



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

BRUNA LIMA DA SILVA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE COAGULANTE
OBTIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DO FUNGO
TERMOFÍLICO *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICAE* N 31**

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto

2013



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

BRUNA LIMA DA SILVA

Produção e Caracterização da Protease Coagulante Obtida por Fermentação Submersa a Partir do Fungo Termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31

Prof. Dr. Roberto da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

São José do Rio Preto, SP

Março/2013

UNESP-UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Dissertação de Mestrado “Produção e caracterização da protease coagulante obtida por fermentação submersa a partir do fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31”, apresentada por Bruna Lima da Silva, perante a banca examinadora em 05 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto da Silva

Universidade Estadual Paulista-Campus de São José do Rio Preto-SP
(Orientador)

Prof. Dr. Hamilton Cabral

Universidade de São Paulo-Campus de Ribeirão Preto-SP
(Titular)

Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez

Universidade Estadual Paulista-Campus de São José do Rio Preto-SP
(Titular)

*A minha família e amigos,
pelo amor, carinho, confiança,
torcida, apoio, e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele não seríamos nada;

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

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

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

A CAPES, pelo auxílio financeiro;

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

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

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

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

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

RESUMO

Proteases constituem uma das mais importantes enzimas industriais e uma de suas principais aplicações é na indústria láctica para produção de queijos. Devido à escassez do coalho tradicional de origem animal, proteases coagulantes microbianas estão sendo pesquisadas como substitutos. O coalho apresenta duas ações hidrolíticas sobre a caseína que caracterizam sua adequação como um bom coagulante, que são a atividade coagulante e a proteolítica. Quanto maior a razão entre coagulante / proteolítica (AC/AP), melhor o coagulante. O presente trabalho objetivou estudar a produção e caracterização da protease coagulante produzida pelo fungo termofílico *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 via fermentação submersa. As condições de produção estudadas foram: natureza e concentração da fonte de carbono e da solução salina, períodos de incubação e velocidade de agitação. Após a produção foi feita a caracterização físico-química que consistiu em determinar as condições de atuações ótimas da enzima. A partir dos resultados, observou-se que a melhor composição no meio fermentativo foi: 4 % de farelo de trigo, 0,3 % de solução salina, 72 horas de incubação a 45 °C e 150 rpm de agitação. Nestas condições os valores da atividade coagulante e da razão AC/AP foram 60,5 U/mL e 510, respectivamente. A enzima coagulante apresentou as características: pH e temperatura ótimos foram 5,5 e 65 °C, respectivamente; pH e temperatura de estabilidade foram 3,5 – 5,0 (retendo cerca de 80 % da atividade depois de 24 horas à temperatura ambiente) e até 60 °C (após uma hora na ausência de substrato). O conjunto dos resultados sugere a conclusão que a protease coagulante é promissora do ponto de vista tecnológico como substituto do coalho animal, principalmente, devido à sua alta especificidade representada pelo elevado valor da razão.

Palavras-chave: coagulante microbiano, farelo de trigo, fungo termófilo.

ABSTRACT

Proteases are one of the most important industrial enzymes and one of its main applications is in the dairy industry for the production of cheese. Due to the scarcity of renin bovine, microbial coagulants proteases are being researched as a substitute. The rennet has two hydrolytic action on casein featuring its suitability as a good coagulant, which are the milk-clotting and proteolytic activity. The higher the ratio milk-clotting / proteolytic (MCA/PA), the better the coagulant. The present study investigated the production and characterization of coagulant protease produced by thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 on submerged fermentation. The production conditions were: nature and concentration of the carbon source and saline, incubation and agitation speed. After production was performed physicochemical characterization that determined the conditions optimal of the enzyme. From the results, it was observed that the best composition of the fermentative medium was: 4 % wheat bran, 0,3 % saline, 72 hours of incubation at 45 °C and 150 rpm agitation. In these conditions the values of milk-clotting activity and the ratio MCA/PA were 60,5 U/mL and 510, respectively. The clotting enzyme had the characteristics: optimum of pH and temperature were 5,5 and 65 °C, respectively, pH and temperature of stability were 3,5 – 5,0 (retaining approximately 80 % of activity 24 hours at temperature environment) and even 60 °C (after one hour in the absence of substrate). The group of results showed that coagulant protease is promising technological point of view as a substitute for animal rennet, mainly due to their high specificity shown by the high value of the ratio.

Keywords: microbial coagulant, wheat bran, thermophilic fungus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Modificação no perfil de crescimento do *T.indicae-seudaticae* N31 devido à alteração na concentração da solução salina de 0,1, 0,3 e 0,5 %.....20
- Figura 2 -** Crescimento do *T.indicae-seudaticae* N31 em “pellets” em ocará como substrato via FSm.....20
- Figura 3 -** Crescimento filamentososo do *T.indicae-seudaticae* N31 em farinha de soja como substrato via FSm.....21
- Figura 4 -** Crescimento filamentososo do *T.indicae-seudaticae* N31 em farelo de trigo como substrato via FES.....21
- Figura 5 -** Micela em corte transversal, mostrando a estrutura em submicelas, as cadeias polipeptídicas da κ -caseína se projetando da superfície e os aglomerados de fosfato de cálcio (WALSTRA, 1999).....25
- Figura 6 -** Eletro micrografia da micela de caseína (DALGLEISH et al., 2004)....26
- Figura 7 -** Processo de sinérese (A); Aumento gradativo da consistência do gel (B).....28
- Figura 8 -** Tubo estoque do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.....32
- Figura 9 -** Banho termostático para testes de coalhos e coagulantes (A); Tubo de ensaio coagulado (B).....37
- Figura 10 -** Produção da enzima a partir de diferentes substratos a 1 %; 45 °C e 0,1 % solução salina. S1: FT, 72 horas, 150 rpm, AC=12,4 U/mL e R=282; S2: FT, 96 horas, sem agitação, AC=11,7 U/mL e R=275; S3: ES, 24 horas, 150 rpm, AC=9,8 U/mL e R=206; S4: OC, 48 horas, 150 rpm, AC=10,7 U/mL e R=192; S5: FS, 48 horas, 150 rpm, AC=6,4 U/mL e R=127.....41

- Figura 11 -** Interferência da velocidade de agitação na produção da enzima coagulante. FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.....49
- Figura 12 -** Determinação do pH ótimo representado pelas atividades coagulante (■) e proteolítica (□). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.....51
- Figura – 13** Efeito da longa exposição a diferentes valores de pH sobre as atividades coagulante (■) e proteolítica (□). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.....52
- Figura – 14** Determinação da temperatura ótima representada pelas atividades coagulante (A) e proteolítica (B). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.....54
- Figura 15 -** Efeito da incubação do extrato bruto durante 1 hora em diferentes temperaturas. AC (■); AP (□). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.....55
- Figura 16 -** Efeito da temperatura de descongelamento. AC (■); AP (□). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.....57
- Figura 17 -** Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento sobre as atividades coagulantes e proteolíticas. - 20 °C: AC (▲) AP (Δ); 7 °C: AC (■) AP (□); 25 °C: AC (●) AP (○). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.....59
- Figura 18 -** Avaliação do efeito da concentração do cloreto de cálcio na AC. FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Produção mundial de queijos em milhares de tonelada – 2000 / 2008*.....	23
Tabela 2 -	Composição centesimal (base seca) ¹ do farelo de trigo.....	30
Tabela 3 -	AC e Razão AC/AP a partir da combinação de diferentes concentrações de FT, diferentes concentrações de solução salina e período de incubação de 72 a 120 horas, 45 °C a 150 rpm.....	45
Tabela 4 -	Razão AC/AP e pH dos substratos relacionados ao farelo de trigo. FSm durante 72 horas, 45 °C, 150 rpm, solução salina de 0,3 %.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Atividade Coagulante
AP	Atividade Proteolítica
ES	Extrato de Soja
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Farinha de Soja
FSm	Fermentação Submersa
FT	Farelo de Trigo
FTC	Farelo de Trigo com Caseína
OC	Ocará
PA	Palha de Arroz
R	Ração
RM	Resíduo de Milho
SS	Solução Salina
TCA	Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1.	Fermentação.....	17
2.1.1.	<i>Obtenção de enzimas microbianas por meio de processo fermentativo.....</i>	<i>17</i>
2.2.	Crescimento de fungos filamentosos de acordo com o estado físico do meio fermentativo.....	19
2.3.	Coalhos e Coagulantes.....	22
2.4.	Estrutura da caseína.....	24
2.5.	Processo de coagulação.....	27
2.6.	Determinação e importância da Razão (R) entre AC e AP.....	28
2.7.	Aplicação de resíduos agroindustriais para produção de enzimas.....	29
3.	OBJETIVOS.....	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1.	Micro-organismo.....	32
4.2.	Pré-Inóculo.....	32
4.3.	Solução para suspender os micélios.....	33
4.4.	Meios fermentativos.....	33
4.4.1.	<i>Escolha da fonte de carbono.....</i>	<i>33</i>
4.4.2.	<i>Avaliação da FSm estática.....</i>	<i>34</i>
4.4.3	<i>Variação da concentração da fonte de carbono.....</i>	<i>34</i>

4.4.4.	<i>Variação da concentração da solução salina.....</i>	<i>34</i>
4.4.5.	<i>Combinação das concentrações de farelo de trigo e solução salina.....</i>	<i>35</i>
4.4.6.	<i>Componentes relacionados ao trigo.....</i>	<i>35</i>
4.4.6.1.	<i>Obtenção do glúten.....</i>	<i>35</i>
4.4.6.2.	<i>Obtenção do amido de trigo.....</i>	<i>36</i>
4.5.	Extração enzimática.....	36
4.6.	Determinação da atividade coagulante no leite.....	36
4.7.	Determinação da atividade proteolítica.....	37
4.8.	Determinação da Relação entre atividade coagulante e proteolítica.....	38
4.9.	Caracterização do extrato enzimático bruto por meio das atividades coagulante e proteolítica.....	38
4.9.1.	<i>pH ótimo.....</i>	<i>38</i>
4.9.2.	<i>pH de estabilidade.....</i>	<i>39</i>
4.9.3.	<i>Temperatura ótima.....</i>	<i>39</i>
4.9.4.	<i>Temperatura de estabilidade.....</i>	<i>39</i>
4.9.5.	<i>Efeito da temperatura de descongelamento.....</i>	<i>39</i>
4.9.6.	<i>Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento do extrato enzimático bruto sobre a atividade enzimática.....</i>	<i>40</i>
4.9.7.	<i>Influência da concentração do cloreto de cálcio na atividade coagulante... </i>	<i>40</i>
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1.	Influência do tipo de substrato na produção da enzima.....	41
5.2.	Efeito da concentração do substrato e da solução salina.....	44

5.3.	Variação simultânea da concentração do substrato, solução salina e período de incubação.....	45
5.4.	Componentes relacionados ao trigo.....	47
5.5.	Velocidade de agitação.....	49
5.6.	Caracterização do extrato bruto através das atividades coagulante e proteolítica.....	50
5.6.1.	<i>pH ótimo</i>	50
5.6.2.	<i>pH de estabilidade</i>	51
5.6.3.	<i>Temperatura ótima</i>	52
5.6.4.	<i>Temperatura de estabilidade</i>	54
5.6.5.	<i>Temperatura de descongelamento</i>	57
5.6.6.	<i>Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento do extrato enzimático bruto sobre a atividade enzimática</i>	58
5.6.7.	<i>Influência da concentração do cloreto de cálcio na atividade coagulante</i> ..	59
6.	CONCLUSÕES.....	61
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

Devido a vantagens operacionais como especificidade de reação e alta eficiência de conversão com pouca formação de metabólitos secundários, as enzimas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes setores industriais, destacando-se as indústrias de alimentos e bebidas, têxtil, papelaria e farmacêutica (PALMA, 2003; WEINGARTNER, 2010). Dentre as enzimas, as proteases constituem um dos grupos mais importante, devido à amplitude de usos industriais que vão desde as indústrias de detergentes, tintas, couros até alimentos e farmacêutica (KRISHNA et al., 2009). As proteases, também conhecidas como peptidases ou proteinases, apresentam a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas, peptídeos e polipeptídeos, elas representam em torno de 60 % do total de enzimas comercializadas mundialmente (RAO et al., 1998; SANDHYA et al., 2005).

Vários grupos de micro-organismos são capazes de produzir diferentes proteases por processos de fermentação. Entre eles os fungos têm sido amplamente empregados principalmente pelo fato de suas enzimas serem, na maioria dos casos, extracelulares, o que facilita o processo de extração e recuperação do meio de fermentação (RAO et al., 1998; GERMANO et al., 2003).

Uma das principais aplicações de proteases é na indústria láctica para a produção de queijos. Devido à escassez do coalho tradicional de origem animal, proteases coagulantes microbianas estão sendo pesquisadas como substitutos de renina animal. Vários estudos têm sido realizados na procura de proteases coagulantes de origem microbiana (CHANNE; SHEWALE, 1998; HASHEM, 1999; LIMA et al., 2003; TUBESHA e AL-DELAIMY, 2003; CAVALCANTI et al., 2005; KUMAR et al., 2005; SILVEIRA et al., 2005; SATHYA et al., 2009; KURUTAHALLI et al., 2010; DING et al., 2012) visando a aplicação na indústria láctica.

