



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

BRUNA LIMA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PEPTIDASE
COAGULANTE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELO
Thermomucor indicae-seudaticae N31 E PRODUÇÃO DE QUEIJO MUSSARELA**

São José do Rio Preto

2017

Bruna Lima da Silva

Otimização, purificação e caracterização da peptidase coagulante obtida por fermentação submersa pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e produção de queijo mussarela

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia 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.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto da Silva

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto

2017

Silva, Bruna Lima da.

Otimização, purificação e caracterização da peptidase coagulante obtida por fermentação submersa pelo *Thermomucor indica-udatiae* N31 e produção de queijo mussarela / Bruna Lima da Silva. -- São José do Rio Preto, 2017

122 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Roberto da Silva

Coorientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Enzimas microbianas - Aplicações industriais. 3. Queijo mussarela. 4. Biorreatores. 5. Troca iônica.
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Bruna Lima da Silva

Otimização, purificação e caracterização da peptidase coagulante obtida por fermentação submersa pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e produção de queijo mussarela

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia 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 - Orientador

UNESP – São José do Rio Preto, SP

Prof^a. Dr^a. Carolina Merheb Dini

Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Uberaba, MG

Prof^a. Dr^a. Elisa Helena Giglio Ponsano

UNESP – Araçatuba, SP

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

UNESP – São José do Rio Preto, SP

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

UNESP – São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto, 27 de março de 2017.

***Dedico este trabalho à minha família, ao meu namorado Ronaldo e aos meus amigos,
por todo apoio, compreensão, confiança, torcida, amor e carinho.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele não seríamos nada;

Ao Prof. Roberto da Silva pela orientação, paciência, amizade e por compartilhar seus conhecimentos;

Aos colegas de laboratório pela amizade, apoio, compreensão e por tornarem meus dias de trabalho mais agradáveis;

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

A CAPES, pelo auxílio financeiro;

Aos meus pais Rosana e Jorge, os quais acreditaram no meu potencial e me incentivaram a buscar meus objetivos.

Aos meus avós Odila e Benedito os quais sempre me apoiaram incondicionalmente.

Aos meus tios Roberto e Tânia e primos Caio e Iago que sempre torceram por mim.

Ao meu namorado Ronaldo pela compreensão, companheirismo e grande amor.

Enfim, agradeço a toda minha família e amigos que sempre me confortaram, desferiram amor e carinho, torceram durante essa busca e serviram de suporte em todos os momentos.

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está organizada em cinco capítulos para melhor distribuição e entendimento dos assuntos abordados.

Um resumo do trabalho e uma introdução geral foram incluídos para orientar o leitor sobre a relevância científica do trabalho.

O Capítulo 1 consiste em uma Revisão de Literatura envolvendo a importância de peptidases microbianas, micro-organismos produtores de coagulantes microbianos através de processo fermentativo, importância do planejamento experimental na produção enzimática, relevância do processo de purificação no estudo e caracterização da renina microbiana, bem como as características do queijo mussarela.

Os capítulos 2, 3 e 4 foram redigidos na forma de artigos científicos para a posterior publicação.

O Capítulo 2 é referente ao processo de otimização das condições de produção da protease coagulante obtida pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 a partir do processo de fermentação submersa com farelo de trigo como substrato e aplicação das melhores condições de produção em biorreator com agitação mecânica.

No Capítulo 3 é apresentado o processo de purificação e caracterização da peptidase coagulante produzida em fermentação submersa pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com farelo de trigo como substrato.

No Capítulo 4 é descrito o processo de produção de queijo mussarela a partir de coagulante microbiano produzido em fermentação submersa pelo fungo filamentoso *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

O Capítulo 5 apresenta as conclusões gerais desse trabalho.

RESUMO

Peptidases coagulantes microbianas estão sendo cada vez mais utilizadas na indústria láctica para produção de queijos. Produzir uma enzima coagulante com elevada Razão (R) entre a atividade coagulante (AC) ou específica e atividade proteolítica (AP) inespecífica tem se tornado o objetivo de muitos estudos, já que a atividade inespecífica pode prejudicar a qualidade do produto final. O presente estudo objetivou otimizar a produção submersa, aumentar a escala de fermentação, purificar e caracterizar e a aplicar a enzima coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 na produção do queijo mussarela. A aplicação do Plackett-Burman e Doehlert design para a otimização da AC resultou no aumento de 11,66 vezes (10,46 para 122,0 U/mL). A melhor condição de produção da enzima em Erlenmeyer foi entre 4,1 - 4,7 % de farelo de trigo, 40,5 a 41,75 °C, 0,4 % (NH₄)₂SO₄, 0,4 % MgSO₄.7H₂O e 0,1 % NH₄NO₃, 150 rpm, 96 horas de incubação e pH 5,5. O melhor período para produção da enzima em biorreator com agitação mecânica ocorreu em 96 horas e pH 6,48, apresentando uma Razão AC/AP de 647. A enzima apresentou resistência aos repetidos processos de congelamento e descongelamento. O processo de purificação consistiu da concentração em dialisador tangencial e cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose com tampão acetato 0,02 mol/L e pH 4,6, apresentando uma banda homogênea em SDS-PAGE. A enzima purificada apresentou pH ótimo 5,3 (R=786), temperatura ótima 65 °C (R=3417), ativação da atividade coagulante durante 24 horas de exposição em pH 4,0 (R=5023) e 4,5 (R=3518) e estabilidade térmica até 55 °C durante 5 horas de exposição (R=480). O CaCl₂ influenciou positivamente até a concentração de 0,06 mol/L (AC=101 U/mL). A produção do queijo mussarela foi realizada com o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (QT) e com um coagulante comercial (QC). Os queijos foram armazenados por um período de 120 dias. As análises de Umidade, Acidez, Gordura, GES, Cinzas, Nitrogênio, Proteína total, NS pH 4.6, NS TCA, Sal, Eletroforese e capacidade de derretimento foram realizadas em períodos específicos ao longo do período de armazenamento. A acidez foi maior no QT enquanto a proteína foi maior no QC em todos os períodos analisados. O NS pH 4.6 e o NS TCA também foram maiores no QT em todos os períodos analisados, exceto no primeiro dia, no qual não foi verificado diferença significativa. Os dois tratamentos não apresentaram diferença em relação ao teor de Umidade, Gordura, GES, Cinzas e Sal. O perfil eletroforético demonstrou que houve maior proteólise no QT. A capacidade de derretimento não

diferiu no período do primeiro dia, porém foi maior no QT até o fim da estocagem. Os resultados demonstram que a produção da renina microbiana do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 pôde ser otimizada, produzida em maior escala no biorreator de bancada e purificada por cromatografia de troca iônica. Sua aplicação na produção do queijo mussarela, resultou em produto de boa qualidade. Estes resultados confirmam que a peptidase coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 apresenta potencial para aplicação tecnológica.

Palavras-chave: coagulante microbiano, farelo de trigo, biorreator, troca iônica, queijo mozzarella.

ABSTRACT

Microbial peptidases coagulants are being increasingly used in the dairy industry for cheese production. Producing a clotting enzyme with high ratio (R) between milk-clotting activity (MCA) or specific activity and proteolytic activity (PA) or non-specific has become the object of many studies, since non-specific activity may damage the quality of the final product. The present study aimed to optimize submerged production, increase fermentation scale, purify and characterize and to apply the milk-clotting enzyme produced by *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in the production of mozzarella cheese. The application of Plackett-Burman and Doehlert design to the optimization of MCA resulted in an increase of 11.66 times (10.46 to 122.0 U/mL). The best enzyme production condition in Erlenmeyer was between 4.1 - 4.7 % wheat bran, 40.5 to 41.75 °C, 0.4% (NH₄)₂SO₄, 0.4% MgSO₄·7H₂O and 0.1% NH₄NO₃, 150 rpm, 96 hours of incubation and pH 5.5. The best period for the production of the enzyme in a mechanical agitation bioreactor occurred in 96 hours and pH 6.48, presenting a Ratio MCA/PA of 647. The enzyme showed resistance to repeated freezing and thawing processes. The purification process consisted of the concentration in a tangential dialyzer and ion exchange chromatography on Q-Sepharose resin with 0.02 mol/L acetate buffer and pH 4.6, presenting a homogeneous band on SDS-PAGE. The purified enzyme had an optimum pH of 5.3 (R = 786), optimum temperature 65 °C (R = 3417), activation of the milk-clotting activity during 24 hours of exposure at pH 4.0 (R = 5023) and 4.5 (R = 3518) and thermal stability at 55 °C for 5 hours of exposure (R = 480). CaCl₂ positively influenced until the concentration of 0.06 mol/L (MCA = 101 U/mL). The production of mozzarella cheese was performed with the coagulant *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (TC) and with a commercial coagulant (CC). The cheeses were stored for a period of 120 days. The analyzes of moisture, acidity, fat, GES, ash, total nitrogen, total protein, NS-pH 4.6, NS-TCA, salt, casein electrophoresis and melting capacity of cheese were performed at specific periods throughout the storage period. The acidity was higher in the TC while the protein was higher in the CC in all periods analyzed. NS-pH 4.6 and NS-TCA were also higher on TC in all the periods analyzed, except on the first day, in which there wasn't significant difference. The two treatments showed no difference in relation to moisture, fat, GES, ash and salt content. The electrophoretic profile showed that there was more proteolysis in the TC. The melting capacity did not differ on the first day, but was higher in the TC until the end of storage.

The results demonstrated that the production of the microbial renin of *Thermomucor indicae-seudaticae* and N31 could be optimized, produced in larger scale in the bench bioreactor and purified by ion exchange chromatography. Its application in the production of mozzarella cheese resulted in good quality product. These results confirm that the milk-clotting peptidase of *Thermomucor indicae-seudaticae* and N31 presents potential for technological application.

Key words: microbial coagulant, wheat bran, bioreactor, ion exchange, mozzarella cheese.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 -	Micela em corte transversal, mostrando a estrutura em submicelas, as cadeias polipeptídicas da κ -caseína se projetando da superfície e os aglomerados de fosfato de cálcio.....	32
Figura 2 -	Eletro micrografia da micela de caseína	33
Figura 3 -	Hidrólise da renina sobre a caseína.....	37

CAPÍTULO 2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A OBTENÇÃO DA RENINA MICROBIANA PRODUZIDA PELO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 A PARTIR DE FARELO DE TRIGO

Figura 1 -	Efeitos das variáveis na atividade coagulante de acordo com o planejamento estatístico de Plackett-Burman.....	64
Figura 2 -	Valores experimentais e preditos para a atividade coagulante de acordo com o planejamento experimental.....	65
Figura 3 -	Superfície de resposta e curvas de contorno para a atividade coagulante de acordo com o planejamento experimental.....	67
Figura 4 -	Avaliação da atividade coagulante e proteolítica da renina microbiana obtida em FSm em Erlenmeyer a partir do fungo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em função do período de incubação	69
Figura 5 -	Razão AC/AP da renina microbiana obtida em FSm em Erlenmeyer a partir do fungo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em função do período de incubação.....	69
Figura 6 -	Avaliação da atividade coagulante e proteolítica da produção da renina microbiana produzida pelo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em biorreator com agitação mecânica.....	71
Figura 7 -	Razão AC/AP da produção da renina microbiana produzida pelo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em biorreator com agitação mecânica e perfil do pH do meio.....	72
Figura 8 -	Avaliação da influência de sucessivos congelamentos e descongelamentos na atividade coagulante da peptidase produzida pelo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	73

CAPÍTULO 3. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PEPTIDASE COAGULANTE PRODUZIDA PELO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 OBTIDA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Figura 1 -	Eletoforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (13 %) do extrato bruto do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 produzido por FSm...	87
Figura 2 -	Perfil cromatográfico de separação gerado pelo FPLC – Akta utilizando gradiente escalonado em rampas de NaCl.....	88
Figura 3 -	Perfil eletroforético da combinação dos tubos que apresentaram atividade coagulante do pico número 3 da cromatografia de troca iônica com gradiente escalonado da Figura 3.....	89
Figura 4 -	Influência do pH na atividade coagulante da peptidase purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	90
Figura 5 -	Influência do pH na atividade proteolítica da peptidase purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	90
Figura 6 -	Influência do pH na Razão entre atividade coagulante e proteolítica da peptidase purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	92
Figura 7 -	Efeito da exposição da enzima coagulante purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em diferentes valores de pH.....	92
Figura 8 -	Influência do tempo de exposição em diferentes valores de pH na Razão AC/AP da enzima coagulante purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	93
Figura 9 -	Determinação da temperatura ótima de atuação da peptidase coagulante purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	94
Figura 10 -	Efeito de diferentes temperaturas na Razão AC/AP da enzima coagulante purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	95
Figura 11 -	Influência do tempo de incubação nas atividades coagulante e proteolítica da enzima purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 em diferentes temperaturas.....	96
Figura 12 -	Razão AC/AP da enzima coagulante purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 após exposição em diferentes temperaturas.....	98
Figura 13 -	Influência do cloreto de cálcio na atividade coagulante da enzima purificada do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	98

CAPÍTULO 4. PRODUÇÃO DE QUEIJO MUSSARELA A PARTIR DE COAGULANTE MICROBIANO PRODUZIDO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELO FUNGO FILAMENTOSO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

Figura 1 - Porcentagem da capacidade de derretimento durante o período de armazenamento dos queijos fabricados com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (▲) e com o coagulante comercial (●).....116

Figura 2 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (UREA-PAGE) dos queijos mussarela produzidos com o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e com o coagulante comercial nos períodos de 1, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de fabricação.....117

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A OBTENÇÃO DA RENINA MICROBIANA PRODUZIDA PELO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 A PARTIR DE FARELO DE TRIGO

Tabela 1 -	Matriz experimental utilizada para o planejamento estatístico de Plackett-Burman.....	61
Tabela 2 -	Matriz de Doehlert para a otimização da atividade coagulante.....	61
Tabela 3 -	Resultados para a atividade coagulante a partir do planejamento estatístico de Plackett-Burman.....	63
Tabela 4 -	Análise de variância para o planejamento estatístico de Plackett-Burman.....	64
Tabela 5 -	Resultados obtidos para a atividade coagulante utilizando Doehlert design.....	65
Tabela 6 -	Análise de Variância para os dados obtidos na Tabela 5.....	66
Tabela 7 -	Estimativa dos efeitos na atividade coagulante baseado no planejamento de Doehlert design.....	67

CAPÍTULO 4. PRODUÇÃO DE QUEIJO MUSSARELA A PARTIR DE COAGULANTE MICROBIANO PRODUZIDO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELO FUNGO FILAMENTOSO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

Tabela 1 -	Caracterização físico-química do leite pasteurizado utilizados na produção dos queijos.....	112
Tabela 2 -	Composição dos queijos mussarela feito com o coagulante do <i>T. indicae-seudaticae</i> N31 (QT) e com o coagulante comercial (QC) durante o período de 1 dia de armazenamento.....	113
Tabela 3 -	Composição dos queijos mussarela feito com o coagulante do <i>T. indicae-seudaticae</i> N31 (QT) e com o coagulante comercial (QC) durante o período de 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento.....	114

LISTA DE NOTAÇÃO E ABREVIATURAS

AC	Atividade Coagulante
ANOVA	Análise de Variância
AP	Atividade Proteolítica
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSm	Fermentação Submersa
FT	Farelo de Trigo
R	Razão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido Tricloroacético
GES	Gordura no extrato seco
NS pH 4,6	Nitrogênio solúvel em pH 4,6
NS TCA	Nitrogênio solúvel em Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	21
CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
1. Obtenção de enzimas microbianas.....	24
2. Fermentação em biorreator.....	25
3. Micro-organismo - <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	26
4. Proteínas - Enzimas.....	28
5. Proteínas do leite.....	30
6. Coalhos e Coagulantes.....	34
7. Processo de coagulação.....	35
8. Determinação e importância da Razão (R) entre AC e AP.....	38
9. Produção enzimática a partir de subproduto e resíduo agroindustrial.....	38
10. Processo de purificação de protease.....	40
11. Queijo, Definição e Características.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
 CAPÍTULO 2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A OBTENÇÃO DA RENINA MICROBIANA PRODUZIDA PELO <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 A PARTIR DE FARELO DE TRIGO.....	 54
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1. Micro-organismo e Cultura estoque.....	58
2.2. Pré-Inóculo.....	58
2.3. Produção da peptidase em frasco Erlenmeyer.....	58
2.4. Produção da peptidase em biorreator com agitação mecânica.....	59
2.5. Atividade enzimática.....	59
2.5.1. Atividade coagulante (AC).....	59
2.5.2. Atividade proteolítica (AP)	59
2.5.3. Razão (AC/AP).....	60

2.6. Avaliação de diferentes fatores para a otimização da produção da peptidase coagulante produzida pelo <i>T. indicae-seudaticae</i> N31.....	60
2.6.1. Seleção de variáveis significativas na atividade coagulante.....	60
2.6.2. Otimização da atividade coagulante utilizando Doehert design.....	61
2.6.3. Análises estatísticas.....	62
2.7. Efeito do congelamento na atividade coagulante da enzima.....	62
3. RESULTADOS.....	62
3.1. Seleção de variáveis significativas na atividade coagulante.....	62
3.2. Otimização da atividade coagulante utilizando Doehert design.....	64
3.3. Validação do modelo.....	68
3.4. Produção em biorreator com agitação mecânica.....	70
3.5. Influência do congelamento na atividade coagulante da peptidase.....	73
4. CONCLUSÃO.....	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

CAPÍTULO 3. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PEPTIDASE COAGULANTE PRODUZIDA PELO <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 OBTIDA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	80
RESUMO.....	80
ABSTRACT.....	81
1. INTRODUÇÃO.....	82
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	83
2.1. Micro-organismo.....	83
2.2. Inóculo e obtenção da enzima.....	83
2.3. Atividade Coagulante e Proteolítica.....	83
2.3.1. Atividade coagulante (AC).....	83
2.3.2. Atividade proteolítica (AP).....	84
2.3.3. Razão (AC/AP).....	84
2.4. Purificação da peptidase coagulante.....	84
2.4.1. Concentração enzimática.....	84
2.4.2. Cromatografia de troca iônica.....	85

2.5. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	85
2.6. O efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima pura...	85
2.7. Influência da concentração do cloreto de cálcio na atividade coagulante da enzima pura.....	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
3.1. Purificação da peptidase coagulante do <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	86
3.2. Caracterização da enzima purificada através das atividades coagulante e proteolítica.....	89
3.2.1. pH ótimo.....	89
3.2.2. pH de estabilidade.....	92
3.2.3. Temperatura ótima.....	94
3.2.4. Temperatura de estabilidade.....	96
3.3. Influência da concentração do cloreto de cálcio na atividade coagulante.....	98
4. CONCLUSÃO.....	99
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

CAPÍTULO 4. PRODUÇÃO DE QUEIJO MUSSARELA A PARTIR DE COAGULANTE MICROBIANO PRODUZIDO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELO FUNGO FILAMENTOSO <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.....	103
RESUMO.....	103
ABSTRACT.....	105
1. INTRODUÇÃO.....	106
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	107
2.1. Micro-organismo e produção da enzima.....	107
2.2. Atividade enzimática.....	107
2.2.1. Atividade coagulante (AC).....	107
2.2.2. Atividade proteolítica (AP).....	108
2.2.3. Razão (AC/AP).....	108
2.3. Produção do queijo mussarela.....	108
2.4. Caracterização físico-química dos queijos.....	109
2.5. Capacidade de derretimento dos queijos mussarela.....	110

2.6. Perfil eletroforético das proteínas presentes na matriz dos queijos.....	110
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
3.1. Caracterização do leite pasteurizado utilizado na fabricação dos queijos.....	111
3.2. Composição centesimal dos queijos mussarela.....	112
3.3. Capacidade de derretimento dos queijos mussarela.....	115
3.4. Perfil eletroforético das proteínas presentes na matriz dos queijos.....	116
4. CONCLUSÃO.....	118
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS.....	122

INTRODUÇÃO GERAL

O emprego de enzimas em diferentes setores industriais tem destaque devido às vantagens operacionais como especificidade da reação e alta eficiência de conversão com pouca formação de metabólitos secundários.

Peptidases microbianas fazem parte da classe de enzimas responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, podem ser aplicadas em indústrias de detergentes, couros, laticínios (queijos) e também em aplicações medicinais.

Vários grupos de micro-organismos são capazes de produzir estas peptidases, contudo a pesquisa por novas linhagens produtoras de enzimas coagulantes se justifica em função da especificidade e propriedades físico-químicas requeridas para que um coagulante substitua satisfatoriamente a renina do bezerro.

A obtenção de enzimas coagulantes produzidas por fungos vem aumentando principalmente pelo fato de suas enzimas serem, em sua maioria, extracelulares, facilitando o processo de extração e recuperação do meio de fermentativo com consequente ganho em custo sem prejuízo da qualidade.

A produção de enzimas microbianas geralmente é realizada por meio da fermentação no estado sólido (FES) ou por meio da fermentação submersa (FSm). A escolha do tipo de fermentação, condições de produção e composição do meio depende da adaptação fisiológica do micro-organismo. A utilização de resíduos agroindustriais como substrato de fermentação é uma alternativa interessante, já que é possível se produzir enzimas com relativa redução de custos no processo.

A utilização de enzimas termoestáveis de micro-organismos termofílicos compõe uma abordagem de grande importância para o desenvolvimento de novas tecnologias. A partir do estudo de cada enzima é possível estabelecer um protocolo de produção visando sua aplicação comercial em substituição às enzimas obtidas de forma convencional.

Existem vários fatores que afetam a produção enzimática, por isso, faz-se necessário um planejamento experimental para verificar as condições ótimas, pois as mesmas podem variar entre diferentes micro-organismos, bem como o perfil das diferentes enzimas obtidas. Dentre os diversos modelos de desenho experimentais, podem ser citados aqueles de seleção, como o Plackett-Burman e Fatorial, e os de otimização como Doehlert, Composto Central e Box-Behnken. O Plackett-Burman

mostra-se muito útil na seleção dos fatores importantes e que são significativos na produção de um determinado produto e necessita de poucos pontos experimentais para a sua aplicação. No entanto, não avalia a interação entre as variáveis como o planejamento fatorial faz. O método Doehlert é utilizado como complemento na otimização da produção enzimática e apresenta a vantagem sobre os demais, pois permite avaliar as variáveis em diferentes níveis. Ademais, também apresenta outras vantagens: avalia a interação entre as variáveis independentes, com uma uniformidade no espaço, necessita de poucos pontos experimentais para a sua aplicação, pode ser deslocado para fora do domínio experimental inicial, possui alta eficiência, prediz e calcula os valores ótimos de cada fator e resposta.

A utilização de um delineamento estatístico para a seleção de melhores condições de produção permite a identificação rápida de fatores relevantes, bem como a interação entre eles. A escolha adequada dos intervalos das variáveis é fundamental para alcançar a melhor resposta da produção.

Estudar o modo de ação da enzima coagulante através da determinação de características bioquímicas é fundamental para entendê-la e aplicá-la de forma adequada. Portanto, faz-se necessário obter a enzima na sua forma pura. Normalmente é preciso desenvolver uma metodologia específica de purificação devido às diferenças dos constituintes dos meios de cada produção enzimática.

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades na indústria de laticínios. Para a obtenção de queijo de boa qualidade, o método de coagulação, o coalho/coagulante, a cultura utilizada e os diferentes tratamentos dados à massa, é que determinam as características sensoriais do produto final.

O presente estudo se propõe a otimizar o processo de fermentação submersa da enzima por meio de um delineamento estatístico, aumentar o volume de produção utilizando de testes em biorreator, determinar um protocolo de purificação, estudar as características bioquímicas da enzima pura e produzir o queijo mussarela através da enzima coagulante bruta do *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Obtenção de enzimas microbianas

No processo de fermentação o desenvolvimento microbiano é monitorado durante todo o processo, não importando o estado físico do meio que pode ser líquido ou sólido. A fermentação é uma ferramenta alternativa e de grande importância para a produção e obtenção de enzimas, vitaminas, hormônios, pigmentos, biosurfactantes, biopesticidas, entre outros produtos de interesse industrial (PANDEY, 2003).

A fermentação, em geral, pode ser realizada em estado líquido ou sólido, utilizar desde substratos nobres até resíduos agrícolas, ser empregada tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial e fazer uso de uma grande variedade de micro-organismos, sem mencionar que, ao final, pode-se obter uma infinidade de produtos.

Uma das formas de processo fermentativo é a FES que corresponde ao cultivo de micro-organismos em estado sólido. Este processo envolve o cultivo de micro-organismos sobre um substrato com relativa ausência de água livre, assegurando o estado sólido. Contudo, a umidade deve ser suficiente para garantir as atividades metabólicas. Emprega substratos tais como grãos, bagaços e farelo de trigo (PANDEY, 2003).

Outro processo fermentativo é representado pela FSm, que é o cultivo de micro-organismos em meio fermentativo no estado líquido. A produção industrial de enzimas geralmente é realizada utilizando o cultivo submerso. Este processo envolve o crescimento cuidadosamente controlado e monitorado, de micro-organismos selecionados (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), adicionados em biorreatores com agitação mecânica, contendo um caldo de nutriente (meio de fermentação) e uma adequada concentração de oxigênio. Quando os micro-organismos degradam o substrato para metabolizar os nutrientes, muitas vezes, eles liberam a enzima desejada na solução (BON et al., 2008).

