enzima não pertence às classes das serino e metaloproteases, mas sim às aspárticas, classe de proteases que apresentam dois resíduos de ácido aspártico no sítio ativo, exibem atividade ótima a baixos valores de pH e que são inibidas por Pepstatin A (LLORENTE et al., 2004; FERNANDEZ-LAHORE et al., 1999; VARÓN et al., 2006). É justamente essa classe de proteases, as aspárticas, que é utilizada comercialmente na coagulação do leite, sendo a renina a mais tradicional (RAPOSO; DOMINGOS, 2008).

A Tabela 7 mostra o efeito de alguns íons metálicos, uréia, β-mercaptoetanol, EDTA e alguns detergentes sobre a atividade coagulante da enzima purificada.

Tabela 7. Efeito de íons metálicos, detergentes e outros agentes químicos na atividade coagulante da enzima purificada. A atividade residual representa a porcentagem de atividade remanescente observada em relação ao valor de atividade obtido sem a adição dos agentes (controle).

Agentes (5 mM)	AC Residual (%)
mercúrio	75,6
magnésio	82,6
manganês	99,2
bário	95,6
cobalto	89,3
ferro	96,6
prata	89,3
cálcio	101,0
níquel	34,8
zinco	94,4
cobre	61,6
uréia*	96,2
β-mercaptoetanol	85,1
Detergentes	0,5%
Tween 20	99,5
Tween 80	98,3
Triton X100	102,1
SDS	0

* efeito determinado com uréia 10 mM

Os íons que mais afetaram a atividade foram níquel, cobre, mercúrio com 65,2%, 38,4% e 24,4% de inibição, respectivamente. No trabalho de El-Bendary; Moharam; Ali (2007), os íons níquel e mercúrio, a 5 mM, também foram os que mais inibiram a atividade coagulante da protease de *Bacillus sphaericus*, com 22% e 42% de inibição, respectivamente. No trabalho de Alessandro; Federico (1980), houve comportamento semelhante aos nossos resultados em relação à inibição por cobre e mercúrio e à não interferência por zinco.

Agentes caotrópicos como a uréia são capazes de desorganizar a estrutura protéica por interferir com pontes de hidrogênio (ROCCO et al., 2008), fazendo com que os grupos

ionizáveis da proteína fiquem expostos à solução. Na Tabela 7, observa-se que a uréia, a 10 mM, praticamente não afetou a atividade coagulante.

O β-mercaptoetanol é um agente redutor que rompe pontes dissulfeto. Houve uma inibição muito pequena (15%) da atividade coagulante na presença do β-mercaptoetanol (Tabela 7) indicando que este composto praticamente não interferiu na atividade.

Os detergentes, na concentração testada, não tiveram efeito sobre a atividade coagulante, com exceção do SDS, que inibiu totalmente a atividade (Tabela 7). Esse resultado é diferente do observado para a protease coagulante de *Penicillium oxalicum*, estudada por Hashem (2000), que só foi totalmente inibida com 100 mM de SDS, sendo que com 10 mM ainda tinha 50% de sua atividade.

A Figura 25 mostra o efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a atividade coagulante. Observa-se que há progressiva perda de atividade com o aumento da concentração de NaCl até restar 12% de atividade coagulante na presença de NaCl 3%, sugerindo que a elevação da força iônica provoca um efeito inibitório sobre a enzima. Resultado similar foi encontrado para a protease coagulante da flor *Silybum marianum*, que apresentou perda total de atividade com 1,5% de NaCl (VAIRO-CAVALLI et al., 2005). Já as proteases de *Rhizomucor miehei* (PREETHA; BOOPATHY, 1997) e *Bacillus sphaericus* (EL-BENDARY; MOHARAM; ALI, 2007), foram mais ativas na presença do sal, exibindo 64% e 72% de atividade coagulante na presença de NaCl 3% e 20% , respectivamente.

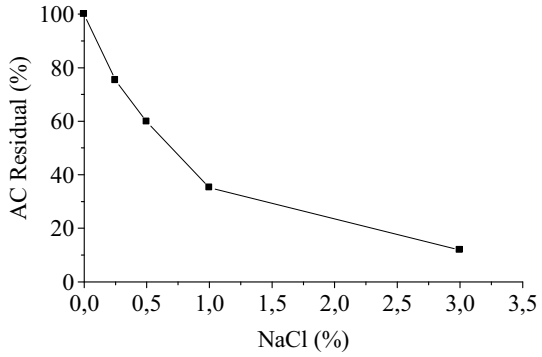


Figura 25. Efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a atividade coagulante da enzima purificada.

Na produção do queijo prato, o sal é adicionado através de salmoura no final do processo, quando a massa do queijo é desenformada, ou seja, o sal não entra em contato com o coagulante (coalho) na etapa de coagulação do leite, o que não coloca em risco a atividade da enzima. A etapa de salga é feita com salmoura 18% e a baixa atividade enzimática verificada na presença de NaCl 3% pode ser interessante para que ocorra inativação parcial da enzima ao final do processo de produção do queijo, diminuindo a atividade do coagulante residual durante a etapa de maturação, evitando proteólise excessiva indesejada com liberação de peptídeos amargos.

5.5.5 Cinética enzimática

A Figura 26 mostra o efeito da concentração de caseína na velocidade da reação enzimática, através da curva de Michaelis-Menten e de sua linearização no duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

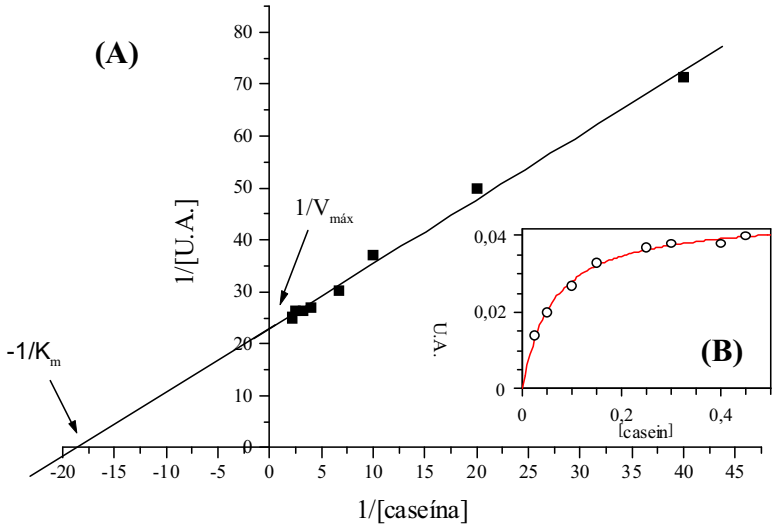


Figura 26. Efeito da concentração do substrato na velocidade de reação: duplo-recíproco de Lineweaver-Burk **(A)** e curva de Michaelis-Menten **(B)**, onde U.A. = Δ Abs $_{280\ nm}$ x 10 / 30 min.

O valor k_m de 0,06 mM para caseína foi obtido da regressão não linear utilizando o programa Grafit 5.0 foi. Esse valor foi mais alto do que o encontrado para a protease altamente hidrolítica de *Thermoascus aurantiacus* de 0,024 mM (MERHEB-DINI, et al. 2009). Isso denota que a protease do *Thermoascus aurantiacus*, por ser menos específica e

apresentar mais opções de sítios de hidrólise na caseína, apresenta maior afinidade por esse substrato.

A Figura 27 mostra o efeito da concentração de leite sobre o tempo de coagulação. Observa-se que na faixa de 2 a 12% de leite o tempo de coagulação é diretamente proporcional à concentração de substrato; quanto maior a concentração de substrato, maior o tempo de coagulação. Esse resultado também foi obtido para a protease coagulante de *Endothia parasitica*, que na faixa de 2 a 20% de leite também apresentou aumento proporcional do tempo de coagulação (LARSON; WHITAKER, 1970). Assim, conclui-se que a concentração de 10% de leite usada para a determinação da atividade coagulante é adequada, pois encontra-se dentro da linearidade da curva.

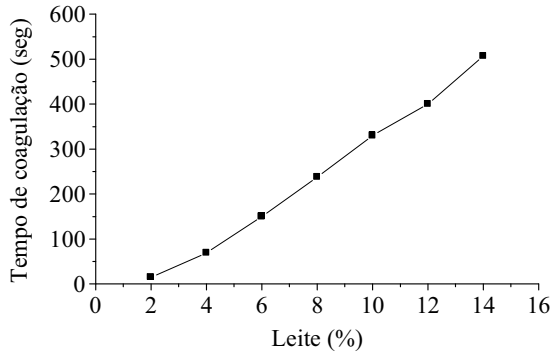


Figura 27. Efeito da concentração de leite sobre o tempo de coagulação pela enzima purificada.

5.5.6 Ponto isoelétrico

A protease apresentou ponto isoelétrico em pH 3,5. Proteases microbianas aspárticas também apresentam baixos valores de ponto isoelétrico como mostrado no trabalho de Yamada; Ogrydziak (1983) onde as proteases I e III, de *Saccharomycopsis lipolytica*, exibiram pI de 4,9 e 3,8, respectivamente; no trabalho de Fernadez-Lahore et al. (1999) onde a protease de *Mucor* sp. apresentou pI de 4,21 e no trabalho de Sardinas (1968) onde a protease de *Endothia parasitica* apresentou pI de 5,5. Llorente; Brutti; Caffini (2004)

estudaram uma protease vegetal aspártica que também apresentou baixo valor de ponto isoelétrico (4,0).

5.5.7 Monitoramento da degradação da caseína do leite

O comportamento hidrolítico da enzima purificada também foi analisado por eletroforese em gel de uréia-poliacrilamida. A Figura 28 mostra o resultado deste experimento.

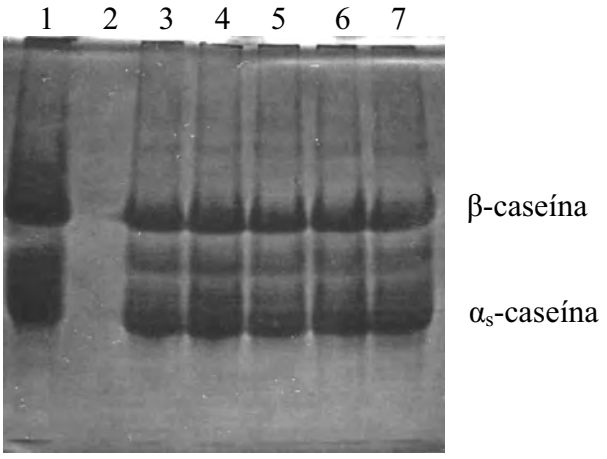


Figura 28. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia (uréia-PAGE) mostrando a hidrólise da caseína pela enzima purificada de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. Coluna 1: solução de leite; coluna 2: solução enzimática; colunas 3-7: caseínas após incubação por 2, 5, 10, 30, 60 minutos, respectivamente.

Dois grandes grupos de caseínas podem ser visualizados nos experimentos de uréia-PAGE: α_s-caseína, com maior mobilidade e β-caseína, com menor mobilidade eletroforética (SILVA; MALCATA, 2004). Observa-se que as frações de caseína continuam intactas até os 60 minutos de hidrólise. Esse resultado assemelha-se ao obtido com o extrato enzimático bruto e intensifica a idéia de alta especificidade em relação à κ-caseína, já que a enzima promoveu a coagulação do leite sem agir sobre as outras frações.

5.5.8 Monitoramento da atividade proteolítica durante a degradação das caseínas: hidrolise enzimática da caseína e RP-HPLC

Estudos relacionados ao padrão de hidrólise das frações de caseína são importantes para caracterizar a qualidade de novas proteases para uso na produção de queijos como agentes coagulantes. Assim, realizou-se um experimento de hidrólise de uma solução de caseína 2% para avaliar o perfil de separação por cromatografia de peptídeos resultantes de ação enzimática. Os cromatogramas dos peptídeos presentes nos hidrolisados são mostrados na Figura 29. O cromatograma (a) corresponde ao padrão das diferentes caseínas (EGITO et al., 2007).

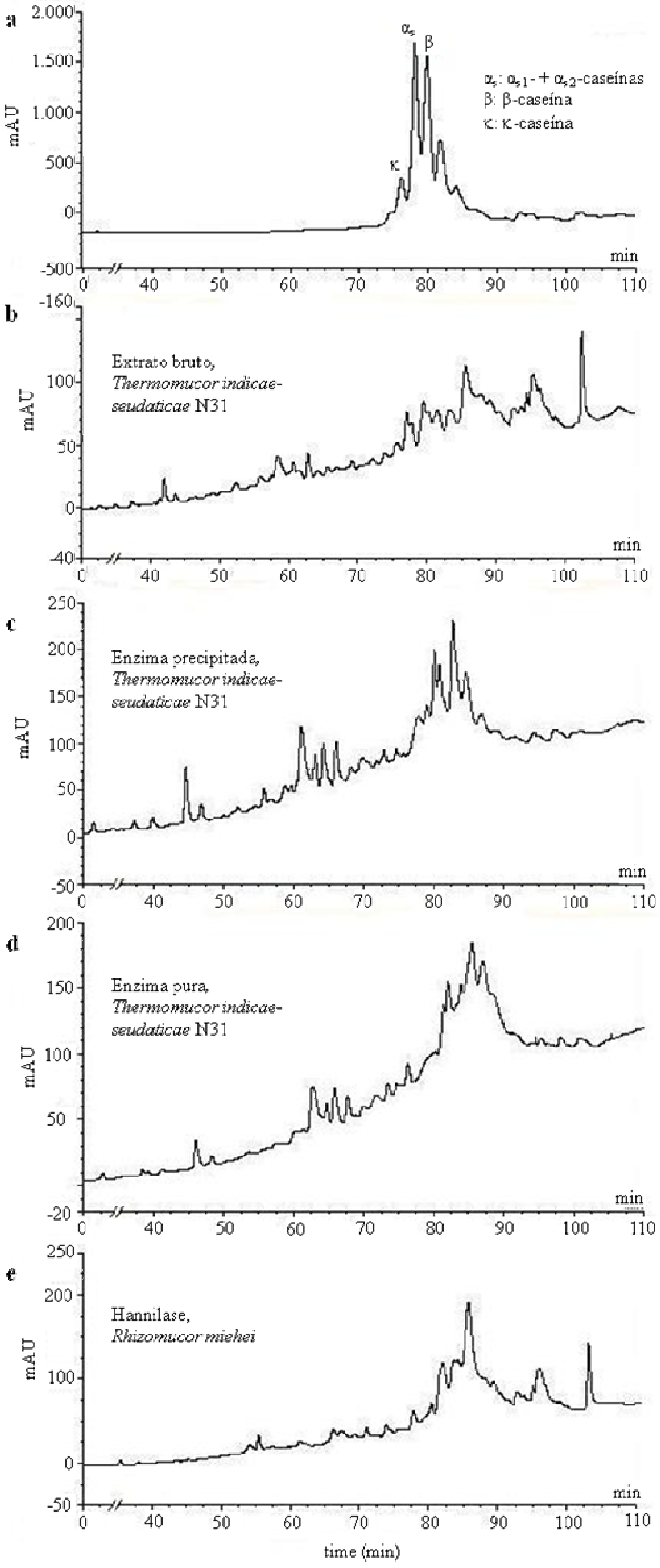


Figura 29. Perfil de eluição em RP-HPLC de caseinato de sódio bovino (20 mg/mL) **(a)** e seus hidrolisados gerados após 1 h de proteólise pelas proteases **(b, c, d, e)**.

