



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

Fernanda Martucci Gerales

Caracterização bioquímica e funcional da ação da peptidase de
Thermomucor indicae-seudaticae N31 sobre a caseína

São José do Rio Preto

2013

Fernanda Martucci Gerales

Caracterização bioquímica e funcional da ação da peptidase de
Thermomucor indicae-seudaticae N31 sobre a caseína

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – 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

São José do Rio Preto

2013

Fernanda Martucci Gerales

Caracterização bioquímica e funcional da ação da peptidase de
Thermomucor indicae-seudaticae N31 sobre a caseína

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – 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.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Hamilton Cabral
USP – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodríguez
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

23 de agosto de 2013

“A persistência é o caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

A Deus, na sua imensa misericórdia em nos conceder a vida e a oportunidade de fazer aquilo que gostamos;

Ao professor Roberto da Silva, por não medir esforços no desenvolvimento deste trabalho e na sua paciência em transmitir seus conhecimentos;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do IBILCE-UNESP, por todo conhecimento compartilhado;

A CAPES, pelo auxílio financeiro;

A todos os colegas do laboratório que tornam o laboratório um lugar agradável para trabalhar;

A amiga Angélica, pela amizade, orientações e por ter me ajudado durante a purificação;

Aos amigos Bruna, Diego, Pedro, Priscila e Raísa pela amizade sincera, pelas longas conversas e por toda a força que sempre me deram;

A amiga Marina, pela amizade e apoio desde o início do mestrado;

Ao meu pai, José Carlos, exemplo de amor e dedicação a mim e minha irmã Aline, sendo praticamente pai e mãe ao mesmo tempo. Obrigada por tudo;

A minha mãe Maria (*in memorian*), que mesmo não estando aqui, sei que guia meus passos em todos os momentos de minha vida;

A minha irmã Aline, amiga, confidente e companheira de todos os momentos;

A minha tia Evanira, por estar presente em todos os momentos de minha vida;

Ao meu noivo, Marcos, por todo amor e apoio durante essa etapa de minha vida;

A toda minha família, avós, tios, primos que sempre estão ao meu lado me dando forças;

A todos que tornaram a realização deste trabalho possível.

RESUMO

Peptidases são enzimas responsáveis por realizar a clivagem de ligações peptídicas de outras proteínas e peptídeos. Essas enzimas apresentam grande importância, pois são utilizadas em vários segmentos industriais, desde a indústria alimentícia até mesmo no processamento de couro e pele e formulações de medicamentos. Uma das principais aplicações das peptidases é nos laticínios, na produção de queijo, que inicialmente envolve a coagulação das caseínas do leite pela ação de enzimas proteolíticas coagulantes, sendo a renina a principal delas. Enzimas microbianas coagulantes de leite são peptidases aspárticas que catalisam a coagulação do leite, substituindo o coalho de vitelo. Em trabalhos anteriores foi isolado o fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 que produziu em fermentação em estado sólido (FES), uma peptidase com capacidade de hidrolisar a κ -caseína do leite e produzir coágulo de boa qualidade. Entretanto, sua caracterização funcional e especificidade de ação ainda não estão claras. Assim, neste estudo, deu-se continuidade à investigação de estrutura e ação desta enzima coagulante. Foi realizado o monitoramento da hidrólise enzimática da caseína por cromatografia líquida de alta eficiência, foi feita análise da especificidade primária da peptidase utilizando substrato de fluorescência da série Abz-LSFMAIQ-EDDnp e foi determinada a sequência primária da proteína por espectrometria de massas. O monitoramento da hidrólise enzimática da caseína por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou que o perfil do extrato bruto de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 apresenta alta similaridade com as enzimas comerciais das marcas Bela-Vista e Chr-Hansen obtidas dos fungos *Rhizomucor miehei* e *Aspergillus niger*, respectivamente. A análise de especificidade primária da peptidase demonstrou alta especificidade e afinidade pelo substrato sintético. A determinação do sítio de clivagem evidenciou a hidrólise de 46% entre a ligação dos aminoácidos fenilalanina e metionina e 54% entre a alanina e isoleucina, o que resulta em para- κ -caseínas muito semelhantes. A sequência primária desta peptidase apresenta elevada similaridade com a peptidase coagulante do fungo *Rhizomucor pusillus*. Esse conjunto de resultados confirma a peptidase coagulante de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 como substituto de coalho.

Palavras-chave: *Thermomucor indica-seudaticae* N31. Cinética enzimática.
Hidrólise da caseína. Fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

*Peptidase enzymes are responsible for catalyze the cleavage of peptide bonds of other proteins. These enzymes present great importance, therefore, are used in several industrial segments, since the food industry even in the processing of leather and formulations of medicinal products. One major application of peptidases is in the dairy industry for cheese production, which initially involves clotting of milk caseins by the action of coagulant proteolytic enzymes being rennin the main one. Microbial rennet-like milk-clotting enzymes are aspartic proteinases that catalyze milk coagulation, substituting calf rennet. In previous study it was isolated a thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 that produced on Solid State Fermentation (SSF), a peptidase with capacity to hydrolyses the k-casein of milk and produce good quality curd. However its functional characterization and specificity of action is not clear yet. Thus, in this study we continued the investigation of structure and action of this enzyme coagulant. Was carried out the monitoring of enzymatic hydrolysis of casein by high performance liquid chromatography-reverse phase, was analyzed the specificity of primary peptidase using substrate of fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide series Abz-LSFMAIQ-EDDnp and determined the primary sequence of the protein by mass spectrometry. Monitoring the enzymatic hydrolysis of casein by high performance liquid chromatography-reverse phase showed that the crude extract *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 shows high similarity with commercial enzymes brands Bela-Vista and Chr-Hansen obtained from fungi *Rhizomucor miehei* and *Aspergillus niger*, respectively. The analysis of primary peptidase specificity demonstrated high specificity and affinity for the synthetic substrate. The determination of the cleavage site showed 46% hydrolysis of the bond between the amino acids phenylalanine and methionine and 54% between alanine and isoleucine resulting in para-k-casein very similar. The primary sequence of this peptidase has high similarity with the coagulant peptidase fungus *Rhizomucor pusillus*. This set of results confirms the coagulant peptidase *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as a substitute for rennet.*

Keywords: Thermomucor indicae-seudaticae N31. enzyme kinetics. Hydrolysis of casein. Solid state fermantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Modelo esquemático da micela de caseína.	20
Figura 2 –	Representação esquemática da união de duas submicelas pelo fosfato de cálcio coloidal (CCP).	22
Figura 3 –	Processos ocorridos durante a coagulação do leite.	24
Figura 4 –	Representação de um polipeptídeo interagindo com o sítio ativo de uma peptidase.....	30
Figura 5 –	Representação de supressão e emissão de fluorescência dos substratos sintéticos (FRET).	31
Figura 6 –	Precipitação do leite com adição de 0,25 M de CaCl ₂	45
Figura 7 –	Perfis de eluição da peptidase de <i>T. indicae-seudaticae</i> N31 durante a purificação.	46
Figura 8 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) de enzima purificada.....	47
Figura 9 –	Perfil de eluição em CLAE-FR da caseína íntegra e hidrolisada	49
Figura 10 –	Sobreposição dos cromatogramas de hidrólise da caseína pelo extrato bruto do fungo <i>T. indicae-seudaticae</i> N31 e pela enzima comercial <i>Rhizomucor miehei</i> (Bela Vista).	50
Figura 11 –	Sequência primária da renina de <i>Rhizomucor pusillus</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Influência da alimentação e da idade na proporção (%) de quimosina e pepsina em extrato de abomaso bovino.	26
Tabela 2 – Concentração dos eluentes A e B utilizados para a eluição das amostras por CLAE-FR	37
Tabela 3 – Valor da atividade coagulante, proteolítica e razão entre as atividades (R)	41
Tabela 4 – Análise de gordura, sólidos não gordurosos, proteínas, acidez e pH dos leites utilizados para mensuração da atividade coagulante	42
Tabela 5 – Atividade coagulante (U/mL) dos diferentes tipos de leite em relação às diferentes concentrações de cloreto de cálcio (molar).	43
Tabela 6 – Área dos picos formados durante a eluição da caseína hidrolisada por extrato bruto e enzima purificada de <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31 e por enzimas comerciais produzidas por <i>Rhizomucor. miehei</i> e <i>Aspergillus Níger</i>	50
Tabela 7 – Parâmetros cinéticos da peptidase coagulante do fungo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.	52
Tabela 8 – Pontos de clivagem do substrato sintético Abz-LSFMAIQ-EDDnp pela peptidase coagulante do fungo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31.	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Efeito da adição de CaCl_2 na atividade coagulante	44
Gráfico 2 –	Curva de Michaelis-Menten obtida da interação entre peptidase de TS-I e substrato sintético	52
Gráfico 3 –	Pseudo de primeira ordem da peptidase coagulante de <i>T. indicaseudaticae</i> N31 com os substratos sintéticos de sequência Abz-HPHLSFMAIPPKQ-EDDnp e Abz-LSFMAIQ-EDDnp	53

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Alanina
Abz	ácido orto-aminobenzóico
AC	Atividade coagulante
AP	Atividade proteolítica
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCP	Fosfato de cálcio coloidal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RP)
EDDnp	etilenodiamondinitro-fenil
F	Fenilalanina
FES	Fermentação em estado sólido
FSm	Fermentação submersa
I	Isoleucina
Ile	Isoleucina
IN 51	Instrução normativa n° 51
K _m	Constante de Michaelis-Menten
k _{cat} /K _m	Eficiência catalítica
L ou Leu	Leucina
M ou Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
R	Razão AC/AP
S ou Ser	Serina
SNG	Sólidos não gordurosos
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TI-S	<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31
UAC	Unidade de atividade coagulante
UAP	Unidade de atividade proteolítica
UV	Ultravioleta
V _{Max}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1 Introdução	15
2 Objetivos	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 Revisão bibliográfica	18
3.1 Classificação das peptidases	18
3.2 Fermentação em estado sólido	18
3.3 Caseína	20
3.4 Coagulação do leite	22
3.4.1 Coagulantes	24
3.4.2 Coalho	25
3.4.3 Importância da especificidade da peptidase	27
3.5 Adição de cálcio	29
3.6 <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	29
3.7 Substrato sintético com supressão intramolecular de fluorescência	30
4 Material e métodos	32
4.1 Micro-organismo	32
4.2 Inoculo	32
4.3 Meios de fermentação	32
4.4 Extração enzimática	32
4.5 Atividade proteolítica	33
4.6 Atividade coagulante	33
4.7 Matéria prima: diferentes amostras de leite	34
4.8 Análise de gordura, sólidos não gordurosos, proteínas, pH e acidez dos diferentes amostras de leites	34
4.9 Determinação da atividade coagulante em diferentes amostras de leite	34
4.10 Purificação da peptidase coagulante	34
4.10.2 Cromatografias	35
4.10.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)	36
4.11 Monitoramento da atividade proteolítica durante a degradação da caseína: hidrólise enzimática da caseína e CLAE-FR	36
4.12 Estudos de cinética enzimática	37

4. 12. 1 Determinação da concentração molar da peptidase coagulante purificada..	37
4.12.2 Determinação da especificidade da peptidase isolada do fungo <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	38
4.13 Determinação dos sítios de clivagem	38
4.14 Determinação de sequência primária da peptidase por espectrometria de massas	39
5 Resultados e discussão.....	41
5.1 Produção enzimática	41
5.2 Análise de gordura, sólidos não gordurosos, proteínas, acidez e pH de diferentes amostras de leite.....	41
5.4 Purificação da peptidase coagulante	45
5.5 Monitoramento da atividade proteolítica durante a degradação da caseína: hidrólise enzimática da caseína e CLAE-FR.....	47
5.6 Estudos de cinética enzimática.....	51
5.7 Determinação dos sítios de clivagem	55
5.8 Determinação de sequência primária da peptidase por espectrometria de massas	56
6 Conclusão	58
7 Referências bibliográficas	59

1 Introdução

Peptidases, também conhecidas como enzimas proteolíticas, são responsáveis por catalisar a clivagem de ligações peptídicas de peptídeos e proteínas (RAO et al., 1998). As peptidases constituem uma das classes de enzimas comerciais mais importante, constituindo aproximadamente 65% do total de enzimas utilizadas na indústria (FERRACINI-SANTOS; SATO, 2009). Elas são utilizadas em diversos segmentos da indústria, como no processamento de alimentos, bebidas, formulações de detergentes, processamento de couro e pele, amaciamento de carnes, formulações de medicamentos e indústria têxtil (FERRACINI-SANTOS; SATO, 2009; LADEIRA et al., 2010; NASCIMENTO; MARTINS, 2004).

As peptidases podem ser obtidas a partir de bactérias, fungos, leveduras, tecidos de mamíferos e de plantas. Porém, atualmente, a maior parte de peptidases comerciais é proveniente de bactérias do gênero *Bacillus*, que produzem quantidades substanciais de peptidase extracelular (LADEIRA et al., 2010). A quantidade e tipo de peptidase que será produzida a partir de micro-organismos dependem tanto da natureza das cepas quanto do meio de crescimento (NADEEM; QAZI; BAIG, 2010).

A estabilidade térmica é um requisito importante para as enzimas comerciais, pois a desnaturação pelo calor é uma causa comum da inativação de enzimas (LI; YANG; SHEN, 1997). Organismos termofílicos produzem enzimas termofílicas, as quais apresentam variadas aplicações, o que justifica o isolamento e estudo das enzimas de novas cepas (MARTIN et al., 2010). Grande parte dos estudos de peptidases é proveniente de bactérias termofílicas do gênero *Bacillus* e *Thermus*, sendo que os estudos das enzimas de fungos termofílicos são limitados (LI; YANG; SHEN, 1997).

O interesse em peptidases microbianas vem crescendo devido à impossibilidade das peptidases derivadas de plantas e animais atenderem as demandas mundiais. Os micro-organismos representam uma excelente fonte de enzimas, pois estes apresentam ampla diversidade bioquímica e também suscetibilidade à manipulação genética (RAO et al., 1998). Devido à manipulação genética, podem ser geradas novas enzimas com propriedades alteradas, o que é desejável para suas diversas aplicações. Além disso, os micro-organismos

apresentam rápido crescimento e pequeno espaço de cultivo (NAJAFI; DEOBAGKAR; DEOBAGKAR, 2005).

Os fungos são capazes de sintetizar maior variedade de enzimas que as bactérias, por exemplo, o *Aspergillus oryzae* produz peptidases ácidas, neutras e alcalinas. No entanto, estas peptidases apresentam menor taxa de reação e são menos tolerantes ao calor do que as peptidases de *Bacillus* (RAO et al., 1998).

A coagulação do leite requer muita atenção, pois é uma etapa fundamental durante a fabricação de queijo. Sendo assim, devido à redução da oferta mundial do coalho convencional e o aumento da produção e consumo de queijos, vem sendo estimuladas novas pesquisas para encontrar enzimas microbianas adequadas como substitutos deste coalho (SHIEH; THI; SHIH, 2009).