Os sistemas de FES e FSm oferecem vantagens e desvantagens. A FES, por exemplo, apresenta diversidade na utilização de resíduos agroindustriais, utiliza baixa quantidade de água, diminuindo a formação de água residual e diminuindo problemas de contaminação por bactérias durante o processo, e muitas vezes, as produções enzimáticas são maiores. Por outro lado, uma grande desvantagem é a dificuldade de controle efetivo dos parâmetros fermentativos, uma vez que o meio é heterogêneo,

difícultando a homogeneidade na transferência calor e umidade. O pH e difusão de oxigênio também são heterogêneos. Isto gera regiões de crescimento microbiano localizado e nem sempre homogêneas no fermentador. Além disso, a esterilização do meio é muito difícil, podendo ocorrer contaminações com frequência (GERMANO et al., 2003; PANDEY, 2003). Os desenhos de fermentadores industriais ainda são feitos por meio de encomenda o que eleva muito o seu custo. Também deve se considerar a limitada variedade de micro-organismos capazes de crescer em níveis de umidade reduzida (SOCCOL et al., 2003).

Por outro lado, o processo em FSm possibilita o controle dos parâmetros físico-químicos do processo e apresenta fácil recuperação das enzimas extracelulares, micélio ou esporos além de possuir facilidade de cultivo em grande escala, já que garante a homogeneidade do meio (SANDHYA et al., 2005; PINHEIRO, 2006). A produção de enzimas em escala industrial é realizada, na maioria das vezes, por fermentação submersa (WANDERLEY et al., 2011).

A composição do meio fermentativo é o que irá determinar a produção, portanto deve ser composto, em geral, de macronutrientes fermentecíveis (assimiláveis), representados principalmente pelas fontes de carbono e nitrogênio, as mais significantes, além de micronutrientes (ferro, manganês, entre outros) e fatores de crescimento, como as vitaminas (WANDERLEY et al., 2011).

A fermentação é uma ferramenta importante na obtenção de enzimas. Sistemas de FES e FSm têm sido utilizados para produção de peptidases (SANDHYA et al., 2005; MERHEB et al., 2006; KRISHNA et al., 2009; MERHEB-DINI et al., 2010; ROCHA, 2010; DING et al., 2012; SILVA et al., 2014), lipases (ALVES et al., 2002; KOBLITZ; PASTORE, 2004; DAMASO et al., 2008; FERRAREZI et al., 2014), pectinases (MARTIN et al., 2004; VARAVALLO et al., 2007; PIROTA, 2009), xilanases (MORETTI et al., 2012; NCUBE et al., 2012; HO; HOOD, 2014), amilases (TEODORO; MARTINS, 2000; ALVES et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2007), celulases (MINUSSI et al., 1998; MORETTI et al., 2012; NCUBE et al., 2012), entre outras.

2. Fermentação em biorreator

Denominam-se biorreator, reator bioquímico ou reator biológico, os reatores nos quais ocorrem reações químicas catalisadas por biocatalisadores (enzimas ou células

vivas). As reações, ou também chamadas de fermentações, tem a finalidade de transformar substratos em produtos de maior valor agregado. Os biorreatores podem ser classificados em dois grupos, os reatores enzimáticos, nos quais as reações ocorrem na ausência de células vivas e os biorreatores, nos quais as reações ocorrem a partir de células vivas (SCHMIDELL et al., 2001).

De acordo com Farshad et al. (2013), para a produção de coagulantes microbianos em escala industrial mais pesquisas devem ser realizadas, já que se faz necessária a determinação de parâmetros eficazes para a produção, tanto em termos de qualidade como quantidade, para que, ao final do processo, se alcance uma maior razão AC/AP.

A fermentação submersa é o processo fermentativo com o maior número de aplicações industriais. O modelo de biorreator que representa 90% do total de biorreatores utilizados industrialmente, em fermentação submersa, é o reator com agitação mecânica, conhecido como STR (*stirred tank reactor*). O meio submerso permite melhor dissolução das fontes de nutrientes, facilitando o contato do micro-organismo a estes compostos. Este método também permite operações, como a esterilização do meio de cultivo, o controle da temperatura, aeração e do pH durante o processo. Além disso, no processo submerso, há também facilidade de aumento de escala e de alteração no regime de operação, podendo ser executado em regime descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo (SCHMIDELL et al., 2001).

Os principais fatores que afetam no crescimento microbiano são: temperatura de incubação, pH do meio, teor de oxigênio e velocidade de agitação (BORZANI et al., 2001).

3. Micro-organismo - *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

Os fungos são micro-organismos eucariotos, heterotróficos, armazenam glicogênio como material de reserva, e com exceção dos fungos aquáticos, não possuem celulose na parede celular. Podem ser encontrados em todos os lugares, tais como, ar, solo, água, vegetais e animais (BORZANI et al., 2001).

O *Thermomucor indicae-seudaticae* é um fungo filamentoso termofílico, homotático e encontra-se classificado na ordem *Mucorales*, família *Mucoraceae* (O'DONNELL et al., 2001).

A cepa do *T. indicae-seudaticae* N31 pode ser considerada um micro-organismo com grande potencial para produção de diferentes enzimas, como exemplo: Pirola (2009) produziu pectinase em FES em 168 horas de incubação a 45 °C; Martin et al. (2010) produziu poligalacturonase em FES e FSm em 48 e 96 horas, respectivamente, a 45 °C; Merheb-Dini et al. (2010) produziram protease em FES em 24 horas a 45 °C; Ferrarezi et al. (2014) produziram lipase em FES e em FSm em 48 horas a 45 °C; Pereira et al. (2015) produziram β -glucosidase em FES em 192 horas a 45 °C.

Considerando a produção de peptidases, os micro-organismos as secretam a fim de degradar proteínas e utilizar os produtos de degradação como fonte de nutrientes para seu próprio crescimento (PANDEY et al., 2006).

O crescimento de fungos filamentosos em meios em estado líquido ou sólido é afetado pelas condições ambientais e pela composição do meio de crescimento. Portanto, alterações morfológicas e fisiológicas são susceptíveis de serem observadas como resultado destas mudanças, e, por conseguinte, também é factível uma alteração tanto no nível de expressão quanto nas propriedades catalíticas de uma determinada enzima (CÁNOVAS; IBORRA, 2003).

Para a nutrição e renovação da matéria viva, os elementos quantitativamente mais importantes no meio de cultivo são: carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre e fósforo. A água e o oxigênio atmosférico não são considerados como nutrientes, contudo ambos são indispensáveis para o crescimento de micro-organismos aeróbios (BORZANI et al., 2001).

Uma forma para obtenção de enzimas é através de processos fermentativos e o trabalho com fungos tem chamado atenção, principalmente por não tornar necessário o uso de métodos caros de filtração, já que seu micélio pode ser removido facilmente, por filtração a vácuo e centrifugação, obtendo-se um extrato livre de células (ANDRADE et al., 2002). Além disso, os fungos são capazes de produzir uma maior variedade de enzimas do que bactérias, entre elas: peptidases ácidas, neutras ou alcalinas, ativas numa ampla faixa de pH (4,0 a 11,0) e em uma ampla variedade de substratos (RAO et al., 1998).

Para uma produção em maior escala, como a produção industrial, o micro-organismo deve apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto, permitir o acúmulo do produto no meio, não produzir substâncias incompatíveis com o produto, apresentar constância no comportamento fisiológico, não ser patogênico, não

exigir condições complexas de processo nem meios de cultura dispendiosos e permitir rápida liberação do produto para o meio (SCHMIDELL et al., 2001).

Silva (2013) estudou a produção de uma peptidase coagulante em FSm pelo *T. indicae-seudaticae* N31 e observou uma diferença acentuada na forma de crescimento e na produção enzimática ao alterar o substrato do meio, concentração de sais e condições de incubação, como agitação e período de incubação.

Geralmente, em FSm a forma de crescimento dos fungos filamentosos varia entre a forma de “pellets” e filamentosa, enquanto na FES predomina a forma micelial (filamentosa), cada qual com características próprias, que podem afetar a produção da enzima (MITCHELL; LONSANE, 1992). Sendo assim, se faz necessário conhecer a fisiologia do micro-organismo de trabalho a fim de compor um meio fermentativo apropriado à produção da substância de interesse (BORZANI et al., 2001).

4. Proteínas - Enzimas

As proteínas são constituídas por aminoácidos, os quais são unidos por meio de ligações peptídicas e desempenham diversas funções, tais como: estrutural e contrátil, hormônios, proteínas de transporte, antígenos/anticorpos, função nutricional e catalisadores biológicos; este último grupo compreende as enzimas (SGARBIERI, 1996).

As enzimas são proteínas globulares, heteropolímeros de vinte aminoácidos diferentes, algumas possuem, como parte de sua estrutura, um grupo não protéico, o qual é denominado de grupo prostético, elas são macromoléculas, cujo peso molecular pode variar de 5.000 a mais de 1.000.000 Daltons (BORZANI et al., 2001).

Em grande parte dos casos o tamanho entre a enzima e o substrato é consideravelmente diferente, sendo que normalmente a massa molar do substrato é muitas ordens de grandeza inferior. Esta desproporção facilita o encaixe do substrato no sítio ativo da enzima (MARZZOCO; TORRES, 2007).

As enzimas são altamente específicas e tem função de catalisar as reações bioquímicas, ou seja, são capazes de aumentar a velocidade de uma reação por um fator de até 10^{20} . Em ausência de enzimas adequadas, a digestão de uma simples refeição poderia demorar por volta de 50 anos (CAMPBELL; FARRELL, 2011).

As enzimas industriais são, majoritariamente, produzidas a partir de micro-organismos (BON et al., 2008). Do total, mais da metade são extraídas a partir de

fungos e leveduras, um terço a partir de fontes bacterianas e o restante a partir de fontes animais e vegetais (PANDEY et al., 2006). Uma das dificuldades da obtenção de enzimas provenientes de fontes animais e vegetais é a grande influência da sazonalidade na produção (BON et al., 2008).

Enzimas microbianas podem ser intracelulares ou extracelulares, sendo que as produzidas extracelularmente são, normalmente, mais estáveis e produzidas em maiores quantidades, além de possuírem a função principal de degradar as macromoléculas presentes no meio, como celulose, amido, lignina e proteínas, com a finalidade de absorver seus componentes como nutrientes (BON et al., 2008). Outra vantagem é que as enzimas extracelulares facilitam o processo de extração e recuperação do meio fermentativo (GERMANO et al., 2003).

Alterações das características do meio, como pH e temperatura, por exemplo, podem causar mudanças na conformação da proteína e, conseqüentemente, na estrutura tridimensional, o que pode alterar o sítio ativo, comprometendo a função biológica enzima (MARZZOCO; TORRES, 2007).

As peptidases são classificadas de acordo com a origem (animal, vegetal ou microbiana), ação catalítica (endopeptidase ou exopeptidase) e com a natureza do sítio catalítico. As endopeptidases clivam particularmente as regiões internas da cadeia polipeptídica, enquanto que as exopeptidases vão atuar nos finais das cadeias polipeptídicas na região amino (aminopeptidases) ou carboxi (carboxipeptidases) terminal (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

As peptidases fazem parte de um dos grupos mais importantes entre as enzimas, devido às diversas aplicações industriais e amplitude de uso, que compreendem desde as indústrias de detergentes, tintas e couros, até as indústrias de alimentos e produtos farmacêuticos (KRISHNA et al., 2009).

Como outras enzimas, as peptidases apresentam um aumento da atividade específica com o aumento da temperatura até alcançar a atividade ótima, a partir desta temperatura, a atividade enzimática tende a diminuir e inicia-se o processo de desnaturação, que é caracterizado pela perda total da atividade. Além da temperatura, cada protease apresenta atividade ótima em valores específicos de pH, sendo assim, podem ser classificadas em peptidases ácidas, neutras e alcalinas (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

O processo de desnaturação altera a estrutura secundária, terciária e quaternária, contudo não altera a sequência de aminoácidos, ou seja, não há rompimento da estrutura

primária, todavia a alteração da conformação acarreta na perda da atividade biológica e funcionalidade (ARAÚJO, 2004).

5. Proteínas do leite

As proteínas do leite podem ser classificadas de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais em três grupos principais, como as caseínas, as proteínas do soro e as proteínas das membranas dos glóbulos de gordura (SGARBIERI, 1996).

Em relação à solubilidade em pH 4,6 a 20 °C, são destacados dois principais grupos: as proteínas que precipitam são chamadas de caseínas e as proteínas que permanecem solúveis são chamadas de proteínas do soro. O leite bovino é constituído de 80 % de caseínas, aproximadamente (FOX; KELLY, 2004). Sendo assim, do ponto de vista quantitativo, nutricional e industrial, a caseína é a proteína mais importante (LIMA, 2010).

De toda a caseína encontrada no leite, 80 a 90 % estão na forma de partículas coloidais aproximadamente esféricas, chamadas de micela, medem em torno de 50 a 200 nm de diâmetro e tem peso de 10^7 - 10^9 daltons e de 10 a 20 % é a porção de caseína que permanece solúvel e essa solubilidade depende de fatores como temperatura, concentração de íons, cálcio e pH (SGARBIERI, 1996). A estrutura micelar é considerada responsável pela base da estabilidade do leite, já que essa conformação é mantida por uma força de repulsão, que é determinada como estabilidade (MACHADO, 2010).

A caseína é considerada uma proteína relativamente pequena, de massa molecular de 20 a 25 kDa, o que provavelmente contribui significativamente para a sua elevada estabilidade. As caseínas, especialmente a β -caseína, contém um elevado teor de prolina, a qual tem a propriedade de interromper a continuidade da estrutura secundária, ou seja, evita a formação de α -helice e folha- β , resultando em uma estrutura relativamente aberta e flexível (FOX; KELLY, 2004).

A caseína, bem como a lactose e a gordura, é um dos componentes orgânicos do leite mais abundantes; é digerida no intestino e considerada fonte de aminoácidos essenciais. Entretanto, quando a digestão não ocorre totalmente pode estimular uma resposta imune localizada intestinal ou sistêmica, conhecida como alergia às proteínas do leite (FRANCO et al., 2009).

A microscopia eletrônica mostrou que as micelas têm uma aparência desigual, o que foi interpretado que as caseínas são construídas a partir de uma união de submicelas (FOX; BRODKORB, 2008), as quais foram classificadas por Cheftel et al. (1989) como a α_{s1} -caseína (sem cisteína e mais suscetível ao efeito de proteases), α_{s2} -caseína (altamente hidrofílica, fosforilada e com grande sensibilidade ao cálcio ionizável), β -caseína (apresenta maior quantidade de prolina e pode se tornar mais aberta em baixas temperaturas, ficando mais suscetível às proteases), κ -caseína (micela de pequeno tamanho, forte, difícil solubilização, sofre pouco efeito do cálcio livre, é a principal fração responsável pela característica de estabilidade protéica da submicela) e γ -caseína (é o resultado da ação proteolítica sobre a β -caseína).

Essas submicelas encontram-se distribuídas em diferentes proporções no leite, sendo que a α_{s1} -caseína representa 38 %, α_{s2} -caseína 10 %, β -caseína 36 % e a κ -caseína 12 %. Cada uma das caseínas apresentam microheterogeneidade, devido à variação no grau de fosforilação; variação no grau de glicosilação no caso da κ -caseína; substituições de aminoácidos geneticamente controladas, conduzindo ao polimorfismo genético; formação de pontes dissulfeto no caso da α_{s2} e κ -caseínas; e proteólise por proteases nativas (FOX; KELLY, 2004).

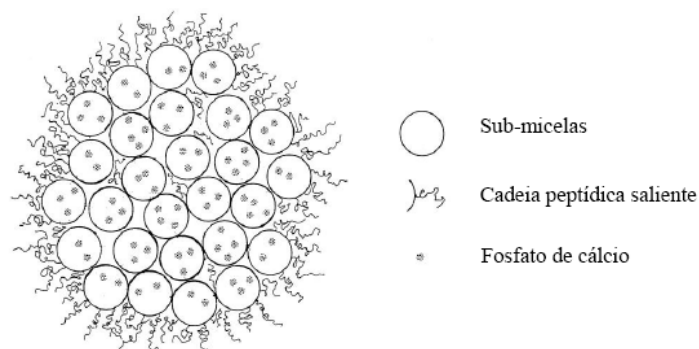
A fração κ -caseína está próxima ou na superfície da micela e difere-se da α e β por conter uma região glicosilada, composta por três monossacarídeos (galactose, N-acetil-galactosamina e ácido N-acetil neuramínico), formando tri ou tetrassacarídeos, ligados aos resíduos treonil 131, 133, 135 ou 136. Entre todas as caseínas a κ -caseína é a menos fosforilada, possui maior estabilidade devido à estrutura mais ordenada. Possui apenas um resíduo fosforil, localizado no segmento glicomacropeptídio. É a única caseína que não precipita na presença de Ca^{++} em pH neutro (SGARBIERI, 2005).

Existem algumas explicações para descrever a micela de caseína, entretanto sua estrutura ainda provoca controvérsias na comunidade científica. Phadungath (2005); Fox e Brodkorb (2008) descrevem uma revisão geral sobre o assunto.

Os modelos se encaixam em 3 categorias: modelos *coat-core* (as micelas seriam esferas rígidas cobertas com uma camada de filamentos protéicos, a κ -caseína), modelos de sub-unidades (submicelas explicado acima por Cheftel et al. (1989); Fox e Brodkorb (2008). Além desses autores citados anteriormente, Walstra (1999) elaborou um modelo, no qual o fosfato de cálcio está presente como aglomerados dentre as submicelas – Figura 1) e modelos de estrutura interna, sendo que todos discutem sobre a composição e organização das β -caseína, α -caseína e κ -caseína no interior e exterior da

micela, sobre a localização e função do fosfato de cálcio e sobre como toda a estrutura é estabilizada.

Figura 1. Micela em corte transversal, mostrando a estrutura em submicelas, as cadeias polipeptídicas da κ -caseína se projetando da superfície e os aglomerados de fosfato de cálcio.



Fonte: WALSTRA, 1999.

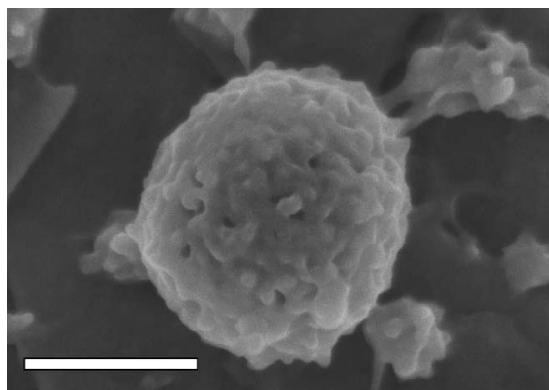
No modelo proposto por Walstra (1999) pode-se observar a micela de caseína de forma esférica, não possui superfície regular plana, é constituída por submicelas, as quais variam em composição e parecem permanecer ligadas por aglomerados de fosfato de cálcio, sendo assim, ocorre uma agregação das submicelas até a formação da micela, na qual se observa o posicionamento da κ -caseína na superfície micelar.

Em média, as micelas são constituídas de 93 % de proteína, 2,8 % de cálcio, 2,3 % de fósforo orgânico, 2,9 % de fósforo inorgânico, 0,4 % de citrato e baixos níveis de magnésio, sódio e potássio (SGARBIERI, 1996).

Apesar do modelo de submicelas ter aceitação na comunidade científica, alguns autores citados por Phadungath (2005) descrevem modelos alternativos para explicar a micela de caseína. Como proposto por Dalglish et al. (2004) através de micrografia eletrônica de varredura, observaram que a superfície micelar não era apenas filamentos presos à uma esfera, eram pequenas estruturas de forma cilíndrica ou tubular, entre 10 a 20 nm de diâmetro, as quais se projetavam do interior, possuindo na extremidade a κ -caseína (Figura 2), o que proporciona uma maior área superficial e facilita a ação de moléculas menores como as enzimas, por exemplo.

Em relação ao tamanho, as micelas medem de 500 a 3.000 Angstroms de diâmetro e apresentam peso molecular de $2,5 \times 10^8$ Daltons, são altamente hidratadas com cerca de 3,7 g ou 4,4 mL de água por grama de caseína (SGARBIERI, 2005).

Figura 2. Eletro micrografia da micela de caseína.



Fonte: DALGLEISH et al., 2004.

Quanto às funções da micela de caseína, Fox e Brodtkorb (2008) chegaram à conclusão de que a caseína do leite existe como micelas dentre todas as espécies estudadas, esse fato é indicado devido à coloração branca presente da qual as micelas são as principais responsáveis. Além disso, observaram que sua distribuição universal sugeriria algum significado nutricional e/ou fisiológico que podem ser observados através da melhora da digestibilidade de recém-nascidos (coagulação das micelas de caseína pela quimosina) e também pela presença de cálcio e fósforo (responsáveis pelo desenvolvimento de dentes e ossos). As micelas mantêm o excesso de fosfato de cálcio em um estado coloidal estável permitindo a secreção do leite com alta concentração de fosfato de cálcio, na forma solúvel; se não houvesse micelas o fosfato de cálcio iria precipitar na glândula mamária bloqueando seus canais, o que poderia levar até a morte do órgão.

Portanto, o conhecimento das diferenças estruturais e das propriedades físico-químicas entre as várias formas de caseína e as proteínas do soro se faz necessário para a compreensão do comportamento tecnológico e funcional, nutritivo e fisiológico dessas proteínas, como parte de um sistema alimentício (SGARBIERI, 2005). Além disso, conhecer a estrutura da micela é importante, devido às reações sofridas por elas durante o processamento de alguns produtos, como, processamento de queijos, estabilidade na esterilização, leites reconstituídos, produtos congelados, entre outros, e a ausência de

conhecimento apropriado da estrutura e das propriedades da micela de caseína, prejudicam as tentativas de solucionar problemas na indústria lática (FOX; KELLY, 2004).

6. Coalhos e Coagulantes

A denominação coalho é utilizada para as enzimas obtidas da quarta câmara do estômago de ruminantes (abomaso) como, por exemplo, o coalho bovino, enquanto a denominação coagulante é utilizada a todas as enzimas utilizadas para coagular o leite, ou seja, aquelas obtidas por meio diferente do coalho, como no caso, dos coagulantes vegetais e microbianos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Muitas enzimas coagulantes microbianas possuem atividade proteolítica, que é a atividade considerada não específica, ou seja, pode atuar hidrolisando partes indesejáveis da caseína. Na indústria de queijos, essa característica é fator limitante, uma vez que pode comprometer o rendimento e a qualidade sensorial do produto (FARSHAD et al., 2013).

O coalho bovino é composto de uma mistura de duas proteínas: renina (também conhecida como quimosina) e pepsina. Todavia, esta relação quimosina-pepsina varia de modo considerável com a idade do animal, isto é, quanto mais jovem, maior a proporção de quimosina, o que é desejável em função de sua atuação específica na coagulação da caseína. Além da idade, o regime alimentar do animal prévio ao abate também influencia esta proporção (ANDRÉN, 1998; LIMA et al., 2003).

Em coalhos de animais recém-nascidos, a proporção média de quimosina : pepsina é em torno de 80 % : 20 % e em animais mais velhos, esta proporção é inversa. Esta informação é importante, uma vez que as pepsinas apresentam menor grau de especificidade, hidrolisando ligações indesejáveis, o que diminui a qualidade do coalho e aumenta o amargor, já a quimosina é considerada altamente específica não deixando residual amargo, porque hidrolisa a ligação peptídica entre os aminoácidos 105 (fenilalanina) e 106 (metionina) (GAJO et al., 2012).

Dados da Associação Brasileira de Queijo (ABIQ), que realizou um levantamento não oficial por meio de *desk research* apontam uma estimativa de produção de queijos no Brasil durante os últimos anos, baseado na produção de empresas com SIF (Serviço de Inspeção Federal). De acordo com o levantamento realizado, a produção de queijos tem se mantido elevada durante os últimos anos no

Brasil (2012 $\approx$ 1003 mil ton; 2013 $\approx$ 989 mil ton; 2014 $\approx$ 1075 mil ton), sendo que o tipo de queijo de maior volume produzido é o queijo tipo mussarela. Isso se deve, principalmente, ao grande emprego no *Food Service*.

Com o crescente aumento da produção de queijos, fontes alternativas de coalhos e coagulantes para promover a coagulação do leite estão sendo estudadas, incluindo coalho bovino de vacas adultas, proteases coagulantes de fungos e outras enzimas proteolíticas. Além do alto custo para a extração da quimosina de bezerros, a presença de outras enzimas (pepsinas), as quais diminuem o rendimento da produção, também é um fator relevante. No entanto, a maioria das proteases de fontes alternativas têm um maior nível de inespecificidade, levando a uma diminuição do rendimento e possível desenvolvimento de amargor em alguns tipos de queijo (CHITPINITYOL; CRABBE, 1997). Por esse motivo, vários trabalhos estão sendo desenvolvidos a fim de melhorar a razão entre a atividade coagulante, específica e atividade proteolítica, inespecífica.

O pH ótimo e a estabilidade de atuação do coagulante microbiano pode determinar se este será ou não considerado como um bom substituto ao coalho bovino (FARSHAD et al., 2013).

7. Processo de coagulação

O processo de coagulação espontânea do leite não acontece, porque a porção C-terminal da κ -caseína, o glicopeptídeo, projeta-se para fora da superfície da micela, formando uma camada esponjosa que previne, por repulsões estéricas e eletrostáticas, qualquer agregação posterior de submicelas (WALSTRA, 1999).

