



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUERATINASE DE *Bacillus* sp. P45 A
PARTIR DE COPRODUTOS E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS
CREMOSOS ENRIQUECIDOS COM CHIA E QUINOA

AILTON CESAR LEMES

Prof^a. Dr^a. Susana Juliano Kalil

Orientadora

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Coorientador

RIO GRANDE, RS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUERATINASE DE *Bacillus* sp. P45 A
PARTIR DE COPRODUTOS E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS
CREMOSOS ENRIQUECIDOS COM CHIA E QUINOA**

AILTON CESAR LEMES

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de doutor em Engenharia e
Ciência de Alimentos da Universidade Federal
do Rio Grande.

Prof.^a Dr.^a Susana Juliano Kalil

Orientadora

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Coorientador

RIO GRANDE, RS

2015

*Pai e mãe,
À vocês a dedicatória,
o prólogo,
as linhas,
os pontos finais,
vírgulas,
acentos
e o resto.
O todo.
Pois sem vocês não haveria verbo.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, exemplos maiores de perseverança e dedicação. Obrigado por mostrarem que o amor é a maior prova de aceitação.

À Prof.^a Susana, exemplo de profissional. Obrigado por abrir as portas, acreditar que nossa parceria seria possível. Obrigado por me ajudar a desconstruir conceitos profissionais e pessoais equivocados, e se dispor, com paciência e dedicação, a me construir como profissional. Sei que às vezes não sabemos reconhecer ou expressar, pela correria do dia a dia ou imaturidade, o esforço dedicado e, assim, peço-lhe desculpas. Não é por mal, acredite! Obrigado por permitir que eu aprendesse com você.

À Eliane, minha incentivadora, amiga e exemplo de superação. Um dia você me disse que uma fruta nunca cai longe da árvore, e é verdade. Continue sendo a pessoa e profissional que é para que eu possa me espelhar. A gente precisa de bons exemplos para seguir o caminho correto.

Ao Prof. Adriano Brandelli, pela coorientação e por proporcionar o intercâmbio na Universidad Nacional del Litoral – Argentina, por meio do projeto CAPES-Mincyt.

Aos Lemes, aos Gilios, aos Nodas, por tudo o que representam para mim. Agradeço todos os dias pela família que tenho e espero que nossos encontros sejam constantes.

Ao Gustavo, pelo apoio, principalmente nos momentos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. Obrigado por todos os bons momentos e, principalmente, por estar ao meu lado, por ser meu amigo, meu melhor amigo. Lembra? *Uma linha pode ser reta, mas o coração humano, ah! Ele é uma estrada com curvas que atravessam montanhas.*

À Lui, Jô, Day, Deh, Rafa, Ligia, Carol e Mari. Essa é a hora de agradecer à vocês que sempre estiveram ao meu lado. Nunca esquecerei a força que sempre me deram! Cada uma com sua peculiaridade, mas muito especiais. Apesar desse meu jeito “desligado”, há quem diga “relapso”, eu sempre prestei atenção em vocês, o tempo todo. Quando vocês acharam que eu não estava olhando, eu vi vocês fazerem para mim aquele café gostoso, na maior parte das vezes, ou aquele bolo “sem vida”, e aprendi que pequenas coisas podem ser muito especiais na vida das pessoas, e que todos nós devemos nos cuidar e nos ajudar; Quando vocês acharam que eu não prestava atenção, eu vi as lágrimas, e aprendi que, às vezes, coisas nos machucam, mas que é permitido chorar, mas que cabe somente a nós mudar a situação; Vocês me mostraram que algumas situações da vida, podem parecer difíceis, e até impossíveis, mas que sempre há uma saída. Eu aprendi com vocês que, ou a gente fica ali chorando e reclamando da vida, ou podemos simplesmente meter o pé na porta e transformá-la, as vezes em uma grande piada: e como nós rimos das peripécias que a vida nos pregou! Eu aprendi com vocês, com cada um de vocês; Quando vocês acharam que eu não estava prestando atenção, eu olhei para vocês e quis dizer: “Obrigado, obrigado por todas as coisas que eu vi e aprendi quando vocês pensaram que eu não estava prestando atenção.” Obrigado! Vou sentir saudades! Eu vou agradecer sempre por ter achado em vocês grandes amigas, grandes irmãs.

À Sandra, minha madrinha adotiva, por abrir as portas do rancho da São Manoel e do seu coração, com alegria e energia que contagia.

Ao Marcos, obrigado por aceitar as diferenças e dividir o dia-a-dia.

À Islanda, Susana Geppert e Anaí Bueno, obrigado por serem sempre tão solícitas e simpáticas.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações (Elida, Felipe, Ana, Thais, Samuel, Gabi, Alexandre), que em algum momento deste trabalho pararam para ouvir sobre ele, da vida ou simplesmente para tomar um cafezinho.

Ao Gabriel, que auxiliou no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Prof. Cezar da Rosa, pela dedicação em ensinar algo novo. Tenho certeza que essa parceria renderá bons frutos.

Ao Prof. Sérgio Rozycki, meu orientador na Universidad Nacional del Litoral, a Yanina Pavón, Sandra Lazzaroni, à equipe da área de lácteos do Instituto de Tecnología de Alimentos e, principalmente, a Florencia Galvan e Maria Alejandra Schwich, sem as quais a realização deste trabalho não seria possível. Muchas gracias por todo el apoyo y toda la ayuda!

À Anelise, por mostrar que nada é imutável desde que estejamos prontos a mudar, e mudar novamente, e não aceitar verdades como eternas.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pelos ensinamentos e disposição para formar excelentes profissionais.

Aos membros da banca Prof.^a Dr.^a Eliane Danesi, Prof. Dr. Adriano Brandelli, Prof.^a Dr.^a Francine Antelo, Prof.^a Dr.^a Janaína Burkert e Prof. Dr. André Burkert pelas contribuições valiosas à melhoria do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Não interessa se você é letrado ou não, o que importa é se você vive aquilo que fala!”
(O Teatro Mágico)

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Tabela 1 - Fator de purificação e recuperação da enzima queratinase obtida em sistemas de maiores capacidades.	48
Tabela 2 – Temperaturas e valores de pH ótimos para proteases de diversas fontes.	50
Tabela 3 – Valores de z , D , K_d e meia vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da desnaturação térmica da queratinase de <i>Bacillus</i> sp. P45 em pH de 7,0 – 9,0 e de 40 – 60°C.	53

ARTIGO 2

Tabela 1 – Formulações dos queijos cremosos elaborados a partir da enzima queratinase de <i>Bacillus</i> sp. P45 e enriquecidos com chia e quinoa.	72
Tabela 2 – Teste de coagulação para a enzima queratinase bruta, purificada e comercial.	75

ARTIGO 3

Tabela 1 – Composição química dos queijos cremosos elaborados a partir da enzima queratinase purificada e enriquecidos com chia e quinoa.	98
Tabela 2 – Valores médios dos parâmetros avaliados para determinação do perfil de textura dos queijos cremosos (dureza, adesividade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade, resiliência).	103
Tabela 3 – Propriedades de consistência ao longo do período de armazenamento dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.	106
Tabela 4 – Propriedades de untabilidade ao longo do período de armazenamento dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.	107
Tabela 5 – Valores de suavidade ao paladar ao longo do período de armazenamento dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.	107
Tabela 6 – Parâmetros do atributo adstringência ao longo do período de armazenamento dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.	108
Tabela 7 - Defeitos descritos pelos avaliadores durante determinação do perfil sensorial dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa. São apresentados o número de avaliadores que perceberam tal atributo, seguido pela nota média, entre parênteses, calculada com base nos avaliadores que perceberam tal atributo.	114

ARTIGO 4

Tabela 1 – Atividade enzimática, proteína, atividade específica e rendimento do processo de extração de β -galactosidase com a utilização do método ultrassônico e abrasivo..... 139

Tabela 2 – Atividade proteolítica, queratinolítica e produtividade obtidos no pico máximo de produção da enzima (U/mL). 142

Tabela 3 – Composição em relação a proteína (base seca) dos substratos proteicos utilizados no cultivo do *Bacillus* sp. P45 para produção de protease..... 143

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Distribuição das vendas e a contribuição de diferentes enzimas na venda total de enzimas, onde a parte destacada indica a venda total de proteases.	16
Figura 2 – Visualização microscópica do micro-organismo <i>Bacillus</i> sp. P45.	17
Figura 3 – Representação esquemática do processo de coagulação enzimática do leite para produção de queijo.....	19
Figura 4 – Visualização microscópica da levedura <i>K. marxianus</i> CCT 7082.....	23
Figura 5 – Representação esquemática de processos ideais. (Melhor: prevenção da geração de resíduos; Pior: descarte inadequado).	25
Figura 6 – Diagrama de fases genérico de um sistema aquoso bifásico formado por um polímero e um sal, onde PC é o ponto crítico, M indica a composição global do sistema, T indica a composição da fase de topo e F indica a composição da fase de fundo.	31

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Figura 1 - pH ótimo da enzima queratinase purificada obtida a partir do <i>Bacillus</i> sp. P45 utilizando tampão fosfato de sódio 100 mM (6,5) e tris-HCl 100 mM (7,0 – 11,0).	49
Figura 2 - Temperatura ótima da enzima queratinase obtida a partir <i>Bacillus</i> sp. P45.....	49
Figura 3 – Efeito de diferentes sais (1mM) na atividade de queratinase purificada.	54
Figura 4 – Efeito da molaridade dos sais na atividade de queratinase purificada.....	56
Figura 5 – Efeito de solventes na atividade da enzima queratinase purificada obtida a partir do <i>Bacillus</i> sp. P45.	58

ARTIGO 2

Figura 1 – Fluxograma de elaboração do queijo cremoso enriquecido com chia e quinoa a partir da utilização da enzima queratinase purificada.	73
Figura 2 - Atividade coagulante da enzima queratinase bruta (+) e purificada (o) obtidas a partir do <i>Bacillus</i> sp. P45 em relação à concentração do extrato enzimático (mL/mg).	75
Figura 3 – Teste de coagulação do leite a partir da enzima queratinase purificada. (A) Teste controle (sem enzima) e (B) teste com adição da enzima.	76
Figura 4 - Testes preliminares de verificação de viabilidade da utilização dos coagulantes e fermento quanto à formação de coágulos firmes (teste do palito).....	77

Figura 5 – Testes preliminares para verificação de viabilidade da utilização dos coagulantes alternativos. (+) Fermento + enzima purificada; (□) Enzima purificada (sem fermento); (○) Fermento + enzima bruta; (▲) Enzima bruta (sem fermento); (●) Fermento + enzima comercial; (■) Enzima comercial (sem fermento).	78
Figura 6 – Enzima queratinase bruta (A) e purificada (B) obtidas a partir do cultivo do <i>Bacillus</i> sp. P45.	79
Figura 7 – pH (A) e acidez (B) das formulações elaboradas a partir a enzima queratinase purificada durante o processo fermentativo. 1 - Nata 6%; Chia 4%; Quinoa 1%; 2 - Nata 10%; Chia 4%; Quinoa 1%; 3 - Nata 6%; Chia 1%; Quinoa 4%; 4 - Nata 10%; Chia 1%; Quinoa 4%; 5 - Nata 8%; Chia 2,5%; Quinoa 2,5%.	80
Figura 8 – pH (A) e acidez (B) das 5 formulações elaboradas a partir a enzima queratinase purificada durante o armazenamento por 25 dias. 1 - Nata 6%; Chia 4%; Quinoa 1%; 2 - Nata 10%; Chia 4%; Quinoa 1%; 3 - Nata 6%; Chia 1%; Quinoa 4%; 4 - Nata 10%; Chia 1%; Quinoa 4%; 5 - Nata 8%; Chia 2,5%; Quinoa 2,5%.	82

ARTIGO 3

Figura 1 – Parâmetros tecnológicos, físico-químicos e sensoriais avaliados no queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa.	95
Figura 2 - (A) Sinérese e (B) índice de retenção de água (IRA %) das diferentes formulações de queijo cremoso determinado por gravidade. (1●) - Nata 6%; Chia 4%; Quinoa 1%; (2■) - Nata 10%; Chia 4%; Quinoa 1%; (3◇) - Nata 6%; Chia 1%; Quinoa 4%; (4▲) - Nata 10%; Chia 1%; Quinoa 4%; (5+) - Nata 8%; Chia 2,5%; Quinoa 2,5%.	100
Figura 3 - (A) Sinérese e (B) índice de retenção de água (IRA %) das diferentes formulações de queijo cremoso determinado por centrifugação. (1●) - Nata 6%; Chia 4%; Quinoa 1%; (2■) - Nata 10%; Chia 4%; Quinoa 1%; (3◇) - Nata 6%; Chia 1%; Quinoa 4%; (4▲) - Nata 10%; Chia 1%; Quinoa 4%; (5+) - Nata 8%; Chia 2,5%; Quinoa 2,5%.	101
Figura 4 – Representação gráfica de avaliação sensorial das amostras de queijo cremoso em relação ao 1º dia de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.	109
Figura 5 – Representação gráfica de avaliação sensorial das amostras de queijo cremoso em relação ao 13º dia de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.	109

Figura 6 – Representação gráfica de avaliação sensorial das amostras de queijo cremoso em relação ao 25º dia de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.....	110
Figura 7 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 1 (6,0% nata; 4,0% chia; 1,0% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.....	110
Figura 8 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 2 (10,0% nata; 4,0% chia; 1,0% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.....	111
Figura 9 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 3 (6,0% nata; 1,0% chia; 4,0% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.....	111
Figura 10 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 4 (10,0% nata; 1,0% chia; 4,0% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.	112
Figura 11 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 5 (8,0% nata; 2,5% chia; 2,5% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.....	112
Figura 12 – Intensidade de gosto e sabor detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 1 em relação à porcentagem de percepção.....	116
Figura 13 – Intensidade de gosto e sabor detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 2 em relação à porcentagem de percepção.....	116
Figura 14 – Intensidade de gosto e sabor detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 3 em relação à porcentagem de percepção.....	117
Figura 15 – Intensidade de gosto e sabor detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 4 em relação à porcentagem de percepção.....	117
Figura 16 – Intensidade de gosto e sabores detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 5 em relação à porcentagem de percepção.....	118

ARTIGO 4

Figura 1 – Processo integrado de produção das enzimas β -galactosidase de <i>K. marxianus</i> e queratinase de <i>Bacillus</i> sp. P45.	131
Figura 2 – Mecanismo de ruptura celular pelo método por abrasão utilizando pérola de vidro (A) e pelo método ultrassônico (B). 1 – Agitação; 2 – Filtração; e 3 – Centrifugação.	134

- Figura 3** – Atividade enzimática (A), proteína total (B) e atividade específica (C) durante o processo de extração de β -galactosidase. (■) Ponteira intermediária; (+) Micro ponteira. ... 138
- Figura 4** – Células da levedura *K. marxianus* CCT 7082 sem nenhum pré-tratamento (A); (B) Células após ruptura por abrasão; (C) Células após ruptura ultrassônica utilizando ponteira intermediária (D); Células após ruptura ultrassônica utilizando micro ponteira. 141
- Figura 5** – pH durante o cultivo do *Bacillus* sp. P45 para produção de protease utilizando diferentes substratos proteicos. 1 - (●) Farinha de penas; 2 - (■) Farinha de penas reutilizada; 3 - (▲) Biomassa residual; e 4 - (◇) Farinha de penas (50%) / Biomassa residual (50%). ... 146
- Figura 6** – Atividade de protease durante o cultivo do *Bacillus* sp. P45 utilizando diferentes substratos proteicos. 1 - (●) Farinha de penas; 2 - (■) Farinha de penas reutilizada; 3- (◇) Biomassa residual; e 4 - (▲) Farinha de penas (50%) / Biomassa residual (50%). 147

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
RESUMO	3
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO GERAL	7
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos	10
 CAPÍTULO II	 11
3 REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1 Enzimas	13
3.2 Enzimas de interesse industrial	14
3.2.1 Proteases	15
3.2.2 β -galactosidase.....	21
3.3 Coprodutos para produção de enzimas de interesse industrial.....	24
3.4 Recuperação e purificação de bioprodutos	26
3.4.1 Ruptura celular e extração de bioprodutos intracelulares.....	26
3.4.2 Purificação de bioprodutos	28
3.4.3 Técnicas de purificação de bioprodutos	29
3.5 Caracterização de enzimas	33
3.6 Considerações finais.....	36
 CAPÍTULO III	 37
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	37
ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE QUERATINASE DE <i>Bacillus</i> sp. P45	
PURIFICADA	39
RESUMO	41
ABSTRACT	41
1 INTRODUÇÃO	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Micro-organismo, inóculo e produção da enzima.....	43
2.2 Purificação da enzima e obtenção em maiores quantidades	44

2.3 Caracterização da enzima queratinase purificada.....	44
2.3.1 Temperatura e pH ótimo	44
2.3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos de desnaturação térmica	45
Para estes cálculos apenas regressões obtidas com um mínimo de 5 pontos e um valor de R ² acima de 0,93 foram aceitos.....	46
2.3.3 Efeito de sais e solventes na atividade de queratinase purificada.....	46
2.4 Determinações analíticas	46
2.5 Análise estatística	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1 Obtenção de queratinase purificada em maiores quantidades	47
3.2 Caracterização da enzima queratinase purificada.....	48
3.2.1 Temperatura e pH ótimo	48
3.3.2 Parâmetros cinéticos para a desativação térmica de queratinase purificada	51
3.3.3 Influência de sais na atividade da enzima	54
4 CONCLUSÃO	59
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ARTIGO 2: ELABORAÇÃO DE QUEIJO CREMOSO UTILIZANDO PROTEASES DE <i>Bacillus</i> sp. P45 COM PROPRIEDADES COAGULANTES	65
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	67
1 INTRODUÇÃO	68
2 MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1 Micro-organismo, inóculo e produção da enzima	69
2.2 Purificação da enzima.....	70
2.3 Determinação da atividade coagulante da enzima.....	70
2.3.1 Preparo da solução coagulante	71
2.4 Ensaios preliminares para o desenvolvimento do queijo cremoso	71
2.5 Elaboração de queijo cremoso a partir da enzima purificada.....	71
2.6. Determinação do pH e acidez durante a elaboração e armazenamento do queijo cremoso	74
2.7 Análise estatística	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1 Atividade coagulante da enzima.....	74

3.2 Ensaaios preliminares com os coagulantes e fermento para o desenvolvimento do queijo cremoso.....	76
3.3 Acompanhamento do pH e acidez durante a elaboração e armazenamento do queijo cremoso.....	79
4 CONCLUSÃO.....	83
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ARTIGO 3: PERFIL DE UM QUEIJO CREMOSO ENRIQUECIDO COM FARINHA DE CHIA E QUINOA	87
RESUMO	89
ABSTRACT	89
1 INTRODUÇÃO.....	90
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	92
2.1 Avaliação das propriedades tecnológicas e sensoriais dos queijos cremosos.....	92
2.1.1 Retenção de água e sinérese	92
2.1.2 Determinação da atividade de água (A_w) e composição química dos queijos	93
2.1.3 Análise do perfil de textura instrumental.....	93
2.1.4 Análises microbiológicas.....	93
2.1.5 Avaliação sensorial dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa	94
2.2 Análise estatística.....	94
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1 Propriedades tecnológicas e sensoriais do queijo cremoso.....	96
3.1.1 Atividade de água e composição química	96
3.1.2 Retenção de água	99
3.1.3 Análise do perfil de textura instrumental.....	102
3.1.4 Análises microbiológicas.....	105
3.1.5 Avaliação do perfil sensorial dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa	105
4 CONCLUSÃO.....	118
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

ARTIGO 4: EXTRAÇÃO DE β-GALACTOSIDASE E REUTILIZAÇÃO DE BIOMASSA RESIDUAL PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES A PARTIR DE <i>Bacillus</i> sp. P45	125
RESUMO.....	127
ABSTRACT.....	127
1 INTRODUÇÃO.....	128
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	130
2.1 Obtenção e caracterização dos substratos proteicos para obtenção de proteases ...	130
2.2 Extração de β -galactosidase: micro-organismo, inóculo e cultivo submerso.....	132
2.1.1 Extração de β -galactosidase por método abrasivo e ultrassônico.....	133
2.3 Produção de queratinase: micro-organismo, inóculo e produção da enzima.....	134
2.3.1 Determinação da produtividade de protease por <i>Bacillus</i> sp. P45.....	135
2.4 Métodos analíticos.....	135
2.4.1 Determinação da atividade enzimática.....	135
2.4.2 Determinação de proteína solúvel e de nitrogênio total.....	136
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	136
3.1 Extração de β -galactosidase.....	136
3.2 Obtenção de protease através do cultivo do <i>Bacillus</i> sp. P45.....	142
4 CONCLUSÃO.....	148
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
CAPÍTULO IV	153
CONCLUSÃO GERAL	155
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	157
CAPÍTULO V	159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
APÊNDICE	181

CAPÍTULO I
RESUMO, ABSTRACT E INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO

As proteases constituem 60-65% do mercado global das enzimas industriais e são utilizadas na indústria de alimentos no processo de amaciamento de carne, na síntese de peptídeos, preparo de fórmulas infantis, panificação, cervejarias, produtos farmacêuticos, diagnósticos médicos, como aditivos na indústria de detergentes e na indústria têxtil no processo de depilação e transformação do couro. Proteases específicas produzidas por micro-organismos queratinolíticos são chamadas de queratinases e distinguem-se de outras proteases pela maior capacidade de degradação de substratos compactos e insolúveis como a queratina. Atualmente, processos que apontem o uso total das matérias-primas e que não resultem em impactos negativos ao meio ambiente tem ganhado destaque. Dentro desta temática, destacam-se a reutilização da farinha de penas residual durante o cultivo do *Bacillus* sp. P45 para produção de proteases e a biomassa residual de levedura, ambas com elevados teores de proteínas, podendo ser utilizadas no cultivo do *Bacillus* sp. P45 para obtenção de proteases. O objetivo deste trabalho foi obter a enzima queratinase purificada em grandes quantidades, sua caracterização, bem como a sua aplicação em processos de coagulação enzimática do leite para o desenvolvimento de um queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa. Além disso, aplicar diferentes coprodutos para produção de enzimas proteolíticas e queratinolíticas. A presente tese foi dividida em quatro artigos: no primeiro foi realizado a obtenção da queratinase purificada em maiores quantidades e a determinação dos parâmetros de estabilidade térmica e a influência de componentes químicos na atividade enzimática. A obtenção da enzima em maiores quantidades alcançou fatores de purificação de 2,6, 6,7 e 4,0 vezes, para 1º SAB, 2º SAB e diafiltração, respectivamente. A recuperação enzimática alcançou valores de 75,3% para o 1º SAB, 75,1% no 2º sistema e 84,3% na diafiltração. A temperatura de 55°C e o pH 7,5 foram determinados como ótimos para atividade da enzima queratinase. O valor da energia de desativação (E_d) médio foi de 118,0 kJ/mol e os valores de z e D variaram de 13,6 a 18,8°C, e 6,9 a 237,3 min, respectivamente. Além disso a adição de sais (CaCl_2 , CaO , $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ e MgSO_4) elevou a atividade da enzima na presença destes compostos. O segundo artigo apresenta a aplicação da queratinase como coagulante de leite bovino e sua aplicação na obtenção de queijo cremoso enriquecido com chia e quinoa. A enzima mostrou atividade de coagulação semelhante ao coagulante comercial, na concentração de 30mg/mL. A enzima purificada foi empregada de forma eficiente na fabricação do queijo cremoso, que apresentou valores de pH de 5,3 e acidez de 0,06 a 0,1 mol/L, com elevação durante os 25 dias de armazenamento. O terceiro artigo apresenta o perfil do queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa, o qual apresentou alto índice de retenção de água (>99,0%) e baixos valores de sinérese (<0,72%). Elevados teores de fibras foi verificado (3,0 a 5,0%), sugerindo seu consumo como fonte de fibras. As análises microbiológicas foram de acordo com a legislação vigente. Na análise sensorial foi verificado altos valores de suavidade ao paladar e verificado maiores valores de consistência e untabilidade nas amostras com maiores concentrações de nata e quinoa. O quarto artigo traz a extração de β -galactosidase por ultrassom e o uso da biomassa residual da levedura, bem como o uso de farinha de penas residuais como substrato para obtenção de proteases. O ultrassom foi eficiente para ruptura celular e extração de β -galactosidase, apresentando alta atividade (35,0 U/mL) e rendimento (876,0 U/g de biomassa). A maior atividade proteolítica (1300 U/mL em 32 h) e queratinolítica (89,2 U/mL) verificadas ocorreram utilizando-se a biomassa e a farinha de penas residuais, respectivamente. Maior produtividade proteolítica (40,8 U/mL/h) foi verificado no meio utilizando biomassa residual como substrato. Já a maior produtividade queratinolítica (2,8 U/mL/h) foi alcançada utilizando farinha de penas reutilizada.

Palavras-chave: purificação, proteases, caracterização, coagulação, queijo cremoso.

