



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTAVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E
BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS

LAISA GRASIELLE RODRIGUES DE OLIVEIRA

BIOPROSPECÇÃO DE RENINA A PARTIR DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA
CAATINGA

SUMÉ - PB

2016

LAISA GRASIELLE RODRIGUES DE OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE RENINA A PARTIR DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA
CAATINGA**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia de
Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de
Desenvolvimento Sustentável do Semiárido,
da Universidade Federal de Campina Grande
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e
Bioprocessos.**

Orientador: Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz

SUMÉ -PB

2016

O482b Oliveira,LaisaGrasielle Rodrigues de.

Bioprospecção de renina a partir de fungos filamentosos da caatinga. / LaisaGrasielle Rodrigues de Oliveira. - Sumé - PB: [s.n], 2016.

41 f.

Orientador: Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

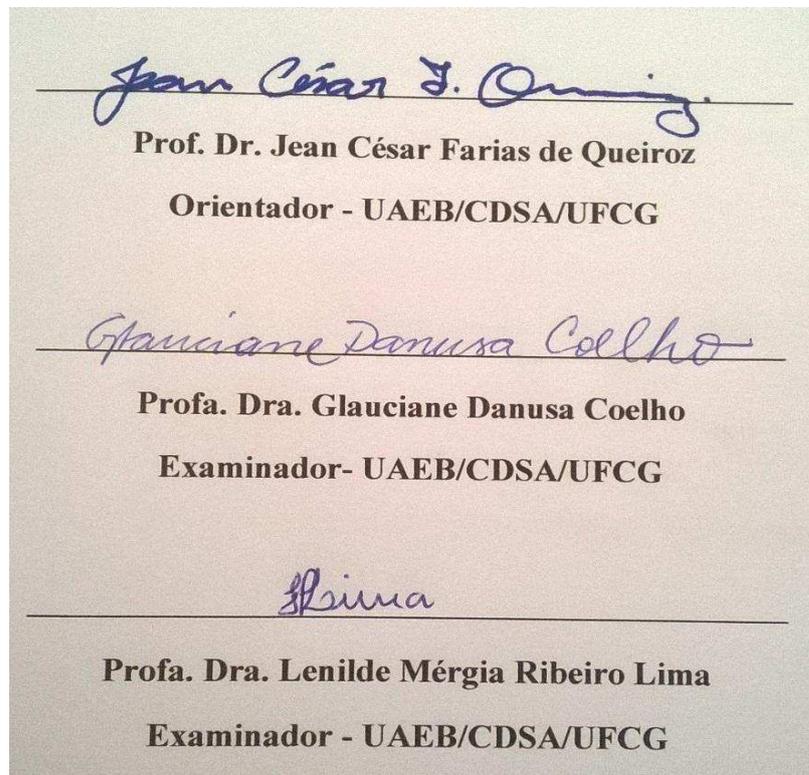
1. Biotecnologia. 2. Bioprospecção. 3. Fermentação. I. Título.

CDU: 60 (043.1)

LAISA GRASIELLE RODRIGUES DE OLIVEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:



Nota Final (9,7)

Aprovada em 18 de Outubro de 2016.

*À minha filha Fernanda Alice,
razão de tudo,*
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Grata a Deus pelo dom da vida, pois sem Ele nada somos.

Agradeço à minha família, em especial, a meus pais, Genildo (*in memoriam*) e Socorro, meu avô Ivo e minha vizinha Severina que sempre esteve ao meu lado rezando e torcendo para que tudo desse certo... Obrigada pelo carinho, amor, palavras de conforto... Obrigada por tudo.

Aos meus irmãos, Ladjá e Lamartine, que são tão importantes na minha vida, sempre apoiando e cobrando. Aos meus sobrinhos, Lázaro e Lara, e minha cunhada Margareth pelo carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean César F. Queiroz que compartilhou comigo suas ideias, conhecimentos e experiência.

Às minhas amigas de caminhada que estiveram ao meu lado todo tempo, Lucia e Arlene, muito obrigada!

À UFCG e seu corpo docente pelos conhecimentos concedidos durante a minha graduação no curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, em especial à professora Glauciane Coelho pelo suporte no Laboratório de Microbiologia e à professora Ilza Brasileiro pelo acolhimento no seu projeto e pela amizade.

Aos colegas de curso, em especial Célia, Carla e Renato que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora por aceitarem este convite.

Por fim, o agradecimento mais especial, minha filha Fernanda Alice a quem dedico este trabalho por completo, pois foi quem certamente mais sentiu minha falta ao longo dessa jornada, agradeço por tudo, este trabalho é para nós e principalmente por nós, amo você minha princesa.

.

“O que ouço, esqueço.

O que eu vejo, lembro.

O que faço, aprendo”.

Confúcio

RESUMO

As proteases constituem uma das mais importantes enzimas utilizadas em processos industriais, principalmente na indústria de alimentos, sendo uma de suas principais aplicações no setor de laticínios, como coagulante de leite em processos de fabricação de queijo. No intuito de otimizar a área de laticínios, novas fontes de enzimas coagulantes estão sendo pesquisadas, proporcionando uma busca de novas linhagens microbianas produtoras destas enzimas. A coagulação do leite por enzimas microbianas é um dos métodos que vem se tornando dos mais vantajosos por permitir redução dos custos do processo e sua produção em larga escala por fermentação. O presente trabalho teve como objetivo analisar a produção de renina por fungos da Caatinga e a eficácia destas enzimas na coagulação do leite. A produção da renina se deu via fermentação submersa e a análise da atividade coagulante foi realizada por meio de testes de coagulação do leite. Os sobrenadantes dos fungos CDSA01, CDSA24 e CDSA72, cultivados na presença de caseína, como estimulante, apresentaram atividade coagulante. O CDSA01 e CDSA24 apresentaram melhores atividades coagulantes, de 9,88UAC/mL e 11,54UAC/mL, respectivamente, nos tempos de 24 horas e 96 horas de fermentação, já o CDSA72 apresentou melhor atividade coagulante de todos os sobrenadantes, de 16,17 UAC/mL no tempo de 72 horas de fermentação.

Palavras-Chave: Enzimas. Fermentação. Laticínios. Coagulação.

ABSTRACT

Proteases are one of the most important enzymes used in industrial processes, especially in the food industry, one of its main applications in the dairy industry, such as milk coagulant in cheese manufacturing processes. In order to optimize the area of dairy, new sources of coagulating enzymes are being researched, providing a search for new microbial strains producing these enzymes. The milk coagulation through microbial enzymes is one of the methods that has become more advantageous in allowing reduction of process costs and its large-scale production by fermentation. This study aimed to analyze the production of renin by Caatinga's fungi and effectiveness of these enzymes in the milk coagulation. The renin production occurred via submerged fermentation and analysis of the coagulation activity was performed by milk coagulation tests. Supernatants from CDSA01 fungi, CDSA24 CDSA72 and grown in the presence of casein as a stimulant showed coagulant activity. The CDSA01 and CDSA24 showed better coagulant activity of 9.88 UAC / mL and 11.54 UAC / mL, respectively, at 24 hours and 96 hours of fermentation, since the CDSA72 showed better coagulant activity of all the supernatants of 16.17 AUC / mL in 72 hours fermentation.

