



YANETH MACHACA MONROY

**“AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A
OBTENÇÃO DE PROTEASE POR CEPAS FÚNGICAS
ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO”**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

YANETH MACHACA MONROY

**“AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A
OBTENÇÃO DE PROTEASE POR CEPAS FÚNGICAS
ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO”**

Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Alimentos.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
DISERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA YANETH
MACHACA MONROY E ORIENTADA PELO PROF. DR.
RANULFO MONET ALEGRE

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M18a Machaca Monroy, Yaneth
Avaliação de resíduos agroindustriais para a
obtenção de protease por cepas fúngicas através da
fermentação em estado sólido / Yaneth Machaca Monroy.
-- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Resíduos agroindustrias. 2. Protease.
3. Micro-organismos - Seleção. 4. Fermentação. I.
Monte Alegre, Ranulfo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of agroindustrial waste for obtaining fungal
Protease by strains by solid state fermentation

Palavras-chave em Inglês:

Agroindustrial waste

Protease

Microorganism - Selection

Fermentation

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Ranulfo Monte Alegre [Orientador]

Gabriela Alves Macedo

Reinaldo Gaspar Bastos

Data da defesa: 27-03-2013

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre (FEA/UNICAMP) - Orientador

Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo (FEA/UNICAMP) – Membro Titular

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (CCA/UFSCar).-.Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant (FEA/UNICAMP) – Membro Suplente

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi (CTA/UNESP) - Membro Suplente

Dedico

*Aos meus pais, Moises e Nanciy, pela
educação que recebi, pela dedicação,
carinho e amor.*

*A minha irmã Miley e meus irmãos
Helar, Omar e Uver pelo carinho e
apoio Incondicional em todas as
minhas conquistas.*

*A todos aqueles que não se
amedrontam diante das dificuldades,
respiram fundo, erguem a cabeça e
enfrentam todos os obstáculos que a
vida lhes impõe, carregando consigo a
certeza de que o conhecimento é o
único bem que ninguém pode lhes
tirar.*

*“A alegria está na luta, na tentativa,
no sofrimento envolvido
e não na vitória propriamente dita”*

Mahatma Gandhi

*“Sem sonhos a vida não tem brilho.
Sem metas os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades os sonhos não se tornam reais.”*

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Sem a presença de Deus jamais conseguiria cumprir mais esta etapa.

*À meu orientador, Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre,
pela orientação neste trabalho, apoio, dedicação, paciência, amizade e pela
maneira como orientou meus passos, contribuindo para o meu crescimento
pessoal e intelectual.*

*Ao meu pai, Moises,
por sempre me apoiar e incentivar a ir em busca dos meus ideais, por acreditar e
confiar em mim e por ser meu exemplo de dedicação, responsabilidade e busca
incessante de conhecimento.*

*À minha mãe, Nanciy,
por seu exemplo de força, coragem, amor e dedicação, meu porto seguro, me
amparando nas dificuldades e dando suporte para que eu continuasse em frente,
razão maior da minha conquista.*

*À Miley, Helar, Omar, e Uver pelo apoio, incentivo e amor. Mesmo distantes
estiveram sempre presentes na minha mente e em meu coração*

*Aos companheiros de Laboratório Luana, Meiri, Jenny, Giovana, Cesar e Marcio (e
os que já estão trilhando outros caminhos). Pela dedicação com que realizam seus
trabalhos e pelo carinho com que me auxiliaram na parte técnica.*

*Aos amigos e colegas de mestrado Luciana, Joice, Susan Sylvia, Fiorela, Angela,
Ana, Marcus, Giovani, Moyses, Mariano pela amizade que me proporcionaram
momentos de alegria e felicidade.*

*À Caudia e a Dona Maria,
pela dedicação com que realizam seus trabalhos e pelo carinho com que me
auxiliaram na parte técnica.*

*Aos meus amigos Anita, Silvia, Eulalia, Maribel, Lena, Roxana, Salomon, e
Ricardo pela amizade, paciência comigo durante os momentos difíceis, e pelos
anos de amizade.*

*Aos professores funcionários da faculdade de Engenharia de Alimentos, pelo
conhecimento transmitido e as valiosas colaborações para o enriquecimento do
trabalho.*

*A Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP pela oportunidade de
realização do curso de mestrado.*

*Ao Capes pelo suporte financeiro sem o qual seria impossível concluir este
trabalho.*

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente com este projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1.Enzimas	4
3.2.Proteases	4
3.3.Procesos fermentativos.....	6
3.4.Fermentação em estado sólido (FES).....	8
3.5.Subprodutos agroindustriais como substrato suporte empregados na FES	9
3.6.Aplicações da protease produzida por FES	11
3.7.Enzimas na coagulação do leite.....	12
3.7.1. Coalho animal	12
3.7.2. Quimosina genética	12
3.7.3. Coagulantes microbianos.....	12
3.7.4. Fungos do gênero <i>Aspergillus</i> spp.	14
3.7.5. Fungos do gênero <i>Mucor</i> spp.....	15
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Micro-organismo.....	17
4.2. Preparo do inóculo	17

4.3. Seleção da linhagem fúngica produtora de protease por ensaio em placa	17
4.4. Fermentação em estado sólido (FES)	18
4.5. Subprodutos agroindustriais utilizadas como substrato na FES	18
4.6. Granulometria dos farelos utilizados na FES	19
4.7. Avaliação da influência da proporção de farelo utilizando delineamento de misturas.....	19
4.8. Avaliação dos fatores que afetam a atividade de protease por metodologia de superfície de resposta	21
4.9. Metodologias analíticas	22
4.9.1. Análises físico-químicas do substrato	22
4.9.2. Determinação da umidade	23
4.9.3. Determinação de cinza (termogravimétrico)	23
4.9.4. Determinação do teor de proteínas pelo método de Kjeldahl	23
4.9.5. Determinação do pH (potenciométrico)	24
4.9.6. Determinação do teor de lipídeos descrito por CECCHI.....	24
4.9.7. Determinação do açúcar redutor	25
4.10. Extração da Enzima	26
4.11. Determinação da atividade enzimática	26
4.12. Efeito da concentração de CaCl_2 na coagulação do leite	26
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Identificação das cepas fúngicas produtoras de Renina	27
5.2. Caracterização do Substrato	28
5.3. Granulometira dos farelos	29
5.4. Seleção de fungos produtores de proteases por ensaio de placa.....	29
5.5. Efeito da porporção dos farelos na fermentação em estado sólido para produção de protease por <i>Aspergillus niger</i> (NRRL 3122) e determinação do tempo de fermentação.....	30

5.6. Estabelecimento do modelo matemático e análise estatística para produção de protease por <i>Aspergillus niger</i> (NRRL 3122)	31
5.7. Efeito da proporção do farelo na fermentação em estado sólido para produção de renina fúngica por <i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 484) e determinação do tempo de fermentação	35
5.8. Estabelecimento do modelo matemático e análises estatística para produção de protease por <i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 484)	36
5.9. Efeito da proporção do farelo na fermentação em estado sólido para produção de renina fúngica por <i>Mucor pusillus</i> (NRRL 3420) e determinação do tempo de fermentação	38
5.10. Estabelecimento do modelo matemático e análise estatística para produção de protease por <i>Mucor pusillus</i> (NRRL 3420)	39
5.11. Efeito da proporção do farelo na fermentação em estado sólido para produção de renina fúngica por <i>Rizhomucor miehei</i> (NRRL 3420) e determinação do tempo de fermentação	42
5.12. Estabelecimento do modelo matemático e análise estatística para produção de protease por <i>Rizhomucor miehei</i> (NRRL 3420)	43
5.13. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade enzimática	46
5.14. Fatores que afetam atividade de protease de <i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 484) por metodologia de superfície de resposta.	48
5.15. Efeito da concentração de CaCl_2 sobre protease de <i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 484)	57
5.16. Efeito da concentração do leite	58
6.CONCLUSÃO	60
7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais diferenças entre fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm)	7
Tabela 2 - Produção de farelo de trigo, arroz e soja no Brasil (Em milhões de toneladas).....	10
Tabela 3 - Principais aplicações em FES.....	11
Tabela 4 - Micro-organismos produtores de proteases microbianas	13
Tabela 5 - Características de algumas proteinases aspárticas de <i>Aspergillus</i> spp	15
Tabela 6 - Características de algumas proteinases aspárticas de <i>Mucor</i> spp	16
Tabela 7 - Faixas de variação dos componentes da mistura dos farelos	19
Tabela 8 - Matriz do delineamento de mistura (ternária)	20
Tabela 9 - Matriz do DCCR para avaliar a atividade enzimática	22
Tabela 10 - Matriz do DCCR para a valiação da atividade enzimática por <i>A. oryzae</i> (NRRL 484)	22
Tabela 11 - Caracterização dos substratos utilizados na FES	28
Tabela 12 - Granulometria dos farelos.....	29
Tabela 13 - Diâmetro de hidrólise de caseína em ágar por proteases fúngicas	30
Tabela 14 - Atividade enzimática em US produzida por <i>A. niger</i> (NRRL 3122), utilizando delineamento de misturas	31
Tabela 15 - Coeficientes de regressão obtida a partir do delineamento de misturas do modelo lineal para <i>A. niger</i> (NRRL 3122).....	32
Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para <i>A. niger</i> (NRRL 3122) referentes a atividades enzimáticas, ao nível de confiança de 95%.....	32
Tabela 17 - Atividade de enzimática em US produzida por <i>A. oryzae</i> (NRRL 484), utilizando delineamento de misturas	35
Tabela 18 - Coeficientes de regressão obtidos a partir do delineamento de misturas para <i>A. oryzae</i> (NRRL 484)	36
Tabela 19 - Análise de variância (ANOVA) para <i>A. oryzae</i> (NRRL 484) referentes a atividades enzimáticas, ao nível de confiança de 95%.....	37
Tabela 20 - Atividade de enzimática em US produzida por <i>M. pusillus</i> (NRRL 3420), utilizando delinemento de misturas	38
Tabela 21 - Coeficientes de regressão obtidos a partir do delineamento de misturas para <i>M. pusillus</i> (NRRL 3420)	39

Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA) para <i>M. pusillus</i> (NRRL 3420) referentes a atividades enzimáticas, ao nível de confiança de 95%.....	40
Tabela 23 - Atividade enzimática em US produzida por <i>R. miehei</i> (NRRL 3420), utilizando delineamento de misturas	43
Tabela 24 - Coeficientes de regressão obtidos a partir do delineamento de misturas para <i>R. miehei</i> (NRRL 3420)	44
Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA) para <i>R. miehei</i> (NRRL 3420) referentes a atividades enzimáticas, ao nível de confiança de 95%.....	44
Tabela 26 - Matriz do DCCR para determinar a temperatura e pH da protease de <i>A. oryzae</i> (NRRL 484) e valores de atividade em 96 h de FES.....	49
Tabela 27 - Coeficientes de regressão (CR) para a resposta de atividade enzimática em 96 h de fermentação	50
Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo da atividade enzimática em função da temperatura e pH	52
Tabela 29 - Resultados experimentais para os 11 ensaios e as respostas previstas utilizando o modelo e seus desvios.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de uma micela de caseína e coagulação..	5
Figura 2 - Mecanismo de coagulação do leite por quimosina.....	6
Figura 3 - Fluxograma de produção de enzimas por FES	9
Figura 4 - Farelo de arroz (a), farelo de trigo (b) e farelos de soja (c) utilizados na fermentação em estado sólido (FES).....	18
Figura 5 - Representação gráfica do delineamento proposto.	20
Figura 6 - Fotomicrografia das cepas fúngicas produtoras de renina <i>A. niger</i> (NRRL 3122) (a), <i>A. oryzae</i> (NRRL 484) (b), <i>Mucor pusillus</i> (NRRL 3420) (c) e <i>Rhizomucor miehei</i> (NRRL 3420) (d).	27
Figura 7 - Superfície de resposta do efeito da interação entre as variáveis independentes sobre a produção de protease de acordo com o delineamento experimental de misturas ao nível de 95% de confiança por <i>A. niger</i> (NRRL 3122) em 48 horas de FES.	33
Figura 8 - Efeito dos componentes FA ($X_1 = 33,33\%$), FT ($X_2 = 33,33\%$) e FS ($X_3 = 33,33\%$) sobre a atividade enzimática (US) por <i>A. niger</i> (NRRL 3122) em 48 horas de FES.....	34
Figura 9 - Superfície de resposta do efeito da interação entre as variáveis independentes sobre a produção de protease de acordo com o planejamento experimental de misturas ao nível de 95% de confiança por <i>Mucor pusillus</i> (NRRL 3420) em 48 horas de FES.	40
Figura 10 - Efeito dos componentes FA ($X_1 = 33,33\%$), FT ($X_2 = 33,33\%$) e FS ($X_3 = 33,33\%$) sobre a atividade enzimática (US) por <i>Mucor pusillus</i> (NRRL 3420) em 48 horas de FES.....	41
Figura 11 - Efeito do armazenamento do extrato enzimático a 4°C sob as atividades enzimáticas por <i>A. oryzae</i> (NRRL 484) na FES	47
Figura 12 - Coagulação do leite desnatado por enzima bruta a partir de subprodutos agroindustriais por <i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 484).	49
Figura 13 - Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre atividade de protease de <i>A. oryzae</i> (NRRL 484), para nível de confiança de 5% ($p < 0,05$)	51
Figura 14 - Valores experimentais de atividade em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.....	53
Figura 15 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade. ..	54

Figura 16 - Superfície resposta do efeito da temperatura e pH e sobre atividade de protease de <i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 484).	55
Figura 17 - Curvas de contorno do efeito da temperatura e pH sobre atividade de protease de <i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 484).	55
Figura 18 - Efeito das concentrações de CaCl_2 em M sobre atividade de protease de <i>A. oryzae</i> (NRRL 484) na coagulação do leite.	57
Figura 19 - Atividade de protease de <i>A. oryzae</i> (NRRL 484) na coagulação do leite em função da concentração de sólidos de leite.....	59

RESUMO

Estudou-se a produção de enzimas fúngicas como substitutos do coalho de vitelo na indústria de queijo. Apartir de quatro cepas de fungos, o *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) foi selecionada por produzir maior atividade de coagulação do leite durante a fermentação em estado solido (FES). A atividade de coagulação foi avaliada através de ensaios em placas, em que o maior diâmetro de halo obtido, relacionado com a hidrólise da caseína, foi de 6,2 cm. Os substratos utilizados foram farelo de soja, de arroz e de trigo e estudou-se a combinação de várias quantidades dos substratos utilizando delineamento de misturas. Dos substratos utilizados, houve maior crescimento do fungo quando foi utilizada a mistura dos farelos. O aumento da quantidade de farelo de trigo na mistura foi estatisticamente importante, sendo favorável ao aumento da atividade enzimática, que alcançou valores de 16000 US. As maiores atividades enzimáticas foram observadas em 96 horas de cultivo, com umidade de 80%. Em seguida fez-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de 11 ensaios onde as variáveis independentes foram temperatura e pH. Os resultados obtidos pelo DCCR foram analisados por ferramentas estatísticas que confirmaram a confiabilidade do modelo preditivo para a atividade da enzima. De acordo com este modelo, a máxima atividade enzimática foi de 16552 US, em pH 5,8 e temperatura de 32°C do meio sólido. Em relação às concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) para a coagulação do leite, a maior atividade enzimática foi obtida utilizando a concentração de 0,04 M. Também foi avaliada a influência da concentração de sólidos do leite no tempo de coagulação. Maiores concentrações de sólidos levaram a menores tempos de coagulação. De forma geral, verificou-se que as atividades enzimáticas obtidas nas condições otimizadas foram superiores às relatadas por outros pesquisadores.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*, protease, coagulação de leite, resíduos agroindustriais, fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

Production of fungal enzymes as substitutes for calf rennet in the cheese industry was studied. *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) was selected among four strains of fungi due to its higher milk-clotting activity during solid state fermentation (SSF). The clotting activity was evaluated by tests in plates, in which the largest halo diameter obtained was 6.2 cm. The halo diameter is related to the casein hydrolysis. The substrates used were pure soybean, rice and wheat bran. In addition, the combination of substrates using varying amounts of mixture design was also studied. Higher fungus growth was achieved when a mixture of the substrates was used. The increased amount of wheat bran in the mixture was statistically significant led to higher enzyme activity, which reached values of 16000 US. The highest enzyme activities were observed at incubation time of 96 h with 80% humidity. A Central Composite Rotational Design (DCCR) of 11 essays was performed, in which the independent variables evaluated were temperature and pH. The results were analyzed by DCCR statistical tools which confirmed the reliability of the predictive model for the enzyme activity. According to this model, the maximum enzymatic activity was 16,552 US, at pH 5.8 and solid medium temperature of 32 °C. Regarding the calcium chloride (CaCl_2) concentration necessary to the milk clotting, the highest enzymatic activity was obtained using a concentration of 0.04 M. The effect of solids concentration in the milk-clotting time was also evaluated. Higher solids concentration leads to lower clotting times. In general, it was found that the enzyme activities obtained at the optimized conditions were greater than those reported by other investigators.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, protease, milk-clotting, agro-industrial residues, fermentation state solid.

1. INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas que ocupam uma posição central com respeito às suas aplicações, constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, sendo utilizada nas indústrias de detergente, carne e de laticínios, representando aproximadamente 60% do mercado total de enzimas (KUMAR *et al.*, 2005). Os avanços nas técnicas analíticas demonstraram que as proteases realizam modificações altamente específicas e seletivas de proteínas (DESHPANDE *et al.*, 1998).

O coalho ou renina é uma das proteases mais importantes na utilização industrial e, como a sua fonte de alimentação é limitada, verificaram-se muitos esforços para encontrar uma alternativa satisfatória (AL-DELAIFY & TUBESHA, 2003). O coalho é obtido do quarto estômago de bezerros lactantes onde age sobre a proteína do leite (NEELAKANTAN *et al.*, 1999).