Para obtenção de queijo de boa qualidade, o método de coagulação, o coalho/coagulante, o fermento utilizado e os diferentes tratamentos dados à massa, é que determinam as características organolépticas do produto final (BONATO et al., 2006).

A renina apresenta duas ações hidrolíticas na caseína. A atividade coagulante que representa a especificidade da proteólise, ou seja, a capacidade de clivar a cadeia de aminoácidos rompendo a κ -caseína especificamente entre as unidades Phe105-Met106 e

a atividade proteolítica a qual hidrolisa, de modo inespecífico, outras ligações peptídicas da caseína, sendo considerada uma atividade generalizada, inespecífica, a qual compromete a consistência e promove o desenvolvimento de gosto amargo no queijo (ROBINSON; WILBEY, 1998; GAJO et al., 2012). Portanto, quanto maior a razão AC/AP melhor o coagulante, já que este, por sua vez, apresentará maior afinidade pela ligação Phe105-Met106 durante a etapa de coagulação do leite, implicando na diminuição da proteólise inespecífica excessiva durante a produção de queijos.

Em geral, há dois processos usuais de produção de enzimas microbianas. A fermentação no estado sólido (FES) que corresponde ao cultivo de micro-organismos sobre um substrato com relativa ausência de água livre, assegurando o estado sólido do cultivo e é geralmente realizado com substratos tais como grãos, bagaços e farelo de trigo (PANDEY, 2003). O segundo processo é a fermentação no estado líquido (FSm) em que o cultivo de micro-organismos se dá em culturas no estado líquido e é em geral, realizada com substratos solúveis.

A escolha do tipo de fermentação depende da adaptação fisiológica do organismo. Geralmente, em cultivo submerso a forma de crescimento de fungos filamentosos varia entre as formas “peletizadas” e “filamentosas”, cada uma tendo suas próprias características, que podem afetar a taxa de produção de enzimas por influenciar, uma vez que é afetada a difusividade e taxa de transferência de massa (MITCHELL; LONSANE, 1992; DASILVA et al., 2005).

O fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 tem sido estudado por nosso grupo e apresentou boas características para uso como coagulante via FES (MERHEB-DINI et al., 2010). Entretanto, devido às dificuldades inerentes a FES quando visa à produção em escala para a aplicação industrial, foi importante avaliar condições em que este fungo produzia a enzima sob FSm. O presente trabalho objetivou estudar a produção sob FSm e a caracterização da protease coagulante do fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fermentação

De acordo com Bonato et al. (2006), do ponto de vista bioquímico, a fermentação é um processo anaeróbico (ausência de oxigênio) de transformação de uma substância em outra, produzida a partir de micro-organismos, tais como bactérias e fungos denominados, nesses casos, de fermentos. Entretanto, o termo fermentação também é usado na biotecnologia para definir processos aeróbios (presença de oxigênio).

O desenvolvimento microbiano é monitorado durante todo o processo fermentativo, independente do estado físico do meio (líquido ou sólido). Além disso, a fermentação é uma via alternativa e muito importante para obtenção de enzimas, vitaminas, hormônios, pigmentos, biosurfactantes, biopesticidas, entre outros produtos de interesse industrial (PANDEY, 2003).

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

2.1.1. Obtenção de enzimas microbianas por meio de processo fermentativo

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

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

A FES é o cultivo de micro-organismos em meio fermentativo no estado sólido. Este processo envolve o cultivo de micro-organismos sobre um substrato com relativa ausência de água livre assegurando o estado sólido. Contudo, a umidade deve ser suficiente para garantir as atividades metabólicas. Emprega substratos tais como grãos, bagaços e farelo de trigo (PANDEY, 2003).

FSm é o cultivo de micro-organismos em meio fermentativo no estado líquido. A produção industrial de enzimas geralmente é realizada utilizando esta forma. Este processo envolve o crescimento cuidadosamente controlado, de micro-organismos selecionados (bactérias, leveduras ou fungos) em recipientes fechados contendo um caldo de nutriente (meio de fermentação) e uma alta concentração de oxigênio. Quando os micro-organismos degradam o substrato para metabolizar os nutrientes eles liberam a enzima desejada na solução.

Os sistemas de FES e FSm oferecem vantagens e desvantagens, um em relação ao outro. A FES oferece algumas vantagens em relação a FSm como, por exemplo: maior diversidade na utilização de resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, soja, arroz, bagaço de laranja, bagaço de cana, entre muitos outros; utiliza baixa quantidade de água, permitindo uma produção mais concentrada dos metabólitos, diminuindo a formação de água residual e diminuindo problemas de contaminação por bactérias durante o processo; e ainda, na maioria das vezes, as produções enzimáticas são maiores. Por outro lado, a maior desvantagem da FES é a dificuldade de controle efetivo dos parâmetros fermentativos, uma vez que o meio é heterogêneo, dificultando a homogeneidade na transferência de massa, calor, e umidade. O pH e difusão de oxigênio também são heterogêneos. Isto gera regiões de crescimento microbiano localizado e nem sempre homogêneas no fermentador. Além disso, a esterilização do meio é muito difícil, podendo ocorrer contaminações com frequência (GERMANO et al., 2003; PANDEY, 2003). Os desenhos de fermentadores industriais ainda são feitos

sob encomenda o que eleva muito o seu custo. Também deve se considerar a limitada variedade de micro-organismos capazes de crescer em níveis de umidade reduzida (SOCCOL et al., 2003).

Por outro lado, a FSm permite o controle dos parâmetros físico-químicos do processo e apresenta fácil recuperação das enzimas extracelulares, micélio ou esporos além de possuir facilidade de cultivo em grande escala, já que garante a homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo (SANDHYA et al., 2005; PINHEIRO, 2006). A produção de enzimas em escala industrial se faz, majoritariamente, por fermentação submersa (WANDERLEY et al., 2011).

2.2. Crescimento de fungos filamentosos de acordo com o estado físico do meio fermentativo

O crescimento vegetativo de fungos filamentosos em meios em estado líquido, semi-sólido ou sólido é afetado pelas condições ambientais e pela composição do meio de crescimento (Figura 1). Portanto, alterações morfológicas e fisiológicas são susceptíveis de serem observadas como resultado destas mudanças, e, por conseguinte, também é factível uma alteração tanto no nível de expressão quanto nas propriedades catalíticas de uma determinada enzima (CÁNOVAS; IBORRA, 2003). Geralmente, em FSm a forma de crescimento dos fungos filamentosos varia entre a forma de “pellets” e filamentosa (Figuras 2 e 3 respectivamente), enquanto na FES predomina a forma micelial (filamentosa) (Figura 4), cada qual com características próprias, que podem afetar a taxa de produção da enzima, dentre outros fatores, pela influência da taxa de transferência de massa que é o movimento de um componente específico num sistema de vários componentes (MITCHELL; LONSANE, 1992).

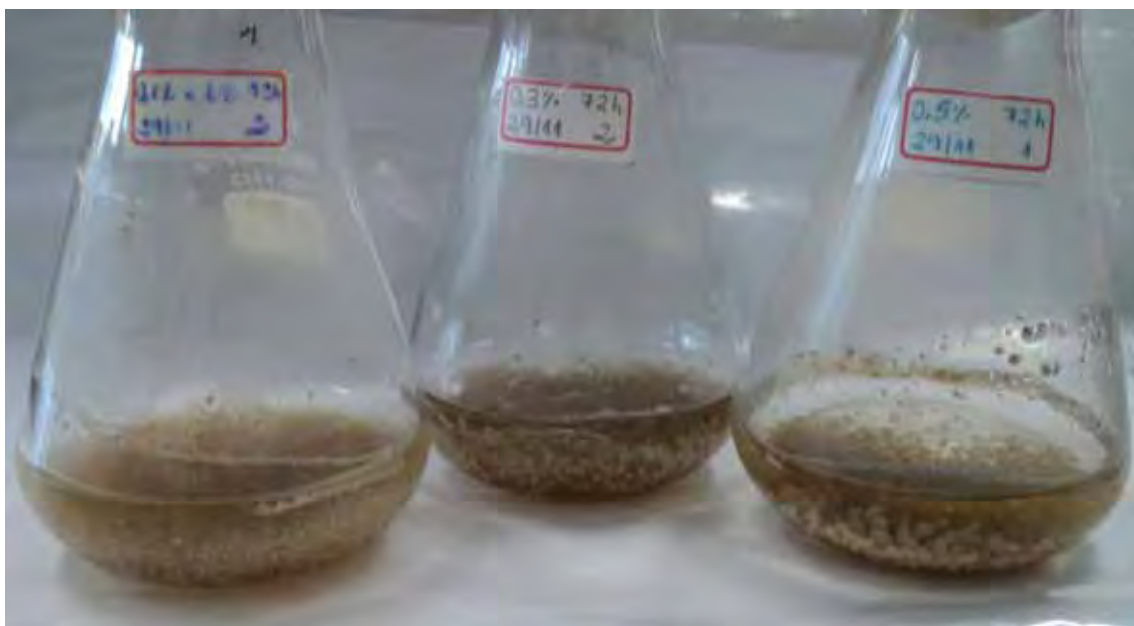


Figura 1. Modificação no perfil de crescimento do *T.indicae-seudaticae* N31 devido à alteração na concentração da solução salina de 0,1, 0,3 e 0,5 %.



Figura 2. Crescimento do *T.indicae-seudaticae* N31 em “pellets” em ocará como substrato via FSm.



Figura 3. Crescimento filamentososo do *T.indicae-seudaticae* N31 em farinha de soja como substrato via FSm.



Figura 4. Crescimento filamentososo do *T.indicae-seudaticae* N31 em farelo de trigo como substrato via FES.

2.3. Coalhos e Coagulantes

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

Na fabricação da maioria dos queijos, são empregadas enzimas proteolíticas (coalho); dentre essas, a mais utilizada é a renina, a qual atua de modo específico sobre a caseína e suas distintas frações (LIMA et al., 2003), evitando a proteólise excessiva e com isso o amargor que alguns outros coalhos promovem.

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

Em coalhos de animais recém-nascidos a proporção média de quimosina : pepsina é em torno de 80 % : 20 %, e em animais mais velhos, esta proporção é inversa. Esta informação é importante, uma vez que as pepsinas apresentam menor grau de especificidade, hidrolisando ligações indesejáveis o que diminui a qualidade do coalho e aumenta o amargor, já a quimosina é considerada altamente específica não deixando residual amargo, porque hidrolisa a ligação peptídica entre os aminoácidos 105 (fenilalanina) e 106 (metionina) (GAJO et al., 2012). As duas partes resultantes são a para- κ -caseína insolúvel (resíduos de aminoácidos de 1 a 105, que formará o paracaseinato de cálcio) que permanece associada à micela de caseína e um peptídeo solúvel (glicomacropéptido; resíduos 106 a 169) (ROBINSON; WILBEY, 1998).

Ao observarmos a Tabela 1 é evidente o aumento da produção de queijos durante os anos de 2000 a 2007, tanto no Brasil (43,82 %) como nos demais países (17,47 %), e esse crescente aumento em conjunto com a diminuição na produção de coalho de origem bovino, devido à baixa disponibilidade de animais jovens para abate,

resultou em um aumento no custo de produção (EMBRAPA, 2008; ESCOBAR; BARNETT, 1993).

Tabela 1. Produção mundial de queijos em milhares de tonelada – 2000 / 2008*.

Países	Milhares de Toneladas								
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008*
AMÉRICA DO NORTE	4.208	4.216	4.372	4.350	4.504	4.645	4.761	4.833	4.911
Canadá	328	329	350	342	345	352	291	297	300
Estados Unidos	3.746	3.747	3.877	3.882	4.025	4.150	4.325	4.389	4.461
México	134	140	145	126	134	143	145	147	150
AMÉRICA DO SUL	890	900	840	785	840	895	1.008	1.055	1.155
Argentina	445	440	370	325	370	400	480	475	515
Brasil	445	460	470	460	470	495	528	580	640
UNIÃO EUROPÉIA**	5.861	5.865	5.993	6.205	6.481	6.625	6.801	6.870	6.975
EX – URSS	287	365	469	504	574	649	622	663	690
Rússia	220	260	340	335	350	375	405	420	430
Ucrânia	67	105	129	169	224	274	217	243	260
ÁFRICA	380	395	414	463	468	473	475	n.d.	n.d.
Argélia	n.d.	n.d.	4	13	13	13	13	n.d.	n.d.
Egito	380	395	410	450	455	460	462	n.d.	n.d.
ÁSIA	49	54	57	78	82	84	92	98	106
Coréia do Sul	15	20	20	23	24	24	28	30	32
Filipinas	n.d.	n.d.	1	6	6	5	6	7	7
Taiwan	n.d.	n.d.	n.d.	14	17	16	18	20	20
Japão	34	34	36	35	35	39	40	41	47
OCEANIA	670	655	725	669	694	672	654	668	664
Austrália	373	374	413	368	389	375	362	360	335
Nova Zelândia	297	281	312	301	305	297	292	308	329
TOTAL	12.345	12.450	12.870	13.054	13.643	14.043	14.413	14.187	14.501

* Previsão

** União Européia é composta por 27 países

Fonte: USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos Atualizado em abril/ 2008.