Keywords: Enzymes. Fermentation. Dairy Products. Coagulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fungos Filamentosos da Caatinga armazenados em meio BDA e ADM, sob forma de coleção.	27
Figura 2 - Agitação do meio em agitador orbital, contendo solução de esporos, a 37°C, 120 rpm.....	29
Figura 3 - Extrato enzimático bruto, liofilizado para teste de coagulação.	30
Figura 4 - Cloreto de Cálcio e Leite em pó desnatado para realização do teste de coagulação	30
Figura 5 - Representação do teste de coagulação A) CDSA01; B) CDSA103.	33
Figura 6 - Teste de coagulação A) Coagulação do CDSA24 B) Separação do gel CDSA24 ..	33
Figura 7 - Variação da atividade coagulante com o tempo de fermentação do fungo CDSA01.	34
Figura 8 - Variação da atividade coagulante com o tempo de fermentação do fungo CDSA24	34
Figura 9 - Variação da atividade coagulante com o tempo de fermentação do fungo CDSA72.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Componentes do meio de cultura Batata, Sacarose e Ágar (BSA).....	28
Tabela 2 -Componentes do meio de cultura Batata, Sacarose e Caseína (leite em pó)	28
Tabela 3 - Atividade coagulante de fungos filamentosos produtores de enzima coagulante do leite em diferentes tempos de fermentação.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AC	Atividade Coagulante
ADM	Ágar, Dextrose e Malte
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
BSA	Batata, Sacarose e Ágar
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
EC	<i>Enzyme Commission</i>
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSm	Fermentação Submersa
g	Gramas
κ	kapa
km ²	Quilômetro quadrado
L	Litro
Met	Metionina
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Phe	Fenilalanina
pH	Potencial Hidrogeniônico
qsp	Quantidade Suficiente para
UAC	Unidade de Atividade Coagulante
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
p/v	peso por volume
rpm	rotação por minuto
T	Tempo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 BIOPROSPECÇÃO	17
3.2 BIOMA CAATINGA E BIOTECNOLOGIA.....	17
3.3 ENZIMAS	18
3.4 PROTEASES	19
3.4.1 Aplicações econômicas das proteases	20
3.4.1.1 Detergentes.....	20
3.4.1.2 Indústria alimentícia.....	21
3.4.1.2.1 Panificação	21
3.4.1.2.2 Carnes.....	21
3.4.1.2.3 Cervejaria	22
3.4.1.2.4 Laticínios - fabricação de queijos.....	22
3.4.1.2.5 Processo de Coagulação	23
a) Coalhos e coagulantes	24
3.5 FERMENTAÇÃO.....	25
3.5.1 Obtenção de Enzimas microbianas por meio de processos fermentativos	25
3.5.1.1 Crescimento de fungos filamentosos	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 MICRORGANISMOS	27
4.2 MEIOS DE CULTURA	28
4.2.1 Meio para ativação dos fungos filamentosos	28
4.2.1.1 Contagem e solução de esporos	28
4.2.3 Obtenção do Extrato Enzimático Bruto	29
4.2.3.1 Liofilização do extrato enzimático bruto	29
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 ATIVAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	31
5.2 FERMENTAÇÃO E TESTE DE ATIVIDADE COAGULANTE.....	31
5.3 CINÉTICA DE COAGULAÇÃO	33

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são, em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes, que atuam nas reações químicas como catalisadores biológicos, diminuindo a energia requerida para a ativação da reação, e consequentemente, uma rápida obtenção do produto, uma vez que na ausência de catalisadores a velocidade de reação é menor por requerer mais energia para sua ativação (LEHNINGER, 2006).

As enzimas apresentam vantagens quando comparadas a catalisadores químicos e, por isso, são cada vez mais aplicadas nos setores industriais e de biotecnologia (SILVA, 2011). No entanto, são as proteases que ocupam posição de destaque constituindo um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, classificadas de acordo com sua fonte, sua ação catalítica ou de acordo com a natureza do seu sítio catalítico (PALMA et al., 2002). As proteases atuam hidrolisando ligações peptídicas de moléculas proteicas e peptídeos, sendo utilizadas nas indústrias de detergentes, cerveja, carnes, couro e em laticínios (KUMAR et al., 2005; MURI, 2014).

Uma das maiores aplicações das proteases é na indústria de laticínios na produção de queijos, devido à escassez do coalho tradicional de origem animal, o que tem ocasionado a substituição deste por proteases coagulantes de origem microbiana (SILVA, 2013). Por muito tempo, a maioria do coalho empregado na coagulação de leite era extraída do abomaso de bezerras em lactação. No entanto, com as mudanças que o setor de laticínios sofreu nos últimos anos, sobretudo a indústria de queijo, se ampliando a uma razão superior à disponibilidade de renina (quimosina), os coalhos de origem fúngica ganharam espaço no mercado, pois apresentam-se como alternativa à escassez de coalhos tradicionais (SILVEIRA, 2007).

As proteases atuam na fabricação de derivados de leite em processos de coagulação, ou seja, desestabilização das caseínas do leite. A coagulação láctica pode acontecer por dois métodos distintos: ácido ou enzimático; entretanto, na maioria dos tipos de queijo, o método enzimático é o mais empregado devido, especialmente, ao maior rendimento obtido quando comparado ao método ácido. A coagulação enzimática aplica enzimas proteolíticas para formação do coágulo, empregando normalmente a renina (CASTILHO, 2008).

O coalho apresenta duas ações hidrolíticas na caseína que lhe garante a atuação como bom coagulante: a atividade coagulante e a atividade proteolítica. A atividade coagulante que possui a capacidade de clivar a cadeia de aminoácidos rompendo a k-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 que compromete a qualidade do produto final (GAJO et al., 2012; SILVA, 2013).

Existem várias formas para obtenção de enzimas proteolíticas, como células animais e vegetais, porém os microrganismos representam uma excelente fonte que vem sendo utilizada em escala industrial por apresentarem características que permitem o aumento na produção de enzimas de aplicação conhecida em processos biotecnológicos e a produção de novas enzimas de interesse comercial (NASCIMENTO, 2005).

Vários grupos de microrganismos são capazes de produzir diferentes proteases por processos de fermentação, entre essas proteases microbianas, as de origem fúngica, apresentam vantagens tais como: fácil obtenção e recuperação do meio fermentativo por serem enzimas extracelulares, o que torna a técnica mais viável em custos operacionais, pois não necessita de métodos caros de filtração já que o micélio pode ser extraído, por filtração a vácuo e centrifugação, na obtenção de extrato livre de células (KUMAR et al., 2005; SILVA, 2013).

Conhecendo a importância da utilização de enzimas proteolíticas na indústria de laticínios, este trabalho tem o objetivo encontrar novas reninas em fungos da Caatinga.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a produção de renina por fungos filamentosos da Caatinga e a eficácia destas enzimas na coagulação do leite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir renina microbiana via fermentação submersa por fungos filamentosos da Caatinga.
- Análise da atividade enzimática, por meio de testes de coagulação do leite.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BIOPROSPECÇÃO

O termo bioprospecção, academicamente, é entendido como uma forma de extrair o valor econômico da biodiversidade a partir de uma exploração sistemática de organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes de seres vivos que apresentam potencial econômico e podem resultar no desenvolvimento de produtos (SACCARO JÚNIOR, 2011).

Segundo o Inciso VII do Artigo 7º da Medida Provisória nº 2.186/16/2001, bioprospecção é qualquer atividade exploratória que visa identificar do componente do Patrimônio Genético e informação sobre Conhecimento Tradicional Associado, com potencial de uso comercial.

A obtenção de inúmeros produtos com aplicação industrial fundamenta-se na bioprospecção de microrganismos, sendo este grupo de organismos a maior fonte de genes do planeta (SOUZA *et al.*, 2004). Os microrganismos, pela sua produção de enzimas, oferecem uma grande importância econômica e social para a produção de bebidas e alimentos (MONTEIRO e SILVA, 2009).

A busca por novas fontes de enzimas coagulantes do leite proporciona a investigação de novas linhagens microbianas produtoras das mesmas. Um dos métodos mais vantajosos para redução dos custos no processo de coagulação do leite é a utilização de enzimas microbianas (VASCONCELOS *et al.*, 2004).

A bioprospecção de fungos no bioma Caatinga para obtenção de bioprodutos ainda é pontual, porém este cenário vem mudando com o avanço de novas técnicas biotecnológicas e com pesquisadores que se dedicam exclusivamente a esta técnica (CLEMENTINO, 2014).

3.2 BIOMA CAATINGA E BIOTECNOLOGIA

O bioma Caatinga abrange uma área de 734.478 km², abrangendo cerca de dez estados brasileiros, é o único bioma exclusivamente brasileiro, colocando-o em um importante cenário para bioprospecção, já que grande parte deste patrimônio genético não é encontrada em outro lugar (MELO, 2016).

A Caatinga é o bioma mais importante da região Nordeste, ocupando cerca de 10% do território nacional (ANDRADE *et al.*, 2005). Esse bioma apresenta uma grande variedade de

espécies vegetais e animais, apesar de ter sua biodiversidade comprometida devido à sua degradação. A Caatinga apresenta-se bastante heterogênea, apesar de ser uma região semiárida, apresentando centenas de diferentes tipos de paisagens únicas (MMA, 2007).