O primeiro passo da fabricação de queijos envolve a desestabilização das caseínas do leite por enzimas proteolíticas coagulantes. A fração κ -caseína desempenha um importante papel na estabilização da micela de caseína. A renina, também conhecida como quimosina é capaz de romper a cadeia de amino ácidos da κ -caseína especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). As duas partes resultantes desta divisão são a para- κ -caseína insolúvel (resíduos de amino ácidos 1 a 105) que permanece associada à micela de caseína (para caseína) e um peptídeo solúvel (glicomacropeptídeo; resíduos 106 a 169). No segundo passo, agora não enzimático, sem a ação estabilizadora da κ -caseína, a estrutura micelar residual (frações alfa, beta e para- κ -caseína) precipita na presença de cálcio, formando o paracaseinato de cálcio (CHITPINITYOL & CRABBE, 1998). A coagulação se dá quando aproximadamente 86% da κ -caseína foi hidrolisada; neste momento as micelas de para caseína começam a agregar como resultado do *crosslinking* intermicelar via ligação do cálcio aos grupos fosfato-serina (GUINEE & WILKINSON, 1992).

A escassez de coalho na indústria do queijo tem estimulado a pesquisa para a coagulação do leite de enzimas a partir de fontes alternativa, oriunda principalmente de células animais, plantas, fungos e leveduras, mas raramente em bactérias. (PANDEY *et al*, 2006). Entretanto, os substitutos de origem microbiana são mais interessantes tendo em vista da sua constante disponibilidade, devido à possibilidade do uso de substratos de baixo custo para fermentação (YU & CHOU, 2005). Desde então grande diversidade de queijos são produzidos de diversas matérias-primas. A produção de queijo baseia-se na aplicação da ciência e tecnologia, incluindo o uso de enzimas industriais (FOX, 2004).

Conhecendo a importância de proteases na indústria de alimentos, as informações sobre as características da enzima mostram-se interessantes não apenas do ponto de vista da pesquisa básica, mas também como parâmetros relevantes visando seu emprego na pesquisa aplicada. Neste trabalho será apresentada a produção de uma protease fúngica por meio de um processo fermentativo, como agente coagulante na produção de queijo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir protease fúngica no extrato enzimático obtido por fungos de *Aspergillus* spp e de *Mucor* spp a partir de resíduos agroindustriais por fermentação em estado sólido (FES).

2.2. Objetivos Específicos

- Seleção de cepas fúngicas produtoras de protease em meio sólido;
- Caracterizar o substrato/suporte a ser utilizado através de análises físico-químicas;
- Determinar a melhor proporção dos farelos para a produção de enzimas utilizando-se delineamento de misturas;
- Avaliar o pH e temperatura para a produção de protease fúngica;
- Determinar o efeito da concentração do CaCl_2 na coagulação do leite.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Enzimas

As enzimas são componentes de todos os tipos de células, animal, vegetal e microbiana. A complexidade dos meios biológicos nos quais elas exercem sua função faz com que as moléculas sejam muito específicas sobre o substrato com o qual elas interagem, muito seletivas na reação e capazes de agir em solução aquosa a temperaturas, pH e pressão atmosférica controlados (HEADON; WALSH, 1994; SALAZAR; ASENJO, 2007; WHITAKER; VORAGEN; WONG, 2003).

3.2. Proteases

As proteases são enzimas degradativas que catalisam a hidrólise total de proteínas (DESHPANDE *et al.*, 1998). A renina é uma protease, tendo ponto isoelétrico igual a 4,6, sendo chamada também quimosina ou pepsina, apresentando a propriedade específica de hidrolisar a κ -caseína, fração protetora do estado coloidal de caseína, a qual é formada pelas frações α , β , γ e κ . A renina hidrolisa a ligação entre fenilalanina e metionina da fração κ , desestabilizando a micela de caseína e consequentemente permitindo a coagulação na presença de íons de cálcio (WHITAKER *et al.*, 2003). O esquema da coagulação da caseína encontra-se na Figura 1.

A fonte tradicional de renina é o coalho, que é um extrato de abomaso do quarto estômago de bezerros contendo principalmente quimosina. Tal enzima é específica para hidrólise κ -caseína e desestabilização da caseína (WHITEHURST & LAW, 2002). O coalho para a coagulação do leite representa 75% da produção total de queijos (FOX, 2004). Produtos lácteos estão entre os exemplos clássicos de fermentação derivada dos gêneros alimentícios (AEHLE, 2004).

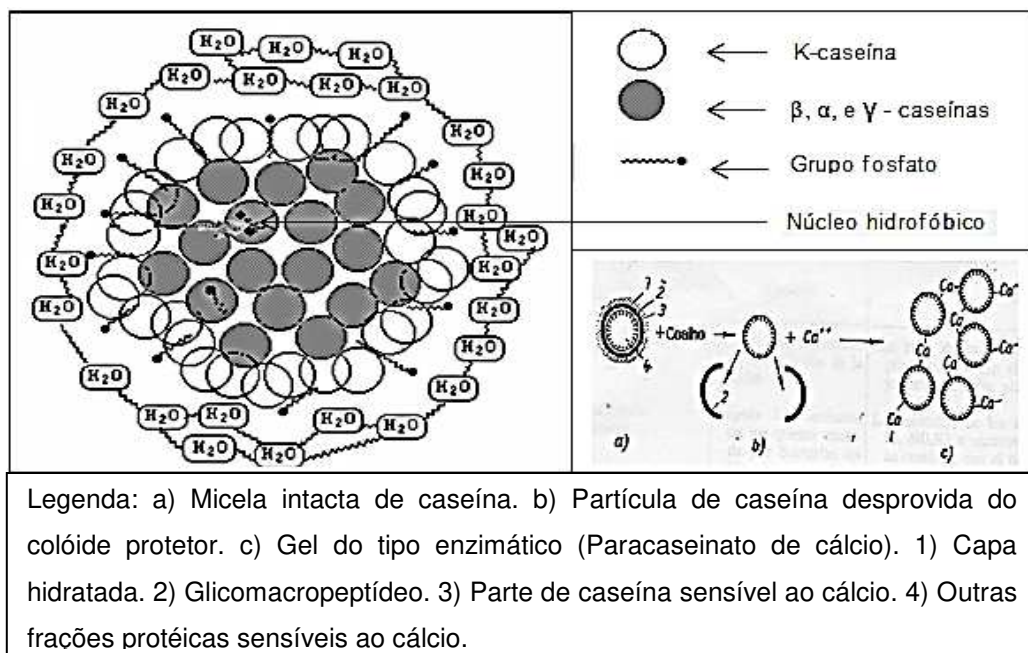


Figura 1 - Representação esquemática de uma micela de caseína e coagulação.

Fonte: SPREER, (1975)

Coagulação enzimática do leite é um processo de duas fases, sendo que qualquer variação no ambiente químico pode afetar os dois estágios de reação separadamente. Na primeira fase, as enzimas hidrolisam a molécula κ-caseína, a proteína de divisão em dois fragmentos: o hidrofóbica para-κ-caseína e o macropéptido hidrofílico. Esta última é capaz de difundir-se no soro de leite. A segunda fase consiste na coagulação das micelas de caseína que foram desestabilizadas por ataque proteolítico (JACOB *et al* 2011). Esta fase é sensível ao pH, à temperatura, ao meio e à concentração de Ca^{2+} . A Figura 2 mostra o mecanismo de coagulação do leite por quimosina bovina; qualquer proteólise que libera frações de proteína de leite que não sejam a ação específica sobre a para-κ-caseína é considerada indesejável (YEGIN *et al.*, 2011).

Quimosina-peptídica é essencial na clivagem da κ-caseína que regula coagulação do leite através da clivagem proteolítica específica da sua ligação peptídica (Phe105-Met106) para produzir para-κ-caseína (LI, T. *et al.*, 2011)

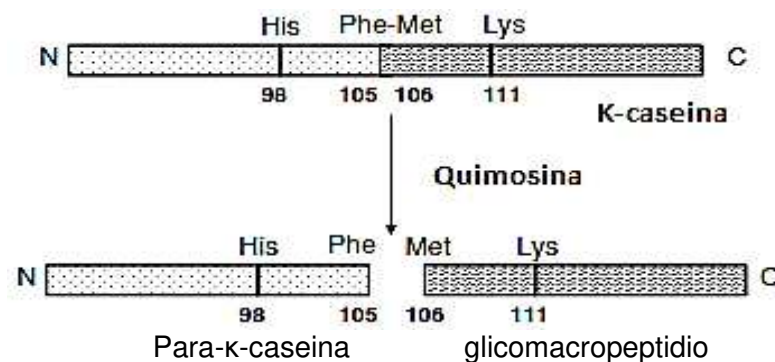


Figura 2 - Mecanismo de coagulação do leite por quimosina

Fonte: (YEGIN *et al.*, 2011).

3.3. Processos fermentativos

Fermentação é um processo que acompanha o desenvolvimento microbiano e é uma ferramenta importante na obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, vitaminas, hormônios, pigmentos, biosurfactantes, biopesticidas, etc (PANDEY *et al* 2000).

O meio de cultivo deve atender à demanda nutricional do micro-organismo produtor, aos objetivos do processo e à escala de operação. Sua seleção depende, para a maioria dos processos em larga escala, do custo, disponibilidade e características dos seus componentes (HE, X. *et al.*, 2011). Os substratos que compõem os meios devem conter fontes de carbono, nitrogênio, substâncias minerais e fatores de crescimento como vitamina B, aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos (PANDEY, 1991). As fontes de carbono, especialmente carboidratos, podem ser: glicose (pura ou de amido hidrolisado), lactose (pura, soro de queijo), amido ou fécula de cevada, centeio, trigo, aveia, farinhas e farelos diversos, soja, amendoim, algodão, batata, batata-doce, mandioca, sorgo e sacarose (melaço de cana, de beterraba ou açúcar refinado). As fontes nitrogenadas podem ser: cevada, melaço de beterraba, água de maceração de milho, farinha de aveia, farinha de centeio, farelo de soja e soro de queijo (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Na Tabela 1 apresenta-se as principais diferenças entre fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm)

Tabela 1 - Principais diferenças entre fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm)

FATOR	FES	FSm
Substratos	Polímeros insolúveis ou pouco solúveis	Compostos geralmente solúveis em água
	Geralmente fornece todos os suportes	Cada composto tem uma função diferencial
	O micro-organismo cresce firmemente aderido ao substrato	O micro-organismo encontra-se distribuído uniformemente no sistema
Assepsia (Escala Industrial)	Trabalha-se com baixos níveis de assepsia ou há tratamento térmico do sistema	O sistema é esterilizado com calor ou filtração. É necessário um controle de contaminação
Inoculação	Relação inóculo/meio geralmente é alta. Operação complexa	Relação inóculo/meio geralmente é baixa. Operação simples
Controles de proceso	Controle de temperatura é complexo devido à baixa condutividade térmica do substrato	Controle de temperatura simples devido às características do sistema
	O pH geralmente não é controlado e, quando é, utiliza-se solução tampão ou o próprio substrato já é tamponante	Controle de pH é fácil devido às características do sistema
Aeração	A fase gasosa ocupa os espaços entre as partículas fornecendo oxigênio ao sistema	O oxigênio é transferido continuamente ao meio por injeção de ar
Bioreator	Reatores estáticos ou agitados com projetos dirigidos. Baixo consumo energético	Grande volume, complexos com modelos nomeados e patenteados. Alto consumo energético
Concentração e recuperação de produtos	Recuperação relativamente simples. Altamente concentrados (100-300 g/L)	Recuperação pode ser complexa. Baixa concentração (30-80 g/L)
Contaminação	Baixa devido à baixa umidade no sistema	Grande. As condições de cultivo precisam ser controladas
Agitação	Evita-se	Fundamental

Fonte: (MCNEIL & HARVEY, 2008)

Os meios de cultivo podem ser divididos em sintéticos e naturais. Os sintéticos apresentam composição química bem conhecida, já os naturais apresentam composição química complexa, geralmente desconhecida, sendo normalmente preferidos pelo menor custo (PANDEY *et al.*, 2000). Os processos fermentativos para obtenção de dado produto a partir de dado micro-organismo podem ser bem variados; dependem do tipo de reator utilizado, do estado da fermentação (submersa ou sólida) e de outras características como ser descontínuo, descontínuo alimentado, semicontínuo ou contínuo (STANBURY *et al* 1995).

3.4. Fermentação em estado sólido (FES)

Definida como o processo de fermentação que envolve a matriz sólida e é levada a cabo em ausência ou quase ausência de água livre, no entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para sustentar o crescimento e metabolismo de o micro-organismo (SINGHANIA *et al.*, 2009).

A matriz sólida pode ser fonte de nutrientes ou simplesmente um suporte impregnado por nutrientes que permite o desenvolvimento dos micro-organismos (PANDEY, 2003).

Os procesos fermentativos envolvem uma série de variáveis como: pré-tratamento do sólido, composição do meio, pH, condições da autoclavagem e quantidade de inóculo, agitação, aeração, temperatura, umidade do meio e umidade no fermentador (DUTTA, 2008). Algumas considerações importantes para o desenvolvimento da FES incluem a seleção adequada do substrato e micro-organismo, otimização dos parâmetros do processo e separação e purificação dos produtos (NOUANI *et al.*, 2011).

De maneira geral, este é um processo que emerge como tecnologia em potencial para a produção de diversos produtos de origem microbiana, principalmente para a produção de enzimas fúngicas (PANDEY, 2003). Na Figura 3 apresenta-se o esquema genérico da produção de enzimas.

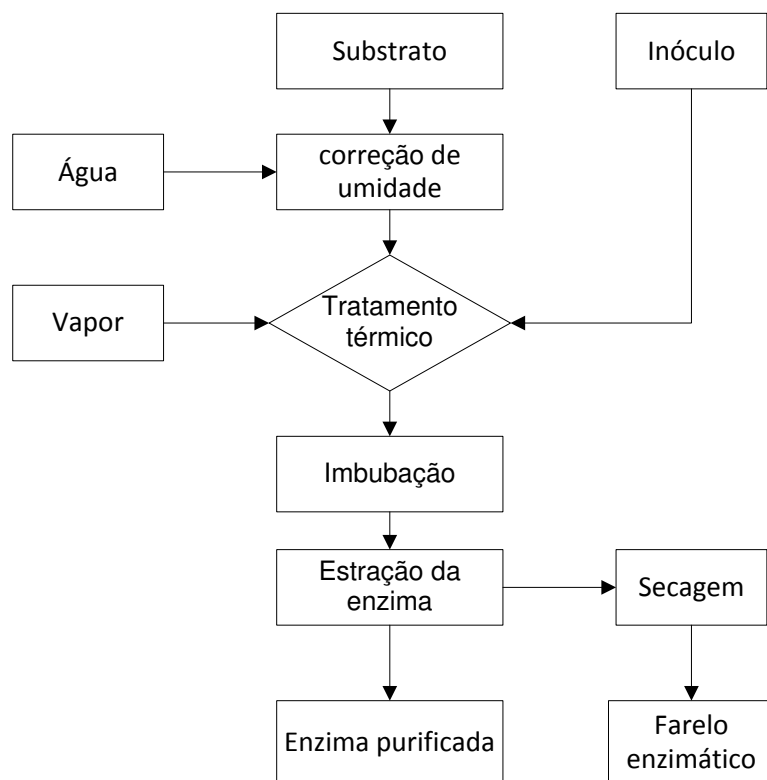


Figura 3 - Fluxograma de produção de enzimas por FES

3.5. Subprodutos agroindustriais como substrato suporte empregados na FES

A seleção adequada de substrato é de fundamental importância para qualquer tipo de fermentação. O substrato pode estar tanto na forma natural quanto na forma sintética, dependendo do processo que se deseja realizar, da facilidade de se obter matérias-primas ou dos resultados que se quer conseguir. Porém, de forma geral, os materiais utilizados são provenientes de matérias-primas, produtos e ou resíduos agroindustriais (NAMPOOTHIRI *et al.*, 2002), devido ao baixo ou nenhum valor comercial.

Entre estes, destacam-se os subprodutos agroindustriais como farelos que se obtêm a partir de trigo, arroz e soja. Como se mostra na Tabela 2, a produção dos farelos de trigo e arroz ocorre principalmente no sul e soja no centro oeste do Brasil, o beneficiamento destes produtos gera de 7 a 12% de farelos, dependendo do tipo de processo, produto e tipo de cultivo.