Por esse motivo vias alternativas de produção de coalho para promover a coagulação do leite na fabricação de queijos estão sendo estudadas incluindo coalho bovino de vacas adultas, proteases coagulantes de fungos e outras enzimas proteolíticas. Além de problemas encontrados para a extração da quimosina de bezerras como o alto custo, já mencionado, a presença de outras enzimas (pepsinas) as quais diminuem o rendimento da produção, também é um fator relevante. No entanto, a maioria das proteases de fontes alternativas têm um maior nível de inespecificidade, levando a uma diminuição do rendimento e possível desenvolvimento de amargor em alguns tipos de

queijo (CHITPINITYOL; CRABBE, 1997), por esse motivo vários trabalhos estão sendo desenvolvidos a fim de melhorar a razão a qual é obtida por meio da atividade coagulante, específica *versus* atividade proteolítica, inespecífica.

2.4. Estrutura da caseína

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

As caseínas são encontradas no leite em forma micelar, e classificadas como fosfoproteínas globulares insolúveis em pH 4,6 e a 20 °C (ROBINSON; WILBEY, 1998). Essa estrutura micelar é a base da estabilidade do leite já que essa estruturação é mantida por uma força de repulsão que é determinada como estabilidade (MACHADO, 2010).

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

A fração κ -caseína está próxima ou na superfície da micela e difere-se da α e β por conter uma região glicosilada, composta por três monossacarídeos (galactose, N-acetil-galactosamina e ácido N-acetil neuramínico), formando tri ou tetrassacarídeos, ligados aos resíduos treonil 131, 133, 135 ou 136 (SGARBIERI, 2005).

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

Os modelos se encaixam em 3 categorias: modelos *coat-core* (as micelas seriam esferas rígidas cobertas com uma camada de filamentos protéicos, a κ - caseína), modelos de sub-unidades (submicelas explicado acima por Cheftel et al. (1989); Fox e Brodkorb (2008). Além desses autores citados anteriormente, Walstra (1999) elaborou um modelo, no qual o fosfato de cálcio está presente como aglomerados dentre as submicelas – Figura 5) e modelos de estrutura interna, sendo que todos discutem sobre a composição e organização das β - caseína, α - caseína e κ - caseína no interior e exterior da micela, sobre a localização e função do fosfato de cálcio e sobre como toda a estrutura é estabilizada.

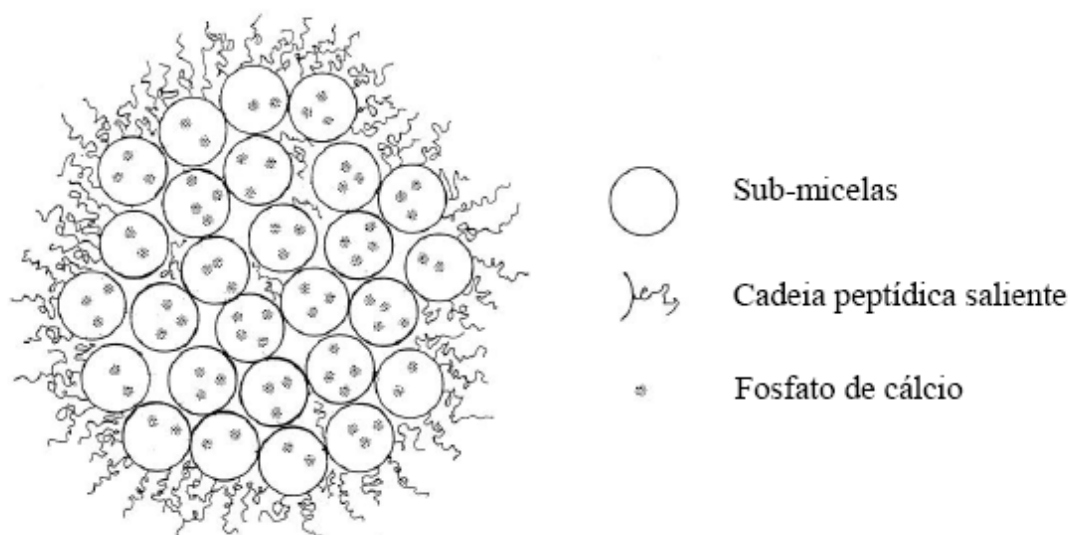


Figura 5. Micela em corte transversal, mostrando a estrutura em submicelas, as cadeias polipeptídicas da κ -caseína se projetando da superfície e os aglomerados de fosfato de cálcio (WALSTRA, 1999).

Apesar do modelo de submicelas ter aceitação na comunidade científica, alguns autores citados por Phadungath (2005) descrevem modelos alternativos para explicar a micela de caseína. Como proposto por Dalgleish et al. (2004) através de micrografia eletrônica de varredura, observaram que a superfície micelar não era apenas filamentos presos à uma esfera, eram pequenas estruturas de forma cilíndrica ou tubular, entre 10 a

20 nm de diâmetro, as quais se projetavam do interior, possuindo na extremidade a κ -caseína (Figura 6), o que proporciona uma maior área superficial e facilita a ação de moléculas menores como as enzimas, por exemplo.

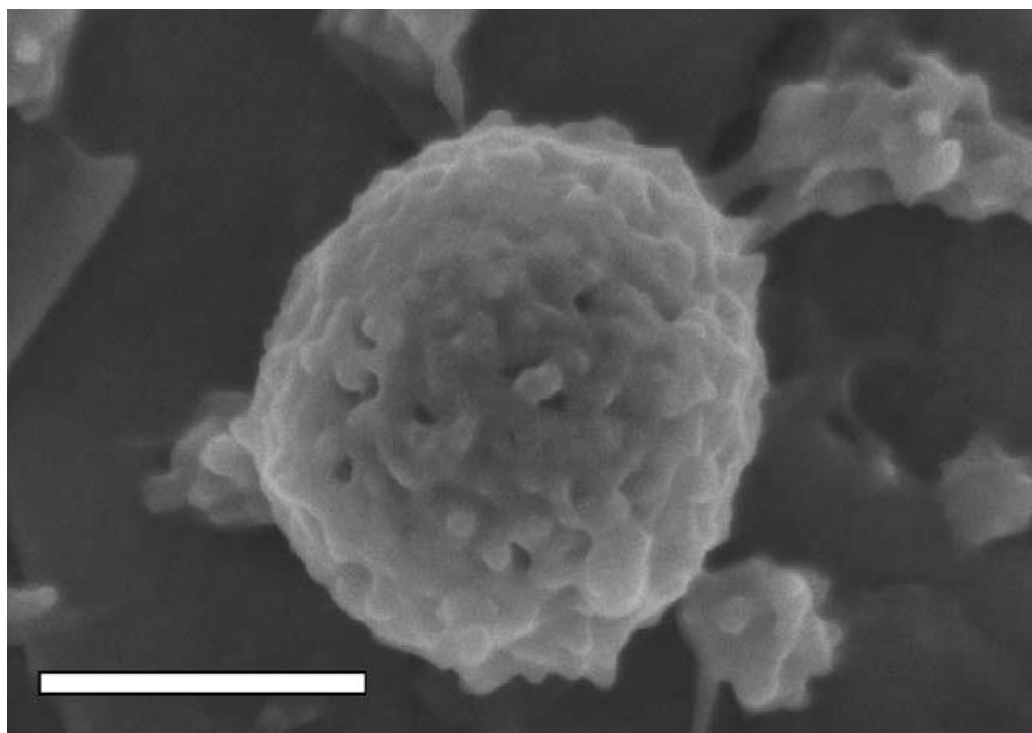


Figura 6. Eletro micrografia da micela de caseína (DALGLEISH et al., 2004).

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

2.5. Processo de coagulação

O leite apresenta-se como uma emulsão líquida constituída de duas fases: contínua e descontínua. A fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura (SGARBIERI, 2005). O início da fabricação de queijos envolve a coagulação das caseínas do leite, por enzimas proteolíticas coagulantes ou pela acidificação (BONATO et al., 2006).

Muitas proteases são capazes de coagular o leite, porém a que desempenha o papel de melhor agente desta ação é a renina devido às características de transformação que possui.

Bons agentes coagulantes são classificados de acordo com sua especificidade, pois uma elevada AP pode acarretar a quebra excessiva ou não das proteínas dos queijos e esta quebra desordenada compromete a consistência e ainda propicia o desenvolvimento de gosto amargo, devido à liberação de pequenos peptídeos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos os quais podem interagir com receptores de amargor na cavidade oral (GAJO et al., 2012).

Essa especificidade que faz com que a renina seja adequada foi explicada por Robinson e Wilbey (1998) no fato da sua capacidade de hidrolisar a cadeia de aminoácidos rompendo a κ -caseína especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). As duas partes resultantes são a para- κ -caseína insolúvel (resíduos de aminoácidos de 1 a 105, que formará o paracaseinato de cálcio) que permanece associada à micela de caseína e um peptídeo solúvel (glicomacropéptídeo; resíduos 106 a 169).

A hidrólise enzimática que ocorre na produção do queijo ou o tratamento a altas temperaturas resultam na remoção ou dissociação da κ -caseína da superfície das micelas, eliminando a estabilidade eletrostática e estérica da superfície micelar e aumentando a hidrofobicidade de superfície (SGARBIERI, 2005), com isso, a para- κ -caseína não mais estabiliza a estrutura micelar e as frações alfa e beta podem precipitar, na presença de cálcio, formando o coágulo, onde a gordura fica retida e o soro formado é expulso pelo processo de sinérese (Figura 7A) (REID et al., 1997; BONATO et al., 2006).

A consistência do gel é aumentada gradativamente, à medida que aumenta a rigidez dos retículos de caseinato de cálcio, culminando a um ponto ideal, em função da elasticidade requerida na massa para queijos (Figura 7B) (BONATO et al., 2006).

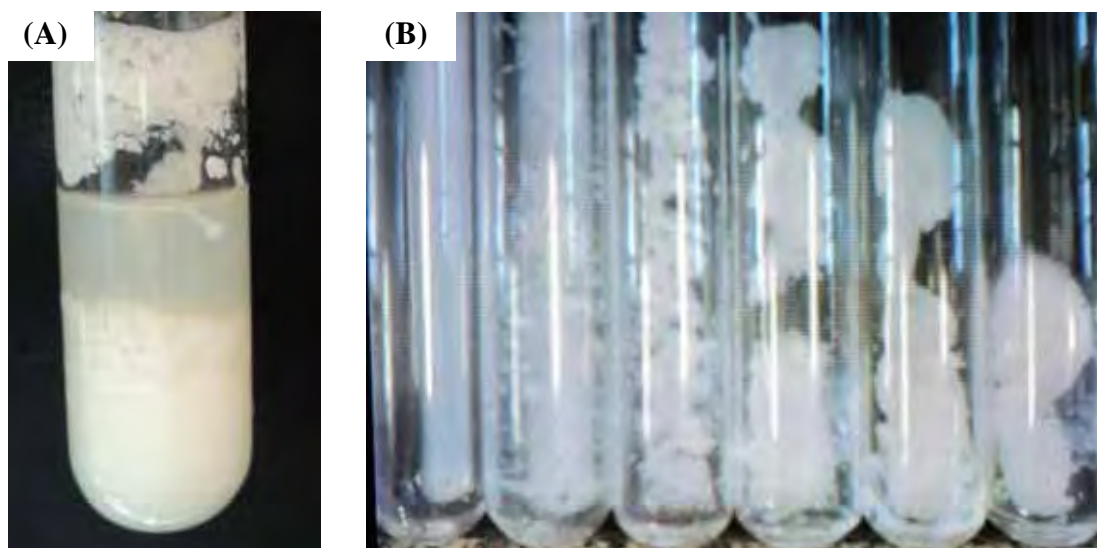


Figura 7. Processo de sinérese (A); Aumento gradativo da consistência do gel (B).

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

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

O motivo pelo qual a renina é considerada adequada para a produção de queijo é devido à sua elevada AC e baixa AP o que culmina em uma elevada R, já que $AC/AP=R$. Essa relação é utilizada para determinar a capacidade de um extrato enzimático como substituto do método convencional.

Segundo Hashem (1999) a razão é usada como um índice para justificar a adequabilidade de um extrato enzimático para uso como substituto de coalho. E para ser

utilizada como um índice que justifique o aproveitamento do extrato como substituto de renina o R deve ser maior que 1, ou seja, possuir mais AC do que AP.

A partir dessas informações foram feitos testes com o *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 via FSm, em diferentes meios fermentativos e dias de produção variados a fim de obter uma condição em que a AC fosse alta e AP baixa, promovendo, portanto um elevado valor de R.

2.7. Aplicação de resíduos agroindustriais para produção de enzimas

Vários resíduos agroindustriais podem ser empregados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas (BOCCHINI et al., 2005), devido à disponibilidade e por representar uma fonte alternativa de baixo custo. De modo geral, a preocupação em relação à utilização mais eficiente de resíduos agroindustriais vem aumentando a cada ano (CARVALHO et al., 2008), e isso ocorre, principalmente, a fim de reduzir custos com o descarte desses resíduos no meio ambiente.