A Caatinga é o ecossistema brasileiro mais negligenciado em relação à conservação da biodiversidade, devido à característica semiárida (ZANELLA; MARTINS, 2003). Apresenta as riquezas ofuscadas pela carência de conhecimentos técnico-científicos relativo ao bioma de modo geral e ao valor biológico, paisagístico e aplicação econômica sustentável de sua biodiversidade (CASTRO et al., 2003).

Na Caatinga, ainda é observada, além de variedade de espécies vegetais e animais, uma grande diversidade de microrganismos associada a estes indivíduos. Apesar do grande número de fungos e bactérias encontrados no bioma Caatinga, os microrganismos ainda têm seu potencial biotecnológico pouco explorado (COSTA et al., 2014).

3.3 ENZIMAS

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos e são imprescindíveis nas reações químicas que se processam nos organismos, uma vez que na ausência desses catalisadores essas reações têm velocidade muito baixa, sendo o principal instrumento para síntese e quebra de moléculas essenciais ao crescimento e vida de todos os organismos (HOLLIDAY; MITCHELL; THORNTON, 2009).

Devido a algumas vantagens operacionais como especificidade de reação e seletividade de atuação sobre substratos quando comparada a catalisadores químicos, as enzimas têm apresentado grande participação no comércio mundial em processos industriais e biotecnológicos (SILVA, 2011).

O mercado de enzimas é dividido em enzimas industriais e enzimas especiais. Estão entre as principais enzimas de interesse industrial as proteases, carboidrases, lipases e fitases e são divididas em três segmentos de mercado: enzimas técnicas aplicadas em produtos de limpeza, têxtil, couros, álcool como combustível e papel; enzimas para alimentos e bebidas; e enzimas para ração animal. Já as enzimas especiais são as enzimas terapêuticas, para diagnóstico e pesquisa (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

3.4 PROTEASES

As proteases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de proteínas, peptídeos e aminoácidos livres (OLIVEIRA et al.,2015), compondo um grupo único de enzimas com um vasto campo de aplicação, uma vez que provocam alterações irreversíveis ou destruição dos substratos, que são importantes do ponto de vista biológico, principalmente em processos patológicos, fisiológicos e tecnológicos (RIFFEL, 2003).

A extração das proteases se dá a partir de diversas fontes, uma vez que podem ser encontradas de forma universal em todos os seres vivos (animal, vegetal ou microbiana)(FREITAS, 2013).

As principais proteases originárias de plantas são: a papaína extraída do látex do mamão verde, a bromelina presente no abacaxi e a ficina retirada do látex do figo verde. A extração de enzimas de origem vegetal é dependente de alguns fatores, como a disponibilidade de uma grande área para o cultivo, das condições climáticas para o crescimento das plantas e do tempo (RACTZ, 2015).

As proteases de origem animal são preparadas em grandes quantidades e extraídas de tecidos específicos, como estômago de ruminantes, de onde são retiradas a renina e a pepsina, e de tecido pancreático de bovinos e suínos, de onde são extraídas a tripsina e a quimotripsina. A obtenção destas enzimas depende geralmente da disponibilidade do animal para o abate, o que torna o processo de alto custo por ser controlado por políticas governamentais e agropecuárias (FREITAS, 2013; GIONGO, 2006; SILVA, 2013).

Alguns obstáculos apresentados na obtenção de enzimas de fontes animal e vegetal levaram a busca de novas fontes de enzima, sendo os microrganismos uma excelente fonte devido à sua larga diversidade bioquímica e diversas vantagens como a obtenção por processos mais simples e de baixo custo como seu rápido crescimento e pequeno espaço para o cultivo (GIONGO, 2006; RACTZ, 2015). Além de serem mais estáveis que as homólogas de plantas e animais (FREITAS, 2013; GIONGO, 2006).

O Comitê Internacional de Enzimas (*EnzymeComission*) denomina as proteases como enzimas que pertencem à classe das hidrolases (3) e subclasse das peptídeo-hidrolases ou peptidases (4), sendo classificadas como EC 3.4. As outras classificações que se dão as proteases são de acordo com o tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico (serino, sulfidrílicas, ácidas e metalo) e relação evolucionária em conformidade com a estrutura (PALMA et al., 2002; RACTZ, 2015).

As proteases podem ser divididas, ainda, por sua melhor atuação em diferentes faixas de pH: proteases neutras, ácidas e alcalinas. Dentre as proteases ácidas, que incluem

principalmente as aspártico proteases (melhor atividade na faixa de pH de 2,0 a 6,0) estão as ácidas microbianas, como a renina e a pepsina e as de origem animal como o coalho bovino obtido de estômago de bovinos lactentes (SILVA, 2013; SUMANTHA et al., 2006).

As proteases de origem microbiana estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas e correspondem a cerca de 40% do total de proteases comercializadas devido à sua diversidade bioquímica (GUPTA *et al.*, 2002; VIEIRA, 2013).

Os fungos filamentosos estão entre os microrganismos que possuem intensa produção de enzimas hidrolíticas, como as proteases, dependendo de algumas condições de crescimento, como fonte de carbono, nitrogênio e temperatura. O crescimento e a produção de enzima extracelular são afetados pela fonte de nitrogênio presente no meio, uma vez que muitas proteases somente são produzidas e secretadas quando o meio de cultura possui proteínas como fonte de nitrogênio (BAZARZHAPOV *et al.*, 2006).

3.4.1 Aplicações econômicas das proteases

O uso de enzimas nas indústrias apresenta vantagens porque elas são naturais, não tóxicas e específicas, além de possuírem a capacidade de modificar características de variados tipos de resíduos, o que resulta em uma diminuição da poluição ambiental, podendo ser usados como substitutos de processos químicos rigorosos (MUSSATO, 2007).

No comércio de enzimas, as proteases ocupam posição de destaque, representando cerca de 60% do total de enzimas de uso industrial do mundo. Proteases termoestáveis produzidas por organismos termofílicos (adaptados a altas temperaturas do meio ambiente) são apropriadas para utilização em processos industriais por serem termoestáveis. Essas proteases são aplicadas principalmente nas indústrias de processamento de couro, detergentes, síntese de peptídeos, indústria de alimentos, e aplicações farmacêutica e biotecnológica (ZHU *et al.*, 2007).

3.4.1.1 Detergentes

Os detergentes são substâncias sintéticas que agem removendo, dispersando e estabilizando materiais de uma superfície. As proteases compõem um dos ingredientes essenciais na produção de detergentes, pois, diferentemente dos detergentes iônicos, os detergentes enzimáticos agem de forma específica, atuando de maneira mais eficiente sobre a matéria orgânica, promovendo a remoção de resíduos de alimentos, sangue e secreções

corporais, incluindo ainda, lavagem de reagentes usados na limpeza de dentaduras e lentes de contato, por exemplo (BON *et al.*, 2008; RAO *et al.*, 1998).

A indústria de detergentes sofreu algumas mudanças nos últimos anos no sentido de substituir alguns componentes de sua formulação considerados nocivos por fórmulas biodegradáveis e menos prejudiciais à natureza (SOUZA, 2012). Atualmente, nas formulações dos detergentes muitos dos ingredientes nocivos à natureza foram substituídos por enzimas pelo fato dessas apresentarem vantagens como: obtenção a partir de fontes renováveis, biodegradáveis e não oferecer riscos à vida marinha (RODRIGUÉZ *et al.*, 2006). O maior emprego de proteases está na produção de detergentes, devido à sua estabilidade e atividade em pH alcalino e altas temperaturas, e também à sua ação em vários substratos proteicos em combinação com outras enzimas, como amilases, celulasas e lipases (SILVA, 2011).

3.4.1.2 Indústria alimentícia

3.4.1.2.1 Panificação

O glúten é uma proteína insolúvel presente na farinha de trigo e determina as propriedades das massas. Na panificação, enzimas proteolíticas podem ser utilizadas como aditivos no preparo de massas, agindo sobre o glúten afetando a elasticidade e a textura e, ainda, contribuindo para redução do tempo de mistura da massa e o custo de produção (SILVA, 2011). O tratamento da massa com endoproteínases e exoproteínases de *Aspergillusoryza* modifica o glúten por meio de proteólise limitada (MERHEB, 2007). Proteases de origem fúngica e bacteriana atribuem à massa força e extensibilidade adequadas, permitindo uma laminação isenta de fraturas, e de espessura conveniente para uma tostagem adequada do material durante o forneamento, e são utilizadas especificamente para biscoito crocante (AQUARONE *et al.*, 2001).