Peptídeos que interagem fortemente com a coluna de RP-HPLC são de natureza mais hidrofóbica e assim com maior tendência a apresentarem sabor amargo (GALLAGHER et al., 2004). O padrão de fragmentos de peptídeos formados pela ação da protease do extrato enzimático bruto de *T. indicae-seudaticae* N31 (Figura 29b) e da protease comercial de *R. miehei* (Hannilase) (Figura 29e) não são idênticas mas apresentam similaridades, especialmente na faixa de 75-110 minutos, na qual um total de 8 picos podem ser observados. Essa faixa final da corrida é crucial para a produção de queijos visto que representa os prováveis peptídeos amargos, entretanto, o amargor só poderia ser efetivamente detectado por análise sensorial (LEE; WARTHESEN, 1996). O perfil de hidrólise obtido pela ação do extrato bruto do *T. indicae-seudaticae* N31 (Figura 29b) foi o que mais se assemelhou ao perfil da enzima comercial. Isso é interessante do ponto de vista tecnológico, pois o uso de um extrato enzimático bruto com características atraentes é mais vantajoso do que trabalhar com enzimas purificadas, cuja obtenção envolve custos elevados (LLORENTE et al., 2004). Apesar da ausência de resultados sensoriais, a comparação dos dois perfis é um bom indicativo da composição de peptídeos e do comportamento na produção de queijos. Várias proteases de origem microbiana, que têm sido investigadas como substitutos da renina, geralmente apresentam alta atividade proteolítica o que resulta em amargor em queijos maturados produzido pela ação em seqüências hidrofóbicas da caseína, levando à formação de peptídeos altamente hidrofóbicos os quais causam amargor quando acumulados (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001). Já que a Hannilase é um agente coagulante amplamente utilizado, o perfil de peptídeos obtidos com o extrato enzimático de *T. indicae-seudaticae* N31 incentiva a continuação dos nossos estudos sobre a viabilidade da protease de *T. indicae-seudaticae* N31.

A caracterização bioquímica e físico-química de enzimas purificadas é importante para avaliar seu potencial biotecnológico. Entretanto, para aplicação industrial, o processo de purificação pode resultar em aumento de custos, prejudicando a viabilidade comercial. Por isso, um último experimento de hidrólise foi realizado na caseína para estudar a ação da enzima após precipitação com etanol e após total purificação. A Figura 29c mostra o perfil obtido após hidrolise usando o extrato precipitado e a Figura 29d mostra o perfil obtido após hidrolise usando a enzima purificada. Os padrões dos fragmentos de peptídeos são muito parecidos como mostrado pelos picos similares nas faixas de 45-50; 60-70 e 80-90 minutos, sugerindo que o extrato precipitado age de maneira muito semelhante na caseína como a enzima purificada, indicando que uma purificação parcial com etanol foi adequada para resultar num extrato enzimático com baixa atividade proteolítica generalizada. Isso é muito

interessante considerando que pode implicar em redução de custos durante possível comercialização da enzima por não tornar necessário todo o processo de purificação para emprego tecnológico. Os perfis são parecidos com o do extrato bruto, porém com a vantagem de não exibir picos na faixa mais tardia de 90-110 minutos, importante para o sabor amargo como mencionado anteriormente. Portanto a protease coagulante de *T. indicae-seudaticae* N31 exibe uma ação proteolítica na caseína muito promissora.

5.6 Produção dos queijos Prato

5.6.1 Rendimento e composição dos queijos

Foram feitos dois processamentos, um utilizando um coagulante comercial e outro utilizando a protease de *T. indicae-seudaticae* N31 que foi produzida por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato por 24 h. Após a fermentação, 1.116 mL de extrato enzimático, com 76 U/mL de atividade coagulante, foi concentrado por ultrafiltração em equipamento utilizando membrana de 10 kDa, para 112 mL com 668 U/mL de atividade coagulante.

A Tabela 8 mostra os resultados das análises físico-químicas do leite pasteurizado tipo B empregado na fabricação dos queijos.

Tabela 8. Análises dos leites utilizados na fabricação dos queijos. Os resultados representam a média dos valores encontrados para os lotes de leite A e B.

Análises	
Densidade (g/cm^3)	1,03 ± 0,00
Sólidos desengordurados (%)	8,71 ± 0,08
Gordura (%)	2,72 ± 0,37
Proteína (%)	3,18 ± 0,03
Água	0 ± 0
Ponto de congelamento (°H)	-0,52 ± 0,01

O rendimento das produções foi de 9,89 L de leite necessários para elaborar 1 kg de queijo com o coagulante comercial e de 10,46 L de leite necessários para elaborar 1 kg de queijo com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31, sendo bastante semelhantes.

A Tabela 9 apresenta os resultados da caracterização físico-química dos queijos durante o período de maturação.

Tabela 9. Composição dos queijos fabricados com coagulante comercial (H) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (T) durante a maturação.

Análises	Processos	Dias de Maturação				
		1	15	30	45	60
Acidez (%)	H	$0,60 \pm 0,05^{Bc}$	$1,05 \pm 0,15^{Ab}$	$1,12 \pm 0,13^{Bb}$	$1,38 \pm 0,16^{Ba}$	$1,55 \pm 0,17^{Ba}$
	T	$0,70 \pm 0,05^{Ae}$	$1,13 \pm 0,04^{Ad}$	$1,26 \pm 0,04^{Ac}$	$1,56 \pm 0,08^{Ab}$	$1,78 \pm 0,08^{Aa}$
pH	H	$5,34 \pm 0,05^{Aa}$	$5,25 \pm 0,16^{Aa}$	$5,33 \pm 0,10^{Aa}$	$5,26 \pm 0,05^{Aa}$	$5,35 \pm 0,11^{Aa}$
	T	$5,34 \pm 0,08^{Ab}$	$5,52 \pm 0,16^{Ba}$	$5,42 \pm 0,01^{Aab}$	$5,38 \pm 0,02^{Bab}$	$5,39 \pm 0,07^{Aab}$
Proteína Total (%)	H	$23,92 \pm 1,56^{Aa}$				
	T	$25,16 \pm 1,80^{Aa}$				
Gordura (%)	H	$25,92 \pm 1,20^{A}$				
	T	$25,83 \pm 1,69^{A}$				
Umidade (%)	H	$43,98 \pm 1,04^{A}$				
	T	$42,47 \pm 0,82^{B}$				
Cinzas (%)	H	$4,34 \pm 0,13^{B}$				
	T	$4,60 \pm 0,14^{A}$				
Sal (%)	H	$1,90 \pm 0,00^{B}$				
	T	$2,10 \pm 0,00^{A}$				
S/U* (%)	H	$0,44 \pm 0,01^{B}$				
	T	$0,50 \pm 0,02^{A}$				

Nd

$^{A, B}$ Letras iguais na mesma coluna, para as mesmas análises, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$);
$^{a, b, c, d, e}$ Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$);
Nd = não determinado (as análises de gordura, umidade, cinzas e sal foram determinadas apenas no primeiro dia de maturação);
* sal na umidade.

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram uma composição típica de queijo Prato maturado que, em média, é composto por umidade (42 a 46%), gordura (25 a 29%), sal (1,6 a 1,9%) e proteína (23 a 25%) (BRASIL, 1997; BALDINI, 1998; SPADOTI et al., 2003a; GUTIERREZ et al., 2004), indicando que a produção de queijo Prato com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 pode ser bem executada sob as condições convencionais de fabricação.

O teor de umidade dos queijos de ambos os processos, 43,98% para o queijo fabricado com coagulante comercial e 42,47% para o queijo fabricado com coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31, estão de acordo com a legislação que classifica o queijo Prato como de média umidade (36 a 46%) (BRASIL, 1997). Apesar de a umidade do queijo fabricado com coagulante comercial ser significativamente maior que a do queijo fabricado com coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31, os valores foram muito similares, não acarretando em problemas tecnológicos. A variação do teor de umidade pode estar relacionada à variações decorrentes da prensagem coletiva dos queijos, ou seja, quando os queijos são prensados uns sobre os outros, como foi o nosso caso, os que ficam em baixo recebem maior pressão e por isso são mais desidratados (GARCIA et al., 2009). Por isso que os queijos são invertidos após 30 minutos da primeira prensagem. Além disso, apesar da padronização da etapa da drenagem do soro, pode ter sido removido quantidades diferentes de soro afetando o conteúdo de umidade dos queijos do dois processos e também pode ter ocorrido falta de uniformidade na distribuição da massa nas formas, prejudicando a saída do soro (GARCIA et al., 2009). Valores similares de umidade em queijo Prato também foram encontrados por Spadoti; Dornellas; Roig (2005) (45,11% com 10 dias de estocagem), por Cichoscki et al. (2002) (41,91% com 7 dias de estocagem), por Moretti; Nabuco; Penna (2004) (42,27% com 3 dias de estocagem).

O queijo Prato integral é classificado como gordo por apresentar de 25 a 29% de gordura (GARCIA et al., 2009). Os teores de gordura dos queijos foram de aproximadamente 26% e não diferiram significativamente. Valores similares de gordura em queijo Prato também foram encontrados por Spadoti et al. (2003b) (25,2% com 10 dias de estocagem), por Narimatsu et al. (2003) (24,89% com 10 dias de estocagem), por Spadoti; Dornellas; Roig (2005) (25,30% com 10 dias de estocagem) ao utilizarem coalho de vitelo (90% quimosina). Já Folegatti (1994) e Baldini (1998) encontraram valores superiores de gordura, 31,87% com 1 dia de maturação e 30,46% com 6 dias de maturação, respectivamente, ao utilizarem coalho bovino (80% pepsina e 20% quimosina). Esses resultados mostram que provavelmente o tipo de coalho utilizado influencia o teor de gordura do queijo.

De acordo com Checchi (1999) o conteúdo de cinzas em produtos lácteos varia de 0,7 a 6,0% é constituída principalmente por cálcio, fósforo, sódio e enxofre. Os teores de cinzas dos queijos foram de 4,34% ± 0,13 para o processo com coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 e 4,60% ± 0,14 para o processo com coagulante comercial (Tabela 9), sendo que este teor foi significativamente maior. Estes valores são um pouco superiores aos reportados por Baldini (1998) de 3,72% com 1 dia de maturação, por Narimatsu et al. (2003) de 3,73% com 10 dias de estocagem.

A Tabela 9 mostra que houve um aumento da acidez para os queijos de ambos os processamentos durante os 60 dias de maturação, provavelmente devido ao acúmulo de produtos de degradação da lactose como o ácido lático e outros ácidos voláteis (NAGARAJA et al., 1979). O perfil da evolução da acidez foi similar para ambos os queijos, apesar de os teores serem significativamente maiores para aquele fabricado com o coagulante de *T. indicae-seudaticae* N31, com exceção do 15° dia, onde não há diferença entre os dois processamentos (Tabela 9). Aumento contínuo da acidez durante a maturação também foi observado no trabalho de El-Tanboly; El-Hofi; Ismail (2000) para queijos Gouda fabricados tanto com coagulante comercial (Ha-la) quanto microbiano (*Mucor miehei* NRRL 3169) e no trabalho de Cichoscki et al. (2002) ao estudar 60 dias de maturação do queijo Prato produzido com coalho animal. No trabalho de Narimatsu et al. (2003) também foi observado aumento da acidez durante os 45 dias analisados de maturação no queijo Prato fabricado com coalho de vitelo.

A diminuição nos valores de pH para os processamentos mostrado na Tabela 9 está relacionado à fermentação da lactose do queijo conforme mencionado acima, o que é importante para prevenir crescimento de bactérias patogênicas. Além disso, a variação do pH ao longo da maturação também depende da capacidade tamponante do queijo, devido à quantidade de proteínas e sais minerais presentes (Narimatsu et al., 2003), à formação de NH_3 e/ou ao catabolismo do ácido láctico (FOX, 1989).

5.6.2 Avaliação da proteólise: evolução do nitrogênio solúvel

A Figura 30 mostra a evolução do índice de extensão da maturação (NS-pH 4,6/NT*100) e do índice de profundiade da maturação (NS-TCA 12%/NT*100) dos queijos, que são determinações importantes para a avaliação do comportamento do coalho e das

peptidases do fermento láctico e de bactérias contaminantes, respectivamente, durante a maturação. Observa-se que houve aumento dos índices para ambos os processos, o que está de acordo com a literatura (McWEENEY; FOX, 1997).

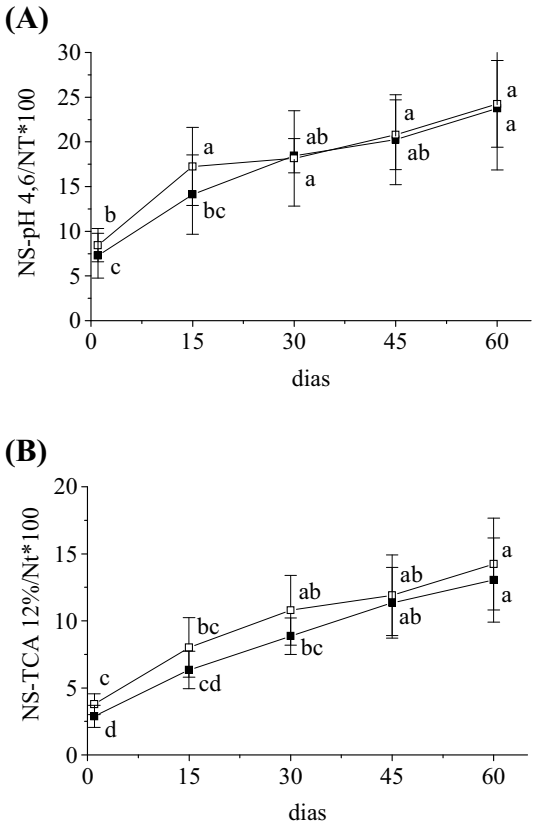


Figura 30. Evolução dos índices de maturação, NS-pH 4,6/NT*100 **(A)** e NS-TCA 12%/NT*100 **(B)**, dos queijos fabricados com coagulante comercial (□) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (■) durante a maturação. [a, b, c, d] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

De acordo com os resultados do teste-F da ANOVA, mostrados na Tabela 10, o tempo afetou significativamente os índices de maturação dos queijos ($p < 0,01$), o que já era esperado pois para haver maturação esses índices precisam aumentar ao longo do tempo. Observa-se também que os tratamentos não afetaram significativamente o IEM sugerindo que a protease do *T. indicae-seudaticae* N31 causou o mesmo tipo de proteólise que o coagulante comercial. Entretanto observa-se que os tratamentos afetaram o IPM ($p < 0,05$) porém, ao realizar comparação de médias pelo teste de tukey, não observou-se diferença do IPM entre os tratamentos. Nota-se ainda que a interação entre os tratamentos e o tempo de maturação não afetou significativamente os índices, indicando que a proteólise aumenta ao longo do tempo

da mesma maneira nos queijos produzidos com o coaguante comercial e com a protease do *T. indicae-seudaticae* N31.