Por meio da conscientização ecológica e sabendo que os setores agroindustriais e de alimentos são responsáveis por gerar grandes quantidades de resíduos muitos trabalhos e linhas de pesquisas estão sendo desenvolvidos a partir de fermentações, tanto em estado sólido como submerso para produção de enzimas com aplicação comercial. Em relação à produção de proteases podem ser citados os trabalhos de: Germano et al. (2003); Tubesha e Al-Delaimy (2003); Cavalcanti et al. (2005); Sandhya et al. (2005); Silveira et al. (2005); Krishna et al. (2009); Sathya et al. (2009); Merheb-Dini et al. (2010); Rocha (2010); Ding et al. (2012), os quais visaram desenvolver condições que minimizaria o descarte desses resíduos no meio ambiente.

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

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

nutrientes que compõem o farelo de trigo. Raupp et al. (2000) fizeram a análise da composição centesimal (base seca) do farelo de trigo (Tabela 2).

Tabela 2. Composição centesimal (base seca)¹ do farelo de trigo.

Fibra alimentar	Carboidrato digerível²	Proteína	Lipídio	Cinza
43,69	27,92	19,79	3,43	6,33

¹média de três determinações analíticas; ²estimado no hidrolisado produzido no procedimento analítico de determinação da fibra alimentar.

Fonte: adaptada de Raupp et al. (2000).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou estudar a produção e caracterização da protease coagulante produzida pelo fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 via fermentação submersa. Além disso, buscou produzir um extrato enzimático com uma elevada razão entre atividade coagulante / atividade proteolítica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão descritas as etapas utilizadas para o processo de produção, composição dos meios de fermentação, processo de extração enzimática, análises para a obtenção dos valores de AC e AP e a caracterização da enzima bruta.

4.1. Micro-organismo

A obtenção do fungo filamentososo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Figura 8) se deu a partir da coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP. Para seu cultivo e manutenção utilizaram-se tubos de cultura com meio Sabouraud Dextrose Agar. A incubação foi realizada a 45 °C durante 48 horas (ou até crescimento completo). Após o crescimento o armazenamento se deu em temperatura ambiente por se tratar de um fungo termofílico.



Figura 8. Tubo estoque do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31.

4.2. Pré-Inóculo

Do tubo de cultura estoque foi preparado o pré-inóculo, o qual funcionou como crescimento provisório do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e, posteriormente, como suspensão de micélios a qual foi transferida para os meios fermentativos.

Para prepará-lo foram utilizados 50 mL de meio de cultura Sabouraud colocados em frasco Erlenmeyer de 250 mL, autoclavado a 120 °C por 20 min, em seguida permaneceu inclinado até que o gel solidificasse e por fim, em condições estéreis, foi inoculado com uma alçada do tubo de cultura. Após a inoculação incubou-se, sem agitação, a 45 °C por 48 horas ou até crescimento completo.

4.3. Solução para suspender os micélios

Após crescimento total do pré-inóculo foi adicionado 100 mL de solução salina composta de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NH_4NO_3 , previamente esterilizada. A concentração utilizada foi de 0,1 % para cada sal. Em seguida a superfície do meio foi raspada com auxílio de uma alça de níquel-cromo a fim de se obter uma suspensão de micélios, a qual foi utilizada para inocular 1 mL em cada um dos frascos Erlenmeyer contendo os meios fermentativos.

4.4. Meios fermentativos

Foram preparados e autoclavados a 120 °C / 20 min, em frascos Erlenmeyer de 125 mL com volume fixo de solução salina (fonte de nitrogênio inorgânico) de 25 mL, pH 5,5 contendo os seguintes sais: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NH_4NO_3 e incubação a 45 °C. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata.

A seguir será descrita a composição e condições de incubação dos meios fermentativos avaliados:

4.4.1. Escolha da fonte de carbono

FSm com agitação de 150 rpm. Variou-se a fonte de carbono (farelo de trigo, farelo de trigo com caseína, palha de arroz, resíduo de milho, farinha de soja, extrato de soja e ocará) em concentração de 1 %, incubou-se durante 144 horas (com extrações a cada 24 horas) e solução salina na concentração de 0,1 % para cada sal.

Também foi testado com: dextrose, caseína e peptona de carne em concentração de 1 %. Para estes substratos a incubação foi feita durante 96 horas (com extrações a cada 24 horas) e solução salina na concentração de 0,3 % para cada sal.

4.4.2. Avaliação da FSm estática

Esse procedimento fez o uso da FSm sem agitação (estática). Os substratos testados foram: farelo de trigo, farinha de soja e extrato de soja na concentração de 1 %, por 144 horas de incubação (com extrações a cada 24 horas), solução salina na concentração de 0,1 % para cada sal.

4.4.3. Variação da concentração da fonte de carbono

Neste teste utilizou-se um único substrato, o farelo de trigo, já que apresentou melhor desempenho na produção da renina microbiana.

Foi variado a concentração de substrato em 2; 3; 4; 5 e 6 %, entretanto, a concentração de solução salina foi mantida a 0,1 %.

Os frascos Erlenmeyer foram incubados durante 144 horas (com extrações a cada 24 horas) a 150 rpm.

4.4.4. Variação da concentração da solução salina

O substrato utilizado foi o farelo de trigo onde a concentração foi mantida a 1 %. Porém, a solução salina teve suas concentrações variadas em 0,3; 0,5; 0,7 e 0,9 % para cada sal. O período de incubação foi de 144 horas (com extrações a cada 24 horas) a 150 rpm.

4.4.5. Combinação das concentrações de farelo de trigo e solução salina

Neste experimento variou-se simultaneamente a concentração de farelo de trigo em 3; 4 e 5 % e da solução salina em 0,3; 0,4 e 0,5 % para cada sal. Velocidade de agitação de 150 rpm. As extrações foram feitas em 72, 96 e 120 horas.

4.4.6. Componentes relacionados ao trigo

O procedimento baseou-se nos componentes individuais presentes no farelo de trigo: glúten a 2 e 4 %, amido de trigo a 2 e 4 %, farinha de trigo a 2 e 4 %, farelo de trigo com glúten a 4 %, farelo de trigo com amido de trigo a 4 %, farelo de trigo com farinha de trigo a 4 %, amido de trigo com glúten a 4 % e bagaço de cana a 2 e 4 % como fonte de fibras, as combinações realizadas tiveram a proporção de 1:1 mantidas.

Utilizou-se 0,3 % da concentração da solução salina com extração em 72 horas de produção e agitação de 150 rpm. Esses parâmetros foram escolhidos com base nos resultados obtidos nessas condições.

4.4.6.1. Obtenção do glúten

Utilizou-se 100 g farinha de trigo comercial (Nita) juntamente com 48 mL de água, a mistura foi amassada (em torno de 10 minutos) até que se obteve uma massa homogênea, a qual foi lavada sob água corrente até que a água não apresentasse a cor branca.

Após lavagem, a amostra foi congelada e em seguida liofilizada durante 24 horas. Já liofilizada, passou por processo de maceração até que fosse obtido um pó o qual foi utilizado nos demais experimentos.

4.4.6.2. Obtenção do amido de trigo

A água da lavagem da massa foi reservada em baldes, os quais ficaram em repouso até a decantação da maior parte do amido. Centrifugou-se o restante do sobrenadante para maior aproveitamento.

A pasta obtida foi colocada em estufa de circulação de ar a 60 °C até completa secagem, depois de seca macerou-se até formar um pó, o qual foi utilizado para os experimentos.

4.5. Extração enzimática

Para a extração enzimática filtrou-se o conteúdo de cada frasco Erlenmeyer em papel de filtro a vácuo e o extrato obtido foi centrifugado a 13776 g por 10 minutos a 5 °C. O sobrenadante obtido, denominado extrato enzimático bruto, foi congelado a -20 °C para posteriores ensaios enzimáticos.

4.6. Determinação da atividade coagulante no leite

Determinou-se a AC de acordo com Arima et al. (1970), com modificações. Cinco mL de solução 10 % (p/v) de leite desnatado (Itambé) acrescido com CaCl₂ 0,01 mol/L, foi pré-incubado em banho-maria a 35 °C durante 10 minutos. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de solução enzimática e iniciou-se a contagem do tempo.

A formação do coágulo foi observada enquanto rodava-se continuamente o tubo de ensaio em banho-maria termostático para teste de coalho/coagulante MA 470/Coalho/1 (Figura 9A).

O tempo em que as primeiras partículas (Figura 9B) foram formadas foi medido.



Figura 9. Banho termostático para testes de coalhos e coagulantes (A); Tubo de ensaio coagulado (B).

Uma unidade de atividade coagulante (MCU) foi definida como a quantidade de enzima necessária presente em 1 mL de extrato que coagulou 10 mL de substrato em 40 minutos e foi calculada de acordo com Shata (2005): $UAC/mL = 2400/t \times S/E$, onde t é o tempo necessário para formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume de enzima.

4.7. Determinação da atividade proteolítica

A AP foi determinada de acordo com Merheb et al. (2007), com modificações. Este procedimento requereu de um controle para cada amostra. A mistura da reação das amostras foi composta de 0,4 mL de caseína (Sigma) 0,5 % (p/v) diluída em tampão acetato 0,2 mol/L pH 5,5 como substrato; 0,4 mL de tampão acetato 0,2 mol/L pH 5,5 e 0,2 mL de extrato enzimático. A reação ocorreu em banho-maria a 35 °C e ao término de 30 minutos a reação foi interrompida devido a adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %; já para os controles a mistura da reação se diferenciou no momento da adição do extrato enzimático o qual foi adicionado após a interrupção da reação com TCA 10 %. As amostras e controles foram centrifugados a 11159 x g durante 9 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 280 nm.

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

4.8. Determinação da Relação entre atividade coagulante e proteolítica

O cálculo da Relação (R) entre atividade coagulante (AC) e proteolítica (AP) foi feito da seguinte maneira: $R = \text{Atividade Coagulante (U/mL)} / \text{Atividade Proteolítica (U/mL)}$.

4.9. Caracterização do extrato enzimático bruto por meio das atividades coagulante e proteolítica

4.9.1. pH ótimo

Para a atividade coagulante a análise do pH ótimo foi realizada em um banho-maria com rotação a 35 °C em uma faixa de pH de 5,0 a 7,5.

Em um tubo foi adicionado 5 mL de solução 10 % (p/v) de leite em pó desnatado (Itambé) diluído em tampão a 0,2 mol/L: Acetato (5,0 a 5,5), Mes (6,0 a 7,0) ou Taps (7,5), acrescido de $CaCl_2$ a 0,01 mol/L. Esta mistura foi previamente incubada durante 10 minutos, em seguida adicionou-se 0,5 mL do extrato enzimático e o tempo foi marcado até a coagulação.

Na atividade proteolítica a faixa de pH analisada foi de 4,5 a 8,5, os tampões utilizados tinham molaridade de 0,4 mol/L: Acetato (4,5 a 5,5), Mes (6,0 a 7,0) ou Taps (7,5 a 8,5) e a solução de caseína 0,5 % foi diluída em água.

4.9.2. pH de estabilidade

Houve um pré-tratamento da enzima na determinação do pH de estabilidade, onde a mesma foi diluída em proporção de 1:1 em soluções tampão a 0,4 mol/L: Acetato (3,5 a 5,5); Mes (5,5 a 7,0) e Taps (7,5 a 9,5) e mantida a 25 °C por 24 horas.

Ao término desse período, alíquotas de todos os pH foram tomadas para os ensaios de atividade coagulante e proteolítica residuais, os quais procederam conforme os itens 4.6. e 4.7., respectivamente.

4.9.3. Temperatura ótima

Para a determinação deste parâmetro, a faixa de temperatura testada compreendeu de 35 a 80 °C com variação de 5 °C.

As análises prosseguiram como descritas nos itens 4.6. e 4.7. em cada uma das temperaturas avaliadas.

4.9.4. Temperatura de estabilidade

A análise da temperatura de estabilidade da enzima requereu de um pré-tratamento, o qual consistiu na pré-incubação do extrato enzimático em banho-maria durante 1 hora em cada uma das temperaturas testadas entre 35 a 80 °C (com variação de 5 °C), em seguida as análises foram feitas de acordo com os itens 4.6. e 4.7. a 35 °C.

4.9.5. Efeito da temperatura de descongelamento

Alíquotas congeladas de extrato enzimático foram submetidas a diferentes temperaturas (4, 15, 23, 35 e 60 °C) somente o tempo suficiente para o descongelamento.

Em seguida, seguiu-se com as análises mencionadas nos itens 4.6. e 4.7.

4.9.6. Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento do extrato enzimático bruto sobre a atividade enzimática

O experimento consistiu em analisar a viabilidade da atividade enzimática do extrato bruto ao decorrer de 10 semanas de armazenamento em diferentes temperaturas (-20 °C, 7 °C e 25 °C).

Após a extração enzimática foram determinadas as atividades coagulantes e proteolíticas no tempo zero.

Para o armazenamento a -20 °C nada foi adicionado ao extrato, todavia a fim de prevenir o crescimento microbiano, foi adicionado 0,2 % de azida sódica nos tubos armazenados a 7 e 25 °C.