3.4.1.2.2 Carnes

Uma variedade de enzimas proteolíticas produzidas por plantas (bromelina e papaína), animais e microrganismos, demonstrou eficiência no amaciamento de carnes, as quais são utilizadas como amaciadores, proteases alcalinas termofílicas que possuem a capacidade de hidrolisar proteínas do tecido conjuntivo e proteínas da fibra muscular (MERHEB, 2007).

O processo de amaciamento consiste em polvilhamento de uma preparação enzimática ou por meio da imersão do produto em uma solução enzimática e/ou injetando a preparação concentrada de protease na carne (RACTZ, 2015).

3.4.1.2.3 Cervejaria

Na indústria cervejeira, enzimas proteolíticas tanto de origem vegetal quanto de origem microbiana são empregadas para diminuição da turbidez da cerveja quando é resfriada em temperaturas inferiores a 10°C. A turbidez aparece pela proliferação de microrganismos ou como resultado de reações químicas entre substâncias da cerveja, chamada de turbidez não biológica, que é resultado da formação de um complexo entre taninos e os polipeptídios durante o resfriamento da cerveja. Enzimas proteolíticas são utilizadas na prevenção da turbidez não biológica, reduzindo-se o tamanho do polipeptídio com preparações enzimáticas, pois o tamanho da proteína é quem determina o tamanho do agregado final (MERHEB, 2007; NASCIMENTO, 2005).

No processamento da cerveja, as enzimas são utilizadas para auxiliar no controle da turbidez durante as seguintes etapas: malteação, fermentação e maturação (AQUARONE et al., 2001).

3.4.1.2.4 Laticínios - fabricação de queijos

Na indústria de laticínios as proteases são utilizadas, seja para a fabricação de queijos pelo uso da renina ou ainda para a aceleração da maturação pela utilização de proteases fúngicas ou bacterianas (NASCIMENTO, 2005).

Na fabricação de queijos, as proteases são usadas na coagulação provocando hidrólise da ligação peptídica (Phe 105 - Met 106), empregando-se a renina, sendo essa protease a escolhida devido à sua alta especificidade pela k- caseína (NEVES, 2014).

O setor de laticínios é a maior área de aplicação de proteases na indústria de alimentos. Produto de secreção das glândulas mamárias, o leite é um fluido viscoso formado por uma fase líquida e partículas em suspensão, constituindo uma emulsão natural de gorduras em água estabilizada e uma dispersão coloidal de proteína, estável em condições normais de temperatura ou de refrigeração (BRASIL, 2013).

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: 1) caseínas; 2) proteínas do soro; 3) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; 4) enzimas (BRASIL, 2013).

As caseínas são fosfoproteínas globulares existentes no leite em forma micelar. A micela é formada de quatro proteínas principais: α_1 -, α_2 -, β - e κ -caseína, representando cerca de 38%, 10%, 35% e 15%, respectivamente, e 8% de fosfato de cálcio coloidal aproximadamente (MERHEB,2007).

Existe um consenso que diz que a estrutura das micelas de caseínas é estabilizada por interações hidrofóbicas e iônicas (HOLT et al., 2003). Os níveis de cálcio para precipitação da caseína α_1 são muito baixos, enquanto a caseína α_2 é mais sensível à precipitação pelo Ca^{2+} , já a κ -caseína é uma glicoproteína e possui apenas um grupo fosfoserina, sendo, portanto, estável na presença de íons de cálcio o que a torna importante na estabilidade da micela de caseína. A β -caseína, por ser mais fosforilada que a κ -caseína, é mais sensível a altas concentrações de sais de cálcio, apesar de ser menos sensível à precipitação com cálcio do que as caseínas α (BRASIL, 2013).

A hidrólise da κ -caseína por proteases selecionadas resulta na desestabilização das micelas e é um processo industrialmente importante explorado na produção da maioria dos queijos (BRASIL, 2013). Essa desestabilização da caseína é realizada por endopeptidases, que hidrolisam a ligação peptídica Phe105-Met 106 da cadeia peptídica da κ -caseína, o que resulta em produtos com uma porção hidrofóbica, (para- κ -caseína) e uma hidrofílica chamada glicomacropéptido, eliminando a estabilização da micela o que provoca a precipitação da caseína do leite (ORDONÉZ, 2005).

3.4.1.2.5 Processo de Coagulação

A primeira etapa da fabricação de queijos é a coagulação das caseínas por enzimas proteolíticas coagulantes ou pela acidificação (SILVA, 2013). Várias proteínas possuem a capacidade de coagular o leite, no entanto a renina desempenha melhor papel uma vez que é capaz de hidrolisar a cadeia de aminoácidos especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina) (MERHEB, 2007). O resultado da hidrólise enzimática é a 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). Nisso, a *para*- κ -caseína não mais estabiliza a estrutura micelar e as frações alfa e beta, precipitam, na presença de cálcio, formando o coágulo, onde ocorre a expulsão do soro por sinérese e a retenção da gordura (SILVA, 2013; BONATO et al., 2006).

O cálcio auxilia na coagulação por criar condições isoeletricas e por agir como uma ponte entre as micelas (MERHEB-DINI et al., 2010). No entanto, quando a concentração deste íon é baixa, a coagulação é lenta e o coágulo é fraco; porém, o coágulo torna-se mais

compacto, flexível, elástico, impermeável e contrátil quando utilizadas concentrações adequadas de cálcio e fósforo, o que permite à massa do queijo tolerar forças mecânicas no processo de fabricação (BONATO et al., 2006).

a) Coalhos e coagulantes

No processo coagulação do leite, a coagulação enzimática é a mais utilizada e feita pela adição de enzimas específicas conhecidas como coalhos ou coagulantes. A denominação coalho é usada para as enzimas obtidas do abomaso de ruminantes como, por exemplo, o coalho bovino. Já a denominação coagulante está para todas as enzimas utilizadas para coagular o leite quando obtidas por meios diferentes do coalho do abomaso, como exemplo, os coagulantes de origem vegetal e microbiana (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

As enzimas proteolíticas são utilizadas no processo de fabricação da maioria dos queijos; dentre essas, a principal empregada é a renina, uma fosfoproteína que atua de modo específico sobre a caseína, hidrolisando as ligações peptídicas entre os aminoácidos Phe105-Met106, formando a coalhada (LIMA *et al.*, 2003; PERRY, 2004).

O coalho bovino é composto de duas enzimas: a quimosina e a pepsina que se alteram de acordo com a idade do animal, sendo o seu percentual menor quanto mais avançada a idade. Extratos provenientes de estômagos de vitelos possuem alto conteúdo de quimosina, sendo o coalho composto normalmente 80-90% de quimosina e 10-20% pepsina, já os coalhos de bovinos adultos apresentam um maior conteúdo de pepsina, em torno de 90%. A pepsina bovina é bastante proteolítica e apresenta menor grau de especificidade que a quimosina, podendo hidrolisar ligações indesejáveis das caseínas e assim, diminuir a qualidade do coalho, causar o desenvolvimento de sabor amargo ao produto, além de causar redução do rendimento e da vida útil do queijo (ANTUNES, *et al.*, 2004; FOX; LAW, 1991; LIMA *et al.*, 2003).

Na fabricação da maioria dos queijos é utilizada a renina sendo tradicionalmente empregada a renina proveniente de estômagos de animais que são abatidos. No entanto, com o crescente aumento da produção mundial de queijos, juntamente com a redução na produção de coalho de origem bovina, devido à baixa disponibilidade de animais para abate, desencadeou-se em um aumento no preço de coalho tradicional e isto contribuiu para a procura de um substituto desta enzima (SILVEIRA, 2007).