Tabela 2 - Produção de farelo de trigo, arroz e soja no Brasil (Em milhões de toneladas)

	Arroz		Soja		Trigo	
	fev/12	fev/13	fev/12	fev/13	fev/12	fev/13
NORTE	89,9935	92,32	206,36	241,89	-	-
RR	10,07	10,06	0,99	0,99	-	-
RO	13,49	13,41	43,91	50,83	-	-
AC	1,81	1,99	-	-	-	-
AM	1,24	1,26	-	-	-	-
AP	0,25	0,26	-	-	-	-
PA	21,13	21,14	30,09	32,69	-	-
TO	42,02	44,18	131,38	157,396	-	-
NORDESTE	73,06	103,27	579,15	692,19	-	-
MA	44,43	62,87	156,81	171,12	-	-
PI	13,06	23,59	119,99	155,72	-	-
CE	5,88	6,72	-	-	-	-
RN	0,23	0,21	-	-	-	-
PB	0,02	0,24	-	-	-	-
PE	1,35	1,35	-	-	-	-
AL	1,62	1,68	-	-	-	-
SE	4,27	4,27	-	-	-	-
BA	2,20	2,36	302,35	365,34	-	-
CENTRO-OESTE	70,73	56,06	3315,96	3764,59	10,36	6,48
MT	43,82	48,97	2075,66	2322,51	-	-
MS	10,36	9,42	439,69	574,85	4,08	2,28
GO	16,54	7,16	783,89	850,52	5,74	3,76
DF	-	-	16,72	16,72	0,54	0,44
SUDESTE	14,69	12,83	442,35	487,47	19,08	15,43
MG	6,11	4,94	290,58	319,54	8,56	7,67
ES	0,26	0,26	-	-	-	-
RJ	0,51	0,55	-	-	-	-
SP	7,81	7,09	151,77	167,93	10,52	7,76
SUL	853,49	869,21	1762,57	2739,15	520,49	386,63
PR	15,85	15,16	1039,48	1432,09	237,59	200,69
SC	102,38	101,80	103,07	148,72	22,38	13,45
RS	735,26	752,25	620,03	1158,34	260,51	172,49
NORTE/NORDESTE	163,0485	195,5955	785,5075	934,0875	-	-
CENTRO-SUL	938,904	947,606	5520,8775	6991,221	549,917	408,538
BRASIL	1101,9525	1143,2015	6306,385	7925,3085	549,917	408,538

Fonte: CONAB (2013)

3.6. Aplicações da protease produzida por FES

A demanda por proteases está constantemente em ascensão devido suas diversas aplicações. Existem várias empresas envolvidas na produção de proteases, como indústrias têxteis, detergentes, papel entre outras. A FES é amplamente utilizada para a obtenção de vários produtos, conforme listado na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais aplicações em FES

SETOR	APLICAÇÃO	EXEMPLOS
Fermentações Industriais	Enzimas	Amilases, celulasas, pectinases, xilanases e proteases.
	Antibióticos	Penicilina, tetraciclina.
	Ácidos Orgânicos	Fumárico, gálico, cítrico, láctico
	Etanol	<i>Scwanniomycetes</i> (em substratos amiláceos), <i>Sacharomycetes</i> .
	Metabólitos fúngicos	Hormônios, alcaloides
Agricultura	Biocontrole e Bioinseticidas	<i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Colletotricum</i> .
	Estimulantes de crescimento vegetal	<i>Giberelinas</i> , <i>Incoderma Rhizobium</i> .
	Produção de inóculo	Micorrizas, cogumelos, bioinseticidas.
Indústria Agro-alimentícia	Alimentos tradicionais	Koji, Queijos fermentados, molho de soja (Shoyu).
	Produção de fungos comestíveis	Agaricus, Pleurotus, Shiitake.
	Aditivos alimentares	Bioaromas, corantes, ác. orgânicos.
Ambiental	Biorremediação e Biodegração de compostos tóxicos	Casca de café, pesticidas, subprodutos da mandioca.

Fonte: (PANDEY *et al.*, 2000)

3.7. Enzimas na coagulação do leite

3.7.1. Coalho animal

Coalho animal é extraído do abomasso do quarto estômago de ruminantes jovens, principalmente de bezerros. O coalho contém quimosina e pepsina em frações que dependem da idade dos animais, quimosina varia entre cerca de 50% e 95%, é conhecida pela sua alta especificidade para hidrolisar a κ -caseína, que provoca a desestabilização da micelas de caseína e portanto, induz a coagulação do leite (MØLLER *et al.*, 2012),

3.7.2. Quimosina genética

Em 1990 a versão recombinante de quimosina de bezerro, usualmente denota como quimosina produzida por fermentação (FPC) foi a primeira transformação para processamento de alimentos produzido com DNA recombinante, tecnologia que foi registrada no, FDA (Food and Drug Administration). Quimosina recombinante é usada principalmente nos Estados Unidos, Brasil e em outras partes do mundo mostrando crescente aceitação. Estima-se que FPC compreenda 70-80% do mercado global de coagulantes (FLAMM, 1991).

3.7.3. Coagulantes microbianos

Muitas proteases extracelulares de origem microbiana agem de forma semelhantes como a quimosina e são em parte adequadas para a produção de queijo. Tais coagulantes podem ser facilmente produzidos por fermentação e são, portanto, disponíveis quase ilimitadamente. As enzimas mostram, no entanto, maior atividade proteolítica, o que pode levar à perda de produtos de degradação das proteínas do soro de queijo e assim afetam negativamente o rendimento do queijo (JACOB *et al.*, 2011).

Na Tabela 4 apresentam-se alguns micro-organismos produtores de protease.

Tabela 4 - Micro-organismos produtores de proteases microbianas

Micro-organismos	Propriedades	Referência
<i>Endothia parasitica</i> <i>Mucor miehei</i>	Impacto do tipo de coagulante nas propriedades funcionais no queijo mussarela	(YUN <i>et al.</i> , 1993)
<i>Mucor miehei</i>	Processamento de coalho microbiano em fermentação em estado sólido com farelos	(THAKUR <i>et al.</i> , 1993)
<i>Mucor miehei</i>	O efeito dos parâmetros de fermentação para a produção protease ácida num meio quimicamente definido	(AYHAN <i>et al.</i> , 2001)
<i>Mucor pusillus</i>	Produção de protease aspártica em escala laboratorial	(PEREZ <i>et al.</i> , 2001)
<i>Mucor ssp</i>	Renina como enzima coagulante do leite produzida por um local isolado	(TUBESHA & AL-DELAIMY, 2003)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Produção enzimática para coagulação do leite em fermentação em estado sólido.	(SHATA & FODA, 2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	Papel da caseína na indução e melhoramento da produção de uma protease na coagulação do leite por bactérias	(DUTT <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pichia pastoris</i>	Clonagem e expressão de quimosina ativa de búfalo	(VALLEJO <i>et al.</i> , 2008)
<i>Mucor circinelloides</i>	Produção de protease para coagulação do leite em fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais	(SATHYA <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	Caracterização e elaboração de queijo, Propriedades do coalho como enzima produtora da protease	(FAZOUANE-NAIMI <i>et al.</i> , 2010)
<i>Mucor mucedo</i>	Produção de protease aspártica extracelular em fermentação submersa	(YEGIN <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	Produção de enzima para coagulação do leite a partir de farelo de trigo	(DING <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Produção e caracterização de enzima para coagulação do leite, por fermentação submersa.	(DING <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bacillus subtilis</i>	Purificação e caracterização da enzima para coagulação do leite, e seu uso potencial na indústria de laticínios.	(LI, Y. <i>et al.</i> , 2012)

A seleção adequada do micro-organismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de FES (PANDEY, 1992). Os micro-organismos devem apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto e permitir sua rápida liberação para o meio. Não devem produzir substâncias incompatíveis com o produto e apresentar inconstância quanto ao comportamento fisiológico (SCHMIDELL, 2001).

3.7.4. Fungos do gênero *Aspergillus* spp.

Espécies de *Aspergillus* produzem grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas na biotecnologia (KNUF & NIELSEN, 2012).

Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fulmigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*. Os *Aspergillus* spp. pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eutrotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. Esses fungos se reproduzem por meio de esporos (conídias), formando micélios compostos por hifas septadas e ramificados (FAZOUANE-NAIMI *et al.*, 2010).

O *Aspergillus niger* é um fungo filamentoso negro comumente denominado como “mofo negro”, apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mas rapidamente forma milhares de esporos. Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3-5 µm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação (FAZOUANE-NAIMI *et al.*, 2010).

O *Aspergillus oryzae*, em comparação de *A. flavus*, não produz aflatoxina e sua longa história de uso na indústria alimentar provou sua segurança. O *A. oryzae* tem genes envolvidos no metabolismo, particularmente aqueles para a síntese secundária dos metabólitos. *Aspergillus oryzae* tem a maior extensão de genes hidrolíticos, codificados como proteases alcalinas, ácidas e neutras (MACHIDA *et al.*, 2005).

Na Tabela 5 apresenta-se um resumo das características de algumas proteinases aspárticas microbianas por *Aspergillus* spp .

Tabela 5 - Características de algumas proteinases aspárticas de *Aspergillus* spp

Fungo	Massa molecular (KDa)	Temperatura optima C	pH optimo	Referência
<i>Aspergillus versicolor</i>	38,5	45	6	(ABDELFATTAH & SALEH, 1988)
<i>Aspergillus ustus</i>	86	63	6	(TAKAHASHI & KIKUCHI, 1993)
<i>Aspergillus niger</i>	-	55	5,8	(CHANNE & SHEWALE, 1997)
<i>Rhizopus oryzae</i>	34	60	5,5-7,5	(KUMAR <i>et al.</i> , 2005)
<i>Aspergillus oryzae</i>	32-35	45	3,0-3,5	(VISHWANATHA <i>et al.</i> , 2010)

3.7.5. Fungos do gênero *Mucor* spp.

As proteases produzidas pelas duas espécies são estreitamente relacionadas, *Mucor pusillus* e *Mucor miehei* possuem alta atividade de coagulação do leite junto com baixa atividade proteolítica. Estas características são semelhantes à quimosina de vitelo (renina) (HEADON & WALSH, 1994; NEELAKANTAN *et al.*, 1999; THAKUR *et al.*, 1993; YAMASHITA *et al.*, 1987).

A reprodução dos mucorales ocorre por meio de esporos de reprodução assexuada denominados esporangiósporos, que ficam armazenados dentro de esporângios simples ou ramificados, que são estruturas globosas infladas, na forma de columelo (ANDREEVA & RUMSH, 2001)

A protease de *Mucor pusillus* var. Lindt, a qual não possui carboidratos em sua cadeia, alcançou resultados satisfatórios como coalho alternativo na produção de uma grande variedade de queijos, mas não foram todas as cepas da var. Lindt que produziram queijos de qualidade aceitável. Esta enzima é mais sensível a mudanças de pH na faixa entre 6,4 e 6,8 do que o coalho bovino (REED, 1993).

O coalho proveniente do *Mucor miehei* e sua alta termoestabilidade, esta enzima permanece ativa no soro e fica concentrada nos produtos provenientes do mesmo, causando problemas quando tais produtos, contendo coalho microbiano residual, entram em contato com caseína, como subprodutos provenientes do soro ou queijos que necessitam do processo de maturação. Conseqüentemente, quase todo o coalho utilizado na indústria de queijo é, agora, submetido ao tratamento com peróxido de hidrogênio sob condições controladas, com o intuito de diminuir sua termoestabilidade. Na indústria é potencial pela capacidade de coagulação do leite que apresentam boa qualidade de queijo (SEKER *et al.*, 1998).

Na Tabela 6 apresenta-se um resumo das características de algumas proteinases aspárticas microbianas por *Mucor* spp.

Tabela 6 - Características de algumas proteinases aspárticas de *Mucor* spp

Fungo	Massa molecular (KDa)	Temperatura optima °C	pH optimo	Referência
<i>Rhizomucor pusillus</i>	38,5	55	5,6	(ETOH <i>et al.</i> , 1979)
<i>Rhizomucor miehei</i>	20-43	58-62	5,6	(PREETHA & BOOPATHY, 1994)
<i>Mucor bacilliformis</i>	-	-	3,0-3,8	(LAHORE <i>et al.</i> , 1995)
<i>Mucor circinellloides</i>	33	-	3,0-3,5	(FERNANDEZ-LAHORE <i>et al.</i> , 1999)
<i>Mucor pusillus</i>	-	30	5	(PEREZ <i>et al.</i> , 2001)
<i>Mucor subtilis</i>	-	37	6	(DUTT <i>et al.</i> , 2009)
<i>Mucor mucedo</i>	32-35	24	4,5	(YEGIN <i>et al.</i> , 2010)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i>	-	70	5,7	(MERHEB-DINI <i>et al.</i> , 2010)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo

Os micro-organismos utilizados foram o *Aspergillus niger* (NRRL 3122) e *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) foram cedidos pela NRRL – US Department of Agriculture. Os micro-organismos *Mucor pusillus* (NRRL 3420) e *Rhizomucor miehei* (NRRL 3420) cujas culturas foram provenientes da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, sediada em Campinas – SP. As culturas foram mantidas em 10 mL de meio PDA (água batata dextrose) inclinado em tubos de ensaio previamente esterilizados na temperatura de 121 °C por 15 minutos.

4.2. Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo os fungos *Aspergillus niger* (NRRL 3122), *Mucor pusillus* (NRRL 3420) e *Rhizomucor miehei* (NRRL 3420) foram cultivados em 100 mL de água-água com 4 g de farelos (2 g de farelo de soja, 1 g de farelo de arroz e 1 g de farelo de trigo) e *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) foi cultivado em 50 mL de PDA (batata-dextrose-água), inclinados em Erlenmeyer de 250 mL a 30 °C por período de 7 dias. A raspagem dos esporos foi realizada adicionando-se 50 mL de água destilada estéril e a contagem dos esporos em Câmara de Neubauer, que foi padronizado a 1×10^6 esporos/mL. O cálculo da concentração de esporos (*C_{esp}*) foi realizado de acordo a Equação (1).

$$C_{esp} \left(\frac{esp}{mL} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ de esp contados} \times \text{fator de diluição}}{4 \times 10^{-4} \text{ mL}} \quad (1)$$

4.3. Seleção da linhagem fúngica produtora de protease por ensaio em placa

Dois *Aspergillus* spp e dois *Mucor* spp foram selecionados para a produção de protease utilizando meio em placa de Petri. O meio de crescimento (10 mL) contendo 0,5% de glicerol, 2% de caseína, 0,3% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 2 % de água, pH 7,0 foi preparado em placas de Petri (20 mm de diâmetro),

inoculado com esporos de fungos (50 μ L) e incubado a 30 °C, durante 72 h. As placas foram então coradas com azul brilhante de *Coomassie*, seguido de descoloração com água destilada para observar a zona de hidrólise devido à produção de protease neutra, medindo-se o raio da zona de hidrólise.

4.4. Fermentação em estado sólido (FES)

Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados os farelos e em seguida esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Foram adicionados 2 mL da suspensão de esporos (1×10^6 esporos/mL) em cada frasco contendo 10 g de farelos, de acordo com as proporções especificadas em cada experimento. O meio fermentativo de cada frasco foi misturado com o auxílio de bastões de vidro, para homogeneizar os substratos.

4.5. Subprodutos agroindustriais utilizadas como substrato na FES

Como meio de cultivo no processo de fermentação em estado sólido para obtenção da protease, foram utilizados três tipos de farelos: farelo arroz (FA), farelo de soja (FS) e farelos de trigo (FT) mostrados na Figura 4.

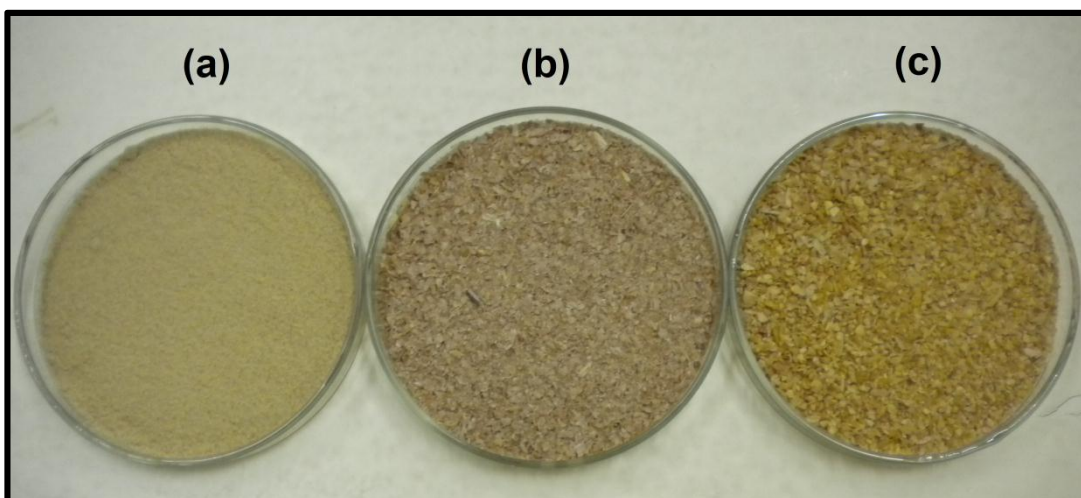


Figura 4 - Farelo de arroz (a), farelo de trigo (b) e farelos de soja (c) utilizados na fermentação em estado sólido (FES).

4.6. Granulometria dos farelos utilizados na FES

Foram testadas cinco granulometrias dos farelos para FES, que foram moídas em moinho de disco e classificados a fim de obter a granulometria desejada. Estas granulometrias foram: 60, 40, 35, 16 e 14 mesh, que corresponde a 0,250, 0,420, 0,500, 1,19 e 1,41 mm.

4.7. Avaliação da influência da proporção de farelo utilizando delineamento de misturas.

Com a finalidade de estudar a influência da proporção de farelos na atividade enzimática, aplicou-se um delineamento de misturas para os 3 componentes (MALVESTITI *et al.*, 2007; MONGOMERY, 2001), que podem variar de 0 a 1% ou 0 a 100%, como apresenta-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Faixas de variação dos componentes da mistura dos farelos

Substrato	Faixas
Farelo de arroz (X_1)	$0 \leq X_1 \leq 1$ ou 100 %
Farelo de trigo (X_2)	$0 \leq X_2 \leq 1$ ou 100 %
Farelo de soja (X_3)	$0 \leq X_3 \leq 1$ ou 100 %

As misturas de farelos foram analisadas experimentalmente empregando-se planejamento (Figura 5) para obter dados de modelação (BOX & DRAPER, 2007). Dez combinações dos três farelos foram definidas conforme pontos experimentais. Os componentes (X_1 , X_2 e X_3) referem-se à proporção de farelo de arroz, trigo e soja respectivamente, (Tabela 8). Para FES a temperatura de 30°C e umidade de 80% foram mantidas fixas em todos os ensaios e a atividade enzimática foi verificada em 48 e 96 horas de fermentação.