Em estudos realizados com *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (TI-S), foi observado que o extrato enzimático obtido (após 24 horas) por fermentação em estado sólido com farelo de trigo produziu coágulo de boa qualidade e queijo similar ao obtido por enzima comercial (MERHEB-DINI et al., 2010). O presente estudo é uma continuidade do trabalho de Merheb-Dini (2010) visando compreender melhor a ação da enzima por meio de sua caracterização bioquímica e funcional.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterização bioquímica e funcional da ação da peptidase de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 sobre a caseína.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir extrato enzimático bruto contendo peptidase coagulante, por meio de fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31;
- Purificar a peptidase coagulante a partir do extrato enzimático;
- Analisar o padrão de hidrólise das frações de caseína para caracterizar a especificidade desta peptidase;
- Determinar a especificidade primária da peptidase coagulante utilizando substrato sintético de supressão intramolecular de fluorescência.
- Comparação da peptidase coagulante com enzimas comerciais.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Classificação das peptidases

Peptidases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas de uma molécula de proteína e peptídeos (SANDHYA et al., 2005).

De acordo com a classificação da Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as peptidases encontram-se na classe 3 (hidrolases), mais especificamente, no subgrupo 4. Porém, as peptidases não cumprem facilmente o sistema geral de nomenclatura de enzimas, pois apresentam uma enorme diversidade funcional e estrutural, sendo classificadas com base em três critérios principais: tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e a relação da evolução da estrutura primária (RAO et al., 1998).

Quanto ao local de ação sobre os substratos, as peptidases são divididas em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases (RAO et al., 1998). As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região C ou N terminal. Aquelas atuantes na região N terminal podem liberar um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases), enquanto as exopeptidases, as quais atuam na região C terminal, podem liberar um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases). Já as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, ou seja, entre as regiões N e C terminal, pois a presença de grupos amino ou carboxila livres apresenta efeito negativo na atividade dessa peptidase (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2010).

3.2 Fermentação em estado sólido

Fermentação em estado sólido (FES) é um processo em que micro-organismos se desenvolvem em substratos sólidos, na ausência de água livre e na presença de umidade suficiente para proporcionar o crescimento e metabolismo do micro-organismo (BELLON-MAURE; ORLIAC; CHRISTEN, 2003; PANDEY, 2003). Com a baixa umidade, a fermentação é realizada por um número limitado de micro-organismos, principalmente por fungos e leveduras (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Há um grande interesse em relação à FES, pois estudos com enzimas, corantes, além de outras substâncias de interesse da indústria alimentícia têm mostrado maior rendimento ou melhores características aos produtos que a fermentação submersa (FSm), além de menores custos. Estudos realizados com *Penicillium restrictum* para a produção de lipase mostraram que os investimentos necessários para FES foram 78% menor que para FSm. A grande vantagem da FES é que a matéria prima utilizada como substrato é muito barata (COUTO; SANROMÁN, 2006).

A seleção do substrato adequado é um ponto muito importante na FES. Neste tipo de fermentação, o substrato não é solúvel, atuando como suporte físico e também como fonte de nutrientes (PANDEY, 2003; COUTO; SANROMÁN, 2006; RAMANUJAM; SUBRAMANIAN, 2008). Tanto os cereais quanto seus produtos de processamento são as matérias-primas mais utilizadas para realizar a incubação de fungo. Dentre estes, o trigo ou seu farelo e a soja ou a soja desengordurada são os mais utilizados. Estes substratos são utilizados principalmente para reduzir o custo de produção de várias enzimas fúngicas (WANG; LAW; WEBB, 2005). Sendo assim, para selecionar um substrato para a produção enzimática por FES deve-se levar em conta fatores como o custo e a disponibilidade do mesmo (PANDEY et al., 2000).

A granulometria do substrato também é um ponto importante na FES, pois a disponibilidade de área superficial desempenha papel vital para a fixação microbiana, transferência de nutrientes, aeração, crescimento microbiano e produção enzimática (PRAKASHAM; RAO; SARMA, 2006). Partículas menores de substrato proporcionam uma maior área superficial para o crescimento microbiano, porém se forem muito pequenas pode ocorrer aglomeração do substrato e ocasionar um menor crescimento. Já as partículas maiores proporcionam melhor aeração, mas uma menor área superficial (PANDEY et al., 1999).

Como cada micro-organismo tem suas próprias condições especiais para produzir o máximo de enzimas, deve ser realizada a otimização da composição do meio (SANDHYA et al., 2005).

Estudos realizados por Prakasham e colaboradores (2006) mostraram que a produção de peptidase variou com o tipo de substrato utilizado. Essa variação pode ser atribuída tanto aos nutrientes fornecidos por cada um dos substratos quanto ao suporte fornecido para o desenvolvimento dos micro-organismos.

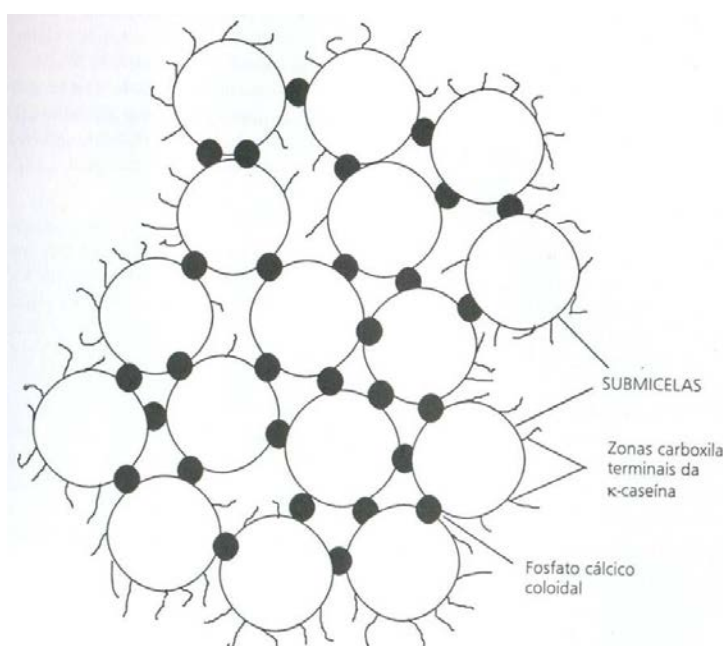
Sendo assim, a necessidade primordial de qualquer processo fermentativo é um micro-organismo produtivo que é capaz de crescer em um substrato econômico (NADEEM; QAZI; BAIG, 2010).

3.3 Caseína

As caseínas são proteínas pertencentes à família das fosfoproteínas, as quais são sintetizadas na glândula mamária em resposta aos hormônios da lactogênese e outros estímulos. Elas são secretadas como grandes agregados coloidais, denominados de micelas, que são responsáveis por muitas das propriedades físicas originais do leite (GINGER; GRIGOR, 1999). De acordo com Ordóñez e colaboradores (2007), esses agregados coloidais apresentam tamanho variável, sendo que aproximadamente 95% das caseínas formam os agregados coloidais e o restante fica disperso dentro do leite. Segundo Amiot (1991), as micelas de caseínas apresentam um diâmetro que varia de 30 a 300 nm, apresentando peso molecular aproximado de $2,5 \times 10^8$ daltons (SGARBIERI, 2005).

As micelas de caseína são formadas por várias partículas menores, chamadas sub-micelas (figura 1). Essa afirmação pode ser feita baseada em observação das micelas no microscópio eletrônico (ORDÓÑEZ et al., 2007).

Figura 1 – Modelo esquemático da micela de caseína.



(ORDÓÑEZ et al., 2007).

As caseínas são divididas em dois grupos: as que são sensíveis ao cálcio e as que não são sensíveis ao cálcio. A junção de caseínas sensíveis e não sensíveis forma a micela, impedindo ou inibindo a precipitação do grupo sensível na presença de cálcio. No leite bovino, a κ -caseína é a porção que não é sensível ao cálcio, já a α_{s1} , α_{s2} e β caseínas são sensíveis ao cálcio (HORNE, 2006).

A família α_{s1} -caseína pode representar até 40% de todas as frações de caseína no leite bovino, enquanto que a família α_{s2} -caseína, um grupo mais desigual, representa até 10% de todas as frações de caseína. As famílias de caseínas α_{s1} e α_{s2} são as mais sensíveis ao cálcio, precipitando com 6 mM e 2 mM de Ca^{2+} , respectivamente. A β -caseína constitui até 45% do total das caseínas do leite bovino, e representa a família de caseínas mais hidrofóbica. A família κ -caseína é responsável por até 15% do total das caseínas do leite (DZIUBA, J. et al., 2009). Na sequência primária da κ -caseína encontra-se uma porção apolar e outra polar. A porção apolar (para- κ -caseína) interage com a α e β caseína encontradas no interior da micela por meio de seus grupos hidrofóbicos e a porção polar (glicomacropéptideo) orienta-se para a porção do soro, interagindo com a água (SGARBIERI, 2005).

A κ -caseína apresenta grande importância na estabilidade da micela de caseína. As pequenas saliências em forma de capa pilosa (zonas C-terminais) da κ -caseína apresentam-se carregadas negativamente, devido à presença de carboidratos de elevada eletronegatividade, portanto, tornando-se hidrofílica. Além disso, o acúmulo de cargas negativas na periferia da micela também interfere na estabilidade, pois provoca certa repulsão entre as micelas mais próximas, evitando o choque entre elas e a possível agregação. Esse fato ocorre não só pelas cargas negativas, mas também pelo impedimento estérico (ORDÓÑEZ et al., 2007).

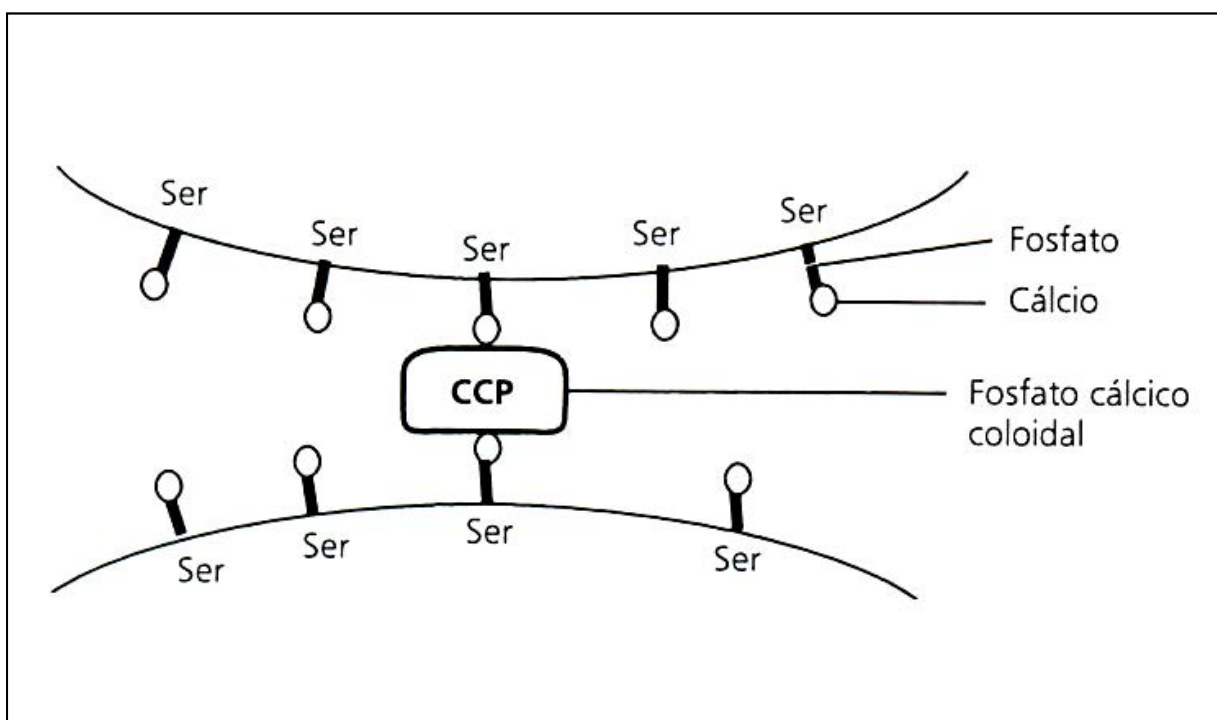
As caseínas constituem em média 80% das proteínas do leite bovino, sendo que o restante é composto pelas proteínas do soro (HORNE; BANKS, 2007).

A matéria seca das micelas de caseína é formada por 94% de proteínas e 6% de minerais, os quais são denominados coletivamente de fosfato de cálcio coloidal (CCP) (HORNE, 2006). O CCP é composto de fosfato, cálcio, citrato, magnésio, sódio e potássio, sendo os últimos três encontrados em menores quantidades (SGARBIERI, 2005; ORDÓÑEZ et al., 2007).

Estes minerais funcionam como um cimento que apresenta a função de manter as caseínas da micela unidas (HORNE, 2006). A teoria mais aceita dessa união diz

que os resíduos seril-fosfato da cadeia proteica da periferia de uma sub-micela se liga a um átomo de cálcio e esse se une ao CCP, o qual se ligaria a outra molécula de cálcio que estaria unido a um fosfato de outra sub-micela, dessa forma atuaria como ponte entre as sub-micelas (figura 2) (ORDÓÑEZ et al., 2007).

Figura 2 – Representação esquemática da união de duas sub-micelas pelo fosfato de cálcio coloidal (CCP).



(ORDÓÑEZ et al., 2007).

3.4 Coagulação do leite

A coagulação do leite é uma etapa fundamental na fabricação de todos os queijos. O objetivo principal da produção de queijos foi e continua sendo a conversão do leite, que é perecível, em um produto que possui maior vida útil, além de preservar seus nutrientes (AHMED; BABIKER; MORI, 2010; CAVALCANTI et al., 2007; SHIEH; THI; SHIH, 2009).

A etapa de coagulação pode ser dividida em primária, secundária e provavelmente em terciária (LUCEY; FOX, 1993; PIRES; ORELLANA; GATTI, 1999; PEREIRA et al., 2010).

Durante a primeira etapa, conhecida como hidrólise enzimática, a κ -caseína é clivada pelo coalho ou coagulante principalmente na ligação dos aminoácidos 105 e 106, formando duas porções: a para- κ -caseína (resíduos 1 a 105) e o macropeptídeo (resíduos 106 a 169) (LUCEY; FOX, 1993; ZOBRIST et al., 2005; PEREIRA et al., 2010). A porção dos resíduos 1 a 105 é hidrofóbica, sendo assim, permanece junto à micela de caseína, já a porção dos resíduos 106 a 169 é hidrofílica, permanecendo no soro após a hidrólise (LUCEY; FOX, 1993). Esta etapa é independente da presença de cálcio, no entanto, a adição do cálcio ocasiona a redução do pH, aumentando a taxa de reação enzimática de forma indireta (LUCEY; FOX, 1993).

Foi visto que para ocorrer a agregação e a coagulação das micelas de caseína é necessário que entre 80 e 90% das κ -caseínas estejam hidrolisadas, já que as micelas que possuem a maior parte das κ -caseínas inalteradas apresentam uma baixa tendência à agregação. O requerimento desta quantidade de κ -caseína hidrolisadas para ocorrer a agregação e coagulação demonstra a habilidade de estabilização da micela pela κ -caseína (DALGLEISH, 1980).