A coagulação pode ser realizada por via enzimática (coalho ou coagulante), em meio ácido, a frio ou a quente, porém o coágulo obtido por esses três últimos métodos é diferente do coágulo obtido por via enzimática (LIMA, 2010).

Na primeira fase do processo de coagulação a principal caseína afetada pela renina ou quimosina é a κ -caseína. Esta hidrólise enzimática é capaz de liberar fragmentos, os quais são denominados de para- κ -caseína e glicopeptídeo (RAYMOND et al., 1972).

Após a coagulação ocorre a expulsão do líquido residual, o qual é denominado de lactosoro e o teor de lactosoro liberado varia conforme o tipo de queijo. Uma parte do lactosoro é eliminada após o processo de fabricação do queijo, porém o restante é

aproveitado como matéria-prima na produção de iogurtes, ricota entre outros produtos (PERRY, 2004).

Quando ocorre a eliminação da estabilização eletrostática e estérica da superfície micelar, aumenta a hidrofobicidade de superfície, o que resulta em agregação das micelas e formação de coágulo, essa hidrólise enzimática ocorre durante a produção de queijos ou no tratamento térmico em temperaturas elevadas fazendo com que ocorra a dissociação da κ -caseína (SGARBIERI, 2005).

O entendimento das propriedades da micela facilita a compreensão da fabricação de queijos, onde se sabe que o início envolve a coagulação das caseínas do leite, e essa coagulação ou desestabilização pode ser realizada por meio de enzimas proteolíticas coagulantes ou através da acidificação (BONATO et al., 2006).

Várias peptidases possuem capacidade de coagular o leite, todavia, é a renina ou também denominada quimosina, que executa com maior propriedade o papel de melhor agente de coagulação e isso se deve às características adequadas de transformação que possui.

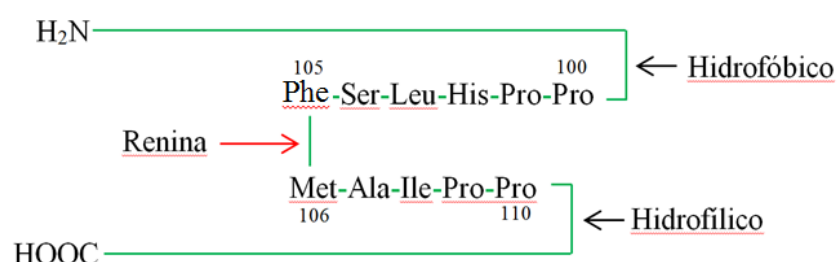
A classificação de bons agentes coagulantes é realizada de acordo com a especificidade, pois uma elevada atividade proteolítica pode ocasionar a hidrólise inadequada das proteínas do leite e, posteriormente, das proteínas do queijo. Essa hidrólise, muitas vezes indesejada, é capaz de comprometer a consistência e ainda promover o desenvolvimento de gosto amargo no produto final, devido à liberação de pequenos peptídeos, os quais podem conter resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e interagir com receptores de amargor na cavidade oral (GAJO et al., 2012).

A especificidade que torna a renina adequada para coagulação do leite foi explicada por Robinson e Wilbey (1998), por sua capacidade de hidrolisar a cadeia de aminoácidos, rompendo a κ -caseína especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). As duas partes resultantes são a para- κ -caseína insolúvel (resíduos de aminoácidos de 1 a 105, que formará o paracaseinato de cálcio) que permanece associada à micela de caseína e um peptídeo solúvel (glicomacropéptido; resíduos 106 a 169), o qual ficará contido no soro.

A liberação deste macropéptido hidrofílico, com caráter ácido, é capaz de reduzir as cargas da superfície, aumentando as interações hidrofóbicas responsáveis pela coagulação do leite (ARAÚJO, 2004). A Figura 3 representa a ação da renina sobre a caseína.

A hidrólise enzimática que ocorre na produção do queijo ou o tratamento a altas temperaturas resultam na remoção ou dissociação da κ -caseína da superfície das micelas, eliminando a estabilidade eletrostática e estérica da superfície micelar e aumentando a hidrofobicidade de superfície (SGARBIERI, 2005), com isso, a para- κ -caseína não mais estabiliza a estrutura micelar e as frações α e β -caseína podem precipitar, na presença de cálcio, formando o coágulo, onde a gordura fica retida e o soro formado é expulso pelo processo de sinérese (REID et al., 1997; BONATO et al., 2006).

Figura 3. Hidrólise da renina sobre a caseína.



Fonte: Adaptada de ARAÚJO, 2004.

A consistência do gel é aumentada gradativamente, à medida que aumenta a rigidez dos retículos de caseinato de cálcio, culminando em um ponto ideal, em função da elasticidade necessária para a fabricação de queijos (BONATO et al., 2006).

Um grande número de processos tecnológicos pode desestabilizar, dispersar ou afetar as propriedades das micelas de caseína. Contudo, a maioria dos principais produtos lácteos é produzida pela desestabilização das micelas de caseínas, como queijos, leites fermentados, tratamentos térmicos, secagem ou produtos congelados (FOX; KELLY, 2004).

Os minerais influenciam a textura do queijo, já que participam do processo de coagulação (PERRY, 2004). O cálcio ajuda na coagulação por criar condições isoeletricas e por agir como uma ponte entre as micelas (MERHEB-DINI et al., 2010), porém, quando sua concentração é baixa, a coagulação é lenta e o coágulo formado é fraco. Todavia, em concentrações adequadas, o cálcio e o fósforo tornam o coágulo mais compacto, flexível, elástico, impermeável e contrátil. Estas condições permitirão à massa do queijo suportar as forças mecânicas durante o processo de fabricação (BONATO et al., 2006).

8. Determinação e importância da Razão (R) entre AC e AP

A renina apresenta duas ações hidrolíticas na caseína. A atividade coagulante que representa a especificidade da proteólise, ou seja, a capacidade de clivar a cadeia de aminoácidos rompendo a κ -caseína especificamente entre as unidades Phe105-Met106. A atividade proteolítica hidrolisa, de modo inespecífico, outras ligações peptídicas da caseína, sendo considerada uma atividade generalizada, inespecífica, a qual compromete a consistência e promove o desenvolvimento de gosto amargo no queijo (ROBINSON; WILBEY, 1998; GAJO et al., 2012). Portanto, quanto maior a razão AC/AP, melhor o coagulante, já que este, por sua vez, apresentará maior afinidade pela ligação Phe105-Met106 durante a etapa de coagulação do leite, implicando na diminuição da proteólise inespecífica excessiva durante a produção de queijos. A renina obtida de forma convencional possui elevada especificidade, ou seja, alta AC e baixa AP, o que culmina em elevada razão (R); esta característica é o que a torna adequada para a produção de queijos.

A determinação da razão entre AC/AP é utilizada para determinar a capacidade de um extrato enzimático obtido de formas alternativas, como por exemplo, extrato enzimático extraído do estômago de outros animais, extratos vegetais, extratos produzidos por bactérias e fungos entre outros, como substituto do coalho obtido pelo método convencional.

Segundo Hashem (1999), a razão é usada como um índice para justificar a adequabilidade de um extrato enzimático para uso como substituto de coalho. E, para ser utilizada como um índice que justifique o aproveitamento do extrato como substituto de renina, o R deve ser maior que 1, ou seja, possuir mais AC do que AP.

O trabalho de Silva et al. (2014) demonstrou que a peptidase coagulante produzida pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em fermentação submersa apresentou alta AC e baixa AP, ou seja, uma elevada razão, o que sugeriu a adequabilidade da enzima em substituição ao coalho. Todavia, sua aplicação não foi avaliada na produção de queijos.

9. Produção enzimática a partir de subproduto e resíduo agroindustrial

A obtenção de enzimas microbianas a partir de subprodutos e resíduos agroindustriais tem sido o foco de muitos estudos durante os últimos anos e a tendência

é que essa linha de pesquisa continue, visando encontrar formas alternativas para agregar valor a um produto até então considerado como um subproduto ou um resíduo de produção.

O custo do meio de produção enzimática é um fator importante e, portanto, o valor do substrato fermentativo deve ser considerado. Uma alternativa para alcançar um meio de produção de baixo custo é o emprego de subprodutos e resíduos agroindustriais como substrato (PANDEY et al., 2006).

Muitos subprodutos agroindustriais, como o farelo de trigo, por exemplo, podem ser aplicados como substratos viáveis em fermentações visando à produção de diferentes enzimas. Além disso, representam uma fonte alternativa para a diminuição do custo de produção.

De modo geral, a cada ano, a preocupação em relação ao aproveitamento mais eficiente de resíduos agroindustriais vem aumentando (CARVALHO et al., 2008), e isso ocorre, principalmente, para evitar gastos com o descarte desses resíduos no meio ambiente, além de ser uma forma de agregar valor ao que seria perdido.

Por meio da conscientização ecológica e sabendo que os setores agroindustriais e de alimentos são responsáveis por gerar grandes quantidades de resíduos, muitos trabalhos e linhas de pesquisas estão sendo estudadas, principalmente por meio de processos fermentativos, tanto em estado sólido como submerso para produção de enzimas visando à aplicação comercial. Em relação à produção de peptidases, podem ser citados os trabalhos de Germano et al. (2003); Tubesha e Al-Delaimy (2003); Cavalcanti et al. (2005); Sandhya et al. (2005); Silveira et al. (2005); Krishna et al. (2009); Sathya et al. (2009); Merheb-Dini et al. (2010); Rocha (2010); Ding et al. (2012), os quais abordam alternativas a fim de desenvolver condições, que seriam capazes de empregar subprodutos e resíduos na produção de algo com aplicação tecnológica e, conseqüentemente, diminuir o descarte de resíduos no meio ambiente e otimizar a utilização de subprodutos, os quais possuem, em geral, baixo valor comercial.

De acordo com Rocha (2010), a bioconversão de resíduos agrícolas de indústrias alimentícias está cada vez mais em evidência, já que representam recursos viáveis para a síntese de produtos, como a produção de enzimas, por exemplo.

Entre os resíduos agroindustriais, um dos que mais são citados por apresentar bons resultados para produção de protease coagulante é o farelo de trigo (MERHEB-DINI et al., 2010). Isso acontece, provavelmente, devido à presença e à proporção dos

nutrientes que compõem o farelo de trigo. Entretanto, para muitas empresas, o farelo de trigo não é considerado um resíduo, é utilizado em 100 % para a produção de alimentos para animais e, mais recentemente, para alimentação humana, devido ao elevado teor de fibras.

10. Processo de purificação de protease

A purificação consiste em um processo de eliminação de constituintes indesejáveis do meio de cultivo, como a elevada proporção de água, moléculas orgânicas e inorgânicas constituintes do meio de cultura, outros metabólitos intracelulares originados de células mortas e fragmentos celulares. Normalmente, é preciso desenvolver uma metodologia específica devido às diferenças de cada produção enzimática (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005).

Durante o processo de purificação, várias etapas são realizadas visando eliminar os contaminantes e alcançar uma amostra pura. Entretanto, a porcentagem de recuperação da enzima, em geral, diminui durante cada etapa realizada. Portanto, um dos principais objetivos de cada etapa de purificação é reter o máximo da enzima desejada para que, ao final do processo, se consiga uma enzima pura e com um fator de purificação elevado (CAMPBELL; FARRELL, 2011).

Algumas etapas envolvidas no processo de purificação são: clarificação da amostra (filtração e/ou centrifugação, obtendo o extrato enzimático bruto), concentração da amostra (ultrafiltração ou precipitação por sais ou solventes orgânicos) e por cromatografia, onde ocorre a purificação de alta resolução (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005).

A etapa de concentração significa aumentar a quantidade de enzima num volume fixo devido à remoção da água e dos contaminantes constituintes do extrato. Além disso, enzimas não específicas também podem ser removidas durante esse processo (FARSHAD et al., 2013). A concentração de proteínas está diretamente relacionada com a quantidade total de água que elas são capazes de absorver (PEREDA et al., 2005).

Técnicas de purificação em coluna tem a vantagem de que as frações resultantes são passíveis de quantificação utilizando métodos analíticos gerais. Dentre as técnicas de purificação em coluna estão: a cromatografia de gel-filtração, que separa proteínas

baseada no tamanho, e a cromatografia de troca iônica, que separa proteínas por meio das diferenças entre as cargas (PANDEY et al., 2006).

Na cromatografia de troca iônica, a coluna pode ser empacotada com resina aniônica (carregada positivamente) ou catiônica (carregada negativamente) e deve ser equilibrada, inicialmente, com tampão de pH e força iônica apropriados (CAMPBELL; FARRELL, 2011). Normalmente, a amostra a ser separada contém íons orgânicos ou inorgânicos, carregados positiva ou negativamente, e que se ligam ou não à fase estacionária. À medida que a fase móvel passa pela coluna, os íons que se ligam aos grupos carregados da resina são separados daqueles que não possuem interação com ela. Para a eluição, deve ser feita uma alteração da fase móvel a fim de diminuir as interações eletrostáticas (ARAÚJO, 2004).

Portanto, o objetivo do processo de purificação consiste no isolamento da enzima específica, a partir de um extrato bruto contendo outros componentes (FEDATTO, 2004).

11. Queijo, Definição e Características

A Portaria nº 364 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1997) estabelece o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Mozzarella, o qual também pode ser denominado de queijo muzzarella ou queijo mussarela destinado ao consumo humano. No presente trabalho será denominado de queijo mussarela.

De acordo com o RIISPOA (BRASIL, 1997), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Segundo a Portaria nº 146 de 07 de março de 1996, os queijos devem apresentar na sua composição leite e/ou leite reconstituído (integral), semidesnatado, desnatado e/ou soro lácteo bem como um coagulante apropriado (de natureza física e/ou química e/ou bacteriana e/ou enzimática). Os cultivos de bactérias lácticas ou outros micro-organismos específicos, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, caseína, caseinatos, sólidos

de origem láctea, condimentos são considerados ingredientes opcionais (BRASIL, 1996).

De acordo com o RIISPOA (BRASIL, 1997), entende-se por Queijo Mussarela o queijo obtido pela filagem da massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação do leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas) complementada ou não pela ação de bactérias lácteas específicas.

O queijo mussarela pode ser classificado como um queijo de média, alta ou muito alta umidade e extragordo, gordo a semigordo segundo a classificação estabelecida no "Regulamento Técnico Geral para fixação de Identidade e Qualidade de Queijos" (BRASIL, 1997).

Segundo a Portaria nº 364 de 4 de setembro de 1997, o queijo mussarela deve apresentar na sua composição leite e /ou leite reconstituído padronizados ou não no seu conteúdo de matéria gorda, coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas e cloreto de sódio. Já a massa acidificada, cultivos de bactérias lácticas específicas, leite em pó, creme, cloreto de cálcio, caseinatos, ácidos cítrico, láctico, acético ou tartárico e especiarias, condimentos e/ou outras substâncias alimentícias são considerados ingredientes opcionais (BRASIL, 1997).

Para a fabricação de queijos, o leite deve ser de boa qualidade, apresentando-se livre de contaminação bacteriana, química ou física, já que alguns casos de contaminação podem influenciar ou inibir a coagulação bem como alterar o tempo de maturação dos queijos devido a alterações na microbiota láctica (PERRY, 2004).

Um grande número de processos tecnológicos pode desestabilizar, dispersar ou afetar as propriedades das micelas de caseína. Contudo, a maioria dos principais produtos lácteos é produzida pela desestabilização das micelas de caseínas, como queijos, leites fermentados, tratamentos térmicos, secagem ou produtos congelados (FOX; KELLY, 2004).

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades na indústria de laticínios. Para obtenção de queijo de boa qualidade, o método de coagulação, o coalho/coagulante, a cultura utilizada e os diferentes tratamentos dados à massa, é que determinam as características sensoriais do produto final (BONATO et al., 2006).

O queijo é um alimento de grande comercialização, apresentando vantagens do ponto de vista tecnológico: é um produto de fácil aceitação, apresenta elevado

rendimento na fabricação, o que implementa o seu escoamento e distribuição no mercado (FURTADO, 1990).

No ano de 2015, os tipos de queijos mais consumidos continuaram os mesmos, ou seja, mussarela, requeijão e prato. Esse é um modelo de hábito de consumo que permanece, porém com a introdução de novas variedades, como cremosos e queijos finos. O motivo pelo qual o queijo mussarela é o de maior consumo no Brasil é devido à sua variada aplicação como ingrediente em diversos pratos (PIVARO, 2015).

O queijo mussarela é produzido com leite pasteurizado, normalizado em teor de gordura. Sua massa é filada, isto é, após a dessoragem ela é finamente fatiada, aquecida e as fatias misturadas até formar um bloco liso e homogêneo com consistência firme e compacta. Tem cor esbranquiçada e sabor levemente ácido. Seu formato e peso são variáveis. A conservação deve ser feita sob refrigeração em temperaturas de até 10 °C (PERRY, 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33 n. 4, São Paulo, oct./dec. 2002.

ANDRADE, V. S. et al. Production of extracellular protease by *Mucor Circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 106-110, 2002.

ANDRÉN, A. Milk-clotting activity of various rennets and coagulants: background and information regarding IDF Standards. **Bulletin of the International Dairy Federation n° 332/IDF**. Brussels, Belgium, p. 9-14, 1998.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Blucher, 2001, v. 4.

ARAÚJO, J. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 2004, 478 p.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 506 p.

BONATO, É. P.; HELENO, G. J. B.; HOSHINO, N. A.; JÚNIOR, A. F.; **Leites fermentados e queijos**. Florianópolis, 2006.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da reforma agrária. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. SDA/DIPOA. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo mozzarella (muzzarella ou mussarela). Portaria nº 364 de 4 de setembro de 1997. Brasília, 1997. 6 p.

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº 2.244, de 4 de junho de 1997. Diário Oficial da União, Brasília, 1997.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. São Paulo: Cenage Learning, 2011, 845 p.

CÁNOVAS, M.; IBORRA, J. L. Culture collections and biochemistry. **Int Microbiol**, v. 6, p. 105-112, 2003.

CARVALHO, R. V.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L.. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28, 2008.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas Alimentarias**. Editora: Acribia, 1989.

CHITPINITYOL, S.; CRABBE, M. J. C. **Chymosin and aspartic proteinases**. 1997.

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

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39 n. 4, dez. 2008.

DING, Z.; AI, L.; OUYANG, A.; DING, M.; WANG, W.; WANG, B.; LIU, S.; GU, Z.; ZHANG, L.; SHI, G. A two-stage oxygen supply control strategy for enhancing milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Eur Food Res Technology**, p. 1043-1048, 2012.

FARSHAD, K.; SOHEILA, A.; FERREYDOON A., M. Semi-purification and kinetic study of microfungus rennet biosynthesized by local isolate of *Rhizomucor nannitzii* using solid-state fermentation system: Concentration methods and determinant factors in clotting activity. **European Journal of Experimental Biology**, v.3, p.167-174, 2013.

FEDATTO, L.M. Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citro e videira. ESALQ/CENA-USP, Piracicaba, 2004.

FERRAREZI, A. L., OHE, T. H. K.; BORGES, J. P.; BRITO, R. R.; SIQUEIRA, M. R.; VENDRAMINI, P. H.; QUILLES JR., J. C.; NUNES, C. C. C.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; BOSCOLO, M.; DA-SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indica-udatiae* N31 for transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 106–113, 2014.

FOOD INGREDIENTS BRASIL - Dossiê Enzimas: A evolução das enzimas coagulantes. Nº 16 - 2011. Disponível em <http://www.revista-fi.com/materias/164.pdf>. Acesso em: 25 jul 2012.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. **The caseins**. In: YADA, R. Y. *Proteins in Food Processing*. North America: ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004, p. 29-71.

FRANCO, R.; MACHADO, C.; MESSIAS, T. Determinação das proteínas totais do leite visando avaliar o valor nutricional do produto completo. **IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**, Belém, 2009.

FURTADO, M.M. A arte e a ciência do queijo. São Paulo. Editora Globo, 1990. p. 297.

GAJO, A. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, M. S.; PAIXÃO, M. G.; PINTO, S. M.; DAVID, F. M. **Estudo sensorial de queijo similar ao minas padrão com leite de ovelha utilizando agente coagulante e coalho**. Cândido Tostes, p. 61-65, 2012.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, fev. 2003.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, fev. 2003.

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

HO, H. L.; HOOD, J. S. Optimisation of Medium Formulation and Growth Conditions for Xylanase Production by *Aspergillus brasiliensis* in Submerged Fermentation (SmF). **Biodivers Biopros Dev**, v.1, 2014.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, Campinas, abr./jun. 2004.

KRISHNA K, V.; GUPTA, M.; GUPTA, N.; GAUDANI, H.; TRIVEDI, S.; PATIL, P.; GUPTA, G.; KHAIRNAR, Y.; BORASATE, A.; MISHRA, D. Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. **International Journal of Microbiology Research**, p. 14-18, ISSN: 0975-5276, 2009.

LIMA, C. J. B.; RIBEIRO, E. J.; ARAUJO, E. H. **Obtenção de Coalho Através da Fermentação do Fungo Filamentoso *Mucor miehei* NRRL 3420**. Uberlândia, 2003.

LIMA, U. A. **Matérias-primas dos alimentos**. São Paulo: Blucher, 2010. v. 1, 402 p.

MACHADO, S. C. **Fatores que afetam a estabilidade do leite bovino**. 2010. 201f. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MARTIN, N; SOUZA, S R ; SILVA, R ; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, Curitiba, set. 2004.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 386 p.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v.104, p.127-131, 2007.

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

MINUSSI, R. C.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O. Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, São Paulo, out./dez. 1998.

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K. Definition, characteristics and potential in solid substrate cultivation. **Elsevier**, New York, Applied Science, p. 455-67, 1992.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; DA SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1062-1071, 2012.

NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in food processing**. San Diego: Academic Press, 1993, 480 p.

NCUBE, T.; HOWARD, R. L.; ABOTSI, E. K.; RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 118-123, 2012.

O'DONNELL, K.; LUTZONI, F. M.; WARD, T. J.; BENNY, G. L. Evolutionary relationships among mucoralean fungi (*Zygomycota*): Evidence for family polyphyly on a large scale. **Mycologia**, v.93, p. 286-296, 2001.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. *Rhizobia* amylase production using various starchy substances as carbon substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, São Paulo, abr./jun. 2007.

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

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech, 2006, 742 p.

PEREDA, J. A. O.; RODRIGUES, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M.M L. G.; MINGUILLÓN, G. O. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. Tecnología de Alimentos. Porto Alegre: Artmed, 2005, v.1.

PEREIRA, J. C.; LEITE, R. S. R.; PRADO, H. F. A.; MARTINS, D. A. B.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production and Characterization of β -glucosidase Obtained by the Solid-State Cultivation of the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Appl Biochem Biotechnol**, v.175, p.723-732, 2015.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005, 440 p.

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

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de Lípases por fermentação em estado sólido e submersa utilizando *Penicillium Verrucosum* como microrganismo**. 2006. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim.

PIROTA, R. D. P. B. **Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal por fungos termofílicos usando suplemento comercial como substrato**. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

PIVARO, J. Balanço de 2015 e Perspectivas 2016: Tempos de equilíbrio trabalhoso. Indústria de laticínios, n.117, p.52, 2015.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAYMOND, M.N.; GAMIER, J.; BRICAS, E.; CILIANU, S.; BLASNIC, M.; CHAIX, A.; LEFRANCIER, P. Studies on the specificity of chymosin (rennin). I. Kinetic parameters of the hydrolysis of synthetic oligopeptide substrates. **Biochimie**, v.54, p.145-154, 1972.

REID, J. R.; COOLBEAR, T.; AYERSB, J. S.; COOLBEAR, K. P. The Action of Chymosin on κ -Casein and its Macropeptide: Effect of pH and Analysis of Products of Secondary Hydrolysis. **Int. Dairy Journal** 7, p. 559-569, 1997.

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

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 2010. 161f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade federal de Uberlândia.

SANDHYA, C; SUMANTHA, A; SZAKACS, G; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SATHYA, R.; PRADEEP, B. V.; ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M. Production of Milk Clotting Protease by a Local Isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using Agro-industrial Wastes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, p. 788-794, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Blucher, 2001, v.2, 541 p.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo: Varela, 1996, 517p.

SGARBIERI, V. C. **Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite**. Braz. J. Food Technol., v.8, p. 43-56, 2005.

SILVA, B. L. **Produção e caracterização da protease coagulante obtida por fermentação submersa a partir do fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N 31**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

SILVA, B. L.; GERALDES, F. M.; MURARI, C. S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and Characterization of a Milk-clotting Protease Produced in Submerged Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Appl Biochem Biotechnol**, v.172, p.1999-2011, 2014.

SILVEIRA, G. G.; OLIVEIRA, G. M.; RIBEIRO, E. J.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. **Food science and technology**, Curitiba, v. 48, 2005.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

TEODORO, C. E. S.; MARTINS, M. L. L. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, São Paulo, out./dez. 2000.

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

VARAVALLO, M. A.; QUEIROZ, M. V.; LANA, T. G.; BRITO, A. T. R.; GONÇALVES, D. B.; ARAÚJO, E. F. Isolation of recombinant strains with enhanced pectinase production by protoplast fusion between *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, 2007.

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

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista Hestia Citino**, v. 1, n.1, p. 30-36, 2011.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A OBTENÇÃO DA RENINA MICROBIANA PRODUZIDA PELO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 A PARTIR DE FARELO DE TRIGO

Bruna Lima da Silva; Amanda Reges de Sena; José Erick Galindo Gomes; Eleni Gomes; Roberto da Silva

Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil.