Devido ao aumento na produção de queijos *versus* a escassez de coalho tradicional, esta ocasionada ainda por problemas de extração da quimosina e seu alto custo e presença de outras enzimas que comprometem a qualidade do queijo, vias alternativas de produção de coalho para utilização na coagulação do leite estão sendo estudadas incluindo coalho bovino

de vacas adultas, proteases coagulantes de fungos e vegetais, além de outras enzimas proteolíticas. Porém esses substitutos alternativos apresentam um nível maior de inespecificidade o que causa menor rendimento e possibilidade de desenvolvimento de amargor em alguns tipos de queijos (SILVA, 2013).

3.5 FERMENTAÇÃO

A fermentação, do ponto de vista bioquímico, é um processo anaeróbio, ou seja, acontece na ausência de oxigênio transformando uma substância em outra, a partir de microrganismos, como bactérias e fungos, chamados nestes casos de fermentos. No entanto, o termo fermentação é usado na biotecnologia para denominar processos aeróbios, ou seja, que acontecem na presença de oxigênio (BONATO et al.,2006).

A fermentação é muito importante para obtenção de produtos de interesse industrial tais como: enzimas, vitaminas, hormônios, pigmentos, biossurfactantes, biopesticidas,dentre outros, sendo as condições do meio de desenvolvimento microbiano monitorado, independentemente de seu estado físico, seja ele líquido ou sólido (PANDEY, 2003).

As condições do meio fermentativo determinam a produção devendo conter em sua composição macronutrientes fermentescíveis, micronutrientes e fatores de crescimento como as vitaminas. Entre os macronutrientes estão os oriundos de fontes de carbono e nitrogênio, já entre os micronutrientes estão o ferro, manganês, entre outros (WANDERLEY et al., 2011).

3.5.1 Obtenção de Enzimas microbianas por meio de processos fermentativos

A obtenção de enzimas pode acontecer por processos fermentativos, e os fungos oferecem vantagem na realização desse trabalho pelo uso de métodos baratos de filtração como centrifugação e filtração a vácuo, uma vez que o seu micélio pode ser extraído de forma fácil (ANDRADE et al., 2002). Outra vantagem dos fungos quando comparados às bactérias, é que eles são capazes de produzir um número maior de enzimas ativas em uma ampla faixa de pH (4,0 a 11,0) e em uma variedade maior de substratos (SILVA, 2013).

Os sistemas de fermentação mais utilizados para produção de enzimas são o FES (Fermentação em Estado Sólido) e aFSm (Fermentação Submersa ou em Estado líquido) para produção de proteases, lipases, pectinases, amilases, celulasas, entre outras(SILVA, 2013).

O processo de fermentação em estado sólido ocorre sobre um substrato com ausência de água livre, o que lhe confere o estado sólido; no entanto, deve conter umidade suficiente

para o funcionamento das atividades metabólicas, utilizando substratos como farelo de trigo, grãos e bagaços e resíduos agroindustriais (PANDEY, 2003).

Já a fermentação submersa (ou líquida) é o tipo de fermentação utilizada em processos industriais e proporciona um crescimento cuidadosamente controlado de microrganismos em recipientes fechados contendo um meio de nutrientes e uma significativa concentração de oxigênio, em que a liberação da enzima desejada na solução acontece devido à degradação do substrato pelos microrganismos para metabolizar os nutrientes presentes no meio de cultivo (SILVA, 2013).

Os dois sistemas de fermentação apresentam suas vantagens e desvantagens, porém quando se trata de produção de enzimas em escala industrial, a fermentação submersa é a mais empregada por apresentar algumas características desejáveis de cultivo em grande escala: controle dos parâmetros físico-químicos do processo e fácil recuperação das enzimas extracelulares, micélio ou esporos além de possuir facilidade de cultivo uma vez que garante a homogeneidade do meio (SANDHYA et al., 2005; PINHEIRO, 2006).

3.5.1.1 Crescimento de fungos filamentosos

O desenvolvimento de fungos filamentosos em meios de crescimento, independente do seu estado físico e é influenciado pelas condições ambientais e pela sua composição; portanto, variações fisiológicas e morfológicas podem acontecer como resultado dessas mudanças e têm como consequência, ainda, alterações no nível de expressão e nas propriedades catalíticas da enzima (SILVA, 2013).

Cada tipo de fermentação possui suas características, podendo influenciar na taxa de produção da enzima, ocasionadas por alguns fatores como taxa de transferência de massa, que é, num sistema de vários componentes, o movimento de um componente específico. A forma de crescimento dos fungos filamentosos varia de acordo com o estado físico do meio: em fermentação submersa o crescimento se dá em forma de “pellets” e filamentosa, enquanto o crescimento na fermentação sólida é predominante na forma micelial (SILVA, 2013).

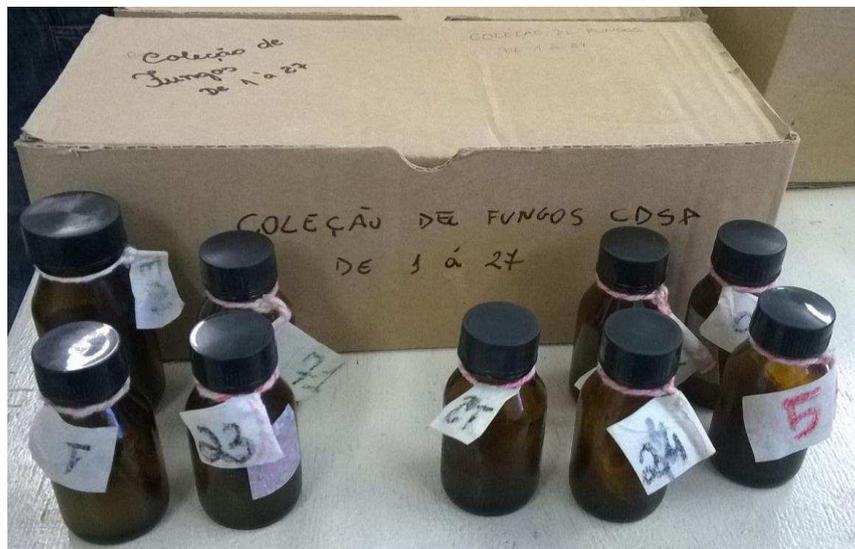
4 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia e de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.1 MICRORGANISMOS

Os fungos utilizados no trabalho são provenientes da coleção de Fungos Filamentosos da Caatinga do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA)-Sumé/PB. A coleção foi construída a partir de sucessivas coletas de fungos do solo e de folhas de plantas do Bioma Caatinga no município de Sumé-PB, armazenados em vidro âmbar de 20 mL contendo 10 mL de meio de cultura inclinado composto por Batata, Dextrose e Ágar (meio BDA) ou vidro âmbar de 30 mL contendo 15mL de meio de cultura inclinado composto por Ágar, Dextrose e Extrato de Malte (meio ADM). Neste estudo foram selecionados de forma aleatória 10 espécimes, denominados CDSA01, CDSA10, CDSA12, CDSA23, CDSA24, CDSA54, CDSA71, CDSA72, CDSA78 e CDSA103.

Figura 1 - Fungos Filamentosos da Caatinga armazenados em meio BDA e ADM, sob forma de coleção.



Fonte: Acervo do próprio autor.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio para ativação dos fungos filamentosos

A ativação dos isolados fúngicos foi realizada em placas de Petri, em duplicata, em meio BSA (Batata, Sacarose e Ágar). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C a 1atm durante 20 minutos e posteriormente adicionado 0,05 g.L⁻¹ de tetraciclina, a fim de evitar o crescimento de bactérias.

Tabela1 -Componentes do meio de cultura Batata, Sacarose e Ágar (BSA)

Componentes	Quantidade
Batata	200 g
Sacarose	20 g
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p 1000mL

4.2.1.1 Contagem e solução de esporos

No preparo da suspensão de esporos, cerca de 10 mL de água destilada (esterilizada) foram adicionados sobre a superfície das placas de petri com micélio fúngico seguida de uma raspagem superficial das colônias com auxílio de alça de platina.

A suspensão foi filtrada em gaze e algodão, previamente esterilizados. A contagem dos esporos, 1mL da suspensão de esporos foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer. O inóculo foi ajustado para que se atingisse a concentração de esporos de 10⁵/mL.