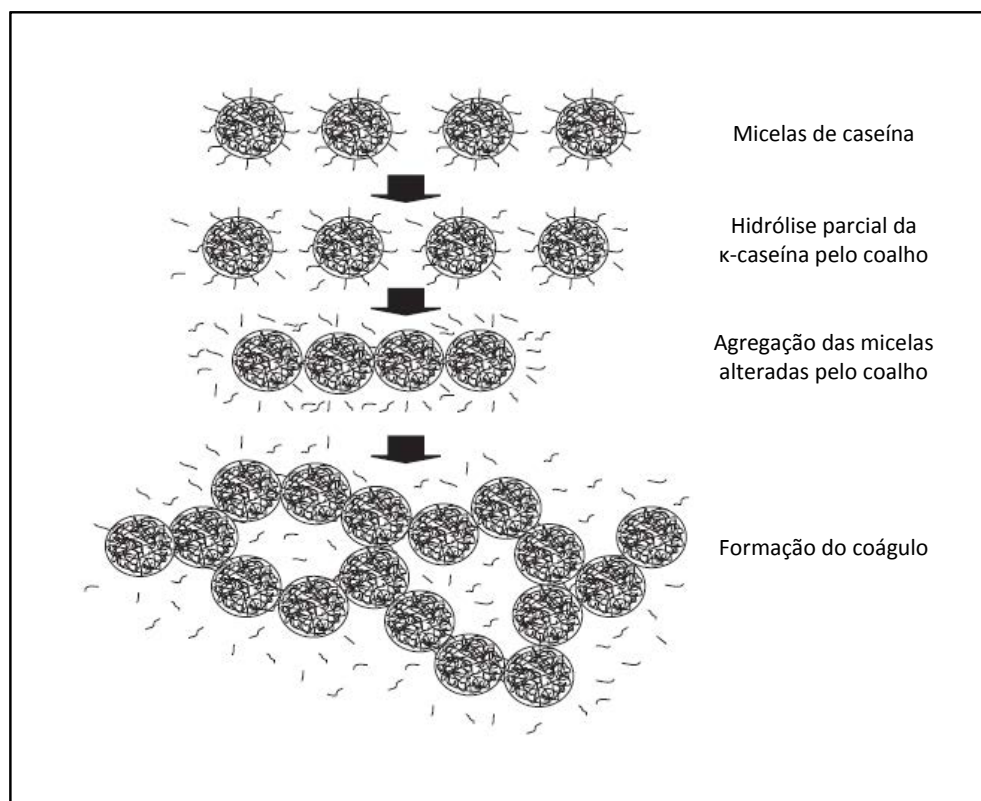
Após a hidrólise enzimática as micelas têm suas cargas superficiais reduzidas em cerca de 40%, o que leva à redução da repulsão entre as micelas. Essa redução permite a maior aproximação das micelas modificadas pelas enzimas, facilitando a agregação (LUCEY; FOX, 1993; PEREIRA et al., 2010).

Na segunda etapa, também conhecida como fase de agregação, ocorre a formação de um gel tridimensional, o chamado coágulo (PEREIRA et al., 2010). Esta etapa é cálcio- dependente. A presença de cálcio leva à redução ainda maior da repulsão entre as micelas de caseína levando a uma maior agregação destas micelas (LUCEY; FOX, 1993).

Durante a terceira etapa, conhecida como sinérese e rearranjo estrutural, ocorre a sinérese do gel e expulsão da água (soro) e o consequente rearranjo da estrutura do gel (LUCEY; FOX, 1993).

Na figura 3 encontram-se as diferentes fases que ocorrem durante a coagulação enzimática do leite (PEREIRA et al., 2010).

Figura 3 – Processos ocorridos durante a coagulação do leite



(PEREIRA et al., 2010).

3.4.1 Coagulantes

Coagulante é toda substância que provoca a coagulação do leite e que apresente origem diferente do coalho, ou seja, não é um extrato de abomaso de ruminantes (ANDRÉN, 2004).

Várias peptidases de plantas, animais e micro-organismos estão sendo testadas com a finalidade de ser utilizadas como coagulantes de leite, porém a maior atenção é dada para as peptidases microbianas com a finalidade de atuarem como substituto do coalho convencional (SHIEH; THI; SHIH, 2009).

Normalmente os substitutos de coalho produzem um menor rendimento e um gosto diferente em comparação com queijos produzidos com coalho. Porém quando eles são utilizados na fabricação de queijos não curados estas diferenças não são tão significantes. (ANDRÉN, 2004). Estas diferenças ocorrem devido a muitos coagulantes provocarem uma extensa hidrólise não específica em toda a caseína (HORNE; BANKS, 2007).

De acordo com Silva e Malcata (2005), vários foram os trabalhos que mostraram a elaboração de queijos com coagulantes de origem vegetal, porém muitos deles mostraram-se impróprios devido ao seu excessivo caráter proteolítico, ocasionando a redução da produção de queijos, além de conferir gosto amargo ao produto final.

Enzimas proteolíticas de origem fúngica, especialmente enzimas extracelulares de *Endothia parasítica*, *Mucor miehei* e *Mucor pusillus* receberam aceitação na escala industrial devido a sua alta atividade coagulante (AC) e baixa atividade proteolítica (AP). Entre estes fungos, o preferido pela indústria para a produção de enzima coagulante é o *M. miehei* devido a sua elevada razão AC/AP (SEKER et al., 1998).

Em estudo realizado por Merheb-Dini (2010), foi observado que durante a maturação do queijo Prato não ocorreram diferenças significativas entre o queijo elaborado com coagulante comercial e o elaborado com a coagulante de TI-S, sendo assim foi possível sugerir que ocorreu o mesmo tipo de proteólise em ambos os tratamentos. O mesmo comportamento foi observado em relação ao derretimento para os dois tratamentos. Já em relação ao rendimento, o queijo produzido com coagulante de TI-S apresentou menor rendimento, porém foi bastante semelhante ao queijo produzido com coagulante comercial.

3.4.2 Coalho

O coalho convencional, também conhecido como coalho de vitelo, consiste em uma mistura de duas enzimas proteolíticas: a quimosina (88-94%) e a pepsina (6-12%). Esta proporção é alterada de acordo com a individualidade e idade de cada bezerro (SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001). Segundo Andrén (2004), a proporção de quimosina e pepsina depende também da alimentação do ruminante. Quando o animal tem apenas o leite como alimento a quimosina permanece em proporção elevada, chegando a 90%. Essa proporção permanece elevada até seis meses de idade, período em que o animal está sendo amamentado, mesmo se também estiver ingerindo pastagem. No entanto, se o bezerro é desmamado a proporção diminui para cerca de 30% na idade de seis meses. Em seguida essa proporção é diminuída com a idade, sendo que em adultos encontram-se apenas vestígios de quimosina (tabela 1).

Tabela 1. Influência da alimentação e da idade na proporção (%) de quimosina e pepsina em extrato de abomaso bovino.

Alimentação	Idade (meses)	Quimosina (%)	Pepsina (%)
Lactente ou alimentado com leite	<3	90	10
Pastagem e lactente	6	75	25
Concentrado	6	30	70
Concentrado e feno	>24	Traço	100

(ANDRÉN, 2004)

A secreção da quimosina, enzima específica, no abomaso de ruminantes recém-nascidos tem a finalidade de coagular o leite ingerido, sem danificar as imunoglobulinas secretadas no colostro nos primeiros dias de lactação, isso ocorre devido à AC desta enzima (ANDRÉN, 2004).

A renina tem a função de coagular o leite ingerido, formando uma massa semilíquida, aumentando o tempo de permanência do leite no organismo. Se não ocorresse a coagulação, o leite na forma líquida fluiria pelo restante do sistema digestivo, causando diarreia (FANI, 2011).

Entre o grande número de peptidases que possuem aplicação na indústria de alimentos, as peptidases aspárticas, como a quimosina, são as utilizadas na coagulação do leite para a fabricação de queijos (EGITO et al., 2007). A quimosina provoca a clivagem principalmente entre os aminoácidos 105 (fenilalanina) e 106 (metionina) da κ -caseína bovina, causando a desestabilização das micelas de caseína, resultando na coagulação do leite (EGITO et al., 2007; REID et al., 1997). Dessa forma ocorre a liberação, no soro, da porção C-terminal (resíduos 106 a 169), a qual é chamada de glicomacropéptido (CAVALCANTI et al., 2007). Já a porção N-terminal (resíduos 1 a 105), a porção insolúvel, é retida no coágulo (REID et al., 1997).

A ligação entre os aminoácidos Phe₁₀₅ e Met₁₀₆ da κ -caseína é sensível a hidrólise das peptidases ácidas. Embora a maioria das enzimas coagulantes hidrolisem a ligação entre Phe e Met da κ -caseína ou ao redor desta ligação, existem muitas diferenças a respeito da especificidade e o grau de proteólise produzido durante a coagulação (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

Na fabricação de queijos a quimosina apresenta a função de coagular o leite através da hidrólise específica da ligação entre o aminoácido 105 e 106 (KUMAR et al., 2010; SOUSA; ARDO; MCSWEENEY, 2001). A quimosina é utilizada para a fabricação de queijos por possuir elevada AC e além disso assegura que apenas um pequeno número de fragmentos de peptídeos seja liberado durante o processo de maturação. Esse é o principal problema de muitos substitutos de coalho: atividade proteolítica excessiva, provocando o surgimento de peptídeos amargos (ACERES et al., 1992).

3.4. 3 Importância da especificidade da peptidase

Por muito tempo, o coalho de bezerros, uma enzima convencional de coagulação do leite obtida do quarto estômago de bezerros lactentes, foi o coagulante mais utilizado para a fabricação de queijos em todo o mundo. Porém, com a oferta reduzida deste coalho e o aumento da produção e do consumo de queijos têm sido estimuladas pesquisas para encontrar um substituto para este coalho (SHIEH; THI; SHIH, 2009).

A quimosina tem uma grande afinidade pela ligação entre os aminoácidos 105 e 106 da κ -caseína e tem a maior especificidade de coagulação do leite das peptidases aspárticas. Outras peptidases aspárticas de coagulação de leite como a pepsina, peptidase de *Rhizomucor miehei*, peptidase de *Rhizomucor pusillus* e peptidase de *Cryphonectria parasitica* tem atividade específica menor que a da quimosina, variando entre elas (ANDRÉN, 2004).

Os coagulantes diferem quanto a velocidade que eles continuam a degradar a caseína após a hidrólise de formação do gel. Somente os coagulantes que tem elevada AC e baixa AP são considerados adequados para a fabricação de queijos. Coagulantes com elevada AP pode formar gel de estrutura fraca, ocorrer altas perdas de proteína e gordura no soro e reduzir o rendimento do queijo, sendo que quanto maior a proteólise maior é a redução no rendimento (HORNE; BANKS, 2007).

Muitas peptidases de origem diferente do coalho convencional têm sido consideradas inadequadas para a fabricação de queijos, pois levam a produção de queijos extremamente amargos (EGITO et al., 2007). A pepsina, por exemplo, possui uma alta atividade proteolítica (AP), porém não é específica, sendo assim é

responsável pelo gosto amargo do queijo. A proporção de quimosina e pepsina encontrada no coalho convencional é 70% e 30%, respectivamente, e quando essa proporção é alterada, ocorrem mudanças proteolíticas no queijo (IRIGOYEN et al., 2001). A quimosina se torna adequada para a produção de queijos, pois, no pH característico do leite ela apresenta AP muito baixa, além de provocar a hidrólise específica entre os aminoácidos 105 e 106 da κ -caseína (ANDRÉN, 2004; HORNE; BANKS, 2007).

Um dado importante para a utilização de uma nova peptidase na fabricação comercial de queijos é a razão entre sua AC e AP, além da alta AC (SHIEH; THI; SHIH, 2009). AC é definida como a capacidade específica da peptidase de hidrolisar a κ -caseína, tornando-se uma das propriedades mais importantes das enzimas utilizadas na produção de queijos (SILVA; MALCATA, 2005; JACOB; JAROS; ROHM, 2011).

É sabido que muitas enzimas proteolíticas vão coagular o leite, porém, a proporção entre a AC e a AP varia muito de um extrato enzimático para outro, dessa forma pode influenciar tanto na qualidade final do queijo, quanto na sua produção (BARBANO; RASMUSSEN, 2005).

O valor desta razão apresenta grande importância para a produção de queijos, pois quando a razão entre a AC e a AP é alta espera-se que o queijo proveniente de coagulante que apresente estas características tenha menor perda de gordura e proteína além de alto rendimento da produção, quando comparado com a produção com coagulantes que apresentem baixa razão entre tais atividades (BARBANO; RASMUSSEN, 2005), consequentemente apenas as enzimas com uma alta razão AC/AP são consideradas adequadas (HORNE; BANKS, 2007).

Na fabricação do queijo ocorrem duas etapas de proteólise: a primária e a secundária. A proteólise primária ocorre principalmente pela ação do coalho residual, produzindo grandes e médios peptídeos, os quais podem ser degradados em peptídeos pequenos e, eventualmente, em aminoácidos livres por um processo conhecido como proteólise secundária. A proteólise primária desempenha um papel fundamental em relação à textura do queijo, enquanto a secundária interfere no gosto do queijo. Esta última etapa é importante para assegurar a hidrólise ideal das caseínas, evitando características como a baixa viscosidade e o elevado gosto amargo (CAVALLI et al., 2008).

3.5 Adição de cálcio

O cálcio existe no leite em duas formas: solúvel e coloidal. O equilíbrio entre as formas coloidal e solúvel é dependente do pH, temperatura e força iônica. Para facilitar a coagulação do leite durante a fabricação de queijos uma prática comum é a adição de aproximadamente 0,02% de CaCl_2 , o que ocasiona um aumento de todas as formas de cálcio presente no leite (WOLFSCHOOM-POMBO, 1997).

A coagulação do leite é especialmente dependente do balanço entre a forma solúvel e coloidal do cálcio, sendo que a adição de CaCl_2 tem maior importância quando são utilizados coagulantes vegetais ou microbianos. A quantidade de CaCl_2 adicionada ao leite para a fabricação de queijo deve ser exata, pois se for adicionado muito CaCl_2 , ocorrerá a dissociação da α -caseína da κ -caseína, portanto, ocorrerá a precipitação da α -caseína, pois esta não estará mais protegida pela κ -caseína da ação do cálcio (ROBINSON; WILBEY, 2002).

As micelas de caseína do leite são carregadas negativamente, sendo assim, quando são adicionados íons negativos (fosfatos ou citratos) ocorre o aumento da estabilidade das proteínas, porém o aumento de íons de cálcio neutraliza as cargas negativas, causando instabilidade às proteínas (AMIOT, 1991). A adição de cálcio aumenta a taxa de firmeza do coágulo. A maioria do cálcio adicionado se liga à caseína diretamente nos resíduos de cargas negativas da caseína ou como CCP. No entanto, a adição de concentrações muito elevadas de cálcio ($> 0,1 \text{ M}$) reduz acentuadamente a taxa de firmeza do coágulo, possivelmente porque a excessiva ligação de cálcio pode interferir na formação apropriada do gel, ou, pode reduzir a solubilidade da κ -caseína (LUCEY; FOX, 1993).

Para que ocorra a agregação das micelas de caseína é necessário um nível crítico de cálcio e a aceleração do processo de coagulação ocorre devido à combinação entre o aumento da concentração de cálcio e a diminuição do pH (WOLFSCHOOM-POMBO, 1997).

3.6 *Thermomucor indicae-seudaticae*

O fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* encontra-se classificado na ordem Mucorales (SCHIPPER, 1979).

A FES permitiu a produção de peptidase a partir deste fungo, a qual apresentou potencial para ser utilizado como substituto do coalho convencional. Este potencial foi indicado após estudos realizados com queijo Prato produzido a partir desta peptidase (MERHEB-DINI, 2010).