Tabela 10. Efeito dos tratamentos e do tempo de maturação sobre os índices de extensão (IEM) e profundidade (IPM) da maturação.

Causas de Variação	GL	F	
		IEM	IPM
Tratamento*	1	0,7886 ^{NS}	4,1020 *
Tempo	4	22,6678 **	34,9906 **
Tratamento x Tempo	4	0,2570 ^{NS}	0,1880 ^{NS}

*Uso do coagulante comercial e da protease do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

Aumento do IEM e IPM durante a maturação de queijo Prato também foi observado por Folegatti (1994), Baldini (1998), Narimatsu et al. (2003), Gorostiza et al. (2004), Moretti; Nabuco; Penna (2004), Garcia et al. (2009).

Como a evolução do NS-pH 4,6/NT*100 não foi significativamente diferente para os queijos produzidos com cada coagulante em nosso estudo, esperava-se um perfil de hidrólise similar da α_{s1}-caseína nesses queijos, porém isso não foi observado como mostra a eletroforese na Figura 30B (página 106) o que provavelmente ocorreu pela ação diferente dos coagulantes devido ao pH e à temperatura de maturação, como mencionado anteriormente.

No queijo Cheddar, o peptídeo α_{s1}-CN f1-23 é posteriomente hidrolisado por proteinases de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* em peptídeos menores (SINGH; DRAKE; CADWALLADER, 2003). Como o queijo Prato também foi produzido com essa espécie de cultura iniciadora, é provável que essa hidrólise também tenha ocorrido, afetando o IPM.

5.6.3 Avaliação da proteólise: uréia-PAGE e RP-HPLC

A Figura 31 mostra os resultados da eletroforese. Na Figura 31A, dois grandes grupos de caseínas foram identificados no uréia-PAGE: α_{s1}-caseína, com maior mobilidade e β-caseína, com menor mobilidade eletroforética (SILVA; MALCATA, 2004). Observa-se também a região da família α_{s2}-caseína, cujas mobilidades eletroforéticas se situam entre as caseínas α_{s1} e β (SGARBIERI, 2005).

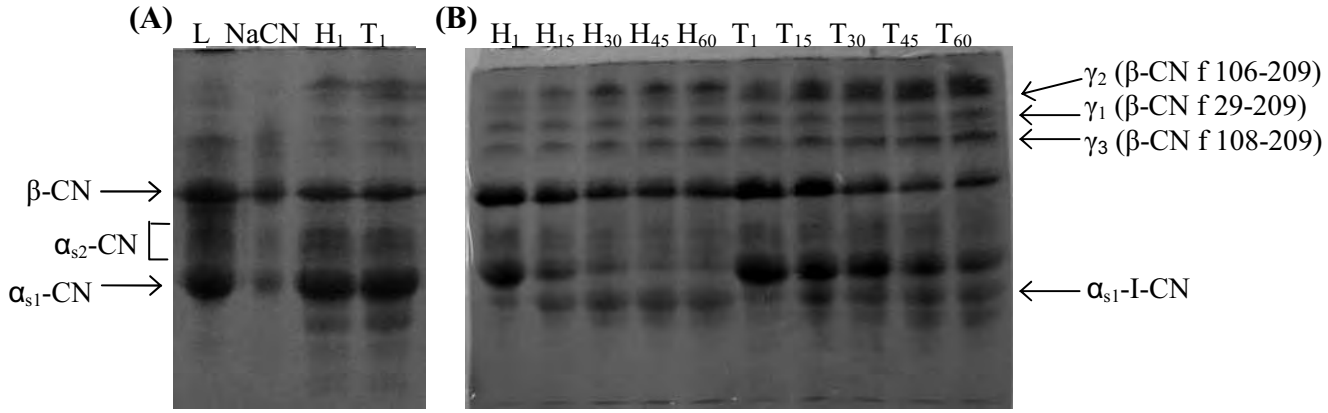


Figura 31. Eletroforese em gel de poliacrilamida (uréia-PAGE) da caseína. **(A)**: perfil eletroforético do leite (L), do caseinato de sódio bovino (NaCN) e dos primeiros dias de maturação do queijos Prato (H_1 e T_1). **(B)**: perfil de degradação da caseína dos queijos Prato durante 60 dias de maturação. H representa os queijos fabricados com coagulante comercial e T os queijos produzidos com o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

A Figura 31B mostra a degradação das caseínas dos queijos produzidos com o coagulante comercial (H_1 a H_{60}) e com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 (T_1 a T_{60}) durante os 60 dias de maturação. Nota-se degradação da α_{s1}-caseína, mais acentuada para os queijos produzidos com coagulante comercial, mostrando que a quebra das moléculas de caseína é específica para o tipo de coagulante utilizado (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). Nota-se também degradação da β-caseína, mais acentuada nos queijos produzidos com o coagulante do *T. indicae-seudaticae N31*, com formação de seus produtos de hidrólise, as frações γ, as quais vão acumulando no queijo (SINGH; DRAKE; CADWALLADER, 2003). Observa-se ainda que a fração α_{s2}-CN também é degradada, de maneira similar para ambos os

queijos. De acordo com Grappin; Rank; Olson (1985) essa fração é bastante resistente à quimosina e sua degradação estaria relacionada à plasmina, cujos substratos preferidos são as frações β- CN e α_{s2}-CN (BALDINI, 1998), entretanto os produtos de degradação da α_{s2} não foram ainda identificados pela comunidade científica (FOX, 1989).

Resultados similares de maior degradação da α_{s1}-CN e menor degradação da β-CN também foram encontrados por Folegatti (1994) sendo que a maior degradação da fração α_{s1}-caseína ocorreu nos queijos Prato produzidos com coalho bovino, seguido pelos queijos produzidos com coalhos de vitelo e o obtido por fermentação. Essa tendência também foi relatada por Gorostiza et al. (2004) ao estudar o queijo Prato, por Irigoyen et al. (2001) ao estudar queijo ovino feito com renina de cordeiro, por Bansal et al. (2009) ao estudar queijo Cheddar feito com quimosina de camelo ou bezerro produzidas por fermentação e por Silva; Malcata (2004) ao estudar queijo ovino feito com coagulante de *Cynara cardunculus*. Edwards; Kosikowski (1969) também encontraram diferença de ação na α_{s1}-CN por diferentes coagulantes. Os autores verificaram que houve maior degradação nos queijos Cheddar produzidos com coalho de vitelo, seguido dos coagulantes microbianos de *Mucor* e por último *Endothia*. Assim, observamos que os próprios coagulantes comerciais disponíveis no mercado atuam de modo diferente nas caseínas dos queijos. O importante é que essa ação diferenciada não afete o produto tecnologicamente de maneira que ele venha a desenvolver normalmente suas características típicas de sabor, aroma, textura, etc.

A Figura 32 mostra os resultados das análises de RP-HPLC para as frações de queijos solúveis em pH 4,6. A fração de queijo solúvel em pH 4,6 é produzida principalmente pelo coagulante residual já que os produtos provenientes da ação da plasmina, como as proteose-peptonas, são solúveis em pH 4,6 mas contribuem muito pouco para o NS-pH 4,6 e as γ-caseínas são insolúveis em pH 4,6 (McSWEENEY; FOX, 1997). Os cromatogramas obtidos, usando absorbância a 214 nm como sistema de detecção (comprimento de onda na qual ligações peptídicas absorvem), se mostraram muito complexos com vários picos e diferenças quantitativas entre os perfis de peptídeos de ambos os processos durante o progresso da maturação, sendo observado aumento da intensidade de alguns e diminuição da intensidade de outros. O maior número de picos nos cromatogramas T pode representar produtos de hidrólises não conhecidas já que a α_{s1}-CN foi menos hidrolisada nesse sistema ou pode ainda representar produtos de hidrólise da β-CN, que foi mais hidrolisada nesse sistema, como mostrado na eletroforese da Figura 31B. Novamente, o importante é que essa ação diferenciada não afete o produto tecnologicamente.

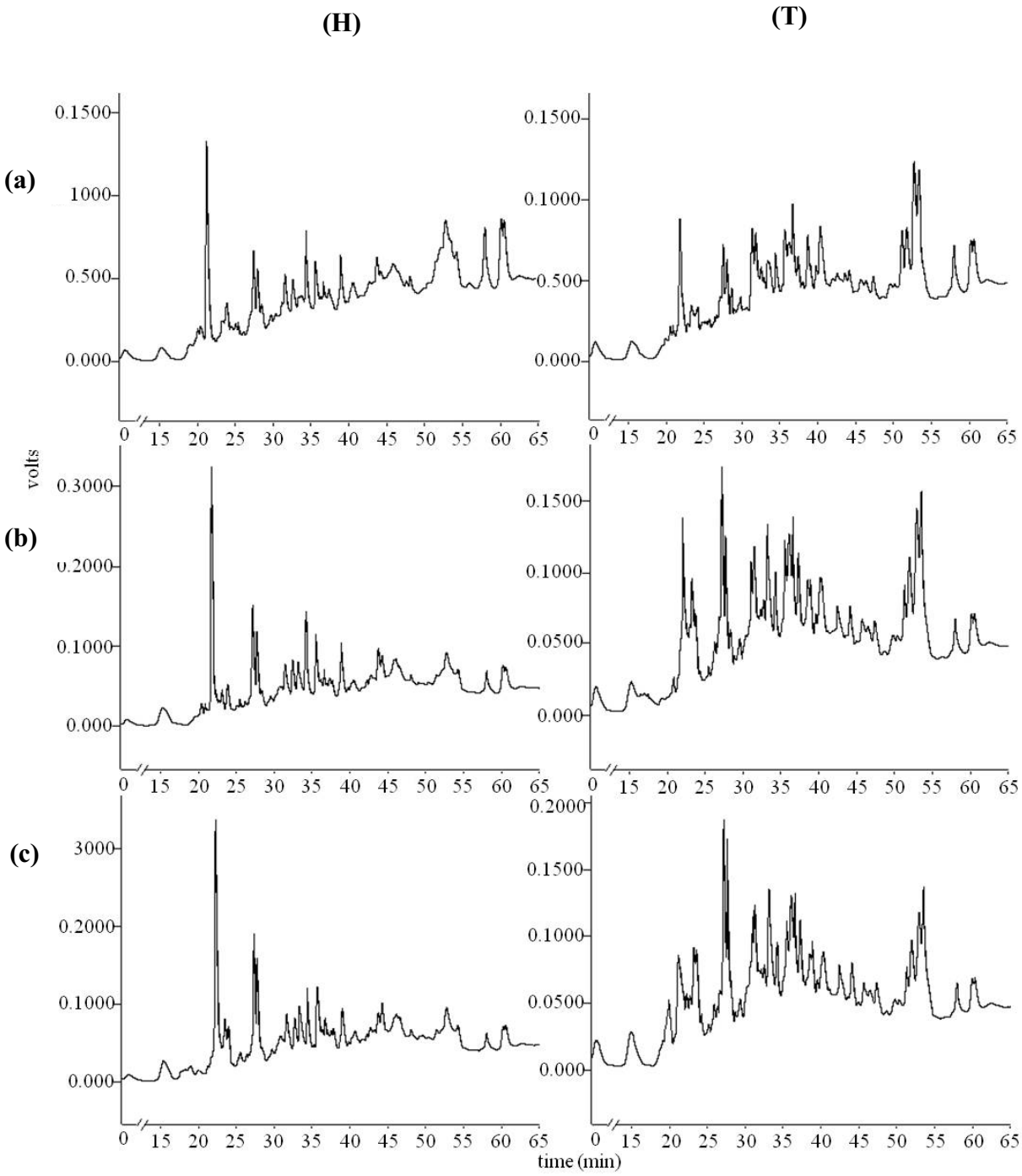


Figura 32. Perfil de eluição em RP-HPLC das frações nitrogenadas solúveis em pH 4,6 dos queijos fabricados com o coagulante comercial **(H)** e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 **(T)** com 1 **(a)**, 30 **(b)** e 60 **(c)** dias de maturação.

Apesar de algumas diferenças quantitativas entre os perfis de ambos os processos, um comportamento similar é notado: os peptídeos aumentam fortemente nos primeiros 30 dias e depois permanecem praticamente inalterados nos últimos 30 dias. Esses resultados estão de acordo com as determinações do IEM (NS-pH 4,6/NT*100) discutidas anteriormente: nos queijos produzidos com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31, o nitrogênio solúvel em

pH 4,6 aumentou intensamente a partir do primeiro dia até o 15° dia seguido de estabilização e os queijos produzidos com o coagulante comercial, o nitrogênio solúvel em pH 4,6 aumentou a partir do primeiro dia até o 30° seguido de estabilização (Figura 30A, página 105). As análises em RP-HPLC da fração solúvel em pH 4,6 se mostraram como uma ferramenta importante para complementar as determinações do nitrogênio solúvel em pH 4,6.

5.6.4 Capacidade de derretimento

A Figura 33 mostra a capacidade de derretimento dos queijos ao longo da maturação. Houve um intenso aumento da capacidade de derretimento nos primeiros 30 dias de maturação seguido de uma tendência à estabilização nos últimos 30 dias para ambos os processamentos. De acordo com o teste-F da ANOVA (Tabela 11) o tempo realmente afetou significativamente a capacidade de derretimento dos queijos ($p < 0,01$) o que era esperado já que o derretimento tende a ser maior quando a degradação de proteínas aumenta pois a proteólise favorece a hidratação da matriz caséica (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). A hidrólise de ligações peptídicas libera 2 novos grupos carregados (NH_3^+/COO^-) que competem pela água (O'MAHONY, LUCEY, McSWEENEY, 2005) favorecendo então interações proteína-água no queijo em detrimento das interações proteína-proteína, resultando na perda da habilidade de manter a estrutura do queijo durante aquecimento permintindo aos quejios derreterem mais facilmente (SPADOTI et al., 2003b). Portanto, devido às mudanças nas interações proteína-proteína e proteína-umidade e à proteólise mais intensa nos primeiros 30 dias de maturação (mostrados pela evolução dos teores de nitrogênio solúvel, pela eletroforese e nos cromatogramas da análise em HPLC), é neste período que observa-se aumento significativo na capacidade de derretimento dos queijos em nosso trabalho. Aumento da capacidade de derretimento ao longo da maturação também foi encontrado por outros autores ao estudar o queijo Prato (SPADOTI et al., 2003b, NARIMATSU et al., 2003; NONOGAKI; MONTEIRO; GIGANTE, 2007; DE RENSIS; PETENATE; VIOTTO, 2009).

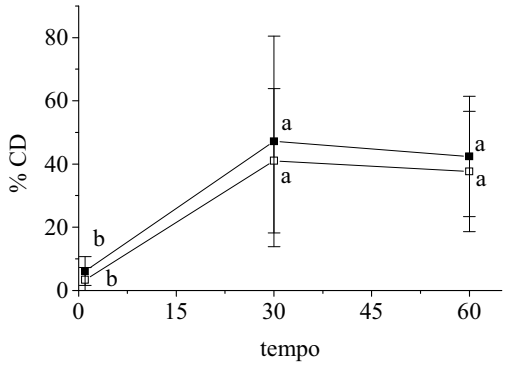


Figura 33. Capacidade de derretimento (%) durante a maturação dos queijos fabricados com o coagulante comercial (□) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (■). [a, b] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Tabela 11. Efeito dos tratamentos e do tempo de maturação sobre a capacidade de derretimento.