A cada semana as atividades coagulantes e proteolíticas foram realizadas com o objetivo de determinar a estabilidade da enzima.

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

Foi adicionado à solução 10 % (p/v) de leite desnatado (Itambé) diferentes concentrações de CaCl_2 (0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06 e 0,1 mol/L), em seguida a AC foi determinada de acordo com o item 4.6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Influência do tipo de substrato na produção da enzima

A atividade enzimática foi avaliada até o sexto dia, com agitação de 150 rpm, em diferentes substratos a 1 % de concentração: farelo de trigo (FT), palha de arroz (PA), resíduo de milho (RM), farelo de trigo com caseína (FTC), extrato de soja (ES), farinha de soja (FS), ocará (OC), dextrose, caseína e peptona de carne. Também foi avaliada a produção enzimática sem agitação com farelo de trigo, farinha de soja e extrato de soja a 1 %, durante seis dias.

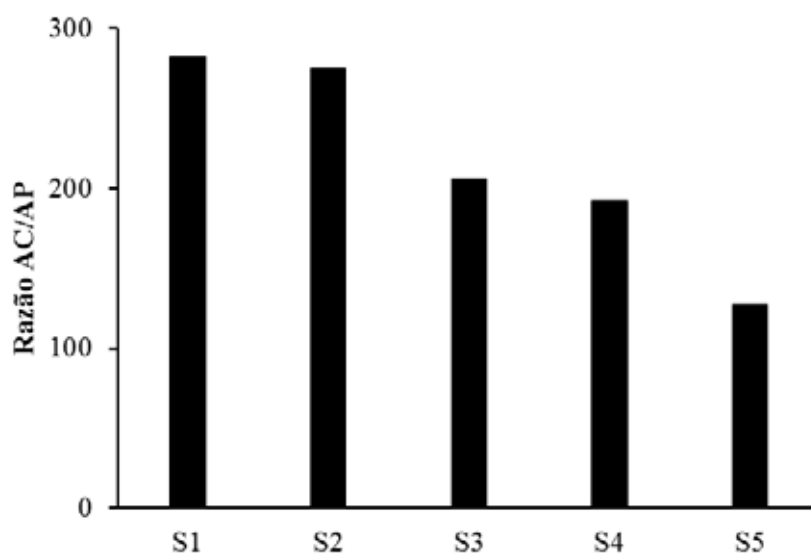


Figura 10. Produção da enzima a partir de diferentes substratos a 1 %; 45 °C e 0,1 % solução salina. S1: FT, 72 horas, 150 rpm, AC=12,4 U/mL e R=282; S2: FT, 96 horas, sem agitação, AC=11,7 U/mL e R=275; S3: ES, 24 horas, 150 rpm, AC=9,8 U/mL e R=206; S4: OC, 48 horas, 150 rpm, AC=10,7 U/mL e R=192; S5: FS, 48 horas, 150 rpm, AC=6,4 U/mL e R=127.

A Figura 10 mostra a produção da enzima em diferentes substratos, observou-se que o fungo *T. indicae-seudaticae* N31 foi capaz de produzir a enzima coagulante em diferentes períodos de incubação, isso ocorreu pela mudança do substrato. Entretanto,

observa-se que o FT (S1) apresentou os melhores resultados da razão e AC dentre os demais substratos testados, correspondendo a R=282 e AC=12,4 U/mL.

Portanto, foi determinado que a produção da protease fosse feita a partir do FT como substrato, já que foi o meio onde se obteve a maior AC nas condições com e sem agitação. Entretanto, seria utilizada a FSm com agitação, a princípio, por ter apresentado maior valor em menor tempo de fermentação (Figura 10- S1).

Como visto no presente trabalho, alguns fatores influenciam na produção enzimática, um deles é quando se altera o micro-organismo, por exemplo: 96 horas em FES *Aspergillus niger* MC4 (CHANNE; SHEWALE, 1998); 192 horas de incubação em fermentação estática com o *Penicillium oxalicum* (HASHM, 1999); 40 horas de FSm *Nocardopsis* sp (CAVALCANTI et al., 2005); 48 horas em FES *Rhizopus oryzae* (KUMAR et al., 2005); 48 horas de cultivo em FES *Mucor miehei* (SILVEIRA, 2007), sugerindo que não há um ponto fixo universal de melhor produção e ainda, além do micro-organismo, a fonte de carbono utilizada demonstrou ter papel vital na determinação do tempo de incubação (Figura 10).

O tipo de fermentação é um fator importante na produção da enzima, diferente do resultado obtido neste trabalho, Merheb-Dini et al. (2010) que também utilizaram o *T. indicae-seudaticae* N31 e o substrato FT, porém em FES, encontraram que o melhor período de produção foi no primeiro dia. E ainda, no presente trabalho utilizando FSm com agitação de 150 rpm e estática foi observado períodos diferentes de maior valor de AC, sendo o terceiro e o quarto dia, respectivamente (Figura 10 – S1 e S2).

Prakasham et al. (2006) também concordam que as características de produção variam, em geral, de micro-organismo para micro-organismo. A partir dos dados de caracterização completa do indivíduo isolado é feita uma avaliação do potencial de produção comercial. Merheb-Dini et al. (2010) completam afirmando que o tempo de produção normalmente ocorre de 2 a 8 dias.

Durante os testes preliminares utilizou-se a combinação de caseína ao farelo de trigo, já que alguns artigos a descrevem como intensificadora na produção da enzima. É o caso de Escobar e Barnett (1993), Lima et al. (2003) e Silveira et al. (2005), os quais utilizaram o fungo *Mucor miehei* e obtiveram, com essa combinação, um aumento na produção de renina microbiana. Entretanto, para o *T. indicae-seudaticae* N31 essa combinação não foi significativa para produção da enzima em nenhum dos períodos

avaliados (24 a 144 horas). Merheb-Dini et al. (2010) também observaram que a caseína adicionada ao farelo de trigo não aumentou significativamente a produção enzimática.

Vários substratos podem ser utilizados para a produção da renina microbiana (SILVEIRA et al., 2005): Channe e Shewale (1998) utilizaram o *Aspergillus niger* MC4 através de FES, e encontraram que o melhor meio para produção foi composto de amido, peptona de carne e solução e sais. Concluíram então, que o amido foi uma boa fonte, porque retardou liberação de açúcares durante a fermentação. O presente trabalho discorda de Channe e Shewale (1998), o qual ao avaliar o perfil de fermentação utilizando o amido, a peptona de carne, o amido combinado ao farelo de trigo (1:1) e o amido combinado ao glúten, obteve-se, em ambas as condições, valores insatisfatórios para a produção (Tabela 4); Beyenal et al. (1999) estudaram a estirpe comercial de *Mucor miehei* (NRRL 3420), a fermentação foi realizada em um fermentador alimentado continuamente, utilizando um meio contendo extrato de levedura, sais e D-glucose, obtiveram bons resultados; Cavalcanti et al. (2005) que cultivou o *Nocardopsis* sp via FSm em meios contendo sais e variações de concentração de farinha de soja e glicose também obtiveram resultados interessantes para produção, além disso, os autores consideraram este trabalho como uma alternativa promissora e de baixo custo já que o Brasil é um grande produtor de soja. Entretanto, como mostra a Figura 10, os resultados obtidos no presente trabalho, não foram satisfatórios para a produção com farinha de soja; Silveira et al. (2005) com o *Mucor miehei* em FSm conseguiram produzir a enzima a partir de farinha de semente de algodão e água de maceração de milho. Já em 2007 por meio de FES utilizou o farelo de trigo combinado com HCl, farelo de laranja, aveia e farelo de arroz, com e sem suplementação de caseína. Encontrou bons resultados com essas combinações e constatou que a caseína potencializa a síntese de renina (SILVEIRA, 2007); Kumar et al. (2005) produziram a protease coagulante através do fungo *Rhizopus oryzae* por meio de FES com farelo de trigo; Merheb-Dini et al. (2010) através da FES com o *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 mostraram que o farelo de trigo por si só foi um bom substrato para a produção de AC, concordando com os resultados obtidos neste estudo.

Bons resultados utilizando-se o farelo de trigo também foram constatados por outros autores ao estudar outros fungos (TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003; KURUTAHALLI et al., 2010; DING et al., 2012). Como demonstrado por vários autores e também no presente trabalho, o farelo de trigo é um dos substratos de maior

potencial na produção da renina microbiana, resultando em alta AC, AP relativamente baixa e, portanto, uma elevada razão AC/AP, resultado interessante para a produção como explicado anteriormente. Além disso, o farelo de trigo é um resíduo, tornando o processo de produção mais acessível e menos dispendioso.

5.2. Efeito da concentração do substrato e da solução salina

A partir dos resultados preliminares determinou-se que o FT seria o substrato utilizado, em processo de FSm com agitação de 150 rpm, incubação a 45 °C e tempo de incubação de 144 horas com extração a cada 24 horas. Entretanto, variações na concentração do substrato (FT) e da solução salina seriam feitas, neste experimento, separadamente a fim de avaliar qual dessas variáveis tem maior influência na resposta de produção enzimática.

Dois grupos de meios fermentativos foram preparados, no primeiro variou-se a concentração do substrato de 2, 3, 4, 5 e 6 % e manteve-se a concentração da solução salina em 0,1 %; no segundo grupo a concentração do substrato foi mantida a 1 % e aumentou-se a concentração da solução salina para 0,3, 0,5, 0,7 e 0,9 %. Ambos os experimentos foram realizados simultaneamente a 45 °C durante 144 horas a 150 rpm.

Ao término das fermentações observou-se que a concentração do substrato teve maior influência na resposta enzimática do que a concentração da solução salina, onde, as melhores condições para cada experimento foram de 3 % para a concentração de substrato e 0,3 % de concentração da solução salina, ambos em 72 horas de incubação, os valores de AC foram de 33,7 U/mL e 21,5 U/mL, respectivamente.

O experimento seguinte foi baseado neste teste, portanto adotou-se as melhores concentrações (substrato: 3, 4 e 5 %; solução salina: 0,3 e 0,5 %) e os melhores períodos de incubação (72 a 120 horas) para combiná-los e avaliar se há interação e um possível sinergismo entre essas variáveis.

5.3. Variação simultânea da concentração do substrato, solução salina e período de incubação

A partir do experimento anterior foram estabelecidas algumas combinações de condições que poderiam nos remeter a melhores respostas de produção enzimática.

A partir da Tabela 3 constatou-se que as variáveis são sinérgicas, à medida que ao combiná-las, foram obtidos resultados superiores aos demais resultados encontrados anteriormente.

Observou-se tanto um aumento da R quanto da AC, os quais atingiram valores de R superior a 400 em 2 dos 33 experimentos e AC superior a 60,0 U/mL em 3 dos 33, a condição que apresentou, ao mesmo tempo, valores elevados de R e AC foi alcançada em 72 horas de incubação, concentração do substrato de 4 % e solução salina de 0,3 % com valores de 510 e 60,5 U/mL, respectivamente.

Tabela 3. AC e Razão AC/AP a partir da combinação de diferentes concentrações de FT, diferentes concentrações de solução salina e período de incubação de 72 a 120 horas, 45 °C a 150 rpm.

FT	SS	72 h		96 h		120 h	
		AC (U/mL)	AC/AP	AC (U/mL)	AC/AP	AC (U/mL)	AC/AP
1	0,3	21,5 ± 0,8	377 ± 114	12,7 ± 3,8	298 ± 109	10,3 ± 6,3	322 ± 97
	0,4	-	-	-	-	-	-
	0,5	26,6 ± 4,4	288 ± 33	11,5 ± 1,8	210 ± 24	13,4 ± 3,9	297 ± 29
3	0,3	52,6 ± 2,8	378 ± 11	21,2 ± 4,8	165 ± 11	35,3 ± 15,0	223 ± 72
	0,4	38,2 ± 5,8	243 ± 9	35,9 ± 8,0	217 ± 46	34,4 ± 5,8	254 ± 99
	0,5	30,7 ± 8,3	476 ± 133	38,1 ± 0,9	236 ± 10	29,2 ± 11,8	184 ± 64
4	0,3	60,5 ± 4,3	510 ± 78	51,9 ± 7,2	382 ± 97	34,0 ± 9,0	328 ± 3,8
	0,4	54,2 ± 1,6	237 ± 9	51,1 ± 2,8	245 ± 2	51,9 ± 3,9	267 ± 29
	0,5	43,9 ± 3,5	246 ± 43	47,7 ± 8,8	226 ± 14	41,1 ± 0,5	227 ± 15
5	0,3	63,8 ± 5,6	311 ± 71	44,1 ± 5,1	254 ± 21	36,1 ± 6,3	262 ± 9,4
	0,4	67,1 ± 8,0	385 ± 115	57,9 ± 10,4	271 ± 9	38,8 ± 7,4	177 ± 28
	0,5	33,0 ± 4,2	145 ± 24	57,3 ± 7,2	253 ± 44	50,0 ± 10,1	373 ± 18

(-) Análise não realizada

A razão foi demonstrada em vários trabalhos: Preetha e Boopathy (1997) estudaram algumas propriedades da enzima a partir de *Rhizomucor miehei* NRRL 3500 e compararam com a enzima comercial (proveniente do bezerro e do *Mucor miehei*). A AP após um tratamento térmico foi determinada e expressa como um índice de termoestabilidade. Ao final do experimento observaram que a relação AC/AP do *Rhizomucor miehei* NRRL 3500 foi de 2,3, a do bezerro 4,9 e do *Mucor miehei* 2,0; Hashem (1999) que ao estudar alguns fungos determinou que o melhor produtor da enzima coagulante era o *Penicillium oxalicum* o qual a partir da fermentação estática obteve a razão de 4,55 em 8 dias de incubação. Esse valor quando comparado à razão obtida no presente trabalho utilizando o *T. indiciae-seudaticae* N31 é bem inferior, além disso, a produção enzimática ocorreu no terceiro dia de fermentação; Kurutahalli et al. (2010) fizeram a triagem entre 16 cepas de fungos e encontraram que o *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 foi o maior produtor em FES composto de farelo de trigo, farinha de soja desengordurada e leite em pó desnatado durante 120 horas de incubação, eles obtiveram o valor da razão no extrato bruto de 2,54; Merheb-Dini et al. (2010) através da FES com o *T. indiciae-seudaticae* N31 encontraram a maior razão de 76 em 24 horas de FES com o farelo de trigo; El-Baky et al. (2011) utilizaram a FSm com agitação de 150 rpm e produziram a renina microbiana com o basidiomiceto *Piptoporus soloniensis*, como resultado encontraram uma razão de 51. Os dois últimos trabalhos citados possuem as maiores razões quando comparados aos citados anteriormente, entretanto quando comparados aos dados obtidos neste trabalho observa-se que a razão AC/AP da enzima produzida pelo *T. indiciae-seudaticae* N31 via FSm é muito superior.