RESUMO

As peptidases fúngicas com atividades coagulantes (AC), também chamadas de reninas microbianas, vêm crescendo em importância para a indústria láctea na produção de queijos. A exploração comercial dessas enzimas depende, principalmente, de sua produção em quantidade/atividade em um biorreator. As condições do meio fermentativo para produção da renina microbiana interferem diretamente na resposta enzimática. Industrialmente, a produção de enzimas é realizada por fermentação submersa em biorreator, portanto, o estudo da produção em maior escala se torna necessário. O presente trabalho objetivou otimizar a produção da renina microbiana produzida pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 por fermentação submersa em Erlenmeyer e aplicar as condições ótimas de produção em biorreator de bancada com agitação mecânica. Inicialmente, foi feita uma seleção dos principais fatores por meio do Plackett-Burman, e em seguida, aplicou-se o planejamento de otimização de Doehlert. Este modelo de design experimental aplicado para a otimização da AC resultou no aumento de 11,7 vezes (10,5 para 122,0 U/mL). A melhor condição de produção da enzima em Erlenmeyer foi entre 4,1-4,7 % de farelo de trigo, 40,5 a 41,8 °C, 0,4 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 % NH_4NO_3 , 150 rpm, 96 horas de incubação e pH 5,5. O melhor período para produção da enzima em biorreator com agitação mecânica ocorreu entre 72 e 96 horas e pH 6,5, resultando numa razão AC/AP de 581 e 647, respectivamente, e redução de cerca de um dia de fermentação. Os resultados demonstraram que a produção da enzima coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 pôde ser otimizada e obtida em maior escala em biorreator de bancada com agitação mecânica.

Palavras-chave: peptidase coagulante, biorreator, Doehlert.

ABSTRACT

Fungal peptides with milk-clotting activities (MCA), also called microbial renin, have been growing in importance for the dairy industry in the production of cheeses. The commercial exploitation of these enzymes depends mainly on their production in quantity / activity in a bioreactor. The conditions of the fermentative medium for the production of the microbial renin interfere directly in the enzymatic response. Industrially the production of enzymes is carried out by submerged fermentation in bioreactor, therefore the study of the production in scale becomes necessary. The present work aimed to optimize the production of the microbial renin produced by *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in submerged fermentation in Erlenmeyer and to apply the optimum conditions of production in a mechanical agitated bench bioreactor. Initially, was done a selection of the main factors through the Plackett-Burman, then applied the optimization planning of Doehlert. This experimental design model applied for the optimization of MCA resulted in an increase of 11.7 times (10.5 to 122.0 U / mL). The best enzyme production condition in Erlenmeyer was between 4.1-4.7% wheat bran, 40.5 to 41.8 °C, 0.4% (NH₄)₂SO₄, 0.4% MgSO₄·7H₂O and 0.1% NH₄NO₃, 150 rpm, 96 hours of incubation and pH 5.5. The best period for enzymatic production in mechanically agitated bioreactor occurred between 72 and 96 hours and pH 6.48, resulting in an MCA / PA ratio of 581 and 647, respectively, and reduction of about one day of fermentation. The results showed that the production of the milk-clotting enzyme by *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 could be optimized and obtained in a larger scale in a mechanical agitated bench bioreactor.

Keywords: milk-clotting peptidase, bioreactor, Doehlert.

1. INTRODUÇÃO

Vários grupos de micro-organismos são capazes de produzir peptidases, contudo poucos são capazes de produzir aquelas com ação coagulante do leite. A pesquisa por novas linhagens de micro-organismos produtores de enzimas coagulantes, visando à substituição do coalho animal, se justifica pelas características de especificidade que elas possuem, pelo aspecto econômico que representam e, até mesmo, por atender às demandas religiosas de certos grupos étnicos.

As peptidases microbianas fazem parte da classe de enzimas responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas de proteínas e peptídeos (RAO et al., 1998) e podem ser classificadas como as enzimas mais importantes em indústrias de detergentes, tintas, couro e, também, em aplicações medicinais (KRISHNA et al., 2009). Uma das características mais importantes de uma peptidase para emprego como coagulante é o modo de ação em relação aos diferentes substratos (RAWLINGS et al., 2008). Ela deve apresentar alta especificidade ou atividade coagulante (AC) e baixa atividade proteolítica (AP).

Os principais fatores que afetam no crescimento microbiano são: temperatura de incubação, pH do meio, teor de oxigênio e velocidade de agitação (BORZANI et al., 2001).

A produção de enzimas coagulantes por fungos vem aumentando, principalmente, pela produção da enzima extracelular, facilitando o processo de extração e recuperação do meio de fermentativo (GERMANO et al., 2003). Uma importante aplicação de peptidases coagulantes microbianas é na indústria de laticínios, para a produção de queijos.

A obtenção de enzimas microbianas a partir de subprodutos e resíduos agroindustriais tem sido o foco de muitos estudos durante os últimos anos, visando encontrar formas alternativas para diminuir os custos de produção. Muitos subprodutos agroindustriais, como o farelo de trigo, por exemplo, podem ser aplicados como substratos viáveis em fermentações objetivando a produção de diferentes enzimas, além disso, representam uma fonte alternativa para a diminuição do custo de produção.

A partir do estudo individual de cada enzima é possível estabelecer um protocolo de produção visando à viabilização para exploração. Experimentos em que se varia um fator “por vez” (*variable-at-a-time*) sobre a variável resposta, são demorados e não avaliam as interações entre fatores. A utilização de um delineamento estatístico para

a seleção de melhores condições de produção permite a identificação rápida de fatores relevantes, que afetam a produção, bem como a interação entre eles. A escolha adequada dos intervalos das variáveis é fundamental para alcançar a otimização do processo produtivo (OSKOUIE et al., 2008).

Existem vários fatores que afetam a produção enzimática, por isso, faz-se necessário um planejamento experimental para verificar as condições ótimas, pois estas condições podem variar entre diferentes micro-organismos, bem como entre as diferentes enzimas (BRAVO et al., 2000). Dentre os diversos modelos de desenhos experimentais, podem ser citados aqueles de seleção das variáveis, como o Plackett-Burman e Fatorial; e os de otimização das respostas como Doehlert, Composto Central e Box-Behnken (LI et al., 2007). O modelo de Plackett-Burman mostra-se muito útil na seleção dos fatores importantes e que são significativos na produção de um determinado produto; além disso, necessita de poucos pontos experimentais para a sua aplicação. No entanto, não avalia a interação entre as variáveis, como no Fatorial. O modelo de Doehlert é utilizado como complemento na otimização da produção enzimática e possui uma vantagem sobre os demais, pois permite avaliar as variáveis em diferentes níveis. Ademais, avalia a interação entre as variáveis independentes, com uma uniformidade no espaço, necessita de poucos pontos experimentais para a sua aplicação, pode ser deslocado para fora do domínio experimental inicial, possui alta eficiência, prediz e calcula os valores ótimos de cada fator e resposta (KIRAN et al., 2010; BENSALAH et al., 2010).

O modelo de superfície de resposta é um processo rápido para a otimização de um grande número de variáveis e fornece uma visão do efeito interativo dos vários parâmetros envolvidos na produção.

O presente estudo se propôs a otimizar o processo de fermentação submersa da enzima do *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 por meio de delineamentos estatísticos, aumentar o volume de produção em biorreator e verificar a robustez da enzima mediante a variação da temperatura de armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e cultura estoque

Foi utilizado o fungo filamentoso *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, obtido do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP. O crescimento e a manutenção da cultura estoque foram realizados em frascos Erlenmeyer adicionados de meio Potato Dextrose Agar (PDA). A temperatura de incubação foi de 45 °C durante 48 horas. Após o crescimento, a cultura foi utilizada para iniciar a fermentação (pré-inóculo).

2.2. Pré-inóculo

Da cultura estoque foi preparado o pré-inóculo, o qual funcionou como crescimento provisório do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e, posteriormente, como suspensão de micélios, a qual foi transferida para os meios fermentativos. O pré-inóculo foi constituído de 50 mL de meio de cultura PDA colocados em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Inoculados com uma alçada do frasco de cultura estoque. Após a inoculação, foi realizada a incubação, a 45 °C durante 48 horas. Após o crescimento total, foi adicionada solução salina constituída de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1 %), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 %) e NH_4NO_3 (0,1 %). Em seguida, a superfície do meio foi raspada com auxílio de uma alça de níquel-cromo ou um palito estéril, a fim de se obter uma suspensão de esporos, a qual foi utilizada para inocular os meios fermentativos. A inoculação foi feita com 10^5 esporos/mL, os quais foram contados em microscópio óptico comum com auxílio da câmara de Neubauer.

2.3. Produção da peptidase em frasco Erlenmeyer

O tipo de processo fermentativo escolhido para a otimização foi a fermentação submersa. O farelo de trigo foi selecionado como substrato, já que, em trabalho anterior de Silva et al. (2014), foi o substrato que melhor apresentou produção da peptidase coagulante em processo submerso. A fermentação foi feita em 96 horas de incubação em frasco Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de solução salina. A composição dos meios variou de acordo com a seleção de variáveis significativas na atividade

coagulante. Os extratos enzimáticos obtidos foram avaliados para as atividades enzimáticas e, posteriormente, congelados para análises.

2.4. Produção da peptidase em biorreator com agitação mecânica

Foi empregado o biorreator de bancada BIO-TEC 1,5V (Tecnal, Piracicaba), equipado com sistema de agitação mecânica, controle de vazão gasosa, pH e temperatura. A fermentação foi conduzida durante 144 horas, com extrações a cada 24 horas, volume inicial de 800 mL e 1,5 vvm. A produção ocorreu sob as condições de operação e meio obtidos após o ensaio de otimização. As extrações foram feitas em papel de filtro a cada 24 horas.

2.5. Atividade enzimática

2.5.1. Atividade coagulante (AC)

1 mL de solução 10 % (p/v) de leite desnatado (Itambé) acrescido com CaCl_2 0,01 mol/L, foi pré-incubado em banho-maria a 35 °C durante 10 minutos. Em seguida adicionou-se 0,1 mL de solução enzimática e iniciou-se a contagem do tempo. Os tubos de ensaio contendo a mistura reacional foram dispostos sobre suportes rotativos. A formação do coágulo foi observada na parede do tubo de ensaio que rodava continuamente durante o teste em banho-maria termostático para teste de coalho/coagulante MA 470-Marconi, SA.

O tempo em que as primeiras partículas foram formadas foi medido. Uma unidade de coagulação do leite (UAC) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a coagulação de 1 mL de substrato em 40 minutos a 35 °C e foi calculada de acordo com Shata (2005): $\text{UAC} = 2400/t \times S/P$, onde t é o tempo necessário para a formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume da enzima.

2.5.2. Atividade proteolítica (AP)

A AP 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) diluída em tampão acetato 0,2 mol/L pH 5,5; 0,4 mL de tampão acetato 0,2 mol/L pH 5,5 e 0,2 mL

de extrato enzimático. A reação ocorreu em banho-maria a 35 °C e ao término de 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Nos controles a solução de TCA 10 % foi adicionada à mistura de reação antes da adição da enzima. As amostras e seus controles foram centrifugados a 11159 xg durante 9 minutos. A leitura da absorbância nos sobrenadantes foi realizada a 280 nm. A atividade proteolítica foi calculada pela equação: $UAP/mL = (\Delta Abs_{280nm} \times 10 \times \text{fator de diluição}) / (E \times t)$, 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.

2.5.3. Razão (AC/AP)

Determinou-se a razão de coagulação dividindo-se a atividade coagulante pela atividade proteolítica, com a fórmula: $R = AC (U/mL) / AP (U/mL)$, onde R é o valor da razão, AC atividade coagulante e AP atividade proteolítica.

2.6. Avaliação de diferentes fatores para a otimização da produção da peptidase coagulante produzida pelo *T. indicae-seudaticae* N31

2.6.1. Seleção de variáveis significativas na atividade coagulante

Previamente ao ensaio de otimização, experimentos do tipo “um fator a cada tempo” (“*variable-at-a-time*”) foram realizados para selecionar os fatores efetivos e seus níveis importantes para a variável resposta. Assim, as seguintes variáveis independentes foram selecionadas: temperatura, pH, farelo de trigo, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e NH_4NO_3 . Foi proposto o planejamento saturado de Plackett-Burman (PLACKETT E BURMAN, 1946) composto por 12 ensaios (PB12) para selecionar as variáveis no que diz respeito aos seus efeitos principais e não os efeitos de interação. Os valores reais são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Matriz experimental utilizada para o planejamento estatístico de Plackett-Burman.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	FT (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	NH ₄ NO ₃ (%)
1	50	4,5	3	0,1	0,1	0,1
2	50	5,5	1	0,4	0,1	0,1
3	45	5,5	3	0,1	0,4	0,1
4	50	4,5	3	0,4	0,1	0,4
5	50	5,5	1	0,4	0,4	0,1
6	50	5,5	3	0,1	0,4	0,4
7	45	5,5	3	0,4	0,1	0,4
8	45	4,5	3	0,4	0,4	0,1
9	45	4,5	1	0,4	0,4	0,4
10	50	4,5	1	0,1	0,4	0,4
11	45	5,5	1	0,1	0,1	0,4
12	45	4,5	1	0,1	0,1	0,1

Legenda: 96 h de incubação; 10⁵ esporos/mL; FT: farelo de trigo.

2.6.2. Otimização da atividade coagulante utilizando Doehert design

Para prever a atividade coagulante nas condições das variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$), a Metodologia de Superfície de Resposta foi utilizada. Uma matriz de Doehlert (DOEHLERT, 1970) foi empregada para encontrar as melhores condições para a variável resposta. O planejamento continha 2 variáveis (temperatura e farelo de trigo) e 3 pontos centrais totalizando em 9 ensaios. A temperatura foi estudada em 3 níveis e a concentração de farelo de trigo em 5 níveis os quais são dados em seus valores reais na tabela 2.

Tabela 2. Matriz de Doehlert para a otimização da atividade coagulante.

Ensaio	Temperatura (°C)	FT (%)
1	43	3,6
2	43	4,4
3	41	3,2
4	41	4,0
5	41	4,0
6	41	4,0
7	41	4,8
8	39	3,6
9	39	4,4

Legenda: Solução salina: 0,4 % de (NH₄)₂SO₄, 0,4 % MgSO₄.7H₂O e 0,1 % de NH₄NO₃; pH 5,5; 96 h de incubação; 10⁵ esporos/mL; FT: farelo de trigo.

O comportamento do sistema foi explicado pela seguinte equação quadrática (Eq. (1)):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_{i2} + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde Y é a resposta predita, β_0 é o intercepto, β_i é o coeficiente linear, β_{ii} é o termo quadrático, β_{ij} é o termo de interação, X_i e X_j são as variáveis independentes.

2.6.3. Análises estatísticas

Após a obtenção dos resultados, os mesmos foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) utilizando-se o programa Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA), para indicar as variáveis com efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e o ajuste do modelo aos dados experimentais. Todos os ensaios foram realizados aleatoriamente em triplicata.

2.7. Efeito do congelamento na atividade coagulante da enzima

Após fermentação foi feita a extração enzimática em papel de filtro. Uma alíquota do extrato bruto obtido em 96 horas foi reservada a 7 °C sem a ação do congelamento, em seguida, sucessivos congelamentos a -20 °C e descongelamentos a 25 °C foram realizados. Ao fim de oito processos de congelamentos e descongelamentos foi feita a análise de atividade coagulante, visando avaliar sua capacidade de manipulação, resistência e robustez diante da variação da temperatura.

3. RESULTADOS

3.1. Seleção de variáveis significativas na atividade coagulante

No estudo de SILVA et al., 2014 foi observado que a produção da peptidase coagulante pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 era afetada pelo meio de produção, além de parâmetros físicos como pH e temperatura. Desta forma, uma abordagem estatística usando Plackett-Burman e otimização utilizando design de Doehlert foi empregada.

As médias dos resultados obtidos no planejamento estatístico de Plackett-Burman são apresentadas na tabela 3. Verificou-se uma variação de 10,46 a 81,79 U/mL na AC utilizando o planejamento de Plackett-Burman.

Saxena e Singh (2010) também utilizaram o planejamento estatístico de Plackett-Burman como modelo de desenho experimental de seleção de variáveis significativas na produção da protease do *Bacillus* sp e observaram uma variação de 35,2 a 240,8 U/mL nas respostas das atividades.

Tabela 3. Resultados para a atividade coagulante a partir do planejamento estatístico de Plackett-Burman.

Ensaio	AC experimental (U/mL)	AC predita (U/mL)
1	22,46 ± 0,57	26,02
2	13,61 ± 1,92	9,96
3	81,79 ± 1,38	68,10
4	35,02 ± 0,47	25,73
5	14,09 ± 4,53	17,73
6	22,59 ± 2,20	34,71
7	55,07 ± 1,61	60,04
8	64,57 ± 2,45	66,88
9	35,14 ± 0,21	37,14
10	10,46 ± 0,11	4,05
11	34,00 ± 0,75	30,59
12	21,87 ± 1,67	29,67

Legenda: 96 h de incubação; 10^5 esporos/mL; AC: atividade coagulante.

A significância da equação do modelo (Eq. (2)), avaliada pela Análise de variância (ANOVA) (Tabela 4), revelou que a regressão foi significativa e a temperatura e farelo de trigo foram as variáveis que afetaram de forma significativa a atividade coagulante (Figura 1). Verificou-se que, a temperatura teve efeito negativo e o farelo de trigo efeito positivo na atividade coagulante e devem, então, devem ser deslocados para valores inferiores e superiores na etapa de otimização, respectivamente.

$$\text{Atividade coagulante (U/mL)} = 252,10 - 5,81 \cdot T + 5,27 \cdot \text{pH} + 50,77 \cdot \text{FT} + 54,07 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 103,56 \cdot \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 58,02 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 \quad \text{Eq. (2)}$$

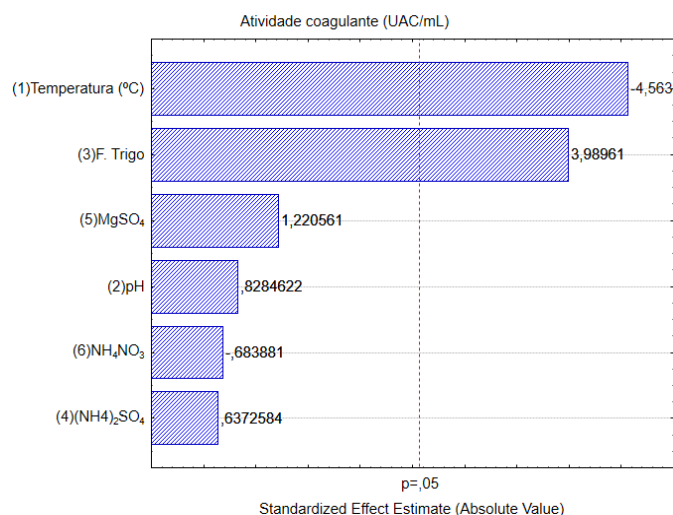
Tabela 4. Análise de variância para o planejamento estatístico de Plackett-Burman.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	F _{cal}	F _{tab}	p-Value
Regressão	4833,31	6	805,55	6,63	4,95	0,028*
Resíduo	607,35	5	121,47			
Total	5440,66					

*: Estatisticamente significativo. $R^2 = 0,89$. Nível de confiança: 95 %.

Ademais, o ajuste do modelo foi medido pelo coeficiente de determinação (R^2), o qual teve um valor de 0,89 indicando que 89 % da variação total na atividade coagulante residual foi explicada pelo modelo ajustado.

Figura 1. Efeitos das variáveis na atividade coagulante de acordo com o planejamento estatístico de Plackett-Burman.



3.2. Otimização da atividade coagulante utilizando Doehlert design

Os resultados (experimentais e preditos) são apresentados na tabela 5 e figura 2.

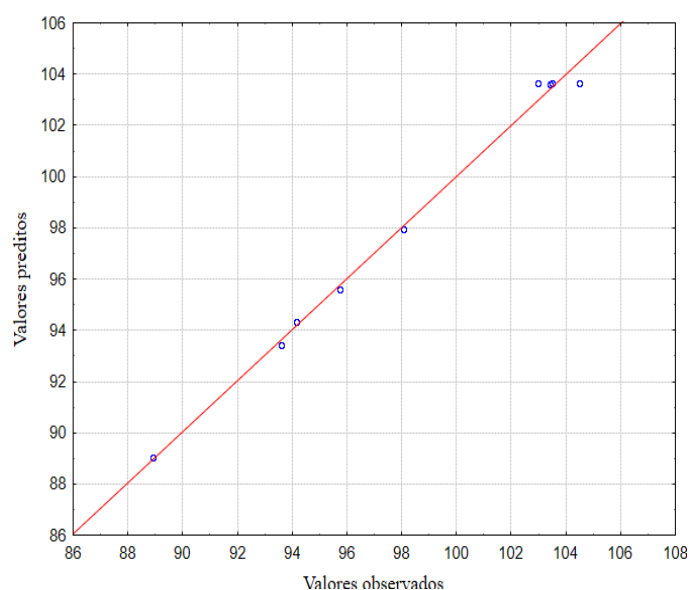
Para o experimento, a quantidade de farelo de trigo e a temperatura de incubação foram variadas. Porém, as demais variáveis estudadas foram mantidas constantes (0,4 % (NH₄)₂SO₄, 0,4 % MgSO₄.7H₂O e 0,1 % NH₄NO₃, 150 rpm, 96 horas de incubação e pH 5,5).

Tabela 5. Resultados obtidos para a atividade coagulante utilizando Doehlert design.

Ensaio	Temperatura (°C)	FT (%)	AC experimental (U/mL)	AC predita (U/mL)
1	43	3,6	88,90 ± 1,40	89,05
2	43	4,4	98,09 ± 10,15	97,94
3	41	3,2	93,59 ± 1,80	93,44
4	41	4,0	104,48 ± 5,14	103,65
5	41	4,0	103,48 ± 2,52	103,65
6	41	4,0	102,99 ± 9,33	103,95
7	41	4,8	103,43 ± 17,70	103,58
8	39	3,6	94,17 ± 8,85	94,32
9	39	4,4	95,74 ± 4,85	85,59

Legenda: Solução salina: 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 % de NH_4NO_3 ; pH 5,5; 96 h de incubação; 10^5 esporos/mL; FT: farelo de trigo; AC: atividade coagulante.

Figura 2. Valores experimentais e preditos para a atividade coagulante de acordo com o planejamento experimental.



A figura 2 é uma representação gráfica da tabela 5 e apenas ilustra a alta similaridade observada entre os valores preditos e os resultados experimentais, refletindo a precisão e a aplicabilidade da matriz de Doehlert para o processo de otimização.

Cavalitto e Mignone (2007) utilizaram a matriz de Doehlert para o processo de otimização da produção de protopectinase pelo *Geotrichum klebahnii* e também obtiveram bons resultados com a otimização.

Chaari et al. (2012) otimizaram a produção de liquenase pelo *Bacillus licheniformis* UEB CF utilizando Doehlert design e observaram um ajuste satisfatório do modelo quadrático com os dados experimentais.

A equação obtida após regressão para a otimização mostrou a atividade coagulante como função destas variáveis. Aplicando-se a análise de regressão múltipla aos dados experimentais, a seguinte equação (Eq. (3)), foi encontrada para explicar a resposta:

$$\text{Atividade coagulante (U/mL)} = -3065,56 + 156,98 \cdot T - 2,04 \cdot T^2 - 108,16 \cdot FT - 128,50 \cdot FT^2 + 9,52 \cdot T \cdot FT \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde T representa a temperatura e FT farelo de trigo.

Os dados obtidos experimentalmente para a atividade coagulante foram analisados pela Análise de Variância (Tabela 6) e Teste F (Teste de Fisher).

Tabela 6. Análise de Variância para os dados obtidos na Tabela 5.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Fcal	F tab (IC 95 %)	R ²
Regressão*	246,24	5	49,25	114,53	9,01	
Resíduo	1,29	3	0,43			
Falta de ajuste	0,14	1	0,14	0,24	18,50	0,99
Puro erro	1,15	2	0,58			
Total	247,53					

Legenda: *: Estatisticamente significativo; Fcal: F calculado; Ftab: F tabelado. Nível de confiança: 95 %.

O teste de Fisher indicou que a equação ajustada foi estatisticamente significativa ($F_{cal} > F_{tab}$) e a falta de ajuste indicou uma boa concordância ($F_{cal} < F_{tab}$) entre o modelo ajustado e os dados experimentais para cada variável. A qualidade do ajuste também foi confirmada pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99$) o qual implica que somente 1 % da variabilidade da resposta não foi explicada pelo modelo. O modelo citado pode ser utilizado para prever a atividade coagulante dentro do campo experimental estudado.

A estimativa dos efeitos para cada variável e suas interações foram determinadas e são apresentadas na tabela 7. Verificou-se que todos os termos quadráticos, o farelo de trigo em seu termo linear e o de interação foram estatisticamente significativos ao nível

de confiança adotado. O termo linear do farelo de trigo e o de interação tiveram efeitos positivos na resposta analisada. Os demais termos tiveram seus efeitos negativos. Ademais, os termos quadráticos afetaram a curvatura da superfície de resposta.

Tabela 7. Estimativa dos efeitos na atividade coagulante baseado no planejamento de Doehlert design.