Causas de Variação	GL	F
Tratamento*	1	0,7777 ^{NS}
Tempo	2	23,4763 **
Tratamento x Tempo	2	0,0365 ^{NS}

*Uso do coagulante comercial e da protease do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

Ainda de acordo com os resultados do teste-F da ANOVA (Tabela 11) observa-se que os tratamentos não afetaram significativamente a capacidade de derretimento, sugerindo que a protease do *T. indicae-seudaticae* N31 e o coagulante comercial tiveram o mesmo efeito no derretimento. Entretanto, apesar de não haver diferença significativa da capacidade de derretimento entre os processamentos para os mesmos períodos, o valor obtido para o processamento T (6,11%) é quase o dobro do valor para o processamento H (3,37%). Além disso, os valores dos desvios padrão estão extremamente altos. Isso provavelmente reflete a falta de uniformidade e homogeneidade das amostras de queijos já que trabalhamos com pouca amostra (queijos pequenos, aproximadamente 250 g). Nota-se também que a interação entre os tratamentos e o tempo de maturação não afetou significativamente a capacidade de derretimento, indicando que ela aumenta ao longo do tempo da mesma maneira nos queijos produzidos com o coaguante comercial e com a protease do *T. indicae-seudaticae* N31.

5.6.5 Análises do perfil de textura

Os resultados da caracterização do perfil de textura dos processamentos dos queijos estão apresentados na Tabela 12. Dentre os atributos avaliados no estudo do perfil de textura instrumental (TPA), apresentamos os resultados para dureza, elasticidade e coesividade.

Tabela 12. Parâmetros de textura durante a maturação dos queijos fabricados com coagulante comercial (H) e com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (T).

Análise	Processamento	Dias de Maturação		
		1	30	60
Dureza (g_f)	H	4292,17 ± 3279,23[a]	5091,84 ± 4251,20[a]	9629,17 ± 4363,43[a]
	T	5274,19 ± 931,59[a]	4837,90 ± 4221,38[a]	9658,66 ± 3378,33[a]
Elasticidade	H	0,95 ± 0,06[a]	0,91 ± 0,03[a]	0,89 ± 0,05[a]
	T	0,88 ± 0,05[ab]	0,92 ± 0,04[a]	0,81 ± 0,06[b]
Coesividade	H	0,82 ± 0,01[a]	0,75 ± 0,05[ab]	0,65 ± 0,12[b]
	T	0,80 ± 0,03[a]	0,74 ± 0,04[ab]	0,64 ± 0,10[b]

[a, b] Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

A Tabela 13 mostra os resultados para o teste-F da ANOVA. Observa-se que os tratamentos não afetaram os parâmetros com exceção da elasticidade ($p < 0,05$), porém, ao realizar comparação de médias pelo teste de tukey, não observou-se diferença da elasticidade entre os tratamentos. Observa-se que o tempo de maturação afetou todos os parametros e que a interação entre os tratamentos e o tempo de maturação não afetou significativamente os parametros sugerindo que os parâmetros variaram ao longo do tempo da mesma maneira nos queijos produzidos com o coaguante comercial e com a protease do *T. indicae-seudaticae* N31.

Tabela 13. Efeito dos tratamentos e do tempo de maturação sobre os parâmetros de textura.

Causas de Variação	GL	F		
		Dureza	Elasticidade	Coesividade
Tratamento*	1	0,0294 ^{NS}	7,0497 *	0,2053 ^{NS}
Tempo	2	4,6741 *	5,0853 *	10,8874 **
Tratamento x Tempo	2	0,0645 ^{NS}	2,1261 ^{NS}	0,0104 ^{NS}

*Uso do coagulante comercial e da protease do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

Os resultados para dureza, além de apresentarem grande variação, mostraram que houve aumento deste parâmetro ao longo da maturação para os dois coagulantes, apesar de estatisticamente os valores serem iguais. Devido à proteólise que ocorre no queijo, especialmente a hidrólise da α_{s1}-CN, ocorre um enfraquecimento na matriz protéica logo no início da maturação e isso afeta diretamente a dureza, que tende a diminuir com o tempo (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). Nossos resultados provavelmente refletem a falta de uniformidade e homogeneidade das amostras de queijos e a necessidade de se trabalhar com maior quantidade de amostras, ou seja, queijos maiores.

A elasticidade, na análise instrumental de textura, está relacionada com a velocidade na qual um material deformado volta à condição não deformada, depois que a força de deformação é removida (GARCIA, 2007). A elasticidade não se alterou significativamente nos queijos produzidos com o coagulante comercial durante a maturação. Já para o coagulante do *Thermomucor*, houve diferença significativa da elasticidade entre os 30° e 60° dias, mas ambos os valores foram iguais ao valor do 1°dia. Portanto, a velocidade na qual os queijos voltaram ao normal após a compressão no texturômetro não mudou com a maturação.

A coesividade, na análise instrumental de textura, representa o quanto um material pode ser deformado antes de se romper (GARCIA, 2007). Para o parâmetro coesividade, houve diferença significativa para os queijos para ambos os coagulantes a partir do 30° dia de maturação, onde se observou diminuição dos valores. Garcia (2007) também verificou diminuição da coesividade a partir do 30° dia. Portanto os queijos tornaram-se menos coesos, ou seja, mais fraturáveis. Diminuição da coesividade do queijo Prato também foi observada por Baldini (1998) e Augusto (2003).

6. Conclusões

- O microrganismo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi capaz de se desenvolver em condições estacionárias utilizando farelo de trigo, resíduo agroindustrial de baixo custo e secretar extracelularmente a enzima, em curto período de tempo (24 horas), mostrando-se então promissor para este processo fermentativo;
- O extrato enzimático bruto exibiu forte atividade coagulante e baixa atividade proteolítica e baixa ação hidrolítica sobre as caseínas do leite;
- Foi possível isolar a protease aspártica do extrato enzimático bruto através de técnicas tradicionais de purificação;
- A enzima purificada também apresentou baixa ação hidrolítica sobre as caseínas do leite;
- O queijo Prato produzido com o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 apresentou composição característica deste tipo de queijo;
- Os índices de proteólise (IEM e IPM) dos queijos produzidos com a protease do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 não diferiram significativamente dos obtidos para os queijos produzidos com o coagulante comercial, sugerindo que a protease do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 matura o queijo Prato da mesma forma que o coagulante comercial;
- A hidrólise das caseínas ao longo da maturação nos queijos produzidos com os coagulantes apresentou algumas diferenças qualitativas como observado na uréia-PAGE e nos perfis de peptídeos da fração de nitrogênio solúvel em pH 4,6 obtidos após HPLC;
- Apesar de os queijos produzidos com a protease do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 terem apresentado alguns resultados diferentes daqueles produzidos com o coagulante comercial, a produção de queijo Prato pôde ser bem executada sob as condições convencionais de fabricação e sugerem que o coagulante realmente tenha potencial tecnológico para ser aplicado como substituto de coalho.

7. Referências Bibliográficas

ABDEL-FATTAH, A. F.; MABROUK S. S.; EL-HAWWARY, N. M. Production and some properties of rennin-like milk-clotting enzyme from *Penicillium citrinum*. **Journal of General Microbiology**, v. 70, p. 151-155, 1972.

ACERES, L. B. et al. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 37, p. 283-294, 1992.

AGEITOS, J. M. et al. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2205-2213, 2007.

AHMED, I. A. M. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. **Food Chemistry**, v. 116, p. 395-400, 2009.

ALESSANDRO, M.; FEDERICO, F. Partial purification and characterization of a yeast extracellular acid protease. **Journal of Dairy Science,** v. 63, p. 1397-1402, 1980.

ANDRÉN, A. Rennets and Coagulants In Encyclopedia of Dairy Sciences, **Academic Press**, London, p. 281-286.

ANEMA, S. G.; LEE S. K.; KLOSTERMEYER, H. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ-casein and the gelation of skim milk by chymosin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 99-106, 2005.

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var *lindt*. **Methods in Enzymology**, v. 19, p. 446-459, 1970.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Dairy Products. In: _____. **Official Methods of Analysis**. 16. ed. Arlington, 1997.

AUGUSTO,M. M. M. **Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo Prato.** 2003. 190f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação**. 1998. 206f. (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BANSAL, N. et al. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 510-517, 2009.

BANSAL, N.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Factors affecting the retention of rennet in cheese curd. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9219-9225, 2007.

BERMINGHAM, S.; MALTBY, L.; COOKE, R. C. A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. **Mycological Research**, v. 99, p. 479-484, 1995.

BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Eletrophoresis, v. 8, p. 93-99, 1987.

BRASIL. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,** Poder Executivo, Brasília, DF, 8 set. 1997. n. 172, p. 19690.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico identidade e qualidade de leite pasteurizado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,** Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set. 2002.

BRUNO, M. A. et al. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 695-701, 2010.

CASE, R. A.; BRADLEY JR., R. L.; WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 15. ed. Washington, 1985. p. 327-404.

CAVALCANTI, M. T. H. et al. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiopsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 29-35, 2004.

CAVALCANTI, M. T. H. et al. Milk-clotting protease production by *Nocardiopsis* sp. in an inexpensive medium. **World Journal of Microbiology and Technology**, v. 21, p. 151-154, 2005.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Ed. da Unicamp, 1999.

CHANNE, P. S.; SHEWALE, J. G. Influence of culture conditions on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. **World Journal of Microbiology and Technology**, v. 14, p. 11-15, 1998.

CHARCOSSET, J. Y.; CHAUVET, E. Effect of culture conditions on ergosterol as an indicator of biomass in the aquatic hyphomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2051-2055, 2001.

CHITPINITYOL, S.; CRABBE, M. J. Chymosin and aspartic proteinases. **Food Chemistry**, v. 61, p. 395-418, 1997.

CICHOSCKI, A. J. et al. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v. 13, p. 329-336, 2002.

DALGLEISH, D. G.; SPAGNUOLO, P. A.; GOFF, H. D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. **International Dairy Journal,** .v 14, p. 1025-1031, 2004.

D'AMBROSIO, A. et al. Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida.* **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 22, p. 145-150, 2003.

De RENSIS, C. M. V. B.; PETENATE, A. J.; VIOTTO, W. H. Caracterização físico-química, reológica e sensorial de queijos tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos***,* v. 29, p. 488-494, 2009.

DJAJAKIRANA, G.; JOERGENSEN, R. G.; MEYER, B. Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. **Biol Fertil Soils**, v. 22, p. 299-304, 1996.

DUTT, K. et al. Production of milk-clotting protease from *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 761-772, 2009.

EDWARDS, J. L.; KOSIKOWSKI, F. V. Electrophoretic proteolytic patterns in cheddar cheese by rennet and fungal rennets: their significance to international classification of cheese varieties. **Journal of Dairy Science**, v. 52, p. 1675-1678, 1969.

EGITO, A. S. et al. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. **International Dairy Journal**, v; 17, p. 816-825, 2007.

EL-BENDARY, M. A.; MOHARAM, M. E.; ALI, T. H. Purification and Characterization of milk clotting enzymes produced by *Bacillus sphaericus*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, p. 695-699, 2007.

EL-TANBOLY, E.; EL-HOFI, M. A.; ISMAIL, A. Changes of proteolytic and lipolytic activities during ripening of Gouda cheese prepared with fungal rennet substitute. **Milchwissenchaft**, v. 55, p. 624-628, 2000.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite. http://www.cnpgl.embrapa.br. Última consulta em 27 de agosto 2010.

FARKYE, N. Y.; FOX, P. F. Objective indices of cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, v. 1, p. 37-40, 1990.

FARRELL, 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. P. 135-147, 2006.

FERNANDEZ-LAHORE, H. M. et al. Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. **Journal of Peptide Research**, v . 53, p. 599-605, 1999.

FOLEGATTI, M. I. S. **Avaliação do uso de quimosina produzida por *Aspergillus niger* var. *awamori* na fabricação de queijo tipo Prato**. 1994. 65f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

FOX, P. F. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1379-1400, 1989.

GALLAGHER, J.; KANEKANIAN, A. D.; EVANS, E. P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, p. 279-285, 1994.

GARCÍA, D. M. et al. Characterization of the proteinases secreted by *Sarocladium oryzae*. **Biotecnología Aplicada**, v. 20, p. 170-172, 2003.

GARCIA, G. A. C. **Efeito do uso de enzimas proteolíticas na maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura.** 2007. 154f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2007.

GARCIA, G. A. C. et al. Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica fastuosaína. **Brazilian Journal of Food Technology,** VII BMCFB, p. 69-77, 2009.

GERMANO et al. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246-251, 2003.

GESSNER, M. O.; CHAUVET, E. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 502-507, 1993.

GESSNER, M. O.; NEWELL, S. Y. Biomass, growth rate, and production of filamentous fungi in plant litter. In: C.J. HURST, R.L. CRAWFORD, G. KNUDSEN, M. MCINERNEY, L. D. STETZENBACH, Manual of Environmental Microbiology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, p. 390-408, 2002.

GONZÁLEZ, V. et al. Influência do tamanho da amostra e da lubrificação na determinação da textura de queijo tipo Minas Frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. **Anais ...** Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. v. 3, p. 2067-2069.

GOROSTIZA, A. et al. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. **Food Chemistry,** v. 85, p. 407-414, 2004.

GRAPPIN, R.; RANK, T. C.; OLSON, N. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 531-540, 1985.

GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 45, p. 94-104, 1992.

GUTIERREZ, E. M. R. et al. Efeito da radiação gama nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo prato durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v. 24, p. 596-601, 2004.

HARBOE, M.; BUDTZ, P. Producción, acción y aplicación de cuajo y coagulantes. In LAW, B. A. **Technology of Cheesemaking**. Sheffield: Sheffield Academic Press Ltd., 1999.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry***,* v. 48, p. 422-427, 1972.

HASHEM A. M. Optimization of milk-clotting productivity by *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 203-207, 1999.

HASHEM, A. M. Purification and properties of a milk-clotting enzymes produced by *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 219-222, 2000.

HORNE, D. S. Casein interactions: casting light on the *black boxes*, the structure in dairy products. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 171-177, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo, 1985.

IRIGOYEN, A. et al. Influence of calf or lamb rennet on the physicochemical, proteolytic, and sensory characteristics of an ewe's milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 27-34, 2007.

KEMBHAVI, A. A.; KULKARNI, A.; PANTI, A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM N° 64. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, n. 1-2, p. 83-92, 1993.

KHAN, M. R.; BLAIN, J. A.; PATTERSON, J. D. E. Extracellular Proteases of *Mucor pusillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 719-724, 1979.

KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3. ed. Ann Arbor: Edwards Bros., 1997.

KUCHROO, C. N.; FOX, P. F. Fractionation of the water soluble-nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods. **Milchwissinschaft**, v. 37, n. 11, p. 651-653, 1982.

KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1701-1705, 2005.

KUMAR et al. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B,** v. 145, p. 108-113, 2006).

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARSON, M. K.; WHITAKER, J. R. *Endothia parasitica* protease. Parameters affecting activity of the rennin-like enzyme. **Journal of Dairy Science**, v. 53, p. 253-260, 1970.