A razão é o parâmetro que justifica a adequabilidade do coagulante para a substituição do coalho, entretanto é válido comparar o tempo de coagulação (tempo necessário para que se formem os primeiros sinais de coágulo), uma vez que nem todos os trabalhos disponíveis na literatura utilizam a mesma fórmula para o cálculo, como no trabalho de Benlounissi et al. (2012), os quais estudaram algumas espécies de fungos produtores da renina microbiana, sendo que de todas as espécies avaliadas o *Aspergillus tamaris* foi aquele que mais rápido coagulou o leite (5 minutos), tempo semelhante quando compara-se à melhor condição encontrada no presente trabalho, descrita pela Tabela 3 (6 minutos).

5.4. Componentes relacionados ao trigo

O experimento seguinte teve como base os componentes principais do trigo, portanto, as fermentações foram realizadas a partir do glúten 2 e 4 %, amido de trigo 2 e 4 %, farinha de trigo 2 e 4 %, farelo de trigo com glúten 4 %, farelo de trigo com amido de trigo 4 %, farelo de trigo com farinha de trigo 4 %, amido de trigo com glúten 4 % e bagaço de cana 2 e 4 % como fonte de fibras, as combinações realizadas mantiveram a proporção de 1:1. A concentração da solução salina foi mantida a 0,3 % com extração em 72 horas de produção e agitação de 150 rpm.

Os resultados obtidos não foram satisfatórios, no fato de que a produção da protease foi baixa (Tabela 4). Os meios contendo somente: glúten, amido de trigo, farelo de trigo com glúten e bagaço de cana não apresentaram AC.

Tabela 4. Razão AC/AP e pH dos substratos relacionados ao farelo de trigo. FSM durante 72 horas, 45 °C, 150 rpm, solução salina de 0,3 %.

Fonte de carbono	Concentração do substrato			
	2 %		4 %	
	AC/AP	pH	AC/AP	pH
Glúten	-	8,3 ± 0,04	-	8,0 ± 0,02
Amido	-	3,7 ± 0,07	-	3,7 ± 0,05
Farinha de trigo	210 ± 15	3,7 ± 0,01	160 ± 60	3,7 ± 0,04
FT : Glúten	*	*	-	8,2 ± 0,11
FT : Amido	*	*	41 ± 1	3,6 ± 0,00
FT : Farinha	*	*	152 ± 11	3,6 ± 0,02
Amido : Glúten	*	*	145 ± 38	5,0 ± 0,47
Bagaço de cana	-	5,3 ± 0,01	-	5,1 ± 0,03

- Valor não calculado

* FSM não realizada

Embora tenham sido encontradas elevadas razões, os valores de AC foram demasiadamente baixos quando comparados ao experimento anterior (Tabela 3), determinando, por conseguinte, que esses substratos nessas concentrações não são adequados para a produção da renina microbiana. Contudo, esse experimento mostrou o comportamento do fungo em relação à intensa modificação do pH do meio o qual era, inicialmente, de 5,5. Como observado na Tabela 4, quando o meio foi composto somente por proteína (glúten) houve uma alcalinização e mesmo assim foi evidenciado o crescimento do fungo podendo, em algum momento, ter havido a produção enzimática, entretanto, através da caracterização da enzima foi constatado que em pH igual ou maior que 8 a mesma perde a atividade, isso provavelmente deve ocorrer devido à mudanças em sua estrutura tridimensional, portanto, se houve a produção enzimática, com o aumento do pH a mesma foi desnaturada.

Já quando possuiu maior concentração de carboidrato houve a acidificação em todos os meios testados e embora tenha havido o crescimento do fungo a ausência de proteína no meio provavelmente interferiu indicando que há necessidade de uma indução para a produção.

Em meios onde foi feita a combinação do glúten e amido (1:1) o pH se manteve na faixa de 5, próximo ao pH inicial, entretanto como mostra a Tabela 4, o pH não é, sozinho, capaz de determinar se há ou não a produção da enzima, já que no bagaço também estava por volta de 5 e não houve AC, talvez ao modificar a proporção de glúten e amido os resultados se mostrem de outra forma, entretanto mesmo se houvesse a mudança na proporção e um relativo aumento na produção, a tendência em apresentar um valor de AC baixo ainda permaneceria, já que na melhor condição o valor máximo de AC não passou de 10,9 U/mL.

O pH foi aferido durante todas as condições testadas, e as que se mostraram mais adequadas para produção da renina microbiana, compreendia o valor entre: 5,22 – 6,56, sendo que na melhor condição para produção (Tabela 3) o pH foi de 6,22.

5.5. Velocidade de agitação

Uma vez que cada micro-organismo tem sua resposta enzimática variada de acordo com o substrato, solução salina, tempo e temperatura de incubação, esta parte do estudo dedicou-se a avaliar a influencia da velocidade de agitação na produção enzimática, já que é um parâmetro de grande relevância, Ding et al. (2012) não estudaram a composição do meio, mas sim a velocidade de agitação e os níveis de aeração, parâmetros que segundo eles são pouco estudados, o micro-organismo de estudo foi o *Bacillus amyloliquefaciens*, o qual também se voltou para a produção de uma protease coagulante, com o trabalho obtiveram um valor máximo da produção quando modificaram a aeração de 350 para 500 rpm, a partir desse estudo o próximo experimento realizado teve como foco a velocidade de agitação do meio.

As melhores condições obtidas com o experimento ilustrado na Tabela 3 foram mantidas em todas as velocidades testadas.

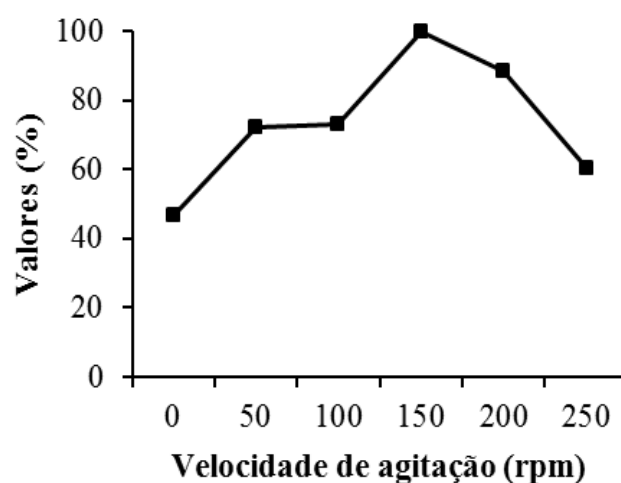


Figura 11. Interferência da velocidade de agitação na produção da enzima coagulante. FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.

De acordo com a Figura 11 a velocidade que foi utilizada durante todo o estudo já era, coincidentemente, a velocidade ideal de maior produção. Entretanto, com este experimento foi possível observar mudanças significativas no crescimento do fungo o qual cresceu somente em forma filamentosa quando não tinha agitação e em baixa

velocidade (50 rpm), já quando aumentou-se para 100 rpm foi notado o crescimento em ambas as formas filamentosas e peletizadas, esta velocidade demonstrou ser uma transição no modo de crescimento do fungo, por fim a partir de 150 rpm não observou-se mudanças significativas, crescendo somente em pellets.

5.6. Caracterização do extrato bruto através das atividades coagulante e proteolítica

5.6.1. pH ótimo

Essa determinação é importante uma vez que cada enzima possui o seu pH ótimo. A Figura 12 mostra o efeito que o pH exerce nas atividades coagulante e proteolítica, de acordo com estes gráficos observa-se que o pH ótimo da protease coagulante obtida a partir do *T. indicae-seudaticae* N31 via FSm é 5,5 em ambos os casos e conforme aumenta o pH há uma diminuição das atividades até se extinguirem em 7,5 para a coagulante e 8,0 para a proteolítica. Na AC o ponto inicial foi em 5,5, pois em pH menor que esse valor a análise ficaria comprometida uma vez que esse teste utiliza leite como base da reação e como é sabido, o pH de 4,6 corresponde ao ponto isoelétrico da caseína, assim a mistura da reação já estaria desestabilizada o que nos levaria a um resultado não confiável.

Como dito anteriormente, conforme o aumento do pH maior é a diminuição da atividade enzimática, esse comportamento é esperado já que a grande maioria das enzimas aspárticas produzidas por fungos tem uma melhor resposta em pH baixos. Resultados semelhantes ao presente estudo também foram observados nos trabalhos de Preetha e Boopathy (1997) utilizando o *Rhizomucor miehei*; Kumar et al. (2005) a partir do *Rhizopus oryzae*; Merheb et al. (2007), os quais utilizaram o *Thermoascus aurantiacus* e El-Baky et al. (2011) com o basidiomiceto *Piptoporus soloniensis*. Em ambos os trabalhos citados, conforme o aumento do pH a atividade enzimática era reduzida.

O pH inicial da mistura do leite para realizar o ensaio de AC também foi aferido e possuía o valor de pH em 6,26 valor esse que em um processo de produção industrial

poderia ser facilmente alterado já que em muitos processos de produção de queijos são adicionadas culturas “starter” as quais normalmente são compostas por bactérias acidulantes, portanto ao acidificar o pH do meio o efeito da enzima produzida pelo *T. indiciae-seudaticae* N31 seria favorecida.

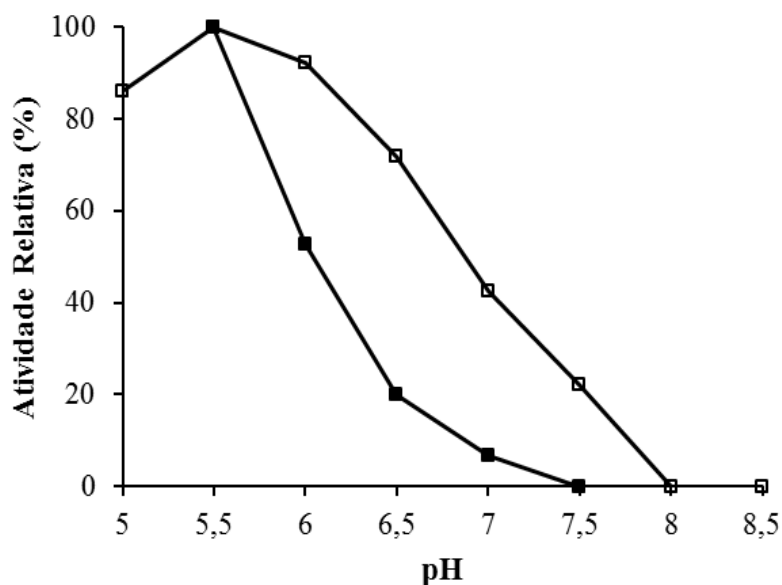


Figura 12. Determinação do pH ótimo representado pelas atividades coagulante (■) e proteolítica (□). FSM; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.

5.6.2. pH de estabilidade

O longo período de exposição da enzima em diferentes pH demonstrou que o pH em que sua atividade é ótima não é necessariamente o pH mais estável. Como ilustrado na Figura 13, pôde-se observar que em ambos os ensaios enzimáticos não foi encontrado uma ampla faixa de estabilidade. Além disso, os pontos de maior estabilidade para AC e AP são diferentes, sendo 4,0 e 4,5 respectivamente, também é notável que no ensaio da AC a queda no valor de atividade é mais acentuada quando comparado a AP. Resultado semelhante foi encontrado por Sardinias (1968) o qual caracterizou a renina microbiana produzida pela *Endothia parasítica* e encontrou que o

pH de estabilidade era 4,5, além disso, neste estudo também não foi encontrado uma ampla faixa de estabilidade.