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND KERATINASE APPLICATION IN CREAMY CHEESE DEVELOPMENT

ABSTRACT

Proteases constitute 60-65% of the global market for industrial enzymes, and most of them are alkaline proteases used in the food industry in meat tenderizing process, in peptide synthesis, preparation of infant formula, baking and brewing. Furthermore, they are used in pharmaceutical industry, medical diagnostics, as additives in laundry detergents and textile industry in the process of waxing and processing of leather. The specific proteases produced by keratinolytic microorganisms are denominated keratinases and distinguished from the other proteases due to their higher capacity to degrade compact and insoluble substrate such as keratin. Currently, processes that converge to the total use of raw materials and do not result in negative impacts on the environment has great importance. Within this theme, we highlight the feather meal; solid residue generated from the *Bacillus* sp. cultivation P45 for the production of proteases and the biomass resulting of the bioprocess for obtaining β -galactosidase by the yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7982, which is used for conversion of lactose into glucose and galactose. After the extraction step, the enzyme is intended for its application and the residual biomass with a high protein content should be used in cultivation of *Bacillus* sp. P45 to keratinase obtainment. The objective of this work was the production of enzyme keratinase from byproducts, purification and characterization, as well as its application in enzymatic milk clotting processes for the development of dairy products. This thesis was divided into four articles: on the first one, the keratinase purification was performed using systems of larger capacity and in addition, the enzyme was characterized in terms of optimum pH and temperature, kinetic parameters of denaturation and the influence of salts and organic solvents over the enzymatic activity. The use of systems with larger purification capacities allowed the obtainment of the purified enzyme in larger quantities without compromising purity and recovery. The optimum temperature and pH for enzyme activity observed was 55° C and 7.5, respectively. The enzyme showed a reduction of half-life ($t_{1/2}$) with increased along with the incubation temperature and constant thermal denaturation was inversely proportional to $t_{1/2}$. Furthermore, the salts CaCl_2 , CaO , and $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ and MgSO_4 led to higher enzyme activity. The second article presents the keratinase as an alternative coagulant bovine milk and its application in developing a cream cheese enriched with chia and quinoa. The clotting enzyme showed similar activity to the commercial coagulant at a concentration of 30 mg/mL, being capable of hydrolysing casein present in the milk. The new coagulant was used efficiently in the development of dairy product enriched with chia and quinoa, functional components. The third article presents the evaluation of technological, physical, chemical and microbiological characteristics of the cream cheese enriched with chia and quinoa, which presented high water retention rate and low syneresis values. The high fiber content suggests that the product can be consumed as a source of fibers with health benefits. Microbiological and technological analysis showed that the cheese is stable and innovative, meeting the market's expectations for this type of product. The fourth article brings the extraction of β -galactosidase by ultrasound and the use of yeast biomass waste, as well as the use of flour waste feathers as a substrate for obtaining proteases. The ultrasound was efficient for cell disruption and extraction β -galactosidase, with high activity (35.0 U/ml) and yield (876.0 U/g of biomass). The major proteolytic activity (1300 U/ml for 32 h) and keratinase (89.2 U/ml) were verified using flour biomass and waste feathers, respectively.

Keywords: purification, proteases, characterization, coagulation, cream cheese.

1 INTRODUÇÃO GERAL

As proteases constituem 60-65% do mercado global das enzimas industriais (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2014), sendo que a maioria delas são proteases alcalinas utilizadas na indústria de alimentos no processo de amaciamento de carne, na síntese de peptídeos, preparo de fórmulas infantis, panificação e cervejarias. Além disso, são utilizadas em produtos farmacêuticos, diagnósticos médicos, como aditivos na indústria de detergentes e na indústria têxtil no processo de depilação e transformação do couro (VERMA et al., 2011).

Estas enzimas podem ser obtidas a partir de animais, bactérias, fungos e plantas, no entanto, as de origem microbianas são as mais comuns (BEKA et al., 2014; DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011; LEITE-JÚNIOR; TRIBST; CRISTIANINI, 2014; MERHEB-DINI et al., 2010), destacando-se as proteases produzidas por micro-organismos do gênero *Bacillus*. Entre estas estão as produzidas pelo *Bacillus* sp. P45 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009), o qual foi isolado a partir do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*) da Bacia Amazônica, e que enquadra-se no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS (*Generally recognized as safe*). As proteases por ele produzidas, apresentam grande potencial para utilização na hidrólise de proteínas (SIRTORI et al., 2006) e para aplicação em processos bioindustriais.

As proteases microbianas são importantes porque são mais estáveis, quando comparadas com seus homólogos de origem vegetal e animal (RAO et al., 1998), e ativas em pH alcalino, na presença de tensoativos, íons metálicos, agentes oxidantes e solventes orgânicos e, em geral, apresentam certa estabilidade em temperaturas mais elevadas (JURADO et al., 2004; LI et al., 2011). As proteases específicas produzidas por micro-organismos queratinolíticos são chamadas de queratinases. Estas enzimas distinguem-se de outras proteases pela maior capacidade de degradação de substratos compactos e insolúveis como a queratina (ONIFADE et al., 1998).

Devido à demanda industrial por proteases, faz-se necessário a busca e caracterização de novas proteases, visando aplicação em processos biotecnológicos. Dependendo da espécie do micro-organismo produtor e dos protocolos de purificação empregados, as características destas enzimas podem ser diversificadas, tornando-se necessários estudos de caracterização de suas propriedades.

Do ponto de vista tecnológico, a protease produzida a partir do *Bacillus* sp. P45 destaca-se em relação à sua aplicação como agente coagulante alternativo de leite para

elaboração de produtos lácteos, devido à redução da oferta de coagulantes naturais de origem animal, seu alto custo, a restrição de consumo devido a razões religiosas, restrições alimentares e até mesmo a proibição, em alguns países, da produção de alimentos obtidos a partir de organismos geneticamente modificados. Estes fatores têm levado a uma crescente demanda por coagulantes substitutos, promovendo uma busca por novas fontes de proteases com propriedades coagulantes (JACOB; JAROS; ROHM, 2010; AHMED et al., 2012).

A coagulação do leite, na maioria dos processos de obtenção de queijos, é causada pela ação das proteases, onde a hidrólise específica da ligação peptídica fenilalanina₁₀₅ – metionina₁₀₆ na *k*-caseína que provoca a desestabilização da micela de caseína, levando a uma subsequente agregação, o que resulta na transformação do leite em coalhada (KUMAR et al., 2010), originando o queijo.

Adicionalmente, o crescente interesse no desenvolvimento de processos que apontem o uso total da matéria-prima e que não resultem em impactos negativos ao meio ambiente implicam no aproveitamento de coprodutos em processos biotecnológicos (SINGH; KAPOOR; KUMAR, 2012). Dentro desta temática destaca-se o aproveitamento da farinha de penas residual do cultivo do *Bacillus* sp. P45 para a produção de proteases. Além disso, durante a produção intracelular da enzima β -galactosidase, utilizada na hidrólise da lactose e para produção de galactooligosacarídeos (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985) é gerada biomassa residual da levedura *Kluyveromyces marxianus*, a qual apresenta elevado teor de proteínas, superior a 46,0%. Em substituição ao seu descarte, ela pode ser utilizada na produção de proteases, uma vez que as etapas de produção (MANERA et al., 2008), extração (LEMES et al., 2012; MEDEIROS et al., 2008), purificação (BRAGA; LEMES; KALIL, 2014; LEMES et al., 2014; MEDEIROS; BURKERT; KALIL, 2012), imobilização (BRAGA et al., 2014) e caracterização (BRAGA et al., 2013; HEIDTMANN et al., 2012) de β -galactosidase já foram extensamente investigadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações. Assim, a utilização deste coproduto na produção de proteases, especialmente queratinase, representaria uma alternativa para à gestão adequada deste coproduto resultante do processo biotecnológico de obtenção da enzima.

Em relação à protease com propriedades queratinolíticas obtida a partir do cultivo do *Bacillus* sp. P45, não há ainda a caracterização completa da enzima purificada a partir de sistemas de purificação que permita sua obtenção em maiores quantidades, nem estudos de aplicação como coagulante alternativo de leite bovino para o desenvolvimento de produtos lácteos enriquecidos nutricionalmente. Não há relatos sobre a utilização de biomassa residual de outro processo biotecnológico para produção de enzimas proteolíticas e queratinolíticas.

Os dados obtidos até o momento para o *Bacillus* sp. P45 e para a protease com propriedades queratinolíticas foram focados na purificação e caracterização parcial de um peptídeo antimicrobiano produzido durante o cultivo do *Bacillus* sp. P45 (SIRTORI et al., 2006), produção da enzima a partir de diferentes substratos proteicos (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009) e otimização da produção da enzima a partir do uso de farinha de penas como substrato (DAROIT et al., 2011). Além disso, foi realizada a caracterização da enzima obtida a partir de uma estratégia de purificação utilizando técnicas cromatográficas (DAROIT, 2011) e a estabilidade cinética em relação à temperatura e íons metálicos (DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011). Mais recentemente foi estudado a purificação da enzima por membranas filtrantes (SEVERO; OLIVEIRA; MACHADO, 2011) e o desenvolvimento de uma estratégia de purificação utilizando sistema aquoso bifásico e o processo de diafiltração (SALA et al., 2014).

Desta forma, considerando o exposto acima, esta tese realizou a caracterização parcial da enzima queratinase obtida a partir do cultivo do *Bacillus* sp. P45 em relação aos parâmetros de estabilidade térmica e a influência de componentes químicos na atividade enzimática. Foi também realizada a aplicação da enzima purificada em processos de coagulação do leite bovino para o desenvolvimento de um queijo cremoso enriquecido com chia e quinoa, assim como a avaliação das características tecnológicas, físico-químicas e sensoriais do produto desenvolvido. Além disso, foi investigada a reutilização da biomassa residual da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 gerada durante a extração da enzima β -galactosidase como substrato para produção de enzimas proteolíticas e queratinolíticas a partir do *Bacillus* sp. P45.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir, purificar e caracterizar a enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 e aplicar na produção de queijos cremosos enriquecidos com farinha de chia e quinoa.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir a enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 a partir da utilização de farinha de penas como substrato;
- Obter a enzima queratinase purificada por sistema aquoso bifásico em maiores quantidades;
- Caracterizar a enzima em relação aos parâmetros cinéticos e a influência de componentes químicos na atividade enzimática;
- Verificar a capacidade coagulante de proteases obtidas a partir do *Bacillus* sp. P45, assim como sua aplicação no desenvolvimento de queijos cremosos enriquecidos com farinha de chia e quinoa;
- Avaliar as características tecnológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa.
- Avaliar o potencial de um processo integrado de produção de enzimas de interesse industrial (β -galactosidase e proteases), visando aproveitamento integral dos resíduos gerados em diferentes processos biotecnológicos.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Enzimas

As enzimas constituem um grupo de macromoléculas necessário para inúmeros eventos biológicos. Além disso, são úteis em muitos processos industriais, sobretudo nas áreas de biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos. Compõem o principal alvo de pesquisas em biotecnologia, não apenas por seu papel em mecanismos celulares, mas por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais. Em outras palavras, a utilização de enzimas permite a redução de produtos químicos utilizados durante o processamento de alimentos e a minimização de resíduos, facilitando o desenvolvimento de processos que podem ser impraticáveis ou não rentáveis. Além disso, em alimentos, podem melhorar os aspectos nutricionais, funcionais e reológicos, além de prolongar a vida útil dos produtos (WHITEHURST; VANOORT, 2009).

Apesar do alto custo, em alguns casos, sua utilização em processos e vantagens em diversos campos faz com que uma variada gama de indústrias as utilizem (PZSCZOLA, 2001). Além disso, sistemas com catálise enzimática vem ganhando considerável atenção nos últimos anos como uma ferramenta eficiente para a preparação de produtos de química fina, produtos farmacêuticos, ingredientes alimentares, produtos derivados naturais, entre outros (FACUNDO et al., 2015; MIESZCZAKOWSKA-FRAC et al., 2012).

As reações realizadas a partir do uso de enzimas apresentam elevado grau de especificidade por seus substratos, o que evita reações paralelas indesejáveis, aceleram as reações químicas de maneira extraordinária, e as reações podem ser executadas em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pH, sendo que poucos catalisadores não-biológicos apresentam tais propriedades. Além disso, as reações enzimáticas podem ser também realizadas em sistemas alternativos, utilizando solventes orgânicos adequados (POSPISKOVA; SAFARIK, 2015).

Adicionalmente, como catalisadores, as enzimas atuam em pequenas quantidades e se recuperam indefinidamente, não levando a cabo reações que sejam desfavoráveis do ponto de vista energético e não provocam modificações do sentido dos equilíbrios químicos, porém aceleram sua realização (KIELING, 2002). Além das vantagens já mencionadas, as enzimas são biodegradáveis, o que as tornam ambientalmente inofensivas, possibilitando, assim, que as indústrias as utilizem em processos viáveis e menos poluentes, além de serem extremamente eficientes, uma vez que muito pouco é necessário para um grande resultado. As

enzimas podem substituir muitos produtos químicos nocivos ou até perigosos e permitem a produção segura e ambientalmente correta, decorrente de uma “tecnologia limpa” (FAÇANHA, 2012).

As enzimas podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam: oxidoredutases, as quais catalisam reações de óxido-reduções; transferases, que catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra; hidrolases, as quais catalisam reações de hidrólise; liases, que constituem o grupo das enzimas que catalisam reações de quebra de ligações; isomerases, onde ocorre a catálise de reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero; e as ligases, representadas pelas enzimas que catalisam ligações covalentes de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia (SANT’ANNA-JUNIOR, 2001).

As enzimas podem ser obtidas a partir de fontes animais (ROLET-REPECAUD et al., 2013; SHAMTSYAN et al., 2013; TRUJILLO et al., 2000) e vegetais (CORRONS et al., 2012; GALÁN; CABEZAS; FERNÁNDEZ-SALGUERO, 2012; MAZORRA-MANZANO et al., 2013b). Em contrapartida, ambas as fontes requerem processos de obtenção demorado, pois dependem da disponibilidade de área para cultivo e condições climáticas ou da disponibilidade de animais para o abate, o que pode afetar a produção e oferta (RAO et al., 1998).

A obtenção de enzimas a partir de micro-organismos representa uma fonte atraente com vantagens sobre as de origem animal ou vegetal, uma vez que podem ser cultivadas em grandes quantidades durante um período curto e com menor custo de produção, oferecendo um amplo espectro de características físico-químicas (HEADON; WALSH, 1994).

A pesquisa de enzimas e suas atuações, assim como os processos de obtenção, representam um interesse estratégico, pois garantem o suprimento das mesmas para os mais variados processos, tornando possível o desenvolvimento de processos viáveis.

A importância da utilização de enzimas e dos estudos de obtenção podem ser verificados pelo fato de que o valor estimado das vendas de enzimas industriais passou de 1 bilhão de dólares (RAO et al., 1998) para uma estimativa a qual poderá atingir por volta de 6,9 bilhões de dólares em 2017, com aumento anual de 6,4% (FREEDONIA-GROUP, 2014), sendo que as proteases de origem microbiana representam a maior parte deste mercado.

3.2 Enzimas de interesse industrial

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção e às vantagens já mencionadas. Além disso, está disponível

uma enorme diversidade de enzimas, com propriedades específicas que permitem sua aplicação de maneira eficiente em diversos processos industriais, entre as quais se destacam proteases e β -galactosidasas.

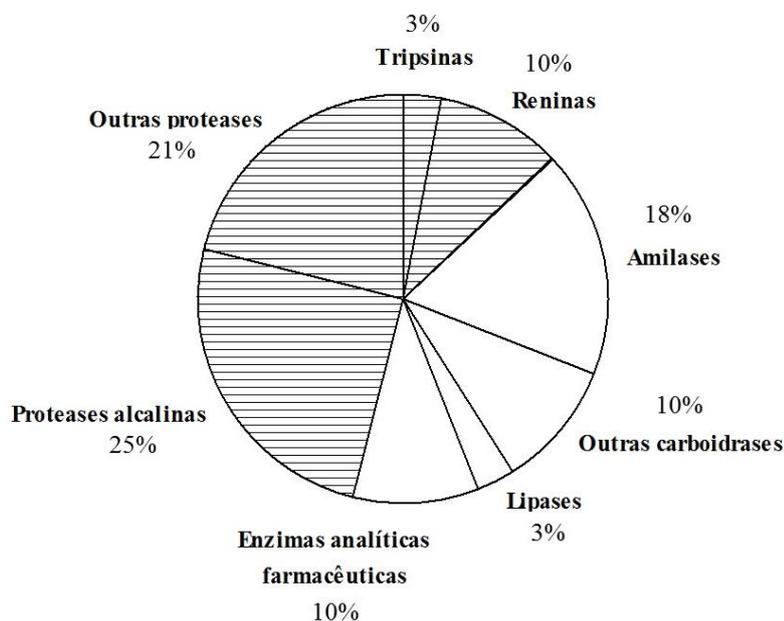
3.2.1 Proteases

As proteases (EC 3.4), também denominadas peptidases ou proteinases, são enzimas degradativas com a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas de proteínas, causando alterações irreversíveis ou destruição dos substratos, que do ponto de vista biológico podem ser importantes nos processos fisiológicos, patológicos e também tecnológicos (RAO et al., 1998; BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001).

As proteases constituem de 60 a 65% do mercado global das enzimas industriais (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2014), sendo que a maioria delas são as proteases alcalinas, utilizadas na indústria de alimentos no processo de amaciamento de carne, na síntese de peptídeos, preparo de fórmulas infantis, panificação e cervejarias. Além disso, são utilizadas em produtos farmacêuticos, diagnósticos médicos, como aditivos na indústria de detergentes e na indústria têxtil, no processo de depilação e transformação do couro (VERMA et al., 2011).

A importância das proteases no mercado global de enzimas pode ser visualizada na Figura 1, que apresenta a distribuição das vendas e a contribuição de diferentes enzimas na venda total de enzimas, principalmente em relação a proteases. Estas enzimas, assim como outras, são encontradas em diversas fontes, tais como plantas, animais e micro-organismos (bactérias, fungos) e até mesmo em insetos (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1997). No entanto, entre estas fontes, os micro-organismos apresentam um grande potencial para sua produção, devido à sua ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética. As características das proteases podem ser bastante diversificadas, diferindo em relação à sua massa molar, ponto isoelétrico, estabilidade térmica, valores de pH e temperatura ótimos, incluindo as propriedades de estabilidade e de atividade em diferentes aditivos, sais, metais e solventes (ERTAN et al., 2015). Além disso, tem-se estimado que as proteases de origem microbianas representam 40% do total de vendas mundial de enzimas (CASTRO et al., 2014).

Figura 1 - Distribuição das vendas e a contribuição de diferentes enzimas na venda total de enzimas, onde a parte destacada indica a venda total de proteases.



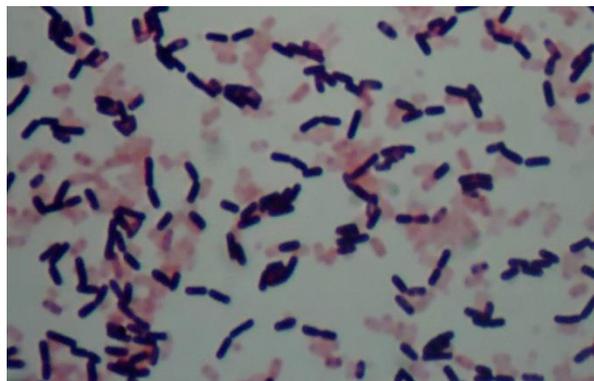
Fonte: RAO et al. (1998)

Além disso, as proteases microbianas são predominantemente extracelulares e podem ser separadas no meio de fermentação, diminuindo a necessidade de passos complexos para extração e recuperação da enzima (MUTHULAKSHMI et al., 2011).

É estimado que metade da produção comercial de proteases disponíveis são derivadas das cepas de *Bacillus* sp. (BEG; SAXENA; GUPTA, 2002; BEG; GUPTA, 2003). O gênero *Bacillus* é um dos maiores da microbiologia, com forma de bastonetes, gram-positivos, formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, sendo na sua maioria catalase positiva. Os micro-organismos pertencentes a este grupo possuem diversas características vantajosas para produção de proteases, tais como alta taxa de crescimento, menor tempo de cultivo e por serem reconhecidos como seguros (GRAS) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para algumas espécies como por exemplo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004).

Dentre as proteases de *Bacillus*, estão as enzimas com propriedades proteolíticas e queratinolíticas produzidas pelo micro-organismo *Bacillus* sp. P45 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009) (Figura 2), o qual foi isolado a partir do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*) da Bacia Amazônica, e que apresenta grande potencial na hidrólise de proteínas (SIRTORI et al., 2006) e para aplicação em processos bioindustriais.

Figura 2 – Visualização microscópica do micro-organismo *Bacillus* sp. P45.



Fonte: SALA (2013)

As proteases produzidas por micro-organismos queratinolíticos são chamadas de queratinases (EC 3.4.21-24/99) e distinguem-se das demais proteases por apresentarem maior capacidade de degradação de substratos compactos e insolúveis como a queratina. A maior parte das queratinases são enzimas indutivas, as quais exigem a presença de queratina como indutor exógeno (ONIFADE et al., 1998).

As queratinas são proteínas estruturais fibrosas e produzidas nas células epiteliais de vertebrados superiores e humanos, atuando como barreira mecânica e protetora, sendo o constituinte majoritário da pele, pelos, penas, unhas, cascos, chifres e escamas (FRASER; MACRAE; ROGERS, 1972; JONES et al., 1997). A queratina é resistente a fatores ambientais, físicos e químicos, não sendo degradadas de maneira efetiva por proteases comuns, como tripsina ou pepsina (BRANDELLI, 2008). Além disso são insolúveis em água, soluções salinas, ácidos diluídos e alcalinos a temperatura ambiente (SHIAH, 1979).

A resistência de degradação da queratina, frente a outras moléculas, é consequência do elevado nível de enovelamento da cadeia polipeptídica e do empacotamento da cadeia proteica em estruturas de α -hélice ou β -pregueada. Além disso, apresentam alto grau de ligações inter e intracadeia através da formação de ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (PARRY; NORTH, 1998).

Os dados obtidos até o momento em relação ao *Bacillus* sp. P45 e para a protease com propriedades queratinolíticas foram focados na purificação e caracterização parcial de um peptídeo antimicrobiano produzido durante o cultivo do *Bacillus* sp. P45 (SIRTORI et al., 2006), produção da enzima a partir de diferentes substratos proteicos (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009) e otimização da produção da enzima a partir do uso de farinha de penas

como substrato (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). Além disso, foi realizada a caracterização da enzima obtida a partir de uma estratégia de purificação utilizando técnicas cromatográficas e a estabilidade cinética em relação à temperatura e íons metálicos (DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011). Mais recentemente foi estudado a purificação da enzima por membranas filtrantes (SEVERO; OLIVEIRA; MACHADO, 2011) e o desenvolvimento de uma estratégia de purificação utilizando sistema aquoso bifásico e o processo de diafiltração (SALA et al., 2014).

Devido à crescente demanda por tais enzimas, tem-se aumentado o interesse em proteases com propriedades específicas, como atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, resistência a condições adversas, e também com propriedades que permitam sua aplicação no desenvolvimento de alimentos, como por exemplo sua aplicação em processos de coagulação de leite para produção de derivados lácteos.

3.2.1.1 Aplicação tecnológica das proteases na elaboração de queijos

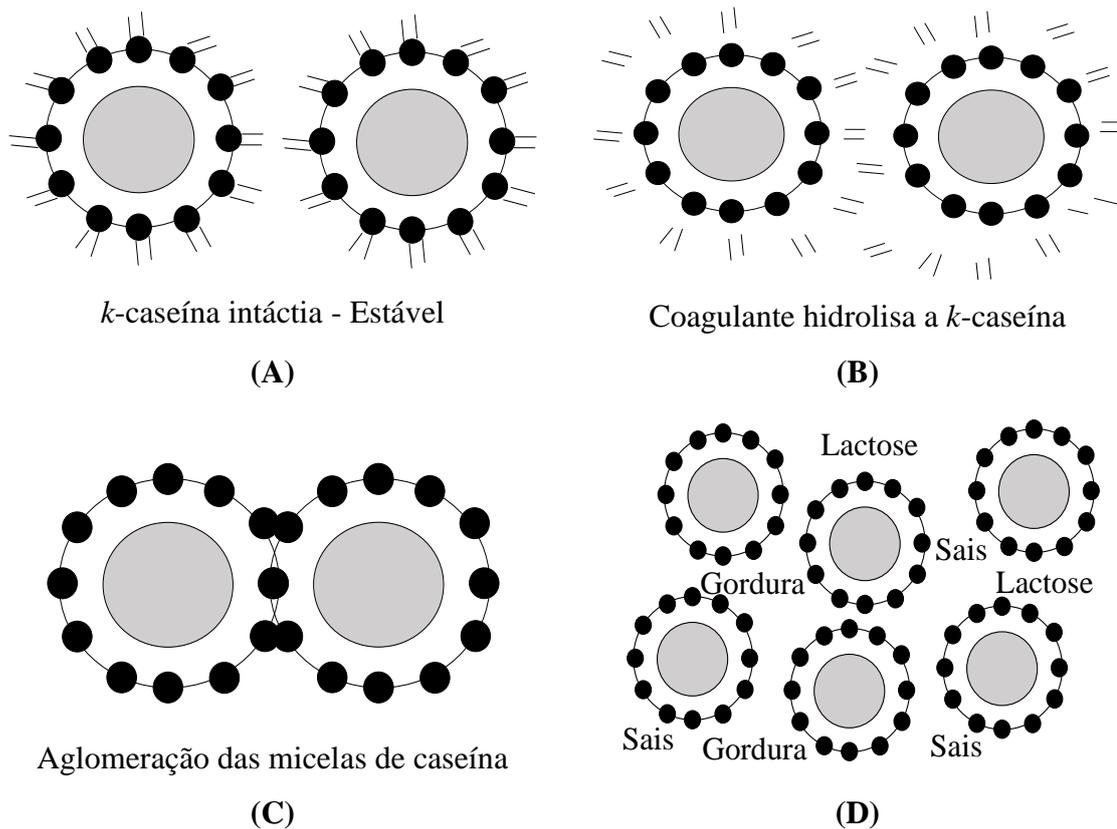
Além das aplicações possíveis citadas anteriormente, do ponto de vista tecnológico, levando-se em conta sua aplicação na indústria de alimentos, a protease produzida por *Bacillus* sp. P45 pode-se destacar em relação a diversos aspectos: **(i)** o aumento constante na produção de queijo no mundo nos últimos anos; **(ii)** a redução da oferta de coagulantes naturais de origem animal; **(iii)** seu alto custo; **(iv)** a restrição de consumo devido a razões religiosas; **(v)** restrições alimentares; e **(vi)** a proibição da produção de alimentos produzidos a partir de organismos geneticamente modificados. Estes fatores têm levado a uma crescente demanda por novos coagulantes substitutos, promovendo uma busca por novas proteases com propriedades coagulantes para a produção e desenvolvimento de produtos lácteos, como o queijo, por exemplo (AHMED et al., 2012; JACOB; JAROS; ROHM, 2010; MAZORRA-MANZANO et al., 2013a; ROSEIRO et al., 2003).