LAW, B. A. **Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk**, 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 1-6.

LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1748-1760, 1987.

LEATHERBARROW, R. J. Grafit Version 5.0. Staines, UK: Erithacus Software Ltd., 1992.

LEE, K. D., & WARTHESEN, J. J. Mobile phases in reversed-phase HPLC for the determination of bitter peptides in cheese. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 291-294, 1996.

LI, D.C.; YANG, Y. J.; SHEN, C. Y. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycological Research**, v. 101, n. 1, p. 18-22, 1997.

LLORENTE, B. E.; BRUTTI, C. B.; CAFFINI, B. O. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8182-8189, 2004.

LONSANE, B. K. et al. Scale up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 259-273, 1992.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 30433-30437, 2008.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2725-2743, 2003.

MACCHIONE, M. M. et al. Protease production by different thermophilic fungi. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 146, p. 223-230, 2008.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 127-144, 2004.

McSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. **Lait**, v. 77, p. 41-76, 1997.

MEDYANTSEVA, E. P.; VERTLIB, M. G.; BUDNIKOV, G. K. Metal ions as enzyme effectors. **Russian Chemical Reviews**, v. 67, p. 225-232, 1998.

MERHEB, C. W. et al. Partial characterization of protease from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127-131, 2007.

MERHEB-DINI, C. et al. (a) Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9210-9217, 2009.

MERHEB-DINI, C. et al. (b) Production and characterization of a milk clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, p. 87-93, 2010.

MESROB, B. K.; STOEVA, S. T. P.; VASSILEVA, R. A. Purification of milk-clotting protease from *Bacillus mesentericus* strain 76. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 11, p. 340-344, 1978.

MILLE-LINDBLOM, C.; VON WACHENFELDT, E.; TRANVIK, L. J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. **Journal of Microbiological Methods,** v. 59, p. 253-262, 2004.
MONTGOMERY, H. J. et al. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1207-1217, 2000.

MORAES, R. J. Q. et al. Dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em milho armazenado. **Arq. Inst. Biol,** v. 70, p. 483-489, 2003.

MORETTI, B. R.; NABUCO, A. C.; PENNA, A. L. B. Evolução dos índices de maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes",** v. 59, p. 363-366, 2004.

MOSCHOPOULOU, E. E. et al. Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 49-57, 2006.

NAGARAJA, K.S. et al. Changes during manufacture and ripening of cheddar cheese prepared with fungal rennet substitute of *Rhizopus oligosporus*. **Die Nahrung**, v. 23, p. 621-626, 1979.

NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3. ed. NY: Academic Press Inc., 1993.

NARIMATSU, A. et al. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, p. 177-182, 2003.

NELSON, J. H. Impact o f new milk clotting enzymes on cheese technology. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 1739-1750, 1975.

NEVES-SOUZA, R. D.; SILVA, R.S. S. F. Estudo de custo-rendimento do processamento de queijos tipo minas frescal com derivado de soja e diferentes agentes coagulantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 170-174, 2005.

NEWELL, S. Y.; ARSUFFI, T. L.; FALLON, R. D. Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 54, p. 1876-1879, 1988.

NEWELL, S. Y.; MILLER, J. D.; FALLON, R. D. Ergosterol content of salt-marsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. **Mycologia**, v. 79, p. 688-695, 1987.

NIEMENMAA, O.; GALKIN, S.; HATKKA, A. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation,** v. 62, p. 125-134, 2008.

NONOGAKI, C. O.; MONTEIRO, V. S.; GIGANTE, M. L. Metodologia para avaliar a capacidade de derretimento de queijo Prato. **Brazilian Journal of Food Technology,** v. 10, p. 71-77, 2007.

NOUANI, A. et al. (a) Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. **Journal of Food Technology**, v. 1, p. 20-29, 2009.

NOUANI, A. et al. (b) Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 112-117, 2009.

NOUT, M. J. R. et al. Ergosterol content of *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 grown in liquid and solid substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 456-461, 1987.

O'MAHONY, J. A.; LUCEY, J. A.; McSWEENEY, P. L. H. Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3101-3114, 2005.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 81-84, 2003.

PASANEN, A. L. et al. Ergosterol Content in Various Fungal Species and Biocontaminated Building Materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 138-142, 1999.

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

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. p. 1-196.

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

PIRES M. S.; ORELLANA G. A.; GATTI, C. A. Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: action of Ca^{2+} and pH. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 3, p.235-238, 1999.

POLGÁR, L. **Mechanisms of Protease Action**. Florida: CRC Press, Inc., 1989. p. 68-70**.**

POZA, M. et al. Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus Xanthus* strain 422. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 691-698, 2003.

PREETHA, S.; BOOPATHY, R. Influence of culture conditions on the production of milk-clotting enzyme from *Rhizomucor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 527-530, 1994.

PREETHA, S.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor* miehi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13, p. 573-578, 1997.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RAPOSO, S.; DOMINGOS, A. Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 139-144, 2008.

RICHARDSON, M. D.; LOGENDRA, S. Ergosterol as an indicator of endophyte biomass in grass seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3903-3907, 1997.

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Cheesemaking Practice**, 3. ed. NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1998.

ROCCO, A. G. et al. Characterization of the protein unfolding processes induced by urea and temperature. **Biophysical Journal**, v. 94, p. 2241-2251, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual** 3. ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SARDINAS, J. L. Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 248-255, 1968.

SATHYA, R. et al. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 788-794, 2009.

SAWYER, W. H. Complex between β-lactoglobulin and κ-casein. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 52, p. 1347-1355, 1969.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. Volume 2. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 247-270.

SCHNÜRER, J. Comparison of Methods for Estimating the Biomass of Three Food-Borne Fungi with Different Growth Patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 552-555, 1993.

SEITZ, L. M. et al. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v. 69, p. 1202-1203,1979.

SERRES, L.; AMARIGLIO, S.; PETRANSXIENE, D. **Contrôle de la qualité des produtits laitiers**. Ministère de l'Agriculture. Direction des Services Vétérinaires. Tome I. Analyse Physique et Chimiquie (Chimie VII – 6), 1973.

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

SENTHILKUMAR, S.; RAMASAMY, D.; SUBRAMANIAN, S. Isolation and partial characterization of milk-clotting aspartic protease from *Streblus asper*. **Food Science and Technology Internatinal**, v. 12, p. 103-109, 2006.

SHALABI, S. I.; FOX, P. F. (1987). Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. **Irish Journal of Food Science Technology***, 11*, 135-151.

SHATA, H. M. A. Extraction of Milk-clotting Enzyme Produced by Solid State Fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, p. 241-247, 2005.

SIDRACH, L. et al. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus L.*): enzymatic properties of cynarase A. **Phytochemistry**, v. 66, p. 41-49, 2005.

SILVA, A. T. **Maturação do queijo tipo Prato: Influência da adição de enzimas proteolíticas no processo**. Campinas, 1998. 119p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1998.

SILVA, E. M.; MACHUCA, A., MILAGRES, A. M. F. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 161-164, 2005.

SILVA, P. H. F. et al. **Físico-química do leite e derivados:** métodos analíticos. Juiz de Fora: Oficina de Impressão, 1997.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. (2004). Influence of the coagulant level on early proteolysis in ovine cheese-like system made with sterilized milk and *Cynara cardunculus.* **Journal of Food Science***, 69*, 579-584.

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

SILVEIRA, G. G. et al. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 931-937, 2005.

SINGH, T. K.; DRAKE, M. A.; CADWALLADER, K. R. Flavor of cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,** v. 2, p. 139-162, 2003.

SOMKUTI, G. A.; BABEL, F. J. Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. **Journal of Bacteriology**, v. 95, p. 1407-1414, 1968.

SOUSA M. J.; ARDO, Y.; McSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 327-345, 2001.

SOUSA, M. J.; MALCATA, F. X. Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22.p. 305-314, 1998.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Avaliação sensorial de queijo prato obtido por modificações do processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 705-712, 2005.

SPADOTI, L. M. et al. (a) Avaliação do rendimento do queijo tipo prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 492-499, 2003.

SPADOTI, L. M. et al. (b) Evaluation of the melting capacity of Prato cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Lait,** v. 83, p. 397-408, 2003.

SRINIVASAN, R. A. et al. Milk-clotting enzymes from microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 12, p. 475-478, 1964.

STAHL, P. D.; PARKIN, T. B. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p. 847-855, 1996.

SUMANTHA, A. et al. Production and partial purification of a neutral metaloprotease by fungal mixed substrate fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 313-319, 2005.

TUBESHA, Z. A.; AL-DELAIMY, K. S. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 237-241, 2003.

VAIRO-CAVALLI, S. et al. Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 3, p. 271-275, 2005.

VAKALERIS, D. G.; PRICE, W. V. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 2, p. 264-276, 1959.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and Milk Products, Technology, Chemistry and Microbiology**. 2. ed. London: Aspen Publishers, Inc., 2001. p. 1-13.

VARÓN, R. et al. Kinetic analysis of a general model of activation of aspartic proteinase zymogens. **Journal of Theoretical Biology**, v. 242, p. 743-754, 2006.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. A.; 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.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **Journal of Dairy Science,** v. 76, p. 329-350, 1993.

WALSH, M. K.; LI, X. Thermal stability of acid proteinases. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 637-640, 2005.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal,** v. 9, p. 189-192, 1999.

WILKINSON, M. G.; KILCAWLEY, K. N. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 817-830, 2005.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Revista Boletim do Leite**, v. 55, p. 1-8, 1983.

XUE, H. Q.; UPCHURCH, R. G.; KWANYUEN, P. K. Ergosterol as a quantifiable biomass marker for *Diaporthe phaseolorum* and *Cercospora kikuchii*. **Plant Disease**, v. 90, p. 1395-1398, 2006.

YAMADA, T.; OGRYDZIAK, D. M. Extracellular acid protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. **Journal of Bacteriology**, v. 154, p. 23-31, 1983.

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

8. Produção científica, tecnológica, cultural e social proveniente da tese

- Solicitação de patente;

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

- Trabalhos a serem submetidos para publicação:
  MERHEB-DINI, C.; MARTIN, N.; LEITE, R. S. R; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Purification of the milk-clotting protease from the newly isolated thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 and its biochemical characteristics. (Normas da **Bioresource Technology**)

  MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A. C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. (Normas da **Food Chemistry**)

- Prêmio de Incentivo à Pesquisa SBCTA 'Dílson Teixeira Coelho' na área de Biotecnologia: Ingredientes e Produtos Derivados com o trabalho "Caracterização da protease coagulante no extrato enzimático bruto de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31" durante o XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos;

- Trabalho "Produção de queijo Prato com substituição do coalho tradicional por enzima microbiana de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31" selecionado para participar do Prêmio Santander de Empreendedorismo.

- Resumos em congressos:

- "Efeito da Fosfatação nas características físico-químicas dos amidos de arroz e de milho", 04 a 07 de novembro de 2007, Unicamp, Campinas, SP - 7º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos;
- "Comparação de técnicas de precipitação de protease coagulante produzida por *Thermomucor indicae-seudaticae* N31" e "Partial purification and characterization of protease from thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*, and its hydrolytic activity on milk proteins", 13 a 15 de agosto de 2008, Rio de Janeiro, RJ – VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática;
- "Production of milk clotting protease in solid state fermentation by the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* and its hydrolytic activity on bovine caseins", no XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology 5 a 9 de agosto de 2008, Meeting of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies (IUMS), Istanbul, Turquia.
- "Extraction and determination of oxidoreductases from Calabura (*Mungingia calabura*) fruit", 31 de agosto a 4 de setembro de 2008, Foz do Iguassu – XXXVII Brazilian Congress of Agricultural Engineering;
- "Características da protease coagulante de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: baixa atividade proteolítica e baixa termoestabilidade", 3 a 7 de dezembro de 2008, Lorena, SP, VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages;
- "Purificação da Protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e suas Características", 2 a 5 de agosto de 2009, Natal, RN, XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos - Sinaferm;
- "Perfil de peptídeos de hidrolisados de caseína: comparação da ação das proteases de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e *Rhizomucor miehei*", 8 a 11 de novembro de 2009, Campinas, SP, 8° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos;
- "Production of milk-clotting protease and biomass determination in solid state fermentation of *Thermomucor indicae-seudaticae* N31", 5 a 8 de outubro de 2010, Curitiba, PR, IV Congresso Internacional de Bioprocessos na Indústria de Alimentos.

- Produção concomitante:

- MACCHIONE, M. M.; MERHEB, C. W.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Protease production by different thermophilic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 223-230, 2007, DOI 10.1007/s1210-007-8034-x.
- MEHEB-DINI, C.; CABRAL, H.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLIN, L. M.; OKAMOTO, D. N.; RODRIGUEZ, G. O. B.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9210-9217, 2009.
- OLIVEIRA, D. S.; MERHEB-DINI, C.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production of crude xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 aiming the baking process. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 588-594, 2010, DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01740.x

- Co-orientação de Mayara Marçolla de Almeida durante estágio básico e iniciação científica, com bolsa FAPESP.