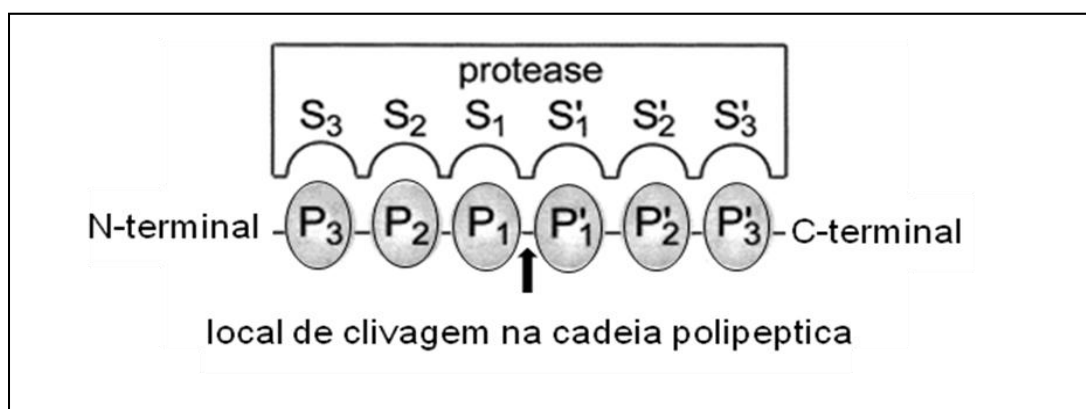
Este fungo também pode produzir outras substâncias, como por exemplo, a glucoamilase, a qual é um biocatalisador utilizado na indústria alimentícia (KUMAR et al., 2010).

3.7 Substrato sintético com supressão intramolecular de fluorescência

O substrato peptídico que possui supressão intramolecular de fluorescência (FRET) possui a característica de conter na extremidade amino-terminal o ácido orto-aminobenzóico (Abz), responsável pela emissão da fluorescência do peptídeo, e na extremidade carboxi-terminal o grupo etilenodiamondinitro-fenil (EDDnp) responsável pela supressão da fluorescência (CHAGAS et al., 1991)

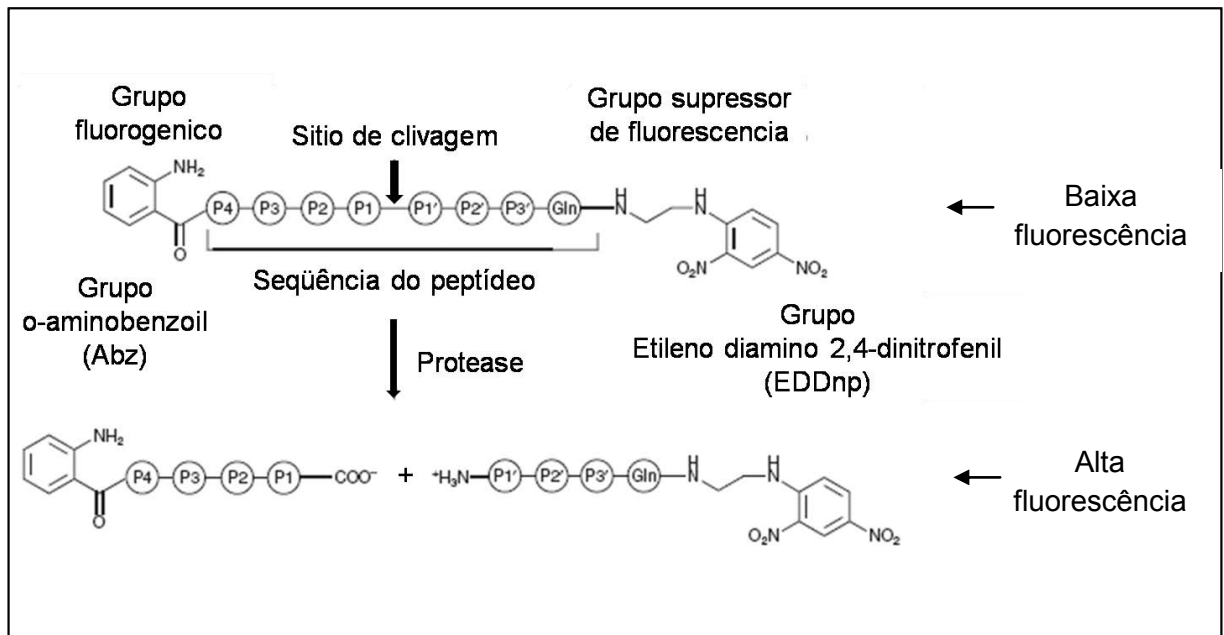
Quando as extremidades Abz e EDDnp estão próximas, isto é, quando o peptídeo ainda está íntegro (não foi hidrolisado), o grupo EDDnp promove a supressão da fluorescência emitida pelo grupo Abz, desta forma observa-se uma emissão de baixa fluorescência. Após a ação da peptidase, que promove a hidrólise do substrato, ocorre o distanciamento entre o grupo Abz e EDDnp, consequentemente ocorre o aumento da emissão de fluorescência (figura 4 e 5) (SANTOS, 2009).

Figura 4 – Representação de um polipeptídeo interagindo com o sítio ativo de uma peptidase.



Modelo proposto por Schechter e Berger (1967), modificado de Grahn et al, (1999).

Figura 5 – Representação de supressão e emissão de fluorescência dos substratos sintéticos (FRET).



(Adaptado de Santos, 2009)

4 Material e métodos

4.1 Micro-organismo

O fungo TI-S pertence à coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP. Este fungo foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio Sabouraud, e em seguida, foi colocado em uma estufa a 45°C por dois dias para que ocorresse o desenvolvimento. Após esse período de crescimento o fungo foi armazenado à temperatura ambiente.

4.2 Inoculo

Foi adicionado em cada Erlenmeyer do pré-inoculo 100 mL de solução salina esterilizada, a qual foi composta de 0,1% de cada um dos seguintes sais: sulfato de amônia $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, sulfato de magnésio hepta-hidratado $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ e nitrato de amônia (NH_4NO_3) . Após a adição da solução salina, a superfície do meio foi raspada delicadamente para obter uma suspensão de micélios, a qual foi utilizada para inocular os meios de fermentação.

4.3 Meios de fermentação

Foram preparados meios contendo 100% de farelo de trigo. Estes meios foram colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, totalizando 5 g de substrato, e foram esterilizados (120°C/20min). Os meios foram inoculados com 6,75 mL da suspensão de micélios e incubados a 45°C, por 24 horas.

4.4 Extração enzimática

Para ser realizada a extração enzimática foi adicionado 40 mL de água destilada aos meios. Em seguida os frascos foram agitados a 100 rpm/30 minutos. Após a agitação, o conteúdo foi filtrado e centrifugado a 30996 x g por 20 minutos, a 5°C. O extrato enzimático foi congelado para posteriores ensaios enzimáticos.

4.5 Atividade proteolítica

A mensuração da AP foi feita de acordo com Merheb-Dini et al. (2007), com algumas modificações. Este procedimento requer um controle para cada amostra analisada. Para realizar a mistura das amostras foi colocado em cada microtubo (2 mL) 0,4 mL de tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e 0,4 mL de solução de caseína (Sigma) 0,5% (p/v) diluída em tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e 0,2 mL de extrato enzimático. Em seguida, os microtubos foram colocados em banho-maria a 35°C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 10% em cada microtubo para interromper a reação. Os controles das reações foram feitos da mesma maneira que as amostras, porém com uma diferença: a adição do extrato enzimático foi realizada após a paralisação da reação com a adição do TCA 10%.

Todos os microtubos foram centrifugados a 11159 x g por 9 minutos. Após a centrifugação, a leitura da absorbância do sobrenadante foi realizada a 280 nm. Uma unidade de AP (UAP) é definida como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância a 280 nm, nas condições do ensaio. A AP foi calculada da seguinte forma: $\text{UAP/mL} = (\text{x Abs}_{280 \text{ nm}} \times 10 \times \text{fator de diluição}) / (\text{E} \times \text{t})$, sendo E o volume de enzima e t o tempo de reação, em minutos.

4.6 Atividade coagulante

A determinação da AC foi feita de acordo com Arima et al. (1970), com algumas modificações. Cinco mL de solução de leite desnatado (Itambé) reconstituído a 10% (p/v) com CaCl_2 0,01 M foi colocada em tubos de ensaio e foi pré incubada em banho-maria na temperatura de 35°C por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado ao leite 0,5 mL de solução enzimática e foi iniciada a contagem do tempo necessário para ocorrer a coagulação do mesmo. A formação do coágulo foi observada enquanto os tubos rodavam continuamente no banho-maria termostático para teste de coalho/coagulante MA 470/coalho/1.

Para a mensuração da AC das amostras purificadas o volume do leite foi reduzido para 2,5 mL e o volume de enzima adicionada foi de 0,25 mL.

A contagem do tempo foi interrompida com a formação das primeiras partículas. Uma unidade de AC (UAC) foi definida como a quantidade de enzima presente em 1 mL de extrato enzimático necessária para coagular 10 mL de

substrato em 40 minutos, e foi calculada de acordo com Shata (2005): $\text{UAC/mL} = 2400/t \times S / E$, sendo t o tempo (em segundos) necessário para a formação do coágulo, S é o volume de leite e E o volume de enzima.

4.7 Matéria prima: diferentes amostras de leite

Foi realizada a mensuração da AC de diferentes amostras de leite. Os leites utilizados para este fim foram o leite tipo A integral (Agrindus), A desnatado (Salute), B (Saboroso) e C (Tébar), além do leite desnatado em pó (Itambé) reconstituído a 10% (p/v).

4.8 Análise de gordura, sólidos não gordurosos, proteínas, pH e acidez dos diferentes amostras de leites

A quantidade de gordura, sólidos não gordurosos (SNG) e de proteína foi mensurada através do Ekomilk (Milkana Kam 98-2A). Para a realização destas análises foi colocado leite no recipiente do próprio equipamento e procedida a leitura.

A mensuração da porcentagem de ácido láctico das amostras de leite foi realizada de acordo com Silva e colaboradores (1997). Foi colocado 10 mL de leite em um becker e adicionado 2 gotas de solução de fenolftaleína em seguida foi adicionado NaOH 0,1 N, gota em gota, até o leite adquirisse coloração rosa claro.

Para aferir o pH foi utilizado o peagâmetro Digimed DM 20.

4.9 Determinação da atividade coagulante em diferentes amostras de leite

Em cada uma das cinco amostras de leite foi adicionado diferentes quantidades de CaCl_2 : 0; 0,005; 0,01; 0,04; 0,06 e 0,1 M. As etapas seguintes foram realizadas de acordo com o descrito no item 4.6

4.10 Purificação da peptidase coagulante

A concentração e as cromatografias foram realizadas de acordo com o descrito por Merheb-Dini (2010), com algumas modificações.

4.10.1 Concentração

A concentração do extrato bruto foi realizada empregando-se métodos de precipitação proteica, utilizando-se solvente orgânico (etanol).

Para a realização da concentração da solução enzimática, esta foi acrescida de etanol na proporção de 1:2 de extrato enzimático e etanol, respectivamente, misturado delicadamente e deixada em repouso por aproximadamente 12 horas em banho de gelo, a 4°C. Posteriormente, a solução foi centrifugada a $13776 \times g$ / 20 minutos, a 2°C e o precipitado foi ressuspendido em tampão acetato 50 mM, pH 4,5.

4.10.2 Cromatografias

Para realizar a purificação da peptidase coagulante do TI-S N31 primeiramente a amostra foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel com a resina Sephadex G-75 (Pharmacia), a qual foi colocada em uma coluna de dimensões 100 x 2,8 cm, totalizando 600 mL de resina. A resina foi equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 4,5.

O extrato bruto concentrado por precipitação foi centrifugado a $551 \times g$ por 20 minutos a 2 °C e posteriormente foi filtrada em filtros de 0,22 µm. Uma alíquota de 2 mL de enzima filtrada foi diluída em 3 mL de tampão acetato 50 mM, pH 4,5 para depois ser aplicada na coluna.

A eluição foi realizada em equipamento Akta purifier (Amersham pharmacia biotech) acoplado a um coletor de frações Frac-900. A amostra foi eluída com o mesmo tampão com o qual a coluna foi equilibrada, com fluxo de 0,3 mL/minuto. Posteriormente, foram coletadas, em microtubos, amostras de 2 mL do líquido eluído. Para cada amostra foi dosada a AC.

As frações que apresentaram AC foram combinadas e submetidas à cromatografia de troca iônica utilizando resina Q Sepharose (Pharmacia) em uma coluna de dimensões 10 x 0,5 cm, contendo 2 mL de resina equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 4,0. A eluição foi do tipo gradiente escalonado de NaCl (0-0,35M) em tampão acetato 50 mM, pH 4,0, a 0,26 mL/minuto. Esta análise foi realizada no mesmo equipamento anteriormente citado.

A eluição foi realizada até 30% de eluente B, em 40 volumes de coluna, volume que permitiu a eluição total da peptidase coagulante.

Amostras de 1,7 mL do líquido foram coletadas em tubos, e em seguida foram realizadas as dosagens de AC. As frações que apresentarem AC foram combinadas e dialisadas em membrana de celulose em tampão acetato 50 mM, pH 4,5, durante 48 horas, com agitação a 4°C para a realização dos testes subsequentes.

4.10.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras do extrato bruto e extrato bruto precipitado e as amostras coletadas após as cromatografias foram analisadas por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970).

Foi adicionado em cada microtubo 10 µL de amostra e 5 µL de tampão amostra (tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, DTT a 0,1M e azul de bromofenol a 0,001 M) e posteriormente os microtubos foram fervidos a 100°C por 5 minutos para a desnaturação da amostra.

O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 4% e o gel fracionador na concentração de 13% como indicado em Sambrook e Russell (2001). A revelação do gel foi feita com nitrato de prata conforme Blum e colaboradores (1987).

4.11 Monitoramento da atividade proteolítica durante a degradação da caseína: hidrólise enzimática da caseína e CLAE-FR

A hidrólise foi realizada de acordo com Merheb-Dini (2010). Uma solução de 2% de caseína (Sigma) diluída em tampão acetato 50 mM, pH 5,5, foi submetida à hidrólise a 35°C, sendo iniciada através da adição de 0,1mL de solução enzimática em 0,9 mL da solução de substrato. As soluções enzimáticas (TI-S , *Rhizomucor meihei* – Alternative, Bela Vista e *Aspergillus niger* - Ha-La , Chr-Hansen) foram padronizadas para a mesma AC (4 minutos). A reação foi paralisada ao final de uma hora, por meio de fervura durante seis minutos. Uma alíquota foi diluída 20 vezes e filtrada em filtros de 0,22 µm antes da análise em CLAE para remover qualquer material proteico particulado presente nos hidrolisados.

As análises em CLAE-FR foram realizadas de acordo com Léonil et al. (1995), com algumas modificações. As amostras foram analisadas com um sistema de

CLAE Flexar que consiste em um detector UV/visível, uma bomba binária e um gestor de solvente integrado a desgaseificador (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). A separação foi realizada utilizando uma coluna PerkinElmer C18 (250 x 2,1 mm DI) à temperatura de 40 °C. A bomba do sistema foi ajustada para enviar um fluxo constante de 0,2 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL de amostra.