4.2.2 Meio de fermentação e para a produção de renina

A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyer, de 250 mL, esterilizados contendo um meio composto de Batata, Sacarose e Caseína. A Caseína evidenciou ser um importante indutor enzimático nas fermentações submersas e em estado sólido (SILVEIRA *et al.*, 2001). Deste modo foi analisada a produção de renina com presença deste suplemento, que foi substituído pelo leite em pó. O meio foi inoculado com a suspensão micelial e incubado a 37°C.

Tabela 2 - Componentes do meio de cultura Batata, Sacarose e Caseína (leite em pó)

Componente	Quantidade
Batata	20 g
Sacarose	20g
Leite em pó	12 g
Água destilada	q.s.p 1000mL

Figura 2 - Agitação do meio em agitador orbital, contendo solução de esporos, a 37°C, 120 rpm.



Fonte: Acervo do próprio autor

4.2.3 Obtenção do Extrato Enzimático Bruto

Para a extração enzimática, os frascos foram agitados a 120 rpm/30min e o conteúdo filtrado em papel de filtro e centrifugado. A solução obtida denominada de extrato enzimático bruto foi mantida em 4°C em refrigerador, para evitar a decomposição por proteases.

4.2.3.1 Liofilização do extrato enzimático bruto

A liofilização dos extratos foi realizada em liofilizador de bancada Marca Liotop, Modelo L101.

O extrato enzimático bruto foi congelado em frascos contendo um volume de 25 mL e colocado para liofilizar.

Figura 3 - Extrato enzimático bruto, liofilizado para teste de coagulação.



Fonte: Acervo do próprio autor

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE

A determinação da AC foi feita de acordo com Arima et al. (1968), com algumas modificações. Os extratos liofilizados foram dissolvidos em solução de CaCl_2 10 mM. O tempo de coagulação foi medido adicionando 1mL da enzima dissolvida em CaCl_2 com 1 mL da solução de leite reconstituído (12% p/v de leite em pó desnatado). A atividade coagulante foi definida como a quantidade de enzima que coagula 1,0 mL de leite em 40 minutos a 50 °C e foi calculada de acordo com a seguinte equação: $\text{UAC/mL} = 2400/T \times S/E$, em que T é o tempo necessário para formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume de enzima (DINI, 2010).

Figura 4 - Cloreto de Cálcio e Leite em pó desnatado para realização do teste de coagulação



Fonte: Acervo do próprio autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Na ativação dos isolados fúngicos, houve o crescimento de bactérias em quatro placas, sendo eles o CDSA10, CDSA23, CDSA54 e CDSA78, os quais foram submetidos novamente à ativação em meio BDA sob as mesmas condições de cultivo, sendo que houve crescimento de bactérias apenas na placa contendo o fungo CDSA54.

5.2 FERMENTAÇÃO E TESTE DE ATIVIDADE COAGULANTE

Os fungos estudados foram submetidos a uma fermentação cuja variável avaliada foi o tempo de fermentação.

A seleção dos nove isolados avaliados apenas três apresentaram ação coagulante indicando a presença de renina nos extratos brutos.

Tabela 3 - Atividade coagulante de fungos filamentosos produtores de enzima coagulante do leite em diferentes tempos de fermentação.

Tempo (h)	CDSA01				
	T1(min)	UAC/mL	T2(min)	UAC/mL	Média (UAC/mL)
24	5,5	7,27	3,2	12,5	9,885
48	8,3	4,82	10,68	3,749	4,28
72	9,25	4,32	4,02	9,96	7,14
96	7,78	5,03	4,52	8,86	6,945
Tempo (h)	CDSA24				
	T1(min)	UAC/mL	T2(min)	UAC/mL	Média (UAC/mL)
24	8,38	4,77	7,62	5,25	5,01
48	6,72	5,95	5,98	6,68	6,315
72	5,2	7,69	4,75	8,42	8,055
96	4,23	9,45	2,93	13,64	11,545

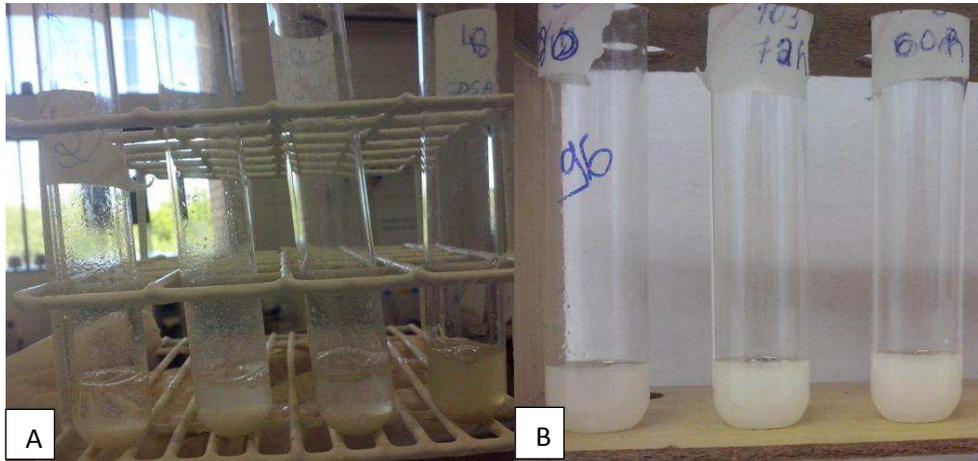
Tempo (h)	CDSA72				
	T1(min)	UAC/mL	T2(min)	UAC/mL	Média (UAC/mL)
24	6,98	5,73	7,98	5,01	5,37
48	6,78	5,9	7,92	5,05	5,475
72	3,28	12,18	1,98	20,17	16,175
96	9,9	4,04	10,37	3,86	3,95

A tabela 3 mostra a atividade coagulante do leite (UAC/ml) nos diferentes tempos de fermentação, em que T1 e T2 são os tempos de coagulação. Os resultados obtidos demonstram que os sobrenadantes apresentaram diferentes valores de atividade coagulante em diferentes tempos de fermentação.

O extrato referente a fermentação do isolado CDSA72 apresentou a maior atividade coagulante em 72 horas de fermentação, iniciando a formação de coágulos num tempo médio de 3 minutos. O CDSA72 é um *Aspergillus*. Radha et al. (2011) em estudo envolvendo a produção de proteases ácidas por *Aspergillus* spp. mencionaram uma melhor produção em um tempo superior, 120 h, ao obtido no presente estudo. O que indica que o CDSA72 teve sua melhor produção em um tempo menor de fermentação, no entanto, o CDSA01 apresentou uma atividade coagulante menor, porém em um tempo menor de fermentação.

Algumas amostras não apresentaram a atividade coagulante, em nenhum dos tempos de fermentação como é possível observar na Figura 5. A amostra do CDSA103 não apresentou formação dos coágulos, enquanto o CDSA01 apresentou coagulação nos diferentes tempos de fermentação.

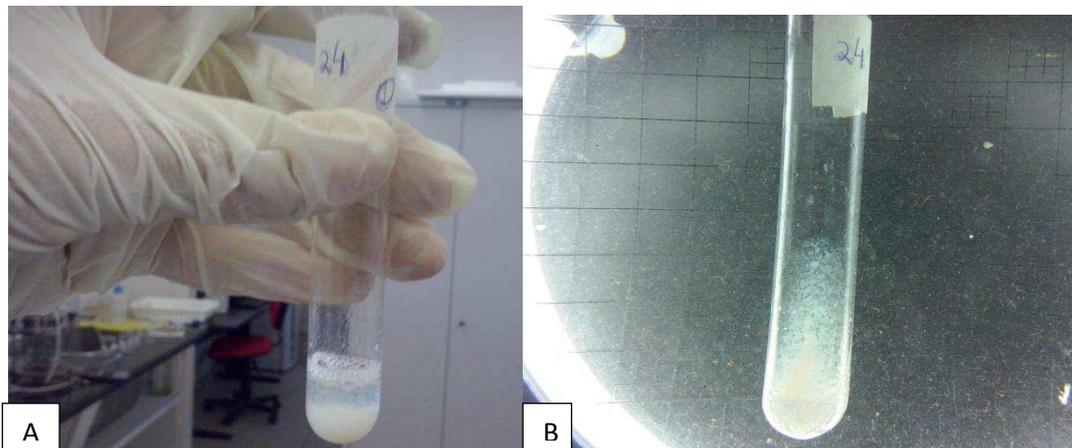
Figura 5 - Representação do teste de coagulação A) CDSA01; B) CDSA103.