ANEXO I

Laudo Análise Micotoxinas

LABORATÓRIO DE MICOTOXINAS - LABMIC
Depto. de Agroindústria Alimentos e Nutrição - ESALQ/USP
Av. Pádua Dias, 11 - C.P. 09 - CEP 13.418-900 - Piracicaba - SP.
Fone: (0..19) 3429-4196 Fone/Fax (0..19) 3422-5678 - Email: labmic@esalq.usp.br

LAUDO DE ANÁLISE DE MICOTOXINAS Nº: 10/ 03

Amostra nº.: 10/03-03 Data de Entrada: 12/03/10 Data da Análise: 18/03/10

Produto Analisado*: **Extrato enzimático obtido por fermentação em estado sólido**

Interessado: **Carolina Merheb Dini**
Lab. de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE - UNESP
Rua Cristovão Colombo, 2265
15.054 – 000 – São José do Rio Preto - SP

Local da Amostragem:* São José do Rio Preto - SP

Responsável pela Amostragem:* Interessado

Peso do Lote:* Não informado Peso da Amostra Recebida: 250 mL Safra*: Não informado

RESULTADOS**:

Micotoxina Analisada	Quantidade (µg/kg)	Método Utilizado	Limite de Detecção/Quantificação (µg/kg)
Aflatoxina B_1	Não Detectada	Brasil (2000) modificado, IN nº 09, de 24 mar. 2000, DOU Seção 1, p. 35-41, 30 mar. 2000, POP. A. 011	0,5/1,0
Aflatoxina B_2	Não Detectada		0,5/1,0
Aflatoxina G_1	Não Detectada		0,5/1,0
Aflatoxina G_2	Não Detectada		0,5/1,0
Ocratoxina A	Não Detectada	J.A.O.A.C, v.72 (1), p.22-26, 1989, modificado	3,0 / 3,0
Zearalenona	Não Detectada		60,0 / 80,0

* Informações fornecidas pelo Interessado

**** Limite máximo permitido para aflatoxinas**

- 20 µg/kg (B_1 + B_2 + G_1 + G_2) para amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado); pasta de amendoim ou manteiga de amendoim; milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolas) - Portaria nº. 183, de 21 de março de 1996, do MAPA DOU de 25/03/96 Seção 1 p. 4929-30, e Resolução ANVISA RDC nº. 274 de 15/10/2002 publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002
- 30 µg/kg (B_1 + G_1) em produtos para consumo humano – Resol. nº. 34//6 (19/01/1977) CNNPA/ Minis. da Saúde – Diário Oficial da União de 19/0//// Seção 1 Parte V

Observações: Os resultados são válidos apenas para a amostra analisada
Este Laudo não pode ser reproduzido parcialmente

Piracicaba, 19 de março de 2010

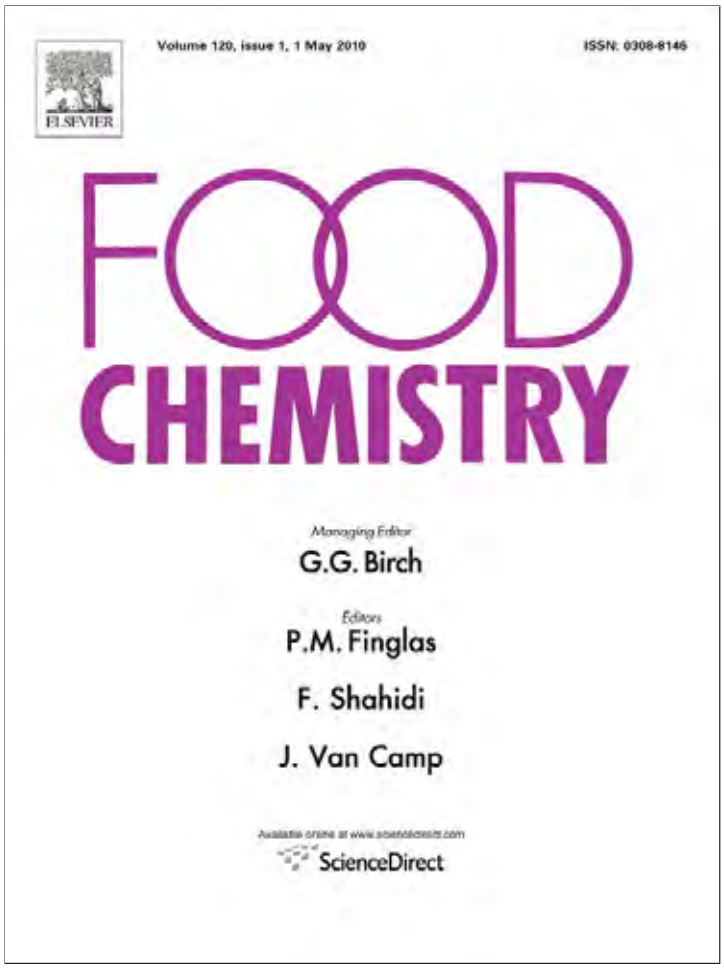
Engª Agrª. Drª. Maria Antonia Calori Domingues
CREA 061293203

- □□□ -

ANEXO II

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

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Author's personal copy

Food Chemistry 120 (2010) 87–93

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31)

Carolina Merheb-Dini, Eleni Gomes, Maurício Boscolo, Roberto da Silva *

Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology-IBILCE – UNESP. Rua Cristóvão Colombo, 2265 São José do Rio Preto, São Paulo, CEP 15054-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 January 2009
Received in revised form 9 September 2009
Accepted 22 September 2009

Keywords:
Thermophilic fungi
SSF
Protease
Milk-clotting
Urea–PAGE
RP-HPLC

ABSTRACT

Microbial rennet-like milk-clotting enzymes are aspartic proteinases that catalyze milk coagulation, substituting calf rennet. Crude enzymatic extract produced by the thermophilic fungus, *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, on solid state fermentation (SSF) using wheat bran, exhibited high milk-clotting activity and low proteolytic activity after 24 h of fermentation. Highest milk-clotting activity (MCA) was at pH 5.7, at 70 °C and in 0.04 M $CaCl_2$; it was stable in the pH range 3.5–4.5 for 24 h and up to 45 °C for 1 h. MCA was highly inhibited by pepstatin A. Hydrolytic activity profile of the crude enzymatic extract on whole bovine casein, analyzed by gel electrophoresis (Urea–PAGE) and RP-HPLC revealed low proteolytic action towards casein fractions and a peptide profile similar to the one obtained with commercial *Rhizomucor miehei* protease (Hannilase).

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

One major application of proteases is in the dairy industry for cheese production, which initially involves clotting milk caseins with the use of coagulant proteolytic enzymes, rennin being the main one (D'ambrosio, Rossano, Ungaro, & Riccio, 2003; Kumar, Sharma, Saharan, & Singh, 2005). The latter is traditionally obtained from the abomassum of calves. However, due to its scarcity, high price and also the expansion of worldwide cheese production, there has been an increase in the search for substitutes (Kumar et al., 2005). An adequate substitute must have intense milk-clotting and low proteolytic activities to minimize dissolution of the clot (Hashem, 1999).

Much research has been carried out in order to find proteases from microbial origin (Abdel-Fattah, Mabrouk, & El-Hawwary, 1972; Arima, Yu, & Iwasaki, 1970; El-Bendary, Moharam, & Ali, 2007; Fernandez-Lahore et al., 1999; Hashem, 1999; Kumar et al., 2005; Poza, Sieiro, Carreira, Barros-Velázquez, & Villa, 2003; Preetha & Boopathy, 1997; Shata, 2005; Srinivasan et al., 1964; Tubesha & Al-Delaimy, 2003; Yu & Chou, 2005), animal origin (D'ambrosio et al., 2003; Kumar, Sharma, Mohanty, Grover, & Batish, 2006; Moschopoulou, Kandarakis, Alichanidis, & Anifantakis, 2006) and from plant origin (Llorente, Brutti, & Caffini, 2004; Raposo & Domingos, 2008; Silva & Malcata, 2004; Vairo-Cavalli, Claver, Priolo, & Natalucci, 2005) that can be used in the dairy industry to clot milk. However, the way these proteases act on casein is not always clear and doubts may arise regarding their hydrolytic profile and their real potential for industrial application as coagulants.

A substitute from a microbial source would be more interesting considering its stable availability and low cost due to the possibility of using cheap substrates for fermentation (Yu & Chou, 2005) besides, it has a better acceptance by people whose eating habits and religious beliefs are against the use of animal enzymes (Sardinas, 1968; Tubesha & Al-Delaimy, 2003).

Determining the characteristics of crude enzymatic extract, even though they may result from a combination of enzymes and non-enzymatic proteins, is important due to their potential use in food technology, since in industrial applications the cost of enzymes is very important (Llorente et al., 2004). Therefore, this work reports the production and characterization of an acid protease from a new and local strain of *Thermomucor*. Afterwards, hydrolysis on bovine casein and its peptide profile were investigated for better understanding its proteolytic activity.

* Corresponding author. Tel.: +55 017 3221 2354; fax: +55 017 3221 2356.
E-mail address: dasilva@ibilce.unesp.br (R. da Silva).

0308-8146/$ - see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.075

Author's personal copy

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and inoculum

The fungus, *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, obtained from the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology – IBILCE – UNESP, São José do Rio Preto, was inoculated in 250 mL Erlenmyer flasks containing Sabouraud dextrose agar medium (Oxoid) with 0.2% casein and incubated at 45 °C for 2 days for complete growth. Afterwards, it was kept at room temperature until further use.

The mycelium was suspended in 100 mL of sterilised nutrient solution, made up of 0.1% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ and NH_4NO_3 and this was used to inoculate the fermentation medium.

2.2. Fermentation medium and culture conditions

Media containing 100% of wheat bran (WB) or 80% of wheat bran and 20% of casein (WBC), totaling 5 g of substrate, were sterilised (120 °C/40 min) in 250 mL Erlenmeyer flasks.

WB and WBC media were inoculated with 6.75 mL and 6.8 mL, respectively, of mycelial suspension, to 60% initial moisture, and were cultivated at 45 °C for 8 days. Samples were taken every 24 h, during 192 h, to establish enzymatic production profile and consequently determine culture conditions that yielded highest milk-clotting activity and lowest proteolytic activity. Crude enzyme solution was obtained by adding 40 mL of distilled water to the fermented material, shaking at 100 rpm/30 min, and then the material was filtered and centrifuged at 30996*g* for 20 min. The clear solution, denominated crude enzymatic extract, was assayed.

2.3. Milk-clotting activity (MCA) determination

Milk-clotting activity was determined according to Arima et al. (1970). Briefly, 5 mL of 10% solution of skim milk powder (Itambé) in 0.01 M $CaCl_2$ was pre-incubated at 35 °C for 10 min. Enzymatic extract (0.5 mL) was added and time counting started. Clot formation was observed while manually rotating the test tube. The time at which the first particles were formed was measured. One milk-clotting unit (MCU) was defined as the amount of enzyme required to clot 1 mL of substrate in 40 min at 35 °C and was calculated according to Shata (2005): unit of milk-clotting activity $(U) = 2400/T \times S/E$, where T is the time necessary for clot formation, S is the milk volume and E is the enzyme volume.

2.4. Proteolytic activity (PA) determination

Proteolytic activity was determined according to Kembhavi, Kulkarni, and Panti (1993), with some modification. The reaction mixture was made up of 0.4 mL of casein (Sigma), 0.5% (w/v) in 0.2 M acetate buffer, pH 5.5 and 0.4 mL of 0.2 M acetate buffer, pH 5.5, to which 0.2 mL of the crude enzyme solution was added. The reaction was carried out at 35 °C and stopped after 30 min with 1 mL of 10% TCA (trichloroacetic acid). Test tubes were centrifuged at 2300*g*/5 min and the absorbance of the supernatant was measured at 280 nm. An appropriate control was prepared, in which the TCA was added before the enzymatic solution. One unit of proteolytic activity (U) was arbitrarily defined as the amount of enzyme required to cause an increase of 0.1 in absorbance at 280 nm, under the assay conditions. Enzymatic activity was calculated as follows: $U/mL = (\Delta Abs_{280nm} \times 10 \times \text{dilution factor})/(0.2 \times 30)$. The specific activity was expressed as units of enzyme activity per mg of protein.

Protein content was measured, following the method of Hartree (1972), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.5. Effects of pH and temperature on enzyme activity and stability

To assay optimum pH, milk-clotting activity was determined at 35 °C, at different pH values using the following 0.2 M buffer solutions: acetate (5.7–6.0); Mes (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid) (5.8–6.9) and Taps (N-tris[Hydroxymethyl]methyl-3-aminopropanesulfonic acid) (7.3). Proteolytic activity was determined at 35 °C, at different pH values, using the following 0.2 M buffer solutions: acetate (3.5–5.5); Mes (5.5–7.0) and Taps (7.5–9.5). Optimum temperature for both activities was determined by incubating the reaction mixture at different temperatures ranging from 30 to 75 °C, with 5 °C intervals, and assaying the activity at the pH determined as optimum.

For pH stability, the enzyme was dispersed (1:1) in the following 0.2 M buffer solutions: acetate (3.5–5.5); Mes (5.5–7.0) and Taps (7.5–9.5), and maintained at 25 °C for 24 h. Afterwards, residual milk-clotting and proteolytic activities were determined under optimum conditions of pH and temperature. Thermal stability was assayed by incubating the enzyme at different temperatures ranging from 35 to 80 °C, with 5 °C intervals, for 1 h. Afterwards, residual milk-clotting and proteolytic activities were determined under optimum conditions of pH and temperature.

2.6. Effect of $CaCl_2$ concentration on milk clotting

The effect of $CaCl_2$ concentration on milk clotting was determined according to item 2.3, however, using increasing concentrations of the calcium chloride solution (0; 0.002; 0.005; 0.01; 0.02; 0.04; 0.06; 0.1; 0.25; 0.5; 0.75 and 1.0 M).

2.7. Effect of protease inhibitors on enzymatic activities

To 0.2 mL of enzymatic extract, different specific protease inhibitors were added including serine–protease inhibitor (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF, 10 mM), metalloprotease inhibitor (ethylene-diaminetetraacetic acid, EDTA, 10 mM), aspartic protease inhibitor (pepstatin A, 20 μM) and cysteine–protease inhibitor (E-64, 10 μM). Samples were incubated at 35 °C for 10 min and residual milk-clotting and proteolytic activities were determined and compared to the control, which was incubated without the inhibitors and corresponds to 100% of activity.

2.8. Monitoring proteolytic activity during milk casein degradation: enzymatic hydrolysis of milk and electrophoresis

Hydrolysis was carried out according to Merheb, Cabral, Gomes, and Da-Silva (2007) with some modification. A 10% solution of skim milk powder (Itambé) in 0.01 M $CaCl_2$ was subjected to hydrolysis at 35 °C, which was initiated by addition of 0.1 mL of enzyme solution, with specific MCA of 38.6 U/mg proteins, to 0.9 mL of substrate solution. At selected times (2, 5, 10, 30 and 60 min) the reaction was quenched by heating at boiling temperature for 6 min. After centrifugation (2300*g*/5 min) the precipitate was used to monitor proteolysis, as described by Shalabi and Fox (1987). For this, 20 mg of the precipitate were incubated at 37 °C, in Eppendorf flasks, with 0.4 mL of 0.062 M tris–HCl buffer, pH 6.7, containing 42% (w/v) urea for 1 h. Afterwards, 10 μL of β-mercaptoethanol were added and the mixture again kept at 37 °C for 45 min. Finally, a drop of bromophenol blue was added. Electrophoresis was performed, according to Shalabi and Fox (1987), to these treated samples, using a Mini Protean 3 Cell vertical slab-gel unit (Bio Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547). Urea–PAGE was performed at a constant voltage of

Author's personal copy

80 V, using 0.046 M tris–glycine, pH 6.7, as running buffer. Gels were stained overnight with Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained with ethanol/acetic acid/water 3:1:6 (v/v/v) solution.

2.9. Monitoring proteolytic activity during casein degradation: enzymatic hydrolysis of casein and RP-HPLC

Hydrolysis and RP-HPLC analyses were carried out according to Gallagher, Kanekanian, and Evans (1994) with some modification. A 2% solution of casein (Sigma, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103, USA) in 50 mM acetate buffer pH 5.5, was subjected to hydrolysis at 35 °C, which was initiated by addition of 0.1 mL of enzyme solution to 0.9 mL of substrate solution. Enzyme solutions (*T. indiae-seudaticae* N31 and *Rhizomucor meihei* – Hannnilase, Chr-Hansen) were standardized to equal milk-clotting activity (3 min) by the method of Arima et al. (1970). The reaction was quenched at the end of 1 h by heating at boiling temperature for 6 min. An aliquot was filtered through 0.22 μm filters prior to RP-HPLC analyses to remove any particulate protein material in the hydrolysates. For RP-HPLC analyses, a Dionex P680 HPLC Pump (Dionex Corporation, 1228 Titan Way, P.O. Box 3603, Sunnyvale, CA 94088-3603) was fitted with a Dionex 201SP C_{18} 5 μm reversed phase column (4.6 × 250 mm) and a UV detector at a wavelength of 220 nm. Each sample (20 μL) was injected and eluted with 0.06% trifluoroacetic acid (TFA)/HPLC grade water as a mobile phase, at a flow rate of 0.7 mL/min. The concentration of the mobile phase modifier (0.056% TFA/HPLC grade methanol) was increased linearly from 0% to 91% over 100 min and in this case held at 91% for a further 10 min.