A fase móvel utilizada foi a solução A consistindo 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético) em água bidestilada e solução B consistindo de 0,1% TFA em acetonitrila e água bidestilada na proporção de 80:20 respectivamente. Os peptídeos foram eluídos pelo aumento da concentração da solução B com seguinte gradiente: 0-5min, 46-56%; 5-15, 56-70%; 15-20, 70-80% (tabela 2). A coluna foi previamente equilibrada com as fases móveis (A e B) utilizando 46% da solução B. O detector foi ajustado em 220nm. Os cromatogramas foram analisados com o programa Chromera Manager 2.1 (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA).

Tabela 2 – Concentração dos eluentes A e B utilizados para a eluição das amostras por CLAE-FR.

Minutos	Concentração do eluente (%)	Concentração do eluente B (%)
0-5	54-44	46-56
5-15	44-30	56-70
15-20	30-20	70-80

4.12 Estudos de cinética enzimática

4. 12. 1 Determinação da concentração molar da peptidase coagulante purificada

Para calcular o K_{cat} e a eficiência catalítica da peptidase analisada foi necessário anteriormente encontrar a concentração molar da enzima. A molaridade foi determinada por titulação do sítio ativo como foi descrito por Turk e colaboradores (1993), porém foi utilizado o inibidor pepstatina a 1 mM para realização da titulação.

4.12.2 Determinação da especificidade da peptidase isolada do fungo *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31

Para obtenção da especificidade da peptidase coagulante isolada e purificada do fungo TI-S foram realizados experimentos cinéticos utilizando substrato sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência, determinando assim parâmetros cinéticos (K_M , V_{Max} e k_{cat}/K_M), (SONG et al., 2001; PORTARO et al., 2000).

Foram realizadas cinéticas enzimáticas com a peptidase em tampão MES, pH 5,5 e temperatura de 45°C na presença do substrato com supressão intramolecular da série Abz-LSFMAIQ-EDDnp, sendo adicionados em concentrações crescentes até a obtenção da velocidade máxima da peptidase.

O substrato foi fornecido pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. Este substrato foi sintetizado conforme a sequência de aminoácidos encontrada ao redor da ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da κ -caseína. O substrato utilizado continha a seguinte sequência: Abz-LSFMAIQ-EDDnp.

Foi adicionado em uma cubeta de quartzo (caminho ótico: 10 mm) 1800 μ L de tampão MES (100 mM), 100 μ L CaCl₂ (100 mM), 100 μ L de peptidase coagulante e foi incubado por 5 minutos a 45°C. Posteriormente foi adicionado substrato até atingir a concentração final de 4,32 μ M.

Os experimentos foram realizados no Laboratório do Prof. Hamilton Cabral na Faculdade de Farmácia da USP - Campus de Ribeirão Preto, em espectrofluorímetro (Lumina Thermo Scientific) acoplado com cela de temperatura interna e com agitação magnética (Peltier 4-Position Fluorescence Cell Holder) ajustando os comprimentos de onda de 320nm de emissão e 420nm de excitação. O monitoramento foi dado em função do aumento do sinal da fluorescência.

A determinação das constantes cinéticas foi feita conforme a equação de *Michaelis-Menten* calculada por regressão não linear dos dados da hidrólise utilizando o programa computacional GraphPad Prism versão 5.0.

4.13 Determinação dos sítios de clivagem

A amostra da peptidase coagulante foi incubada com o substrato de sequência Abz-LSFMAIQ-EDDnp numa concentração final de 30 μ Mol em tampão MES pH 5,5

e 5 mM de CaCl_2 . Foi adicionado em microtubos 447,5 μL de tampão MES, pH 5,5, 25 μL de enzima coagulante e 25 μL de CaCl_2 (100 mM) e incubados por 5 minutos a 45°C. Após decorrer o tempo de incubação, foram adicionados 2,5 μL de substrato sintético de sequência Abz-LSFMAIQ-EDDnp. As amostras permaneceram *overnight* a 45°C para a realização da hidrólise.

Os fragmentos resultantes da hidrólise dos peptídeos fluorogênicos foram isolados por CLAE em uma coluna C-18 Ultrasphere (5 μm ; 4.6 x 150 mm) e as ligações cindíveis foram identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF (Tof- Spec- Micromass) (BERSANETTI et al., 2005).

4.14 Determinação de sequência primária da peptidase por espectrometria de massas

A proteína (banda) de interesse foi recortada do gel de poliacrilamida SDS-PAGE e tratada como descrito por Schevchenko et al. (1996), e digerida com tripsina.

Os experimentos foram realizados no laboratório da Prof^a. Adriana Franco Paes Leme, no LNBio (Laboratório Nacional de Biociências), Campinas.

Para análise no LC-MS MS as amostras foram ressuspensas em 12 μL de ácido trifluoracético 0,1%.

Os peptídeos foram analisados por LC-MS MS. Os peptídeos foram separados por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 (100 μm x 100 mm) (Waters) em nano Acquity Ultra Performance LC (Waters) acoplado a uma interface de ESI nanospray em um espectrômetro de massa do tipo Q-ToF Ultima (MicroMass/Waters). Volume de 4,5 μL dos peptídeos foram injetados automaticamente e os peptídeos foram eluídos da coluna com gradiente de 0-90% de acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% durante 20 min. sob fluxo de 0,6 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os arquivos de dados gerados pelo Q-ToF foram processados em programa Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.). Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa Mascot Server v.2.3.01.0 (Matrix Science Ltda.), tendo como parâmetros uma clivagem perdida pela tripsina, modificação fixa de carbamidometilação, modificação variável de oxidação da metionina e 0,1 Da de tolerância de massas para MS e 0,1 Da de tolerância de massas para MSMS. As

buscas foram realizadas utilizando o banco de dados NCBI nr_082012 (19.922.528 sequencias; 6.828.478.126 resíduos).

5 Resultados e discussão

5.1 Produção enzimática

O extrato enzimático foi obtido após 24 horas de fermentação em farelo de trigo pelo fungo TI-S. Os valores da AC, AP e da razão AC/AP encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Valor da atividade coagulante, proteolítica e razão entre as atividades (R).

	AC (U/mL)	AP (U/mL)	R
24 horas	164,8	1,22	135

AC: atividade coagulante, AP: atividade proteolítica, R: AC/AP.

Segundo estudos realizados por Smith e Yada (1991), os valores de R para peptidase aspártica 1 de *Mucor miehei*, peptidase aspártica 2 de *Mucor miehei* e da quimosina foi 1,4; 1,2 e 5,1 respectivamente. Já segundo Yegin et al. (2012), duas preparações enzimáticas comerciais de *Rhizomucor miehei* e duas preparações comerciais de quimosina recombinante apresentaram o valor de R de 43,5; 23,9; 72,2 e 106,7 respectivamente, sendo o valor desta última preparação comercial de quimosina mais próximo do valor encontrados neste trabalho.

O valor da AC foi próximo ao obtido por Merheb-Dini (2010), porém o valor de R foi maior neste trabalho. Este é um dado importante, pois o alto valor de R é interessante para a produção de queijos. (BARBANO; RASMUSSEN, 2005; HORNE; BANKS, 2007).

5.2 Análise de gordura, sólidos não gordurosos, proteínas, acidez e pH de diferentes amostras de leite

Na tabela 4 encontram-se os teores de gordura, sólidos não gordurosos (SNG), proteínas, acidez e valores de pH obtidos para cada amostra de leite utilizada para a realização da AC.

Tabela 4 – Análise de gordura, sólidos não gordurosos, proteínas, acidez e pH dos leites utilizados para mensuração da atividade coagulante.

	Leite				
	A	A desnatado	B	C	Em pó
% gordura	3,68	0,13	2,95	3,13	0,06
% SNG	8,15	9,03	8,58	8,22	8,79
% proteína	2,98	3,27	3,13	3,00	3,18
% ácido láctico	0,13	0,14	0,14	0,15	0,13
pH	6,8	6,75	6,68	6,75	6,48

O teor da acidez das amostras de leite analisados variou de 0,13 a 0,15 %. De acordo com a Instrução Normativa N° 51 (IN 51), a acidez do leite deve ser de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico por 100 mL de leite. As amostras de leite tipo A desnatado, B e C encontram-se de acordo com os padrões estabelecidos, no entanto os leites A e em pó apresentaram valores de acidez abaixo do padrão. Essa variação pode ocorrer devido ao método utilizado não ser o preconizado pela IN 51 (BRASIL, 2002).

A quantidade de proteína encontrada em todas as amostras de leites analisadas estava de acordo com o preconizado, que é de no mínimo de 2,9%. Enquanto o teor de gordura deve ser no mínimo 3% no leite integral, e no máximo 0,5% no leite desnatado. Apenas o leite B não apresentou o valor de gordura esperado, isso pode ocorrer porque o método empregado não é preciso, além de não ser o preconizado pela IN 51 (BRASIL, 2002).

Quanto aos SNG, o leite deve conter no mínimo 8,4% quando integral e para os demais o valor deve ser corrigido pela seguinte fórmula: $SNG > 8,652 - (0,084 \times \text{teor de gordura})$. Os valores de SNG do leite A e C foram, respectivamente, 8,15 e 8,22%, encontrando-se abaixo do esperado para o leite integral. Essa variação pode ocorrer por ter sido usado um método diferente do indicado pela IN 51 (BRASIL, 2002).

O pH das amostras de leite analisadas variou de 6,48 a 6,8. Segundo Walstra e colaboradores (1999), o pH do leite deve variar entre 6,6 e 6,8, tendo valor médio 6,7 na temperatura de 20°C. Sendo assim, o pH das amostras analisadas encontram-se na faixa esperada, exceto o pH do leite em pó que foi de 6,48.

5.3 Determinação da AC de diferentes amostras de leite

Foi realizada a mensuração da AC com diferentes amostras de leite adicionados de diferentes concentrações de CaCl_2 , sendo possível observar a variação dos valores de AC, os quais se encontram na tabela 5.

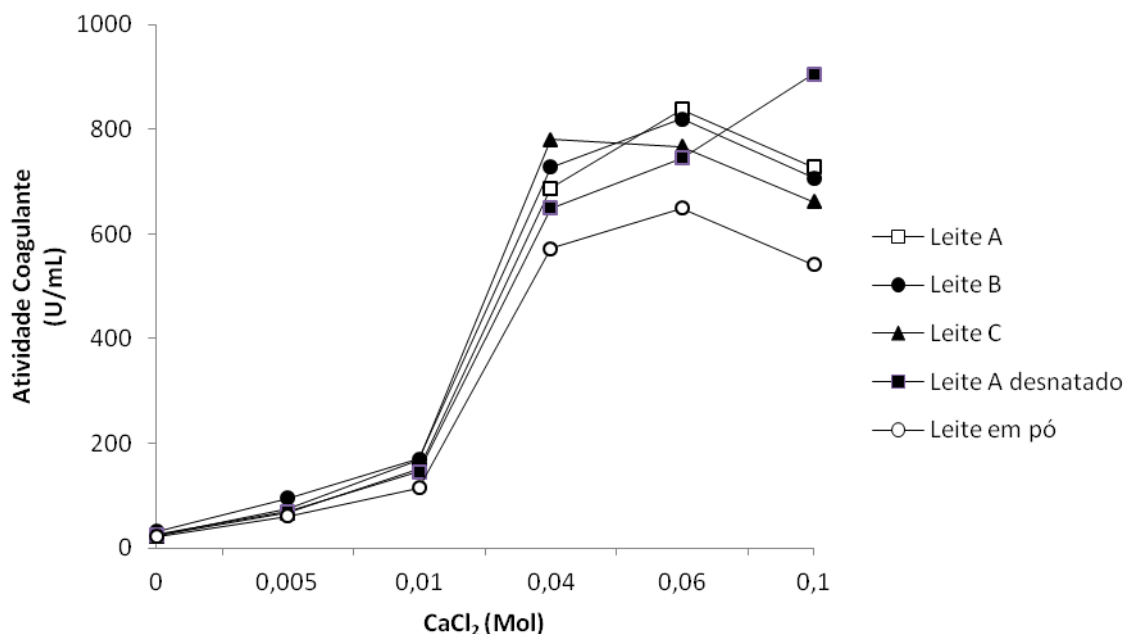
Tabela 5 – Atividade coagulante (U/mL) das diferentes amostras de leite em relação às diferentes concentrações de cloreto de cálcio (molar).

CaCl ₂ (M)	Leite				
	A	B	C	Em pó	Desnatado A
0	23,3 ± 0,8	32,0 ± 0,2	23,6 ± 0,4	22,1 ± 0,4	25,1 ± 0,4
0,005	67,6 ± 1,3	95,5 ± 2,1	76,3 ± 7,0	61,3 ± 0,7	70,1 ± 1,6
0,01	150,4 ± 4,3	170,3 ± 3,2	167,5 ± 3,6	115,0 ± 2,3	145,5 ± 1,5
0,04	687,2 ± 39,3	727,7 ± 22,1	781,0 ± 87,3	571,6 ± 13,6	649,0 ± 17,5
0,06	837,4 ± 17,1	819,6 ± 42,0	767,2 ± 36,9	649,9 ± 35,2	744,4 ± 49,3
0,1	727,7 ± 22,1	706,3 ± 20,8	662,0 ± 38,9	541,4 ± 7,0	905,5 ± 87,4

Como mostrado no gráfico 1, as amostras leites A integral, B e em pó apresentaram maior AC com a adição de 0,06 M de CaCl_2 . Já para o leite C e A desnatado o pico de atividade coagulante ocorreu com 0,04 e 0,1M, respectivamente.

De acordo com Sanner e Kovács (1973), a adição de quantidades crescentes de CaCl_2 proporciona a diminuição do tempo de coagulação do leite, já que o Ca^{2+} é necessário para a coagulação do leite, até atingir a máxima AC. Neste trabalho foi mostrado que com 0,04 M de Ca^{2+} foi obtida a máxima AC com a peptidase de *Mucor pusillus*.

Gráfico 1 – Efeito da adição de CaCl_2 na Atividade Coagulante.



Desta forma, conclui-se que os diferentes tipos de leite respondem de forma distinta às diferentes concentrações de cálcio. O decréscimo ocorrido após o pico deve-se provavelmente ao aumento da força iônica ou pela saturação dos resíduos negativos das micelas. As diferenças na AC ocorridas entre os tipos de leite são devidas à composição individual de cada amostra. A variação de sais no leite ocorre devido à raça, estágio da lactação, infecção do úbere e alimentação (FOX; MCSWEENEY, 1998).

Segundo Joudu e colaboradores (2008), as propriedades de coagulação do leite variam de acordo com a idade, fase de lactação, raça, espécie dos animais e estação do ano.

A utilização do leite sem pasteurizar para a realização de AC não é satisfatória, pois apresenta variações na capacidade coagulação. Em 1952, o cientista N. J. Berridge propôs o uso de leite em pó padronizado adicionado de CaCl_2 para a realização de testes de AC (ANDRÉN, 2004).

Quando foi adicionado aos leites a quantidade de 0,25 M de CaCl_2 , ocorreu a precipitação do leite (figura 6) antes mesmo de ser adicionada a enzima coagulante. Isso pode ser explicado pela dissociação da α -caseína, o que ocasiona a precipitação, já que esta não está mais protegida da ação do cálcio pela κ -caseína. Isso ocorre quando é adicionado quantidades altas de CaCl_2 , normalmente não é necessário quantidade maior que 0,02% de CaCl_2 para que ocorra coagulação

satisfatória, mesmo em leites que sofreram tratamento térmico severo (ROBINSON; WILBEY, 2002).