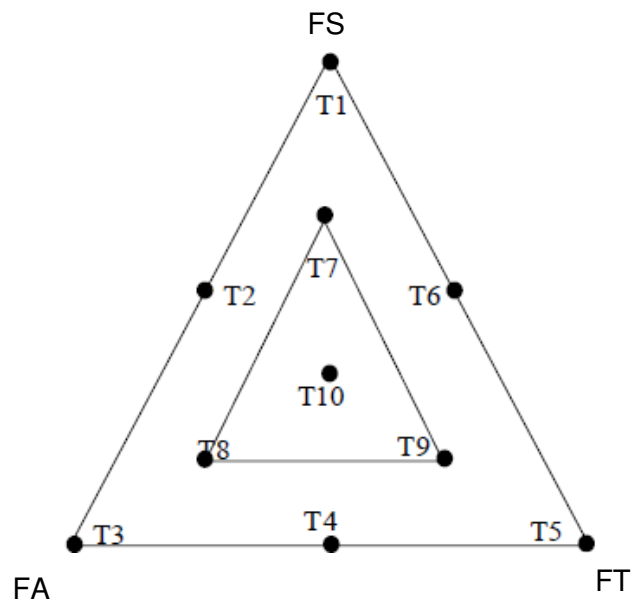


Figura 5 - Representação gráfica do delineamento proposto.

Tabela 8 - Matriz do delineamento de mistura (ternária)

Teste	X_1	X_2	X_3
1	1 (10)	0 (0)	0 (0)
2	0 (0)	1 (0)	0 (0)
3	0 (0)	0 (0)	1 (0)
4	1/2(0,5)	1/2(0,5)	0 (0)
5	1/2(0,5)	0 (0)	1/2(0,5)
6	0 (0)	1/2(0)	1/2(0)
7	2/3(0,67)	1/6(0,167)	1/6(0,167)
8	1/6(0,167)	2/3(0,67)	1/6(0,167)
9	1/6(0,167)	1/6(0,167)	2/3(0,67)
10	1/3(0,33)	1/3(0,33)	1/3(0,33)

As equações (Linear, quadrático, cúbico especial e cúbico) foram submetidas à análise de variância. A equação Scheffé canônica (cúbico especial) apresenta-se na (Equação 2)

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (2)$$

Onde Y representa atividade enzimática estimada, β_1 , β_2 , β_3 , β_{12} , β_{13} , β_{23} , e β_{123} são os coeficientes de regressão e X_1 , X_2 e X_3 são as frações de farelo de arroz, trigo e soja respectivamente presentes na mistura para FES.

As respostas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) para determinar o significado da regressão modelo no nível de 5% (teste F) e do coeficiente de determinação ajustado (R^2), Valores positivos para β indicam efeitos sinérgicos enquanto que os valores negativos indicam antagonismo (DRAPER, 2007).

A análise da significância dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de protease foi avaliada através do programa Statistica v 7.0 (StatSoft. Inc).

4.8. Avaliação dos fatores que afetam a atividade de protease por metodologia de superfície de resposta

O delinemaneto de misturas, como exposto anteriormente, foi utilizado para determinar a proporção dos farelos, e quais influenciam na produção da enzima. Dessa forma, após a identificação da mistura fez-se um planejamento completo (Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR), buscando-se elaborar um modelo matemático e, através da análise da superfície de resposta gerada por este modelo, obter as condições de temperatura e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de incubação em que a produção de protease fosse máxima.

Foi empregado um DCCR 2^2 com três repetições na condição central e quatro ensaios nos pontos axiais, totalizando onze ensaios. A matriz com os valores codificados está expressa na Tabela 9.

Tabela 9 - Matriz do DCCR para avaliar a atividade enzimática

Ensaio	Variáveis	
	Temperatura	pH _{inicial}
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

As variáveis independentes analisadas foram temperatura (°C) e pH_{inicial}, os valores dos níveis dessas variáveis estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 - Matriz do DCCR para a valiação da atividade enzimática por *A. oryzae* (NRRL 484)

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
T (°C)	20	23	30	37	40
pH _{inicial}	3	3,6	5	6,4	7

4.9. Metodologias analíticas

4.9.1. Análises físico-químicas do substrato

As análises das características físico-químicas do substrato como: umidade (termogravimétrico), cinzas (termogravimétrico), proteínas (método de Kjeldahl) e pH (potenciométrico) foram realizadas conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985). A determinação de lipídios foi feita de acordo a metodologia descrita por CECCHI 2003 e a quantificação dos açúcares redutores presentes nos farelos foi feita pela metodologia de Somogyi-Nelson. Todas as análises foram feitas em triplicata e expressas em porcentagem.

4.9.2. Determinação da umidade

A umidade dos farelos foi determinada a partir da media da diferença de massa entre a amostra úmida e a seca. A secagem foi realizada sob temperatura de 105 °C em estufa aerada, com as amostras acondicionadas em frascos previamente tarados. Após 24 horas de secagem, os frascos foram colocados em dissecador até atingirem a temperatura ambiente e em seguida pesados em balança analítica da marca Sartorius Analytic, modelo A200S.

4.9.3. Determinação de cinza (termogravimétrico)

Pesaram-se cerca de 5 g de farelo em cadinho tarado e seco a 105 °C por 2 h. O cadinho foi colocado em estufa a 550 °C até que restassem apenas cinzas brancas. Após esfriamento em desecador, o cadinho foi pesado novamente.

4.9.4. Determinação do teor de proteínas pelo método de Kjeldahl

O teor de proteínas foi determinado pela metodologia de Kjeldahl. Foi pesado 0,2 g de farelo em papel filtro livre de nitrogênio e adicionou-se 2 g de mistura catalítica (Na_2SO_4 e $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$) no tubo digestor, adicionando-se 5 mL de ácido sulfúrico no tubo seguido de agitação. O tubo foi levado à digestão em bloco digestor a 450 °C até o conteúdo do tubo ficar límpido e transparente. Esfriou-se o tubo. A etapa seguinte consistiu na destilação da amônia. Foram colocados 15 mL de água no tubo até dissolver a amostra e esfriou-se o tubo em banho de gelo ou água corrente. O tubo com a amostra digerida foi então levado ao destilador e colocou-se 20 mL de NaOH. O vapor foi borbulhado em 10 mL de ácido bórico 3% em Erlenmeyer com 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila 0,2% e azul de

metileno 0,2%). A destilação ocorreu até o aparecimento da cor verde ou até que o volume coletado fosse de 50 mL para garantir o término da evaporação e a condensação de toda amônia presente na amostra. A etapa final consistiu na titulação do borato de amônio com HCl 0,1N. O fator de correção usado foi 6,25.

4.9.5. Determinação do pH (potenciométrico)

As medidas de pH foram realizadas com 10 g do substrato em suspensão em 100 mL de água e agitado durante 15 minutos, com posterior medida do pH da suspensão formada em potenciômetro da marca Digimed, modelo pH 300.

4.9.6. Determinação do teor de lipídeos descrito por CECCHI

Foram pesados 3 g de farelo de arroz (amostra moída) e colocados em tubos de 70 mL, adicionando-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 5 mL de água destilada e tampou-se hermeticamente. Os volumes de solvente que foram adicionados (10, 20 e 5 mL) correspondem a uma relação em volume de 1:2:0,5 de clorofórmio:metanol:água. Nessa proporção os três coexistem em uma solução homogênea. Colocaram-se os tubos no agitador rotativo por 30 minutos, e adicionou-se exatamente 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5 %, tampou-se e agitou-se vigorosamente por 2 minutos. A adição de mais clorofórmio e mais água muda a proporção para 2:2:1,5, causando a separação total do clorofórmio que carrega os lipídios (camada inferior). Portanto, todos os lipídios da amostra ficam dissolvidos em 20 mL de clorofórmio. Deixou-se separar as camadas de forma natural (de um dia para outro na geladeira), descartando-se a camada superior com pipeta e filtrou-se rapidamente a inferior (para evitar a evaporação do clorofórmio) num tubo de 30 mL. Mediu-se exatamente 5 mL do filtrado e transferiu-se para placas de Petri, colocando-as em estufa a 100°C até evaporar o solvente durante 15 minutos, resfriou-se em dessecador e pesou-se. O teor de lipídios foi então calculado pela Equação 3.

$$\%Lipídeos_Totais = \frac{P_L \times 4 \times 100}{w} \quad (3)$$

Onde:

w = peso da amostra [g];

P_L = peso dos lipídios contidos nos 5 mL [g].

4.9.7. Determinação do açúcar redutor

Este método empregou duas soluções distintas. A primeira, denominada de Reagente de Somogyi-Nelson I foi preparada pela dissolução de 4,0 g de sulfato de cobre (CuSO_4), 24,0 g de Na_2CO_4 anidro, 16,0 g de NaHCO_3 , 12,0 g de tartarato de sódio e potássio e 18,0 g de Na_2SO_4 , nesta ordem, em 600 mL de água destilada. O volume foi completado para 1,0 L em balão volumétrico, requerendo-se repouso por uma noite em ambiente escuro. Após este período, filtrou-se a solução através de papel de filtro Whatman número 1 e estocou-se o reagente em frasco escuro, protegido da luz. A segunda solução, denominada de Reagente de Somogyi-Nelson II, foi preparada a partir de duas outras soluções. A primeira foi obtida pela dissolução de 50,0 g de molibdato de amônio anidro em 900 mL de água destilada, seguida da adição de 42,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A outra solução foi preparada pela dissolução de 6,0 g de Na_2HAsO_4 anidro em 50 mL de água destilada. O Reagente de Somogyi-Nelson II foi preparado através da mistura destas duas soluções. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C estocou-se o reagente em frasco escuro, protegido da luz.

O procedimento para a determinação de açúcares redutores foi iniciado pela adição de 2,0 mL de Reagente de Somogyi-Nelson I a um tubo contendo 1,0 mL da amostra. Após agitação manual, a mistura obtida era incubada em banho em ebulição por 6 minutos e os tubos, ao final deste período, foram resfriados em banho de gelo. Adicionaram-se 2,0 mL de reagente de Somogyi-Nelson II, seguido de agitação manual vigorosa e repouso durante 5 minutos, sob temperatura ambiente. Um volume de 20 mL de água destilada foi adicionado e os tubos agitados por inversão. A absorbância a 540 nm foi lida em espectrofotômetro da marca Hackr, modelo 400. O valor obtido foi utilizado no cálculo da concentração de açúcares redutores presentes na amostra, a partir de curva padrão relacionando a concentração de glicose com a absorbância (SOMOGYI, 1952).

4.10. Extração da Enzima

A solução enzimática foi extraída adicionando-se 100 mL de água destilada (10 °C) em cada frasco com material fermentado, utilizando bastão de vidro com o objetivo de desagregar os grumos de substrato fermentado, seguindo agitação a 150 rpm por 30 minutos. A mistura foi filtrada usando papel de filtros Whatman nº1.

4.11. Determinação da atividade enzimática

A verificação da atividade enzimática foi realizada mediante a técnica modificada de ARIMA *et al.* (1970), obtendo assim os resultados em Unidades Soxhlet (US). Neste procedimento foi adicionado 1 mL da solução resultante da filtração do meio fermentado com pH ajustado a 6,5 a 10 mL de substrato (10 g de leite desnatado da marca Itambé reconstituído em 100 mL de água destilada contendo 0,01 M de CaCl_2 , previamente aquecido 35°C, anotando-se o tempo exato para o aparecimento dos primeiros coágulos no tubo de ensaio. Uma unidade Soxhlet (US) é definida como a quantidade de enzima requerida para coagular 1 mL de substrato em 40 minutos a 37 °C.

Obs: Alguns artigos expressam a atividade enzimática em unidades Internacionais (UI) sendo que, 1 Unidade Internacional é equivalente a 400 Unidades Soxhlet (US).

4.12. Efeito da concentração de CaCl_2 na coagulação do leite

Para estudar o efeito da concentração de CaCl_2 sobre a coagulação do leite, utilizaram-se diferentes concentrações da solução de CaCl_2 (0,01; 0,02; 0,04; 0,05 M), ou seja, o leite foi reconstituído em solução de CaCl_2 em substituição à água.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação das cepas fúngicas produtoras de Renina

As características microscópicas das cepas fúngicas estão ilustradas na Figura 6 que mostram as fotomicrografias dos micro-organismos, com aumento de 400 vezes.

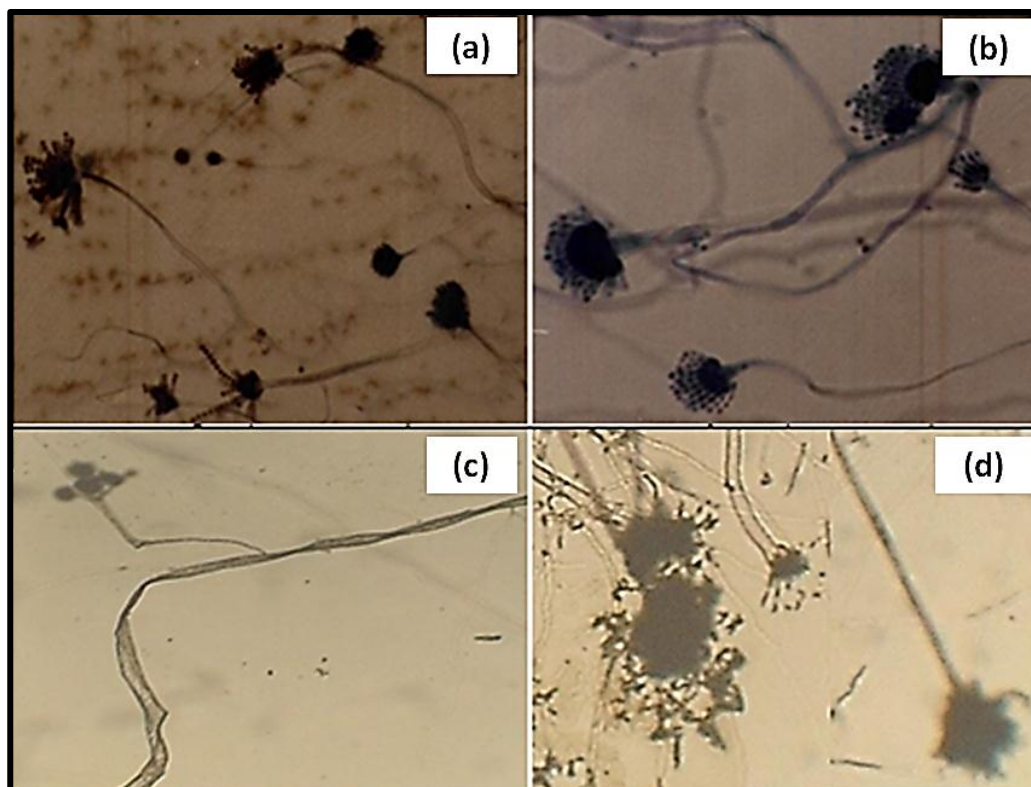


Figura 6 - Fotomicrografia das cepas fúngicas produtoras de renina *A. niger* (NRRL 3122) (a), *A. oryzae* (NRRL 484) (b), *Mucor pusillus* (NRRL 3420) (c) e *Rhizomucor miehei* (NRRL 3420) (d).

As colônias das linhagens apresentam crescimento em meio de PDA (Potato-Destrose-Ágar), incubadas a 30 °C, pigmentação preta para as linhagens de *Aspergillus niger* (NRRL 3122) e *Rhizomucor miehei* (NRRL 3420), verde para *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) e marron claro para *Mucor pusillus* (NRRL 3420).

Como pode ser observado na Figura 6, nas características do *Aspegillus* o conidióforo é composto de estirpe, vesícula ligeiramente esférica não totalmente coberto de fiálides. Pode também ser observada a produção de conídios eretos em cadeias, características morfológicas típicas de fungos do gênero *Aspergillus*.

Nas características do gênero *Mucor* observou-se a presença de columelo elipsoidal e globoso em esporângios ramificados e talos curtos, que em ocasiões curva-se com direção abaixo.

5.2. Caracterização do Substrato

A Tabela 11 mostra os resultados da determinação do açúcar redutor, umidade, cinzas, lipídios, proteínas e pH, dos três farelos utilizados como meios de cultivo na FES.

Tabela 11 - Caracterização dos substratos utilizados na FES

Determinação	Farelo de Arroz	Farelo de Trigo	Farelo de Soja
Acúcar redutor (%)*	23,40	18,70	25,80
Umidade (%)*	75,10	66,84	65,21
Cinzas (%)*	10,10	5,09	5,80
Lipídios (%)*	4,66	3,16	11,08
Proteínas (%)*	10,41	9,39	13,48
pH*	5,79	6,51	5.56

* Médias de triplicatas

Com base nos valores obtidos pode-se considerar que a mistura de farelos é rica em nutrientes.

5.3. Granulometria dos farelos

Os dados do perfil de granulometria dos farelos são apresentados na Tabela 12. Os resultados mostram que a granulometrias dos três farelos com maior porcentagem foi com tamanho igual a 1,19 mm (Peneira Tyler Mesh 16) com: 39,72 % de farelo de arroz, 62,12 % de farelo de soja e 45,92 % farelo de trigo.

Tabela 12 - Granulometria dos farelos

Peneira Tyler Mesh	Abertura (mm)	Farelo de arroz (%)	Farelo de soja (%)	Farelo de trigo (%)
60	0,25	10,18	11,42	7,84
40	0,42	29,75	14,44	10,20
35	0,5	14,59	8,38	6,53
16	1,19	39,72	62,12	45,92
14	1,41	4,32	3,55	26,98
Fundo		1,36	0,09	2,62
Total		100,00	100,00	100,00

5.4. Seleção de fungos produtores de proteases por ensaio de placa

A seleção de fungos produtores de proteases neutras por ensaio em placa foi feito pelo tamanho dos diâmetros dos halos, que foram medidos em três direções diferentes para determinar o diâmetro. (NOUANI *et al.*, 2011).

Protease produzida por micro-organismos apresenta zona clara de hidrólise da caseína no leite (ELLALIAH *et al.*, 2002), que foi tomada como base no presente estudo para examinar as linhagens. Os resultados estão na Tabela 13.