O queijo é um produto lácteo, que desempenha um papel fundamental na nutrição humana há séculos. Uma ampla gama de diferentes queijos é disponível, e suas características são baseadas nas condições da tecnologia de produção empregada e tem sido constantemente aprimorada. Em resumo, o principal objetivo na obtenção de qualquer tipo de queijo é converter o leite, que é perecível, em um produto com maior vida útil, preservando seus nutrientes e conferindo sabores característicos (HINRICHS, 2001).

A coagulação do leite, na maioria dos processos de obtenção de queijos, é causada pela ação das proteases sobre as proteínas do leite. A hidrólise específica da ligação peptídica fenilalanina₁₀₅–metionina₁₀₆ na *k*-caseína (Figura 3A) provoca a desestabilização da micela de

caseína (Figura 3B) e uma subsequente agregação (Figura 3C), resultando na transformação do leite em coalhada (KUMAR et al., 2010), onde todos os componentes são aprisionados em uma estrutura de gel (Figura 3D).

Figura 3 – Representação esquemática do processo de coagulação enzimática do leite para produção de queijo.



Segundo a Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (MAPA, 1996).

As proteases obtidas a partir de micro-organismos, principalmente as de *Bacillus* sp. P45, podem ser utilizadas na elaboração de produtos lácteos, como o queijo cremoso. O

queijo cremoso é um tipo de queijo untável que pode ser obtido através da coagulação do leite utilizando-se uma cultura *starter* contendo uma mistura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, além de um agente coagulante. A coalhada obtida é então homogeneizada e posteriormente acondicionada em embalagens apropriadas. Caracteriza-se por ter uma consistência fina, untuosa, macia e de sabor levemente ácido (ALBUQUERQUE, 2002; SAINANI; VYAS; TONG, 2004).

Diversos processos são empregados na fabricação, mas a versão tradicional preconiza as etapas de padronização quanto ao teor de gordura, pasteurização, homogeneização, inoculação e fermentação. Após a obtenção da coalhada, esta é novamente homogeneizada, resfriada e embalada (FURTADO; NETO, 1994).

Quando novos produtos lácteos são elaborados a partir de novas proteases, com comprovada propriedade coagulante, eles, necessariamente, devem ter suas propriedades tecnológicas e sensoriais determinadas, de modo a avaliar a viabilidade de aplicação da enzima e do seu processamento. É importante que se determine as propriedades reológicas, a textura do produto, pH, acidez, capacidade de retenção de água, sinérese e os atributos sensoriais, que indicam a aceitação do produto pelo consumidor (AICHINGER et al., 2003). Além disso, processos de acidificação e alterações de pH, provenientes da utilização de novos coagulantes, podem modificar as propriedades tecnológicas do leite coagulado, afetando os atributos de qualidade principais e, por isso, devem ser considerados nas etapas de implementação e desenvolvimento de novos produtos lácteos.

Adicionalmente, a elaboração de produtos lácteos enriquecidos com componentes que aportem benefícios à saúde humana, como as sementes de chia e quinoa, são alternativas interessantes, uma vez que tem aumentando o interesse e a busca da população por tais produtos.

A quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) é uma semente tradicionalmente cultivada na região dos Andes e utilizada como cereal no preparo de farinhas e rações animais (STIKIC et al., 2012). Destaca-se pelo seu alto teor de aminoácidos essenciais, proteínas, fibras e minerais (MADL; STERK; MITTELBAACH, 2006; NSIMBA; KIKUZAKI; KONISHI, 2008; ZHUN et al., 2002). Além disso, tem sido relacionada à quinoa uma alta atividade antioxidante, devido a presença de composto fenólicos, proteção contra oxidação lipídica e prevenção de processos inflamatórios, câncer e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (GAWLIK-DZIKI et al., 2013).

A chia (*Salvia hispanica L.*), por sua vez, apresenta alto teor de proteínas, fibras (CAPITANI et al., 2012; MARINELI et al., 2014) e a maior porcentagem conhecida do ácido

graxo α -Linolênico de qualquer fonte vegetal, chegando a 60% (AYERZA; COATES, 2011) o que a tem tornado nos últimos anos cada vez mais importante para a saúde humana e nutrição por causa de seu alto teor de ácido graxo α -linolênico, e os efeitos benéficos à saúde que podem surgir a partir de seu consumo (AYERZA; COATES, 2011).

Além disso, apresenta elevada atividade antioxidante, associada aos compostos polifenólicos e a presença de tocoferóis (CAPITANI et al., 2012). As sementes de chia são atualmente utilizados devido às propriedades nutricionais e medicinais, uma vez que foi demonstrado suas propriedades podem variar desde conferir resistência para atletas, utilização como supressor de apetite, agente de perda de peso, utilizada como mecanismo de controle da glicose no sangue e como forma de regulação intestinal. Além disso, a chia tem sido uma importante matéria-prima para produção de alimentos potencialmente funcionais, devido às suas características especiais, tais como o elevado teor de ácidos graxos e as vantagens em relação a outras fontes de ω -3 disponíveis. As sementes de chia têm sido utilizadas com sucesso para elevar o teor de ácidos graxos ω -3 em produtos de origem animal e também como um ingrediente para pães e outros produtos de panificação (BORNEO; AGUIRRE; LEÓN, 2010; PIZARRO et al., 2013).

São apontados compostos ativos secundários, incluindo terpenos e flavonoides, que possuem excelente atividade antimicrobiana, bem como a capacidade antioxidante, sendo usados contra uma série de doenças, tais como a aterosclerose, a disfunção cerebral e câncer (MARTÍNEZ-CRUZ; PAREDES-LÓPEZ, 2014).

Desta forma, de acordo com as propriedades descritas e comprovadas na literatura, tanto as sementes de chia como as sementes de quinoa podem ser utilizadas como ingredientes potencialmente funcionais para aplicação em alimentos (MARINELI et al., 2014).

3.2.2 β -galactosidase

A β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é uma enzima produzida por animais, vegetais e micro-organismos. É classificada como uma hidrolase, com capacidade transferase para grupos galactosil, atuando no resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar seus monossacarídeos glicose e galactose (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985). Em condições específicas, é empregada na produção de galactooligosacarídeos, componente funcional com efeitos benéficos ao organismo humano (HSU et al., 2007).

A enzima é utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia, na elaboração de produtos destinados as pessoas com intolerância à lactose, permitindo a utilização destes produtos pelos portadores desta comorbidade (BANSAL et al., 2008; CORTÉS et al., 2005). A intolerância à lactose é definida como uma síndrome clínica de desconforto intestinal, e ocorre devido aos baixos níveis ou ausência de atividade da enzima no aparelho digestivo, consequência de uma deficiência congênita da enzima ou de uma diminuição gradativa de sua atividade com o avanço da idade, causando sintomas como diarreia, gases, fortes dores abdominais e inchaços (SANTIAGO et al., 2004). Assim, a necessidade de baixo teor de lactose no leite é importante, pois evita a desidratação tecidual grave, diarreia e até mesmo a morte em crianças e adultos intolerantes (SCHAAFSMA, 2008; SWALLOW, 2003). Embora exista uma grande variação no número de pessoas intolerantes à lactose em diferentes países do mundo, uma média de 70% da população sofre com esse problema, o que torna a importância da enzima ainda maior (MARTINS; BURKERT, 2009).

A lactose tem baixa solubilidade resultante da formação de cristais em concentrações acima de 11%, o que impede a utilização de xaropes concentrados de soro de leite em muitos processos de alimentos. Além de seu uso justificado pela sua atividade hidrolítica, a atividade de transgalactolisação pode ser útil na síntese de glicoconjugados e galactooligosacarídeos para aplicação em alimentos e produtos farmacêuticos (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009).

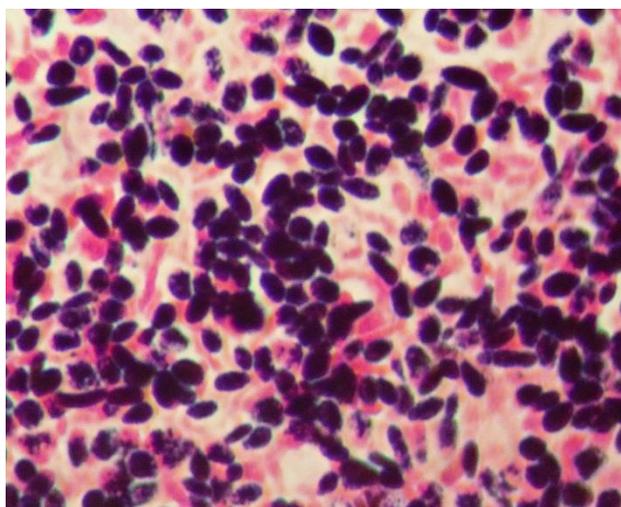
Vários micro-organismos são capazes de produzir a β -galactosidase, dentre eles as leveduras, como *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides*; fungos filamentosos, como *Talaromyces thermophilus*, *Penicillium multicolor* e bactérias, como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus pentosus* (RODRIGUEZ, 2006).

As principais β -galactosidasas comerciais são produzidas a partir de leveduras como *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus* e fungos filamentosos como *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, sendo o restante produzidos a partir da bactéria *Escherichia coli*, porém enzimas produzidas por leveduras são as mais utilizadas para o tratamento do leite e produtos lácteos (DAGBAGLI; GOKSUNGUR, 2008).

A enzima é sintetizada na presença do indutor lactose e a sua produção aumenta durante a fase de crescimento da levedura e alcança produção máxima no início da fase estacionária de crescimento, após a qual a quantidade de enzima diminui (INCHAURRONDO et al., 1998). A levedura *Kluyveromyces marxianus* (Figura 4) pode ser utilizada na produção

da enzima β -galactosidase, uma vez que é reconhecida e considerada como segura (GRAS), podendo ser utilizada na produção de alimentos e fármacos sem oferecer riscos.

Figura 4 – Visualização microscópica da levedura *K. marxianus* CCT 7082.



Fonte: LEMES (2011)

A utilização de *K. marxianus* tem diversas características que a tornam uma excelente opção para a produção industrial, como seu bom rendimento de crescimento em uma ampla faixa de temperatura. Adicionalmente, pode ser cultivada em altas temperaturas, reduzindo a necessidade de controles de contaminação no cultivo comercial (PECOTA et al., 2007). Além disso, a atividade de β -galactosidase de *K. marxianus* é mais alta quando comparadas a outras leveduras (MANERA, 2006). Cresce em uma ampla variedade de fontes de carbono de baixo custo e tem baixa necessidade de nutrientes adicionais, tornando-as economicamente atraentes para os processos comerciais (PECOTA et al., 2007).

Diversos trabalhos já foram realizados visando as etapas de produção (MANERA et al., 2008), extração (LEMES; ÁLVARES; KALIL, 2012; MEDEIROS et al., 2008), purificação (BRAGA; LEMES; KALIL, 2014; LEMES et al., 2014; MEDEIROS; BURKERT; KALIL, 2012), imobilização (BRAGA et al., 2014) e caracterização (BRAGA et al., 2013; HEIDTMANN et al., 2012) da enzima β -galactosidase. No entanto, como a obtenção da enzima ocorre intracelularmente, é necessária uma etapa de extração, a qual resulta na geração de quantidades significativas de biomassa residual com elevado teor de proteínas. Ao invés de ser descartada, a biomassa pode ser utilizada como ração animal, na produção de biocombustíveis (ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014), como ingrediente

alimentar (RAMOS et al., 2011) ou ainda empregada em processos biotecnológicos como substrato para micro-organismos (FERREIRA et al., 2010), como por exemplo para obtenção de proteases, representando uma alternativa à gestão adequada de coprodutos resultantes de processos biotecnológicos de obtenção de enzimas.

3.3 Coprodutos para produção de enzimas de interesse industrial

O crescente interesse no desenvolvimento de processos que apontem o uso total da matéria-prima e que não resultem em impactos negativos ao meio ambiente (processos verdes) implica no aproveitamento de coprodutos em processos biotecnológicos (SINGH; KAPOOR; KUMAR, 2012). Isto se deve ao avanço no desempenho do agronegócio, que levou ao aumento do consumo de insumos e na geração de coprodutos em grandes quantidades (NONHEBEL, 2007), os quais, quando não utilizados, resultam em uma elevação dos custos de eliminação para evitar a poluição ambiental (FEDERICI et al., 2009).

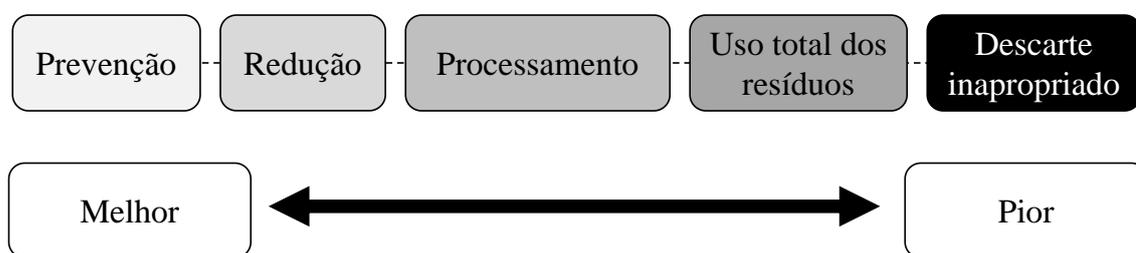
Além de problemas ambientais, os coprodutos gerados podem representar perda de matéria-prima e de energia, exigindo investimentos em tecnologias para seu reaproveitamento (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007), uma vez que podem conter diversas substâncias de alto valor. Assim, se a tecnologia adequada for empregada, o material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003).

Estima-se que 30-40% dos custos envolvidos na produção de enzimas, proteases por exemplo, estejam relacionados ao meio de cultivo utilizado para o crescimento do micro-organismo. Portanto, a utilização de coprodutos como substratos é de grande importância para a redução dos custos de produção de enzimas de interesse industrial (JOO; CHANG, 2005).

Vários resíduos agroindustriais têm sido utilizados como substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representar uma fonte de nutrientes alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção de enzimas com baixo custo (BRAGA; GOMES; KALIL, 2012; MANERA et al., 2011), bem como para a preservação do meio ambiente (KUMAR; TAKAGI, 1999).

A tendência atual, mais forte neste momento da história do que em qualquer outro, é a de empregar processos de produção que não agridam o meio ambiente ou que reduzam o lançamento de resíduos gerados, considerando que os melhores processos são aqueles em que não há a geração de resíduos e os piores processos quando os resíduos gerados são descartados de maneira inadequada (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática de processos ideais. (Melhor: prevenção da geração de resíduos; Pior: descarte inadequado).



Fonte: PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007; TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000.

Os coprodutos gerados, como a farinha de penas e biomassa residual de leveduras, por exemplo, são substratos alternativos para a obtenção de enzimas, uma vez que apresentam em suas composições diferentes constituintes, porém como similaridades, possuem alta concentração de proteínas.

Grande quantidade de penas é gerada diariamente, uma vez que cerca de 7% do peso de abate corresponde às penas, o que proporciona uma grande disponibilidade deste coproduto. As penas são comumente empregadas na elaboração de ração animal como fonte alternativa de proteína. No entanto, além deste destino, a utilização como substrato pode contribuir para reduzir os custos de eliminação deste resíduo e aumentar seu valor agregado, evitando também a poluição ambiental, que poderia ser causada caso esses resíduos fossem jogados no meio ambiente. A farinha de penas contém cerca de 80,0% de proteína, deste total cerca de 85% a 90% é a queratina, uma proteína que em virtude da sua estrutura e da grande quantidade de aminoácidos sulfurosos, possui baixa solubilidade e alta resistência à ação de enzimas (PATENSE, 2012; SCAPIM et al., 2003). A baixa digestibilidade e insolubilidade da farinha de penas têm sido ainda atribuídas às pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas dentro da molécula de queratina e pontes de enxofre presentes na cistina, que contribuem para manter a maior estabilidade da proteína, quando atacada por enzimas (ROCHA; SILVA, 2004). Assim, a farinha de penas utilizada na alimentação animal, deverá passar por um processamento em que as penas são hidrolisadas para tornar os seus nutrientes mais disponíveis.

A biomassa residual de leveduras, por sua vez, apresenta teor de proteínas superior a 46% e pode ser utilizada como ração animal, na produção de biocombustíveis (ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014), como ingrediente alimentar (RAMOS et al., 2011) ou ainda

empregada em processos biotecnológicos como substrato para micro-organismos (FERREIRA et al., 2010), como por exemplo para obtenção de proteases. Tal fato deve-se à sua composição que apresenta elevado teor de proteínas, vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), minerais, macro e microelementos, particularmente selênio e fibras dietéticas, representados por carboidratos da parede celular, principalmente mananas e glicanas (HALASZ; LÁSZTITY, 1991), e ainda, quantidades apreciáveis de fósforo, potássio, cálcio, magnésio e sódio (BORCHANI et al., 2014; ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014), sendo o magnésio, principalmente, apontado como estimulador da produção de proteases (DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011). Desta forma, a biomassa residual de leveduras pode ser utilizada para manutenção do metabolismo de micro-organismos durante o seu desenvolvimento, influenciando no aumento da produção enzimática. Além disso, é relatado que a biomassa de levedura apresenta alta digestibilidade o que facilitaria o processo de proteólise por enzimas produzidas durante o cultivo (YAMADA et al., 2003), estimulando a produção de proteases específicas.

As características destes coprodutos, farinha de penas e biomassa, os tornam atrativos e abrem oportunidades de agregação de valor pela transformação, utilização e obtenção de novos componentes, como por exemplo, a produção de enzimas, tanto intracelulares, como extracelulares.

3.4 Recuperação e purificação de bioprodutos

3.4.1 Ruptura celular e extração de bioprodutos intracelulares

A produção de enzimas pode ocorrer tanto intra como extracelularmente. No entanto, quando a produção ocorre dentro da célula, é necessária uma etapa de ruptura das células para sua liberação (NEVES, 2003). Os critérios utilizados para a seleção da técnica de ruptura celular devem considerar fatores como o tamanho da célula, tolerância a tensões de cisalhamento, necessidade de controle de temperatura, tempo de operação, rendimento do processo, gasto de energia, custo e investimento de capital (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005).

Diferentes métodos podem ser empregados para a extração de proteínas intracelulares, os quais dependem da força física da parede celular dos micro-organismos, localização dentro da célula, estabilidade, e do uso desejado do composto de interesse (FARKADE; HARRISON; PANDIT, 2005).

Não existe um método único ou um conjunto de métodos aplicáveis ao isolamento de todas as proteínas indistintamente, porém, para qualquer proteína, é possível escolher uma sequência de etapas de separação que, dependendo da pureza desejada, podem resultar em

aumento do custo e redução da produção (LIMA et al., 2002). Técnicas baseadas no uso de pressão osmótica, condições abrasivas, tratamento químico, tratamento enzimático, secagem, congelamento-descongelamento e tratamento ultrassônico, podem ser utilizadas para ruptura celular (MORAES et al., 2011).

Os métodos disponíveis para o rompimento celular podem ser classificados, de um modo geral, em mecânicos e não mecânicos; constantemente uma combinação de ambos pode ser realizada para aumentar a eficiência da ruptura celular. Os métodos mecânicos incluem moinhos de bola, homogeneizadores de alta pressão e a cavitação. A cavitação pode ser gerada através de sonicação, homogeneizadores ultrassônicos e reatores de cavitação hidrodinâmica. Os métodos não-mecânicos incluem tratamentos químicos, enzimáticos, calor, soluções alcalinas, choque osmótico e ciclos de congelamento/descongelamento (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009).

Embora diversas técnicas estejam disponíveis para a extração de produtos intracelulares, os métodos mecânicos têm encontrado maior aplicação comercial em comparação com os métodos não mecânicos, pois os últimos possuem limitações operacionais e econômicas quando aplicados em larga escala. Os moinhos de bolas e homogeneizadores de alta pressão tendem a ser utilizados em larga escala para ruptura de células microbianas, ao passo que outros métodos mecânicos e não mecânicos são predominantemente utilizados na escala laboratorial (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009).

Quando a recuperação do bioproduto de interesse durante os passos iniciais é levada em consideração, a economia do processo pode ser melhorada. No caso de produtos intracelulares, isto pode ser conseguido através da liberação do produto seletivamente durante a primeira operação de recuperação (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009).

Tanto o método de ruptura mecânico com esferas de vidro, como o rompimento por ultrassom, são métodos eficientes que são utilizados em processos de *downstream*. O rompimento manual com pérolas de vidro é um método que não necessita de grande aparato operacional, utiliza pérolas de vidro e o procedimento consiste na adição das mesmas em um tubo contendo suspensão celular. O tubo é agitado vigorosamente por um tempo determinado, obtendo-se a enzima extraída pela força do atrito devido à moagem com pequenas esferas como abrasivos (GURPILHARES; PESSOA-JR; ROBERTO, 2003; MEDEIROS et al., 2008). Já no método ultrassônico, ondas são dissipadas no meio líquido através de bolhas de cavitação, as quais formam uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e

consequente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de força capaz de romper as células (BOSSIO; HARRY; KINNEY, 2008), liberando a enzima do seu interior.

O rompimento ultrassônico tem sido aplicado em diversos processos de separação, seja como uma etapa de pré-tratamento ou como processo integral, e como método para acompanhamento de cultivos microbianos (BOSSIO; HARRY; KINNEY, 2008). Além disso, o uso de reatores de cavitação hidrodinâmica para rompimento celular tem sido aprovado e empregado de forma eficiente em larga escala, uma vez que tem demonstrado maior eficiência em comparação com técnicas convencionais baseadas na utilização da energia mecânica (GOGATE; KABADI, 2009), facilidade de operação, pouca necessidade de manutenção e pela possibilidade de ser empregado em processos executados por longos tempos sem a necessidade de qualquer cuidado devido a sua automação (HU; ZHENG; QIU, 2006).

Após a aplicação dos métodos de extração disponíveis, a enzima de interesse deve ser separada do meio aquoso, para tal diversas técnicas de extração, recuperação e purificação podem ser empregadas.

3.4.2 Purificação de bioprodutos

A necessidade de isolamento e recuperação de enzimas em maiores escalas têm trazido inovações importantes nas operações necessárias para sua purificação e aumentado o interesse pelos processos de purificação, devido a demanda por produtos com alto grau de pureza. Dado as variadas características das biomoléculas, não existe um processo de purificação de aplicação geral. Estes devem ser selecionados de modo a promoverem melhor fator de purificação do bioproduto de interesse (LEMES et al., 2014).

Cada enzima possui uma combinação única de propriedades que são exploradas pelas técnicas de purificação. Estas devem ser avaliadas em relação à sua capacidade, poder de resolução, seletividade, rendimento e custos. A capacidade da técnica está relacionada com a quantidade de amostra, em volume ou em concentração de proteína que pode ser manuseada. Um requisito chave no início do processo de purificação é o da redução de volume onde se encontra a proteína que se deseja purificar (BELTER et al., 1988).

Uma medida da complexidade do processo de purificação é o custo, o qual pode ficar em torno de 70-80% do custo final do produto, e a dificuldade do processo, pois as moléculas de proteínas, além de serem diluídas em uma mistura complexa, são instáveis e

sujeitas à desnaturação por aquecimento, solventes e até mesmo na ruptura (ABRANCHES et al., 2005; PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005).

A diversidade de técnicas de purificação possibilita um grande espectro de métodos de separação de bioprodutos que podem ser empregados para que se atinja um produto de acordo com os requeridos graus de concentração e pureza, assim a escolha e sequência das técnicas a serem utilizadas são importantes a fim de minimizar as perdas e aumentar o rendimento nas operações de separações.

Os métodos de separação de proteínas baseiam-se nas diferenças das propriedades físicas, químicas e funcionais. As principais propriedades exploradas são cargas, tamanho, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, forma e função (BELTER et al., 1988), sendo o maior objetivo das técnicas de recuperação e purificação o desenvolvimento de operações unitárias que combinem alta eficiência e ao mesmo tempo reduzido número de etapas para concentrar e purificar a molécula alvo.

Desta forma, deve-se buscar técnicas apropriadas para cada etapa do processo de separação, empregando diferentes métodos para remoção de compostos, isolamento do produto, purificação e polimento do material biológico. O esquema ideal de purificação vai depender não só das características da proteína de interesse, mas também das características dos contaminantes presentes no extrato bruto (LEMES et al., 2014). Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de enzimas, tais como a precipitação, extração com solventes e filtração, geralmente com alto poder de concentração e baixa purificação; e técnicas como a cromatografia de afinidade, troca iônica, gel-filtração, eletroforese, sistema aquoso bifásico, extração com micela reversa, as quais recuperam e purificam, com alto grau de seletividade (CESAR, 2005).

Técnicas como o sistema aquoso bifásico e a ultrafiltração destacam-se por terem sido empregadas de forma bastante eficientes em processos de recuperação e purificação de enzimas sem comprometer as propriedades específicas das proteínas (LEMES et al., 2014; SALA et al., 2014).

3.4.3 Técnicas de purificação de bioprodutos

3.4.3.1 Sistema aquoso bifásico

O sistema aquoso bifásico (SAB) tem sido utilizado com sucesso na extração de biopartículas, principalmente proteínas e enzimas (SILVA et al., 2006). O SAB é uma técnica de purificação constituída de duas fases aquosas imiscíveis, onde as proteínas são purificadas

pelo resultado da partição diferenciada da molécula-alvo e das impurezas presentes em cada uma das fases líquidas. É composto majoritariamente por água, 75 a 80%, o que simula o ambiente natural dos materiais biológicos, impedindo, assim, que suas propriedades sejam alteradas no processo de transferência entre as fases, o que garante a manutenção das propriedades biológicas das moléculas evitando desnaturações (CARDOSO, 2007).

Seus demais componentes formadores, polímeros e sais inorgânicos, não são tóxicos nem inflamáveis, o que os torna um sistema de extração seguro, comercialmente acessível e de baixo custo (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005; SILVA et al., 2006). Além disso, têm sido sugerido e aplicado em substituição às técnicas de separação e concentração convencional de células, uma vez que pode integrar estas duas etapas em apenas uma (CHOUYYOK et al., 2005).