3. Results and discussion

3.1. Production of enzymatic extract

Table 1 shows the production profile of enzymatic activities by the *T. indicae-seudaticae* N31 during 8 days of SSF in WB and WBC media. The microorganism was able to grow in stationary conditions and secrete the activities to the culture media in a short period of time (24 h), revealing to be promising for this fermentative process. It can also be seen that after the second day of fermentation, enzymatic activities decreased drastically.

Casein was added with the intention of inducing higher amounts of enzymatic activities, but the values obtained show that wheat bran alone was a good substrate for milk-clotting activity production (approximately 160 U/mL) and that casein addition did not cause a significant increase in activity (approximately 168 U/mL). Good results for milk-clotting enzyme (MCE) production using wheat bran were also reported by other authors (Arima et al., 1970; Fernandez-Lahore et al., 1999; Kumar et al. 2005; Shata 2005; Tubesha & Al-Delaimy, 2003).

According to Abdel-Fattah et al. (1972), all proteolytic enzymes can clot milk, however the main one used for this action is rennin. Rennin or a rennin-like enzyme adequate for cheese production is characterized by having high milk-clotting activity and low proteolytic activity. Thus, the pattern of production of these activities in the extracts from fermentation by *T. indicae-seudaticae* N31 during the 8 day period was investigated aiming to obtain a production condition of high milk-clotting and low proteolytic activities. The ratio between milk-clotting and proteolytic activities (R) can be used as an index to justify the adequacy of an enzymatic extract to be used as calf rennet substitute (Hashem 1999). Table 1 also shows the results obtained for R determinations during the fermentative process. It can be seen that for every production time R was higher than 1, meaning that milk-clotting activity was higher than proteolytic and that the highest R values happened on days 1, 2, 5 and 8 for WB and on days 1 and 5 for WBC.

Considering that the enzymatic extract obtained through fermentation of *T. indicae-seudaticae* N31 in WB in 24 h presented high milk-clotting activity and low proteolytic activity; less protein content than the corresponding extract obtained in WBC (Table 1), which will be better for future purification of the enzyme and that WB is a cheaper cultivation medium than WBC, this fermentation condition (WB/24 h) was chosen to produce the enzymatic extract to carry on with the following studies.

3.2. Effects of pH and temperature on enzyme activity and stability

Fig. 1a shows the effect of pH on proteolytic activity. An increase in activity is seen from pH 4.5 until reaching maximum reaction rate at pH 5.5 and loosing activity until 7.5. There was a slight increase of activity between pH 7.5 and 9.0 probably due to the fact that casein, being a proteinaceous substrate, might also suffer some modification in their ionizable groups with pH variation, affecting its susceptibility and interfering in its interaction with the enzyme (García, Díaz, Artiles, Ramos, & Rubí, 2003). This behaviour was expected, since proteolytic enzymes from fungi generally exhibit maximum catalytic rate at more acidic pH values, such as the protease from *Thermoascus aurantiacus*, studied by Merheb et al. (2007), which also presented optimum pH at 5.5.

Fig. 1a also shows the effect of pH on milk-clotting activity. Highest activity was at pH 5.7, followed by a fall until pH 7.3. Similar behaviour was reported for the crude extract from *Mucor pusillus* var. *Lindt*, studied by Arima et al. (1970), which exhibited fastest milk clotting at pH 5.5 and extremely slow at pH 7.0 and the precipitated extract from *Penicillium citrinum*, studied by Abdel-Fattah et al. (1972), which presented optimum activity at pH 6.0. Calf rennet exhibits the same dependence towards pH, being weaker in alkaline conditions than in acidic conditions (Richardson, Nelson, Lubnow, & Schwarberg, 1967).

Fig. 1b shows that maximum milk-clotting and proteolytic activities were at 70 °C and 65 °C, respectively. The crude

Table 1
Production of milk-clotting and proteolytic activities, ratio (R) between these activities and protein content during time course of fermentation of *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in WB and WBC media.

Time (days)	WB				WBC			
	MCA (U/mL)	PA (U/mL)	R	Protein content (mg/mL)	MCA (U/mL)	PA (U/mL)	R	Protein content (mg/mL)
1	160.3 ± 11.8	2.1 ± 0.1	76	3.3 ± 0.4	167.6 ± 0.0	2.6 ± 0.1	64	10.7 ± 0.4
2	145.6 ± 1.2	1.9 ± 0.2	77	2.3 ± 0.5	134.4 ± 2.5	2.3 ± 0.2	58	8.5 ± 0.9
3	80.2 ± 1.6	1.3 ± 0.1	62	1.6 ± 0.4	93.7 ± 5.4	1.6 ± 0.1	59	8.2 ± 0.3
4	46.4 ± 3.4	0.7 ± 0.2	66	1.3 ± 0.6	44.7 ± 0.6	1.0 ± 0.3	45	6.9 ± 1.2
5	49.3 ± 0.7	0.6 ± 0.0	82	1.3 ± 0.5	100.0 ± 23.6	1.3 ± 0.2	77	7.2 ± 0.4
6	67.6 ± 1.3	1.0 ± 0.0	68	1.3 ± 0.3	85.2 ± 4.2	1.5 ± 0.3	57	5.8 ± 1.2
7	45.4 ± 4.9	0.7 ± 0.1	65	1.3 ± 0.2	69.4 ± 9.5	1.1 ± 0.3	63	6.0 ± 1.1
8	55.6 ± 3.2	0.6 ± 0.3	93	1.0 ± 0.6	45.9 ± 1.1	0.8 ± 0.2	57	5.4 ± 1.3

R = MCA/PA.

Author's personal copy

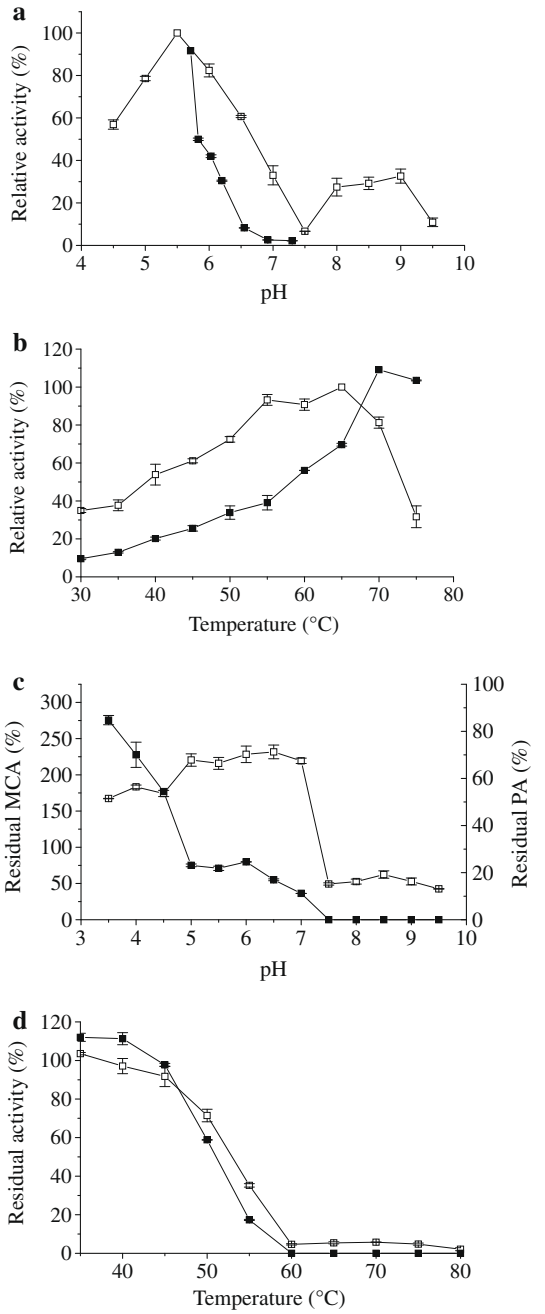


Fig. 1. Physical–chemical properties of milk-clotting (■) and proteolytic (□) activities of the enzymatic extract. (a, b) Effect of pH and temperature on the activity; (c, d) effect of pH and temperature on the stability. Error bars represent standard deviations of two replicates.

enzymatic extract of the thermophilic fungi *T. aurantiacus*, studied by Merheb et al. (2007), and *Thermomyces lanuginosus*, studied by Li, Yang, and Shen (1997), also exhibited optimum proteolytic activity at high temperatures (60 °C and 70 °C, respectively). The crude enzymatic extract from *Penicillium oxalicum*, studied by Hashem (1999), the precipitated extract from *P. citrinum*, studied by Abdel-Fattah et al. (1972) and the purified protease from *Rhizopus oryzae*, in the work of Kumar et al. (2005), exhibited optimum temperature for milk clotting at 60 °C, where the extract from *T. indicae-seudaticae* N31 presented only 50% of activity.

Fig. 1c shows stability of the extract towards different values of pH. For milk-clotting activity, there is not a wide range of stability but a high residual activity from pH 3.5 to 4.5 and afterwards 75% of stability between 5.0 and 6.0, followed by a fall. Very similar results were reported by Channe and Shewale (1998), who studied the enzymatic extract from *Aspergillus niger* MC4 and found maximum stability for milk-clotting activity at pH 4.0 and by Arima et al. (1970), when studying the extract from *M. pusillus* var. *Lindt*, whose milk-clotting activity was more stable at pH 5.0. In another work, these authors also reported stability of calf rennet at similar pH range (Arima, Yu, Iwasaki, & Tamura, 1968). Proteolytic activity was stable only from pH 5.0 to 7.0 with approximately 65–70% of residual activity. It was less stable than protease from *T. aurantiacus*, studied by Merheb et al. (2007), which maintained high stability from pH 3.0 to 9.5.

Fig. 1d shows that, for 1 h, both activities remained stable until 45 °C, exhibited approximately 60–70% of residual activity after incubation at 50 °C and lost activity after 60 °C. These results indicate that proteolytic activity from enzymatic extract from *T. indicae-seudaticae* N31 is more sensitive to heat than those from other thermophilic fungi such as the protease from *T. aurantiacus*, studied by Merheb et al. (2007), which exhibited 100% of stability up to 60 °C for 1 h; the protease from *T. lanuginosus*, studied by Li et al. (1997), which exhibited more than 90% of stability up to 60 °C for 1 h; and presented similar stability to those from mesophilic fungi such as the protease from *A. oryzae* NRRL 2217, studied by Sumantha, Sandhya, Szakacs, Soccol, and Pandey (2005), which maintained 76% of activity at 50 °C for 1 h and to the protease from the flower *Cynara scolymus* L., studied by Llorente et al. (2004), which presented 90% of activity only until 45 °C for 1 h. In a comparative study between milk-clotting enzymes, presented in the work of Preetha and Boopathy (1997), it was found that commercial calf rennet exhibited 4.5% of residual proteolytic activity after incubation at 65 °C for 30 min, which is very similar to the extract from *T. indicae-seudaticae* N31, which exhibited 5.3% of residual proteolytic activity after incubation at 65 °C for 1 h.

There is little information in the literature concerning thermostability of milk-clotting enzymes in crude extracts. However, it is known that the milk-clotting enzymes commercially available, from animal, microbial and recombinant sources exhibit varied thermostability and also that, among the microbial enzymes, the ones from *R. miehi* are more resistant, with high stability at 60 °C and the ones from *Cryphonectria parasitica* are the most sensitive, with stability up to 50 °C (Walsh & Li, 2005). Moschopoulou et al. (2006), while carrying out a comparative study between chymosin and pepsin from kid and calf chymosin concerning inactivation temperature, found that calf chymosin became inactive at temperatures above 56 °C, which is similar to the extract from *T. indicae-seudaticae* N31. Yet, the enzymatic extract produced by *A. niger* MC4, studied by Channe and Shewale (1998) was more thermostable since its milk-clotting activity was only inactivated when heated at 60 °C for 80 min. Therefore, it can be suggested that the milk-clotting activity from the enzymatic extract of *T. indicae-seudaticae* N31 presents low thermostability, which was similar to the crude extract from *Mucor* sp. J20, studied by Tubesha and Al-Delaimy (2003), whose milk-clotting activity exhibited complete inactivation at 60 °C after 20 min; to the precipitated extract from the mesophilic *P. citrinum*, studied by Abdel-Fattah et al. (1972), whose milk-clotting activity was destroyed when heated at 55 °C for 10 min and to the crude extract from *P. oxalicum*, in the work of Hashem (1999), which maintained 52% of milk-clotting activity at 50 °C for 30 min and exhibited expressive loss at 60 °C, which is a relevant property for cheese production.

Most of the enzymatic activity of the coagulant added to milk during cheese making is lost in the whey and only 0–15% of the activity remains in the curd (Sousa, Ardo, & Mcsweeney, 2001). However this coagulant, retained in the curd, which also exhibits proteolytic action, is one of the main agents responsible for the breakdown of caseins during cheese ripening, process called

Author's personal copy

primary proteolysis, especially during the first 24 h after milk clotting (Silva & Malcata, 2004). Thus, factors affecting the retention and activity of the coagulant in the curd are important and therefore, the use of coagulants that are more heat stable than rennet should be avoided, otherwise the excess of proteolytic activity in the curd after cooking may result in excessive proteolysis and, consequently, bitterness during the ripening stage (Sousa et al., 2001). The thermal behaviour of crude enzymatic extract from *T. indicae-seudaticae* N31, represented by inactivation of proteolytic activity with moderate heating, could be interesting for cheese manufacture.

3.3. Effect of $CaCl_2$ concentration on milk clotting

Calcium has been described as an important substance in clot formation during milk clotting, which happens when its concentration is high enough (Anema, Lee, & Klostermeyer, 2005). Calcium helps coagulation by creating isoeletric conditions and by acting as a bridge between casein micelles. Milk-clotting activity was highest at 0.04 of $CaCl_2$.

It is known that calcium has important function on casein aggregation during the second step (non-enzymatic) of milk clotting, caused by the neutralization of casein micelles' negative residues (phosphoserine and carboxylic groups) by Ca^{2+} and calcium–phosphate complexes (Pires, Orellana, & Gatti, 1999) and so that an increase in its concentration leads to an increase in the coagulation rate (Arima et al., 1970; El-Bendary et al., 2007; Kumar et al., 2005). Milk-clotting activity decreased at concentrations higher than 0.04 M, probably due to the increase of ionic force or to the saturation of negative residues of the micelles at increasing Ca^{2+} concentration in the medium. A similar behaviour was reported by Vairo-Cavalli et al. (2005) and Preetha and Boopathy (1997), who studied a protease that presented the same response to increasing calcium concentration (initial raise of activity, followed by fall), with maximum activity at 0.03 and 0.4 M of $CaCl_2$, respectively. Sardinas (1968) when studying the effect of $CaCl_2$ concentration in milk on the activity of the microbial rennin produced by *Endothia parasitica*, also found a peak of maximum clotting at 0.04 M of $CaCl_2$.

3.4. Effect of protease inhibitors on enzymatic activities

Table 2 shows the susceptibility of the enzymatic extract to serine–protease inhibitor (PMSF), cysteine–protease inhibitor (E-64), metalloprotease inhibitor (EDTA) and aspartic protease inhibitor (pepstatin A).