Fonte: Acervo do próprio autor

Na Figura 6, é visível a separação do gel a olho nu e também utilizando uma lente de aumento de 1,5 vezes.

Figura 6 - Teste de coagulação A) Coagulação do CDSA24 B) Separação do gel CDSA24

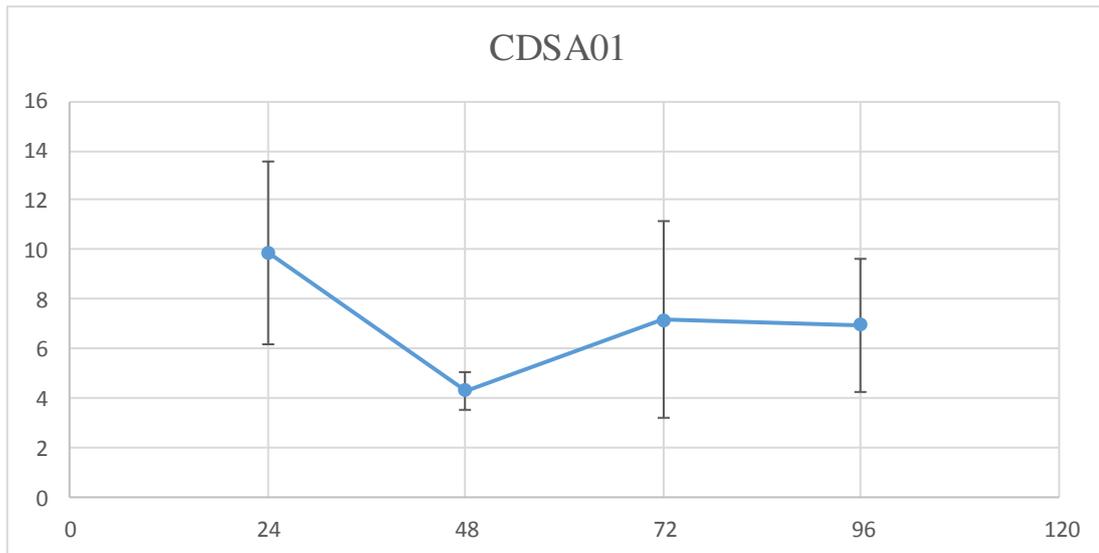


Fonte: Acervo do próprio autor

As Figuras de 7 à 9 mostram a variação da atividade coagulante com os diferentes tempos de fermentação.

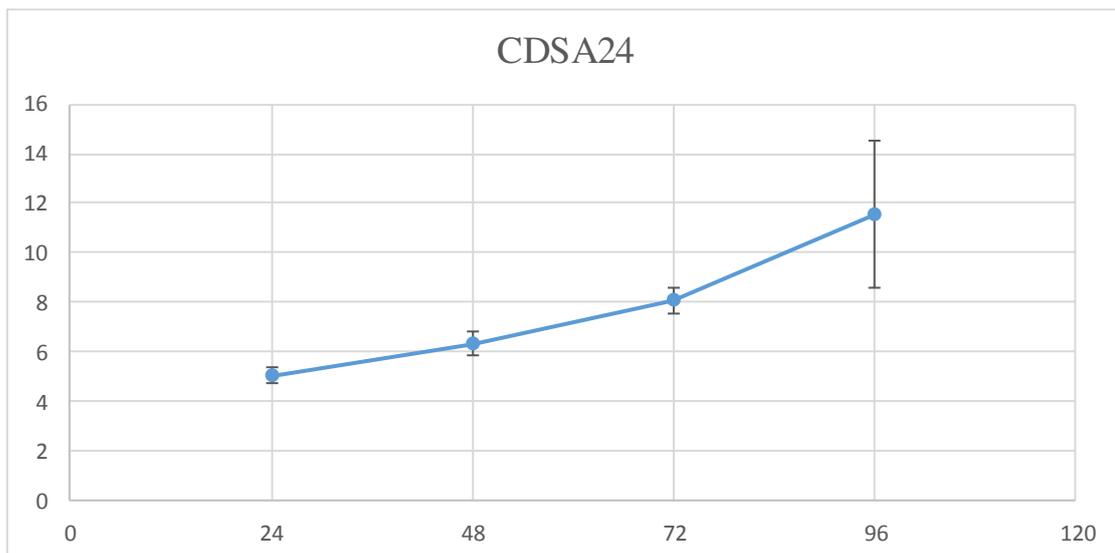
5.3 CINÉTICA DE COAGULAÇÃO

Figura 7 - Variação da atividade coagulante com o tempo de fermentação do fungo CDSA01.



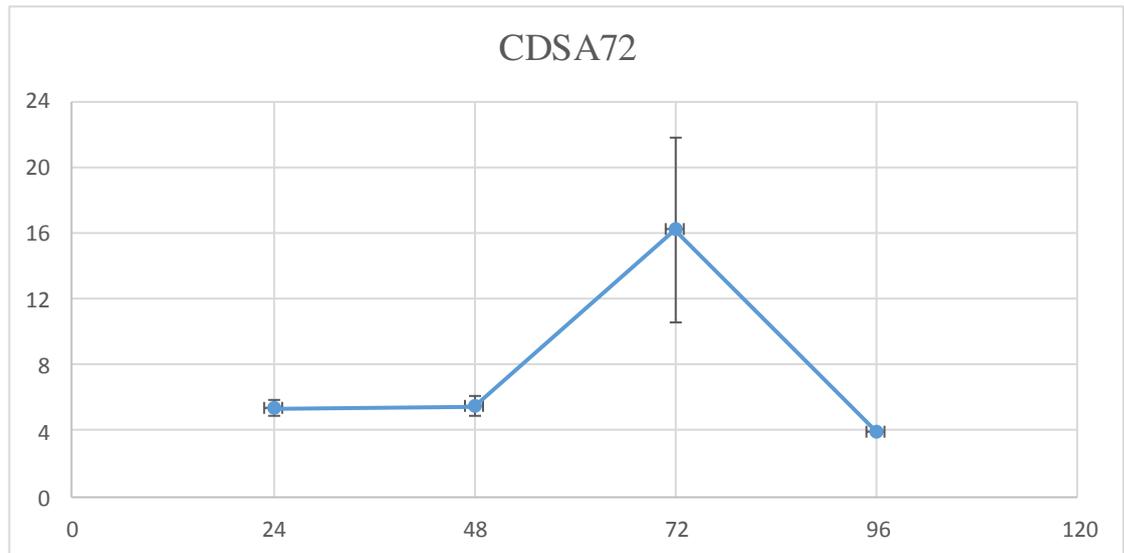
De acordo com a Figura 7 há uma maior atividade coagulante nas primeiras 24 horas de fermentação a partir daí decresce, porém volta a crescer em 72 horas.

Figura 8 - Variação da atividade coagulante com o tempo de fermentação do fungo CDSA24



O extrato referente à fermentação do CDSA24 mostra um aumento contínuo da atividade coagulante apresentando pico de produção, no tempo de 96 horas de fermentação.

Figura 9 - Variação da atividade coagulante com o tempo de fermentação do fungo CDSA72.



O CDSA72 apresentou atividade coagulante contínua nas primeiras 48 horas de fermentação e o pico de 16,17 UAC/mL no tempo de 72 horas.

A maior atividade encontrada foi no fungo CDSA72, um *Aspergillus*. As enzimas de algumas espécies de fungos filamentosos, tais como as de *Penicillium* e *Aspergillus* são descritas como coagulantes promissores. Fonseca (2012) em seu estudo observou que o *Penicilliummelinii* apresenta atividade coagulante de 22,4 UAC/mL.

Oliveira (2015) analisou que a protease de *A. niger* URM 5741 apresentou maior produção (5,71 UAC/ml) em um tempo de 72 h de fermentação, sendo que a protease de CDSA72 apresentou sua maior produção também no tempo de 72 h de fermentação, porém com uma maior atividade coagulante de 16,17 UAC/mL.