Quando pares de polímeros quimicamente diferentes e hidrossolúveis ou um polímero hidrossolúvel e um sal inorgânico são misturados em água acima de concentrações críticas e em determinadas condições termodinâmicas forma-se o SAB, isto, em uma faixa específica de temperatura, pressão e composição dos constituintes. Cada SAB pode ser caracterizado por um único diagrama de fases, que contém a composição das fases em equilíbrio para o sistema. Os dados fundamentais para qualquer tipo de processo de extração líquido-líquido são as composições de equilíbrio de fases. No caso do SAB, um diagrama de fases é necessário para auxiliar o desenvolvimento de modelos termodinâmicos para sua predição (SILVA; LOH, 2006). Pode ser influenciado por fatores como a massa molar e carga do polímero, temperatura, pH, hidrofobicidade, tamanho, adição de sais ou ligantes ao sistema (CAMPESE; TAMBOURGI, 2003).

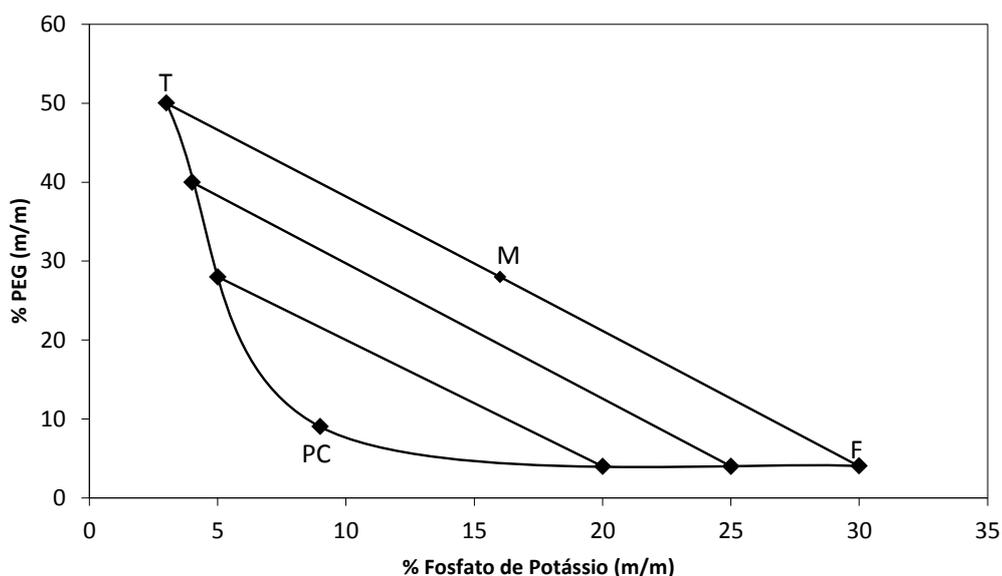
O diagrama de fases (Figura 6) demonstra a concentração de sal e a concentração do polímero presente no sistema em composições globais diferentes, sendo essas duas regiões separadas por uma linha binodal, a qual varia de acordo com o tipo e a massa molar do polímero, a natureza química do sal, a temperatura e o pH do meio (SILVA; LOH, 2006). A curva binodal é formada por pontos cujas coordenadas são as mínimas concentrações de sal e de polímero nas quais o sistema apresenta-se como duas fases em equilíbrio termodinâmico. Abaixo da linha binodal tem-se a região formada por pontos representando concentrações que formam um sistema monofásico, e acima, a região formada por pontos que formam duas fases. Estas concentrações podem ser expressas em qualquer unidade, porém, geralmente elas são expressas em porcentagem mássica (CARDOSO, 2007).

A Figura 6 apresenta um diagrama de fases genérico, onde a abscissa representa a concentração de sal e a ordenada, a concentração do polímero presente no sistema, e informa

em quais composições o sistema é homogêneo ou heterogêneo. O diagrama é designado pela curva binodal (T-PC-F), a qual separa a área de formação de duas fases aquosas (acima da curva binodal) da área de uma fase aquosa (abaixo da curva binodal). A posição da binodal varia de acordo com o tipo e a massa molar do polímero, a natureza química do sal, a temperatura e o pH do meio. Existem diferentes métodos para obtenção da linha binodal, sendo geralmente utilizado o de titulação turbidimétrica (ALBERTSSON, 1986).

Além dessas informações, o diagrama de fases fornece a composição exata da fase de topo e de fundo, sendo que esta informação está na linha de amarração (linha T-M-F). O ponto M indica a composição global do sistema, enquanto que os pontos T e F fornecem as composições exatas das fases de topo e fundo, respectivamente. Todas as misturas com composições globais pertencentes a uma mesma linha de amarração fornecerão fases superiores com composições idênticas, porém com volumes diferentes. O mesmo princípio aplica-se às fases inferiores. O ponto PC no diagrama de fases representa o ponto crítico, onde a composição e o volume das duas fases teoricamente são iguais (ALBERTSSON, TJERNELD, 1994).

Figura 6 – Diagrama de fases genérico de um sistema aquoso bifásico formado por um polímero e um sal, onde PC é o ponto crítico, M indica a composição global do sistema, T indica a composição da fase de topo e F indica a composição da fase de fundo.



Fonte: SINHA et al. (2000)

Uma das características atrativas da extração por SAB é a facilidade de aumento de escala. Isto deve-se ao fato que o coeficiente de partição para substâncias solúveis em muitos casos é independente do volume total das fases do sistema, da razão de volume e da concentração da substância a ser particionada para uma larga faixa de concentração. O comportamento da partição em larga escala para o SAB pode ser pré-definido com grande exatidão a partir de experimentos laboratoriais em pequenos tubos testes. Desta forma, a mistura e o rápido equilíbrio de fases são alcançados, requerendo pouca energia (ALBERTSSON, 1986).

Além disso, a utilização do polietilenoglicol (PEG) nestes sistemas torna-se vantajosa devido às propriedades físico-químicas favoráveis e seu baixo custo, que parece ter melhorado as possibilidades de emprego do SAB em maiores escalas. Esta substância ganha destaque pelo fato de ser atóxica e ter sido aceita para aplicações em alimentos e produtos farmacêuticos (TANUJA et al., 2000).

3.4.3.2 Ultrafiltração/Diafiltração

A ultrafiltração é uma técnica de fracionamento baseada na diferença de tamanho das macromoléculas, com potencial para aplicação em larga escala, tanto para a purificação, como para o polimento de produtos biológicos, tais como enzimas, drogas terapêuticas e anticorpos (GHOSH; CUI, 1998).

A maior vantagem dos processos de biosseparação por ultrafiltração sobre os processos convencionais é o alto rendimento do produto. Existem diversos fatores envolvidos no processo de separação e fracionamento de proteínas por ultrafiltração: interação soluto-soluto, interação soluto-membrana, polarização, modo de transporte do soluto, entre outros vários fatores que podem ser responsáveis pelo fracionamento de proteína (ZUÑIGA et al., 2003).

O processo de ultrafiltração pode ser ajustado para atingir alta produtividade e pureza do produto ao mesmo tempo. O produto fica livre de partículas estranhas se a operação for realizada sob condições estéreis (GHOSH; CUI, 2000).

Separações com membranas não requerem aditivos ou mudanças de fases e podem ser realizadas isotermicamente em baixas temperaturas e pressões, com menor consumo de energia. Asseguram o mínimo de desnaturação, desativação e/ou degradação dos bioprodutos que são instáveis. Além disso, é menos dispendioso do que outros métodos de separação e purificação (CUI, 2005; SAXENA et al., 2009).

O fracionamento de proteína utilizando ultrafiltração pode ser afetado pelas taxas de cisalhamento na superfície da membrana, a pressão, resistência da membrana, porosidade, morfologia e carga de superfície. Neste processo, a obtenção de boa resolução e alta produtividade é dependente das condições de operação (GHOSH; CUI, 2000) e da diferença de tamanho e carga entre as proteínas presentes.

A ultrafiltração, pode ainda ser operada em modo diafiltração, um modo alternativo e conhecido como uma técnica de purificação efetiva e rápida, comumente utilizada para purificar proteínas de origem vegetal (ASPELUND; GLATZ, 2010), animal ou humana (BELHOCINE et al., 1998). Além disso, é utilizada para concentrar enzimas e remover peptídeos, oligossacarídeos, sais e outras impurezas (VEIDE; LINDBACK; ENFORS, 1989). A diafiltração pode ser considerada como um processo de purificação a volume constante, onde se utiliza a manutenção do fluxo do permeado para melhorar a eficiência de extração através do uso de tampão ou água, ocorrendo a remoção dos microssolutos na fração permeada (NG; LUNDBLAD; GAUTAM, 1976). A diluição do extrato na alimentação promove a redução na concentração dos componentes permeáveis, facilitando a remoção através da membrana.

A diafiltração pode ser operada no modo contínuo, onde o diluente é adicionado ao retido na mesma vazão do permeado; ou no modo descontínuo, onde o diluente é adicionado em etapas à célula em vazões iguais ao permeado (FOLEY, 2006). Além disso, pode ser empregada para melhorar o rendimento do produto (YAZDANSHENASA et al., 2005) e quando se deseja eliminar componentes de menor tamanho ou de menor massa molar de uma dada mistura.

A utilização de sistemas de purificação que permitam a obtenção de enzimas em maiores capacidades e que possam ser empregados para melhorar o processo de purificação, sem comprometer o rendimento e pureza, devem ser considerados. Além disso, os protocolos de purificação utilizados podem alterar as características das enzimas, tornando-se necessário estudos de determinação das propriedades das enzimas obtidas.

3.5 Caracterização de enzimas

Devido à demanda industrial por proteases, faz-se necessário sua caracterização, visando a sua aplicação em processos biotecnológicos. Dependendo da espécie do micro-organismo produtor e dos protocolos de purificação empregados, as características destas enzimas podem ser diversificadas, fazendo-se necessário estudos de caracterização de suas

propriedades, como forma de viabilizar sua utilização em processos biotecnológicos inovadores (BRAGA et al., 2013).

O estudo das propriedades das proteases, tais como a especificidade do substrato, as condições ótimas de pH catalíticos, os perfis de temperatura e de estabilidade, e a cinética e as características termodinâmicas podem ser utilizadas para prever a aplicação bem sucedida da enzima (CASTRO; SATO, 2013; CHANG et al., 2013).

O estudo de desnaturação térmica, por exemplo, ajuda a entender a relação entre a estrutura e a função de uma enzima em particular. As enzimas são desnaturadas de diversas maneiras para um estado inativado, sendo esta a principal restrição em diversos bioprocessos. A desnaturação é definida como um processo onde as estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas mudam sem a quebra de ligações covalentes (NAIDU; PANDA, 2003). Além disso, a partir dos dados de estabilidade das enzimas pode-se obter informações da estrutura da enzima e ajudar a aperfeiçoar a viabilidade econômica de processos industriais, uma vez que a estabilidade das enzimas é função de fatores como temperatura, pH, força iônica, natureza, presença ou ausência de substrato, concentração da enzima e tempo de incubação (JURADO et al., 2004; YU; LI, 2006).

Os mecanismos de desativação podem ser complexos, uma vez que as enzimas têm estruturas definidas, e um desvio da sua forma nativa pode afetar sua atividade específica. Os sítios ativos das enzimas são compostos de grupos ionizáveis que devem estar na forma iônica própria para manter a conformação do sítio ativo, do contrário a enzima é desnaturada. Considerando que enzimas são proteínas, elas tendem a perder atividade com o tempo, sendo que essa perda é maior com o aumento da temperatura. Assim, um melhor conhecimento da estabilidade da enzima nas condições operacionais pode ajudar a otimizar a rentabilidade de processos enzimáticos (JURADO et al., 2004; NAIDU; PANDA, 2003).

Desta forma, é importante avaliar a cinética e termodinâmica das enzimas, através da determinação de parâmetro como meia-vida ($t_{1/2}$), constante de desnaturação térmica (K_d), energia de desativação (E_d), dentre outros.

A meia vida da enzima é definida como sendo o tempo necessário para perder 50% de sua atividade inicial (Equação 1). Já o valor para a constante cinética de desnaturação térmica (K_d) para cada temperatura é importante para avaliação das propriedades das enzimas. O K_d é inversamente proporcional à estabilidade da enzima, ou seja, quanto menor o valor de K_d maior será a estabilidade enzimática. Este parâmetro pode ser determinado a partir de um gráfico de logaritmo semi-natural da atividade *versus* tempo. Como K_d é função da temperatura segundo a equação de Arrhenius, pode-se determinar a energia de ativação para

reação de desnaturação (E_d), que representa a barreira de energia a ser transposta para a inativação da enzima. Quanto maiores os valores de E_d , maior é a energia necessária para a inativação da enzima, indicando uma maior estabilidade (Equação 2) (CASTRO et al., 2014; DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011; LAVORENTI et al., 2003; SINHA; KHARE 2013; YADAV; PATEL; JAGANNADHAM, 2012).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (1)$$

$$\ln K_d = \ln A - \frac{E_d}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (2)$$

Além disso, quando se trabalha com enzimas utilizadas na indústria alimentícia, é comum expressar sua inativação utilizando os parâmetros D e z . O valor D ou valor de redução decimal (em minutos) é definido como o tempo que a enzima deve ser incubada em uma dada temperatura para que se mantenha 10% de atividade residual (Equação 3). O cálculo de z (Equação 4) é a determinação do intervalo de temperatura requerido para que a curva de desnaturação térmica atravesse um ciclo logarítmico (KLIBANOV, 1983).

$$D = \frac{2,3026}{K_d} \quad (3)$$

$$\log \frac{D_2}{D_1} = \frac{T_1 - T_2}{z} \quad (4)$$

Os dados apresentados na literatura demonstram diferentes características para as enzimas de diversas fontes, demonstrando a importância de se estabelecer as propriedades cinéticas da enzima de interesse, uma vez que podem variar bastante. Além disso, as informações obtidas através do estudo cinético de desativação de enzimas podem ajudar na determinação das condições as quais as mesmas podem ser submetidas sem causar a perda de eficiência, sem comprometer a viabilidade dos processos enzimáticos. É de extrema importância, portanto, a investigação desses parâmetros para determinar as melhores condições visando a aplicação industrial de proteases.

3.6 Considerações finais

A busca por novas fontes de proteases com propriedades coagulantes vem crescendo de maneira significativa, requerendo cada vez mais estudos a respeito da sua obtenção, purificação em sistemas que permitam sua produção em grandes quantidades, caracterização e principalmente sua aplicação em processos viáveis.

Dentro do exposto na revisão bibliográfica, observa-se que é crescente o interesse no desenvolvimento de processos de produção de enzimas que utilizem coprodutos agroindustriais, reduzindo impactos ambientais e custos de produção de enzimas.

Assim, esta tese vem a contribuir no avanço do desenvolvimento de um processo de purificação de proteases que permita sua obtenção em maiores quantidades, bem como sua caracterização, de modo a viabilizar sua aplicação em processos de coagulação enzimática de leite, permitindo sua aplicação na elaboração de produtos lácteos enriquecidos com componentes potencialmente funcionais. Além disso, o estudo de aplicação da enzima é interessante, visto que a maior parte dos dados na literatura referem-se apenas às etapas de produção e de verificação de propriedades específicas das enzimas, não progredindo com a sua aplicação de fato em processos industriais.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

**ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE QUERATINASE DE *Bacillus* sp. P45
PURIFICADA**

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE QUERATINASE DE *Bacillus* sp. P45 PURIFICADA

RESUMO

As propriedades das enzimas de interesse para aplicação industrial podem ser bastante diversificadas dependendo da espécie do micro-organismo produtor e dos protocolos de purificação empregados, sendo necessária uma caracterização para garantir a viabilidade da sua aplicação. O objetivo deste trabalho foi purificar a enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 em sistemas que permitissem sua obtenção em maiores quantidades, determinar os parâmetros de estabilidade térmica e a influência de componentes químicos na atividade enzimática de forma a viabilizar sua aplicação em processos biotecnológicos. A utilização de sistemas com maiores capacidades permitiu a obtenção da enzima purificada em maiores quantidades. Nestes sistemas o fator de purificação obtido através da estratégia de purificação adotada, foi de até 2,6 vezes no primeiro sistema aquoso bifásico (SAB), 6,7 vezes no segundo SAB e de 4,0 vezes na etapa de diafiltração. A recuperação enzimática alcançou valores de até 75,3% no primeiro SAB, 75,1% no segundo sistema e 84,3% na etapa de diafiltração. A atividade da enzima foi determinada em relação a temperatura e pH ótimos, a influência da adição de sais e solventes orgânicos e em relação a cinética de degradação térmica em diferentes temperaturas (40 – 60°C) e valores de pH (7,0 – 9,0). A temperatura de 55°C e o pH 7,5 foram determinados como ótimos para atividade da enzima queratinase. O valor da energia de desativação (E_d) médio foi de 118,0 kJ/mol e os valores de z e D variaram de 13,6 a 18,8°C, e 6,9 a 237,3 min, respectivamente. Além disso a adição de sais (CaCl_2 , CaO , $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ e MgSO_4) elevou a atividade da enzima na presença destes compostos.

Palavras-chaves: protease, estabilidade, inativação térmica, purificação.

ABSTRACT

The properties of the enzymes with interest for industrial application can be quite diverse depending on the species of microorganism producer and purification protocols employed, requiring an enzyme characterization to ensure the viability of their application. The objective of this work was to produce and purify the enzyme keratinase from *Bacillus* sp. P45 in higher capacity systems, determine the parameters of thermal stability and the influence of chemical components in the enzymatic activity in order to facilitate their application in biotechnological processes. The use of systems with larger capacities allowed enzyme purification in larger quantities. In these systems, the purification factor achieved by the purification strategy adopted was up to 2.6 times in the first aqueous two-phase system (ATPS), 6.7 times in the second ATPS and 4.0 times the diafiltration step. The enzyme recovery reached values of up to 75.3% in the first ATPS, 75.1% in the second and 84.3% in the diafiltration step. The enzyme activity was determined in relation to optimum temperature and pH, influence of the addition of salts and organic solvents and kinetics of thermal degradation at different temperatures (40-60 °C) and pH (7.0 to 9.0). The temperature of 55 °C and pH 7.5 were determined to be best for the keratinase enzyme activity. The average deactivation energy value (E_d) was 118.0 kJ/mol in addition; z and D values ranged from 13.6 to 18.8 °C, and 6.9 to 237.3 min, respectively. Furthermore, the addition salts (CaCl_2 , CaO , $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ and MgSO_4) increased the enzyme activity.

Keywords: protease, stability, thermal inactivation, purification.

1 INTRODUÇÃO

As proteases constituem 60-65% do mercado global das enzimas industriais (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2014), sendo que a maioria delas são proteases alcalinas utilizadas na indústria de alimentos no processo de amaciamento de carne, na síntese de peptídeos, preparo de fórmulas infantis, panificação e cervejarias. Além disso, são utilizadas em produtos farmacêuticos, diagnósticos médicos, como aditivos na indústria de detergentes e na indústria têxtil no processo de depilação e transformação do couro (VERMA et al., 2011).

Estas enzimas podem ser obtidas a partir de animais, bactérias, fungos e plantas. No entanto, as de origem microbianas são as mais comuns (BEKA et al., 2014; DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011; JÚNIOR; TRIBS; CRISTIANINI, 2014; MERHEBDINI et al., 2010), destacando-se as proteases produzidas por micro-organismos do gênero *Bacillus*. Dentre estas estão as proteases com propriedades queratinolíticas produzidas pelo micro-organismo *Bacillus* sp. P45 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009), o qual foi isolado a partir do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*) da Bacia Amazônica, e que apresenta grande potencial na hidrólise de proteínas (SIRTORI et al., 2006) e na aplicação em processos bioindustriais.

As proteases microbianas são particularmente importantes porque são mais estáveis, quando comparadas com seus homólogos de origem vegetal e animal (RAO et al., 1998), e ativas em pH alcalino, na presença de tensoativos, de íons metálicos, agentes oxidantes e solventes orgânicos e, em geral, apresentam certa estabilidade em temperaturas mais elevadas (JURADO et al., 2004; LI et al., 2011). As proteases específicas produzidas por micro-organismos queratinolíticos são chamadas de queratinases. Estas enzimas distinguem-se de outras proteases pela maior capacidade de degradação de substratos compactos e insolúveis como a queratina (ONIFADE et al., 1998).

Devido à demanda industrial por proteases, faz-se necessário a caracterização de novas proteases visando a sua aplicação em processos biotecnológicos. Dependendo da espécie do micro-organismo produtor e dos protocolos de purificação empregados, as características destas enzimas podem ser bastante diversificadas, fazendo necessário estudos de caracterização de suas propriedades, como forma de viabilizar sua utilização em processos biotecnológicos industriais inovadores (BRAGA et al., 2013).

O conhecimento sobre as características da enzima, bem como o efeito da temperatura e outras variáveis no processo de desnaturação são aspectos importantes quando

se considera a sua aplicação em processos biotecnológicos, uma vez que pode fornecer informações sobre sua estrutura e facilitar o desenvolvimento de processos economicamente viáveis. Os mecanismos de desativação podem ser complexos, uma vez que as enzimas têm estruturas definidas, e um desvio da sua forma nativa pode afetar sua atividade específica. Assim, um melhor conhecimento da estabilidade da enzima nas condições operacionais podem ajudar a otimizar a rentabilidade de processos enzimáticos (JURADO et al., 2004; NAIDU; PANDA, 2003).

Além disso, a atividade e a estabilidade térmica das enzimas são influenciadas por diversos fatores, como por exemplo a temperatura, pH e meio de reação, que podem afetar a estrutura tridimensional específica ou a conformação espacial da proteína, inviabilizando processos industriais (JURADO et al., 2004; YU; LI, 2006).

O objetivo deste trabalho foi obter a enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 purificada em maiores quantidades, determinar os parâmetros de estabilidade térmica e a influência de componentes químicos na atividade enzimática de forma a viabilizar sua aplicação em processos biotecnológicos inovadores.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo, inóculo e produção da enzima

O *Bacillus* sp. P45 (Número de acesso no GenBank: AY962474), foi utilizado na produção da enzima queratinase. Uma caracterização parcial mostrou que a cepa enquadra-se no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS (SIRTORI et al., 2006). A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30°C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). A enzima foi produzida por cultivo submerso conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011) em um meio mineral contendo (g/L): NaCl (0,5), KH₂PO₄ (0,4), K₂HPO₄ (0,3), NH₄Cl (1,9) e farinha de penas (43,0) como substrato, a 30°C, 125 rpm por 48 h. Ao término do cultivo, o extrato enzimático foi clarificado por centrifugação (4°C, 5000 x g por 20 min) e o sobrenadante contendo a enzima utilizado nas etapas de purificação.

2.2 Purificação da enzima e obtenção em maiores quantidades

A enzima queratinase foi purificada a partir de uma estratégia determinada por Sala et al. (2014) que consistiu de uma sequência de dois sistemas aquosos bifásicos (SAB) integrado ao processo de diafiltração para remoção de polietileno glicol (PEG). O primeiro SAB foi composto (m/m) por 3% PEG 1500 Da, 23% de fosfato de potássio pH 7,0, 8% de cloreto de sódio (NaCl), 20% de extrato enzimático e 46% de água deionizada. O segundo sistema aquoso bifásico foi formado pela adição (m/m) da fase de topo proveniente do primeiro SAB (36%), tampão tris-HCl 100 mM pH 7,0 (36,0%) e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). A remoção do PEG foi realizada por diafiltração utilizando membrana de 10 kDa de celulose regenerada, 5 ciclos de diafiltração, pressão de 1,5 kgf/cm² e a 15°C. A enzima purificada foi liofilizada e armazenada a 4°C para utilização nas etapas posteriores.

A obtenção da enzima em maiores quantidades foi avaliada a partir da utilização de SABs de maiores capacidades (10, 50 e 500 g). Os sistemas foram montados conforme descrito anteriormente e a enzima purificada, ao final dos sistemas, foi submetida ao processo de diafiltração para remoção do PEG residual. A eficiência do processo foi avaliada em relação ao fator de purificação (FP) (Equação 1) e recuperação enzimática (RP%) (Equação 2). A enzima obtida ao final do processo de purificação foi liofilizada e armazenada a 4°C.

$$FP = \frac{\text{Atividade específica da fração purificada}}{\text{Atividade específica do extrato enzimático bruto}} \quad (1)$$

$$RP\% = \frac{\text{Atividade da enzima purificada} \times \text{Volume purificado}}{\text{Atividade do extrato enzimático bruto} \times \text{Volume inicial}} \times 100 \quad (2)$$

A atividade específica é definida como a razão entre a atividade (U/mL) e a concentração de proteína total (mg/mL).

2.3 Caracterização da enzima queratinase purificada

2.3.1 Temperatura e pH ótimo

O pH ótimo foi determinado através da atividade enzimática a 40°C em uma faixa de pH de 6,5 a 11,0 utilizando tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,0 – 11,0) e tampão Fosfato de Sódio 100 mM (6,5). A temperatura ótima foi determinada no pH ótimo de atividade da enzima para as temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa (%), considerando-se 100% o ponto de maior atividade.

2.3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos de desnaturação térmica

A estabilidade térmica foi avaliada nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60°C e em pH de 7,0 – 9,0 para cada condição, em termos de: meia vida ($t_{1/2}$), constante cinética de desnaturação térmica (K_d) e energia da reação de desativação (E_d). Para tal, a enzima foi incubada em cada condição até que perdesse 50% de sua atividade inicial. A medida da atividade enzimática foi feita em intervalos de tempos pré-determinados. A meia vida da enzima foi calculada a partir da Equação 3 (LAVORENTI et al., 2003).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (3)$$

Considerando-se que na faixa de temperaturas estudadas (40-60°C) a cinética de desnaturação é de primeira ordem e que o valor de K_d é função apenas da temperatura absoluta, os valores experimentais de K_d foram determinados por meio do coeficiente angular do gráfico $-\ln (V/V_0)$ versus tempo de incubação da enzima, em que V é a atividade enzimática em cada tempo de amostragem e V_0 a atividade no tempo inicial ($t = 0$).