Tabela 13 - Diâmetro de hidrólise de caseína em ágar por proteases fúngicas

Fungos seleccionados	Diâmetro da zona de hidrólise (cm)
<i>Aspergillus niger</i> (NRRL 3122)	3,0
<i>Aspergillus oryzae</i> (NRRL 484)	6,2
<i>Mucor pusillus</i> (NRRL 3420)	5,4
<i>Rhizomucor miehei</i> (NRRL 3420)	1,8

A produção de protease pelos fungos testados em meio de ágar caseína com pH 7,0, mostraram que *R. miehei* (NRRL 3420) mostrou pouca produção da protease e o *A. oryzae* (NRRL 484) foi o produtor de protease mais potente apresentando um maior diâmetro de halo com 6,2 cm de zona de hidrólise.

Sandhya *et al.*, (2005) estudaram sete fungos produtores de proteases neutras, *A. oryzae* NRRL 1808 foi o melhor produtor da protease mostrando 2,7 cm de raio (5,4 de diâmetro) na hidrólise da caseína.

5.5. Efeito da porção dos farelos na fermentação em estado sólido para produção de protease por *Aspergillus niger* (NRRL 3122) e determinação do tempo de fermentação

Na Tabela 14 são apresentados a matriz de acordo com o item 4.7 do planejamento experimental de delineamento de misturas por FES e os resultados das atividades enzimáticas expressos em Unidades Soxhlet (US), podendo-se observar que em 48 h de fermentação obteve-se atividade enzimática que variou de 880,4 a 3877,2 US. O melhor resultado foi obtido no Teste 8, cujo meio continha 16,7 % farelo de arroz, 67% farelo de trigo e 16,7% de soja.

A atividade enzimática aumentou em 96 h de fermentação, no mesmo Teste obtendo como atividade máxima 5345,2 US contendo os três farelos.

Tabela 14 - Atividade enzimática em US produzida por *A. niger* (NRRL 3122), utilizando delineamento de misturas

Teste	FA	FT	FS	Atividade Enzimática (US)	
				48 h	96 h
1	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1487,9	2985,1
2	0 (0)	1 (0)	0 (0)	3809,5	2988,8
3	0 (0)	0 (0)	1 (0)	880,4	2970,3
4	1/2(0,5)	1/2(0,5)	0 (0)	2617,2	4606,5
5	1/2(0,5)	0 (0)	1/2(0)	1252,6	4724,4
6	0 (0)	1/2(0)	1/2(0)	1944,9	2545,1
7	2/3(0,67)	1/6(0,167)	1/6(0,167)	2864,0	2663,7
8	1/6(0,167)	2/3(0,67)	1/6(0,167)	3877,2	5345,2
9	1/6(0,167)	1/6(0,167)	2/3(0,67)	2371,5	3864,7
10	1/3(0,33)	1/3(0,33)	1/3(0,33)	2350,6	2507,8

5.6. Estabelecimento do modelo matemático e análise estatística para produção de protease por *Aspergillus niger* (NRRL 3122)

Por meio do tratamento estatístico dado aos dados experimentais, Os valores de atividade enzimática foram ajustados a vários modelos (Linear, quadrático, cúbico especial e cúbico) mediante a regressão múltipla, que foram submetidos à análise de variância.

O modelo significativo para explicar o efeito da composição da mistura sobre a atividade enzimática foi o modelo lineal, mostrando uma equação polinomial de primer grado linear, através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Coeficientes de regressão obtida a partir do delineamento de misturas do modelo lineal para *A. niger* (NRRL 3122)

Fator	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(3)	p
FA	1904,6	421,4	4,5	<0,00273
FT	4020,8	421,4	9,5	<0,00003
FS	1111,3	421,4	2,6	<0,03356

Através destes coeficientes de regressão obtidos, pôde-se elaborar um modelo lineal com as variáveis, expresso pela Equação (4).

$$AE = 1904,6 * FA + 4020,8 * FT + 1111,3 * FS \quad (4)$$

Os resultados da ANOVA do modelo apresentam-se na Tabela 16. Como se pode observar o modelo selecionado ao nível de 95% de confiança.

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para *A. niger* (NRRL 3122) referentes a atividades enzimáticas, ao nível de confiança de 95%

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado medio	Fcal	R ²	P	Ftab
Regressão	6786504	2	3393252	10,4	0,75	0,008	4,72
Residual	2283205	7	326172,2				
Total	9069709	9					

O coeficiente de determinação (R²) indica que o 75% da variação na resposta foi explicada pelo modelo escolhido, ou seja, o modelo selecionado ajustou-se a os dados eperimentais.

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade enzimática, fez-se a curva de contorno da Figura 7, Nota-se como tendência geral em todos os ensaios a correspondência direta entre a propoção do farelo e produção enzimática. Verificando-se que as regiões de maior atividade (em escuro) com farelo de trigo

visou o estabelecimento das máximas atividades obtendo 5345,2 US em 96 h de fermentação.

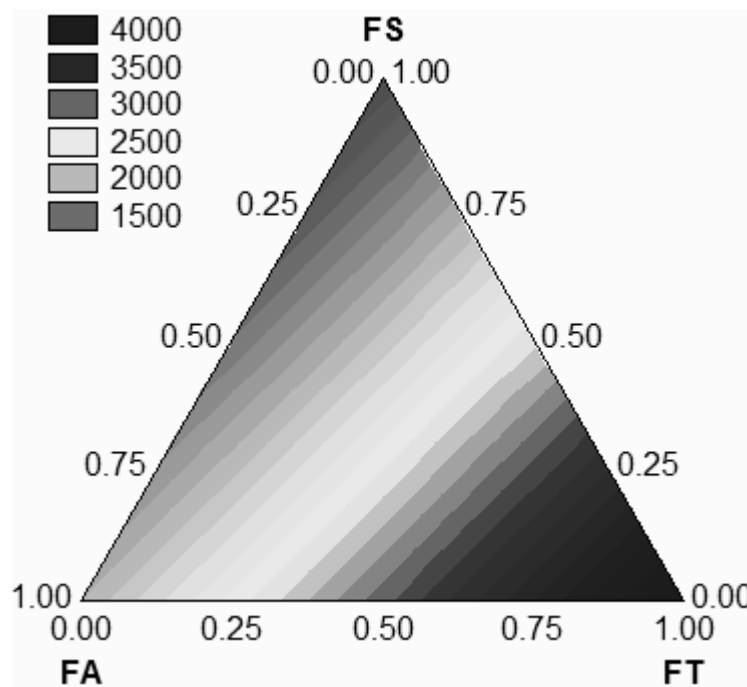


Figura 7 - Superfície de resposta do efeito da interação entre as variáveis independentes sobre a produção de protease de acordo com o delineamento experimental de misturas ao nível de 95% de confiança por *A. niger* (NRRL 3122) em 48 horas de FES.

A avaliação do efeito individual de cada componente da mistura para atividade enzimática foi feito usando os traços de Cox, apresentando na Figura 8. Pode-se observar que o efeito dos farelos de arroz e soja foi negativo e o aumento do farelo de trigo favoreceu a atividade enzimática.

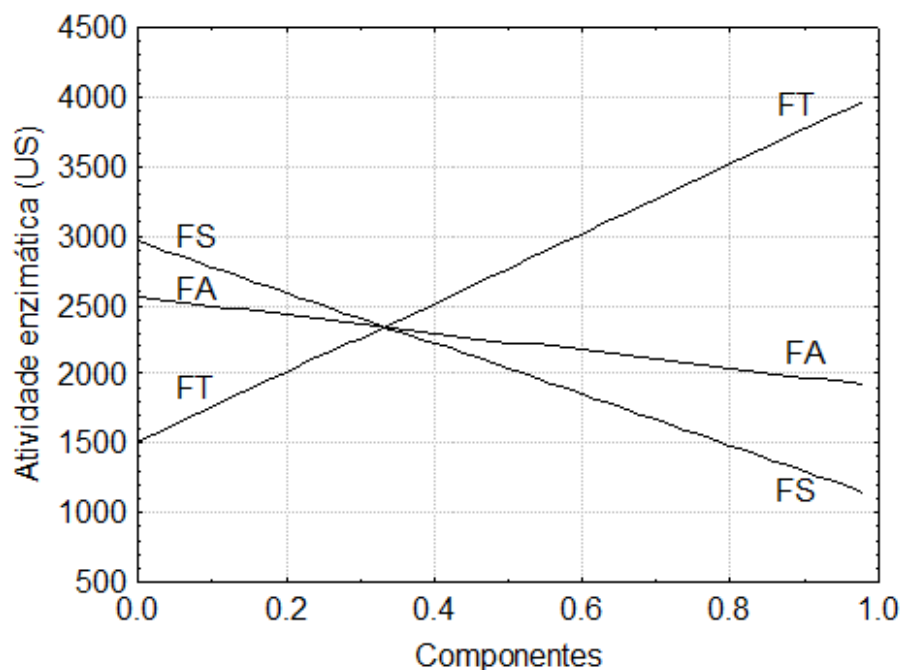


Figura 8 - Efeito dos componentes FA ($X_1 = 33,33\%$), FT ($X_2 = 33,33\%$) e FS ($X_3 = 33,33\%$) sobre a atividade enzimática (US) por *A. niger* (NRRL 3122) em 48 horas de FES.

Channe & Shewale (1997) estudaram a obtenção de protease coagulante por *Aspergillus niger* MC4 em FSm por 4 dias e observaram produção máxima na presença de amido (como fonte de carbono) e peptona de carne (como fonte de nitrogênio) obtendo uma atividade de 400 U/mL.

Fazouane-Naimi *et al* (2010) avaliaram a produção de uma protease ácida por *Aspergillus niger* FFB1 em meio de crescimento com 100 g de farelo de trigo e 150 LI de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,01% (w/v) em FES. A enzima manteve-se por 24 horas a 35 °C na faixa de pH de 5,5-7,0, obtendo 16,563 U (6625,2 US), comparando com a protease do *A. niger* (NRRL 3122) apresentou maior atividade enzimática com a mistura dos farelos de arroz, trigo e soja obtendo 5345,2 US em 96 horas de fermentação.

5.7. Efeito da proporção do farelo na fermentação em estado sólido para produção de renina fúngica por *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) e determinação do tempo de fermentação

Na Tabela 17 são apresentadas a matriz de acordo com o item 4.7 do planejamento experimental de delineamento de misturas por FES e os valores de atividade enzimática expressos em Unidades Soxhlet (US), podendo-se observar que em 48 h de fermentação obteve-se alta atividade enzimática, que variou de 3698,0 a 10126,6 US. O melhor resultado foi obtido no Teste 4, cujo meio continha 50% de farelo de arroz e 50% de farelo de trigo.

A atividade enzimática aumentou em 96 h de fermentação, no mesmo Teste obtendo como atividade máxima 16000,0 contendo os dois farelos.

Tabela 17 - Atividade de enzimática em US produzida por *A. oryzae* (NRRL 484), utilizando delineamento de misturas

Teste	FA	FT	FS	Atividade Enzimática (US)	
				48 h	96 h
1	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1451,9	4580,2
2	0 (0)	1 (0)	0 (0)	3908,8	7430,3
3	0 (0)	0 (0)	1 (0)	3815,6	4486,0
4	1/2(0,5)	1/2(0,5)	0 (0)	10126,6	16000,0
5	1/2(0,5)	0 (0)	1/2(0)	3698,0	4486,0
6	0 (0)	1/2(0)	1/2(0)	5769,2	9338,5
7	2/3(0,67)	1/6(0,167)	1/6(0,167)	5755,4	7843,1
8	1/6(0,167)	2/3(0,67)	1/6(0,167)	7430,3	9836,1
9	1/6(0,167)	1/6(0,167)	2/3(0,67)	7973,4	10212,8
10	1/3(0,33)	1/3(0,33)	1/3(0,33)	8247,4	10762,3

5.8. Estabelecimento do modelo matemático e análises estatística para produção de protease por *Aspergillus oryzae* (NRRL 484)

Os valores de atividade enzimática foram ajustados a vários modelos (Linear, quadrático, cúbico especial e cúbico) mediante a regressão múltipla, que foram submetidos à análise de variância.

Para explicar o efeito da composição da mistura sobre a atividade enzimática foi ajustado ao modelo quadrático mostrando uma equação polinomial de primer grado não linear, através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 18,

Tabela 18 - Coeficientes de regressão obtidos a partir do delineamento de misturas para *A. oryzae* (NRRL 484)

Fator	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(3)	p
(A)FA	4231	1800	2,35	0,079
(B)FT	6925	1800	3,85	<0,018
(C)FS	5398	1800	3,00	<0,040
AB	36675	8298	4,42	<0,012
AC	-658	8298	-0,08	0,941
BC	12738	8298	1,54	0,200

Através destes coeficientes de regressão obtidos, pôde-se elaborar um modelo com as variáveis, expresso pela Equação (5).

$$AE = 4231*FA + 6925*FT + 5398*FS + 36675*FA*FT - 658*FA*FS + 12738*FT*FS \quad (5)$$

Os resultados da ANOVA do modelo apresentam-se na Tabela 19. Como se pode observar o modelo selecionado ao nível de 95% de confiança, não houve diferença significativa entre as médias.

Tabela 19 - Análise de variância (ANOVA) para *A. oryzae* (NRRL 484) referentes a atividades enzimáticas, ao nível de confiança de 95%

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado medio	Fcal	R ²	P	Ftab
Regressão	102014373	5	20402875	5,85	0,88	0,056	6,26
esidual	13941058	4	3485264				
Total	115955431	9					

F não significativo a 5 % de probabilidade

Vishwanatha *et al* (2009) estudaram a caracterização de uma protease ácida obtida a partir de *A. oryzae* MTCC 5341, utilizando-se farelo de trigo e farelo de soja desgordurado, apresentando atividade específica de 43658 U/mg. Este valor foi maior do que encontrado por *A. oryzae* (NRRL 484) que foi 16000 US (40000 U/mg).

Sandhya *et al* (2005) estudaram a comparação da FES e SmF para a produção de protease neutra utilizando resíduos agroindustriais como substratos. Das sete culturas dos fungos. *A. oryzae* NRRL 1808 mostrou-se com maior atividade enzimática. Em ambos os sistemas, o farelo de trigo foi o melhor substrato. Na FES obteve-se 31,2 U de enzima por grama de substrato fermentado (U/gss) mostrando um valor superior do que o sistema FSm cujo rendimento foi de 8,7 U/gss. A avaliação comparativa mostrou produção 3,5 vezes maior da enzima em FES.

Kumar *et al* (2005) estudaram uma protease ácida com possíveis características de enzima coagulante produzida por *Rhizopus oryzae* em fermentação sólida a 30°C por dois dias, utilizando farelo de trigo como substrato obtendo uma atividade 32110 U do extracto puro.

Shata & Foda (2005) relataram as condições ótimas para extração de uma enzima coagulante produzida por *Aspergillus oryzae* em FES utilizando-se farelo de trigo como substrato obtendo uma atividade de 228,6 unidades de Otani / médio gram.

5.9. Efeito da proporção do farelo na fermentação em estado sólido para produção de renina fúngica por *Mucor pusillus* (NRRL 3420) e determinação do tempo de fermentação

Na Tabela 20 são apresentadas a matriz de acordo com o item 4.7 do planejamento experimental de delineamento de misturas por FES e os valores de atividade enzimática expressos em Unidades Soxhlet (US), podendo-se observar que em 48 h de fermentação obteve-se alta atividade enzimática que variou de 1238,39 a 7272,73 US. O melhor resultado foi obtido no Teste 5, cujo meio continha 50% de farelo de arroz e 50% de farelo de soja.

Todos os testes apresentaram redução significativa da atividade enzimática em 96 horas de fermentação, exceto o teste 8 que apresentou a mesma atividade em 48 e 96 horas.

Tabela 20 - Atividade de enzimática em US produzida por *M. pusillus* (NRRL 3420), utilizando delinemento de misturas

Teste	FA	FT	FS	Atividade Enzimatica (US)	
				48 h	96 h
1	1 (10)	0 (0)	0 (0)	4444,4	2529,0
2	0 (0)	1 (0)	0 (0)	1238,4	919,5
3	0 (0)	0 (0)	1 (0)	3333,3	1256,5
4	1/2(0,5)	1/2(0,5)	0 (0)	2637,4	1586,3
5	1/2(0,5)	0 (0)	1/2(0)	7272,7	5853,7
6	0 (0)	1/2(0)	1/2(0)	2339,2	1935,5
7	2/3(0,67)	1/6(0,167)	1/6(0,167)	3761,8	1846,2
8	1/6(0,167)	2/3(0,67)	1/6(0,167)	1811,3	1816,4
9	1/6(0,167)	1/6(0,167)	2/3(0,67)	2934,0	1392,9
10	1/3(0,33)	1/3(0,33)	1/3(0,33)	2937,6	1548,4

5.10. Estabelecimento do modelo matemático e análise estatística para produção de protease por *Mucor pusillus* (NRRL 3420)

Os valores de atividade enzimática foram ajustados a vários modelos (linear, quadrático, cúbico especial e cúbico) mediante a regressão múltipla, que foram submetidos à análise de variância.

O modelo significativo para explicar o efeito da composição da mistura sobre a atividade enzimática foi o modelo cúbico especial também encontrados por Karam *et al* (2005), mostrando uma equação polinomial de primer grado não linear, através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 21,

Tabela 21 - Coeficientes de regressão obtidos a partir do delineamento de misturas para *M. pusillus* (NRRL 3420)

Fator	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(3)	p
(A)FA	4364,0	536,90	8,12807	<0,003893
(B)FT	1365,9	536,90	2,54412	0,084375
(C)FS	3155,2	536,90	5,87673	<0,009830
AB	-722,1	2702,64	-0,26717	0,806651
AC	13018,2	2702,64	4,81684	<0,017045
BC	112,2	2702,64	0,04150	0,969506
ABC	-48490,3	17817,66	-2,72147	0,072459

Através destes coeficientes de regressão obtidos, pôde-se elaborar um modelo com as variáveis, expresso pela Equação (6).

$$AE = 4364 * FA + 1366 * FT + 3155 * FS - 722 * FA * FT + 13018 * FA * FS + 112 * FT * FS - 8490 * FA * FT * FS \quad (6)$$

Os resultados do ANOVA do modelo apresentam-se na Tabela 22. Como se pode observar o modelo selecionado ao nível de 95% de confiança.

Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA) para *M. pusillus* (NRRL 3420) referentes a atividades enzimáticas, ao nível de confiança de 95%

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado medio	F _{cal}	R ²	p	F _{tab}
Regressão	24466829	6	4077805	13,22	0,96	0,029	6,94
Residual	925407	3	308469,1				
Total	25392237	9					

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade enzimática, fez-se a curva de contorno da Figura 9, Nota-se como tendência geral em todos os ensaios a correspondência direta entre a propoção do farelo e produção enzimática. Verificando-se que as regiões de maior atividade (em escuro) com a mistura de farelo de arroz e soja visou o estabelecimento das máximas atividades obtendo 7272,7 US em 48 h de fermentação.

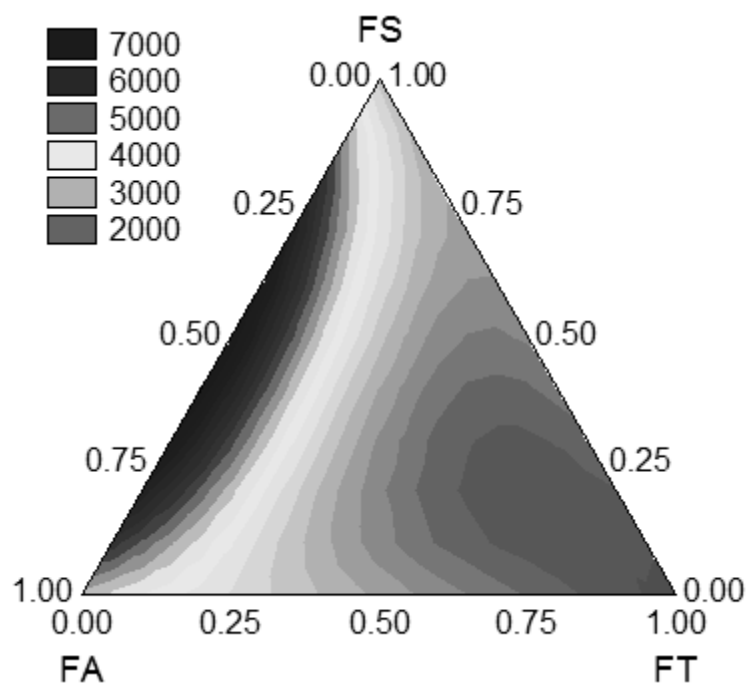


Figura 9 - Superfície de resposta do efeito da interação entre as variáveis independentes sobre a produção de protease de acordo com o planejamento experimental de misturas ao nível de 95% de confiança por *Mucor pusillus* (NRRL 3420) em 48 horas de FES.

A avaliação do efeito individual de cada componente da mistura para atividade enzimática foi feito usando os traços de Cox, apresentando na Figura 10. Pode-se observar que o efeito do farelo de trigo foi negativo e o aumento dos farelos de arroz e soja favoreceu a atividade enzimática.

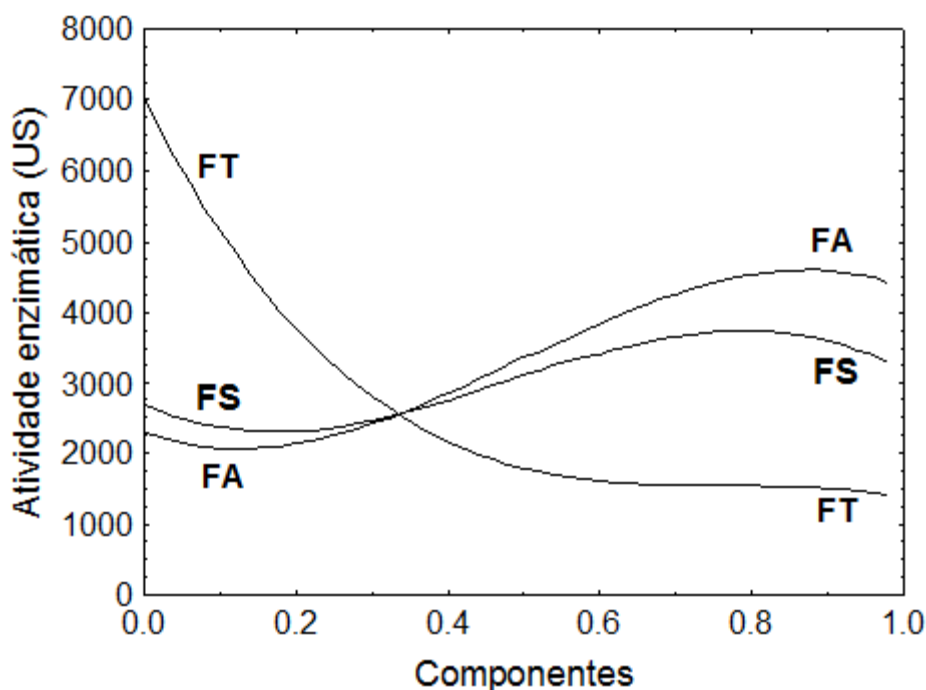


Figura 10 - Efeito dos componentes FA ($X_1 = 33,33\%$), FT ($X_2 = 33,33\%$) e FS ($X_3 = 33,33\%$) sobre a atividade enzimática (US) por *Mucor pusillus* (NRRL 3420) em 48 horas de FES.

Tubeshia & Al-Delaimy (2003) encontraram, dentre 20 linhagens de *Mucor* isoladas na Jordânia, um bom produtor de enzima coagulante, cujas condições ótimas de cultivo ocorreram em FES por quatro dias a 30°C, utilizando uma mistura fortificada de farelo de trigo como substrato. O extrato enzimático bruto foi aplicado na produção de queijo fresco e proporcionou mesmo rendimento quando comparado ao queijo produzido com renina comercial obtendo 200 RU de atividade enzimática em quatro dias de fermentação.

Fernandez-Lahore *et al* (1998) encontraram uma protease ácida *Mucor bacilliformis* na FES, utilizando 10 g de farelo de trigo umedecido com HCl 0,2 N até um teor de água de 120% incubado a 24 °C durante 72-96 h, a recuperação do

extracto enzimático com água destilada obtendo uma atividade enzimática de 6115 + 172 CU g⁻¹ farelo com três dias de fermentação

Fernandez-Lahore *et al* (1999) encontraram uma proteinase ácida com alta atividade coagulante produzida no quarto dia de FES utilizando farelo de trigo como substrato por uma linhagem mesofílica de *Mucor* sp. (M-105) obtendo 710 CU/mL.

Preetha & Boopathy (1994) estudaram a produção de protease coagulante por *Rhizomucor miehi* NRRL 3500 e *Rhizomucor pusillus* em FES e encontraram máxima produção utilizando farelo de trigo como substrato e em 5 dias de fermentação obtendo uma atividade enzimática de 1210 unidades/mL de proteína.

5.11. Efeito da proporção do farelo na fermentação em estado sólido para produção de renina fúngica por *Rizhomucor miehei* (NRRL 3420) e determinação do tempo de fermentação

Na Tabela 23 são apresentados a matriz de acordo com o item 4.7 do planejamento experiemetal de delineamento de misturas por FES e os valores de atividade enzimática expressos em Unidades Soxhlet (US), podendo-se observar que em 96 h de fermentação obteve-se alta atividade enzimática que variou de 600,00 a 3260,9 US. O melhor resultado foi obtido no Teste 8, cujo meio continha 16,7 % de farelo de arroz, 67 % de farelo de trigo e 16,7 de farelo de soja.

Tabela 23 - Atividade enzimática em US produzida por *R. miehei* (NRRL 3420), utilizando delineamento de misturas

Teste	FA	FT	FS	Atividade Enzimática (US)	
				48 h	96 h
1	1 (10)	0 (0)	0 (0)	533,3	666,7
2	0 (0)	1 (0)	0 (0)	1200,0	2847,0
3	0 (0)	0 (0)	1 (0)	685,7	1090,9
4	1/2(0,5)	1/2(0,5)	0 (0)	510,6	631,6
5	1/2(0,5)	0 (0)	1/2(0)	960,0	2321,1
6	0 (0)	1/2(0)	1/2(0)	558,1	600,0
7	2/3(0,67)	1/6(0,167)	1/6(0,167)	585,4	685,7
8	1/6(0,167)	2/3(0,67)	1/6(0,167)	1142,9	3260,9
9	1/6(0,167)	1/6(0,167)	2/3(0,67)	521,7	854,1
10	1/3(0,33)	1/3(0,33)	1/3(0,33)	510,6	819,1

5.12. Estabelecimento do modelo matemático e análise estatística para produção de protease por *Rizhomucor miehei* (NRRL 3420)

Os valores de atividade enzimática foram ajustados a vários modelos (linear, quadrático, cúbico especial e cúbico) mediante a regressão múltipla, que foram submetidos à análise de variância.

Para explicar o efeito da composição da mistura sobre a atividade enzimática foi ajustado ao modelo quadrático mostrando uma equação polinomial de primer grado não linear, através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 24,

Tabela 24 - Coeficientes de regressão obtidos a partir do delineamento de misturas para *R. miehei* (NRRL 3420)

Fator	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(3)	p
(A)FA	487	917	0.531	0.624
(B)FT	3328	917	3.628	<0.022
(C)FS	920	917	1.004	0.372
AB	-3768	4227	-0.891	0.423
AC	5203	4227	1.231	0.286
BC	-4720	4227	-1.117	0.327

Através destes coeficientes de regressão obtidos, pôde-se elaborar um modelo com as variáveis, expresso pela Equação (7).

$$AE = 487 * FA + 3328 * FT + 920 * FS - 3768 * FA * FT + 5203 * FA * FS - 4720 * FT * FS \quad (7)$$

Os resultados do ANOVA do modelo apresentam-se na Tabela 25. Como se pode observar o modelo selecionado ao nível de 95% de confiança. Dos resultados obtidos nas análises de Atividade enzimática não foram diferentes significativamente entre si.

Tabela 25 - Análise de variância (ANOVA) para *R. miehei* (NRRL 3420) referentes a atividades enzimáticas, ao nível de confiança de 95%

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado medio	Fcal	R ²	P	Ftab
Regressão	5792441	5	1158488	1,28	0,62	0,42	6,26
Residual	3617677	4	904419,2				
Total	9410118	9					

F não significativo a 5 % de probabilidade

Ayhan *et al.*,(2001) estudaram os efeitos dos parâmetros da fermentação, como: concentração inicial de D-glicose, temperatura, velocidade de agitação, pH

inicial e a razão de inóculo, sobre a produção de renina por *Mucor miehei* ATCC 3420, obtendo-se a atividade de coagulação do leite de 2,286 SU.cm⁻³.

Da Silveira *et al* (2005) estudaram o efeito da caseína em fermentação em estado sólido para produção de coagulante microbiano pelo zigomiceto *Mucor miehei*, um dos mais pesquisados para este tipo de síntese, via FES utilizando vários resíduos agroindustriais. A atividade enzimática foi de 1066 Unidades de Soxhlet (SU), quando usou-se 1 e 2 g de caseína / grama de farelo de trigo (10% de umidade) mostraram um aumento na produção enzimática de 966 e 1117 SU, respectivamente. Em comparação com *Mucor pusillus* (NRRL 3420) teve uma maior atividade da protease de 7272,73 US.

Cepas de *Mucor* spp. podem produzir enzimas para coagulação do leite em FES, normalmente produzindo 5.000 U/g de substrato sólido após 5-6 dias de cultivo em temperaturas moderadas. O teor de umidade inicial, o pH do substrato, a porosidade do substrato, a temperatura de cultivo, a presença de nutrientes adicionados e a quantidade do inóculo são fatores críticos sobre o rendimento do processo. Maior produtividade pode ser obtida com linhagens selecionadas com nível de umidade inicial de 90% (base seca) a 24-28 °C, em valores iniciais de pH ácido e através da utilização de farelo de trigo como substrato (FRAILE; MUSE; BERNARDINELLI, 1981). Outros autores relataram que a produção da enzima em mistura farelo de trigo suplementado foi ótima com o cultivo a 30 °C após 3-4 dias (AL-DELAIMY; TUBESHA, 2003).

Bons resultados utilizando-se farelo de trigo também foram constatados por outros autores ao estudar por outros fungos como *Aspergillus niger* var. Awamori (isozima B) (EMMONS; BINNS, 1991), *Aspergillus ustus* (TAKAHASHI; KIKUCHI, 1993), *Mucor bacilliformis* (FERNANDEZ-LAHORE et al., 1998), *Mucor rennet* (TUBESHA; AL-DELAIMY, 2003), *Mucor circinelloides* (SATHYA et al., 2009), *Bacillus subtilis* B1 (DING et al., 2011), *Bacillus amyloliquefaciens* JNU002 (DING et al., 2012), *Bacillus amyloliquefaciens* D4 (HE, X. L. et al., 2012), com o farelo arroz *Oryza sativa* (ASAKURA et al., 1997), utilizando-se a mistura de farelo de soja e arroz *Bacillus subtilis* (DUTT et al., 2009) e a mistura de farelo de trigo e arroz *Mucor-miehei* (WU; CHEN; CHEN, 2008).

De qualquer forma, o delineamento de misturas mostrou-se como uma ferramenta bastante útil na determinação da melhor cepa fúngica para produção de proteases, assim como as melhores condições da FES em relação à composição do meio de farelos e ao tempo de fermentação. O uso dessa técnica possibilita a avaliação dessas condições de forma estatisticamente controlada e evita conclusões equivocadas que poderiam ser obtidas através de ensaios aleatórios. De acordo com a Tabela 3, os melhores resultados são observados no ensaio 4 para *A. oryzae* (16000 US em 96 h) e no ensaio 5 para *M. pusillus* (7273 US em 48 h).

Comparando-se esses resultados, podemos considerar que a cepa mais adequada é o fungo *A. oryzae*, já que produziu uma atividade proteolítica mais que duas vezes maior que a do fungo *M. pusillus*, em um tempo duas vezes maior, não comprometendo a produtividade do processo. Essa produção foi usando 50% de FA e 50% de FT a qual foi selecionada e usada nos ensaios subsequentes.

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

A inativação de enzimas durante a estocagem é um fator limitante para sua aplicação industrial. A Figura 11 mostra o efeito do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade enzimática, a fim de obter mais conhecimento sobre o comportamento da enzima durante a estocagem.

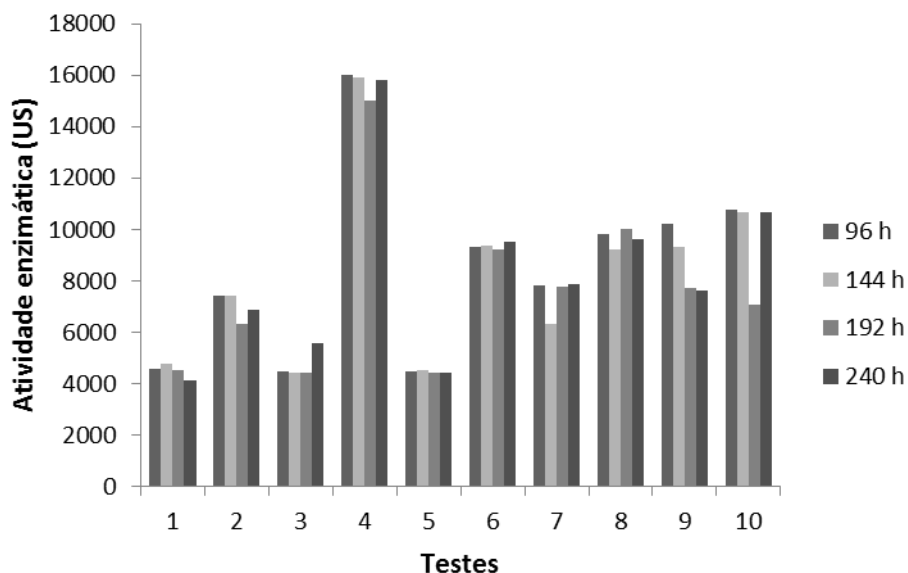


Figura 11 - Efeito do armazenamento do extrato enzimático a 4°C sob as atividades enzimáticas por *A. oryzae* (NRRL 484) na FES

Observa-se que as amostras conservadas em temperatura de refrigeração, apresentaram algumas variações nas atividades enzimáticas, mas permaneceram praticamente 90% ativas nas condições testadas mostrando que as temperaturas de armazenamento se mostraram adequadas para preservar a atividade enzimática até 240 h (10 dias).

Ainda assim, pode-se dizer que o armazenamento a 4°C foi o que conservou as atividades enzimáticas e que ainda provocou aumento da atividade coagulante, talvez por ter ocorrido alguma mudança conformacional na molécula protéica causada pelo resfriamento facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

Nouani *et al.* (2009) ao estudar a estabilidade da protease de *Cynara scolymus* e de *Ficus carica* encontraram que, quando armazenadas a 4°C, as enzimas perderam 80% de atividade coagulante com 20 dias de estocagem.

Merheb-Dini *et al* (2010) ao estudar a temperatura e do tempo de fermentação do extrato enzimático de *Thermomucor indicae* N31, observaram que as amostras conservadas em temperatura de refrigeração e congelamento

apresentaram algumas variações (no máximo 30%) nas atividades coagulantes, permaneceram praticamente 100% ativas mostrando que ambas as temperaturas de armazenamento e congelamento se mostraram adequadas para preservar a atividade coagulante, assegurando em torno de 100% a sua durabilidade por, no mínimo, 10 semanas.