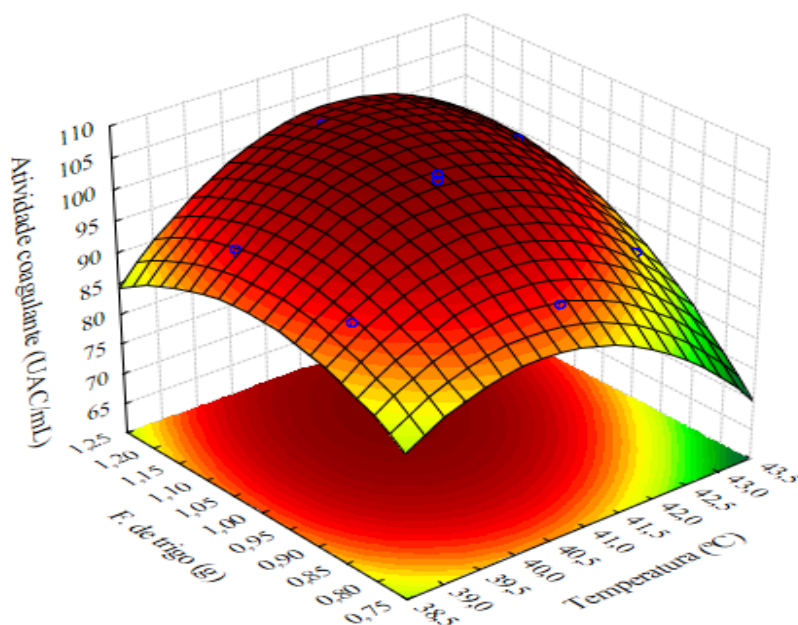
Variável	Efeito	t(2)	p-value
(1) Temperatura (L)	-1,46	-1,92	0,19
Temperatura (Q)	-16,28	-15,66	0,0041*
(2) Farelo de trigo (L)	5,07	11,57	0,0074*
Farelo de trigo (Q)	-2,57	-7,41	0,018*
1L by 2L	3,81	5,02	0,038*

Legenda: *: Termos do modelo estatisticamente significativos (Nível de confiança: 95%).

Uma possível hipótese para um efeito negativo da temperatura é a provável desnaturação da enzima quando exposta a uma alta temperatura por um tempo prolongado (SILVA et al., 2014).

A figura 3 mostra a superfície de resposta tridimensional para a atividade coagulante, onde a mesma foi caracterizada como ótima.

Figura 3. Superfície de resposta e curvas de contorno para a atividade coagulante de acordo com o planejamento experimental.



A partir da equação 3, os valores otimizados foram calculados pela derivada parcial da equação supracitada em relação ao farelo de trigo e a temperatura. A

atividade coagulante ótima predita (104,95 U/mL) poderá ser obtida ao utilizar entre 4,1 a 4,7 % de farelo de trigo e 40,5 a 41,75 °C durante a fermentação submersa pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

Saran et al. (2007) otimizaram a produção da protease do *Bacillus* sp. utilizando o método de superfície de resposta e o Composto Central resultando em um aumento de 1,50 vezes na produção de protease.

3.3. Validação do modelo

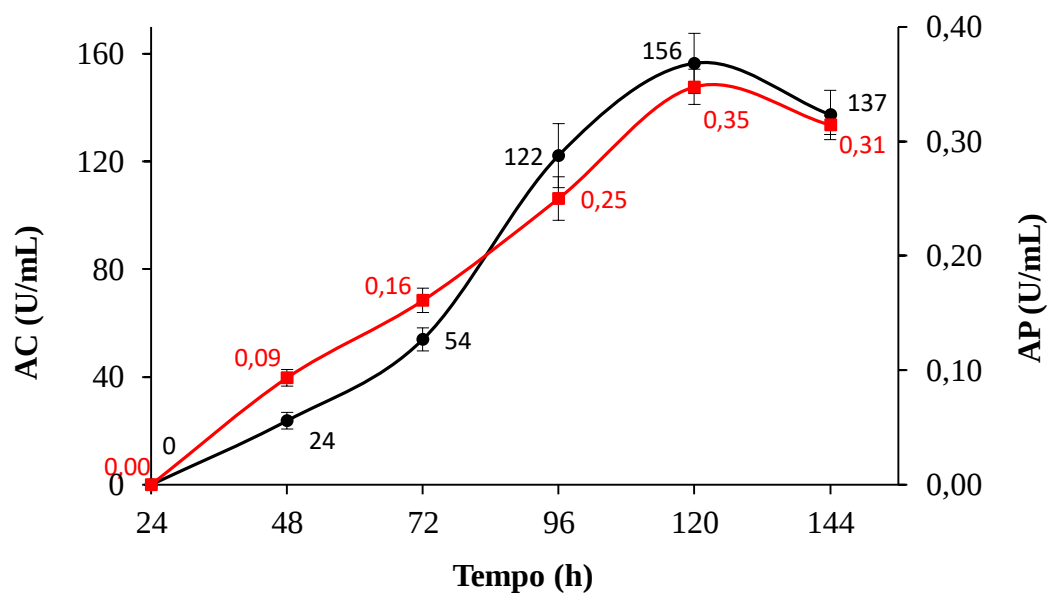
A validação do modelo foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 125 mL agitados sob condições preditas pelo modelo (4,4 % de FT e 41 °C). O valor experimental obtido para atividade coagulante, em 96 horas, foi 122,0 U/mL, valor um pouco acima do valor predito (104,95 U/mL) e, portanto, o modelo foi validado com sucesso.

Saxena e Singh (2010) estudaram a otimização da produção da protease do *Bacillus* sp e também validaram o modelo com sucesso. O valor experimental (577 U/mL) da resposta da atividade obtido foi maior que o valor predito (449 U/mL).

A figura 4 mostra a AC e AP da produção da renina microbiana do *T. indicae-seudaticae* N31 em condições de fermentação preditas pelo modelo. O processo foi realizado durante 144 horas de incubação, com extrações a cada 24 horas para verificar o perfil de produção enzimática. A partir do experimento, observou-se que as maiores AC (156 U/mL) e AP (0,35 U/mL) foram obtidas em 120 horas de incubação.

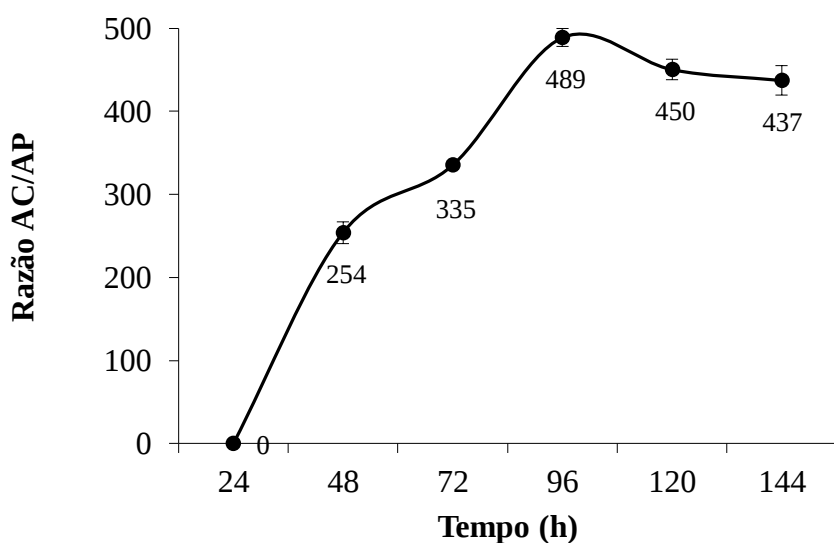
Entretanto, também foi realizado o cálculo da razão entre AC/AP para verificar a adequabilidade do extrato enzimático como um possível substituto do coalho convencional. A figura 5 mostra que a maior razão foi obtida em 96 horas ($R = 489$).

Figura 4. Avaliação da atividade coagulante e proteolítica da renina microbiana obtida em FSm em Erlenmeyer a partir do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em função do período de incubação.



Legenda: Atividade coagulante (●) e proteolítica (■); Erlenmeyer 125 mL; 25 mL solução salina 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % de NH_4NO_3 ; pH 5,5; 4,4 % FT; 150 rpm; 41 °C; 10^5 esporos/mL.

Figura 5. Razão AC/AP da renina microbiana obtida em FSm em Erlenmeyer a partir do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em função do período de incubação.



Legenda: Razão AC/AP (●). Erlenmeyer 125 mL; 25 mL solução salina 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % de NH_4NO_3 ; pH 5,5; 4 % FT; 150 rpm; 41 °C; 10^5 esporos/mL.

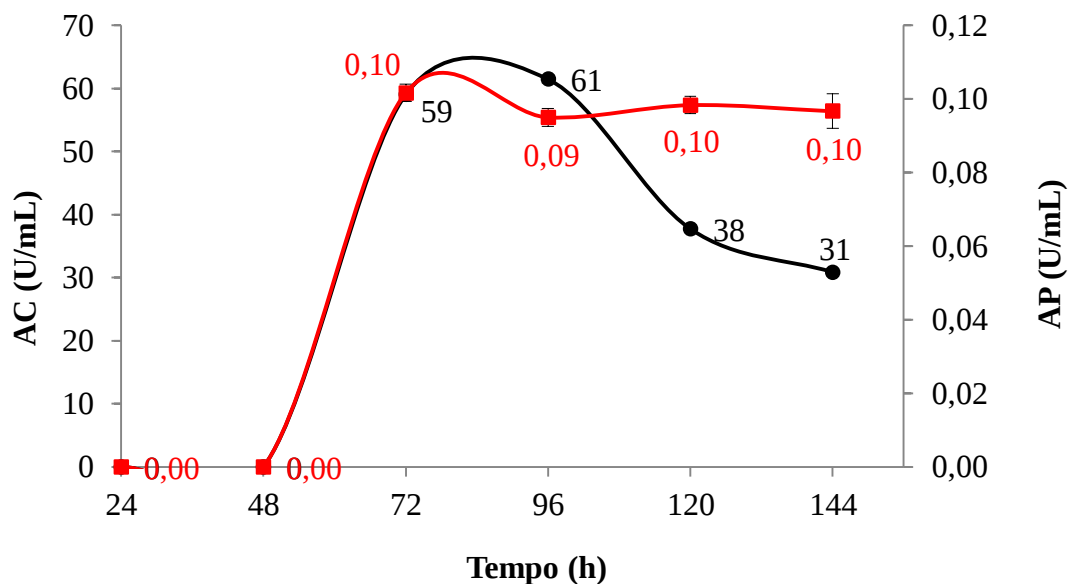
Portanto, o período de 96 horas de incubação foi considerado o mais adequado para a produção da enzima coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31, já que foi o período em que foi encontrado o maior valor da razão AC/AP.

3.4. Produção em biorreator com agitação mecânica

A produção em biorreator foi realizada a fim de determinar a precisão do modelo estatístico, bem como a possibilidade de ampliação de escala. O equipamento utilizado foi o biorreator com agitação mecânica de capacidade máxima de 1,2 litros, com monitoramento do pH e controle dos parâmetros: aeração, temperatura, formação de espuma e velocidade de rotação.

A figura 6 mostra a produção enzimática do *T. indicae-seudaticae* N31 em biorreator em função das atividades coagulante e proteolítica durante 144 horas de incubação, onde se pode observar que as melhores respostas para a atividade coagulante foram obtidas nos períodos de 72 (59,0 U/mL) e 96 (61,0 U/mL) horas de fermentação, porém a atividade proteolítica foi superior no período de 72 horas. Portanto, observou-se uma maior Razão AC/AP em 96 horas de incubação (Figura 7). Sendo assim, o período de 96 horas é indicado para interromper a fermentação, porque, a partir daí, a AC decresce em relação à AP, o que não é interessante para a qualidade do queijo, porque pode desenvolver gosto amargo (SILVA et al., 2014; ROBINSON; WILBEY, 1998; GAJO et al., 2012).

Figura 6. Avaliação da atividade coagulante e proteolítica da produção da renina microbiana produzida pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em biorreator com agitação mecânica.

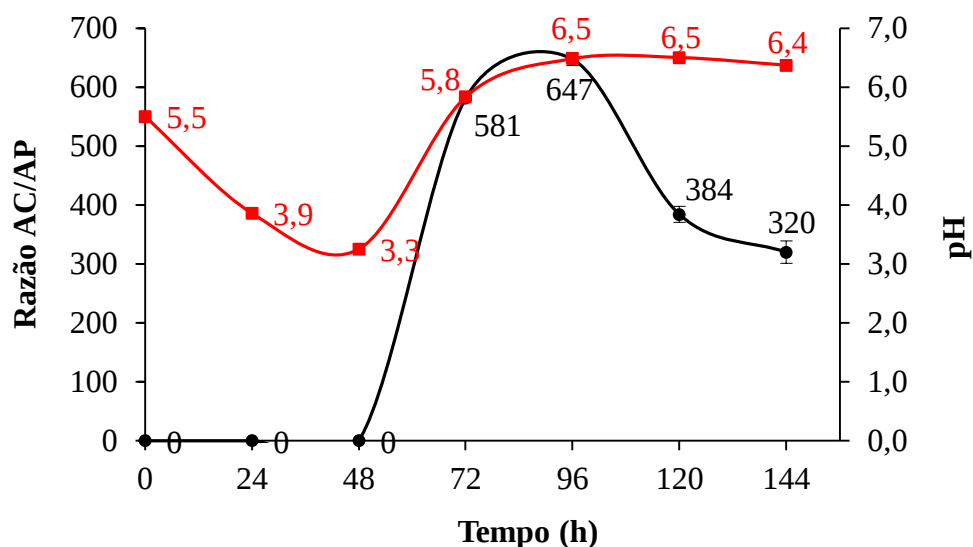


Legenda: Atividade coagulante (●) e proteolítica (■); solução salina 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % de NH_4NO_3 ; pH 5,5; 4,4 % FT; 41 °C; 10^5 esporos/mL.

A partir dos valores de AC e AP foi feito o cálculo da razão (Figura 7), onde foi observado que o período de fermentação mais adequado para a produção da renina microbiana do *T. indicae-seudaticae* N31 em biorreator também foi com 96 horas ($R=647$) de incubação.

O experimento resultou numa produção de 61,0 U/ml de AC em 96 h de produção (Figura 6), porém com uma razão AC/AP de 647 (Figura 7), que foi muito maior quando comparado com a razão AC/AP obtida em frasco Erlenmeyer 489 (Figura 5).

Figura 7. Razão AC/AP da produção da renina microbiana produzida pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em biorreator com agitação mecânica e perfil do pH do meio.



Legenda: Razão AC/AP (●) e pH (■); solução salina 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % de NH_4NO_3 ; 4,4 % FT; 150 rpm; 41 °C; 10^5 esporos/mL.

Durante a fermentação em biorreator foi feito um monitoramento do pH do meio. A figura 7 mostra que o pH no início da fermentação caiu para 3,3 a partir de um valor inicial de 5,5 e atingiu valor máximo de 6,5 em 96 h, ou seja, o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, primeiro acidificou o meio fermentativo para depois começar a produção da enzima de interesse. Este comportamento foi verificado em todas as produções realizadas no biorreator.

No período de 72 a 96 horas de incubação, o experimento com biorreator apresentou maior razão 581 e 647, respectivamente, quando comparado com a produção em frasco Erlenmeyer 335 e 489, respectivamente. Este resultado é importante, pois embora a atividade enzimática unitária tenha diminuído, a Razão AC/AP, aumentou, e com uma redução de 24 horas do tempo de fermentação, o que representa muito em termos de economia de produção.

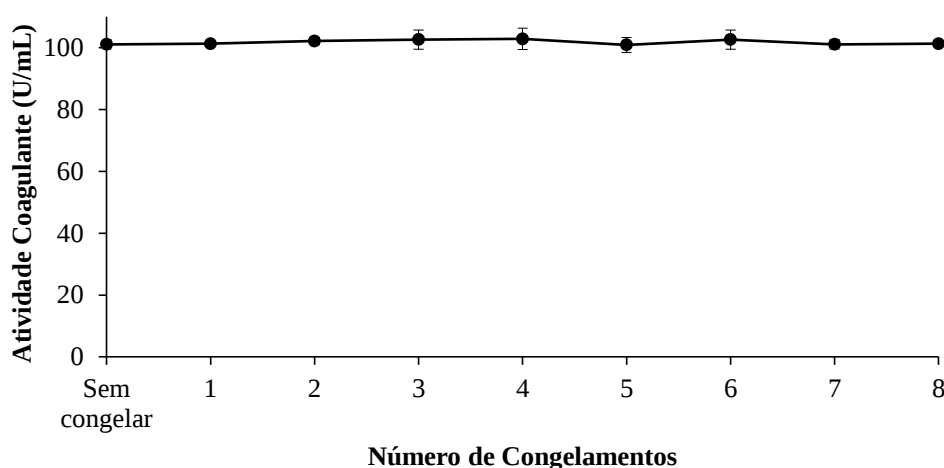
Os estudos de planejamento experimentais focados na otimização dos parâmetros de fermentação puderam ser aplicados na ampliação da produção de enzimas em biorreator com agitação mecânica, ou seja, foi possível aumentar a escala de produção, o que representa uma grande importância para a produção industrial desta enzima.

Saran et al. (2007) otimizaram a produção da protease do *Bacillus* sp. e aplicaram as condições ótimas determinadas pela superfície de resposta em biorreator de 30 litros para verificar a possibilidade de ampliação de escala. A partir dos resultados foi observado que o modelo, mesmo em larga escala, foi eficiente, já que houve a produção enzimática de forma satisfatória e com um menor período fermentativo, validando o modelo.

3.5. Influência do congelamento na atividade coagulante da peptidase

Conforme apresentado na figura 8, o teste de congelamentos e descongelamentos sucessivos da enzima bruta demonstrou não ter influência negativa na atividade específica da peptidase coagulante. Essa avaliação complementou os dados obtidos no trabalho de Silva et al., (2014), indicando que a enzima além de conseguir resistir ao armazenamento, durante pelo menos 10 semanas, em uma faixa de temperatura de -20 °C a 25 °C, também foi resistente quando submetida a repetidas mudanças na temperatura, por meio do congelamento e descongelamento, sem sofrer perdas significativas na atividade coagulante.

Figura 8. Avaliação da influência de sucessivos congelamentos e descongelamentos na atividade coagulante da peptidase produzida em FSm pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em frasco Erlenmeyer



Legenda: AC 96 horas (●); Erlenmeyer 125 mL; 25 mL solução salina 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 % de NH_4NO_3 ; pH 5,5; 4,4 % FT; 150 rpm; 41 °C; 10^5 esporos/mL.

A capacidade da enzima em resistir à intensa manipulação em relação a temperatura pode ser considerada uma vantagem tanto durante o armazenamento como durante a manipulação do produto, já que o congelamento é uma alternativa para preservar o produto contra o desenvolvimento de micro-organismos e oxidação (CARNEIRO, 1983). Além disso, o congelamento e o descongelamento podem levar a desnaturação (PIKAL-CLELAND et al., 2000), já que durante o processo de congelamento ocorre a cristalização dos solutos do tampão promovendo mudanças no pH, o que pode resultar em perda de atividade (CAO et al., 2003), o que não foi observado neste trabalho.

4. CONCLUSÃO

Com a aplicação do Plackett-Burman e Doehlert design para a atividade coagulante foi possível obter resultados entre 10,46 a 122 U/mL, um aumento em torno de 11,66 vezes após otimização.

Além disso, foi possível aumentar o volume de produção em biorreator, utilizando os parâmetros determinados na otimização, com redução no tempo de fermentação, validando o processo fermentativo.

A peptidase coagulante apresentou elevada especificidade e considerável estabilidade em relação às sucessivas variações na temperatura de armazenamento, sugerindo uma maior vantagem durante a manipulação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. **In Methods in Enzymology**, v. 19, p. 446-460, 1970.

BENSALAH, W.; FEKI, M.; WERY, M.; AYEDI, H. F. Thick and Dense Anodic Oxide Layers Formed on Aluminum in Sulphuric Acid Bath. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 26, p. 113-118, 2010.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 506 p.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 1.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência Agrotecnológica**, v. 24, p. 137-152, 2000.

CAO, E.; CHEN, Y.; CUI, Z.; FOSTER, P. R. Effect of Freezing and Thawing Rates on Denaturation of Proteins in Aqueous Solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, p. 684-690, 2003.

CARNEIRO, I. I. C. **ABC do congelamento alimentar**. Brasília: Centro de congelamento alimentar, 1983, 208 p.

CAVALITTO, S.F.; MIGNONE, C.F. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 175–179, 2007.

CHAARI, F.; KAMOUN, A.; BHIRI, F.; BLIBECH, M.; ELLOUZE-GHORBEL, R.; ELLOUZ-CHAABOUN, S. Statistical optimization for the production of lichenase by a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF in solid state fermentation using pea pomace as a novel solid support. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 192–198, 2012.

DOEHLERT, D. H. Uniform shell designs. *Appl. Statistics*. v. 19, p. 231-239, 1970.

GAJO, A. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, M. S.; PAIXÃO, M. G.; PINTO, S. M.; DAVID, F. M. **Estudo sensorial de queijo similar ao minas padrão com leite de ovelha utilizando agente coagulante e coalho**. Cândido Tostes, p. 61-65, 2012.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, fev. 2003.

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.

KIRAN, R. R. S.; KONDURI, R.; RAO, G. H.; MADHU, G. M. Statistical optimization of endo-polygalacturonase production by overproducing mutants of *Aspergillus niger* in solidstate fermentation. **Journal of Biochemical Technology**, v. 2, p. 154-157, 2010.

KRISHNA K, V.; GUPTA, M.; GUPTA, N.; GAUDANI, H.; TRIVEDI, S.; PATIL, P.; GUPTA, G.; KHAIRNAR, Y.; BORASATE, A.; MISHRA, D. Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. **International Journal of Microbiology Research**, p. 14-18, ISSN: 0975-5276, 2009.

LI, Y.; LIU, Z.; CUI, F.; LIU, Z.; ZHAO, H. Application of Plackett-Burman experimental design and Doehlert design to evaluate nutritional requirements for xylanase production by *Alternaria mali* ND-16. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 285-291, 2007.

OSKOUIE, S. F. G.; TABANDEH, F.; YAKHCHALI, B.; EFTEKHAR, F. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p.37-42, 2008.

PIKAL-CLELAND, K. A.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N.; AMIDON, G. L.; CARPENTER, J. F. Protein Denaturation during Freezing and Thawing in Phosphate Buffer Systems: Monomeric and Tetrameric β -Galactosidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 384, p. 398-406, 2000.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, p. 305-325, 1946.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; KOK, C. Y.; KONG, J.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, 2008.

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

SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R. K.; Statistical optimization of conditions for protease production from *Bacillus* sp. and Its scale-up in a bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 141, p. 229–240, 2007.

SAXENA, R.; SINGH, R. Statistical optimization of conditions for protease production from *Bacillus* sp. **Acta Biologica Szegediensis**, v 54, p. 135-141, 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Blucher, 2001, v.2, 541 p.

SILVA, B. L.; GERALDES, F. M.; MURARI, C. S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and Characterization of a Milk-clotting Protease Produced in Submerged Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p.1999-2011, 2014.

STATSOFT Inc., STATISTICA (Data Analysis Software Systems) Version 8.0, 2008.

CAPÍTULO 3

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PEPTIDASE COAGULANTE
PRODUZIDA PELO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 OBTIDA EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Bruna Lima da Silva; Angélica Rodrigues de Souza; Eleni Gomes; Roberto da Silva
Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rua Cristóvão
Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil.

RESUMO

Peptidases microbianas desempenham grande importância junto à indústria. Portanto, estudar as características da enzima mostra-se relevante visando sua aplicação no desenvolvimento de produtos. A partir da purificação enzimática, que é um processo que elimina constituintes indesejáveis do meio de cultivo, é possível estudar e realizar a caracterização bioquímica da enzima. O presente estudo objetivou desenvolver um protocolo de purificação e caracterizar bioquimicamente a enzima coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 obtida em fermentação submersa usando farelo de trigo como substrato. A produção enzimática foi feita com 4 % de farelo de trigo, 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 % de NH_4NO_3 , 41 °C durante 96 horas. A concentração da peptidase foi feita em dialisador tangencial e a purificação por cromatografia de troca iônica em resina Q-Sepharose com tampão acetato 0,02 mol/L e pH 4,6, apresentando uma banda homogênea em SDS-PAGE. A caracterização da enzima purificada mostrou que o pH ótimo foi de 5,3 ($R=786$), temperatura ótima de 65 °C ($R=3417$), ativação da atividade coagulante durante 24 horas de exposição em pH 4,0 ($R=5023$) e 4,5 ($R=3518$) e estabilidade térmica até 55 °C durante 5 horas de exposição ($R=480$). O CaCl_2 influenciou positivamente até a concentração de 0,06 mol/L ($\text{AC}=101 \text{ U/mL}$). O *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produziu uma peptidase coagulante com elevada especificidade, demonstrando potencial como substituto do coalho tradicional. O processo de purificação foi relativamente simples e rápido, utilizando somente a cromatografia de troca iônica e obtendo uma enzima considerada pura na análise SDS-PAGE com boas características de estabilidade.