Figura 6 – Precipitação do leite com adição de 0,25 M de CaCl_2 .

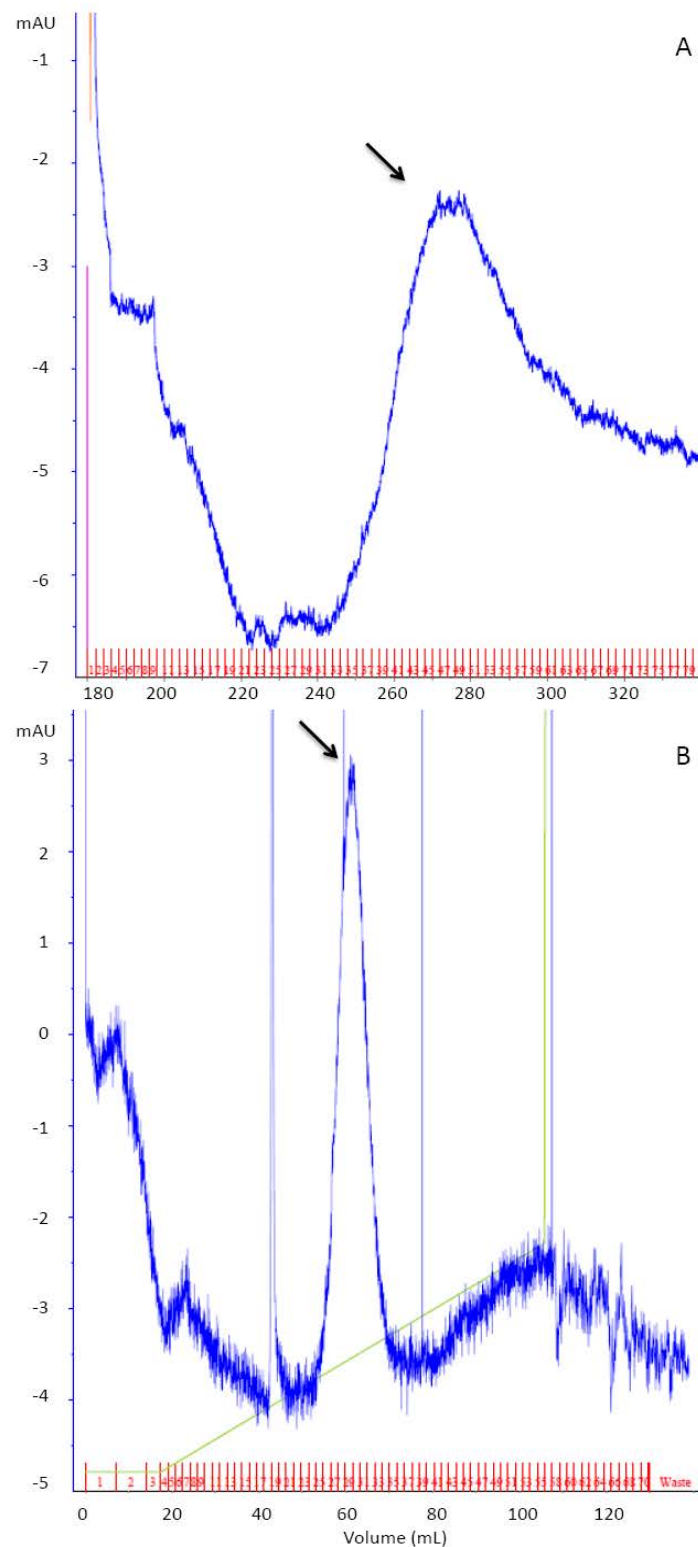


5.4 Purificação da peptidase coagulante

A figura 7-A mostra a eluição de proteínas e da peptidase coagulante do TI-S em sistema de cromatografia ligada ao Akta purifier durante a filtração em gel utilizando a resina Sephadex G-75 e a figura 7-B durante a troca iônica na resina Q-Sepharose. Na eluição do extrato bruto pela resina de gel filtração as amostras que apresentaram AC encontravam-se entre o volume de 260 e 296 mL. Já na resina de troca iônica, as amostras que apresentaram AC estavam compreendidas entre os volumes de 54 e 71 mL. Durante as duas etapas de purificação foi encontrado apenas um pico que apresentava AC.

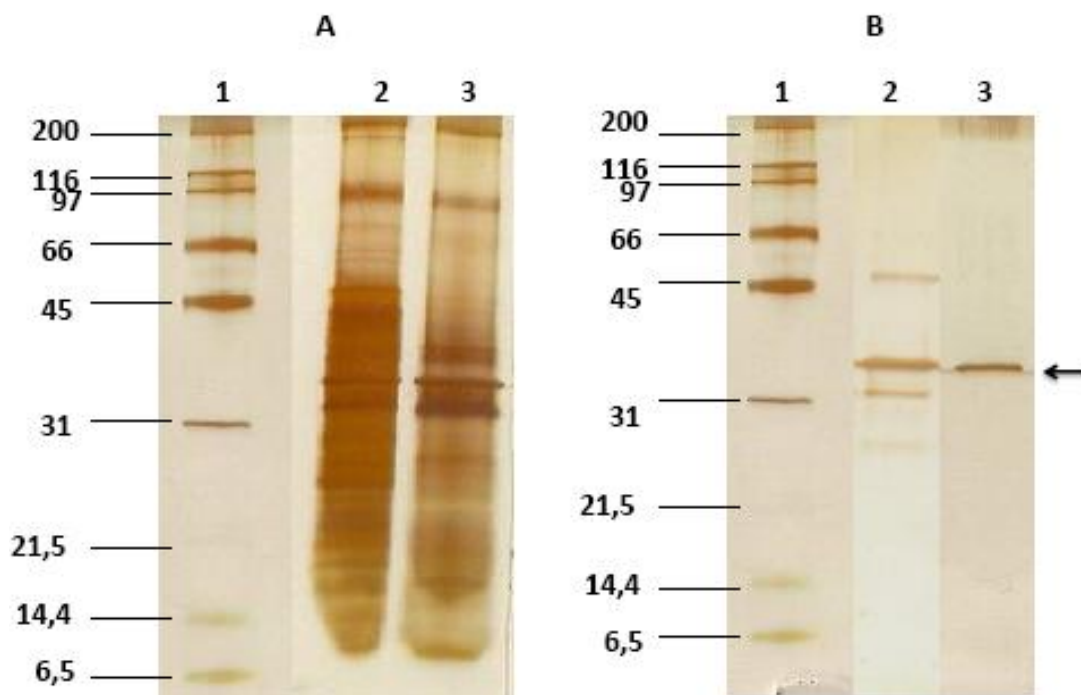
Na figura 8 podemos observar o perfil eletroforético do extrato bruto, extrato bruto precipitado, peptidase coagulante purificada parcialmente (sephadex G-75) e purificada (Q-Sepharose). Na figura 8B-3 podemos identificar apenas uma banda correspondente à peptidase coagulante, que possui aproximadamente 34 kDa. De acordo com o resultado do gel podemos concluir que a enzima foi purificada da mesma forma que no trabalho de Merheb-Dini (2010).

Figura 7 – Perfis de eluição da peptidase de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 durante a purificação.



(A) Perfil parcial de proteínas do extrato bruto (180 a 330 mL) obtido durante a filtração em gel em resina Sephadex G-75. A seta indica o pico que apresentou atividade coagulante. (B) Perfil de proteínas obtido durante a troca iônica em resina Q-sepharose. A seta indica o pico que apresentou atividade coagulante. A linha verde mostra a variação de tampão contendo NaCl inicial e final.

Figura 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) do extrato bruto e do material obtido por purificação. O gel foi corado com nitrato de prata.



(A) 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 tripsina 21,5 kDa, lisozima 14,4 kDa, aprotinina 6,5 kDa), coluna 2: extrato enzimático bruto, coluna 3: extrato enzimático precipitado. (B) coluna 1: marcadores de massa (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, lisozima 14,4 kDa, aprotinina 6,5 kDa), coluna 2: amostra coletada após filtração em gel em resina Sephadex G-75, coluna 3: amostra coletada após troca iônica em resina Q-Sepharose. A seta indica a peptidase purificada do fungo *T. indicae-seudaticae* N31.

5.5 Monitoramento da atividade proteolítica durante a degradação da caseína: hidrólise enzimática da caseína e CLAE-FR

O padrão de hidrólise das frações de caseína é um dado muito importante para caracterizar a qualidade de novas peptidases que poderão ser destinada para a fabricação de queijos. Este é um dos experimentos que mostra se a peptidase coagulante apresenta potencial para ser usada para tal finalidade, devido ao coalho e aos coagulantes do leite afetarem a qualidade do queijo através de sua ação sobre a α , β , κ caseína (MACEDO; FARO; PIRES, 1996).

Assim, foram realizadas hidrólises utilizando a enzima do TI-S e as enzimas comerciais em solução de caseína 2% para se avaliar a ação das enzimas por meio

do perfil cromatográfico dos peptídeos resultantes. Os cromatogramas são mostrados na figura 9. Além dos perfis cromatográficos encontrados na figura 9, foi realizada a análise de CLAE com os extratos enzimáticos (não mostrado), porém não foram evidenciados picos devido à diluição das amostras. Comparando os cromatogramas obtidos neste trabalho com aqueles obtidos por Léonil et al. (1995), permite-se sugerir a identidade dos picos.

Observa-se semelhança de ação entre todas as enzimas brutas, inclusive as comerciais que degradaram a fração κ -caseína (figura 9 C, D e E).

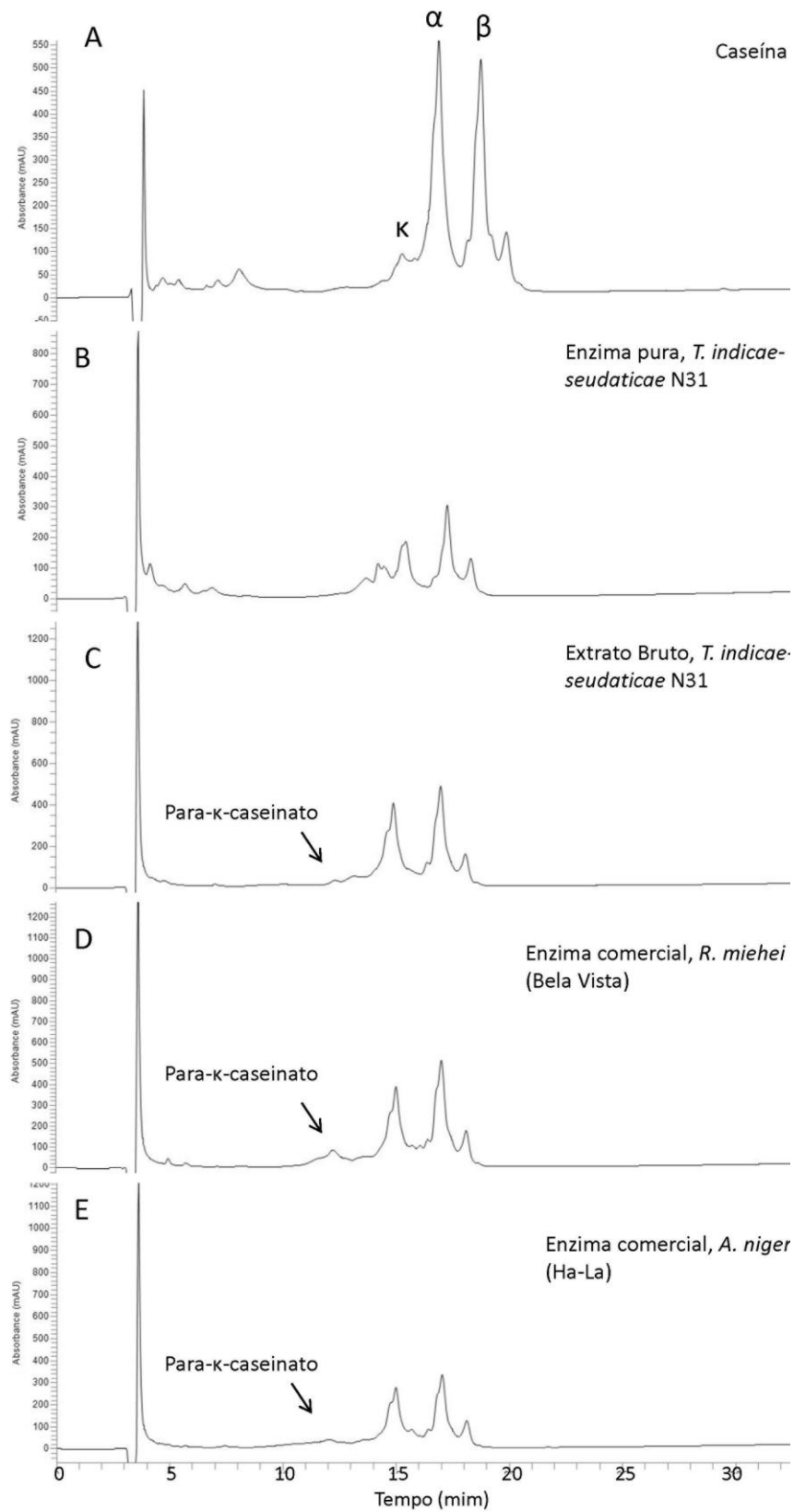
A menor semelhança entre o cromatograma da peptidase coagulante pura de TI-S e das enzimas comerciais pode ser explicado devido às propriedades do extrato bruto serem resultado de uma interação entre enzimas e também de proteínas não enzimáticas (LLORENTE et al., 2004), assim como ocorre com os coagulantes comerciais utilizados neste experimento.

Essa semelhança entre as frações da caseína é de extrema importância, pois, a maioria dos peptídeos de gosto amargo encontrados no queijo são originados da hidrólise da caseína, pois esta contém muitos resíduos hidrofóbicos (KOKA; WEIMER, 2000). Algumas sequências da caseína são particularmente hidrofóbicas e ao serem clivadas por peptidases pode levar à amargura (TEJADA et al., 2008).

Estudos mostram que o amargor em queijos é muito dependente da natureza das proteínas do leite, sendo que a caseína tem maior potencial de causar amargura do que outras proteínas (ADDA; GRIPON; VASSAL, 1982). Análises da formação de peptídeos amargos a partir da caseína revelaram que esses peptídeos são originados da α s1 e β -caseína, pois essas caseínas possuem relativamente altos níveis de aminoácidos hidrofóbicos, sendo fontes potenciais de formação de peptídeos amargos no queijo (KOKA; WEIMER, 2000). E entre estas duas caseínas, α s1-caseína produz mais amargor do que a β -caseína (ADDA; GRIPON; VASSAL, 1982).

O gosto amargo no queijo é resultado da presença de peptídeos de baixo peso molecular que não foram degradados à peptídeos não amargos e aminoácidos (ADDA; GRIPON; VASSAL, 1982).