A energia da desativação foi determinada a partir do coeficiente angular da reta $-\ln (K_d)$ versus $1/T$ (Equação 4), onde R é a constante dos gases ideais ($8,31.10^{-3} \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).

$$\ln K_d = \ln A - \frac{E_d}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (4)$$

Os valores para os parâmetros D e z foram também calculados para expressar a desnaturação enzimática conforme a Equação 5 e a Equação 6, respectivamente. O valor D , ou valor de redução decimal, em minutos, é definido como o tempo que a enzima deve ser pré-incubada em uma determinada temperatura para manter 10% de atividade residual. Já o valor z é o intervalo de temperatura de um ciclo logarítmico na curva de desnaturação (Equação 6).

$$D = \frac{2,3026}{K_d} \quad (5)$$

$$\log \frac{D_2}{D_1} = \frac{T_1 - T_2}{z} \quad (6)$$

Para estes cálculos apenas regressões obtidas com um mínimo de 5 pontos e um valor de R^2 acima de 0,93 foram aceitos.

2.3.3 Efeito de sais e solventes na atividade de queratinase purificada

O efeito dos sais NaCl, CaCl₂, MnCl₂, CaO, C₈H₅KO₄, MgSO₄, CuSO₄, ZnSO₄, FeCl₃ na atividade da enzima queratinase, bem como suas diferentes concentrações (1, 5 e 10 mM), foi avaliado a partir da pré-incubação da enzima com os respectivos sais a 25°C durante 30 min (JELLOULI et al., 2011). O efeito de solventes foi determinado pela ressuspensão da enzima liofilizada nos solventes orgânicos (acetona, etanol, metanol, ácido acético, éter etílico, formaldeído e glutaraldeído) em uma concentração de 50% (v/v) e incubação pelo período de 1 h a 10°C (FOUKIS et al., 2012; MARUTHIAH et al., 2013). Após o período de incubação a atividade enzimática foi determinada e comparada em relação ao extrato enzimático sem adição de solventes e sais (controle), o qual foi incubado nas mesmas condições, sendo considerado como 100%.

2.4 Determinações analíticas

A atividade queratinolítica foi monitorada utilizando-se o substrato solúvel azocaseína, uma vez que a azoqueratina é insolúvel no meio reacional composto por tampão tris-HCl. Além disso, Daroit, Corrêa e Brandelli (2009) demonstraram que a atividade proteolítica e queratinolítica do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P45 nos substratos de azocaseína e azoqueratina, respectivamente, mostraram-se relacionadas.

A atividade de queratinase foi determinada conforme metodologia descrita por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009). O substrato utilizado foi a azocaseína 1% (m/v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,5). A mistura reacional foi composta por 100 µL de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), 300 µL de azocaseína e 100 µL do extrato enzimático. A reação foi incubada em banho com agitação a 40°C durante 30 min e finalizada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 x g por 20 min) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,8 M. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade queratinolítica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância, sob as condições do ensaio.

A concentração total de proteínas foi determinada segundo metodologia de Bradford (1976) utilizando Azul de Coomassie G-250 e albumina de soro bovino (BSA) como padrão, através da absorvância a 595 nm.

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para detectar diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção de queratinase purificada em maiores quantidades

Um processo de obtenção da enzima queratinase purificada em maiores quantidades foi realizado com base em um protocolo estabelecido anteriormente por Sala et al. (2014). O processo desenvolvido, composto por poucas operações unitárias foi capaz de maximizar a recuperação e purificação da enzima.

Os estudos aqui realizados sobre a obtenção de queratinase purificada de *Bacillus* sp. P45 compreenderam o uso de sistemas de purificação de 10 g, em seguida, 50 g e, finalmente, 500 g, representando um fator de 5 e 50 vezes de aumento do sistema de purificação, respectivamente, comparando-os ao processo anterior.

Processos ideais de obtenção de bioprodutos, além de garantirem alta recuperação e pureza, devem minimizar o número de etapas envolvidas e serem considerados em detrimento daqueles com inúmeras etapas e os quais utilizam técnicas de alto custo, o que, na maior parte dos casos, pode ser o fator limitante ao aumento de escala e aplicação industrial do bioproduto de interesse.

Em sistemas aquosos bifásicos o coeficiente de partição para substâncias solúveis, em muitos casos, é independente do volume total das fases do sistema, da razão de volume e da concentração da substância a ser particionada para uma larga faixa de concentração. Desta forma, o comportamento da partição em sistemas de maiores volumes pode ser pré-definido com grande exatidão a partir de pequenos volumes, onde a mistura e o rápido equilíbrio de fases são facilmente alcançados (ALBERTSSON, 1986).

A utilização de sistemas de purificação de maiores capacidades permitiu a obtenção da enzima queratinase purificada em maiores quantidades, sem comprometer o rendimento e pureza (Tabela 1), não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) na recuperação e purificação da enzima. Nestes sistemas o fator de purificação obtido através da estratégia de purificação adotada, foi de até 2,6 vezes no 1º SAB, 6,7 vezes no 2º SAB e de

4,0 vezes na etapa de diafiltração. Já a recuperação enzimática alcançou valores de até 75,3% no 1º SAB, 75,1% no 2º SAB e 84,3% na etapa de diafiltração.

Além disso, as propriedades físico-químicas, baixo custo e atoxicidade do PEG, torna seu uso vantajoso em escala industrial, permitindo sua aplicação para obtenção de bioprodutos aplicáveis na elaboração de alimentos e/ou produtos farmacêuticos (TANUJA et al., 2000).

Tabela 1 - Fator de purificação e recuperação da enzima queratinase obtida em sistemas de maiores capacidades.

SAB	Capacidade (g)	Fator de Purificação	Recuperação (%)
1º	10	2,4 ± 0,1 ^a	73,6 ± 2,63 ^a
	50	2,6 ± 0,3 ^a	78,0 ± 1,33 ^a
	500	2,6 ± 0,1 ^a	75,3 ± 1,14 ^a
2º	10	6,2 ± 1,37 ^a	72,9 ± 1,8 ^a
	50	6,4 ± 2,11 ^a	73,1 ± 2,09 ^a
	500	6,7 ± 1,09 ^a	75,1 ± 1,49 ^a
Diafiltração		4,0	84,3

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$).

3.2 Caracterização da enzima queratinase purificada

3.2.1 Temperatura e pH ótimo

A atividade da enzima queratinase purificada foi determinado em diferentes valores de pH e temperaturas. A queratinase de *Bacillus* sp. P45 foi ativa em valores de pH entre 6,5 e 11,0 e em temperaturas de 40 a 65°C.

Máxima atividade enzimática foi observada em pH 7,5, onde a enzima purificada mostrou uma curva típica em forma de sino (Figura 1). Em relação a temperatura, a enzima mostrou atividade ótima em 55°C, sendo possível verificar o aumento da atividade até o pico máximo, seguida de uma drástica diminuição nas temperaturas mais elevadas (Figura 2), indicando uma desnaturação acelerada.

Isso ocorre, pois o aumento da temperatura ocasiona um aumento da velocidade de reação, uma vez que o calor aumenta a proporção de grupos que reagem e atingem o estado de transição em um determinado momento. No entanto, quando a temperatura sobe acima de um certo ponto, o calor faz com que a enzima desnature. Como a maioria das proteínas são

apenas ligeiramente estáveis, a desnaturação ocorre, levando a queda acentuada na atividade enzimática (NELSON; COX, 2002).

Figura 1 - pH ótimo da enzima queratinase purificada obtida a partir do *Bacillus* sp. P45 utilizando tampão fosfato de sódio 100 mM (6,5) e tris-HCl 100 mM (7,0 – 11,0).

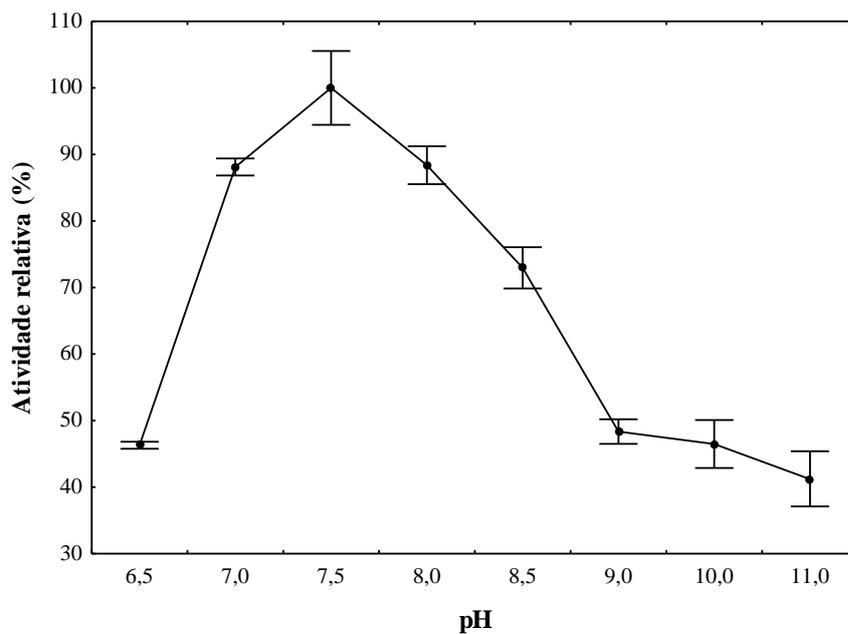


Figura 2 - Temperatura ótima da enzima queratinase obtida a partir *Bacillus* sp. P45.

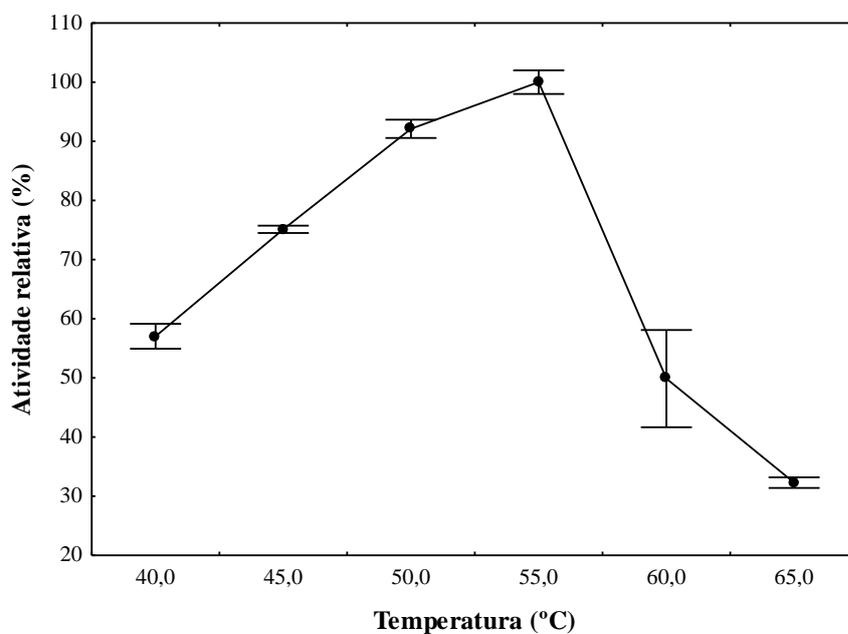


Tabela 2 – Temperaturas e valores de pH ótimos para proteases de diversas fontes.

	Fonte	Temperatura	pH	Referência
Bactérias	<i>Bacillus koreensis</i>	60°C	9,0	ANBU, 2013
	<i>Bacillus</i> sp. EMB9	55°C	9,0	SINHA; KHARE, 2013
	<i>Bacillus licheniformis</i> MP1	70,0	10,0	JELLOULI et al., 2011
	<i>Bacillus</i> sp. SM2014	60,0	10,0	JAIN et al., 2012
	<i>Bacillus subtilis</i> AP-MSU6	40,0	9,0	MARUTHIAH et al., 2013
	<i>Vibrio fluvialis</i>	55°C	8,0	VENUGOPAL; SARAMMA, 2006
	<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	55°C	7,5	RIFFEL et al., 2003
Fungos	<i>Aspergillus parasiticus</i>	50°C	7,0	ANITHA; PALANIVELU, 2013
	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	50°C	9,0	CAVELLO et al., 2013
	<i>Rhizomucor miehei</i>	60°C	4,5	KATROLIA et al., 2012
	<i>K. marxianus</i> IFO 0288	ND	7,7	FOUKIS et al., 2012
Vegetais	<i>Moringa oleífera</i> (vegetal)	50°C	7,0	BIJINA et al., 2011
	<i>Euphorbia neriifolia</i> Linn	45°C	9,5	YADAV; PATEL; JAGANNADHAM, 2012
Parasitas	<i>Taenia pisiformis</i>	37°C	5,5	WANG et al., 2013
Animais	<i>Bothrops andianus</i>	45°C	8,0	VALERIANO-ZAPANA et al., 2012
	<i>Portunus trituberculatus</i>	ND	6,0	MARTINS; ROSÁRIO; DOMINGOS, 2012

ND – Não determinado;

As condições ótimas de pH e temperatura para a queratinase de *Bacillus* sp. P45 estão na faixa reportada para a maioria das proteases alcalinas de diferentes espécies microbianas, animais e vegetais, onde apresentam temperatura ótima na faixa de 40 – 70°C e valores de pH ótimo de 7,0 – 10,0 (Tabela 2).

Cabe salientar que cada enzima possui um pH e temperatura ótimos de atuação, no qual a sua atividade é máxima. No entanto, isso não representa que estas condições sejam as que favoreçam sua maior estabilidade.

3.3.2 Parâmetros cinéticos para a desativação térmica de queratinase purificada

A desativação térmica é conhecida por ser um processo em que a estrutura secundária, terciária ou quaternária de uma proteína é alterada sem a quebra de ligações covalentes. Isso implica na perda de eficiência em processos enzimáticos, fazendo-se necessário avaliar tais propriedades (BRAGA et al., 2013). A determinação dos parâmetros cinéticos de desativação é essencial para entender as relações entre a estrutura e estabilidade da enzima, permitindo verificar sua potencial aplicação industrial.

Além disso, a estimativa dos parâmetros cinéticos ajuda a compreender o provável mecanismo de desnaturação, o que é muito importante para aplicação da enzima em processos que envolvam a utilização de temperaturas elevadas (SANT'ANNA et al., 2010).

Quando se trabalha com enzimas, principalmente as empregadas na indústria de alimentos, sua desativação é expressa em termos de valores para os parâmetros D e z (COBOS; ESTRADA, 2003). Os valores calculados para z foram 15,3, 16,7, 13,6, 17,5 e 18,8°C para os valores de pH de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0, respectivamente, considerando a faixa de temperatura de 40 a 60°C (Tabela 3).

Em relação ao parâmetro D , é possível verificar que este é sempre superior para as menores temperaturas e que diminui drasticamente com o aumento da temperatura de incubação, indicando uma rápida inativação da enzima em temperaturas mais elevadas e a necessidade de um tempo maior de incubação, em temperaturas mais reduzidas, para que a enzima mantenha 10% de sua atividade residual, sendo o inverso verdadeiro; Uma maior temperatura de incubação corresponde a um menor tempo para a desnaturação de 90% da atividade enzimática. Os valores de D , em minutos, variaram de 237,1 (40°C) a 6,7 (60°C).

É possível verificar que a constante cinética de desnaturação térmica (K_d) para a queratinase purificada (Tabela 3) é inversamente proporcional à meia vida da enzima. Além disso, é possível observar que a enzima é mais estável em temperaturas mais baixas, próximas

a 40°C, uma vez que os valores de K_d aumentaram e os de meia vida ($t_{1/2}$) diminuíram com o aumento da temperatura, indicando uma maior inativação nas temperaturas mais elevadas.

O valor da energia de desativação (E_d) médio foi de 118,0 kJ/mol, para a faixa de temperatura de 40 – 60°C, e representa a barreira de energia a ser transposta para a inativação da enzima. Quanto maiores os valores de E_d , maior é a energia necessária para a inativação da enzima, indicando uma maior estabilidade. O valor de E_d , para as mais diversas proteases, está na faixa de 16,3 – 270,0 kJ/mol (CASTRO et al., 2014; DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011; SINHA; KHARE 2013; YADAV; PATEL; JAGANNADHAM, 2012), sendo compatível com o determinado para a enzima queratinase purificada em maiores quantidades.

Daroit, Sant'Anna e Brandelli (2011) obtiveram valores de meia vida inferiores aos obtidos neste trabalho para a protease queratinolítica de *Bacillus* sp. P45 purificada através de uma estratégia envolvendo uma etapa de concentração com sulfato de amônio (30-60% de saturação), seguida de uma cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-100) e de uma cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose). A meia vida ($t_{1/2}$) verificada para a temperatura de 40°C foi de aproximadamente 26 min, a qual foi reduzida para 1,06 min com o aumento da temperatura para 50°C em pH 8,0. Além disso, foi verificado valores de K_d médios a 40 e 50°C de 0,0259 e 0,6556 (min^{-1}), respectivamente, e valor de z de 7,16°C. Sant'Anna et al. (2010) também verificaram que o valor de K_d aumentou com a elevação da temperatura e a meia vida diminuiu durante os ensaios de inativação térmica de peptídeos obtidos a partir do cultivo do *Bacillus* sp. P34. Os valores da constante de desnaturação passaram de 0,0102 (min^{-1}) a 90°C para 0,0586 (min^{-1}) a 120°C. Já a meia vida foi reduzida de 68,3 min a 90°C para 11,83 min a 120°C, e o valor de z determinado foi de 37,7°C.

Uma protease neutra, produzida por *Aspergillus oryzae* CICIM F0899, foi caracterizada e os resultados obtidos demonstraram uma meia vida de 20,4 e 14,2 min a 55 e 60°C, respectivamente (WANG et al., 2013). Castro et al. (2014), durante a verificação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos de uma protease de *Aspergillus niger* LBA02, obtiveram valores de energia de desativação (E_d) de 16,32 kJ/mol na faixa de 35 a 55°C, meia vida de 1386,3 a 14,97 min na faixa de 40 a 60°C e valor de D igual a 4605,2 a 49,73 min.

Tabela 3 – Valores de z , D , K_d e meia vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da desnaturação térmica da queratinase de *Bacillus* sp. P45 em pH de 7,0 – 9,0 e de 40 – 60°C.

pH	Temperatura (°C)	D (min)	z (°C)	K_d (min)	$\frac{1}{2}$ vida (min)
7,0	40	232,3	15,3	0,0099	70,0
	45	89,8		0,0256	27,1
	50	30,9		0,0744	9,3
	55	23,9		0,0959	7,2
	60	11,5		0,1999	3,5
7,5	40	237,1	16,7	0,0097	71,4
	45	60,7		0,0379	18,3
	50	24,5		0,0937	7,4
	55	17,0		0,1351	5,1
	60	15,1		0,1518	4,6
8,0	40	196,6	13,6	0,0117	59,2
	45	45,2		0,0509	13,6
	50	31,8		0,0722	9,6
	55	17,8		0,2289	3,0
	60	6,7		0,3449	2,0
8,5	40	145,5	17,5	0,0158	43,9
	45	43,2		0,0532	13,0
	50	34,0		0,0676	10,2
	55	17,3		0,1324	5,2
	60	10,4		0,2192	3,2
9,0	40	132,9	18,8	0,0173	40,1
	45	86,14		0,0267	25,9
	50	31,6		0,0728	9,5
	55	23,8		0,0968	7,2
	60	11,5		0,1999	3,5

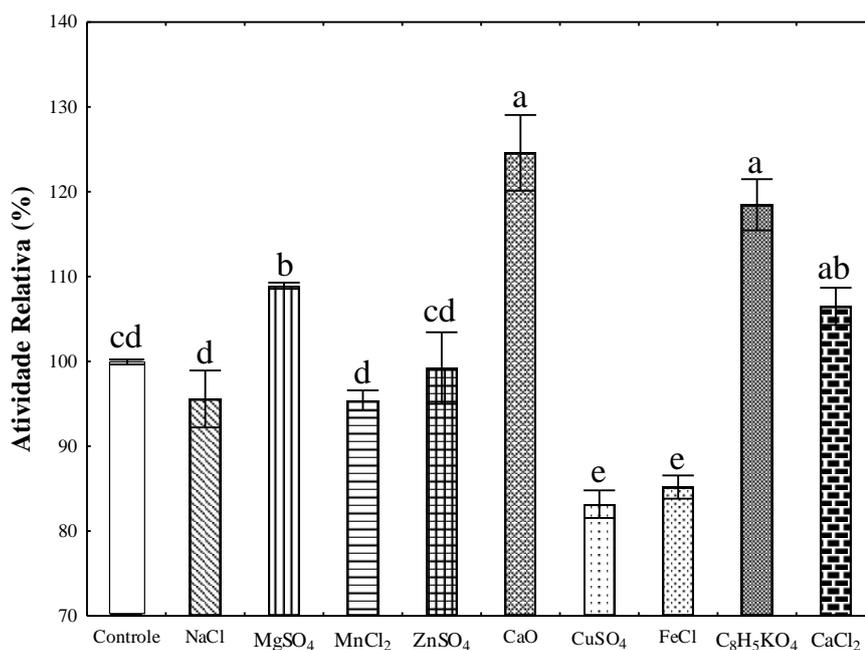
Os dados obtidos neste trabalho e os verificados na literatura demonstram a importância do estudo das propriedades cinéticas da enzima de interesse em diferentes condições, uma vez que dependendo da enzima, e da sua forma de obtenção, suas propriedades podem ser bastante distintas. Além disso, este estudo demonstrou que as

informações obtidas através do estudo cinético de desativação da enzima podem ajudar na determinação das temperaturas as quais a mesma pode ser submetida sem causar a perda de sua eficiência, não comprometendo a viabilidade do processo.

3.3.3 Influência de sais na atividade da enzima

A influência dos sais NaCl, CaCl₂, MnCl₂, CaO, C₈H₅KO₄, MgSO₄, CuSO₄, ZnSO₄ e FeCl₃ na atividade da enzima foi verificado em relação a enzima sem adição de sal (controle), uma vez que foram relatados efeitos positivos sobre a atividade de outras proteases de diversas fontes. Primeiramente foi verificado o efeito dos sais na atividade enzimática (Figura 3) e, posteriormente, a influência do aumento da concentração, de 1 para 10 mM, para os sais que foram significativamente ($p \leq 0,05$) iguais ou superiores ao controle (Figura 4).

Figura 3 – Efeito de diferentes sais (1mM) na atividade de queratinase purificada.



Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os diferentes sais ao nível de 5% de significância.

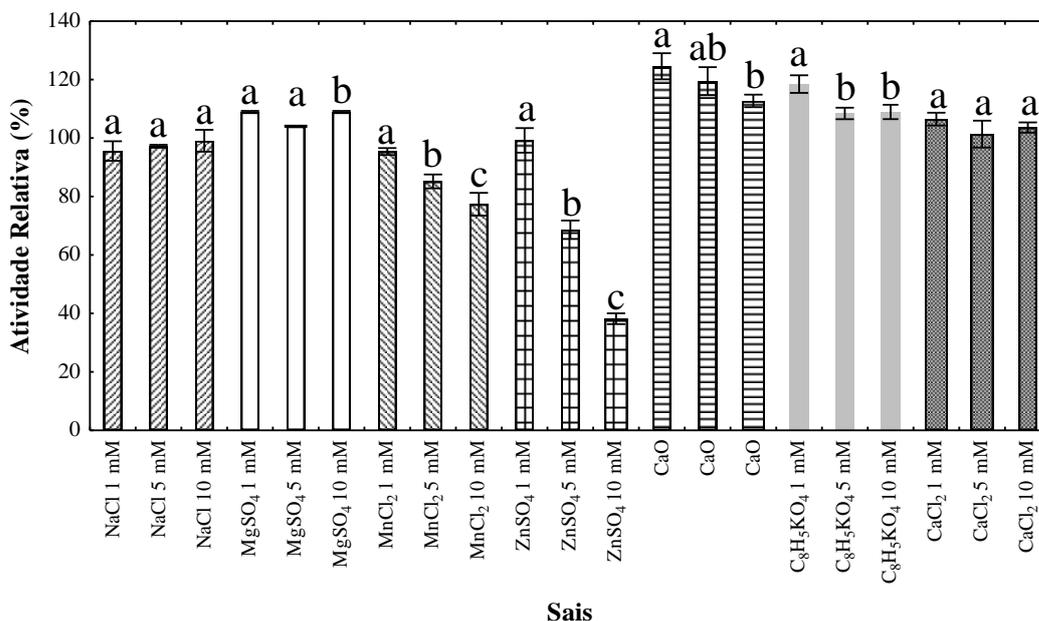
A verificação do comportamento da enzima na presença dos sais é importante, uma vez que a utilização sem prévio conhecimento das suas interferências pode inviabilizar sua eficácia de aplicação. Além disso, alguns destes sais avaliados podem estar presentes nas etapas de processos biotecnológicos nos quais a enzima pode ser aplicada, ou até mesmo na matéria-prima utilizada. Destacam-se: (i) o processo de coagulação enzimática do leite para elaboração de produtos lácteos, cuja principal matéria-prima contém quantidades

significativas de cálcio; **(ii)** no processo de bioconversão das penas, onde a atuação da enzima queratinase é facilitada por agentes redutores como o biftalato de potássio ($C_8H_5KO_4$), responsável pela degradação das ligações dissulfeto da queratina nas penas; **(iii)** produtos à base de proteases, desenvolvidos com a finalidade de amaciar carnes levam em sua composição NaCl; **(iv)** durante o tratamento do couro uma solução de NaCl é empregada para sua conservação para posterior aplicação de enzimas relacionadas ao processo de depilação, as quais podem reduzir a utilização dos compostos químicos como sulfetos e sulfidatos (CAVELLO et al., 2013); e **(v)** na indústria de detergentes são utilizados agentes quelantes com o objetivo de reduzir a dureza da água, no entanto, na presença de tais agentes, o Ca^{2+} pode ser removido, prejudicando a atividade e estabilidade de proteases “cálcio dependentes” e, conseqüentemente, a sua aplicação na produção de detergentes.