Palavras-chave: renina microbiana; fungo filamentoso; troca iônica

ABSTRACT

Microbial peptidases have great importance in the industry. Therefore, studying the characteristics of the enzyme is relevant for its application in product development. With enzymatic purification, which is a process which eliminates undesirable constituents of the culture medium, it is possible to study the biochemical characteristics of the enzyme. The present study aimed to develop the purification protocol and to biochemically characterize the coagulant enzyme of *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 obtained in submerged fermentation using wheat bran as substrate. The enzymatic production was done with 4% wheat bran, 0.4 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.1 % NH_4NO_3 , at 41 °C for 96 hours. The peptidase concentration was performed on a tangential dialyzer and purification by ion exchange chromatography on Q-Sepharose resin with 0.02 mol / L acetate buffer and pH 4.6, presenting a homogeneous band on SDS-PAGE. The purified enzyme showed optimum pH at 5.3 (R = 786), optimum temperature at 65 ° C (R = 3417), with activation of the milk clotting activity (MCA) during 24 hours of exposure at pH 4.0 (R = 5023) and 4.5 (R = 3518) and thermal stability at 55 ° C for 5 hours of exposure (R = 480). CaCl_2 positively influenced the concentration of 0.06 mol / L (MCA = 101 U/mL). *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produced a coagulant peptidase with high specificity, demonstrating potential as a substitute for traditional rennet. The purification process was relatively simple and fast, using only ion exchange chromatography and obtaining an enzyme considered pure in SDS-PAGE analysis with good stability characteristics.

Keywords: microbial renin; filamentous fungus; ion exchange

1. INTRODUÇÃO

A quimosina é uma protease aspártica que hidrolisa especificamente a ligação peptídica entre os aminoácidos Phe105-Met106 liberando a para- κ -caseína e glicomacropeptídeo. É usada extensivamente na indústria de laticínios para produzir uma coalhada estável com bom sabor. É considerada a protease mais eficiente na indústria de queijos. No entanto, a escassez mundial de coalho de vitelo devido ao aumento da demanda por produção de queijo intensificou a busca por coagulantes microbianos alternativos (RAO et al., 1998). Além disso, existe uma procura crescente de novas fontes de enzimas proteolíticas que têm especificidade adequada, estabilidade ao pH, temperatura e agentes químicos (ZANPHORLIN et al., 2011).

Os coagulantes microbianos estão associados com alta atividade proteolítica, causando intensa hidrólise. A diminuição da atividade proteolítica aumenta a relação atividade coagulante do leite / atividade proteolítica e, conseqüentemente, melhora a característica da enzima microbiana (HASHIM, 2000).

Para entender e aplicar a enzima coagulante é necessário estudar suas características bioquímicas. Portanto, é necessário obter a enzima pura. Para a purificação, é geralmente necessário desenvolver uma metodologia específica, porque existem diferenças na composição dos meios de produção de cada enzima.

Durante o processo de purificação, são realizados múltiplos passos para remover contaminantes e obter uma amostra pura. No entanto, em geral, a cada passo executado uma percentagem da atividade enzimática é perdida. Portanto, quanto menos passos de purificação, menor a perda de atividade (CAMPBELL; FARRELL, 2011).

Silva et al (2014) demonstraram que o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi capaz de produzir, por fermentação submersa, uma enzima coagulante com potencial para a produção de queijo. Esta pesquisa teve como objetivo estabelecer um protocolo de purificação e determinar as características bioquímicas da enzima coagulante microbiana produzida pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em fermentação submersa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

O fungo filamentoso *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, obtido a partir da coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP foi mantido em meio Potato Dextrose Agar (PDA).

2.2. Inóculo e obtenção da enzima

O crescimento do inóculo foi feito em meio Potato Dextrose Agar (PDA), a 45 °C durante 48 horas. Após crescimento completo os micélios foram suspensos em solução salina composta de 0,1 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 % de NH_4NO_3 . Esta solução foi usada para inocular os meios fermentativos. A fermentação submersa foi feita em frascos Erlenmeyer contendo 4 % de farelo de trigo, 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 % de NH_4NO_3 , 41 °C durante 96 horas. Após fermentação foi feita a extração em papel de filtro a vácuo, em seguida, o extrato bruto foi centrifugado a 13776 $\times g$ por 15 minutos a 5 °C.

2.3. Atividade enzimática

2.3.1. Atividade coagulante (AC)

1 mL de solução 10 % (p/v) de leite desnatado (Itambé) acrescido com CaCl_2 0,01 mol/L, foi pré-incubado em banho-maria a 35 °C durante 10 minutos. Em seguida adicionou-se 0,1 mL de solução enzimática e iniciou-se a contagem do tempo. Os tubos de ensaio contendo a mistura reacional foram dispostos sobre suportes rotativos. A formação do coágulo foi observada na parede do tubo de ensaio que rodava continuamente durante o teste em banho-maria termostático para teste de coalho/coagulante MA 470-Marconi, SA.

O tempo em que as primeiras partículas foram formadas foi medido. Uma unidade de coagulação do leite (UAC) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a coagulação de 1 mL de substrato em 40 minutos a 35 °C e foi

calculada de acordo com Shata (2005): $UAC = 2400/t \times S/P$, onde t é o tempo necessário para a formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume da enzima.

2.3.2. Atividade proteolítica (AP)

A AP 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) diluída em tampão acetato 0,2 mol/L pH 5,5; 0,4 mL de tampão acetato 0,2 mol/L pH 5,5 e 0,2 mL de extrato enzimático. A reação ocorreu em banho-maria a 35 °C e ao término de 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Nos controles a solução de TCA 10 % foi adicionada à mistura de reação antes da adição da enzima. As amostras e seus controles foram centrifugados a 11159 $\times g$ durante 9 minutos. A leitura da absorbância nos sobrenadantes foi realizada a 280 nm. A atividade proteolítica foi calculada pela equação: $UAP/mL = (\Delta Abs_{280nm} \times 10 \times \text{fator de diluição}) / (E \times t)$, 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.

2.3.3. Razão (AC/AP)

Determinou-se a razão de coagulação dividindo-se a atividade coagulante pela atividade proteolítica, com a fórmula: $R = AC (U/mL) / AP (U/mL)$, onde R é o valor da razão, AC atividade coagulante e AP atividade proteolítica.

2.4. Purificação da peptidase coagulante

2.4.1. Concentração enzimática

A concentração da amostra foi feita em duas etapas, concentração inicial em dialisador tangencial em membrana com corte de 10 kDa, seguida de desidratação por liofilização. Foi verificada a influência de cada processo na atividade coagulante, a qual foi analisada após cada uma das etapas.

2.4.2. Cromatografia de troca iônica

A purificação da enzima ocorreu em sistema Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) em Akta purifier. Foi utilizada uma coluna de troca iônica com resina Q Sepharose (Pharmacia) em coluna (6 cm x 1,6 cm), com 12 mL de resina equilibrada com tampão acetato 0,02 mol/L, pH 4,6. A eluição foi realizada, inicialmente, utilizando um gradiente escalonado e, posteriormente, através de níveis ajustados de NaCl (0 - 0,5 mol/L) em tampão acetato 0,02 mol/L, pH 4,6, a 1,0 mL/min, monitorada em detector UV-VIS a 280 nm. Amostras de 1,5 mL do líquido eluído foram coletadas em coletor de frações Frac-900. A princípio foi feita a atividade coagulante em, pelo menos, um tubo de cada pico. Ao identificar o pico de eluição da enzima, foi dosada a atividade coagulante em todos os demais tubos do pico. As frações que apresentaram atividade coagulante foram combinadas a fim de verificar a pureza (perfil eletroforético) e para posterior caracterização enzimática.

2.5. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O monitoramento dos contaminantes da amostra foi feito por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida contendo SDS (LAEMMLI, 1970).

As proteínas foram desnaturadas por fervura a 100°C por 5 minutos em tampão de amostra composto por tris-HCl 0,1 mol/L, pH 6,8, 2 % de SDS, 10 % de glicerol, DTT a 0,1 mol/L e azul de bromofenol a 0,001 mol/L. O gel concentrador foi preparado na concentração de 5 % e o gel fracionador na concentração de 10 % como indicado em Sambrook e Russel (2001). A coloração das proteínas do gel foi feita utilizando o método com reagente de prata conforme descrito por Blum et al. (1987).

2.6. O efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima pura

O efeito do pH nas atividades coagulante e proteolítica foi testado em banho-maria com rotação a 35 °C na faixa de pH de 5,0 a 8,5. Os tampões utilizados foram: Acetato (4,5 a 5,5), MES (6,0 a 7,0) ou TAPS (7,5 a 8,5).

O pH de estabilidade da enzima foi determinado pela diluição da enzima em solução tampão a 0,4 mol/L (1:1): acetato (3,5 a 5,5), Mes (6,0 a 7,0) e Taps (7,5 a 8,5).

A mistura foi incubada a 25 °C por 24 horas. Após esse período, alíquotas das diferentes soluções de pH foram analisadas quanto às atividades coagulante e proteolítica residuais.

Para a determinação da temperatura ótima da enzima, a atividade coagulante e a atividade proteolítica foram avaliadas na faixa de temperatura de 35 a 70 °C com intervalos de 5 °C.

A análise da temperatura de estabilidade da enzima requereu um pré-tratamento, o qual consistiu na pré-incubação do extrato enzimático em banho-maria em todas as temperaturas testadas entre 35 a 65 °C (com variação de 5 °C). Os períodos de incubação avaliados foram de 1, 3 e 5 horas. Em seguida, foram determinadas as atividades coagulante e proteolítica residuais das amostras.

2.7. Influência da concentração do cloreto de cálcio na atividade coagulante da enzima pura

Foram adicionados à solução 10 % (p/v) de leite desnatado (Itambé) diferentes concentrações de CaCl_2 (0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,10 e 0,15 mol/L), em seguida, a atividade coagulante foi determinada de acordo com o item 2.3.

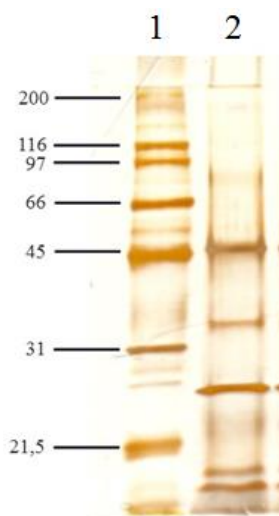
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação da peptidase coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

Antes de iniciar o processo de purificação foi feito uma eletroforese do extrato bruto a fim de verificar a presença e intensidade de contaminantes no meio.

A figura 1, coluna 2, mostra a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida-SDS da enzima bruta, onde se pôde observar a presença de poucos e bem separados contaminantes, sugerindo a necessidade de poucas etapas até a obtenção da enzima pura.

Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (13 %) do extrato enzimático bruto do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produzido por FSm.



Legenda: coluna 1:, marcadores de massa molecular: Miosina 200 kDa, β -galactosidase 116 kDa, fosforilase 97 kDa, BSA 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 31 kDa, inibidor de tripsina 21,5 kDa; Coluna 2: extrato enzimático bruto

O processo fermentativo empregado na produção da peptidase demonstrou ter influência direta na presença de contaminantes da amostra. Como observado no trabalho de Merheb-Dini et al. (2010), que também utilizaram o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N 31, mas empregando a fermentação em estado sólido e farelo de trigo como o substrato, foi encontrado um extrato bruto com uma quantidade muito maior de contaminantes quando comparado ao extrato bruto obtido em fermentação submersa. Essa elevada proporção de contaminantes do extrato bruto obtido por fermentação em estado sólido dificultou o processo de purificação da enzima, fazendo com que uma maior quantidade de etapas de purificação fosse necessária.

Este resultado sugeriu ser desnecessária a realização de uma etapa de fracionamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou etanol. Assim a concentração da enzima bruta foi realizada diretamente através da diálise tangencial, seguida do processo de liofilização.

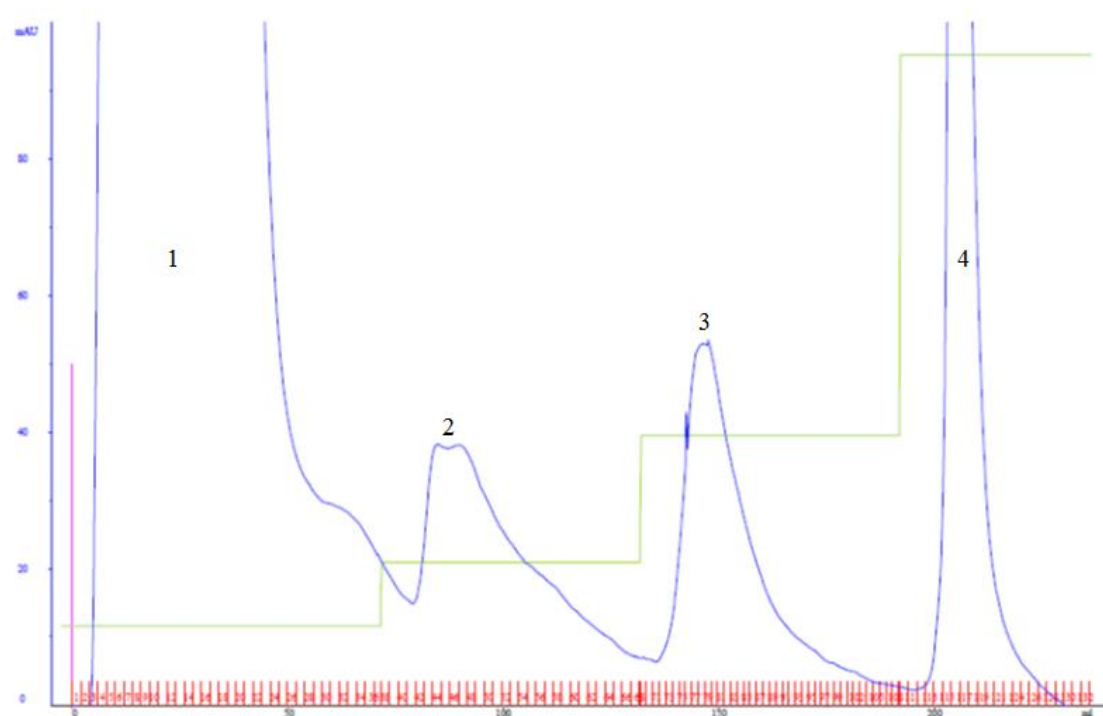
A partir da amostra concentrada e dialisada, foram feitos os testes de adsorção e eluição da enzima em resina Q-Sepharose em diferentes valores de pH e concentrações de NaCl, respectivamente.

Depois de vários testes preliminares, foi estabelecido o protocolo para a purificação, utilizando tampão A (tampão acetato 0,02 mol/L, pH 4,6) e gradiente

escalonado de tampão B (tampão acetato 0,02 mol/L, pH 4,6, 0,5 mol/L de NaCl) em rampas de 10, 20, 40 e 100 %.

A aplicação de gradiente escalonado permitiu uma melhor separação entre os picos. A figura 2 mostra o perfil da cromatografia de troca iônica do extrato bruto do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

Figura 2. Perfil cromatográfico de separação gerado pelo FPLC – Akta utilizando gradiente escalonado em rampas de NaCl.



Legenda: Linha - Azul: UV da amostra 280 nm; Verde: % de tampão B; Vermelha: fluxo da corrida; Pico 1, 2 e 4: contaminantes; Pico 3: enzima coagulante.

Ao final do processo, foi feita a atividade coagulante de um tubo de cada pico para identificar em qual dos picos houve o desligamento da enzima. A atividade coagulante da enzima foi encontrada no pico número 3 do cromatograma (Figura 2), ou seja, a enzima se desligou da resina somente quando a concentração do tampão B atingiu 40 % (0,2 mol/L de NaCl).

Para verificar o grau de pureza da enzima os tubos do pico 3 foram analisados quanto ao perfil eletroforético (Figura 3).

Figura 3. Perfil eletroforético da combinação dos tubos que apresentaram atividade coagulante do pico número 3 da cromatografia de troca iônica com gradiente escalonado da Figura 3.



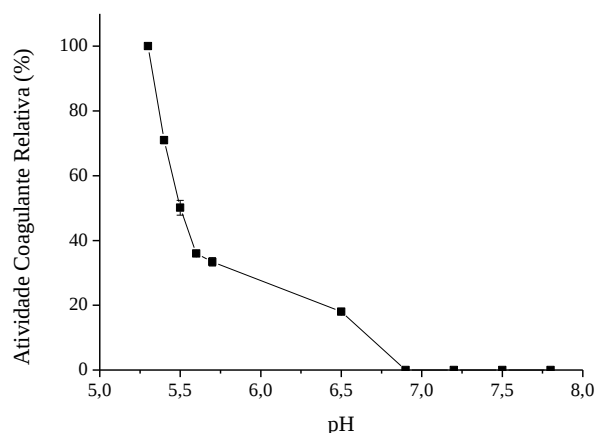
Legenda: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) a 10 %. Coluna 1: marcador de massa molecular: Miosina 200 kDa, β -galactosidase 116 kDa, fosforilase 97 kDa, BSA 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 31 kDa; inibidor tripsina 21,5 kDa; Coluna: 2 enzima purificada

3.2. Caracterização da enzima purificada através das atividades coagulante e proteolítica

3.2.1. pH ótimo

A partir dessas análises pôde-se observar, de acordo com a figura 4, que a máxima atividade coagulante da peptidase do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi obtida em pH 5,3 e a partir do aumento do pH do meio, a atividade coagulante da enzima diminuiu até se extinguir em pH 6,9.

Figura 4. Influência do pH na atividade coagulante da peptidase purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

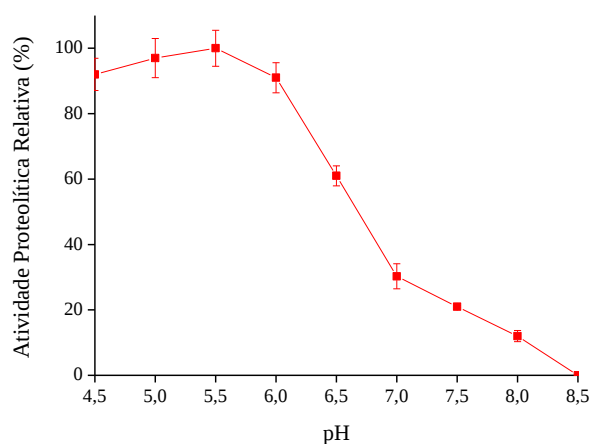


Legenda: (●) Atividade coagulante da enzima pura

Em pH abaixo de 5,3 não foi possível determinar a atividade coagulante, já que o substrato (leite em pó) apresentou prévia desestabilização (coagulação na ausência da enzima), provavelmente, devido à proximidade do ponto isoelétrico (4,6). Portanto, apenas valores de pH acima de 5,3 foram considerados para a análise de pH ótimo da atividade coagulante.

A máxima atividade proteolítica foi observada em pH 5,5 (Figura 5), porém com aumento do pH do meio, a atividade coagulante da enzima diminuiu e se extinguiu em pH 8,5.

Figura 5. Influência do pH na atividade proteolítica da peptidase purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.



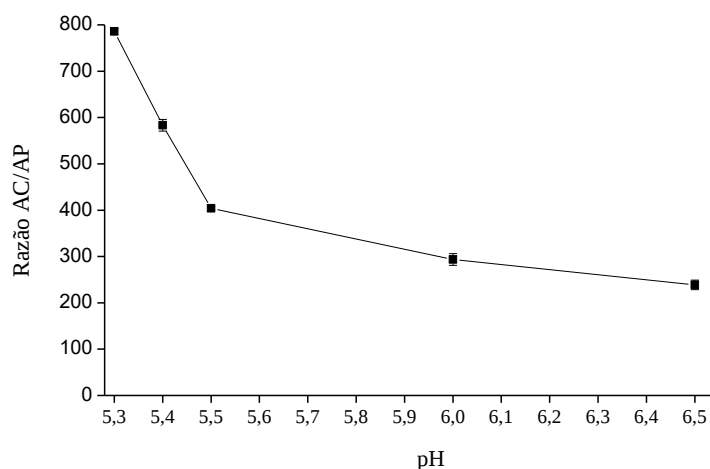
Legenda: (■) Atividade proteolítica da enzima pura.

A partir das figuras 4 e 5, pôde-se observar que a enzima apresentou boa atuação tanto em relação à atividade coagulante, como na atividade proteolítica em valores de pH levemente ácidos. Essa característica é de grande importância, pois geralmente, para a produção de queijos é adicionado culturas “*starter*”, que são constituídas por bactérias acidulantes, as quais irão promover a acidificação do leite e, portanto favorecer a ação da enzima coagulante do *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31.

Comportamento similar foi verificado a partir da peptidase purificada do *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* F518, que apresentou máxima atividade em pH 5,2 e declínio conforme o aumento do pH (SUN et al., 2014), com a enzima coagulante purificada do *Mucor mucedo* DSM 809, a qual obteve melhor desempenho na faixa de pH 5,0 a 5,6 e queda a partir de pH 6,0 (YEGIN et al., 2012), para a enzima purificada do *Mucor pusillus* a atividade máxima foi observada em pH 5,0 e conforme o aumento do pH houve a diminuição da atividade (NOUANI et al., 2009), a peptidase purificada do *Rhizopus oryzae* apresentou atividade ótima em pH 5,5 (KUMAR et al., 2005) e no trabalho de Preetha e Boopathy (1997) a enzima coagulante purificada do *Rhizomucor miehei* apresentou atividade coagulante ótima em pH 5,6 e máxima atividade proteolítica em pH 4,1.

A especificidade da enzima deve ser avaliada por meio da obtenção da Razão, que é a interação entre a atividade coagulante (atividade específica) e atividade proteolítica (atividade inespecífica). Em vista disso, a Razão AC/AP também foi analisada de acordo com a influência do pH do meio. A figura 6 mostra que o valor da Razão AC/AP foi maior em pH 5,3, portanto pode-se concluir que o pH ótimo da peptidase coagulante do *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 foi 5,3. Outro fator observado foi em relação ao estudo anterior realizado por Silva et al. (2014), os quais estudaram a enzima coagulante bruta do *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 obtida em fermentação submersa e ao comparar os valores da Razão da enzima bruta com a enzima purificada, pôde-se observar que houve um aumento significativo da Razão AC/AP após o processo de purificação.

Figura 6. Influência do pH na Razão entre atividade coagulante e proteolítica da peptidase purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

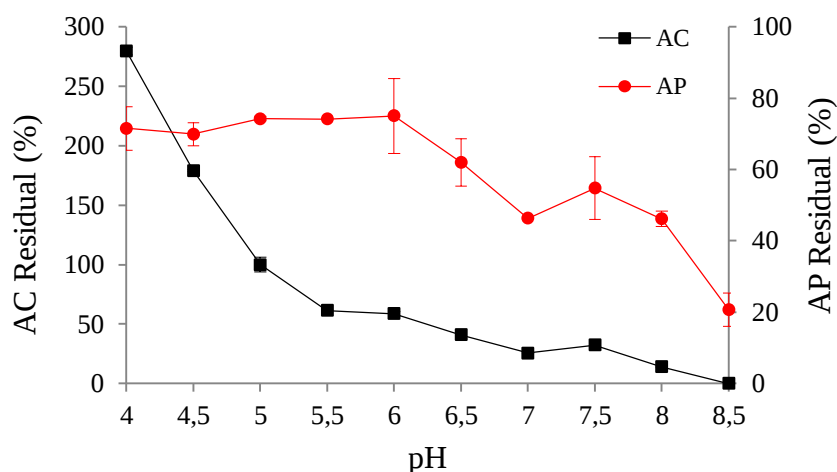


Legenda: (■) Razão AC/AP

3.2.2. pH de estabilidade

A enzima pura foi incubada em tampão com diferentes valores de pH durante 24 horas a 25 °C em repouso. A figura 7 mostra que a atividade proteolítica foi relativamente estável em pH 4,0 até 6,0, permanecendo com cerca de 80 % da atividade inicial. Também foi observado que a atividade proteolítica diminuiu com o aumento do valor pH de exposição, contudo não foi inativada em nenhum dos valores de pH avaliados.

Figura 7. Efeito da exposição da enzima coagulante purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em diferentes valores de pH.



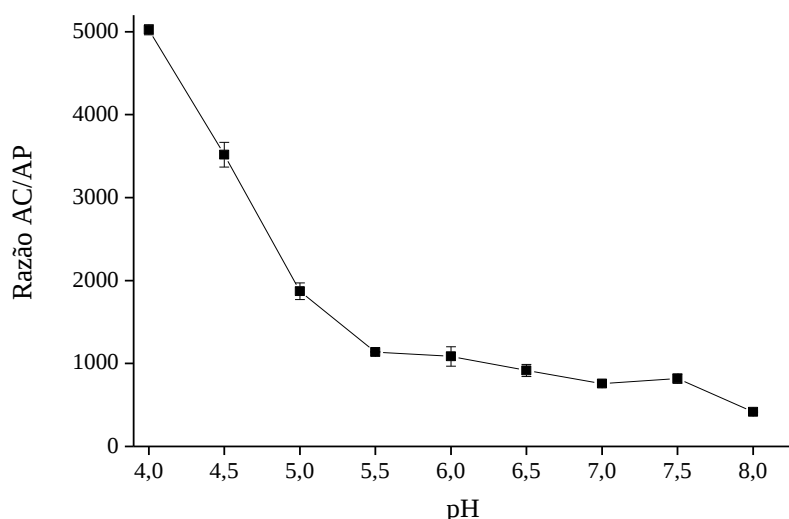
Legenda: (■) Atividade coagulante e (●) Atividade proteolítica da enzima pura

Os resultados mostraram que houve maior atividade da enzima em valores de pH mais ácidos 4,0 e 4,5 uma vez que nestes valores as atividades foram maiores, de aproximadamente 3 e 2 vezes, respectivamente, em relação ao controle (enzima pura sem adição de tampão).