Crude enzymatic extract retained approximately 82% and 97% of milk-clotting activity in the presence of PMSF and E-64, respectively and exhibited an increase of 70% in the presence of EDTA. However, it can be seen that the substance that had major influence on milk-clotting activity was pepstatin A, causing approximately 74% of inhibition. These results suggest the presence of an aspartic protease in the enzymatic extract, class of proteases that have aspartate residues at the active site, exhibit optimum activity at low pH values and are inhibited by pepstatin A (Fernandez-Lahore et al., 1999; Llorente et al., 2004). It is the aspartic proteases that are used commercially for milk clotting, being rennet the most traditional (Raposo & Domingos, 2008). The results also suggest the existence of some metal/ion in the crude enzymatic extract that may be negatively interfering in milk-clotting activity since there was an increase of activity in the presence of the metal sequester.

It is known that enzymatic preparations used for milk clotting exhibit proteolytic action, the important thing is to use a preparation with strong milk-clotting activity and extremely low proteolytic activity (Hashem, 1999), which is the case of the extract from *T. indicae-seudaticae* N31 studied in this work, due to its, already mentioned, high *R* value.

Table 2
Effect of protease inhibitors on milk-clotting and proteolytic activities of the enzymatic extract. Residual activity represents the percentage of activity observed compared to the activity value obtained in assay without addition of inhibitors (control).

Inhibitors	Concentration (mM)	Residual PA (%)	Residual MCA (%)
Control		100.00	100.00
PMSF	10	68.44 ± 2.2	81.80 ± 2.5
E-64	0.01	99.30 ± 2.6	96.88 ± 2.6
EDTA	10	81.10 ± 3.4	170.39 ± 7.3
Pepstatin A	0.02	39.71 ± 1.3	25.83 ± 0.7

3.5. Enzymes hydrolytic behaviour

3.5.1. Urea–PAGE

Hydrolysis performed on milk solution was done so as to simulate real coagulation conditions. The Urea–PAGE used to monitor this experiment is shown in Fig. 2. Two major groups of bands were identified in the Urea–PAGE: α_s-casein, with higher mobility and β-casein, with lower mobility (Silva & Malcata, 2004). It can be seen that casein fractions remain intact up to 60 min of hydrolysis, when a soft start of α_s-casein degradation is observed.

The hydrolytic behaviour of enzymatic extract from *T. indicae-seudaticae* N31 is different than the one observed for another thermophilic fungus, *T. aurantiacus*, studied by Merheb et al. (2007), who reported that at 60 min of hydrolysis, casein fractions had already been extensively degraded, specially β-casein.

Trujillo, Guamis, Laencina, and López (2000) studied ovine casein hydrolysis by different types of commercial coagulants. The enzyme of fungal source (*R. miehei* – Hannilase) presented low proteolytic activity, with great amount of intact caseins still present up to 24 h of incubation, and also showed start of degradation of fraction α_s – at 60 min of hydrolysis.

3.5.2. RP-HPLC profiles

Studies regarding the potential of hydrolysis of the casein fractions are important to characterize the viability of an enzyme's industrial application. Hydrolysis performed on casein solution was done so as to provide a HPLC profile of peptides resulting from enzyme action. The chromatograms of peptides from the

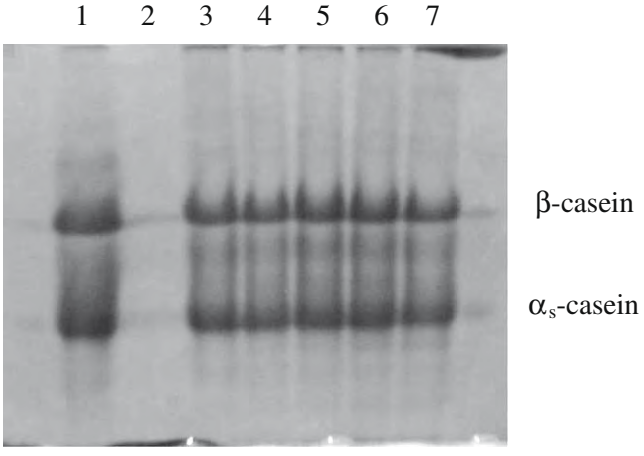


Fig. 2. Urea–PAGE of casein hydrolysis by protease in the enzymatic extract. Lane 1: milk solution; lane 2: crude enzymatic extract; lanes 3–7: caseins after incubation for 2, 5, 10, 30, 60 min, respectively.

Author's personal copy

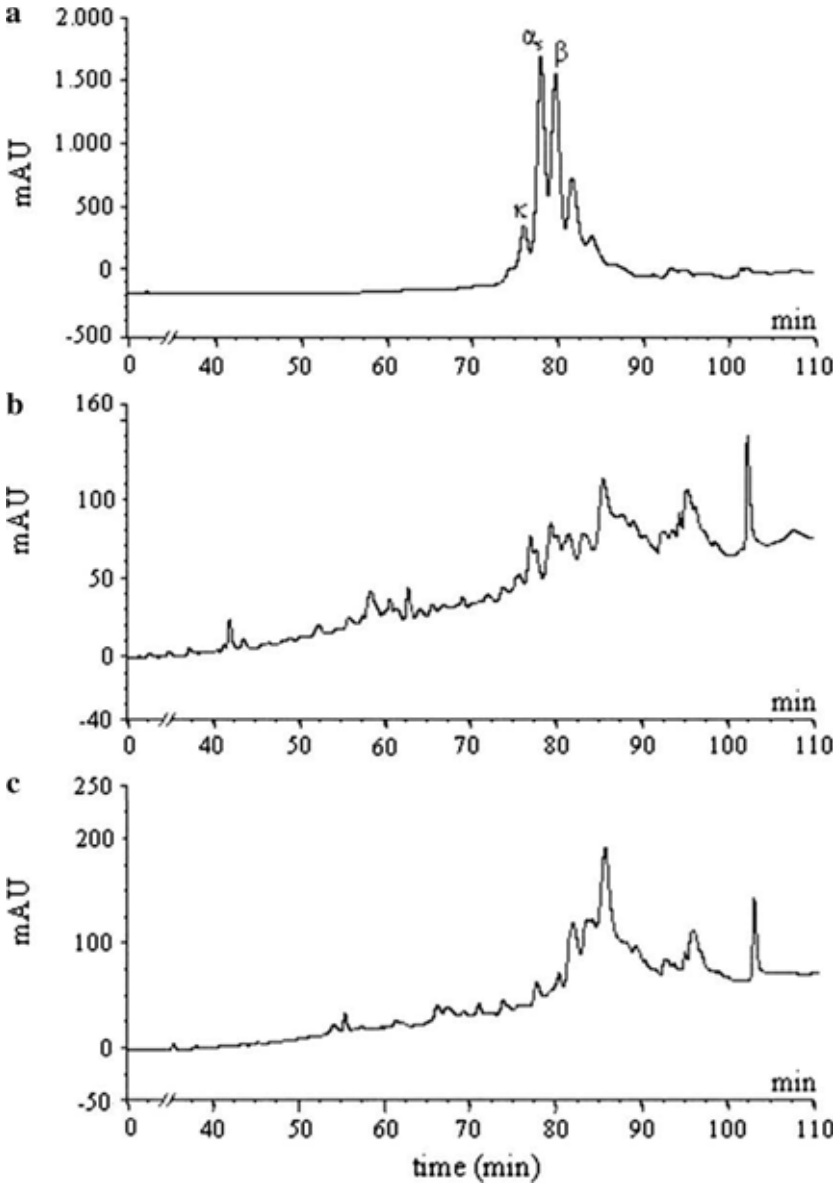


Fig. 3. RP-HPLC elution profile of bovine sodium caseinate (20 mg/mL) (a) and its hydrolysates generated after 1 h of proteolysis by *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (b) and *Rhizomucor miehei* (Hannilase) (c) proteases. α_s: α_{s1}- + α_{s2}-caseins; β: β-casein; κ: κ-casein.

hydrolysates are shown in Fig. 3. Peptides that strongly interact with the RP-HPLC column are more hydrophobic in nature and thus more likely to be bitter in taste (Gallagher et al., 1994). The pattern of peptide fragments formed by the action of the enzymatic extract from *T. indicae-seudaticae* N31 (Fig. 3b) and the *R. miehei* protease (Hannilase) (Fig. 3c) are not identical but present similarities, especially within the range 75–110 min, where a total of 8 peaks can be observed in both hydrolysates. This later-running range is crucial for cheese-making given that it represents the bitter peptides however, bitterness could only be effectively detected by actually tasting these peptides separated by HPLC in sensory analysis (Lee & Warthesen, 1996). Despite of the extract being crude and in the lack of sensory results, the comparison of the two profiles is a good indicative of the peptide compositions. Many proteases from microbial sources have been investigated as adequate substitutes for rennet in cheese production, but generally present high proteolytic activity which results in bitterness in ripe cheeses, produced mainly by the residual coagulant acting on highly hydrophobic sequences of casein, initially of fraction β, leading to the formation of highly hydrophobic peptides, which cause bitterness when accumulated (Sousa et al., 2001). Since Hannilase is a widely used milk-clotting agent, the peptide profile obtained with the enzymatic extract from *T. indicae-seudaticae* N31 encourages the continuation of our studies on the viability of *T. indicae-seudaticae* N31's protease.

4. Conclusions

High milk-clotting and low proteolytic activities were found in the enzymatic extract obtained after 24 h of solid state fermentation by *T. indicae-seudaticae* N31 using only wheat bran as substrate. The biochemical properties of the crude enzyme such as the low proteolytic action on bovine milk caseins, low thermostability and the peptide profile, encourage future cheese production experiments to check its potential as a microbial rennin, and further purification studies will be carried out to find out if the action is a result of multiple or single protease in the extract.

Author's personal copy

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial assistance provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

References

Abdel-Fattah, A. F., Mabrouk, S. S., & El-Hawwary, N. M. (1972). Production and some properties of rennin-like milk-clotting enzyme from *Penicillium citrinum*. *Journal of General Microbiology, 70*, 151–155.

Anema, S. G., Lee, S. K., & Klostermeyer, H. (2005). Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ-casein and the gelation of skim milk by chymosin. *LWT – Food Science and Technology, 40*, 99–106.

Arima, K., Yu, J., & Iwasaki, S. (1970). Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. *lindt*. *Methods in Enzymology, 19*, 446–459.

Arima, K., Yu, J., Iwasaki, S., & Tamura, G. (1968). Milk-clotting enzyme from microorganisms: V. Purification and crystallization of *Mucor* Rennin from *Mucor pusillus* var. *Lindt*.. *Applied Microbiology, 16*, 1727–1733.

Channe, P. S., & Shewale, J. G. (1998). Influence of culture conditions on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14*, 11–15.

D'ambrosio, A., Rossano, R., Ungaro, N., & Riccio, P. (2003). Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 22*, 145–150.

El-Bendary, M. A., Moharam, M. E., & Ali, T. H. (2007). Purification and Characterization of milk clotting enzymes produced by *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Sciences Research, 8*, 695–699.

Fernandez-Lahore, H. M., Auday, R. M., Fraile, E. R., Biscoglio de Jimenez, M., BoninoPirpignani, L., Machalinski, C., & Cascone, O. (1999). Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. *Journal of Peptide Research, 53*, 599–605.

Gallagher, J., Kanekanian, A. D., & Evans, E. P. (1994). Hydrolysis of casein: A comparative study of two proteases and their peptide maps. *International Journal of Food Science and Technology, 29*, 279–285.

García, D. M., Díaz, C. H., Artiles, Y. C., Ramos, R. A., & Rubí, J. A. (2003). Characterization of the proteinases secreted by *Sarocladium oryzae*. *Biotecnología Aplicada, 20*, 170–172.

Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry, 48*, 422–427.

Hashem, A. M. (1999). Optimization of milk-clotting productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology, 70*, 203–207.

Kembhavi, A. A., Kulkarni, A., & Panti, A. (1993). Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM N 64. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 38*, 83–92.

Kumar, A., Sharma, J., Mohanty, A. K., Grover, S., & Batish, V. K. (2006). Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 145*, 108–113.

Kumar, S., Sharma, N. S., Saharan, M. R., & Singh, R. (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: Purification and characterization. *Process Biochemistry, 40*, 1701–1705.

Lee, K. D., & Warthesen, J. J. (1996). Mobile phases in reversed-phase HPLC for the determination of bitter peptides in cheese. *Journal of Food Science, 61*, 291–294.

Li, D. C., Yang, Y. J., & Shen, C. Y. (1997). Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycological Research, 101*, 18–22.

Llorente, B. E., Brutti, C. B., & Caffini, B. O. (2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*, 8182–8189.

Merheb, C. W., Cabral, H., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2007). Partial characterization of protease from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry, 104*, 127–131.

Moschopoulou, E. E., Kandarakis, I. G., Alichanidis, E., & Anifantakis, E. M. (2006). Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. *Journal of Dairy Research, 73*, 49–57.

Pires, M. S., Orellana, G. A., & Gatti, C. A. (1999). Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: Action of Ca^{2+} and pH. *Food Hydrocolloids, 13*, 235–238.

Poza, M., Sieiro, C., Carreira, L., Barros-Velázquez, J., & Villa, T. G. (2003). Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus Xanthus* strain 422. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30*, 691–698.

Preetha, S., & Boopathy, R. (1997). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehi*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 13*, 573–578.

Raposo, S., & Domingos, A. (2008). Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochemistry, 43*, 139–144.

Richardson, G. G., Nelson, J. H., Lubnow, R. E., & Schwarberg, R. L. (1967). Rennin-like enzyme from *Mucor pusillus* for cheese manufacture. *Journal of Dairy Science, 50*, 1066–1072.

Sardinas, J. L. (1968). Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. *Applied Microbiology, 16*, 248–255.

Shalabi, S. I., & Fox, P. F. (1987). Eletrophoretic analysis of cheese: Comparison of methods. *Irish Journal of Food Science Technology, 11*, 135–151.

Shata, H. M. A. (2005). Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. *Polish Journal of Microbiology, 54*, 241–247.

Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2004). Influence of the coagulant level on early proteolysis in ovine cheese-like system made with sterilized milk and *Cynara cardunculus*. *Journal of Food Science, 69*, 579–584.

Sousa, M., Ardo, Y., & Mcsweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal, 11*, 327–345.

Srinivasan, R. A., Iyengar, M. K. K., Babbar, I. J., Chakravorty, S. C., Dudani, A. T., & Iya, K. K. (1964). Milk-clotting enzymes from microorganisms. *Applied Microbiology, 12*, 475–478.

Sumantha, A., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2005). Production and partial purification of a neutral metaloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology, 43*, 313–319.

Trujillo, A. J., Guamis, B., Laencina, J., & López, M. B. (2000). Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food Chemistry, 71*, 449–457.

Tubesha, Z. A., & Al-Delaimy, K. S. (2003). Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. *International Journal of Dairy Technology, 56*, 237–241.

Vairo-Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N., & Natalucci, C. (2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research, 72*, 271–275.

Walsh, M. K., & Li, X. (2005). Thermal stability of acid proteinases. *Journal of Dairy Research, 67*, 637–640.

Yu, P.-J., & Chou, C.-C. (2005). Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium. *Food Technology and Biotechnology, 43*, 283–288.