5.14. Fatores que afetam atividade de protease de *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) por metodologia de superfície de resposta.

Depois de determinar a proporção do farelo e o tempo de fermentação que exercem efeito sobre a atividade enzimática produzida por *A. oryzae* (NRRL 484), a enzima foi caracterizada com respeito a temperatura (T) e pH utilizando planejamento experimental.

Na Tabela 26 esta apresentada a matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR), com os valores reais e codificados, bem como as respostas obtidas para os 11 ensaios. Verificou-se que neste planejamento a atividade variou de 600 a 16552 US e que o valor médio desta variável para os pontos centrais, foi de 16292 US. Os pontos centrais apresentaram pequena variação, indicando boa repetibilidade do processo e através da Figura 12 podemos visualizar a coagulação do leite pelos extractos brutos da enzima dos 11 ensaios.

Tabela 26 - Matriz do DCCR para determinar a temperatura e pH da protease de *A. oryzae* (NRRL 484) e valores de atividade em 96 h de FES

Ensaio	Fatores (reais)		Fatores (codificados)		Atividade enzimática (US)	Atividade enzimática (UI)
	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)	pH		
1	23	3,6	-1	-1	2094	5.24
2	37	3,6	1	-1	11583	28.96
3	23	6,4	-1	1	1806	4.52
4	37	6,4	1	1	16216	40.54
5	20	5,0	-1,41	0	600	1.50
6	40	5,0	1,41	0	1691	4.23
7	30	3,0	0	-1,41	4332	10.83
8	30	7,0	0	1,41	15287	38.22
9	30	5,0	0	0	16216	40.54
10	30	5,0	0	0	16107	40.27
11	30	5,0	0	0	16552	41.38



Figura 12 - Coagulação do leite desnatado por enzima bruta a partir de subprodutos agroindustriais por *Aspergillus oryzae* (NRRL 484).

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 27, onde os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q. O nível de confiança utilizado foi de 95%. As variáveis significativas, ou seja, aquelas que apresentaram p-valor inferior a 0,05 foram o valor da temperatura linear, temperatura quadrática, pH linear e a interação da temperatura com o pH.

Essa análise pode ser visualizada pelo diagrama de Pareto expresso na Figura 13, onde os parâmetros estatisticamente significativos correspondem aos que apresentam valores de t calculado (t_{cal}) maiores que o do t crítico (t_{crit}), em valores absolutos, para o nível de confiança estabelecido (95%) e os correspondentes graus de liberdade.

Tabela 27 - Coeficientes de regressão (CR) para a resposta de atividade enzimática em 96 h de fermentação

Fator	CR	Erro Padrão	t (5)	p-valor
Média	16291,7	1136,1	14,3	< 0,001
T (L)	1930,2	695,7	2,8	0,039
T (Q)	-7586,3	828,1	-9,2	< 0,001
pH (L)	3729,7	695,7	5,4	0,003
pH (Q)	-3254,3	828,1	-3,9	0,011
T x pH	3730,3	983,9	3,8	0,013

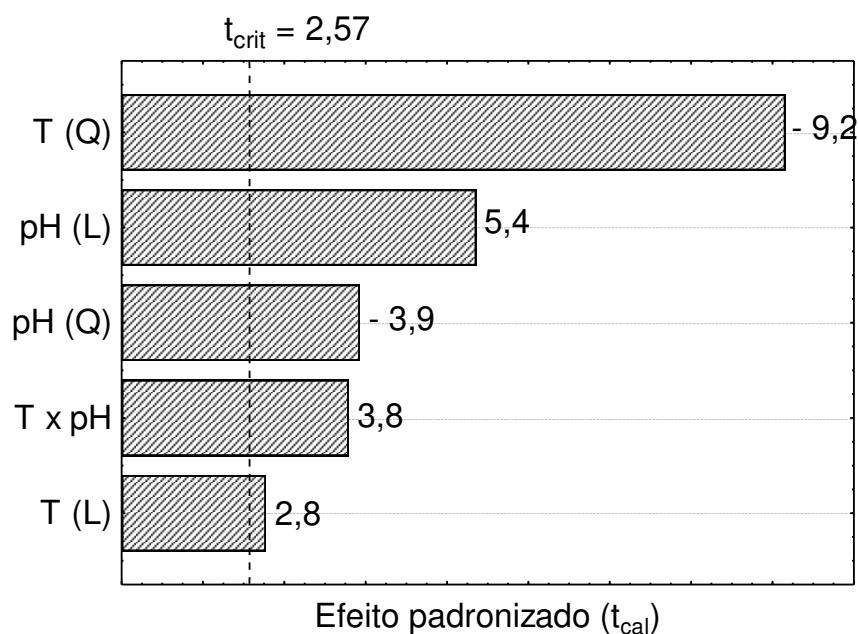


Figura 13 - Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre atividade de protease de *A. oryzae* (NRRL 484), para nível de confiança de 5% ($p < 0,05$)

Através destes coeficientes de regressão obtidos, pôde-se elaborar um modelo que representa a atividade enzimática (AE) em função da temperatura (T) e pH de forma codificada, conforme Equação (8).

$$AE = 16291,7 + 1930,2 (T) - 7586,3 (T)^2 + 3729,7 (pH) - 3254,3 (pH)^2 + 3730,3 (T.pH) \quad (8)$$

Através da análise de variância (ANOVA) da Tabela 28, o modelo foi validado uma vez que os valores do coeficiente de variação explicada e do F calculado foram satisfatórios ($R^2 = 0,964$ e $F_{cal} = 27,3 > 5.F_{tab}$).

Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo da atividade enzimática em função da temperatura e pH

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	Ftab	Fcal/ Ftab	R ²
Regressão	528218109	5	105643622	27.28	5.05	5.4	0.96
Resíduo	19361950	5	3872389.95				
Total	547580059	10					

Com o modelo definido, puderam-se calcular os valores previstos pelo modelo e determinar os desvios relativos quando comparados com os valores experimentais (Tabela 29). Pode-se observar que os desvios foram baixos na região desejada em que as atividades estão maximizadas (pontos centrais: ensaios 9, 10 e 11).

No entanto, nos ensaios onde os valores da resposta foram mais baixos, os desvios relativos foram bem maiores, mostrando que para valores baixos de atividade o modelo não se aplica tão bem quanto para valores mais elevados. Notamos que esta condição experimental é a de temperatura mais drástica estudada, ou seja 20 °C.

Embora a porcentagem de variação tenha sido baixa, os valores previsto pelo modelo são úteis para ilustrar o comportamento da enzima nas diferentes temperatura e pH, e pode assim concluir-se que os valores previstos pelo modelo de ajuste aos valores experimentais, validam o modelo

Tabela 29 - Resultados experimentais para os 11 ensaios e as respostas previstas utilizando o modelo e seus desvios

Ensaio	Temperatur		AE exp		AE	Erro Relativo (%)
	a	pH	(US)	AE exp (UI)	mod	
1	-1	-1	2094	5.24	3521	68.2
2	1	-1	1583	3.96	-79	-105.0
3	-1	1	1806	4.52	3520	94.9
4	1	1	16216	40.54	14841	-8.5
5	-1.41	0	600	1.50	-1512	-352.0
6	1.41	0	1691	4.23	3931	132.5
7	0	-1.41	4332	10.83	4563	5.3
8	0	1.41	15287	38.22	15081	-1.3
9	0	0	16216	40.54	16292	0.5
10	0	0	16107	40.27	16292	1.1
11	0	0	16552	41.38	16292	-1.6

A Figura 14 apresenta o comportamento dos valores experimentais frente aos valores preditos, onde se pode observar que há boa concordância entre eles, sendo possível verificar a tendência através da superfície de resposta. Além disso, fica evidente que os valores de atividade para os pontos centrais foram significativamente maiores que para os demais ensaios.

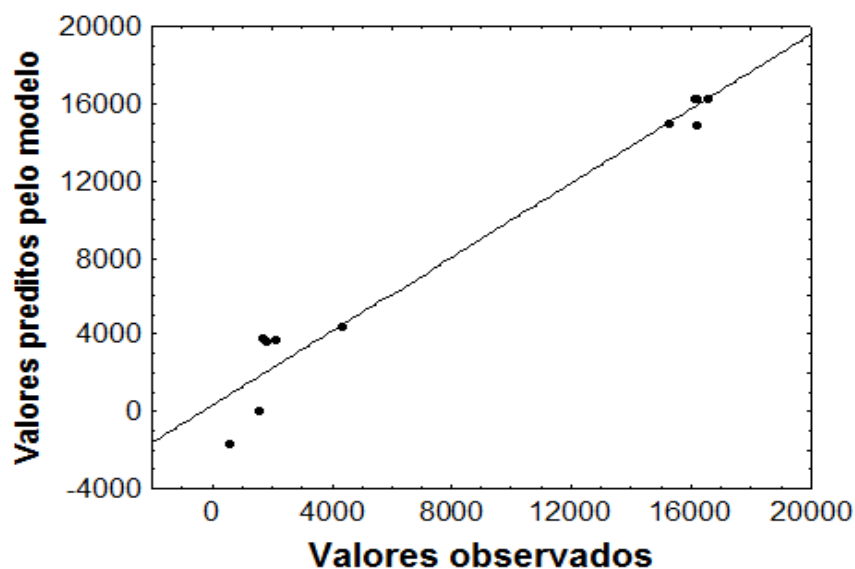


Figura 14 - Valores experimentais de atividade em função dos valores previstos pelo modelo ajustado.

Pela Figura 15 pode-se observar que os erros de ajustamento estão independentes e normalmente distribuídos em torno da reta.

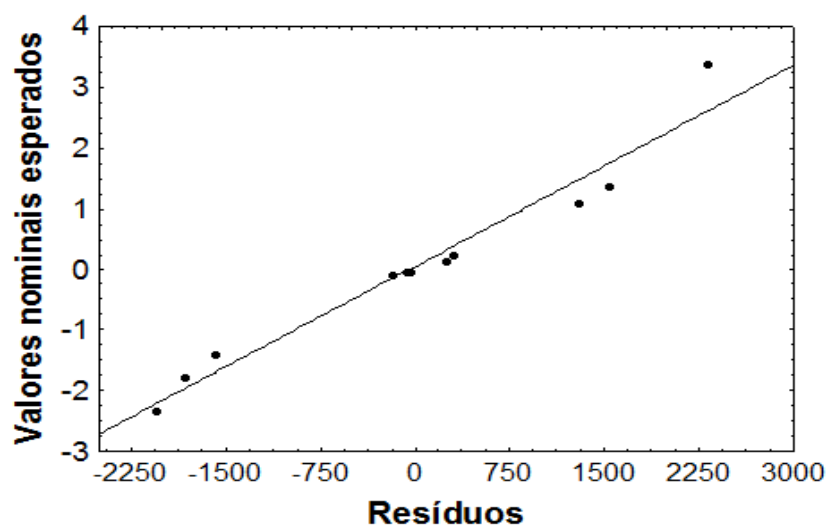


Figura 15 - Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade.

De acordo com a ANOVA, o modelo foi significativo e, através da análise de comportamento dos valores predito em função dos experimentais e da distribuição dos resíduos, foi confirmada a confiabilidade do modelo.

Portanto, foi possível construir a superfície de resposta e curvas de contorno da atividade enzimática em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e do pH (Figura 16 e 17), onde se visualiza que os maiores valores da resposta foram encontrados para os pontos centrais.

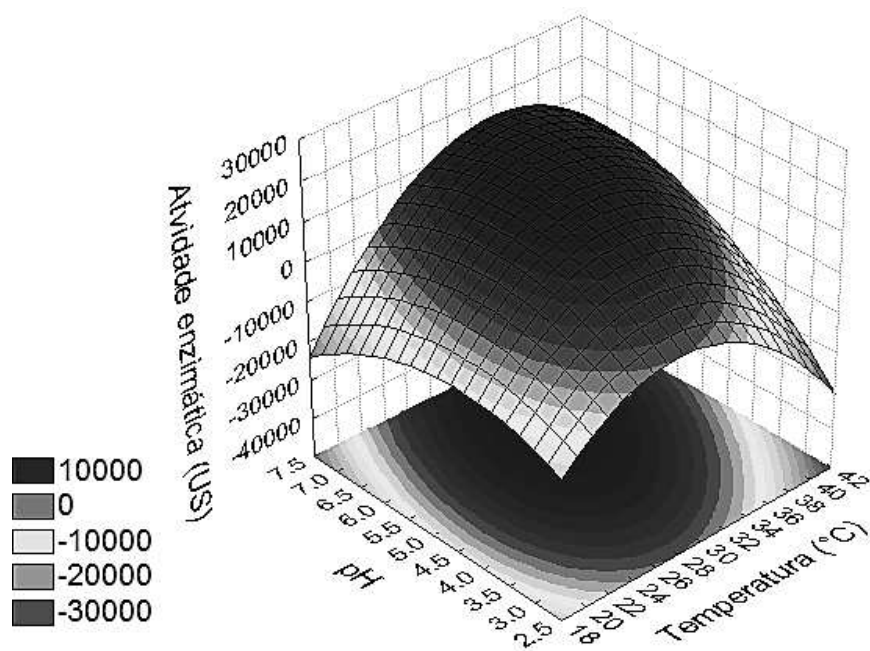


Figura 16 - Superfície resposta do efeito da temperatura e pH e sobre atividade de protease de *Aspergillus oryzae* (NRRL 484).

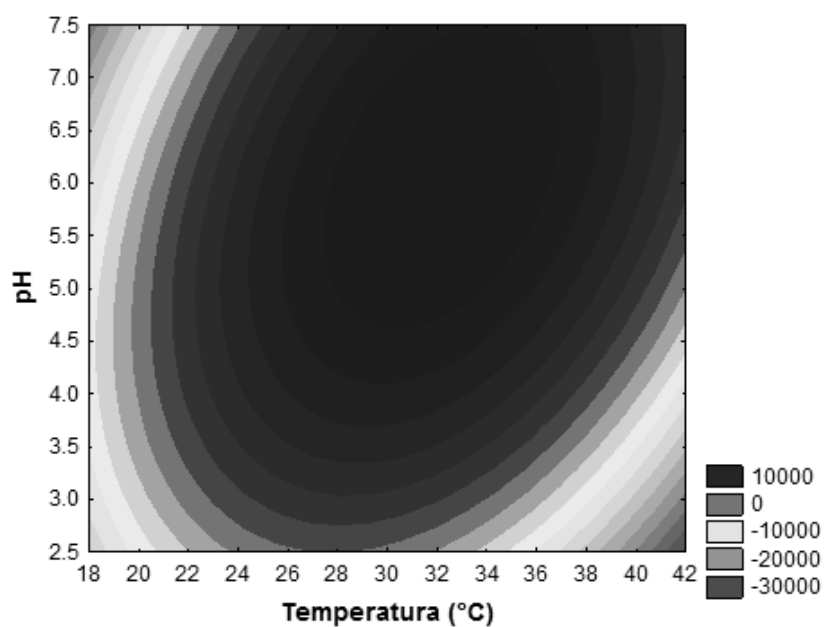


Figura 17 - Curvas de contorno do efeito da temperatura e pH sobre atividade de protease de *Aspergillus oryzae* (NRRL 484).

Em relação ao efeito do pH a protease produzida por *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) em fermentação em estado sólido apresentou atividade enzimática máxima em pH 5,8. Esse resultado é interessante do ponto de vista industrial já que a coagulação do leite ocorre em pH 5,8. Em valores acima desse pH o tempo de coagulação e a firmeza do coagulo diminuem e em valores abaixo a atividade hidrolítica é alta resultando em diminuição do rendimento (CHITPINITYOL; CRABBE, 1998).

Comportamento aproximado foi observado para a protease de *Aspergillus-Versicolor* com atividade coagulante máxima em pH 5,98 (ABDELFATTAH; SALEH, 1988), para *Aspergillus Níger* MC4 em pH 5,8 (CHANNE; SHEWALE, 1997), para a protease de *Rhizopus oryzae*, com atividade coagulante máxima em pH 5,5 com posterior queda e ausência de atividade em pH 8,0 (KUMAR et al., 2005), para a protease de *Mucor pusillus*, com atividade máxima em pH 5,0 seguido de queda e perda de 97% de atividade em pH 7,0 (NOUANI et al., 2009), para protease de *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 com pH 5,4 e queda a partir de pH 7 (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010), protease de *Aspergillus niger* FFB1 com pH 5,5 (FAZOUANE-NAIMI et al., 2010) e para protease de *Bacillus amyloliquefaciens* D4 com pH 6,2 (HE et al., 2012). A atividade coagulante da protease de *Mucor pusillus* var. *Lindt*, estudada por Arima et al (1968), foi máxima em pH 5,5 com grande perda de atividade em pH 7,0 e a da protease de *Rhizomucor miehei* foi máxima em pH 5,6 (PREETHA; BOOPATHY, 1997)

Em relação a o efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas, observa-se que a protease por *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) apresentou atividade máxima em temperatura próximo de 32°C. Comportamento similar foi observado para a protease coagulante produzida por *Aspergillus oryzae*, que apresentou atividade coagulante ótima em temperatura de 30°C (SANDHYA et al., 2005), para *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 também apresentou atividade coagulante ótima em temperatura a 30°C (VISHWANATHA et al., 2010), assim como a obtida por *Mucor circinelloides* em 30°C (SATHYA et al., 2009) e *Bacillus amyloliquefaciens* JNU002 em 35°C (DING et al., 2012).

5.15. Efeito da concentração de CaCl_2 sobre protease de *Aspergillus oryzae* (NRRL 484)

O cálcio exerce função na agregação das caseínas durante a segunda etapa (não enzimática) da coagulação do leite, causada pela neutralização dos resíduos negativos das micelas de caseína (grupos fosfoserina e carboxílicos) por Ca^{2+} e complexos fosfato-cálcio (PIRES; ORELLANA; GATTI, 1999) e que, assim, o aumento da sua concentração aumenta a taxa de coagulação (ARIMA et al., 1968; KUMAR et al., 2005).