A enzima mostrou maior atividade em relação à maioria dos sais testados, sendo verificado que a atividade enzimática foi aumentada ($p \leq 0,05$) por CaO, $C_8H_5KO_4$, $CaCl_2$ e $MgSO_4$ (112,7%, 108,9%, 103,6%, 108,9%, respectivamente) e inibida por $CuSO_4$ e $FeCl_3$ (21,3% e 9,8%, respectivamente). Tais íons metálicos, parecem terem funcionado como interferentes da catálise enzimática, diminuindo ou interrompendo a reação enzimática, sendo, portanto, excluídos dos ensaios de aumento de molaridade.

O efeito positivo do CaO, $C_8H_5KO_4$, CaCl, e $MgSO_4$ sobre a atividade enzimática de proteases foi anteriormente relatado por Anbu (2013). O aumento da atividade é devido à capacidade que alguns íons dos sais utilizados possuem de estabilizar a ligação do complexo enzima-substrato e manter a conformação ativa da enzima, protegendo contra a desnaturação térmica (CAO et al., 2009; FAKHKAKH et al., 2009; FARAG; HASSAN, 2004; LEE et al., 2002).

Além disso, o aumento da atividade enzimática, no caso da adição de sais contendo íons divalentes, Ca^{2+} por exemplo, é devido à melhora da estabilidade conformacional da proteína (GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003; PANTOLIANO et al., 1988) e a estabilização do complexo ternário da enzima (ANITHA; PALANIVELU, 2013), que envolve, em muitas reações enzimáticas, duas ou mais moléculas de substratos, que se ligam à enzima e participam da reação.

Figura 4 – Efeito da molaridade dos sais na atividade de queratinase purificada.

Letras minúsculas iguais entre o mesmo tipo de sal indicam que não há diferença significativa entre as diferentes molaridades ao nível de 5% de significância.

O efeito protetor do Ca^{2+} , em especial, tem sido constantemente relatado, porém seu mecanismo de atuação não é muito claro. É sugerido que o sal provoca um aumento na atividade de água na superfície da proteína, que conduz a um aumento da hidrofobicidade do núcleo, resultando, assim, em uma rigidez e estabilidade estrutural da enzima (DODIA et al., 2008).

Recentemente, foi relatado que o Ca^{2+} pode atuar como uma espécie de "switch", um mecanismo similar a um interruptor ou trocador, que alterna a protease entre as formas estáveis e instáveis, conforme as necessidades biológicas. A hipótese levantada é de que, para realizar de maneira completa toda sua gama de funções biológicas, a estabilidade da protease é variável. Sob algumas circunstâncias, é estável e completamente dobrada, enquanto que podem também ser parcialmente desdobradas e susceptíveis à degradação, sendo esta mudança de estabilidade regulada pela ligação do íon cálcio à enzima (EIJNSINK; MATTHEWS; VRIEND, 2011).

Os sais NaCl, CaCl₂, MnCl₂, CaO, C₈H₅KO₄, MgSO₄ e ZnSO₄, que se destacaram por apresentarem atividade igual ou superior ($p \leq 0,05$) ao controle (sem adição de sal), foram avaliados em concentrações mais elevadas. O aumento da molaridade, de modo geral, levou a uma redução significativa da atividade enzimática, exceto para o NaCl, CaCl₂ e MgSO₄ (Figura 4). Foi verificado também que o MnCl₂ e o ZnSO₄ foram os sais que mais afetaram a

atividade da enzima, quando aumentada sua concentração, resultando em uma inibição de 22,6 e 61,8%, respectivamente (10 mM).

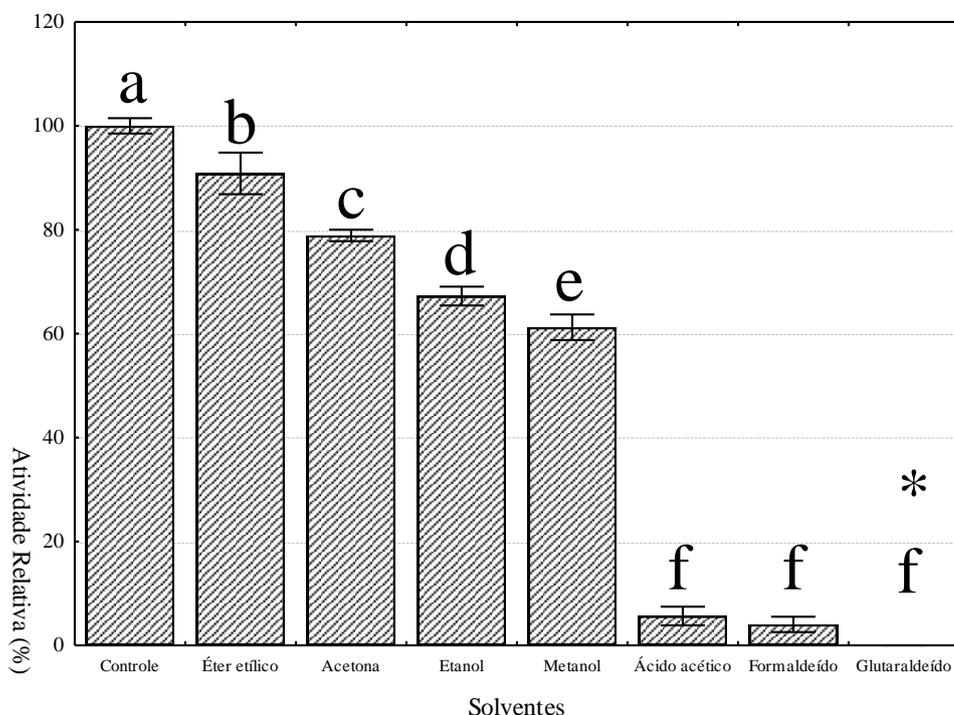
A enzima foi também avaliada na presença de solventes orgânicos para determinar o efeito destes compostos sobre a atividade da enzima. Os solventes utilizados neste trabalho foram selecionados por terem apresentado resultados promissores na atividade de proteases oriundas de outras fontes, e ainda, por serem utilizados no desenvolvimento de produtos e processos envolvendo o uso de proteases. O formaldeído, por exemplo, é rotineiramente utilizado na elaboração de cosméticos, produtos químicos, incluindo produtos de higiene pessoal (xampus). O glutaraldeído é utilizado em processos de imobilização de proteases para tratamento das enzimas adsorvidas ao suporte e para pré-ativação dos suportes de imobilização (LOPEZ-GALLEGO et al., 2005; MATEO et al., 2007). Além disso, os demais solventes podem ser utilizados na elaboração de detergentes e em processos de biossíntese de peptídeos (RAUT et al., 2012).

O uso dos solventes orgânicos afetaram significativamente ($p < 0,05$) a atividade da enzima queratinase, apresentando um efeito negativo (Figura 5). O ácido acético e o formaldeído foram verificados como sendo grandes inibidores da atividade da enzima queratinase purificada, que apresentou atividade residual inferior a 5%. A atividade da enzima na presença do glutaraldeído não pode ser estimada, uma vez que não foi possível realizar leitura devido à coloração da reação.

O éter etílico, a acetona, o etanol e o metanol apresentaram uma inibição da atividade de 9,2%, 21,2%, 32,8% e 38,8% respectivamente. O efeito negativo, pode ser relacionado à capacidade que os solventes tendem a retirar a camada essencial de água do sítio ativo da enzima (YADAV; PATEL; JAGANNADHAM, 2012) e a água em torno da molécula (SCHIFFER; DOTSCH, 1996), causando perda das propriedades catalíticas. Resultados semelhantes foram encontrados para outras proteases de diferentes fontes microbianas (FOUKIS et al., 2012; JAIN et al., 2012; JELLOULI et al., 2011; RAUT et al., 2012).

Segundo Gupta (1992), apesar da redução da atividade, a utilização de solventes orgânicos em reações enzimáticas é necessária e deve ser usada de forma a facilitar os processos enzimáticos, principalmente quando o substrato apresenta maior solubilidade em solventes orgânicos; para reduzir os riscos de crescimento microbiano; melhorar a estabilidade térmica; melhorar a eficiência de purificação e recuperação com a utilização de solventes voláteis; e controlar a especificidade do substrato da reação.

Figura 5 – Efeito de solventes na atividade da enzima queratinase purificada obtida a partir do *Bacillus* sp. P45.



Letras minúsculas iguais entre o mesmo tipo de sal indicam que não há diferença significativa entre as diferentes molaridades ($p > 0,05$). *Não foi possível realizar leitura devido a coloração da reação.

Apesar de apresentar toxicidade ao homem, o metanol já foi relatado na literatura por aumentar a atividade de proteases, em comparação a enzimas purificadas sem quaisquer solventes (RAVIKUMAR et al., 2012). A enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45, na presença de metanol, apresentou 61,2% de atividade residual.

Apesar de reduzirem a atividade enzimática, os solventes orgânicos utilizados devem ser levados em consideração, uma vez que, dependendo da aplicação, sua utilização é necessária.

Proteases tolerantes a solventes orgânicos têm atraído muita atenção, visto que há um grande número de vantagens associadas com a aplicação de enzimas em processos de hidrólise. Tem sido demonstrado que a produção de peptídeos pode ser aumentada através da adição de solventes orgânicos na mistura reacional, assim a aplicação de protease para a produção desses compostos tem sido uma alternativa viável em substituição a hidrólise química (GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003). A manutenção da atividade das enzimas proteolíticas em solventes orgânicos é importante, pois geralmente, são inativadas antes de completar as reações as quais são aplicadas, síntese de peptídeos, por exemplo. Raut et al. (2012) verificaram que a protease obtida de *Saccharopolyspora* sp. apresentou atividade

e foi relativamente estável na presença de solventes orgânicos, entre eles etanol e metanol, indicando a viabilidade de utilização na síntese de peptídeos por atingir elevado rendimento durante o processo em virtude de se manter viável durante a reação.

4 CONCLUSÃO

A execução e implementação da estratégia de purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 em maiores quantidades foi realizada com sucesso, sem comprometer a sua recuperação e pureza. Nestes sistemas o fator de purificação obtido foi de até 2,6 vezes no primeiro sistema aquoso bifásico (SAB), 6,7 vezes no segundo SAB e de 4,0 vezes na etapa de diafiltração. A recuperação enzimática alcançou valores de até 75,3% no primeiro SAB, 75,1% no segundo sistema e 84,3% na etapa de diafiltração.

Na caracterização, a enzima queratinase mostrou uma meia vida ($t_{1/2}$) de aproximadamente 237,3 min em pH 7,5 a 40°C, com redução deste parâmetro com o aumento da temperatura de incubação, sendo a constante de desnaturação térmica inversamente proporcional à meia vida da enzima. A temperatura de 55°C e pH 7,5 foram encontrados como ótimos para atividade da enzima proteolítica.

O valor da energia de desativação (E_d) médio foi de 118,0 kJ/mol e os valores de z e D variaram de 13,6 a 18,8°C, e 6,7 a 237,3 min, respectivamente. Além disso, a adição dos sais CaCl_2 , CaO , $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ e MgSO_4 foram capazes de elevar a atividade da enzima.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**. 3 ed. New York: Wiley, 1986. 346 p.

ANBU, P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, n. 1, p. 162– 168, 2013.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, n. 2, p. 214–220, 2013.

BEKA, R. G.; KRIER, F.; BOTQUIN, M.; GUIAMA, V. D.; DONN, P.; LIBOUGA, D. G.; MBOFUNG, C. M.; DIMITROV, K.; SLOMIANNY, M. C.; GUILLOCHON, D.; VERCAIGNE-MARKO, D. Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 25-31, 2014.

BIJINA, B.; CHELLAPPANA, S.; BASHEERA, S. M.; ELYASA, K. K.; BAHKALIC, A. H.; CHANDRASEKARANA, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2291–2300, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAGA, A. R. C.; MANERA, A. P.; ORES, J. C.; SALA, L.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J. Kinetics and thermal properties of crude and purified β -galactosidase with potential for the production of galacto-oligosaccharides. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 45-52, 2013.

CAO, Z.J.; ZHANG, Q.; WEI, D.K.; CHEN, L.; WANG, J.; ZHANG, X.Q.; ZHOU, M.H. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, n.2, p.181-188, 2009.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.12.001>.

CAVELLO, I. A.; HOURS, R. A.; ROJAS, N. L.; CAVALITTO, S. F. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5-6, p. 972–978, 2013.

COBOS, E.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 810–818, 2003.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358–363, 2009.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 45-51, 2011.

DAROIT, D. J.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Kinetic stability modelling of keratinolytic protease P45: influence of temperature and metal ions. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 165, n. 7-8, p. 1740–1753, 2011.

DODIA, M. S.; BHIMANI, H. G.; RAWAL, C. M.; JOSHI, R. H.; SINGH, S. P. Salt dependent resistance against chemical denaturation of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6223–6227, 2008.

EIJSSINK, V. G. H.; MATTHEWS, B. W.; VRIEND, G. The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease. **Protein Science**, v. 20, p. 1346–1355, 2011.

ESPITIA-SALOMA, E.; VÁZQUEZ-VILLEGAS, P.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Review - Continuous aqueous two-phase systems devices for the recovery of biological products. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 2, p. 101–112, 2014.

FAKHFAKH, N.; KANOUN, S.; MANNI, L.; NASRI, N. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather degrading *Bacillus licheniformis* RPK. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 427-436, 2009.

FARAG, A. M.; HASSAN, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 2, p. 85-93, 2004.

FONTAN, R. C. I.; ALCÂNTARA, L. A. P.; NETO, S. C. A. L.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, G. C. R. Inactivation kinetics of peroxidase from coconut water. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 249-258, 2012.

FOUKIS, A.; STERGIU, P. Y.; THEODOROU, L. G.; PAPAGIANNI, M.; PAPAMICHAEL, E. M. Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 214–220, 2012.

GHORBEL, B.; SELAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 513–518, 2003.

GUPTA, M. N. *Review*: Enzyme function in organic solvents. **European Journal of Biochemistry**, v. 203, p. 25-32, 1992.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C.; KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2012.

JAIN, D.; PANCH, I.; MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from

Bacillus sp.: A potential additive for laundry detergents. **Bioresource Technology**, v. 115, n. 1, p. 228–236, 2012.

JELLOULI, K.; GHORBEL-BELLAJ, O.; AYED, H. B.; MANNI, L.; AGREBI, R.; NASRI, M. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1248–1256, 2011.

JÚNIOR, B. R. C. L.; TRIBST, A. A. N.; CRISTIANINI, M. Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 21, n. 1, p. 44-49, 2014.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme Microbial Technology**, v. 34, n. 1, p. 33–40, 2004.

KATROLIA, P.; JIA, H.; YAN, Q.; SONG, S.; JIANG, Z.; XU, H. Characterization of a protease-resistant α -galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 110, n. 1, p. 578–586, 2012.

LAVORENTI, A.; ROCHA, A. A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L.; PINTO, O. B. Comportamento do diclosulam em amostras de um latossolo vermelho distroférrico sob plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 1, p. 183-190, 2003.

LEE, H.; SUH, D. B.; HWANG, J. H.; SUH, H. J. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 123-133, 2002.

LI, G. Y.; CAI, Y. J.; LIAO, X. R.; YIN, J. A novel nonionic surfactant- and solvent-stable alkaline serine protease from sp. SYBC H with duckweed as nitrogen source: production, purification, characteristics and application. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 845–853, 2011.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 70–75, 2005.

MARTINS, T. M.; ROSÁRIO, V. E.; DOMINGOS, A. Expression and characterization of the *Babesia bigemina* cysteine protease BbiCPL1. **Acta Tropica**, v. 121, n. 1, p. 1– 5, 2012.

MARUTHIAH, T.; ESAKKIRAJ, P.; PRABAKARAN, G.; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU6. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 116–119, 2013.

- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.
- MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A. C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 859–865, 2012.
- NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal inactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 57-67, 2003.
- ONIFADE, A. A.; AL-SANE, N. A.; AL-MUSALLAM, A. A.; AL-ZARBAN, S. A review: potential of biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed sources. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p.1-11, 1998.
- PANTOLIANO, M. W.; WHITLOW, M.; WOOD, J. F.; ROLLENCE, M. L.; FINZEL, B. C.; GILLILAND, G. L.; POULOS, T. L.; BRYAN, P. N. The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: subtilisin as a test case. **Biochemistry**, v. 27, n. 22, p. 27:8311–8317, 1988.
- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.597-635, 1998.
- RAUT, G.; VETAL, S.; BIAO, R.; LIU, X. Y.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Purification and characterization of organic solvent and detergent stable protease isolated from marine *Saccharopolyspora* sp. A9: Application of protease for wound healing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 196– 203, 2012.
- RAVIKUMAR, G.; GOMATHI, D.; KALAISELVI, M.; UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 411-417, 2012.
- RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C. M.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; TAVARES, F. C. A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 3, p. 693–703, 2007.
- RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Scaling-up of a *B*-phycoerythrin production and purification bioprocess involving aqueous two-phase systems: Practical experiences. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 738–745, 2013.
- SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S.J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 2016–2024, 2014.
- SANT’ANNA, V.; UTPOTT, M.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Kinetic modeling of thermal inactivation of the bacteriocin-like inhibitory substance P34. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3147–3152, 2010.

SCHIFFER, C. A.; DOTSCHE, V. The role of protein–solvent interactions in protein unfolding. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 428–432, 1996.

SINHA, R.; KHARE, S. K. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. **Bioresource Technology**, v. 145, n. 1, p. 357–361, 2013.

SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n.6, p.357-363, 2006.

TANUJA, S.; SRINIVAS, D. N.; GOWTHAMAN, K. M.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction coupled with ultrafiltration for purification of amyloglucosidase. **Bioprocess Engineering**, v.23, n. 1, p.63-68, 2000.

VALERIANO-ZAPANA, J. A.; SEGOVIA-CRUZ, F. S.; ROJAS-HUALPA, J. M.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 231–240, 2012.

VENUGOPAL, M.; SARAMMA, A. V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1239–1243, 2006.

VERMA, J.; MODI, D. R.; SHARMA, R.; SAXENA, S. Vital role of alkaline protease in bio-industries: a review. **Plant Archives**, v. 11, n. 11, p. 1083-1092, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARUS, S.; VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 27–34, 2014.

WANG, D.; ZHENG, Z. Y.; FENG, J.; ZHAN, X. B.; ZHANG, L. M.; WU, J. R.; LIN, C. C.; ZHU, L. Influence of sodium chloride on thermal denaturation of a high-salt-tolerant neutral protease from *Aspergillus oryzae*. **Food Science Biotechnology**, v, 22, p. 1359–1365, 2013.

WANG, Q.; ZHANG, S.; LUO, X.; HOU, J.; ZHU, X.; CAI, X. Cloning and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Taenia pisiformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 194, n. 1, p. 26–34, 2013.

YADAV, R. P.; PATEL, A. K.; JAGANNADHAM, M. V. Neriifolin S, a dimeric serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn.:Purification and biochemical characterization. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1296–1304, 2012.

YU, X. W.; LI, Y. Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 1-2, p. 44-50, 2006.

**ARTIGO 2: ELABORAÇÃO DE QUEIJO CREMOSO UTILIZANDO PROTEASES
DE *Bacillus* sp. P45 COM PROPRIEDADES COAGULANTES**

ELABORAÇÃO DE QUEIJO CREMOSO UTILIZANDO PROTEASES DE *Bacillus* sp. P45 COM PROPRIEDADES COAGULANTES

RESUMO

A necessidade de encontrar coagulantes adequados para a elaboração de queijos tem levado a busca por novas proteases para serem utilizadas em substituição aos coagulantes de origem animal, vegetal e até mesmo aos de origem microbiana modificados geneticamente. O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade coagulante de proteases purificadas e sem purificação (bruta) obtidas de *Bacillus* sp. P45 em relação a um coagulante comercial, assim como a viabilidade de aplicação na elaboração de queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa. Tanto a enzima bruta quanto a purificada mostraram atividades de coagulação semelhantes ao coagulante comercial na concentração de 30 mg/mL, sendo capazes de catalisar a hidrólise da caseína do leite. Apesar da similaridade na atividade coagulante a enzima purificada destacou-se para aplicação no processo de elaboração do queijo, uma vez que a enzima bruta apresentava odor acético intenso e coloração marrom. A enzima purificada foi empregada de forma eficiente no desenvolvimento de cinco formulações de queijos cremosos enriquecidos com farinha de chia e quinoa, os quais apresentaram valores finais de pH de 5,3 e acidez de 0,06 a 0,1 mol/L, similares a outros produtos. Durante o período de armazenamento de 25 dias foi verificada a redução do pH e a elevação da acidez para todas as formulações de queijo cremoso, com posterior estabilização do pH e menor produção de ácido láctico ao final do período de armazenamento, fenômeno natural e desejável em produtos lácteos fermentados.

Palavras-chave: queratinase, coagulação enzimática, queijo cremoso, chia, quinoa.

ABSTRACT

The necessity to find suitable coagulants for the development of cheeses has led the search for new proteases to be used in substitution for coagulants of animal, vegetable, and even to the microbial genetically modified. The objective of this study was to determine the clotting ability of purified and not purified (crude) proteases obtained from *Bacillus* sp. P45 compared to a commercial coagulant as well as the viability of their application in the preparation of cream cheese enriched with chia and quinoa flour. Both the crude and the purified enzymes showed coagulation activity similar to the commercial coagulant at a concentration of 30 mg/mL, being capable of catalyzing the hydrolysis of milk casein. Despite the similarity in coagulation activity of the both enzymes, the purified enzyme stood out for use in the preparation of cheese, since the crude enzyme showed intense acetic odor and brown coloring. The purified enzyme was used efficiently in the development of five cream cheese formulations enriched with chia and quinoa flour, which presented final pH values of 5.3 and acidity from 0.06 to 0.1 mol/L, similar to other products. During the 25 days storage period was observed a reduction in pH and an increase in acidity for all cream cheese formulations with higher pH stability and reduced production of lactic acid at the end of the storage period, natural phenomenon and desirable in fermented milk products.

Keywords: keratinase, enzymatic coagulation, cream cheese, chia, quinoa.

1 INTRODUÇÃO

A redução da oferta de coagulantes naturais de origem animal, seu alto custo, a restrição de consumo devido a razões religiosas, restrições alimentares e até mesmo a proibição de alimentos produzidos a partir de organismos geneticamente modificados (OGM) têm levado a uma crescente demanda por novos coagulantes substitutos, promovendo uma busca por novas fontes de proteases com propriedades coagulantes (AHMED et al., 2012; JACOB; JAROS; ROHM, 2010; MAZORRA-MANZANO et al., 2013a; ROSEIRO et al., 2003).

A coagulação do leite, na maioria dos processos de obtenção de queijos, é causada pela ação das proteases sobre as proteínas do leite. A hidrólise específica da ligação peptídica fenilalanina₁₀₅ – metionina₁₀₆ na *k*-caseína provoca a desestabilização da micela de caseína e uma subsequente agregação, resultando na transformação do leite em coalhada (KUMAR et al., 2010). Diferentes enzimas têm sido aplicadas com esse propósito, entre elas as extraídas de vegetais (CORRONS et al., 2012; GALÁN; CABEZAS; FERNÁNDEZ-SALGUERO, 2012; MAZORRA-MANZANO et al., 2013b) e animais (ROLET-REPECAUD et al., 2013; SHAMTSYAN et al., 2013; TRUJILLO et al., 2000), porém seu uso pode ser limitado por questões de cultivo, variações climáticas e disponibilidade de animais para abate, o que pode afetar a produção e oferta.

A obtenção de enzimas a partir de micro-organismos representa uma fonte atraente, uma vez que podem ser cultivadas em grandes quantidades durante um período relativamente curto e com menor custo de produção (HEADON; WALSH, 1994). Dentre as proteases de origem microbiana, destaca-se a enzima com propriedades queratinolíticas produzidas a partir do *Bacillus* sp. P45, o qual foi isolado do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*) da Bacia Amazônica, e que apresenta grande potencial na hidrólise de proteínas (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009; SIRTORI et al., 2006), podendo ser aplicada em processos de coagulação enzimática do leite para elaboração de produtos lácteos.

Adicionalmente, a elaboração de produtos lácteos enriquecidos com componentes que aportem benefícios como as sementes de chia e quinoa, são alternativas interessantes, uma vez que tem aumentando o interesse da população por tais produtos. A quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) é uma semente tradicionalmente cultivada na região dos Andes e utilizada como cereal no preparo de farinhas e rações animais (STIKIC et al., 2012). Destaca-se pelo seu alto teor de aminoácidos essenciais, proteínas, fibras e minerais (MADL;

STERK; MITTELBAACH, 2006; NSIMBA; KIKUZAKI; KONISHI, 2008; ZHUN et al., 2002). Além disso, tem sido relacionada à quinoa uma alta atividade antioxidante, devido a presença de composto fenólicos, proteção contra oxidação lipídica e prevenção de processos inflamatórios, câncer e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (GAWLIK-DZIKI et al., 2013).

A chia (*Salvia hispanica* L.), por sua vez, apresenta alto teor de proteínas, fibras (CAPITANI et al., 2012; MARINELI et al., 2014) e a maior porcentagem conhecida do ácido graxo α -Linolênico de qualquer fonte vegetal, chegando a 60% (AYERZA; COATES, 2011). Além disso, apresenta elevada atividade antioxidante, associada aos compostos polifenólicos e a presença de tocoferóis (CAPITANI et al., 2012), sugerindo, que as sementes podem ser utilizadas como ingredientes funcionais com potencial para aplicação em alimentos (MARINELI et al., 2014).

Não há ainda, de nosso conhecimento, qualquer dado publicado sobre a aplicação de um coagulante alternativo no desenvolvimento de um queijo cremoso enriquecido com chia e quinoa. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a aplicação de uma nova enzima com potencial coagulante do leite bovino em substituição aos coagulantes convencionais na elaboração de um queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo, inóculo e produção da enzima

O *Bacillus* sp. P45 (Número de acesso no GenBank: AY962474), foi utilizado na produção da enzima queratinase. Uma caracterização parcial mostrou que a cepa enquadra-se no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS (SIRTORI et al., 2006). A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30°C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). A enzima foi produzida por cultivo submerso do *Bacillus* sp. P45 conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011) utilizando farinha de penas como substrato a 30°C, 125 rpm por 48 h. Ao término do cultivo, o extrato enzimático foi clarificado por centrifugação (4°C, 5000 x g por 20 min) e o sobrenadante contendo a enzima utilizado nas etapas de purificação.