O pH 5,0 demonstrou não ter influência positiva nem negativa na atividade coagulante da peptidase do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. Já em pH 5,5 e 6,0 a enzima perdeu cerca de 40 % da atividade coagulante inicial e manteve-se em declínio até se extinguir em pH 8,5. A partir dos resultados observou-se que a exposição prolongada em pH acima de 6,5 influencia negativamente a ação coagulante da enzima.

Considerando-se que a enzima sofreu um significativo aumento na atividade coagulante e manteve a atividade proteolítica baixa em pH 4,0 e 4,5, já era de se esperar um consequente aumento na Razão AC/AP. Esse aumento pode ser observado a partir da Figura 8, onde foi verificado, o aumento da Razão AC/AP até pH 6,0 em relação à peptidase controle (enzima pura sem adição de tampão). A partir dos resultados, pôde-se concluir que o pré-tratamento da enzima em pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0 fez com que a ação específica da peptidase produzida pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em fermentação submersa aumentasse em torno de 10, 7, 4, 2 e 2 vezes, respectivamente.

Figura 8. Influência do tempo de exposição em diferentes valores de pH na Razão AC/AP da enzima coagulante purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

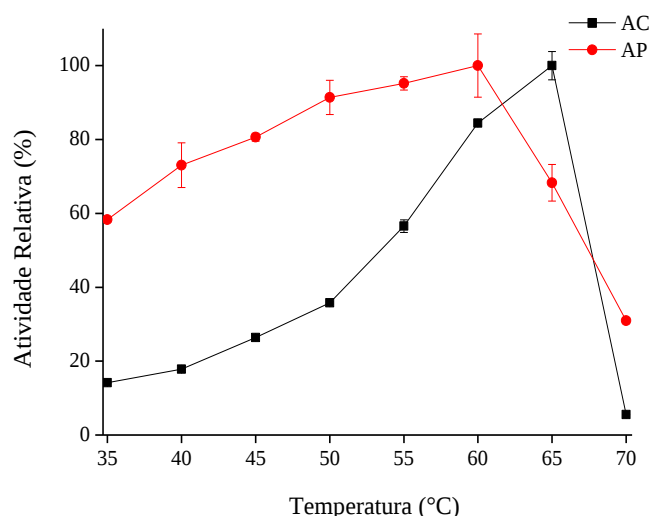


Legenda: (■) Razão AC/AP

3.2.3. Temperatura ótima

A Figura 9 mostra a influência da temperatura nas atividades coagulante e proteolítica. A partir do aumento da temperatura pode-se observar um aumento da atividade enzimática, tanto para a atividade coagulante como para a proteolítica.

Figura 9. Determinação da temperatura ótima de atuação da peptidase coagulante purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.



Legenda: (■) Atividade coagulante e (●) Atividade proteolítica da enzima pura

A atividade coagulante da enzima purificada apresentou um efeito positivo de acordo com o aumento da temperatura, atingindo a máxima atividade em 65 °C. Além disso, pôde ser observado um aumento constante da atividade coagulante, ou seja, a atividade enzimática praticamente dobrou para cada aumento de 10 °C, chegando ao ápice em 65 °C e declinando bruscamente quando submetida a 70 °C.

O efeito da temperatura, na atividade da peptidase coagulante purificada produzida em fermentação submersa pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 usando farelo de trigo como substrato, apresentou o mesmo perfil em relação à enzima bruta (produzida em FSm pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com farelo de trigo) estudada e caracterizada no trabalho de Silva et al. (2014).

Comportamento similar foi verificado a partir da peptidase pura do *Penicillium oxalicum*, que demonstrou melhor desempenho a 65 °C (HASHEM, 2000), a partir da enzima purificada do *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* F518 que apresentou máxima atividade em 60 °C e declínio conforme o aumento a temperatura (SUN et al.,

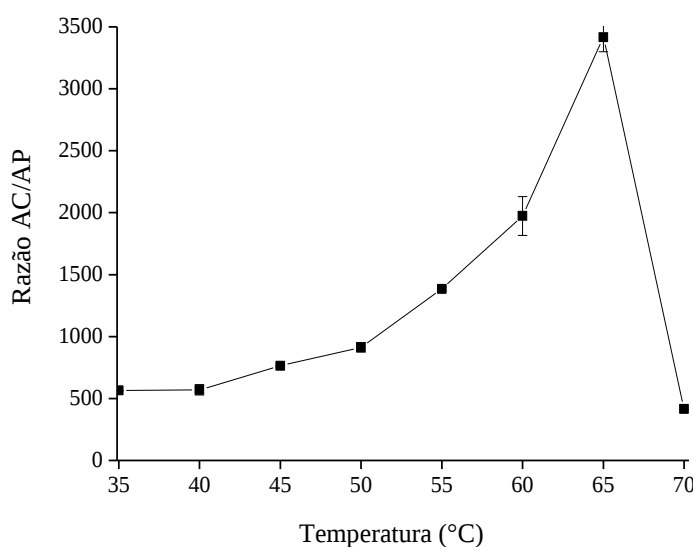
2014) e com a enzima purificada do *Rhizopus oryzae* a qual teve melhor atuação a 60 °C e inativação a 70 °C (KUMAR et al., 2005).

A enzima purificada produzida em fermentação submersa pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 usando farelo de trigo como substrato se mostrou mais sensível a elevadas temperaturas do que a enzima purificada (produzida em FES pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com farelo de trigo) do trabalho de Merheb-Dini et al. (2010), a qual apresentou máxima atividade coagulante em 70 °C e proteolítica em 65 °C. Ao comparar as características das duas enzimas, foi observado que o processo de fermentação alterou algumas características, como a temperatura ótima, por exemplo.

Enzimas coagulantes menos tolerantes a altas temperaturas foram obtidas nos trabalhos de Yegin et al. (2012), que estudaram a enzima coagulante purificada do *Mucor mucedo* DSM 809 em fermentação submersa e encontraram a máxima atividade na faixa de 35 a 40 °C. Nouani et al. (2009) estudaram a peptidase purificada do *Mucor pusillus* e encontraram melhor atividade a 50 °C e inativação a 65 °C.

A Razão AC/AP foi analisada e o melhor valor obtido foi a 65 °C. Esse resultado não foi aleatório e segue coerente, uma vez que a 65 °C foi obtida a máxima atividade coagulante e apenas 60 % da máxima atividade proteolítica, ou seja, além da ótima atividade coagulante a 65 °C, a atividade proteolítica mais baixa também contribuiu para o elevado valor da Razão demonstrado na Figura 10.

Figura 10. Efeito de diferentes temperaturas na Razão AC/AP da enzima coagulante purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

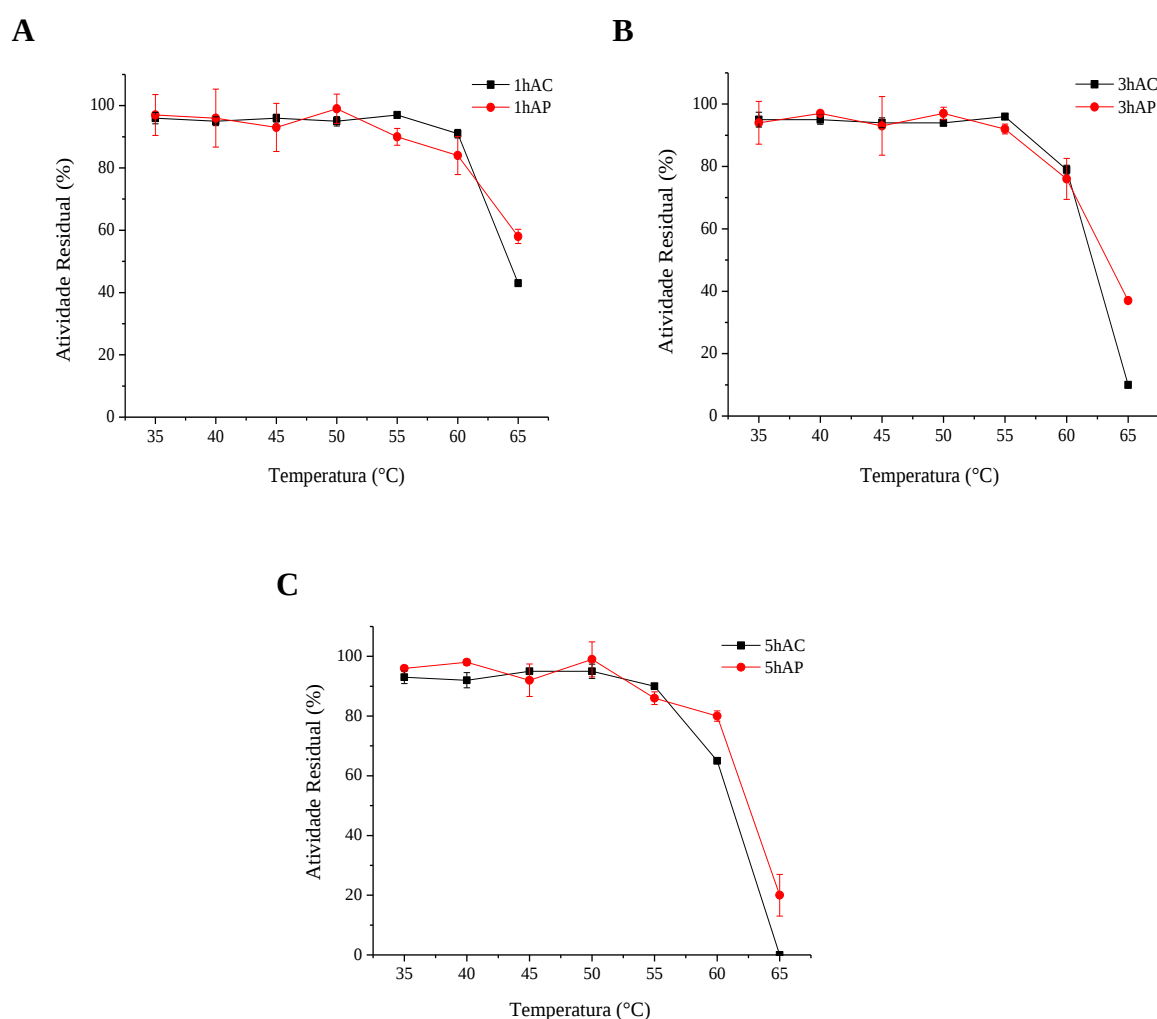


Legenda: (■) Razão AC/AP

3.2.4. Temperatura de estabilidade

A Figura 11 mostra a estabilidade térmica da peptidase coagulante purificada do *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 em diferentes temperaturas durante 1, 3 e 5 horas de incubação. As atividades coagulante e proteolítica se mostraram estáveis até 55 °C durante 5 horas de incubação. Já a 60 °C a atividade coagulante exibiu estabilidade de 91, 79 e 65 % durante 1, 3 e 5 horas de incubação, respectivamente. A 65 °C a estabilidade da atividade coagulante caiu para 43 e 10 % durante 1 e 3 horas de incubação, respectivamente, e perdeu a atividade com 5 horas de incubação.

Figura 11. Influência do tempo de incubação nas atividades coagulante e proteolítica da enzima purificada do *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 em diferentes temperaturas.



Legenda: (■) Atividade coagulante e (●) Atividade proteolítica da enzima pura. (A) 1 hora de incubação; (B) 3 horas de incubação; (C) 5 horas de incubação.

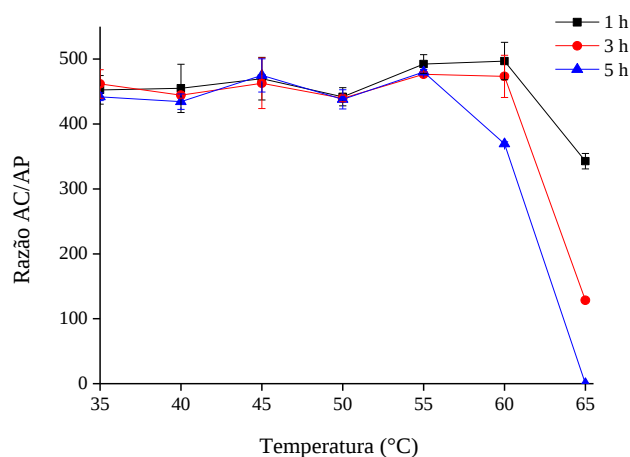
A enzima purificada (produzida em FSm pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com farelo de trigo) demonstrou ter maior estabilidade a diferentes temperaturas do que a enzima bruta (produzida em FSm pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com farelo de trigo), estudada e caracterizada no trabalho de Silva et al. (2014). A enzima bruta perdeu atividade coagulante após 1 hora de incubação a 65 °C, sendo que a enzima purificada ainda apresentou 43 % de atividade coagulante nas mesmas condições de incubação. A enzima purificada só perdeu atividade coagulante quando foi incubada durante 5 horas a 65 °C. A atividade proteolítica da enzima purificada também demonstrou ser mais estável em relação à enzima bruta, e mesmo após 5 horas de incubação a 65 °C a atividade proteolítica remanescente foi de 20 %.

Já a enzima purificada produzida em fermentação em estado sólido pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com farelo de trigo, estudada por Merheb-Dini et al. (2010) foi mais estável do que a enzima purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 obtida em fermentação submersa, apresentando estabilidade até 60 °C durante 1 hora de incubação e estabilidade de 78 e 87 % na atividade coagulante e proteolítica, respectivamente, durante 1 hora de incubação a 65 °C.

Outras enzimas apresentaram-se mais sensíveis à prolongada exposição em diferentes temperaturas, como: a peptidase purificada produzida a partir do *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* F518, que apresentou estabilidade até 40 °C durante 30 minutos de incubação e perda de atividade à 55 °C (SUN et al., 2014); a enzima coagulante purificada do *Mucor mucedo* DSM 809, que foi estável a 40 °C durante 30 minutos e perdeu atividade quando incubada por 10 minutos a 55 °C (YEGIN et al., 2012); a peptidase purificada do *Mucor pusillus* a qual permaneceu estável até 50 °C durante 30 minutos e perdeu atividade a 65 °C (NOUANI et al., 2009); a enzima purificada do *Rhizopus oryzae* foi incubada durante 1 hora a diferentes temperaturas e apresentou estabilidade até 40 °C, já a 70 °C perdeu cerca de 60 % da atividade inicial (KUMAR et al., 2005).

Os valores da Razão AC/AP foram analisados em função da temperatura de estabilidade (Figura 12), contudo não foram observadas mudanças no comportamento da enzima purificada, ou seja, nenhuma temperatura avaliada foi capaz de melhorar o desempenho da atividade enzimática, diferentemente do resultado observado em relação ao pH de estabilidade (Figuras 7 e 8), no qual a enzima pareceu ter sofrido alguma modificação em sua estrutura apresentando um aumento significativo da atividade coagulante quando submetida em pH de 4,0 e 4,5.

Figura 12. Razão AC/AP da enzima coagulante purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 após exposição em diferentes temperaturas.

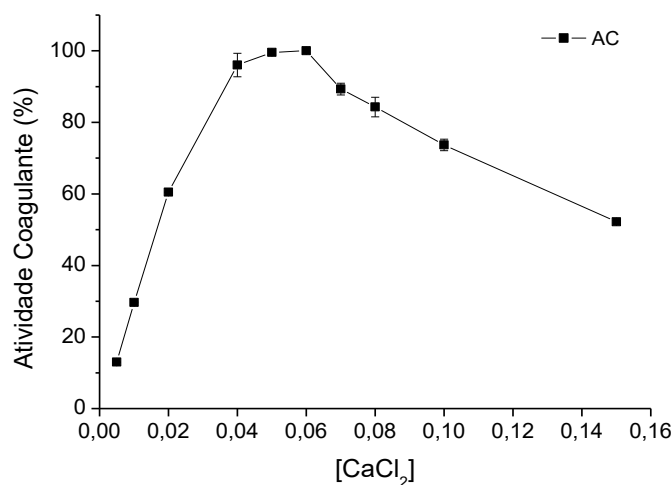


Legenda: (■) 1 hora de incubação; (●) 3 horas de incubação; (▲) 5 horas de incubação

3.3. Influência da concentração do cloreto de cálcio na atividade coagulante

A atividade coagulante da enzima purificada foi avaliada em relação à adição de diferentes concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) ao leite desnatado (Itambé). A partir da figura 13 pode-se concluir que com o aumento do CaCl_2 de 0,005 mol/L até a concentração de 0,06 mol/L ocorreu um aumento da atividade coagulante, sendo que a maior atividade coagulante foi observado com a concentração de 0,06 mol/L de CaCl_2 , todavia, a partir de 0,07 mol/L houve um declínio da atividade.

Figura 13. Influência do cloreto de cálcio na atividade coagulante da enzima purificada do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.



Legenda: (■) Atividade coagulante

O efeito do CaCl_2 na coagulação da enzima purificada (produzida em FSm pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com farelo de trigo), apresentou comportamento semelhante à enzima bruta (produzida em FSm pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 com farelo de trigo) estudada e caracterizada no trabalho de Silva et al. (2014).

Resultados semelhantes foram observados com a peptidase purificada produzida a partir do *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* F518, (SUN et al., 2014) e com a peptidase purificada obtida em fermentação sólida pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (MERHEB-DINI et al., 2010), as quais apresentaram máxima atividade enzimática até a concentração de 0,04 mol/L de CaCl_2 .

Já Nouani et al. (2009) ao estudar a influência do CaCl_2 na atividade coagulante da peptidase purificada do *Mucor pusillus* encontraram melhor resposta quando a concentração de CaCl_2 foi de 0,02 mol/L.

Robinson e Wilbey (2002) estudaram a coagulação do leite e observaram que normalmente não se faz necessário adicionar quantidades maiores do que 0,02 % (0,002 mol/L) de CaCl_2 para que ocorra o processo satisfatório de coagulação, até mesmo em leites que foram submetidos ao tratamento térmico agressivo. Como visto na Figura 21, a adição de uma menor concentração de CaCl_2 (0,005 mol/L) fez com que ocorresse a coagulação do leite, contudo o processo de coagulação com essa concentração de CaCl_2 foi cerca de 8 vezes mais lento em relação às concentrações de 0,04, 0,05 e 0,06 mol/L.

4. CONCLUSÃO

O *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produziu uma peptidase coagulante com elevada especificidade. O processo de purificação foi relativamente simples e rápido, utilizando somente a cromatografia de troca iônica e obtendo uma enzima considerada pura na análise SDS-PAGE com boas características de estabilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. **In Methods in Enzymology**, v. 19, p. 446-460, 1970.

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

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. São Paulo: Cenage Learning, 2011, 845 p.

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

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.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAN, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1701-1705, 2005.

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

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

NOUANI, A.; BELHAMICHE, N.; SLAMANI, R.; BELBRAOUE, S.; FAZOUANE, F.; BELLAL, M. M. Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization. *International Journal of Dairy Technology*, v. 62, p. 112-117, 2009.

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

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

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

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

SILVA, B. L.; GERALDES, F. M.; MURARI, C. S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and Characterization of a Milk-clotting Protease Produced in Submerged Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Appl Biochem Biotechnol**, v.172, p.1999-2011, 2014.

SUN, Q.; WANG, X. P.; YAN, Q. J.; CHEN, W.; JIANG, Z. Q. Purification and Characterization of a Chymosin from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 174, p. 174-185, 2014.

YEGIN, S.; GOKSUNGUR, Y.; FERNANDEZ-LAHORE, M. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1312-1319, 2012.

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v.46, p. 2137–2143, 2011.

CAPÍTULO 4

**PRODUÇÃO DE QUEIJO MUSSARELA A PARTIR DE COAGULANTE
MICROBIANO PRODUZIDO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELO
FUNGO FILAMENTOSO *Thermomucor indicae-seudaticae* N31**

Bruna Lima da Silva; Maitê Bernardo Correia dos Santos; Diego Alves Monteiro; Vivian Ribeiro Diamantino; Roberto da Silva; Ana Lúcia Barretto Penna.

Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil.

RESUMO

Peptidases coagulantes microbianas estão sendo cada vez mais utilizadas na indústria láctica para produção de queijos. Produzir uma enzima coagulante com elevada Razão (R) entre a atividade coagulante - AC (específica) e atividade proteolítica - AP (inespecífica) tem se tornado o objetivo de muitos estudos, já que a atividade inespecífica pode prejudicar a qualidade do produto final. O presente estudo objetivou produzir queijo mussarela a partir do coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 obtido em fermentação submersa e comparar com um coagulante comercial. A produção da enzima foi feita em Erlenmeyer contendo 4,4 % de farelo de trigo, 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 % de NH_4NO_3 , 150 rpm, pH 5,5, 41 °C durante 96 horas. A concentração foi feita em dialisador tangencial. A produção do queijo mussarela foi realizada com o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (QT) e com um coagulante comercial (QC). Os queijos foram armazenados por um período de 120 dias. As análises de Umidade, Acidez, Gordura, GES, Cinzas, Nitrogênio, Proteína total, NS pH 4.6, NS TCA, Sal, Eletroforese e capacidade de derretimento foram realizadas em períodos específicos ao longo do período de armazenamento. A acidez foi maior no QT enquanto a proteína foi maior no QC em todos os períodos analisados. O NS pH 4.6 e o NS TCA também foram maiores no QT em todos os períodos analisados, exceto no primeiro dia, no qual não foi verificado diferença significativa. Os dois tratamentos não apresentaram diferença em relação ao teor de Umidade, Gordura, GES, Cinzas e Sal. O perfil eletroforético demonstrou que houve maior proteólise no QT. A capacidade de derretimento não diferiu no período do primeiro dia, porém foi maior no QT até o fim da estocagem. Os resultados demonstram

que a renina microbiana do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 pôde ser aplicada na produção do queijo mussarela, resultando em um produto de boa qualidade. Estes resultados sugerem que a peptidase coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 apresenta potencial para aplicação tecnológica.

Palavras-chave: renina microbiana, produção de queijo, fungo.

ABSTRACT

Peptidases microbial coagulants are being increasingly used in the dairy industry for cheese production. Producing a clotting enzyme with high ratio (R) between milk-clotting activity - MCA (specific) and proteolytic activity - PA (non-specific) has become the object of many studies, since non-specific activity may damage the quality of the final product. The present study aimed to produce mozzarella cheese using the milk-clotting enzyme produced by *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in submerged fermentation and compared with a commercial coagulant. The enzyme production was done in Erlenmeyer containing 4.4 % wheat bran, 0.4% (NH₄)₂SO₄, 0.4% MgSO₄.7H₂O and 0.1% NH₄NO₃, 150 rpm, pH 5.5, 41 °C, 96 hours of incubation. Concentration was done in a tangential dialyzer. The production of mozzarella cheese was performed with the coagulant *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (TC) and with a commercial coagulant (CC). The cheeses were stored for a period of 120 days. The analyzes of moisture, acidity, fat, GES, ash, total nitrogen, total protein, NS-pH 4.6, NS-TCA, salt, casein electrophoresis and melting capacity of cheese were performed at specific periods throughout the storage period. The acidity was higher in the TC while the protein was higher in the CC in all periods analyzed. NS-pH 4.6 and NS-TCA were also higher on TC in all the periods analyzed, except on the first day, in which there wasn't significant difference. The two treatments showed no difference in relation to Moisture, Fat, GES, Ash and Salt content. The electrophoretic profile showed that there was more proteolysis in the TC. The melting capacity didn't differ in the period of the first day, but was higher in the TC until the end of the storage. The results demonstrate that the microbial renin of *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 could be applied in the production of mozzarella cheese, resulting in a good quality product. These results suggest that the milk-clotting peptidase of *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 presents potential for technological application.

Key words: renin microbial, cheese production, fungus.

1. INTRODUÇÃO

Peptidases microbianas fazem parte da classe de enzimas responsáveis por hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e peptídeos (RAO et al., 1998), podem ser aplicadas em indústrias de detergentes, couros, laticínios (queijos) e também em aplicações medicinais (KRISHNA et al., 2009).

Vários grupos de micro-organismos são capazes de produzir peptidases, contudo a pesquisa por novas linhagens produtoras de enzimas coagulantes se justifica em função da especificidade e propriedades físico-químicas requeridas para que um coagulante substitua satisfatoriamente a renina do bezerro.

A produção de enzimas coagulantes produzidas por fungos vem aumentando principalmente pelo fato de suas enzimas serem, em sua maioria, extracelulares, facilitando o processo de extração e recuperação do meio de fermentativo (GERMANO et al., 2003).

A produção de enzimas microbianas geralmente é realizada por meio da fermentação no estado sólido (FES) ou por meio da fermentação submersa (FSm). A escolha do tipo de fermentação, condições de produção e composição do meio depende da adaptação fisiológica do micro-organismo. A utilização de resíduos agroindustriais como substrato microbiano é uma alternativa interessante já que, pode-se produzir enzimas com relativa redução de custos no processo.

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades na indústria de laticínios. Para obtenção de queijo de boa qualidade, o método de coagulação, o coalho/coagulante, a cultura lática utilizada e os diferentes tratamentos dados à massa, é que determinam as características organolépticas do produto final (BONATO et al., 2006).