A indústria de laticínios já utiliza o *Aspergillusnigger* que inicialmente foi chamado de coagulante genético e atualmente é considerado como um coagulante microbiano, de acordo com informações do fabricante. Está sendo comercializado em diversos países pela Chr. Hansen com o nome de CHY-MAX (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os 9 fungos filamentosos submetidos à fermentação submersa, 3 (33%) apresentaram atividade coagulante;

As amostras dos fungos CDSA01, CDSA24 E CDSA72 apresentaram atividade coagulante, sendo que o CDSA72 apresenta a melhor atividade coagulante, de 16,17 UAC/mL no tempo de 72 horas de fermentação.

Esse estudo demonstra o potencial biotecnológico dos fungos filamentosos da Caatinga na produção de renina.

A descoberta de novas linhagens microbianas com poder coagulante do leite é interessante para nossa região no que diz respeito a sua aplicação na indústria alimentícia de laticínios, uma vez que o Cariri Paraibano por possuir um clima semiárido tem como principal atividade econômica a pecuária e a produção de leite. Do ponto de vista prático, os resultados evidenciam que os fungos filamentosos da Caatinga têm potencial como fonte alternativa de coagulante de leite, contudo, devem ser realizados estudos complementares, como estudo cinético e termodinâmico, que confirmem um indicativo do comportamento da enzima, sendo os resultados obtidos fundamentais para posteriores aplicações, sobretudo na indústria de alimentos no processo de produção de derivados de leite.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. A. et al. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. **Revista Cerne, Lavras**, v. 11, n. 3, p. 253-262, 2005.
- ANDRADE, V. S. et al. Production of extracellular protease by *Mucorcircinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p. 106-110, 2002.
- ANTUNES, L. A. F.; VILELA S. C.; CAMPOS, S.; DUTRA, E. R. P.; MUNCK, A. V. **Crítérios para escolha de um coagulante**. In: ALONSO, P. (Ed.). Ha-labiotec, ano 14. n. 82 Valinhos: Chr Hansen Ind. e Com. Ltda, 2004.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W. &SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotechnologia Industrial: Vol. 4. Biotechnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Bulcher Ltda., 2001.
- ARIMA, K. et al. Milk-Clotting Enzyme from Microorganisms.V. Purification and Crystallization of Mucor Rennin from *Mucorpusillus* Var Lindt. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 1727-&, 1968.
- BAZARZHAPOV, B. B.; LAVRENT'EVA, E. V.; DUNAEVSKII, Ya. E.; BILANENKO, E.N.; NAMSARAEV, B. B. Extracellular proteolytic enzymes of microscopic fungi from thermal springs of the barguzin valley (northern Baikal region). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42; nº 2; p.186-189, 2006.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BONATO, É. P.; HELENO, G. J. B.; HOSHINO, N. A.; JÚNIOR, A. F. **Leites fermentados e queijos**. Florianópolis, 2006.
- BRASIL, R. B. **Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino**. SEMINÁRIOS APLICADOS, UFG, 2013.
- CASTILHO, M. H. **Tipos de coagulação láctea – enzimática e ácida e sua utilidade na produção de queijos**. 2008. 42 p. Monografia (Especialização lato sensu Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2008.
- CASTRO, C. R.; REED, M. S.; OLSEN, A. VI Congresso de Ecologia do Brasil. Fortaleza, Ceará - CE. 2003. Disponível em: <http://www.acaatinga.org.br>. Acesso em: 01 de 08 de 2016.
- CLEMENTINO, L. C. **Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga**. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Universidade Federal de Campina Grande. Sumé, 2014.

COSTA, M. M; YANO-MELO, A. M; MELO, N. F; GOUVEIA, G. V; GOUVEIA, J. J. S. **Potencial dos micro-organismos da caatinga: uma abordagem molecular.**XX ENGENE - Encontro De Genética Do Nordeste. Campina Grande-PB,04 a 07 de novembro de 2014.

FOOD INGREDIENTS BRASIL - **Dossiê Enzimas:** A evolução das enzimas coagulantes. Nº 16 - 2011. Disponível em <http://www.revista-fi.com/materias/164.pdf>. Acesso em: 20 de mai 2016.

FREITAS, A. C. **Produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillusoryzae* CCBP001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida.** Tese (Doutorado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 115 p., 2013.

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

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** Tese (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 81 p., 2006.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases.**Applied Microbiology Biotechnology**, n. 60, p. 381-395, 2002.

HOLLIDAY, G. L.; MITCHELL, J. B.; THORNTON, J. M. Understanding the functional roles of amino acid residues in enzyme catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, p. 560–577, 2009.

HOLT, C.; DE KRUIF, C. G.; TUINIER, R.; TIMMINS, P. A. **Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering.**Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 213, p. 275–284, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica.** 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

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

KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopusoryzae*: purification and characterization. **ProcessBiochemistry**,v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

MELO, I. S. de; **Biodiversidade e bioprospecção de microrganismos da Caatinga.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/29362/biodiversidade-e-bioprospeccao-de-microrganismos-da-caatinga>. Acesso em: 13/09/2016.

MERHEB, C. W. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e determinação do padrão de ação de protease do fungo termofílico *Thermoascusaurantiacus*.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto,2007.

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA, 2007. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. Acesso em: 15 de Agosto de 2015.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos/SENAI**. Departamento Regional de Goiás. v.3,n 5 (jan/jun,2009).

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptídeo miméticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas Ferramenta na Indústria. Biotecnologia. **Ciência Hoje**. São Paulo, outubro 2007. p. 28 – 33.

NASCIMENTO, W.C.A. DO. **Estudos Sobre a Secreção de Proteases por *Bacillus sp. Smia-2* e Sua Compatibilidade Com Detergentes Comerciais**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2005.

NEVES, K. C. S. **Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia**. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

OLIVEIRA, R. L.; GOMES, M. H. G.; PORTO, T. S. Determinação dos parâmetros cinéticos da protease de *Aspergillus niger* URM 5741. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, p. 94-98, 2015.

ORDOÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, v. 1, p. 294, 2005.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; DEL RIO, L. A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 521-530, 2002.

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

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

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.

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.

SOUZA, E. F. de. **Aplicação De Proteases E Amilases Produzidas Por *Bacillus* Sp. Smia-2 Na Remoção De Manchas De Tecidos.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 60 f., 2012.

RACTZ, J. V. B. **Produção e Aplicação de Proteases dos Fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*.** Monografia. Curso de Farmácia. Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 62, n.3, p.597-635, 1998.

RIFTEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, v. 179, n. 4, p. 258-265, 2003.

RODRÍGUEZ, V.B.; ALAMEDA, E.J.; GALLEGOS, J.F.M.; REQUENA, A.R.; LÓPEZ, A.I.G. (2006). Thermal deactivation of a commercial α -amylase from *Bacillus licheniformis* used in detergents. **Biochemical Engineering Journal**. Vol.27 :299- 304.

SACCARO JUNIOR, Nilo L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil.** Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011.

SILVA, E. T. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica.** Tese (Mestrado), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 68 p., 2013.

SILVA, M.S. **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do Cacau.** 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

SILVA, R. R. DA. **Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

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

SILVEIRA, G. G.; CONTIERO, J. Production of microbial rennin from *Mucormiehei* in Batch Fermentation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Stockholm, v.13, suppl. 1, p. S38, 2001.

SOUZA, A.Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELEM PINHEIRO, M. L.; SAQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazonia: *Palicourea langiflora* (aubl.) rich e *Stychnoscogens bentham*. **Acta Amazonica** 34(2);185-195,2004.

SUMANTHA, A., LARROCHE, C. & PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food grade proteases - a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n.2, p. 211–220, 2006.

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.

VASCONCELOS M. P.; ARAÚJO, K. G. L.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Efeito do pH do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijos. **Rev. Bras. Agrobiologia**. 2004, 10, 499-502.

VIEIRA, H. S. F. **Caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha**. 54f. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Universidade de Lisboa. 2013.

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.

ZANELLA, F.C.V. & MARTINS, C.F. Abelhas da caatinga: Biogeografia, ecologia e conservação. In: LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (eds.), **Ecologia e conservação da caatinga**. Edit. Universitária, UFPE, Recife. p. 75-134. 2003.

ZHU, W.; CHA, D.; CHENG, G.; PENG, Q.; SHEN, P. Purification and Characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 40, p. 1592-1597, 2007.