Na Figura 18 nota-se que a atividade aumentou com aumento da concentração de CaCl_2 de 0,01 M até 0,04 M porém decresceu na concentração de 0,05 M, com atividade máxima na concentração de 0,04 M. Isto pode ter ocorrido devido à hidrólise do amido do farelo de trigo que, liberando excesso de carboidratos, também observado por Thakur *et al* (1993) e Merheb-Dini *et al* (2010).

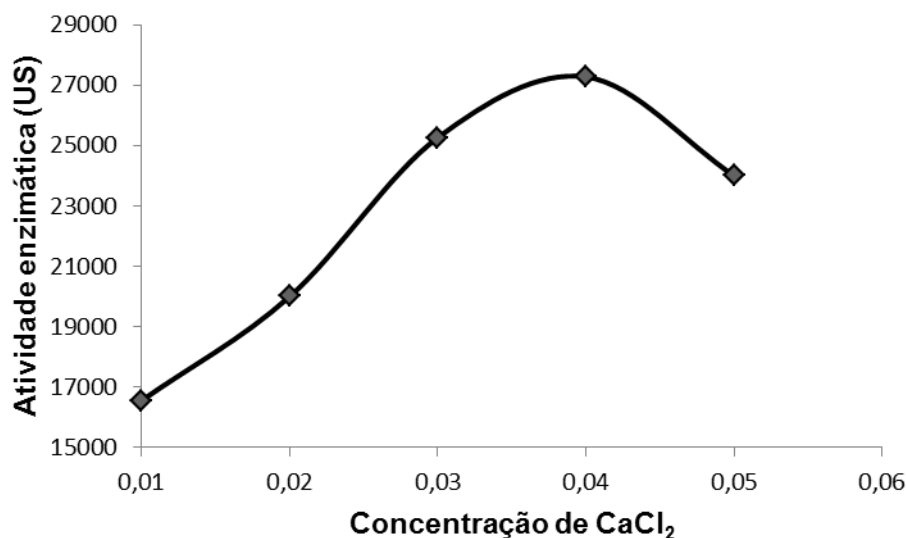


Figura 18 - Efeito das concentrações de CaCl_2 em M sobre atividade de protease de *A. oryzae* (NRRL 484) na coagulação do leite.

Comportamento similar foi relatado por Vairo-Cavalli *et al.* (2005), Preetha & Boopathy (1997) e por Nouani *et al.* (2009) (b), ao estudar proteases que apresentaram a mesma resposta ao aumento da concentração de cálcio (aumento inicial de atividade coagulante, seguido de queda), com máxima atividade a 0,03; 0,04 e 0,02 M de CaCl_2 , respectivamente.

Sardinas (1968) ao estudar o efeito da concentração de CaCl_2 no leite sobre a atividade da renina microbiana produzida por *Endothia parasitica*, também encontrou um pico de máxima coagulação a 0,04 M de CaCl_2 .

Fazouane-Naimi *et al.* (2010) estudaram a atividade de coagulação por protease de *A. niger* FFB1, que foi proporcional à concentração de CaCl_2 com ótimo na presença de 0,01 M. Respostas similares foram observadas para a coagulação do leite com proteases de *Bacillus subtilis* (DUTT *et al.*, 2009), e *Rhizomucor miehei* (PREETHA; BOOPATHY, 1994).

5.16. Efeito da concentração do leite

A Figura 19 mostra o efeito da concentração de leite sobre a atividade enzimática. Observa-se que na faixa de 2 a 10% de leite o tempo de coagulação é diretamente proporcional a concentração de substrato; quanto maior a concentração de substrato, menor o tempo de coagulação. Esse resultado também foi obtido para a protease coagulante de *Endothia parasitica*, que na faixa de 2 a 20% de leite apresentou diminuição proporcional do tempo de coagulação (LARSON; WHITAKER, 1970).

Kumar *et al.* (2005) estudaram o efeito da concentração de leite no tempo de coagulação, A enzima apresentou resposta com o aumento hiperbólico com a concentração do leite desnatado, porem na maior concentração do substrato a atividade diminuiu ligeiramente.

Merheb-Dini *et al* (2010) estudaram o efeito da concentração de leite sobre o tempo de coagulação, observando que na faixa de 2 a 12% de leite o tempo de coagulação é diretamente proporcional a concentração de substrato; quanto maior a concentração de substrato, menor o tempo de coagulação.

Assim, conclui-se que a concentração de 10% de leite usado para a determinação da atividade coagulante é adequado, pois encontra-se dentro da linearidade da curva.

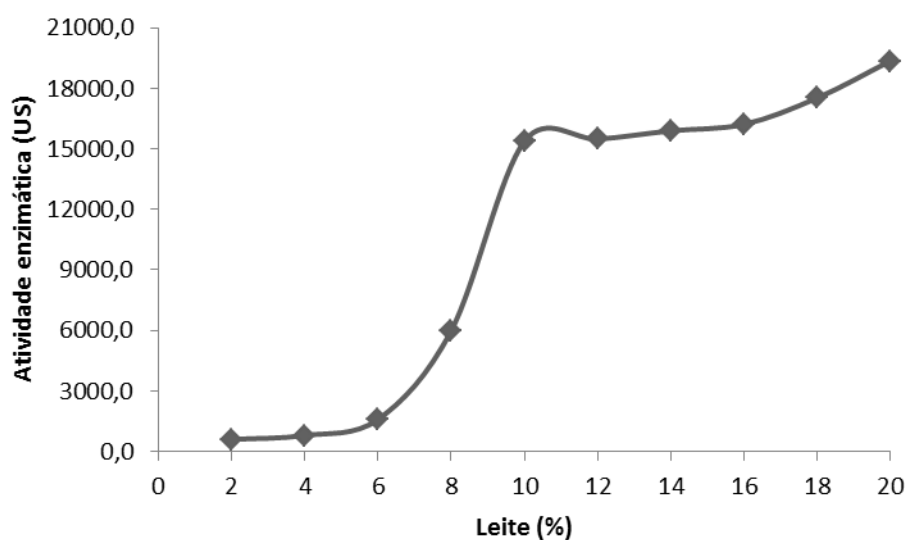


Figura 19 - Atividade de protease de *A. oryzae* (NRRL 484) na coagulação do leite em função da concentração de sólidos de leite.

6. CONCLUSÃO

Das quatro cepas fúngicas testadas *Aspergillus oryzae* (NRRL 484) foi selecionada por produzir maior atividade de coagulação do leite durante a fermentação em estado sólido (FES).

A atividade de coagulação foi avaliada através de ensaios em placas, em que o maior diâmetro de halo obtido, relacionado com a hidrólise da caseína, foi de 6,2 cm.

Meios compostos por misturas de farelos são bons meios de cultivos para produção de protease de *A. oryzae* NRRL 484, sendo a melhor mistura composto por: FA-50% e FT-50% com produção de 16,000 US em 96 horas de fermentação. O pH do extrato enzimático bruto e temperatura de incubação influenciam a atividade enzimática, como esperado a maior atividade foi obtido em pH próximo de 5,8 e temperaturas próximos de 32°C.

A adição de CaCl_2 no leite afeta a atividade enzimática, no tempo de coagulação do leite, o melhor resultado foi obtido com 0,04 M de CaCl_2 .

A concentração do leite afeta a atividade enzimática, ou seja, quanto maior a concentração de sólidos do leite é menor o tempo de coagulação.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELFATTAH, A. F.; SALEH, S. A. Properties of Milk-Clotting Enzyme from *Aspergillus-Versicolor* and Isolation of Rennin-Like Enzyme. **Biological Wastes**, v. 25, n. 2, p. 109-115, 1988.

AEHLE, W. **Enzymes in industry : production and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. ISBN 3527295925 9783527295920.

AL-DELAIFY, K. S.; TUBESHA, Z. A. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 4, p. 237-241, Nov 2003.

ANDREEVA, N. S.; RUMSH, L. D. Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. **Protein Science**, v. 10, n. 12, p. 2439-2450, Dec 2001.

ARIMA, K. et al. Milk-Clotting Enzyme from Microorganisms .V. Purification and Crystallization of *Mucor* Rennin from *Mucor Pusillus* Var Lindt. **Applied Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 1727-&, 1968.

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

ASAKURA, T. et al. Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: Purification, characterization, and application to milk clotting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1070-1075, Apr 1997.

AYHAN, F.; CELEBI, S. S.; TANYOLAC, A. The effect of fermentation parameters on the production of *Mucor miehei* acid protease in a chemically defined medium. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 153-160, Feb 2001.

BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. **Response Surfaces, Mixture, and Ridge Analyses**. EDITION, S.: p. 874 p. 2007.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003. pp. 96-97.

CHANNE, P. S.; SHEWALE, J. G. Influence of culture conditions on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger* MC4. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 11-15, 1997/01/01 1997.

CHITPINITYOL, S.; CRABBE, M. J. C. Chymosin and aspartic proteinases. **Food Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 395-418, Apr 1998.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/2013 – Quinto Levantamento – Fevereiro/2013 http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_02_08_17_24_51_boletim_fevereiro_2013.pdf

DA SILVEIRA, G. G. et al. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 931-937, 2005.

DESHPANDE, V. V. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-+, Sep 1998.

DING, Z. Y. et al. Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 46, p. 9370-9378, Aug 22 2011.

DING, Z. Y. et al. Production and characterization of milk-clotting enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* JNU002 by submerged fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 3, p. 415-421, Mar 2012.

DRAPER, G. E. P. B. A. N. R. Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses. 2007.

DUTT, K. et al. Production of Milk-Clotting Protease from *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 761-772, Sep 2009.

DUTT, K. et al. Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 513-518, May 2008.

DUTTA, R. Fundamentals of biochemical engineering. New Delhi; Berlin; New York, 2008.

ELLAIAH, P. et al. Isolation of alkaline protease producing bacteria from Visakhapatnam soil. **Indian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 173-175, 2002.

EMMONS, D. B.; BINNS, M. R. Milk Clotting Enzymes .4. Proteolysis during Cheddar Cheese Making in Relation to Estimated Losses of Basic Yield Using Chymosin Derived by Fermentation (Niger,a) and Modified Enzyme from Miehei,M. **Milchwissenschaft-Milk Science International**, v. 46, n. 6, p. 343-347, 1991.

ETOH, Y. et al. Milk-Clotting Enzyme from Microorganisms .12. Physicochemical and Immunochemical Studies on Similarities of Acid Proteases Mucor-Pusillus Rennin and Mucor-Miehei Rennin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 209-215, 1979.

FAZOUANE-NAIMI, F. et al. Characterization and Cheese-Making Properties of Rennet-Like Enzyme Produced by a Local Algerian Isolate of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 258-269, 2010.

FERNANDEZ-LAHORE, H. M. et al. Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. **The Journal of Peptide Research**, v. 53, n. 6, p. 599-605, 1999.

FERNANDEZ-LAHORE, H. M.; FRAILE, E. R.; CASCON, O. Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. **Journal of Biotechnology**, v. 62, n. 2, p. 83-93, Jun 30 1998.

FLAMM, E. L. How FDA approved chymosin: A case history. **Bio/Technology**, v. 9, n. 4, p. 349-351, 1991.

FOX, P. F. **Cheese. chemistry, physics, and microbiology.** [Vol. 1]. Amsterdam; London: Elsevier, 2004.

FRAILE, E. R.; MUSE, J. O.; BERNARDINELLI, S. E. Milk-Clotting Enzyme from *Mucor-Bacilliformis*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 191-193, 1981.

GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet Coagulation and Coagulants in Cheese Manufacture. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 45, n. 4, p. 94-104, Nov 1992.

HE, X. et al. Screening fermentation parameters of the milk-clotting enzyme produced by newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* D4 from the Tibetan Plateau in China. **Annals of Microbiology**, p. 1-9, 2011.

HE, X. L. et al. Screening fermentation parameters of the milk-clotting enzyme produced by newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* D4 from the Tibetan Plateau in China. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 357-365, Mar 2012.

HEADON, D. R.; WALSH, G. The industrial production of enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 12, n. 4, p. 635-646, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. v.1, 533p

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 14-33, Feb 2011.

KARAM, L. B. et al. Gel textural characteristics of corn, cassava and yam starch blends: A mixture surface response methodology approach. **Starch-Starke**, v. 57, n. 2, p. 62-70, Feb 2005.

KNUF, C.; NIELSEN, J. Aspergilli: Systems biology and industrial applications. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 9, p. 1147-1155, 2012.

KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, Apr 2005.

LAHORE, H. M. F. et al. Partition Behavior and Purification of a *Mucor-Bacilliformis* Acid Protease in Aqueous 2-Phase Systems. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 615-621, 1995.

LI, T. et al. Structure of the complex between *Mucor pusillus* pepsin and the key domain of κ -casein for site-directed mutagenesis: A combined molecular modeling and docking approach. **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, n. 7, p. 1661-1668, 2011.

LI, Y. et al. Purification and characterization of *Bacillus subtilis* milk-clotting enzyme from Tibet Plateau and its potential use in yak dairy industry. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 4, p. 733-741, 2012.

MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1157-1161, 2005.

MALVESTITI, L.; GIANNUZZI, L.; FERRERO, C. Mixtures of beef tripe, beef liver and soybeans applied to food development. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 31, n. 3, p. 270-285, Jun 2007.

MCNEIL, B.; HARVEY, L. **Practical fermentation technology**. Hoboken, N.J.; Chichester: Wiley ; John Wiley [distributor], 2008.

MERHEB-DINI, C. et al. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 87-93, May 1 2010.

MØLLER, K. K. et al. Comparison of the Hydrolysis of Bovine κ -Casein by Camel and Bovine Chymosin: A Kinetic and Specificity Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 21, p. 5454-5460, 2012/05/30 2012.

MONGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 2001. 699

NAMPOOTHIRI, K. M. et al. Advances in fermentation technology. **International Sugar Journal**, v. 104, n. 1247, p. 493-499, 2002.

NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A. K.; KAUSHIK, J. K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 143-148, 1999.

NOUANI, A. et al. Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 1, p. 112-117, 2009.

NOUANI, A. et al. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Mucor pusillus*: Method comparison. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 9, p. 1655-1665, 2011.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, v. 26, n. 6, p. 355-361, 1991.

PANDEY, ASHOK. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, Mar 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, Jul 2000.

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

PEREZ, T.; RAMOS, E.; DUSTET, J. C. Laboratory scale production of Mucor pusillus aspartic protease from Pichia pastoris yeast. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 35, n. 4, p. 363-367, Dec 2001.

PIRES, M. S.; ORELLANA, G. A.; GATTI, C. A. Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: Action of Ca²⁺ and pH. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 3, p. 235-238, 1999.

PREETHA, S.; BOOPATHY, R. Influence of Culture Conditions on the Production of Milk-Clotting Enzyme from Rhizomucor. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 527-530, Sep 1994.

PREETHA, S., BOOPATHY, R. Purification and characterization of a milk clotting protease from Rhizomucor miehei. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 573-578, 1997.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3. ed. San Diego: Academic, 1993.

SALAZAR, O.; ASENJO, J. A. Enzymatic lysis of microbial cells. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 7, p. 985-994, Jul 2007.

SAMPAIO, P. N. et al. Production and characterization of recombinant cyprosin B in Saccharomyces cerevisiae (W303-1A) strain. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 4, p. 305-312, Apr 2008.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689-2694, Jul 2005.

SATHYA, R. et al. Production of Milk Clotting Protease by a Local Isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using Agro-industrial Wastes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 6, p. 788-794, Nov-Dec 2009.

SEKER, S. et al. Production of microbial rennin from *Mucor miehei* in a continuously fed fermenter. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 469-474, 1998.

SHATA, H. M. A.; FODA, M. S. Production of a milk-clotting enzyme by *Aspergillus oryzae* under solid substrate culture conditions. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 101, n. 6, p. 260-265, Jun 2005.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**. v. 195, p. 19, 1952

SPREER, E. **Lactologia industrial; leche, preparacion y elaboracion, maquinas, instalaciones y aparatos, productos lacteos**. Zaragoza: Acribia, 1975.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. Oxford: Pergamon Press, 1995.

TAKAHASHI, M.; KIKUCHI, T. Purification and Characteristics of Milk Clotting Protease from *Aspergillus-Ustus*. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 40, n. 4, p. 256-261, 1993.

THAKUR, M. S.; KARANTH, N. G.; NAND, K. Downstream Processing of Microbial Rennet from Solid-State Fermented Moldy Bran. **Biotechnology Advances**, v. 11, n. 3, p. 399-407, 1993.

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, n. 4, p. 237-241, Nov 2003.

VALLEJO, J. A. et al. Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10606-10610, Nov 26 2008.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 402-407, May 15 2009.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A.. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 129-138, Feb 2010.

WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003.

WHITEHURST, R. J.; LAW, B. A. **Enzymes in food technology**. Sheffield; Boca Raton, FL: Sheffield Academic Press ; CRC Press, 2002.

WU, J. J.; CHEN, H. B.; CHEN, W. P. Fermentation parameter and partial biochemical characterisation of milk clotting enzyme from Chinese distiller's yeast. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 717-722, 2008.

YAMASHITA, T. et al. Secretion of *Mucor* rennin, a fungal aspartic protease of *Mucor pusillus*, by recombinant yeast cells. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 210, n. 3, p. 462-467, 1987.

YEGIN, S. et al. Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6380-6386, Sep 20 2010.

YEGIN, S. et al. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 949-960, Feb 2011.

YUN, J. J.; BARBANO, D. M.; KINDSTEDT, P. S. Mozzarella Cheese - Impact of Coagulant Type on Chemical-Composition and Proteolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3648-3656, Dec 1993.