O presente estudo se propõe a aplicar o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 na produção do queijo mussarela e comparar suas características com o queijo mussarela produzido a partir de um coagulante microbiano comercial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e produção da enzima

O micro-organismo utilizado foi o *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, obtido a partir da coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP. O crescimento foi feito em meio Potato Dextrose Agar (PDA), a 45 °C durante 48 horas (pré-inóculo). Após crescimento completo foi preparado a suspensão de esporos, ajustada para que a inoculação nos meios fermentativos fosse de 10^5 esporos/mL. A fermentação submersa foi feita em frascos Erlenmeyer contendo 4 % de farelo de trigo, 0,4 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 % de NH_4NO_3 , pH 5,5, 41 °C durante 96 horas. Após fermentação foi feita a extração a vácuo em papel de filtro, em seguida, o extrato bruto foi centrifugado a 13776 xg por 15 minutos a 5 °C, concentrado em dialisador tangencial com membrana de 10 kDa (até alcançar uma atividade coagulante de aproximadamente 300 U/mL) e congelado.

2.2. Atividade enzimática

2.2.1. Atividade coagulante (AC)

1 mL de solução 10 % (p/v) de leite desnatado (Itambé) acrescido com CaCl_2 0,01 mol/L, foi pré-incubado em banho-maria a 35 °C durante 10 minutos. Em seguida adicionou-se 0,1 mL de solução enzimática e iniciou-se a contagem do tempo. Os tubos de ensaio contendo a mistura reacional foram dispostos sobre suportes rotativos. A formação do coágulo foi observada na parede do tubo de ensaio que rodava continuamente durante o teste em banho-maria termostático para teste de coelho/coagulante MA 470-Marconi, SA.

O tempo em que as primeiras partículas foram formadas foi medido. Uma unidade de coagulação do leite (UAC) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a coagulação de 1 mL de substrato em 40 minutos a 35 °C e foi calculada de acordo com Shata (2005): $\text{UAC} = 2400/t \times S/P$, onde t é o tempo necessário para a formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume da enzima.

2.2.2. Atividade proteolítica (AP)

A AP 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) diluída em tampão acetato 0,2 mol/L pH 5,5; 0,4 mL de tampão acetato 0,2 mol/L pH 5,5 e 0,2 mL de extrato enzimático. A reação ocorreu em banho-maria a 35 °C e ao término de 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Nos controles a solução de TCA 10 % foi adicionada à mistura de reação antes da adição da enzima. As amostras e seus controles foram centrifugados a 11159 xg durante 9 minutos. A leitura da absorbância nos sobrenadantes foi realizada a 280 nm. A atividade proteolítica foi calculada pela equação: $UAP/mL = (\Delta Abs_{280nm} \times 10 \times \text{fator de diluição}) / (E \times t)$, 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.

2.2.3. Razão (AC/AP)

Determinou-se a razão de coagulação dividindo-se a atividade coagulante pela atividade proteolítica, com a fórmula: $R = AC (U/mL) / AP (U/mL)$, onde R é o valor da razão, AC atividade coagulante e AP atividade proteolítica.

2.3. Produção do queijo mussarela

Os queijos foram produzidos, em duplicata de processamentos, com 10 L de leite pasteurizado integral (Crioulo) fornecido pela ETEC Padre José Nunes Dias, 0,05 % de cloreto de cálcio, 0,0033% de cultura láctica de *Streptococcus thermophilus* - STI-12 e coagulante (Queijo T – enzima obtida por fermentação submersa pelo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e Queijo C – enzima quimosina CHYMAX extra 570 IMCU a produzida por *Aspergillus niger* var. *awamori* da Chr. Hansen) o suficiente para coagular entre 45 e 55 minutos.

Após o recebimento do leite, as embalagens foram higienizadas. Os queijos foram produzidos na Planta Piloto do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, IBILCE - UNESP, em tanque de aço inoxidável, com capacidade para aproximadamente 25 L. Inicialmente foi feito o aquecimento do leite a 42 °C, em seguida foram adicionados os ingredientes cloreto de cálcio, cultura láctica pré-

solubilizada e coagulante líquido. Após repouso e coagulação, a coalhada foi cortada, promovendo a formação de grãos de 1,0 a 1,5 cm de aresta. Foi efetuada a mexedura, a medida que os grãos se tornaram mais firmes foi aumentada a velocidade de agitação, até completar 10 a 15 minutos. Após repouso de 5 minutos foi feito o dessoramento da massa. Posteriormente, a massa foi transferida para formas perfuradas para a saída do soro, para a compactação e retirada de soro remanescente. A fermentação (descanso) foi realizada a 41 °C até atingir o ponto de filagem, pH da massa entre 4,8 e 5,0. A filagem foi feita com água quente a 75 – 80°C. Após a filagem a massa foi colocada em formas, onde permaneceu em repouso durante 10 a 15 minutos. Posteriormente, foi resfriada em banho de gelo (4 °C), cortada em tamanhos equivalentes e transferida para a salmoura 18 % (12 °C), onde permaneceu durante 30 minutos. Para a conservação, foi feita uma imersão em solução de sorbato de potássio 10 % durante 1 minuto. Em seguida, os queijos foram armazenados em câmara fria (12 °C) por 12 a 15 horas para que ocorresse a secagem e após este período foram embalados a vácuo e armazenados sob refrigeração a 4 °C por até 120 dias.

2.4. Caracterização físico-química dos queijos

Foram avaliadas as características físico-químicas do queijo produzido com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 e do queijo produzido com o coagulante comercial. As análises foram realizadas em triplicata. O teor de umidade foi determinado em estufa à vácuo (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1985).

A acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N usando fenolftaleína como indicador (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997). O teor de gordura (G) foi determinado pelo método de Gerber com butirômetro para queijo (BRASIL, 2006) e o teor de gordura no extrato seco (GES) foi calculado através da fórmula: $\% \text{ GES} = (G / \text{EST}) \times 100$. O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O teor de nitrogênio (N) total foi determinado pelo método de Kjeldahl, em seguida foi calculado o teor de proteína total (PT) multiplicando-se o valor do nitrogênio total pelo fator 6,38 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1997). O teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) ou nitrogênio não caseico (NNC) foi determinado pela dosagem do nitrogênio total no filtrado obtido após precipitação isoelétrica das caseínas (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL

CHEMISTS - AOAC, 1997). O teor de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12% (NS TCA) ou nitrogênio não proteico (NNP) foi determinado pela dosagem de nitrogênio total no filtrado obtido após precipitação da totalidade das proteínas em presença de TCA 12% (AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1997). O teor de sal foi determinado pelo método de doseamento nas cinzas (SILVA et al., 1997).

2.5. Capacidade de derretimento dos queijos mussarela

A capacidade de derretimento foi determinada pelo método de Schreiber conforme descrito por Kosikowski; Mistry (1997), com modificações, após 1, 60 e 120 dias de armazenamento. As análises foram realizadas em quadruplicatas.

O teste para verificar a capacidade de derretimento dos queijos mussarela consistiu da retirada de fatias de 2,2 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura da peça de queijo. Cada fatia foi colocada em uma placa de Petri, devidamente dividida em 8 áreas iguais. Em seguida, as placas foram colocadas a 180 °C por 7 min. Posteriormente, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 min e os diâmetros de cada amostra foram medidos e comparados com o diâmetro inicial.

A capacidade de derretimento de cada queijo é dada pela média dos valores obtidos de cada fatia da amostra. Foi expressa pelo aumento do diâmetro da fatia de queijo após aquecimento. A capacidade de derretimento foi calculada de acordo com a equação 1:

$$CD (\%) = (Df - Di / Di) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde: CD é a capacidade de derretimento; Df é o diâmetro médio final; Di é o diâmetro médio inicial.

2.6. Perfil eletroforético das proteínas presentes na matriz dos queijos

Para avaliação do efeito da proteólise do coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 no queijo mussarela, foi realizado o estudo das frações de caseína por meio da análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (Urea – PAGE), conforme Fox e McSweeney (1998). As amostras foram coletadas após 1, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de

armazenamento e congeladas para posterior avaliação. A análise foi realizada nas amostras de QT e QC, com a utilização de uma cuba de eletroforese vertical, Mini Protean 3 Cell (Bio Rad). As amostras para análise de eletroforese foram preparadas dissolvendo-se 20 mg de amostra em 1 mL de tampão, preparado a partir de 1,50 g de tris-hidroximetil aminometano (TRIS) e 84 g de ureia em 150 mL de água destilada, adicionado de ácido clorídrico até pH 6,7, para um volume final de 200 mL. As amostras foram aquecidas a 37 °C por 1 hora, após, foi adicionado 5 µL de β-mercaptoetanol, seguido de aquecimento a 37 °C por 45 minutos, e por fim, foi adicionada uma pequena quantidade de azul de bromofenol. Para a separação das frações, 10 µL das amostras e do padrão de caseinato de sódio foram aplicados no gel, utilizando-se tensão de 100 V, até o corante azul de bromofenol atingir o final do gel, aproximadamente, 5 horas. Os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250, por 24 h e descorados com solução descorante (água destilada, etanol e ácido acético – 6:3:1).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do leite pasteurizado utilizado na fabricação dos queijos

Para a fabricação de queijos, o leite deve ser de boa qualidade, apresentando-se livre de contaminação bacteriana, química ou física, já que alguns casos de contaminação podem influenciar ou inibir a coagulação bem como alterar o tempo de maturação dos queijos devido a alterações na microbiota láctica (PERRY, 2004).

A caracterização do leite utilizado para a produção dos queijos foi determinada através da aplicação de ultrassom nas amostras, com a utilização do equipamento Ekomilk-M Ultrasonic Milk Analyzers (Bulteh 2000 Ltda., Stara – Zagora, Bulgária).

A tabela 1 mostra a composição físico-química do leite pasteurizado usado no processamento dos queijos.

Tabela 1. Caracterização físico-química do leite pasteurizado utilizados na produção dos queijos.

Análises	Leite
Gordura (%)	3,87 ± 0,03
SNG (%)	8,79 ± 0,00
Densidade (g/cm ³)	1,03 ± 0,00
Água (%)	0,00 ± 0,00
Crioscopia	-0,542 ± 0,00
Proteína (%)	3,22 ± 0,00

* SNG: Sólidos não gordurosos.

3.2. Composição centesimal dos queijos mussarela

A tabela 2 mostra os resultados da caracterização físico-química dos queijos mussarela produzidos com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 e com o coagulante comercial, durante o período de 1 dia de armazenamento.

A tabela 3 mostra os resultados das análises de umidade, acidez, nitrogênio, proteína, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA dos queijos mussarela produzidos com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 e com o coagulante comercial, durante o período de 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento.

Tabela 2. Composição dos queijos mussarela feito com o coagulante do *T. indicaseudaticae* N31 (QT) e com o coagulante comercial (QC) durante o período de 1 dia de armazenamento.

Análises	Processo	Período de armazenamento (dia)
Umidade %	QT	50,04 ^a ± 0,39
	QC	50,13 ^a ± 0,25
Acidez %	QT	0,50 ^a ± 0,04
	QC	0,37 ^b ± 0,01
Gordura %	QT	17,10 ^a ± 1,34
	QC	15,90 ^a ± 0,89
GES %	QT	34,29 ^a ± 2,51
	QC	31,23 ^a ± 1,93
Cinzas %	QT	3,32 ^a ± 0,03
	QC	3,40 ^a ± 0,07
Nitrogênio %	QT	4,31 ^b ± 0,18
	QC	4,56 ^a ± 0,06
Proteína total %	QT	27,50 ^b ± 1,17
	QC	29,12 ^a ± 0,38
NS pH 4.6	QT	0,13 ^a ± 0,07
	QC	0,12 ^a ± 0,07
NS TCA	QT	0,04 ^a ± 0,01
	QC	0,04 ^a ± 0,02
Sal	QT	0,62 ^a ± 0,31
	QC	0,56 ^a ± 0,07

^{a, b} Letras iguais na mesma coluna para cada análise não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). * SNG: Sólidos não gordurosos. *NS pH 4,6: nitrogênio solúvel em pH 4,6. *NS TCA: nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético

Tabela 3. Composição dos queijos mussarela feito com o coagulante do *T. indiciae-seudaticae* N31 (QT) e com o coagulante comercial (QC) durante o período de 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento.

Análises	Processo	Período de armazenamento (dia)				
		15	30	60	90	120
Umidade %	QT	49,99 ^a ± 0,47	49,17 ^a ± 0,72	48,93 ^a ± 0,21	47,86 ^a ± 0,24	48,43 ^a ± 0,22
	QC	49,28 ^a ± 0,85	48,23 ^a ± 1,42	48,62 ^a ± 0,06	47,84 ^a ± 0,24	48,14 ^a ± 0,27
Acidez %	QT	0,60 ^a ± 0,01	0,60 ^a ± 0,02	0,83 ^a ± 0,00	1,10 ^a ± 0,06	1,39 ^a ± 0,02
	QC	0,34 ^b ± 0,01	0,30 ^b ± 0,04	0,34 ^b ± 0,01	0,33 ^b ± 0,02	0,34 ^b ± 0,02
Nitrogênio %	QT	4,18 ^b ± 0,08	4,35 ^b ± 0,28	4,32 ^b ± 0,05	4,39 ^b ± 0,25	4,25 ^b ± 0,08
	QC	4,77 ^a ± 0,38	4,70 ^a ± 0,10	4,73 ^a ± 0,31	4,75 ^a ± 0,15	4,60 ^a ± 0,20
Proteína total %	QT	26,67 ^b ± 0,48	27,75 ^b ± 1,80	27,54 ^b ± 0,30	28,01 ^b ± 1,58	27,14 ^b ± 0,54
	QC	30,44 ^a ± 2,43	29,98 ^a ± 0,63	30,20 ^a ± 2,00	30,33 ^a ± 0,93	29,37 ^a ± 1,28
NS pH 4,6	QT	0,15 ^a ± 0,01	0,19 ^a ± 0,02	0,36 ^a ± 0,02	0,41 ^a ± 0,01	0,48 ^a ± 0,05
	QC	0,13 ^b ± 0,00	0,13 ^b ± 0,01	0,24 ^b ± 0,02	0,32 ^b ± 0,01	0,41 ^b ± 0,05
NS TCA	QT	0,04 ^a ± 0,01	0,03 ^a ± 0,00	0,07 ^a ± 0,02	0,08 ^a ± 0,01	0,11 ^a ± 0,02
	QC	0,02 ^b ± 0,00	0,02 ^b ± 0,00	0,03 ^b ± 0,02	0,05 ^b ± 0,01	0,07 ^b ± 0,01

^{a, b} Letras iguais na mesma coluna para cada análise não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). * SNG: Sólidos não gordurosos. *NS pH 4,6: nitrogênio solúvel em pH 4,6. *NS TCA: nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético

Os teores de umidade, gordura, GES, cinzas, NS pH 4,6, NS TCA e teor de sal de QT e QC foram consideradas estatisticamente iguais ao nível de 5% de significância (Tabela 2). Além disso, todos os queijos produzidos encontram-se de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijos, uma vez que, o queijo Mussarela é classificado como um queijo de média, alta ou muito alta umidade, devendo possuir um teor de umidade no máximo de 60 % (BRASIL, 1997).

A acidez de QT, no primeiro dia após o processamento, foi estatisticamente maior ao nível de 5% de significância do que a acidez de QC. Já o teor de nitrogênio e proteína total, no primeiro dia após o processamento, foram estatisticamente maiores ao nível de 5% de significância no QC.

Ao longo do período de armazenamento (15, 30, 60, 90 e 120 dias) foram realizadas as análises do teor de umidade, acidez, nitrogênio total, proteína total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6), nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12% (NS TCA) e perfil eletroforético.

A partir dos resultados obtidos na tabela 2, pôde-se verificar que teor de umidade entre o queijo T e queijo C não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) ao longo de todos os períodos de armazenamento avaliados. A acidez do queijo T foi estatisticamente maior, ao nível de significância de 5 %, em relação ao queijo C em todos os períodos avaliados. Além disso, pôde-se observar que houve um aumento da acidez ($p \leq 0,05$) do queijo T ao longo do período de armazenamento. Foi observado que o queijo C apresentou maior teor de nitrogênio e proteína total ($p \leq 0,05$) do que o queijo T em todos os períodos analisados. Durante o período de estocagem, foi observado um aumento dos teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% , em ambos os queijos mussarela (QT e QC), em razão da proteólise natural. Porém, quando foi comparado o teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% entre as amostras de QT e QC, foi observado que em todos os períodos avaliados houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), sendo que o QT apresentou maior teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% do que o QC. Porém, como era de se esperar, no primeiro dia de armazenamento, as amostras de QT e QC não diferiram significativamente ($p > 0,05$) quanto ao processo de proteólise.

Apesar do coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 ter apresentado satisfatórios índices de especificidade, houve uma proteólise mais intensa na amostra QT. Porém, este resultado já era esperado, uma vez que enzimas microbianas (brutas) apresentam menor especificidade, quando comparadas às enzimas microbianas comerciais.

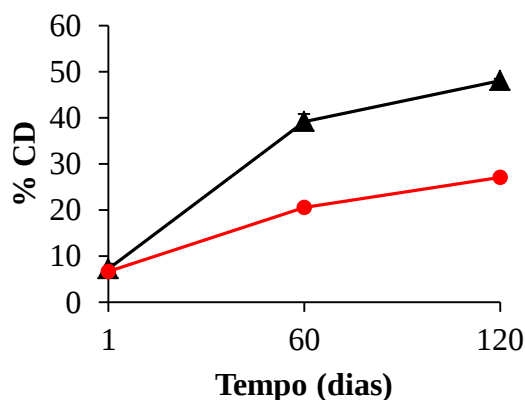
De acordo com os dados mostrados na tabela 2, os queijos mussarela apresentaram, de uma forma geral, resultados estatisticamente diferentes para algumas análises, porém essa diferença, do ponto de vista tecnológico, não se mostrou limitante, indicando que a produção de queijo mussarela com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 pode ser executada.

3.3. Capacidade de derretimento dos queijos mussarela

O coagulante residual afeta o tipo e nível de proteólise durante a maturação, e consequentemente 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).

A capacidade de derretimento foi observada após 1, 60 e 120 dias de armazenamento. As figuras 1 e 2 mostram como foi o perfil de derretimento dos queijos T e C ao longo do período de armazenamento.

Figura 1. Porcentagem da capacidade de derretimento durante o período de armazenamento dos queijos fabricados com a protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (▲) e com o coagulante comercial (●).



Houve um aumento da capacidade de derretimento tanto no queijo produzido com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 como no queijo produzido com o coagulante comercial ao longo do período de armazenamento (Figura 1).

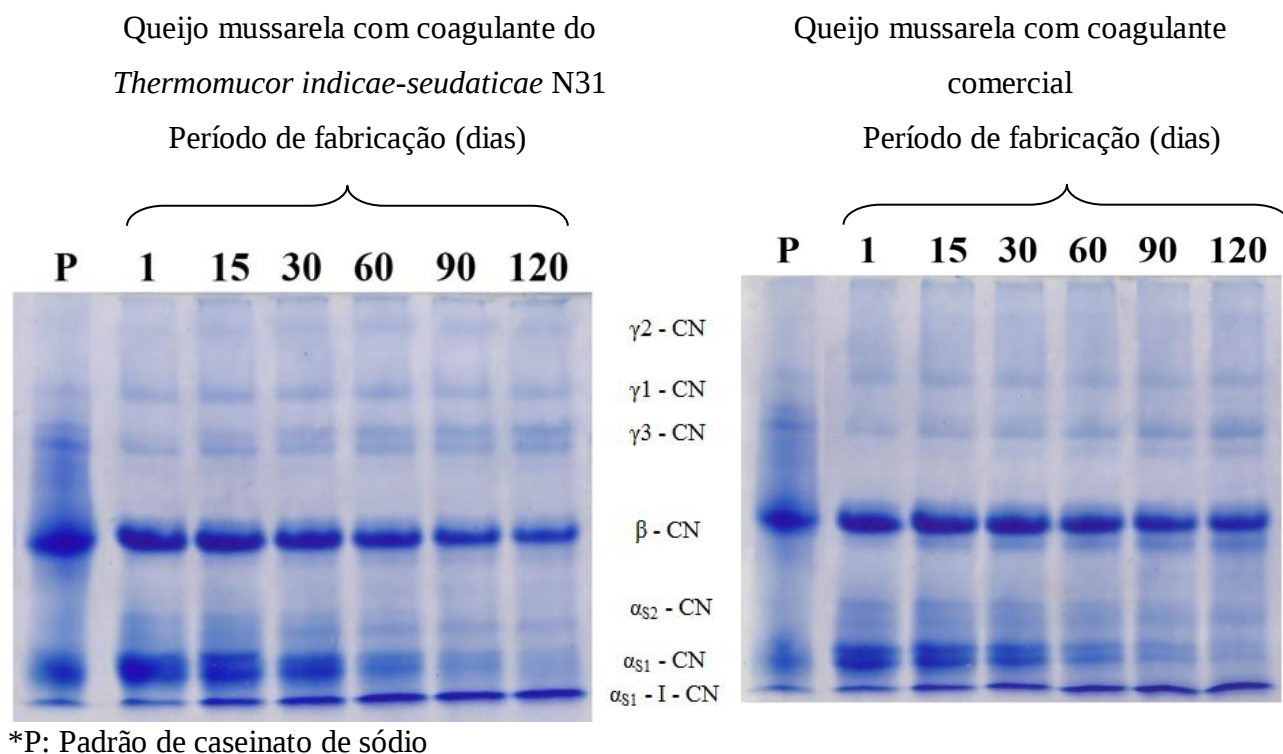
Após o primeiro dia de processamento as amostras de QT e QC não apresentaram diferença significativa ao nível de significância de 5 %. Porém, nos períodos de 60 e 120 dias de armazenamento houve diferença significativa $p \leq 0,05$ entre as amostras de QT e QC, sendo que os QT apresentaram maior capacidade de derretimento do que os QC.

O fato do QT ter apresentado maior capacidade de derretimento em relação ao QC pode ser explicado pela proteólise mais intensa, resultado apresentado na tabela 2 e na figura 2.

3.4. Perfil eletroforético das proteínas presentes na matriz dos queijos

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida UREA-PAGE (Figura 3) representa a proteólise dos queijos produzidos com o coagulante do *T. indicae-seudaticae* N31 e com o coagulante comercial. A análise foi realizada para o queijo T e C após 1, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento.

Figura 2. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (UREA-PAGE) dos queijos mussarela produzidos com o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e com o coagulante comercial nos períodos de 1, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de fabricação.



Em geral, foi possível observar pequenas diferenças no perfil eletroforético da caseína no queijo T e no queijo C até o 30º dias de fabricação. Após esse período, foi observado que a fração β -caseína e a α_{s1} -caseína foram hidrolisadas e houve o aparecimento mais intenso da α_{s1-I} -caseína e da γ_3 -caseína, com maior intensidade no queijo T do que no queijo C. A α_{s1-I} -caseína é originada, pois o coagulante residual que permanece nos queijos hidrolisa, nos estágios iniciais de maturação, a ligação entre os aminoácidos Phe23 e Phe24 da α_{s1} -caseína (FOX; McSWEENEY, 1998).

A análise do perfil eletroforético dos queijos produzidos com o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e coagulante comercial corrobora com os resultados obtidos nas análises do teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e teor de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12%, onde observou-se uma maior proteólise da amostra QT do que em QC.

4. CONCLUSÃO

A produção do queijo tipo mussarela com o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi satisfatória, comprovando o potencial tecnológico desta peptidase.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. Compendium of methods for the examination of foods. 3. ed. Washington: Edwards Brothers, Ann Arbor, 1219 p, 1992.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. Biotecnologia industrial. São Paulo: Blucher, 2001, v. 4.

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

BONATO, É. P.; HELENO, G. J. B.; HOSHINO, N. A.; JÚNIOR, A. F.; **Leites fermentados e queijos**. Florianópolis, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. SDA/DIPOA. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo mozzarella (muzzarella ou mussarela). Portaria nº 364 de 4 de setembro de 1997. Brasília, 1997. 6 p.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Chapman & Hall, 1998, 478 p.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, fev. 2003.

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.

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

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

KRISHNA K, V.; GUPTA, M.; GUPTA, N.; GAUDANI, H.; TRIVEDI, S.; PATIL, P.; GUPTA, G.; KHAIRNAR, Y.; BORASATE, A.; MISHRA, D. Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. **International Journal of Microbiology Research**, p. 14-18, ISSN: 0975-5276, 2009.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

SILVA, P. H. F.; PEREIRA, D. D. C.; OLIVEIRA, L. L. COSTA JUNIOR, L. C. G. Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos. Juiz de Fora: Oficina de Impressão, 1997.

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

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES GERAIS

A. Com a aplicação do Plackett-Burman e Doehlert design para a atividade coagulante foi possível obter resultados entre 10,46 a 122 U/mL, um aumento em torno de 11,66 vezes após otimização.

B. A peptidase coagulante foi produzida a partir de farelo de trigo como substrato pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em fermentação submersa tanto em escala laboratorial como por meio da utilização de biorreator, permitindo a possibilidade de produção em maior escala. Além disso, esta peptidase apresentou elevada especificidade e considerável estabilidade em relação às sucessivas variações na temperatura de armazenamento, sugerindo uma maior vantagem durante a manipulação.

C. O *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produziu uma peptidase coagulante com elevada especificidade, demonstrando potencial como substituto do coalho tradicional. O processo de purificação foi relativamente simples e rápido, utilizando somente a cromatografia de troca iônica e obtendo uma enzima considerada pura na análise SDS-PAGE com boas características de estabilidade.

D. O *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 produziu uma peptidase coagulante em fermentação submersa com elevada especificidade, demonstrando elevado potencial como substituto do coalho tradicional. A produção do queijo tipo mussarela com o coagulante do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 foi satisfatória, comprovando o potencial tecnológico desta peptidase.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 17/04/2017

Bruna Lima da Silva

Assinatura do autor