2.2 Purificação da enzima

A enzima foi purificada a partir da estratégia determinada por Sala et al. (2014) com pequenas modificações que consistiu em uma sequência de dois sistemas aquosos bifásicos (SAB) ampliados 50 vezes em relação ao volume e integrados ao processo de diafiltração para remoção de PEG. O primeiro SAB foi composto (m/m) por 3% PEG 1500 Da, 23% de fosfato de potássio pH 7,0, 8% de cloreto de sódio (NaCl), 20% de extrato enzimático e 46% de água deionizada. O segundo sistema aquoso bifásico foi formado pela adição (m/m) da fase de topo proveniente do primeiro SAB (36%), tampão tris-HCl 100 mM pH 7,0 (36,0%) e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). A remoção do PEG foi realizada por diafiltração utilizando membrana de 10 kDa de celulose regenerada, 5 ciclos de diafiltração, pressão de 1,5 kgf/cm² a 15°C. A enzima purificada foi liofilizada e armazenada a 4°C para utilização nas etapas posteriores.

2.3 Determinação da atividade coagulante da enzima

A atividade coagulante da enzima sobre o leite foi realizada segundo metodologia de Berridge (1952) utilizando leite bovino em pH 6,5 preparado a partir de leite em pó desnatado a 12% (m/v) mediante uma solução de 1,11 g de cloreto de cálcio (CaCl₂) por litro de água destilada. Alíquotas de leite adicionadas de 1 mL da solução enzimática em diferentes concentrações (10 a 50 mg/mL) foram incubadas a 30°C. O tempo de coagulação foi determinado a partir da formação de coágulos na parede do tubo. A atividade coagulante foi realizada para a enzima queratinase bruta (sem purificação), purificada e para quimosina comercial (Chymax[®]) como comparativo. A atividade coagulante foi determinada em termos de unidade de renina (Equação 1). Uma unidade de renina (UR) é definida como a quantidade de enzima contida em 1 mL de extrato enzimático que pode coagular 10 mL do leite padronizado em 100 segundos a 30°C.

$$UR = \frac{10 \cdot V}{t \cdot v} \quad (1)$$

Onde: V = volume de leite (mL); t = tempo de coagulação (s); v = volume de coagulante utilizado (mL).

Após a determinação da atividade coagulante da enzima foi estabelecida a dose equivalente (mg/mL) em relação ao coagulante comercial para posterior utilização na elaboração de queijo cremoso a partir de uma formulação desenvolvida pelo grupo de trabalho do Instituto de Lácteos da Universidad Nacional del Litoral - Santa Fé - Argentina.

2.3.1 Preparo da solução coagulante

A solução coagulante utilizada nos ensaios foi preparada a partir da solubilização da enzima queratinase liofilizada em água destilada e armazenada a 4°C pelo período de 24 h para completa reidratação. Após esse período foi determinada sua atividade coagulante e a enzima aplicada em ensaios preliminares para o desenvolvimento do queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa.

2.4 Ensaios preliminares para o desenvolvimento do queijo cremoso

No sentido de se obter uma formulação viável e verificar a eficiência dos coagulantes e do fermento quando adicionados à mistura base para elaboração do queijo, foram realizados ensaios preliminares a partir de uma mistura padrão contendo nata, chia, quinoa, água, goma espina corona, gelatina, proteína concentrada de soro de leite, leite em pó desnatado, sorbato de potássio, citrato de cálcio, coagulante (enzima queratinase purificada, bruta e a enzima comercial) e fermento contendo uma mistura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* (Formulação 5 – Tabela 1). Foram realizados 6 ensaios diferentes: (1) Fermento + enzima purificada; (2) Enzima purificada (sem fermento); (3) Fermento + enzima bruta; (4) Enzima bruta (sem fermento); (5) Fermento + enzima comercial; e (6) Enzima comercial (sem fermento). Para tal, 200 g desta mistura padrão foram acondicionados em frascos de vidro e incubados em banho termostaticado a 40°C, sendo então adicionado o fermento (Yo-Flex®) e os diferentes coagulantes, conforme cada ensaio.

Durante o processo fermentativo foi verificado o pH e realizado o teste de consistência da massa coagulada (teste do palito), que consistia basicamente na introdução de uma haste ao centro do produto. A haste, quando ocorresse a formação de um coágulo firme, deveria se manter intacta em posição vertical, indicando coágulo viável para a elaboração do queijo cremoso. Além disso, foram verificados atributos como cor, aroma e sabor das amostras testadas.

2.5 Elaboração de queijo cremoso a partir da enzima purificada

Os queijos cremosos enriquecidos com farinha de chia e quinoa foram produzidos a partir do processo apresentado na Figura 1. Foram produzidos 12 kg de cada formulação e

envazadas em embalagens apropriadas e armazenadas a 10°C para análises posteriores. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. As cinco formulações (Tabela 1) foram elaboradas a partir do mesmo processo, contendo as mesmas proporções de água, goma espina corona, gelatina, proteína concentrada de soro de leite, leite em pó desnatado, sorbato de potássio, citrato de cálcio, coagulante (enzima queratinase purificada) e fermento. As formulações foram diferenciadas, no entanto, pelas distintas concentrações de nata, chia e quinoa, as quais foram selecionadas a partir de dados e estudos prévios do grupo de pesquisa em desenvolvimento de produtos lácteos (dados não mostrados).

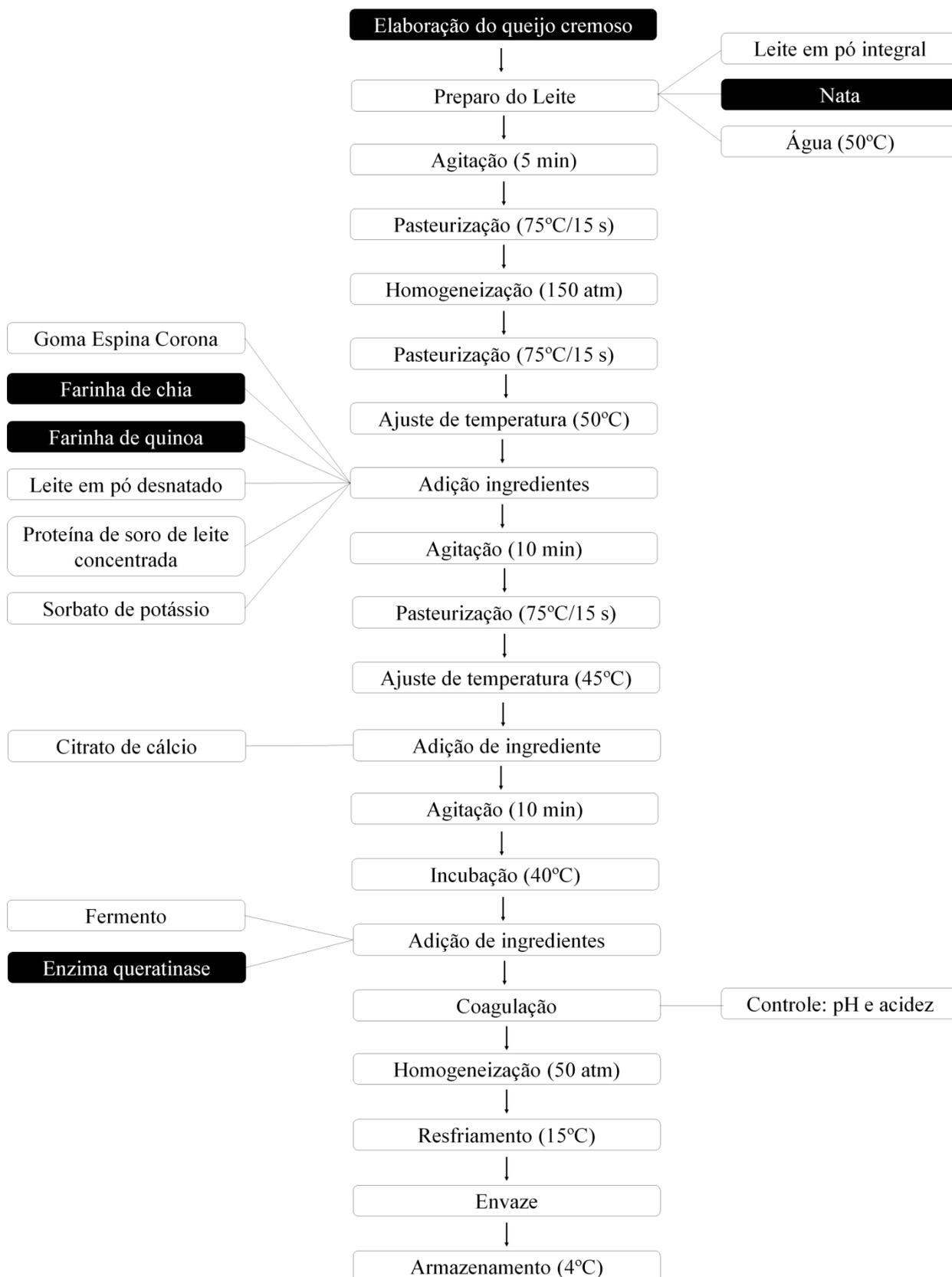
Tabela 1 – Formulações dos queijos cremosos elaborados a partir da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 e enriquecidos com chia e quinoa.

Ingredientes (%)	Formulações (%)				
	1	2	3	4	5
Nata	6	10	6	10	8
Farinha de chia	4,0	4,0	1,0	1,0	2,5
Farinha de quinoa	1,0	1,0	4,0	4,0	2,5

O leite utilizado na elaboração do queijo foi preparado a partir da mistura de leite em pó integral, nata e água a 50°C, seguido de agitação por 5 min. Posteriormente, o leite foi pasteurizado (75°C/15 s) e homogeneizado (150 atm). Após o processo de homogeneização o leite foi novamente pasteurizado (75°C/15 segundos) e a temperatura ajustada a 50°C para adição dos ingredientes: espina corona, polissacarídeo obtido da moagem do endosperma de sementes de espina corona (*Gleditsia amorphoides*) (SPOTTI et al., 2012); farinha de chia e quinoa; proteína de soro de leite concentrada; leite em pó desnatado e sorbato de potássio. A mistura foi agitada por 10 min e pasteurizada (75°C/15 segundos). O leite foi resfriado a 45°C e o citrato de cálcio foi adicionado. O leite foi acondicionado em banho termostatizado a 40°C, sendo adicionado o fermento (Yo-Flex®) contendo uma mistura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* e a enzima queratinase purificada.

O processo de coagulação foi acompanhado por análises de pH e acidez em intervalos de tempos pré-determinados, sendo interrompido quando a mistura atingisse pH entre 5,2 – 5,3. Após a coagulação, a massa coalhada foi submetida à homogeneização (50 atm) e resfriada a 15°C. O queijo cremoso pronto foi acondicionado em embalagens vedadas e armazenados a 4°C para análises posteriores.

Figura 1 – Fluxograma de elaboração do queijo cremoso enriquecido com chia e quinoa a partir da utilização da enzima queratinase purificada.



2.6. Determinação do pH e acidez durante a elaboração e armazenamento do queijo cremoso

O pH e acidez foram determinados durante o desenvolvimento e o armazenamento de cada formulação de queijo cremoso. O pH foi determinado por potenciometria e a acidez por titulação direta com NaOH 0,1 N utilizando fenolftaleína como indicador (AOAC, 2005). Os resultados foram determinados em Graus Dornic (°D) e convertidos para concentração de ácido láctico (mol/L).

2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância para detectar diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade coagulante da enzima

Tanto a enzima bruta como a enzima purificada foram altamente ativas em relação à atividade coagulante quando comparada ao coalho comercial (Tabela 2), mostrando força de coagulação do leite significativamente similares ($p > 0,05$) à quimosina comercial na concentração de 30 mg/mL e adequabilidade como coagulante alternativo.

Os resultados indicaram que o tempo de coagulação do leite é dependente da concentração da solução coagulante e diminui com o aumento da concentração de enzima utilizada, comportamento já conhecido na coagulação de leite (AHMED et al., 2010; BEKA et al., 2014). É possível verificar ainda uma relação linear entre o inverso da concentração de enzima na solução coagulante e o tempo de coagulação do leite para a enzima bruta e purificada (Figura 2) semelhante aos estudos de Chazarra et al. (2007) e Najéra, De-Renobales e Barron (2003), possibilitando assim, a predição do tempo de coagulação e atividade coagulante da enzima.

Os coágulos obtidos a partir das três enzimas apresentaram, visualmente, as mesmas características: estáveis e com soro exsudado transparente. A Figura 3 mostra o leite bovino coagulado pela ação da enzima queratinase em comparação com o controle.

Tabela 2 – Teste de coagulação para a enzima queratinase bruta, purificada e comercial.

Enzima	Concentração (mg/mL)	Tempo de coagulação (s)	Unidade de Renina
Bruta	10	239 ± 7,2 ^e	0,42 ± < 0,01 ^e
	20	140 ± 2,0 ^d	0,71 ± < 0,01 ^d
	30	105 ± 1,7 ^c	0,95 ± < 0,01 ^c
	40	85 ± 1,5 ^b	1,17 ± < 0,01 ^b
	50	76 ± 2,6 ^a	1,32 ± < 0,01 ^a
Purificada	10	264 ± 4 ^e	0,38 ± < 0,01 ^e
	20	141 ± 3 ^d	0,71 ± 0,01 ^d
	30	105 ± 2 ^c	0,96 ± 0,02 ^c
	40	82 ± 2 ^b	1,22 ± 0,02 ^b
	50	74 ± 2 ^a	1,36 ± 0,03 ^a
Comercial	1 mL	106 ± 1 ^c	0,96 ± 0,01 ^c

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ao nível de 5% de significância em relação ao coagulante comercial.

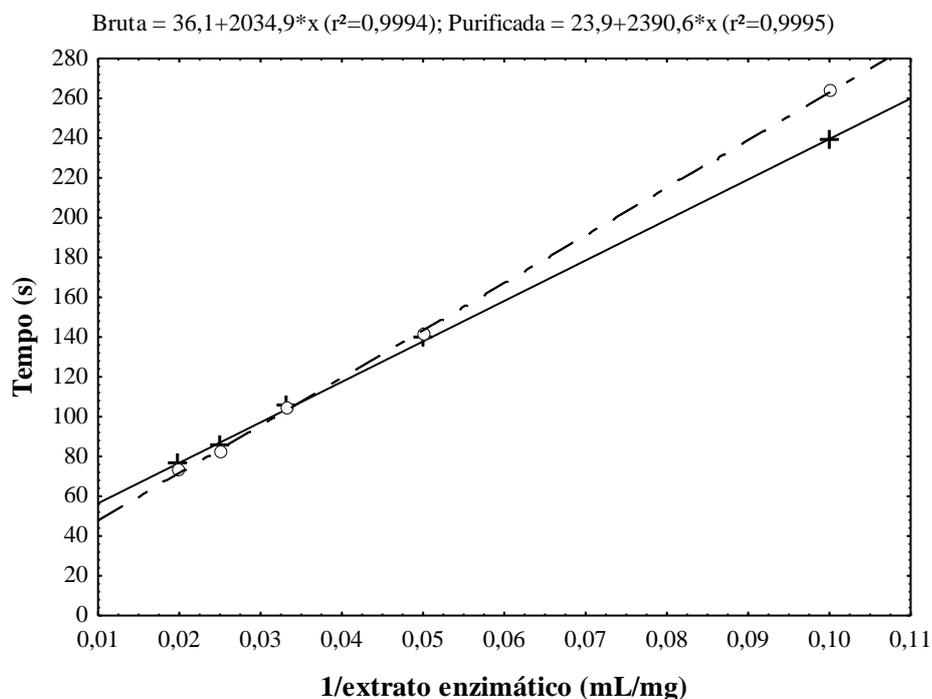
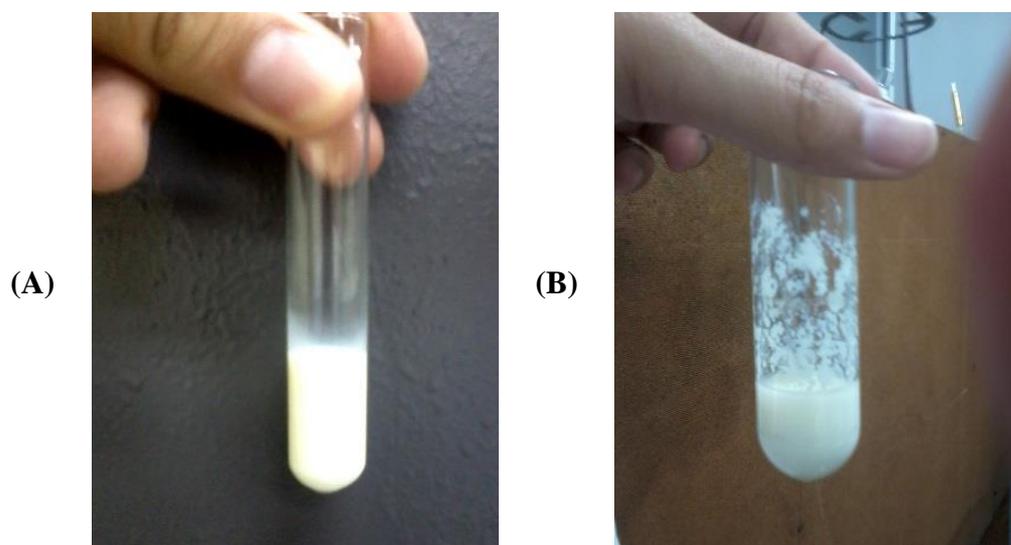
Figura 2 - Atividade coagulante da enzima queratinase bruta (+) e purificada (o) obtidas a partir do *Bacillus* sp. P45 em relação à concentração do extrato enzimático (mL/mg).

Figura 3 – Teste de coagulação do leite a partir da enzima queratinase purificada. (A) Teste controle (sem enzima) e (B) teste com adição da enzima.



Os dados obtidos a partir da aplicação da enzima queratinase nos testes de coagulação mostraram que, tanto a enzima purificada como a enzima bruta, poderiam ser alternativas interessantes como coagulantes substitutos ao coagulante comercial.

3.2 Ensaios preliminares com os coagulantes e fermento para o desenvolvimento do queijo cremoso

Os testes preliminares para verificação da viabilidade de utilização dos coagulantes alternativos e do fermento indicaram que todas as condições utilizadas levaram a formação de uma massa coagulada firme e resistente, indicado pela manutenção da haste (Figura 4) inserida na mistura padrão em posição vertical.

Além disso, foi possível verificar que todas as enzimas, na presença de fermento, coagularam o leite com uma consistência superior aos ensaios sem a adição de fermento. Nos ensaios sem fermento o processo de coagulação, utilizando tanto a enzima bruta quanto purificada, foram superiores aos ensaios utilizando enzima comercial, que apresentou um aspecto arenoso.

Todas as amostras, independentemente da enzima utilizada, apresentaram um aroma marcante de cereais, característico da quinoa, quando o fermento não foi adicionado a formulação. No entanto, com a adição do fermento, esse aroma, desagradável e forte, foi mascarado.

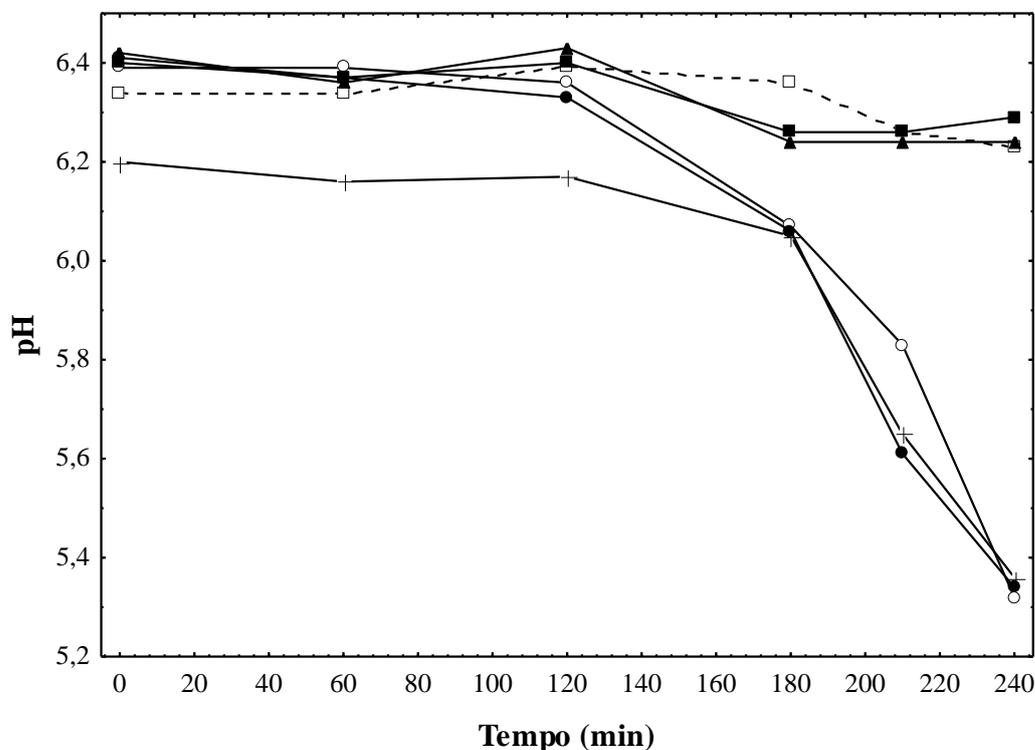
Figura 4 - Testes preliminares de verificação de viabilidade da utilização dos coagulantes e fermento quanto à formação de coágulos firmes (teste do palito).



Apesar da similaridade no teste de firmeza, foi possível notar (Figura 5) que nos ensaios utilizando apenas a enzima (sem adição de fermento) não ocorreu a redução do pH, permanecendo praticamente constante durante todo o processo (6,4 no início para 6,2 ao final do período de 2 h incubação). Já nos ensaios utilizando os três diferentes coagulantes, associados ao fermento, foi possível observar a redução do pH ao longo do tempo de incubação da mistura padrão (6,4 no início para 5,3 ao final das 2 horas de incubação).

A maior redução do pH nas amostras com adição de fermento ocorreu devido a fermentação láctica, que consiste na redução do ácido pirúvico, proveniente da glicólise, em ácido láctico. As bactérias do fermento, *S. termophilus* e *L. bulgaricus*, crescem simbioticamente, produzindo ácido láctico e compostos aromáticos, formando o coágulo. No início da fermentação, a acidez do leite (menor que 20° D) favorece o crescimento do *S. termophilus*, estimulado por alguns aminoácidos livres, especialmente a valina, produzidos pelo *L. bulgaricus*, o que provoca um aumento de acidez. Nesta fase, o *S. termophilus* libera ácido fórmico estimulante do desenvolvimento do *L. bulgaricus*. Quando se atinge aproximadamente 46° D, o meio torna-se pouco propício ao *S. termophilus*, favorecendo, assim, um maior e mais rápido desenvolvimento do *L. bulgaricus*, com produção de acetaldeído, sendo este o principal responsável pelo aroma característico de produtos lácteos fermentados.

Figura 5 – Testes preliminares para verificação de viabilidade da utilização dos coagulantes alternativos. (+) Fermento + enzima purificada; (□) Enzima purificada (sem fermento); (○) Fermento + enzima bruta; (▲) Enzima bruta (sem fermento); (●) Fermento + enzima comercial; (■) Enzima comercial (sem fermento).



Além disso, com o aumento da acidez, o pH aproxima-se do ponto isoelétrico das proteínas do leite (4,6), ocorrendo a coagulação e formação da coalhada (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Em relação ao uso exclusivo de enzimas coagulantes, a coagulação, na maioria dos processos de obtenção de queijos, ocorre por hidrólise específica da ligação peptídica fenilalanina₁₀₅ – metionina₁₀₆ na *k*-caseína, que provoca a desestabilização da micela de caseína e uma subsequente agregação, resultando na transformação do leite em coalhada (KUMAR et al., 2010).

Apesar de apresentarem propriedades semelhantes, em relação as características do coágulo formado, a coagulação realizada apenas com enzimas proteolíticas não é interessante, visto que não ocorre a redução de pH e, conseqüentemente, a produção de ácido láctico. Além disso, não são gerados os compostos responsáveis pelo aroma e sabor característicos do produto.

Adicionalmente, as farinhas de chia e quinoa, presentes na formulação, apresentam aroma intenso de cereais, e que podem ser mascarados quando o fermento é utilizado, não interferindo assim na aceitação do produto pelos consumidores.

Apesar da similaridade na atividade coagulante e nos testes preliminares de firmeza, a enzima purificada (Figura 6B) destaca-se para aplicação no processo de elaboração do queijo cremoso, uma vez que foi verificado que a enzima bruta apresentava odor acético intenso e coloração marrom (Figura 6A), podendo interferir na coloração e odor do produto, e conseqüentemente na aceitação por parte dos consumidores. Desta forma, a enzima purificada, juntamente com o fermento, foi escolhida e aplicada na coagulação do leite e no processo de elaboração do queijo cremoso enriquecido com chia e quinoa.