Kumar et al. (2005) ao caracterizarem a protease obtida do *Rhizopus oryzae* e El-Baky et al. (2011) ao produzirem a renina microbiana a partir do basidiomiceto *Piptoporus soloniensis* encontraram que o pH de maior estabilidade era por volta do 6,0, entretanto, o primeiro manteve a estabilidade por uma ampla faixa de pH (4,0 – 9,0) com variação máxima de apenas 50 %, já o segundo manteve 70 % da atividade em uma pequena faixa de pH 3,0 – 5,0, atingindo o pico em pH 6,0 e decrescendo a partir daí até se extinguir em pH 7,5.

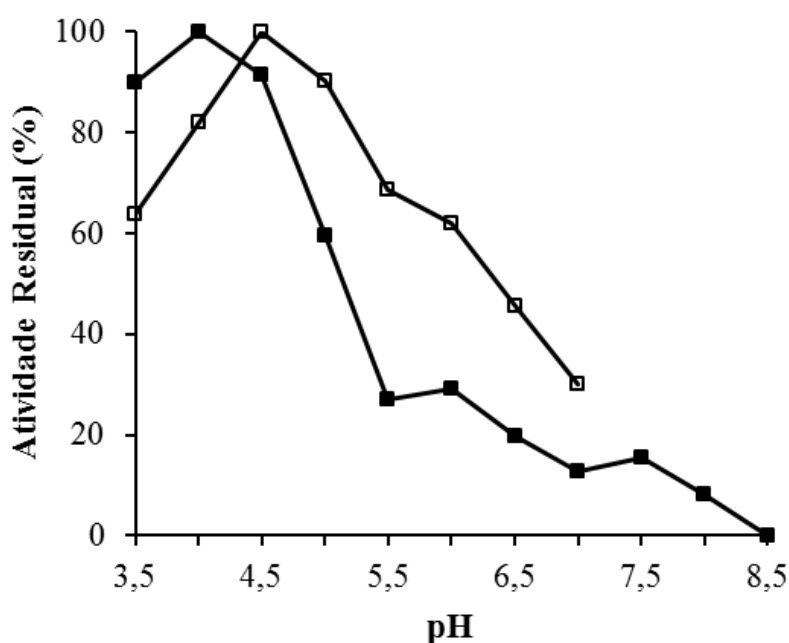


Figura 13. Efeito da longa exposição a diferentes valores de pH sobre as atividades coagulante (■) e proteolítica (□). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.

5.6.3. Temperatura ótima

Por se tratar de um fungo termofílico já era esperado que a temperatura ótima da enzima em questão teria sua atividade ótima em temperaturas elevadas.

A Figura 14A descreve o efeito que a temperatura exerceu sobre a atuação enzimática, onde o valor da atividade aumenta gradativamente até o valor máximo encontrado para AC, a 65 °C, o qual é sete vezes maior do que a 35 °C (temperatura de fabricação de grande parte dos queijos), em contrapartida a partir de 65 °C a atividade enzimática diminui. Quando se compara a eficiência desempenhada pela enzima em sua temperatura ótima (65 °C) com a temperatura de fabricação média de queijos (35 °C) observa-se uma performance cerca de cinco vezes maior, o que poderia ser tratado como empecilho para a aplicação da mesma na produção de queijos dado ao rendimento relativamente baixo à 35 °C, entretanto quando avalia-se o desempenho somente a 35 °C, observa-se que a ação desta renina microbiana é perfeitamente aceitável para tal aplicação, já que a AC e R são satisfatórias (60,5 U/mL e 510, respectivamente) na melhor condição apresentada pela Tabela 3.

Para a AP (Figura 14B) também foi observado um aumento gradativo da atividade enzimática, a qual aumenta até o pico em 60 °C e declina a partir dessa temperatura, observou-se que a diminuição da AP foi mais suave do que da AC.

No estudo de Merheb-Dini et al. (2010), os quais também produziram uma protease coagulante a partir do *T. indicae-seudaticae* N31, porém utilizando a FES, encontraram que tal enzima é estável até a 45 °C e a partir deste ponto declina até perder toda atividade em 60 °C. Este resultado quando confrontado ao obtido no presente trabalho indica que a enzima obtida via FSm resiste a temperaturas mais altas do que a enzima obtida via FES. A protease obtida por Kumar et al. (2005) a partir do *Rhizopus oryzae* também resistiu a elevadas temperaturas, aumentando sua atividade até os 60 °C, a partir deste ponto houve um declínio, até perder toda a atividade ao atingir os 70 °C.

Já a protease coagulante produzida pelo *Piptoporus soloniensis* no estudo de El-Baky et al. (2011) apresentou-se mais sensível à elevadas temperaturas, tendo o pico de atividade a 40 °C, decrescendo a partir dessa temperatura para apenas cerca de 20 % da atividade até se extinguir em 60 °C.

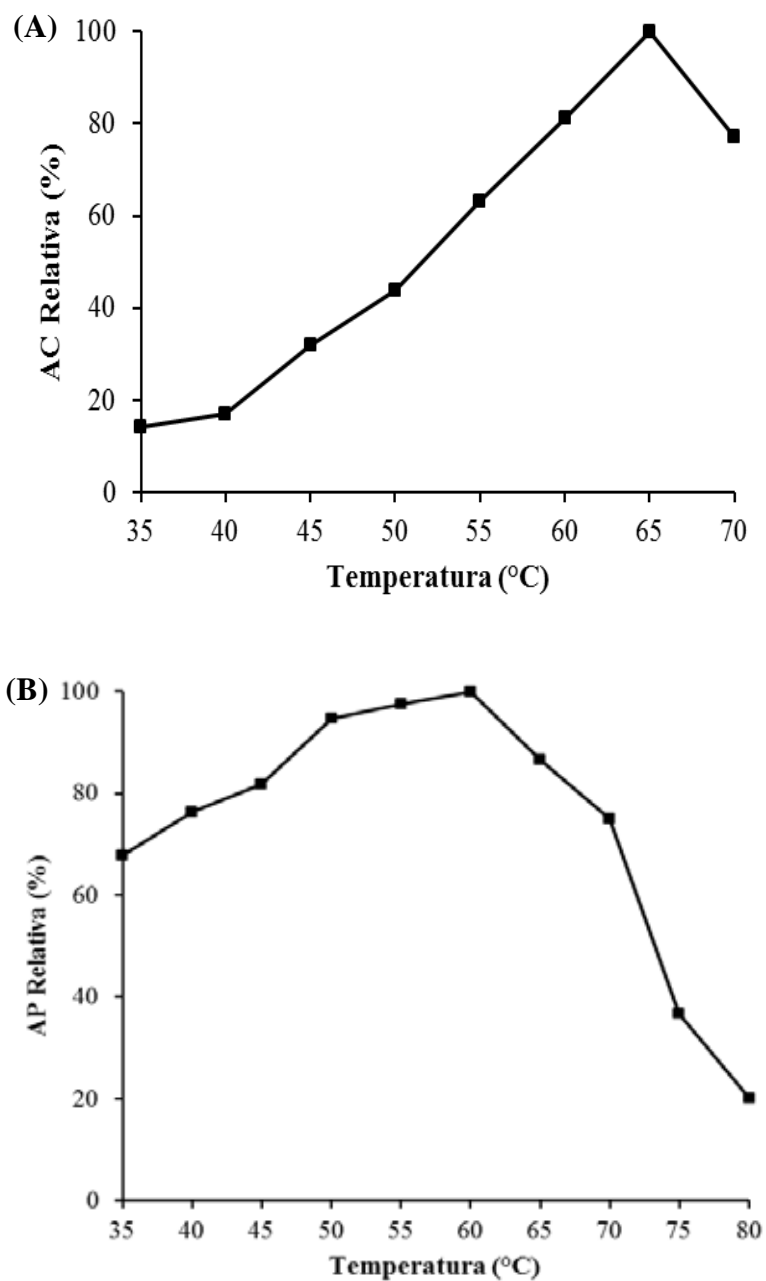


Figura 14. Determinação da temperatura ótima representada pelas atividades coagulante (A) e proteolítica (B). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.

5.6.4. Temperatura de estabilidade

O extrato enzimático foi submetido a diferentes temperaturas durante 1 hora, a Figura 15 mostra a estabilidade da enzima através da análise das atividades coagulante

(■) e proteolítica (□) as quais permaneceram estáveis até 55 °C e apresentaram aproximadamente 80 % de atividade residual a 60 °C, 50 % a 63 °C até perderem a atividade a partir de 65 °C.

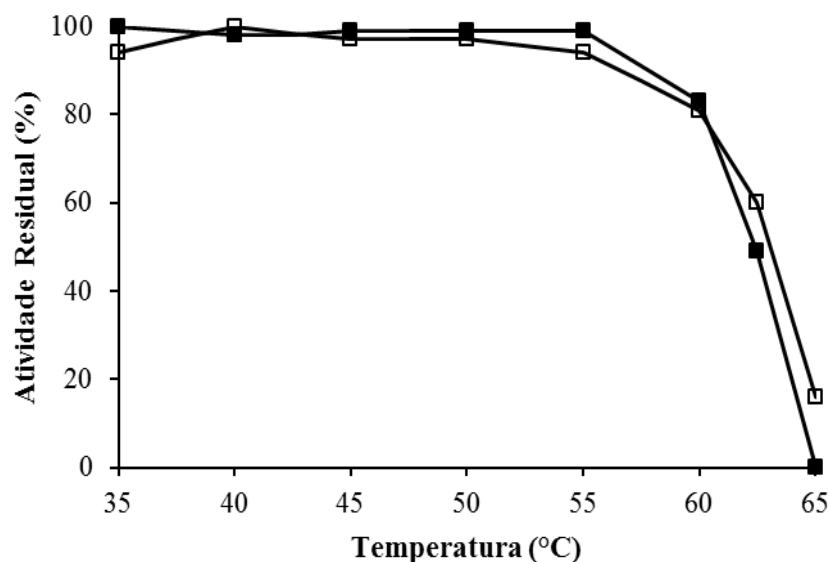


Figura 15. Efeito da incubação do extrato bruto durante 1 hora em diferentes temperaturas. AC (■); AP (□). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.

A protease apresentou termoestabilidade característica de enzimas obtidas de fungos termofílicos como a protease encontrada no trabalho de Li et al. (1997), os quais estudaram o *Thermomyces lanuginosus* via FSm, neste trabalho a atividade foi de aproximadamente 80 % quando submetida a 60 °C durante 50 minutos, resultado semelhante ao do presente estudo. Já Merheb et al. (2007) a partir do *Thermoascus aurantiacus* em FES, encontraram uma protease mais resistente, mantendo 100 % da atividade mesmo quando submetida à 60°C por 1 hora.

Resultado parecido também pôde ser observado a partir de fungos mesofílicos, como o caso de Channe; Shewale (1998) os quais obtiveram a partir do *Aspergillus niger* MC4 um extrato enzimático que apresentou elevada tolerância a altas temperaturas, sendo inativada somente quando aquecida a 60 °C durante 80 minutos.

O tipo de fermentação pode alterar algumas características da enzima como a temperatura de estabilidade, por exemplo. Quando se compara o presente estudo ao

trabalho Merheb-Dini et al. (2010) os quais produziram uma protease coagulante, a partir do mesmo micro-organismo (*T. indicae-seudaticae* N31) e substrato (FT), conclui-se que a temperatura de estabilidade térmica da enzima produzida em FSm é maior do que a produzida por FES, sendo de até 55 °C e 45 °C, respectivamente.

Outros trabalhos apresentaram resultados semelhantes ao estudo de Merheb-Dini et al. (2010), como: Hashem (1999), o qual encontrou uma protease coagulante mais sensível a elevadas temperaturas quando utilizou o *Penicillium oxalicum*, que manteve somente 52 % de AC a 50 °C durante 30 minutos. Resultado semelhante foi obtido por Shieh et al. (2009), os quais trabalharam com uma bactéria para a produção da enzima coagulante (*Bacillus subtilis* natto) e ao realizarem o teste de estabilidade da enzima observaram que a atividade decresceu para 47 % após incubação durante 40 minutos a 55 °C e se extinguiu a 65 °C, valores relativamente baixo quando comparado à atividade residual apresentada pelo *T. indicae-seudaticae* N31 via FSm, a qual caiu para aproximadamente 50 % somente quando submetida por 1 hora a 63 °C.

Enzimas resistentes a elevadas temperaturas vem sendo estudadas, uma vez que as enzimas não resistentes podem perder sua atividade dado ao armazenamento inadequado, feito em temperaturas elevadas, por exemplo. No entanto, Wilkinson e Kilcawley (2005) descrevem que a maior parte da enzima é expulsa do coágulo, sendo liberada juntamente com o soro no processo de produção de queijos, contudo, essa parte remanescente no coágulo ainda pode promover a proteólise, o que levaria ao aparecimento de um gosto amargo bem como uma alteração na textura. Já que a renina bovina é aquela que melhor desempenha a função de coagulação do leite é interessante, portanto, produzir um coagulante microbiano com características que se assemelham a ela. Uma parte do estudo de Moschopoulou et al. (2006), foi avaliar a temperatura de inativação da renina de bezerro, a qual se tornou inativa a partir de 62 °C em pH de 6,2, resultado similar ao encontrado no presente estudo, onde a atividade se extingue em 65 °C.