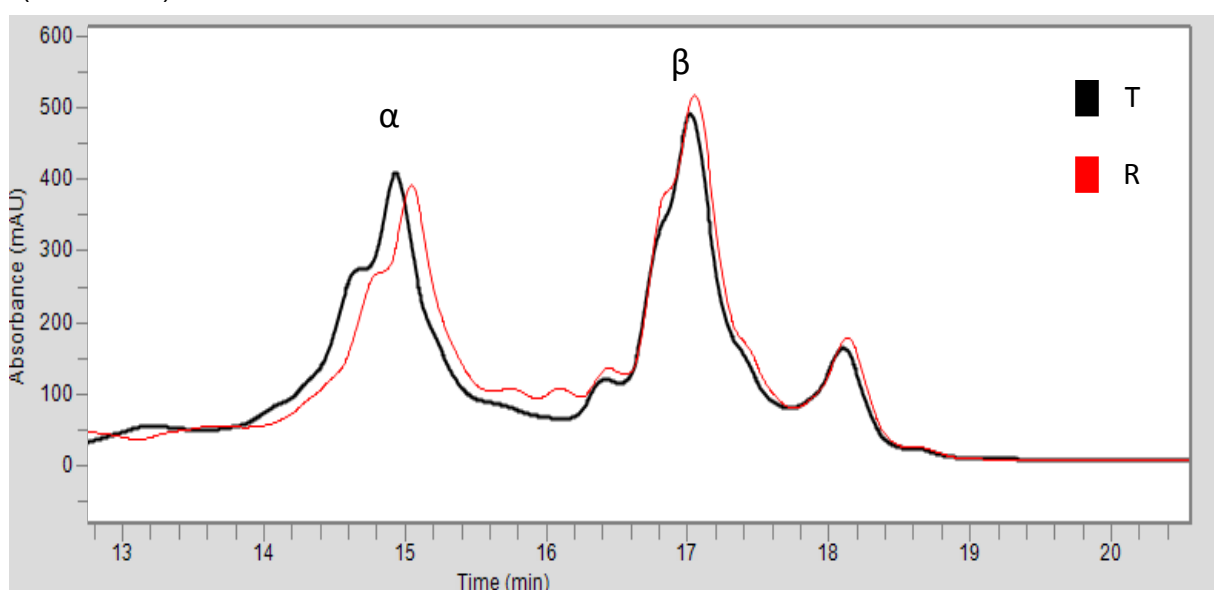
Figura 9 – Perfil de eluição em CLAE-FR da caseína íntegra e hidrolisada.



(A) caseinato de sódio bovino (20 mg/mL) e hidrolisados gerados após 1 h de proteólise pelas peptidases do *Thermomucor indicae-seudaticae* (B e C) e as enzimas comerciais produzidas pelos fungos *R. miehei* (D) e *A. niger* (E).

Os perfis cromatográficos das enzimas comerciais apresentaram maior similaridade com o perfil cromatográfico do extrato bruto do TI-S, sendo que a maior semelhança ocorreu entre o perfil do extrato bruto e da enzima comercial de *Rhizomucor miehei* (Bela Vista), figura 10.

Figura 10 – Sobreposição dos cromatogramas de hidrólise da caseína pelo extrato bruto do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e pela enzima comercial *Rhizomucor miehei* (Bela Vista).



T: extrato bruto do *T. indicae-seudaticae* N31

R: enzima comercial de *Rhizomucor miehei* (Bela Vista)

Na tabela 6 encontra-se a área dos picos formados durante a eluição da caseína hidrolisada por peptidase de TI-S e pelas enzimas comerciais produzidas pelos fungos *R. miehei* (Bela-Vista) e *A. niger* (Ha-La).

Tabela 6 – Área dos picos formados durante a eluição da caseína hidrolisada por extrato bruto e enzima purificada de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e por enzimas comerciais produzidas por *Rhizomucor. miehei* e *Aspergillus niger*.

Enzima	Área dos picos (μAU x s)		
	α	B	Para- K-caseinato
TI-S P	5595484,87	6532462,20	Não visualizado
TI-S B	19350875,80	15688208,82	548402,53
R	17076718,48	18086172,57	5683445,78
A	12379838,73	11634312,29	3776901,09

* TI-S P: enzima pura de TI-S; TI-S B: extrato bruto de TI-S; R: enzima comercial de *Rhizomucor miehei* (Bela-Vista) e A: enzima comercial de *Aspergillus niger* (Ha-La).

Essa semelhança entre o extrato bruto e as enzimas comerciais é um resultado interessante, pois a purificação da peptidase coagulante acarreta o aumento do tempo de produção e dos custos finais da enzima. Esse dado é de grande importância para a indústria de coagulantes, pois a utilização do extrato bruto com características atraentes é mais vantajoso do que trabalhar com enzima purificadas, devido aos menores custos de produção (LLORENTE et al., 2004).

Um aspecto importante a ser observado é a formação de peptídeos na segunda metade do cromatograma, pois os peptídeos que interagem fortemente com a coluna de CLAE-FR são de natureza mais hidrofóbica (peptídeos eluídos no final do cromatograma) e assim com maior tendência a apresentar gosto amargo (GALLAGHER et al., 2004; KANEKANIAN et al., 2000). Observando os cromatogramas é possível notar que a partir da segunda metade os cromatogramas apresentam os mesmos picos, sendo que nenhum desses picos deve causar excessivo gosto amargo no queijo, visto que queijos elaborados com essas enzimas comerciais não são amargos.

A semelhança entre os perfis cromatográficos é um dado importante, pois, as enzimas comerciais já são utilizadas na fabricação de queijos comerciais, o que nos indica que o extrato bruto do TI-S pode apresentar boa aceitação quando utilizado para a fabricação de queijos.

5.6 Estudos de cinética enzimática

Os parâmetros cinéticos K_m (afinidade da enzima pelo substrato), V_{max} e K_{cat}/K_m (eficiência enzimática) são valores importantes para avaliar a eficiência da ação de uma enzima sobre um determinado substrato.

A interação entre a peptidase de TI-S e o substrato sintético de sequência Abz-LSFMAIQ-EDDnp apresentou os seguintes parâmetros cinéticos: K_m : 0,000794 (mM) e K_{cat}/K_m : 1198534 ($\text{mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) (tabela 7). Em trabalho de Visser et al. (1976) e Visser et al. (1977) empregando a quimosina bovina e o substrato de sequência LSFMAI-OMe foi obtido os seguintes dados: K_m : 0,85 (mM) e K_{cat}/K_m : 21,6 ($\text{mM}^{-1} \times \text{s}^{-1}$). Desta forma, os valores de K_m e k_{cat}/K_m obtidos neste trabalho foram menores que os obtidos pela ação da quimosina. Através destes resultados foi observado que a peptidase coagulante do TI-S apresentou uma elevada afinidade pelo

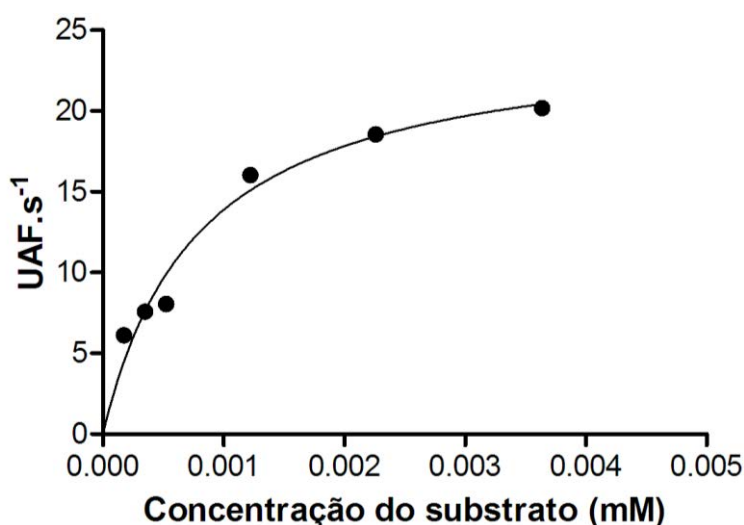
substrato sintético Abz-LSFMAIQ-EDDnp, além de alta eficiência enzimática comparada com a quimosina.

Tabela 7 – Parâmetros cinéticos da peptidase coagulante do fungo *Thermomucor indica-seudaticae* N31.

Substrato sintético	Concentração enzimática (mM)	K_m (mM)	V_{max} (mM/min.)	K_{cat}/K_m (mM ⁻¹ .s ⁻¹)
Abz-LSFMAIQ-EDDnp	$6,21 \times 10^{-5}$	0,000794	24,9	1198534

O gráfico 2 mostra a curva de Michaelis-Menten resultante da interação entre a peptidase de TI-S e o substrato sintético Abz-LSFMAIQ-EDDnp.

Gráfico 2 – Curva de Michaelis-Menten obtida da interação entre peptidase de TS-I e substrato sintético.

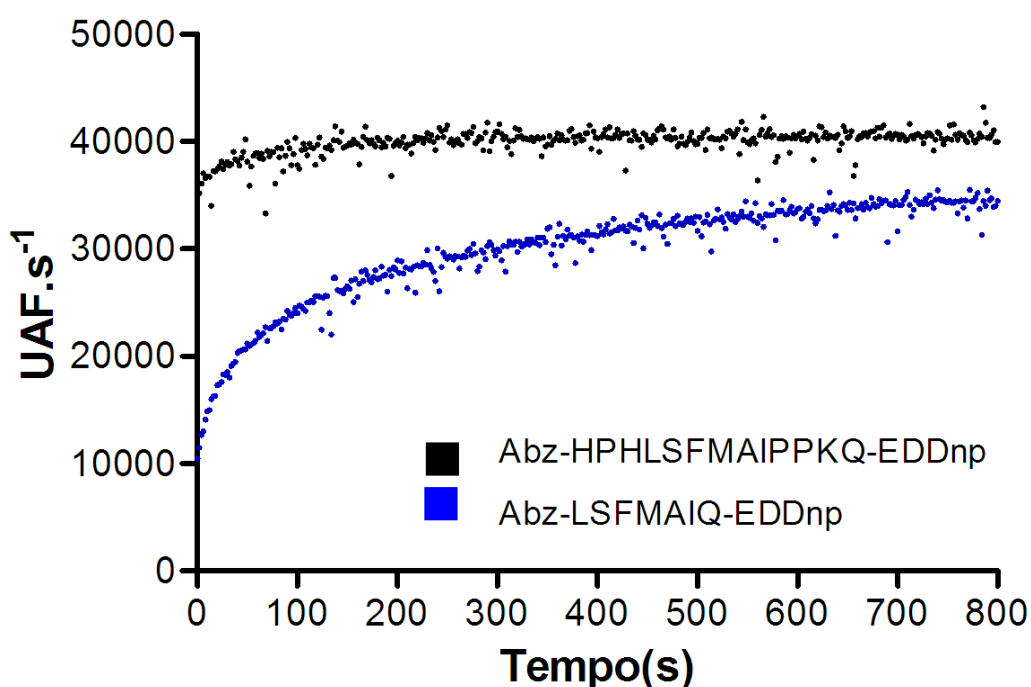


O gráfico 3 mostra duas curvas de pseudo de primeira ordem que são diferenciadas pela sequência do substrato utilizado.

Podemos observar de acordo com o gráfico 3 que a ação da enzima é diferente de acordo com o substrato utilizado. No caso da interação entre a enzima e o substrato de sequência Abz-HPHLSFMAIPPKQ-EDDnp quase não ocorreu inclinação, ao contrário da interação entre a enzima e o substrato de sequência Abz-LSFMAIQ-EDDnp. No caso do substrato Abz-HPHLSFMAIPPKQ-EDDnp, a curva começou por volta de 35.000 UAF.s⁻¹ e estabilizou por volta de 40.000 UAF.s⁻¹

enquanto que a curva do substrato Abz-LSFMAIQ-EDDnp começou aproximadamente em 10.000 UAF.s⁻¹ e estabilizou em aproximadamente em 35.000 UAF.s⁻¹, mostrando que o aumento de fluorescência do segundo substrato foi maior, evidenciando a maior clivagem do substrato.

Gráfico 3 – Pseudo de primeira ordem da peptidase coagulante de *T. indicae-seudaticae* N31 com os substratos sintéticos de sequência Abz-HPHLSFMAIPPKQ-EDDnp e Abz-LSFMAIQ-EDDnp.



Como foi visto através dos resultados deste experimento, tamanho do peptídeo e a sequência ao lado da ligação entre os aminoácidos Phe e Met são importantes para determinar a interação entre a enzima e o substrato. Horne e Banks (2007) observaram que peptídeos sintéticos com 2, 3 ou 4 aminoácidos contendo uma ligação entre Phe e Met não eram hidrolisados pela quimosina, sugerindo que outros aminoácidos são necessários ao lado da ligação Phe e Met.

De acordo com Raymond e colaboradores (1972), a taxa de hidrólise dos peptídeos sintéticos H-FM-Ome, H-FMA-Ome, H-LFMA-Ome pela quimosina era insignificante. A clivagem da ligação Phe-Met foi observada apenas quando o substrato tinha cinco aminoácidos da sequência da κ -caseína, incluindo a ligação Phe-Met.

Dados da literatura (RAYMOND et al., 1972, VISSER et al., 1977) mostraram que peptídeos contendo a ligação Phe-Met da κ -caseína necessitam de no mínimo cinco aminoácidos, incluindo a sequência de aminoácidos SFMA para que seja clivada a ligação Phe-Met. Se o substrato contiver na sequência os aminoácidos Leu₁₀₃ e Ile₁₀₈, além dos quatro aminoácidos acima citados ele se torna um bom substrato para enzimas que clivam a ligação entre os aminoácidos 105 e 106. Isso é explicado pelo prolongamento da cadeia do peptídeo e um aumento da hidrofobicidade da cadeia lateral). Desta forma, embora com apenas 6 aminoácidos, Abz-LSFMAIQ-EDDnp, pode ser considerado um bom substrato sintético para estudos de especificidade da peptidase.

Foi visto ainda que a Ser₁₀₄ apresenta grande importância na interação enzima-substrato (VISSER et al., 1977).

Os resíduos Leu₁₀₃, Phe₁₀₅, Met₁₀₆ e Ile₁₀₈ são hidrofóbicos e provavelmente interagem com resíduos hidrofóbicos do sítio ativo da enzima, enquanto a Ser₁₀₄ forma uma ponte de hidrogênio com outra parte da enzima. Os resíduos 98-102 e 109-111 provavelmente formam uma dobra β em volta do sítio ativo do complexo enzima-substrato. Esta conformação é estabilizada pelos resíduos de prolina (99,101,109 e 110). Um ou mais dos três resíduos de His (98, 100 e 102) e a Lys₁₁₁ são envolvidos na ligação eletrostática (FOX, 1993). Essa conformação dos aminoácidos como a dobra β pode ter interferido na ligação da enzima com o substrato sintético de sequência Abz-HPHLSFMAIPPKQ-EDDnp, dificultando a ação da enzima sobre este substrato, afetando sua eficiência catalítica. Como pode ser visto, esse substrato sintético possui os aminoácidos 109 e 111 que provavelmente formam dobra β e três prolinas (101, 109 e 110) que são responsáveis pela estabilização desta conformação. Segundo Garrett e Grisham (2010), a prolina e a glicina estão sempre envolvidas em dobra β .

Os substratos utilizados neste experimento foram diluídos em concentrações diferentes. As concentrações dos substratos Abz-HPHLSFMAIPPKQ-EDDnp e Abz-LSFMAIQ-EDDnp foram de 0,60 e 0,35 mM, respectivamente. Por este motivo ocorreu a diferença entre os inícios das duas curvas.