5.6.5. Temperatura de descongelamento

O método de descongelamento é importante em produtos com elevado teor de proteína. Nestes casos, o descongelamento lento é preferencial, já que nestas condições a água pode retornar lentamente à posição original, anterior ao congelamento, através da difusão (COLLA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003).

A temperatura de descongelamento em composições com elevado teor protéico é descrita como um fator desnaturante, ou seja, pode haver perda da funcionalidade, em vista disso, foi feito um teste o qual utilizou diferentes temperaturas para o descongelamento (4, 15, 23, 35 e 60 °C), onde as amostras congeladas permaneceram incubadas apenas tempo suficiente para descongelar.

A Figura 16 mostra que a protease coagulante produzida pelo *T. indicaseudaticae* N31 produzida via FSm é estável ao descongelamento, seja ele lento ou rápido, sendo que a máxima variação dos valores obtidos não chegou a 15 %, ou seja, a atividade foi mantida mesmo quando submetida às temperaturas elevadas (descongelamento rápido). Essa característica pode estar relacionada ao fato de ser um micro-organismo termofílico.

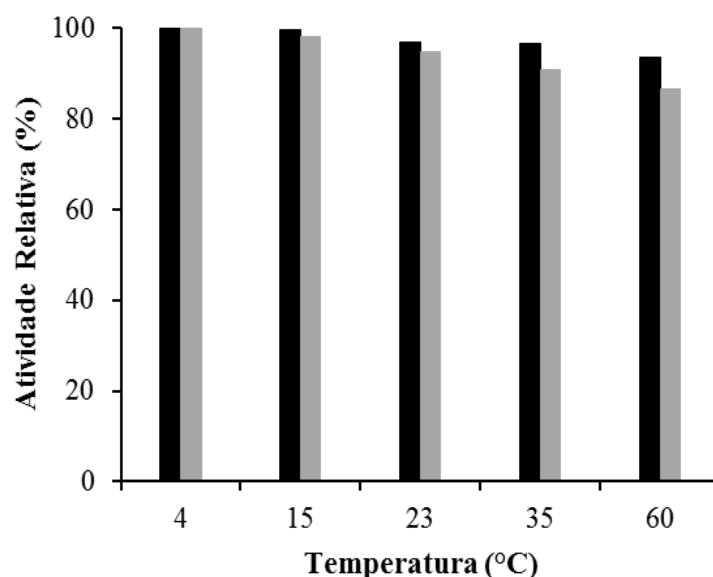


Figura 16. Efeito da temperatura de descongelamento. AC (■); AP (□). FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.

5.6.6. Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento do extrato enzimático bruto sobre a atividade enzimática

A estabilidade de uma enzima ao armazenamento é fator crítico para sua comercialização e se manter estável a uma ampla faixa de temperatura e durante no mínimo 10 semanas de armazenamento é uma característica interessante do ponto de vista comercial.

A Figura 17 mostra as AC e AP da enzima armazenada em diferentes temperaturas (-20, 7 e 25 °C) durante um período de 10 semanas, onde ensaios semanais foram realizados a fim de monitorar o perfil da atividade enzimática.

Observamos que a temperatura e o período de armazenamento pouco afetaram as AC (▲■●), as quais se mantiveram praticamente constante durante todo o estudo, ou seja, a enzima produzida via FSm pelo *T. indicae-seudaticae* N31 pode ser conservada em temperatura ambiente, resfriada ou congelada por, pelo menos, 10 semanas sem que haja qualquer perda dessa atividade.

Entretanto, as AP foram as que mais sofreram mudanças durante o armazenamento e isso foi observado em todas as temperaturas testadas, sendo que a -20 °C (Δ) foi encontrada a menor variação (apenas 25 %) e a 25 °C foram as que mais sofreram modificações, contudo essa variação não passou de 40 %.

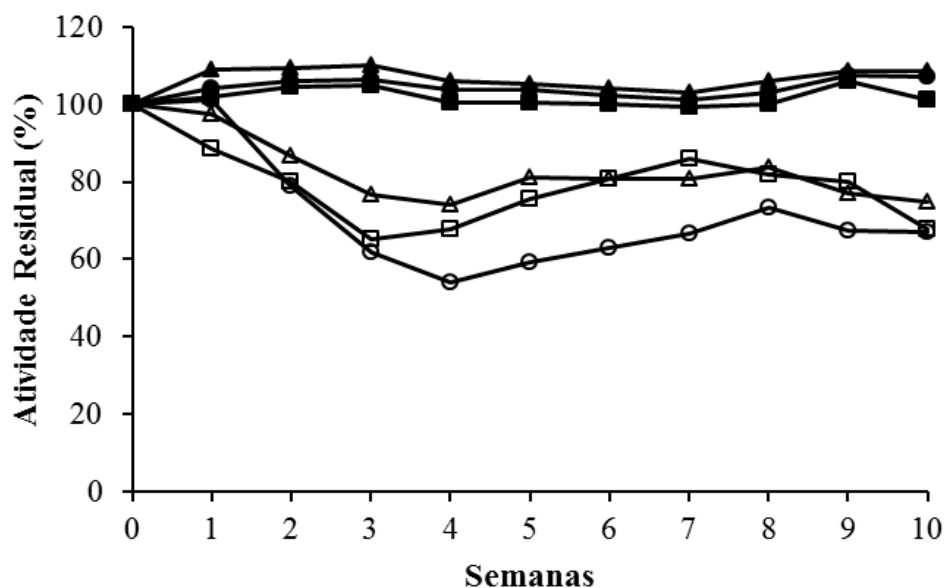


Figura 17. Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento sobre as atividades coagulantes e proteolíticas. - 20 °C: AC (▲) AP (△); 7 °C: AC (■) AP (□); 25 °C: AC (●) AP (○). FSM; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; 45 °C.

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

Já que uma parte do cálcio iônico é convertida em cálcio coloidal no tratamento térmico do leite, é necessário adicionar cálcio ao leite pasteurizado para garantir a formação de um coágulo adequado. Além disso, a adição de cloreto de cálcio provoca a redução do tempo de coagulação, aumento da firmeza da coalhada e da força do gel, melhora a taxa de agregação e adesividade, entretanto o excesso pode resultar na formação de sabor amargo (BONATO et al., 2006; CAVALCANTI et al., 2004).

A Figura 18 mostra a atividade coagulante relativa em diferentes concentrações de cloreto de cálcio, observou-se que a AC aumenta significativamente até o pico em 0,04 mol/L e a partir daí decresce.

Preetha e Boopathy (1997) também observaram que o aumento da concentração do CaCl_2 aumenta a AC até concentração de 0,4 mol/L e que a partir desse valor também há uma diminuição.

Sardinas (1968), Merheb-Dini et al. (2010) e El-Baky et al. (2011) avaliaram o efeito da concentração de CaCl_2 no leite sobre a atividade da renina microbiana produzida pela *Endothia parasítica*, *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 e *Piptoporus soloniensis*, respectivamente, e também encontraram um pico de maior AC a $0,04 \text{ mol/L}$ de CaCl_2 , concordando com o resultado obtido no presente estudo.

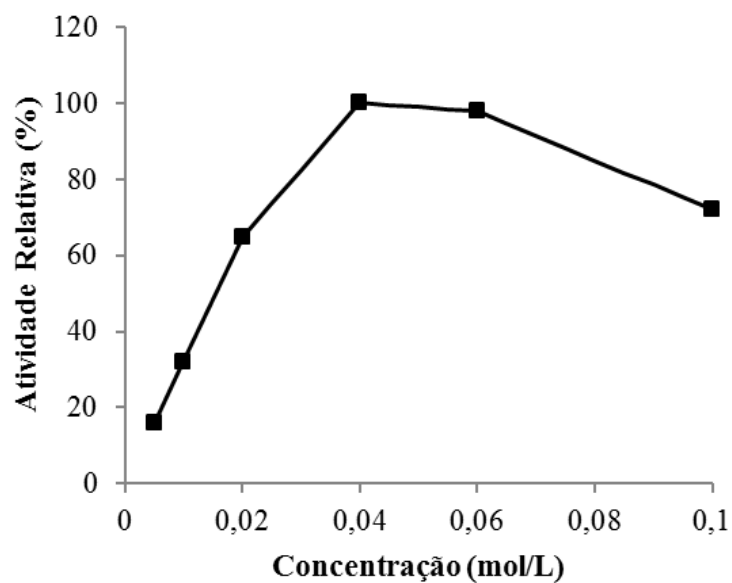


Figura 18. Avaliação do efeito da concentração do cloreto de cálcio na AC. FSm; substrato farelo de trigo a 4 %; solução salina a 0,3 %; 72 horas de incubação; $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados constatou-se que o fungo filamentosso termofílico *T. indiciae-seudaticae* N31 obtido da coleção de micro-organismos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP é um bom produtor da renina microbiana via FSm.

A protease coagulante produzida por FSm apresentou valor da razão AC/AP mais alto em relação à obtida em FES.

Ao avaliar a natureza dos substratos, o farelo de trigo se mostrou o mais promissor para tal produção tanto em FSm com e sem agitação como em FES.

As condições empregadas no processo fermentativo como: tipo de fermentação, tipo e concentração do substrato, temperatura de incubação e concentração da solução salina afetam a taxa de produção enzimática.

A melhor produção enzimática foi obtida sob as seguintes condições de fermentação: 4 % de farelo de trigo, 0,3 % de solução salina, 72 h de incubação a 45 °C e velocidade de agitação de 150 rpm.

A enzima apresentou uma importante característica de aplicação industrial, uma vez que pode ser armazenada por, pelo menos, dez semanas sem apresentar perda de atividade.

A fermentação submersa mostrou-se uma interessante via alternativa para a produção da renina microbiana, em substituição à FES. Este resultado apresenta-se como uma boa opção tecnológica para produção em maior escala desta protease.

7. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

BENLOUNISSI, A.; MECHAKRA-MAZA, A.; GHERIBI, Z.; MAHFOUZ, M.; BLUM, L. J.; MARQUETTE, C. A. Milk-clotting fungus enzymes production: A sustainable development approach based on whey recycling. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 1997-2005, 2012.

BEYENAL, H.; SEKER, S.; SALIH, B.; TANYOLAÇ, A. The effect of D-glucose on milk clotting activity of *Mucor miehei* in a chemostat with biomass retention. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 527-532, 1999.

BOCCHINI, D. A.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3653-3659, 2005.

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

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

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

CAVALCANTI, M.T.H.; MARTINEZ, C.R.; FURTADO, V.C.; NETO, B.B.; TEIXEIRA, M.F.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Milk-clotting protease production by *Nocardiopsis* sp in an inexpensive medium. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, p. 151-154, 2005.

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

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

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

COLLA, L. M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Congelamento e descongelamento – sua Influência sobre os alimentos. **Vetor**, Rio Grande, v. 13, p. 53-66, 2003.

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

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

DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Mische. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, 2005.

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

EL-BAKY, H. A.; LINKE, D.; NIMTZ, M.; BERGER, R. G. PsoP1, a Milk-Clotting Aspartic Peptidase from the Basidiomycete Fungus *Piptoporus soloniensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10311-10316, 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Gado de Leite, 2008. Disponível em <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0423.php>>. Acesso em 03/07/2012.

ESCOBAR, J.; BARNETT, S. M. Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 15, dez. 1993.

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

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, 18, p. 677- 684, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

KURUTAHALLI, S. V.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 1849-1859, 2010.

LI, D. C.; YANG, Y. J.; SHEN, C. Y. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycol. Res.**, v. 101 (1), p. 18-22, 1997.

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

MACHADO, S. C. **Fatores que afetam a estabilidade do leite bovino**. Porto Alegre, BR, 2010. Originalmente apresentada como dissertação de doutorado, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

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

MERHEB, C. W.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Determinação do perfil hidrolítico de protease de *Rhizomucor* sp sobre a caseína bovina. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 20, 2006, Curitiba. Anais... Curitiba: **TecArt**, 2006 (CD ROM).

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

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

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

MOSCHOPOULOU, E. E.; KANDARAKIS, I. G.; ALICHANIDIS, E.; ANIFANTAKIS, E. M. Purification and characterization of chymosin and pepsin from kid. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 49-57, 2006.

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

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Florianópolis, 2003.** Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

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

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

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

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

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

RAUPP, D. S.; CARRIJO, K. C. R.; COSTA, L. L. F.; MENDES, S. D. C.; BANZATTO, D. A. Propriedades funcionais-digestivas e nutricionais de polpa-refinada de maçã. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 395-402, jul./set., 2000.

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

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

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. Uberlândia, 2010. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade federal de Uberlândia.

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

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

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

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.8, p. 43-56, jan./mar., 2005. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/bj_old/brazilianjournal/free/p05185.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2012.

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.

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.

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

SILVEIRA, G. G. **Resíduos agroindustriais como potenciais substratos para a produção de renina microbiana por *Mucor miehei* utilizando fermentação em estado sólido**. Rio Claro, 2007.

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

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

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

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

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

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

WEINGARTNER, V. **Produção, purificação e identificação de mananase, obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e *Aspergillus niger***. Curitiba, 2010. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná.

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