5.7 Determinação dos sítios de clivagem

A peptidase coagulante apresentou dois pontos de clivagem para o substrato sintético de sequência Abz-LSFMAIQ-EDDnp, como mostrado na tabela 8.

Tabela 8 – Pontos de clivagem do substrato sintético Abz-LSFMAIQ-EDDnp pela peptidase coagulante do fungo *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31.

Amostra	Pontos de clivagem	% de clivagem
1	Abz-LSF↓MA↓IQ-EDDnp	F↓M (51%) - A↓I (49%)
2	Abz-LSF↓MA↓IQ-EDDnp	F↓M (46%) - A↓I (54%)
3	Abz-LSF↓MA↓IQ-EDDnp	F↓M (40%) - A↓I (60%)
Média	Abz-LSF↓MA↓IQ-EDDnp	F↓M (46%) - A↓I (54%)

A peptidase coagulante hidrolisou 46% da ligação entre os aminoácidos Phe₁₀₅ e Met₁₀₆ e 54% entre os aminoácidos Ala₁₀₇ e Ile₁₀₈. No primeiro caso, ponto de hidrólise é o mesmo que a quimosina bovina cliva na caseína, formando a para-κ-caseína insolúvel (105 aminoácidos) e o glicomacropéptideo (64 aminoácidos) (CAVALCANTI et al., 2007). No segundo caso, a peptidase coagulante apresenta uma ação muito parecida com a quimosina bovina, clivando na segunda ligação ao lado da ligação entre a Phe₁₀₅ e Met₁₀₆, o que ocasiona um acréscimo de apenas dois aminoácidos na para-κ-caseína. Isso confirma que a peptidase coagulante do TI-S N31 apresenta ação semelhante à quimosina bovina. Resultado semelhante a este foi obtido para a peptidase de *Endothia parasítica*. Esta apresenta diferença na especificidade em relação a quimosina de bezerro, pepsina A e C suína e peptidase de *Mucor miehei*. A peptidase de *Endothia parasítica* cliva a κ-caseína na ligação entre a Ser₁₀₄ e a Phe₁₀₅, enquanto as demais clivam na ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆. Apesar desta diferença de especificidade, a peptidase de *Endothia parasítica* cliva na mesma região das demais peptidases e essa diferença aparentemente não afeta a coagulação (DROHSE; FOLTMANN, 1989).

5.8 Determinação de sequência primária da peptidase por espectrometria de massas

A enzima purificada foi submetida a eletroforese SDS-PAGE e posteriormente a banda foi recortada e submetida a hidrólise por tripsina.

Pela análise de espectrometria de massas foi identificado 6 peptídeos que se igualam com peptídeos trípitos da peptidase do *Rhizomucor pusillus*, de acordo com o alinhamento com sequências primárias da base de dados NCBI Inc _082012. Na figura 11 pode ser visualizado em vermelho os 6 fragmentos que coincidiram com a renina *Rhizomucor pusillus*. A similaridade entre estas peptidases foi de 42%.

Muitas peptidases podem coagular o leite, porém poucas são aceitáveis como substituto de coalho, entre elas estão a pepsina bovina, suína e de galinha, peptidase de *Rhizomucor miehei* e *Rhizomucor pusillus*. Embora a especificidade das peptidases fúngicas acima citadas em relação a α_{s1} e β -caseína não sejam igual a da quimosina elas proporcionam a produção de queijos aceitáveis e foram amplamente utilizadas no Estados Unidos antes da introdução da quimosina microbiana recombinante (FOX, 1993).

Figura 11 – Sequência primária da renina de *Rhizomucor pusillus*.

```

1 MLFSKISSAI LLTAASFALT SARPVSKQSD ADDKLLALPL TSVNRKYSQT
51 KHGQQAAEKL GGIKAFAGD GSVDTPGLYD FDLEEYAI PV SIGTPGQDFY
101 LLFDTGSSDT WVP HKGCDNS EGCVGKRFFD PSSSSTFKET DYNLNITYGT
151 GGANGIYFRD SITVGGATVK QQT LAYVDNV SGPTAEQSPD SELFLDGIFG
201 AAYPDNTAME AEYGDYNTV HVNLYKQGLI SSPVFSVYMN TNDGGGQVVF
251 GGVNNTLLGG DIQYTDVLKS RGGYFFWDAP VTGVKIDGSD AVSFDGAQAF
301 TIDTGTNFFI APSSFAEKVV KAALPDATES QQGYTVPCSK YQDSKTTFSL
351 VLQKSGSSSD TIDVSVPI SK MLLPVDKSGE TCMFIVLPDG GNQFIVGNLF
401 LRFFVNVYDF GKNRIGFAPL ASGYENN

```

*Sequência de aminoácidos destacados em vermelho são os resíduos iguais entre o *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e *Rhizomucor pusillus*.

Os membros da família de peptidases aspárticas têm tipicamente um peso molecular de 35 a 40 kDa e são glicosiladas (MURAKAMI et al., 1998). De acordo com a literatura as peptidase desta família (*Rhizomucor*) são bastante específicas para o substrato e apresentam uma extremamente baixa atividade proteolítica. As peptidases do *Rhizomucor pusillus* são conhecidas por reconhecer resíduos de aminoácidos aromáticos e clivar ligações peptídicas preferencialmente no seu lado

COOH (terminal carboxílico), tal qual acontece na ligação Phe (105) – Met (106) na molécula de κ -caseína (ARIMA et. al. 1967).

6 Conclusão

Conclui-se que a composição individual do leite interfere na sua AC, principalmente em relação à concentração de cálcio presente em cada leite. Os leites que apresentam maior quantidade de cálcio em sua composição provavelmente atingirão o pico de AC mais rapidamente. Além disso, o excesso de cálcio pode provocar a dissociação da α -caseína, levando a precipitação do leite.

Os experimentos de hidrólises da caseína com o extrato bruto e peptidase purificada de TI-S e com enzimas comerciais (produzidas pelos fungos *Rhizomucor miehei* e *Aspergillus niger*) mostraram que o extrato bruto apresentou perfil de atuação semelhante aos das enzimas comerciais.

Os parâmetros cinéticos da interação entre a enzima coagulante purificada de TI-S e o substrato sintético de sequência Abz-LSFMAIQ-EDDnp mostrou que esta enzima possui elevada afinidade e alta eficiência comparada com enzimas coagulantes de origem diferente.

A hidrólise do substrato sintético revelou que o substrato é hidrolisado 46% na ligação entre os aminoácidos fenilalanina e metionina e 54% na ligação entre os aminoácidos alanina e isoleucina. Nos dois casos os peptídeos resultantes são semelhantes, com diferença de apenas dois aminoácidos no seu tamanho. De qualquer, isso também evidencia que a hidrólise acontece na mesma região da proteína como ocorre com a quimosina bovina.

Por meio da análise de espectrometria de massa foi observada uma homologia de sequência de aminoácidos entre a peptidase de *Rhizomucor pusillus* e a peptidase de TI-S em torno de 42% de identidade.

7 Referências bibliográficas

- ACERES, L. B. et al. Purification and characterization of a Milk clotting protease from *Mucor bacilliformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 37, p. 283-294, 1992.
- ADDA, J.; GRIPON, J. C.; VASSAL, L. The chemistry of flavor and texture generation in cheese. **Food Chemistry**, v. 9, p. 115-129, 1982.
- AHMED, I. A. M.; BABIKER, E. E.; MORI, N. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 759-764, 2010.
- AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**. Zaragoza: ACRIBIA, 1991. 547 p.
- ANDRÉN, A. Rennets and coagulants. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 281-286, 2004.
- ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. **In Methods in Enzymology**, v. 19, p. 446-460, 1970.
- BARBANO, D. M.; RASMUSSEN, R. R. Cheese yield performance of fermentation-produced chymosin and other milk coagulants. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 19-26, 2005.
- BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 881-896, 2003.
- BERSANETTI, P. A. et al. Characterization of arazyme, an exocellular metalloprotease isolated from *Serratia proteamaculans* culture medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.574-581, 2005.
- 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.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set. 2002.
- BRUTTI, C. B. et al. *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. **Food Science and Technology**, v. 45, p. 172-179, 2012.
- CAVALCANTI, M. T. H. et al. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiopsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 29-35, 2004.
- CAVALLI, S. V. et al. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chemistry**, v. 106, p. 997-1003, 2008.

CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. **Analytical Biochemistry**, v. 192, p.419-425, 1991.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, V. 76, p. 291–302, 2006.

DALGLEISH, D. G. A mechanism for the chymosin-induced flocculation of casein micelles. **Biophysical Chemistry**, v. 11, p. 147-155, 1980.

DROHSE, H. B.; FOLTMANN, B. Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine x-casein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 995, p. 221-224, 1989.

DZIUBA, J. et al. Milk proteins. In: NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. (Ed). **Handbook of Dairy Foods Analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 79-108.

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

FANI, M. Enzimas: natureza e ação nos alimentos. **Food Ingredients Brasil**, n. 16, p. 26-37, 2011.

FERRACINI-SANTOS, L.; SATO, H. H. Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 54-60, 2009.

FOX, P. F. Exogenous enzymes in dairy technology. **Journal of Food Biochemistry**, v. 17, p.173-199, 1993.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. Londres: BLACKIE ACADEMIC E PROFESSIONAL, 1998. 478 p.

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

GARRETT, R.; GRISHAM, C. **Biochemistry**. Boston: CENGAGE LEARNING, 2010. 1184 p.

GRAHN, S.; KURTH, T.; ULLMANN, D.; JAKUBKE, H. S' subsite mapping of serine proteases based on fluorescence resonance energy transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1431, p. 329-337, 1999.

GINGER, M. R.; GRIGOR, M. R. Comparative aspects of milk caseins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 133-145, 1999.

GONÇALVES, T. A. et al. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119 pp. 293–299, 2012.

HORNE, D. S. Casein micelle structure: Models and muddles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 148-153, 2006.

HORNE, D. S.; BANKS, J. M. Rennet-induced coagulation of milk. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, v. 1, p. 47-70, 2007.

IRIGOYEN, A. et al., Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an ovine cheese. **Food Chemistry**, v. 72, p. 137-144, 2001.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 14-33, 2011.

JOUDU, I. et al. The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. **International Dairy Journal**, v.18, p. 964-967, 2008.

KANEKANIAN, A.; GALLAGHER, J.; EVANS, E. P. Casein hydrolisys and peptide mapping. **International Journal of Dairy Technology**, v. 53, p. 1-5, 2000.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Investigation of the ability of a purified protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98 to hydrolyze bitter peptides from cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 75-79, 2000.

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

KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Characterization of a neutral and thermostable glucoamylase from the thermophilic mold *Thermomucor indicae-seudaticae*: activity, stability, and structural correlation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 160, p. 879-890, 2010.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

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

LÉONIL, J. et al. Analysis of major bovine milk proteins by on-line high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Le Lait**, v. 75, p. 193-210, 1995.

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

LUCEY, J. A.; FOX, P. F. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1714-1724, 1993.

MACEDO, Q.; FARO, C. J.; PIRES, E. M. Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: Action on bovine α_s - and β -casein and comparison with chymosin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 42-47, 1996.

MARTIN, N. et al. Pectinase production by a brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid_state and submerged fermentation. **Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 306-313, 2010.

MARTIN, P. et al. Kinetic studies on the action of *Mucor miehei* aid proteases and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 612, p. 410-420, 1980.

MEDINA, M. et al. Characteristics of Burgos and Hispánico cheeses manufactured with calf rennet or with recombinant chymosin. **Food Chemistry**, v. 45, p. 85-89, 1992.

MERHEB, C. W. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e determinação do padrão de ação de protease do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus***, 2007. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

MERHEB-DINI, C. **Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijos maturados**. São José do Rio Preto, 2010. 123p. [Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP].

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

NADEEM, M.; QAZI, J. I.; BAIG, S. Enhanced production of alkaline protease by a mutant of *Bacillus licheniformis* N-2 for dehairing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n.5. p. 1015-1025, 2010.

NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 197-203, 2005.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 91-96, 2004.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. São Paulo: ARTEMED, 2007. v. 2, p.26-35.

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

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p.149–162, 1999.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153–162, 2000.

PEREIRA, C. I. et al. How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model Portuguese cheeses manufactured from several milk sources and two alternative coagulants. **Journal of Dairy Science**, v 93, p. 1335-2294, 2010.

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

PORTARO, F. C. V. et al. Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P4, P3, P2', and P3' variations in extended substrates. **Biochemistry Journal**, v. 347, p. 123-129, 2000.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. S.; SARMA, P. N. Green gram husk—an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1449–1454, 2006.

RAMANUJAM, P. K. N. S.; SUBRAMANIAN, P. Production of pectin lyase by solid state fermentation of sugarcane bagasse using *Aspergillus niger*. **Advanced Biotech**, v. 6, p. 30-33, 2008.

RAO, M. B. et al. Microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p.597-635, 1998.

RAYMOND, M. N.; GARNIER, J.; BRICAS, E. Studies on the specificity of chymosin (rennin): kinetic parameters of the hydrolysis of synthetic oligopeptide substrates. **Biochimie**, v. 54, p. 145-154, 1972.

REID, J. R. et al. Macropeptide: Effect of pH and Analysis of Products of Secondary Hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 559-569, 1997.

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Fabricación de queso**. Zaragoza: ACRIBIA, 2002. 488 p.

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

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

SANNER, T.; KOVÁCS-PTOSZT, G. Kinetic studies on the aggregation of κ -casein by *Mucor pusillus* protease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.303, p. 68-76, 1973.

SANTOS, J. A. N. **Inibição e especificidade da Lbpro vírus da febre aftosa**. 2009. 93p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCHIPPER, M. A. A. *Thermomucor* (Mucorales). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 45, p. 275-280, 1979.

SEKER, S. et al. Production of microbial rennin from *Mucor miehei* in a continuously fed fermenter. **Enzyme Microbial Technology**, v. 23, p. 469-474, 1998.

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

SHATA, H. M. A. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, p. 241-247, 2005.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v.68, p. 850-858, 1996.

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

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

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

SMITH, J. L.; YADA, R. Y. Characterization of two aspartyl proteinases from a commercial fungal (*Mucor miehei*) rennet. **Canadian Institute of Food and Technology**, v. 24, p. 48-56, 1991.

SONG, E. K. et al. Analysis of the subsite specificity of rat insulysin using a fluorogenic peptide substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 1152-1155, 2001.

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

TEJADA, L. et al. Proteolysis in goats' Milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 139-146, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. **Apresentação das Proteases de Microrganismos**. 2010. Disponível em: <<http://acd.ufrj.br/proteases/ProteaseApres.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2011.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos**: química y microbiología. Zaragoza: ACRIBIA, 1995. 476p.

VISSER, S. et al. Peptide substrates for chymosin (rennin): kinetic studies with peptides of different chain length including parts of the sequence 101-112 of bovine κ -casein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 438, p. 265-272, 1976.

VISSER, S. et al. Peptide substrates for chymosin (rennin): kinetic studies with bovine κ -casein-(103-108)-hexapeptide analogues. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 481, p. 171-176, 1977.

WALSTRA, P. et al. **Dairy technology**. Nova York: MARCEL DEKKER, 1999. 727 p.

WANG, R.; LAW, R. C. S.; WEBB, C. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 217-227, 2005.

WOLFSCHOOM-POMBO, A. F. Influence of calcium chloride addition to milk on the cheese yield. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 249-254, 1997.

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.

ZOBRIST, M. R. et al. High-pressure-induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 655-662, 2005.