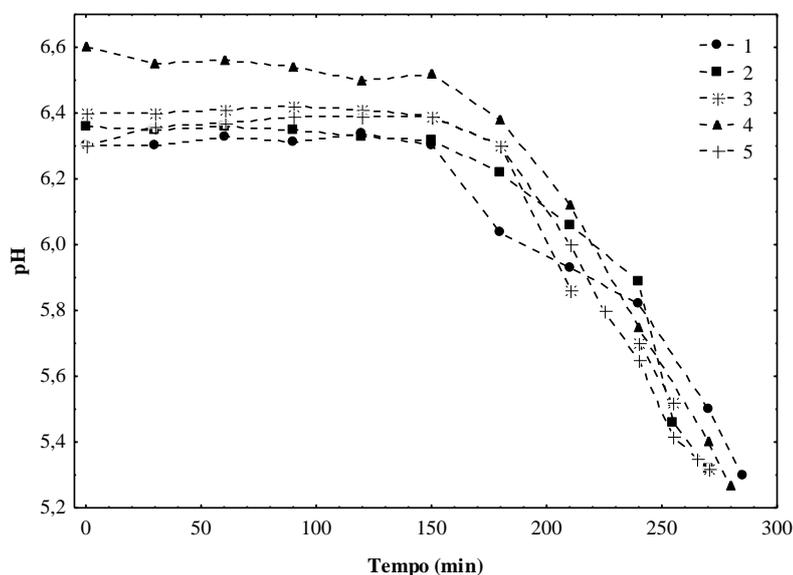
Figura 6 – Enzima queratinase bruta (A) e purificada (B) obtidas a partir do cultivo do *Bacillus* sp. P45.



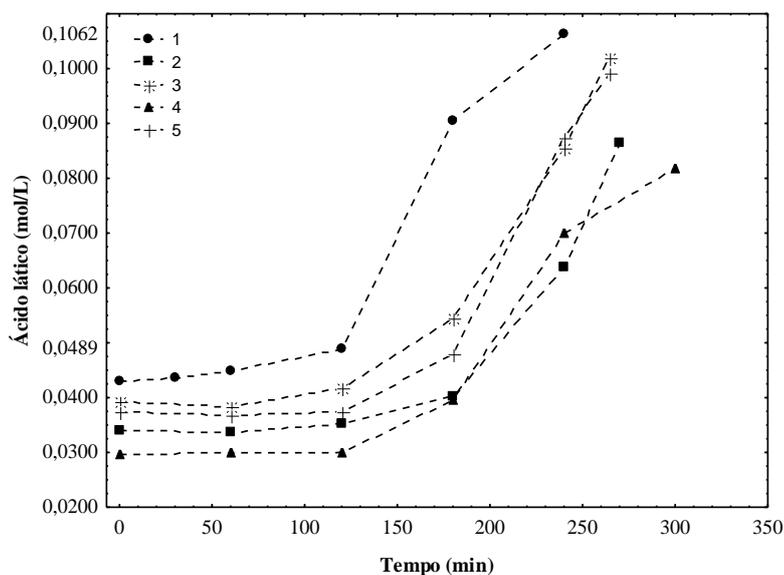
3.3 Acompanhamento do pH e acidez durante a elaboração e armazenamento do queijo cremoso

O processo de fermentação foi acompanhado pelo pH e acidez das diferentes formulações como mecanismo de controle para interrupção do processo fermentativo (Figura 7), o qual deve ocorrer próximo a 5,4. É possível observar comportamento semelhante, independentemente da formulação, no declínio de pH e aumento proporcional na produção de ácido lático em todas as formulações elaboradas. O pH durante a fermentação variou de 6,6 - 6,3 no início do processo a 5,3 ao término da elaboração do produto. Já a produção de ácido lático variou de 0,02 - 0,03 no início do processo a 0,06 - 0,1 mol/L ao final do processo fermentativo com duração de aproximadamente 5 h.

Figura 7 – pH (A) e acidez (B) das formulações elaboradas a partir a enzima queratinase purificada durante o processo fermentativo. 1 - Nata 6%; Chia 4%; Quinoa 1%; 2 - Nata 10%; Chia 4%; Quinoa 1%; 3 - Nata 6%; Chia 1%; Quinoa 4%; 4 - Nata 10%; Chia 1%; Quinoa 4%; 5 - Nata 8%; Chia 2,5%; Quinoa 2,5%.



(A)



(B)

A redução do pH e aumento da acidez ocorre pois, uma vez que o fermento contendo a mistura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* é adicionado à formulação do produto, se inicia a fermentação ácido-láctica, onde os micro-organismos fermentativos utilizam e hidrolisam a lactose em glicose e galactose, sendo a glicose posteriormente transformada em ácido láctico. A formação de ácido láctico provoca a queda do valor do pH durante a fermentação e também durante o armazenamento do queijo, pois grande parte das enzimas permanecem ativas e os micro-organismos

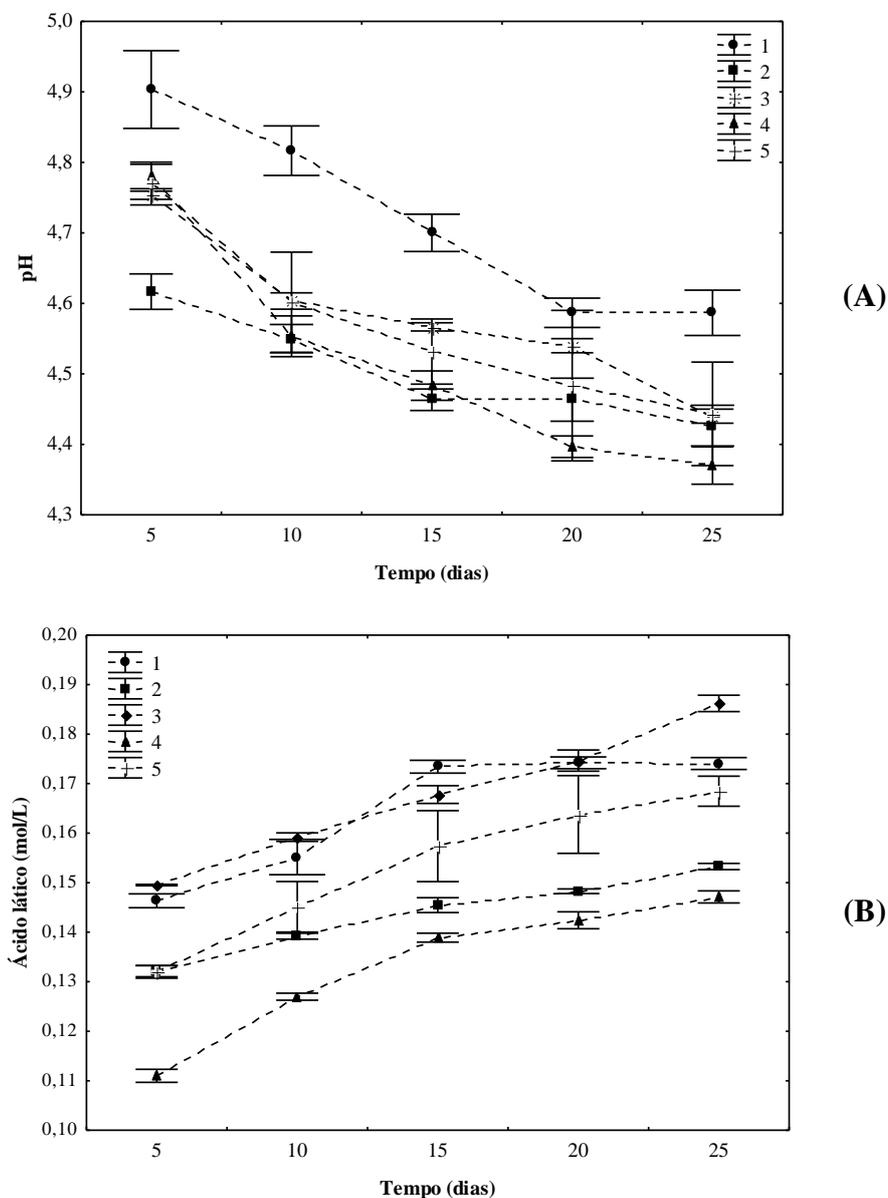
continuam viáveis. Este efeito, no entanto, é menos marcante durante o armazenamento devido ao fato de se utilizar baixas temperaturas (ROJAS-CASTRO; CHACÓN-VILLALOBOS; PINEDA-CASTRO, 2007).

A redução do pH, além de conferir as características sensoriais específicas do produto, é importante para prevenir o crescimento de bactérias patogênicas. A variação do pH durante o armazenamento depende também da capacidade de tamponamento do queijo, devido a quantidade de proteínas e minerais presentes, para a formação de amônio e/ou para o catabolismo de ácido lático (LAWRENCE; HEAP; GILLES, 1984; MERHEB-DINI et al., 2012).

A redução do pH (Figura 8A) e a elevação da acidez do produto (Figura 8B) para todas as formulações de queijo cremoso durante o período de 25 dias de armazenamento foi observado. Pode-se verificar que durante os primeiros dez dias de armazenamento a queda do pH e produção de ácido lático é mais pronunciada que nos períodos seguintes, chegando quase a se estabilizar ao final do armazenamento. Isto se deve a **(i)** inibição da atividade enzimática da cultura láctica, **(ii)** redução da carga microbiana, representada pelo fermento utilizado, e **(iii)** esgotamento da lactose disponível aliado à baixa temperatura (ROJAS-CASTRO; CHACÓN-VILLALOBOS; PINEDA-CASTRO, 2007; TAMIME; ROBINSON, 1985).

Os valores de pH e proporcional acidez, assim como a estabilização do pH e menor produção de ácido lático das amostras ao final do período de armazenamento, é um fenômeno natural e desejável durante a elaboração de produtos lácteos fermentados e é descrita por diversos autores. Olmedo, Nepote e Grosso (2013) verificaram que durante os 35 dias de armazenamento a acidez aumentou e o pH diminuiu em todas as formulações de queijos cremosos aromatizados com óleos essenciais de orégano e alecrim. O pH verificado para estes produtos permaneceu entre 4,4 - 4,8 e o ácido lático produzido de 0,8 a 1,8 (mg ácido lático/100g de queijo). Já Brighenti et al. (2008) encontraram valores de pH entre 4,6 a 5,4 para 18 diferentes amostras de queijos cremosos comerciais durante o estudo de caracterização das propriedades reológicas e de textura de queijos com diferentes níveis de gordura. Deegan et al. (2014), por sua vez, verificaram valores de pH entre 5,4 - 5,6 durante o desenvolvimento de queijos com reduzido teor de gordura. Menor pH foi verificado para amostras produzidas a partir de leite com teor integral de gordura quando comparado as amostras elaboradas com leite de reduzido teor de gordura.

Figura 8 – pH (A) e acidez (B) das 5 formulações elaboradas a partir a enzima queratinase purificada durante o armazenamento por 25 dias. 1 - Nata 6%; Chia 4%; Quinoa 1%; 2 - Nata 10%; Chia 4%; Quinoa 1%; 3 - Nata 6%; Chia 1%; Quinoa 4%; 4 - Nata 10%; Chia 1%; Quinoa 4%; 5 - Nata 8%; Chia 2,5%; Quinoa 2,5%.



Considerando os dados encontrados para os queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa, elaborados a partir da enzima purificada, pode-se constatar que, os valores de acidez e pH, são os que, habitualmente, são verificados e reportados para este tipo de produto, inclusive os comerciais. As propriedades das sementes de chia e quinoa, tais como teor de aminoácidos e ácidos graxos essenciais, elevado conteúdo de proteínas, fibras, minerais, alta atividade antioxidante, proteção contra oxidação lipídica e potencial na prevenção de processos inflamatórios, câncer e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativos, tais

como a aterosclerose, sugerem, portanto, o uso como ingredientes potencialmente funcionais (AYERZA; COATES, 2011; GAWLIK-DZIKI et al., 2013; MADL; STERK; MITTELBACH, 2006; MARINELI et al., 2014; NSIMBA; KIKUZAKI; KONISHI, 2008; STIKIC et al., 2012; ZHUN et al., 2002).

4 CONCLUSÃO

A protease purificada obtida a partir do *Bacillus* sp. P45 apresentou alta atividade coagulante e foi capaz de hidrolisar as proteínas presentes no leite, sendo empregada de forma eficiente na produção de um queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa, componentes com potencial funcional.

As cinco formulações de queijos cremosos apresentaram valores finais de pH de 5,3 e acidez de 0,06 a 0,1 mol/L. Durante o período de armazenamento (25 dias) foi verificada a redução do pH e a elevação da acidez para todas as formulações de queijo cremoso, com posterior estabilização do pH e menor produção de ácido láctico ao final do período de armazenamento, fenômeno natural e desejável em produtos lácteos fermentados.

Os resultados apontaram de maneira positiva a aplicação da enzima purificada como alternativa para o desenvolvimento de processos biotecnológicos inovadores, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de novos produtos lácteos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, I. A.; MORISHIMA, M. I.; BABIKER, E. E.; MORI, N. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. **Food Chemistry**, v. 116, p. 395-400, 2009.

AOAC International. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18th ed. International Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2005.

AYERZA, R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1366-1371, 2011.

BEKA, R. G.; KRIER, F.; BOTQUIN, M.; GUIAMA, V. D.; DONN, P.; LIBOUGA, D. G.; MBOFUNG, C. M.; DIMITROV, K.; SLOMIANNY, M. C.; GUILLOCHON, D.; VERCAIGNE-MARKO, D. Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 25-31, 2014.

BERRIDGE, N. J. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. **Journal of Dairy Research**, v. 19, p. 328-332, 1952.

BRIGHENTI, M.; GOVINDASAMY-LUCEY, S.; LIM, K.; NELSON, K.; LUCEY, J. A. Characterization of the rheological, textural, and sensory properties of samples of commercial us cream cheese with different fat contents. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4501-4517, 2008.

CAPITANI, M. I.; SPOTORNO, V.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 94-102, 2012.

CHAZARRA, S.; SIDRACH, L.; LOPEZ-MOLINA, D.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1393-1400, 2007.

CORRONS, M. A.; BERTUCCI, J. I.; LIGGIERI, C. S.; LÓPEZ, L. M. I.; BRUNO, M. A. Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, p. 103-109, 2012.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 358-363, 2009.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.

DEEGAN, K. C.; HOLOPAINEN, U.; MCSWEENEY, P. L. H.; ALATOSSAVA, T.; TUORILA, H. Characterisation of the sensory properties and market positioning of novel reduced-fat cheese. **Innovative Food Science Emergency and Technology**, v. 21, p. 169-178, 2014.

GALÁN, E.; CABEZAS, L.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. **International Dairy Journal**, v. 25, p. 92-96, 2012.

GAWLIK-DZIKI, U.; SWIECA, M.; SUŁKOWSKI, M.; DZIKI, D.; BARANIAK, B.; CZYZ, J. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts – In vitro study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 154-160, 2013.

- HEADON, D. R.; WALSH, G. The industrial production of enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 12, p. 635-646, 1994.
- JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Review - Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 14–33, 2011.
- KUMAR, A.; GROVER, S.; SHARMA, J.; BATISH, V. K. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 243-258, 2010.
- LAWRENCE, R. C.; HEAP, H. A.; GILLES, J. A controlled approach to cheese technology. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1632-1645, 1984.
- MADL, T.; STERK, H.; MITTELBAACH, M. Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, p. 795-806, 2006.
- MARINELI, R. S.; MORAES, E. A.; LENQUISTE, S. A.; GODOY, A. T.; EBERLIN, M. N.; MARÓSTICA-JR, M. R. Chemical characterization and antioxidant potential of *Chilean chia* seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 1304-1310, 2014.
- MAZORRA-MANZANO, M. A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J. M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 325-330, 2013(a).
- MAZORRA-MANZANO, M. M.; PEREA-GUTIÉRREZ, T. C.; LUGO-SÁNCHEZ, M. E.; RAMIREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CORDOBA, B. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1902–1907, 2013(b).
- MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A. C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, p. 859–865, 2012.
- NAJÉRA, A. I.; DE-RENOBALES, M.; BARRON, L. J. R. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. **Food Chemistry**, v. 80, p. 345-352, 2003.
- NSIMBA, R. Y.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. **Food Chemistry**, v. 106, p. 760-766, 2008.
- OLMEDO, R. H.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 409-417, 2013.

- ROJAS-CASTRO, W. N.; CHACÓN-VILLALOBOS, A.; PINEDA-CASTRO, M. L. Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. **Agronómica Mesoamérica**, v. 18, p. 221-237, 2007.
- ROLET-RÉPÉCAUD, O.; BERTHIER, F.; BEUVIER, E.; GAVOYE, S.; NOTZ, E.; ROUSTEL, S.; GAGNAIRE, V.; ACHILLEOS, C. Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 459-468, 2013.
- ROSEIRO, L. B.; BARBOSA, M.; AMES, J. M.; WILBEY, R. A. Cheese making with vegetable coagulants e the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 76-85, 2003.
- SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S.J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 2016–2024, 2014.
- SHAMTSYAN, M.; DMITRIYEVA, T.; KOLESNIKOV, B.; DENISOVA, N. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, p. 343–347, 2013.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. Ed. Varela. São Paulo, SP 295p. 1997.
- SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 52, p. 357-363, 2006.
- SPOTTI, M. J.; SANTIAGO, L. G.; RUBIOLO, A. C.; CARRARA, C. R. Mechanical and microstructural properties of milk whey protein/espina corona gum mixed gels. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 69-74, 2012.
- STIKIC, R.; GLAMOCLJIA, D.; DEMIN, M.; VUCELIC-RADOVIC, B.; JOVANOVIC, X.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; JACOBSEN, S. E.; MILOVANOVIC, M. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 132-138, 2012.
- TAMIME, A.; ROBINSON, R. **Yoghurt: science and technology**. Pergamon Press. Gran Bretaña. 1985.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Ed. ArtMed. 894p. 2005.
- TRUJILLO, A. J.; GUAMIS, B.; LAENCINA, J.; LOPEZ, M. B. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. **Food Chemistry**, v. 71, p. 449-457, 2000.
- ZHUN, N.; SHENG, S.; SANG, S.; JHOO, J. W.; KARWE, M. V.; ROSEN, R. T.; HO, C. T. Triterpene saponins from debittered quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 865-867, 2002.

**ARTIGO 3: PERFIL DE UM QUEIJO CREMOSO ENRIQUECIDO COM FARINHA
DE CHIA E QUINOA**

PERFIL DE UM QUEIJO CREMOSO ENRIQUECIDO COM FARINHA DE CHIA E QUINOA

RESUMO

O mercado mundial de queijos vem crescendo a cada ano, e com isso, aumentando a necessidade do desenvolvimento de produtos lácteos inovadores que atendam as expectativas do mercado consumidor, em virtude da busca por produtos mais saudáveis. Os queijos possuem propriedades que definem sua qualidade e aceitação pelo consumidor, tais como textura, sabor, composição, capacidade de retenção de água, sinérese, entre outros. Desta forma, quando um novo produto é desenvolvido, faz-se necessário a avaliação dos principais atributos que podem interferir na aceitação ou recusa deste produto pelo público alvo. O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros tecnológicos de um queijo cremoso enriquecido com chia e quinoa. O produto desenvolvido apresentou alto índice de retenção de água ($\geq 99,0\%$) e baixos valores de sinérese (0,72%). Além disso, o processamento empregado e os componentes da formulação foram suficientes para garantir condições higiênico-sanitárias satisfatórias em relação a *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, coliformes totais, coliformes termotolerantes, contagem total de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras. As características tecnológicas e o perfil sensorial demonstraram que o produto desenvolvido é estável e inovador, atendendo as expectativas do mercado em relação a este tipo de produto.

Palavras-chave: protease, queijo cremoso, chia, quinoa.

ABSTRACT

The world cheese market is growing every year, and thus, increasing the need for the development of innovative dairy products that meet the expectations of the consumer, mainly due to the search for healthier products that contributes with benefits to the human healthy. The cheeses have properties that define its quality and acceptability by the consumer, such as texture, composition, water holding capacity, syneresis, among others. Thus, when a new product is developed, it is necessary to evaluate the main attributes that can interfere with the acceptance or refusal of this product by the consumer. The objective of this study was to evaluate the technical parameters of a cream cheese enriched with chia and quinoa. The product developed showed high water retention value ($\geq 99,0\%$) and low syneresis values (0.72%). In addition, the employee processing and formulation components were sufficient to ensure satisfactory sanitary conditions for *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, total coliforms, fecal coliforms, total count of aerobic mesophilic, molds and yeasts. The technological characteristics and the sensory profile found showed that the product developed is highly stable and innovative, meeting the market's expectations for this type of product.

Keywords: protease, cream cheese, chia, quinoa.

1 INTRODUÇÃO

O queijo é um produto lácteo, que desempenha um papel fundamental na nutrição humana há séculos. Uma ampla gama de diferentes queijos é disponível, e suas características são baseadas nas condições da tecnologia de produção empregada e que tem sido aprimorada. Em resumo, o principal objetivo da obtenção de qualquer tipo de queijo é converter o leite, que é perecível, em um produto com vida útil mais longa, preservando seus nutrientes (HINRICHS, 2001) e conferindo sabores característicos.

Segundo a Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (MAPA, 1996).

O queijo cremoso é um tipo de queijo untável que se obtém através da coagulação do leite utilizando-se uma cultura *starter* contendo uma mistura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, além de um agente coagulante. A coalhada obtida é homogeneizada e posteriormente acondicionada em embalagens apropriadas. Caracteriza-se por ter uma consistência fina, untuosa, macia e de sabor levemente ácido (ALBUQUERQUE, 2002; SAINANI; VYAS; TONG, 2004). Diversos processos são empregados na fabricação, mas a versão tradicional preconiza as etapas de padronização quanto ao teor de gordura, pasteurização, homogeneização, inoculação e fermentação. Após a obtenção da coalhada, esta é novamente homogeneizada, resfriada e embalada (FURTADO; NETO, 1994).

A coagulação do leite, na maioria dos processos de obtenção de queijos, é causada pela ação das proteases sobre as proteínas do leite. A hidrólise específica da ligação peptídica fenilalanina₁₀₅ – metionina₁₀₆ na *k*-caseína provoca a desestabilização da micela de caseína e uma subsequente agregação, resultando na transformação do leite em coalhada (KUMAR et al., 2010). A coagulação enzimática do leite, utilizando proteases, em combinação com a fermentação, é um meio eficaz de se obter a coalhada sem perdas significativas de proteínas no soro de leite.

Uma enzima proteolítica produzida por *Bacillus* sp. P45 e obtida a partir de uma estratégia de purificação (SALA et al., 2014) foi eficientemente empregada na coagulação

enzimática de leite bovino e utilizada na elaboração de um queijo cremoso enriquecido com farinha de chia (*Salvia hispanica* L.) e quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) (LEMES et al., 2014), as quais apresentam componentes que aportam benefícios à saúde, destacando-se pelo seu alto teor de aminoácidos essenciais, proteínas, fibras, minerais, alta atividade antioxidante, proteção contra oxidação lipídica e prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, sugerindo a utilização como ingredientes funcionais para uso durante o desenvolvimento de novos alimentos (AYERZA; COATES, 2011; GAWLIK-DZIKI et al., 2013; MADL; STERK; MITTELBAACH, 2006; MARINELI et al., 2014; NSIMBA; KIKUZAKI; KONISHI, 2008; STIKIC et al., 2012; ZHUN et al., 2002).

Durante o desenvolvimento de novos produtos lácteos, as propriedades tecnológicas e sensoriais são importantes para determinar a viabilidade do seu processamento, assim como a determinação das propriedades reológicas, da textura do produto, do pH, da acidez, da capacidade de retenção de água, da sinérese, e dos atributos sensoriais, que indicam a aceitação do produto pelo consumidor (AICHINGER et al., 2003). Durante o armazenamento a liberação de soro na superfície do produto, denominada sinérese, que é visualizada pelo consumidor, representa um defeito indesejável e deve ser evitado. Além disso, a acidificação e alterações do pH provenientes da utilização de novos coagulantes, podem afetar as propriedades tecnológicas do leite coagulado, demonstrando que as condições de coagulação e temperatura de incubação, podem afetar tais características e, por isso, devem, ser avaliadas na etapa de desenvolvimento do produto lácteo.

Algumas análises das propriedades tecnológicas em queijos são importantes, também, para estabelecer padrões de qualidade que garantirão a uniformidade dos novos produtos desenvolvidos em todos os processamentos (FOX et al., 2000; SHOEMAKER et al., 1992; VELEZ-RUIZ; BARBOSA-CANOVAS, 1997).

Não há ainda, de nosso conhecimento, qualquer dado dos parâmetros tecnológicos e físico-químicos de queijo cremoso enriquecido com chia e quinoa, elaborado a partir de um novo coagulante. Além disso, considerando a necessidade de padronizar o processo de fabricação do queijo cremoso enriquecido com chia e quinoa e, pelo aumento da consciência dos consumidores por produtos alternativos e saudáveis, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características tecnológicas, físico-químicas e sensoriais de um produto lácteo inovador, o queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação das propriedades tecnológicas, físico-químicas e sensoriais (Figura 1) foi realizada para cinco formulações de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa, elaborados conforme descrito por Lemes et al. (2014) a partir do uso de uma protease de *Bacillus* sp. P45. Todas as formulações, elaboradas a partir do mesmo processo, apresentam as mesmas proporções de água, espina corona, gelatina, proteína concentrada de soro de leite, leite em pó desnatado, sorbato de potássio, citrato de cálcio, coagulante (enzima queratinase purificada) e fermento, sendo diferenciadas, no entanto, pelas distintas concentrações de nata e relação chia/quinoa (Figura 1). Amostras armazenadas adequadamente a 10°C foram utilizadas para a verificação do perfil dos queijos cremosos. As concentrações estabelecidas, as análises, assim como sua periodicidade foram baseadas em dados e estudos prévios (dados não mostrados) do grupo de pesquisa do Instituto de Tecnologia de Lácteos da Universidad Nacional del Litoral – Argentina.

As seguintes análises durante os 25 dias de armazenamento foram realizadas em triplicata: pH e acidez (cada 5 dias); perfil de textura, retenção de água e sensorial (dias 1, 13 e 25 de armazenamento); atividade de água e sólidos totais (13° dia de armazenamento). Além disso, foram realizadas análises para verificação da composição química das diferentes formulações e avaliação das condições higiênico-sanitárias do produto através da determinação de *Staphylococcus* coagulase positiva; *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e termotolerantes, contagem total de mesófilos aeróbios e bolores e leveduras (25° dia de armazenamento).

2.1 Avaliação das propriedades tecnológicas e sensoriais dos queijos cremosos

2.1.1 Retenção de água e sinérese

A determinação do índice de retenção de água (%IRA) dos queijos enriquecidos com chia e quinoa foram realizadas durante o armazenamento pelos métodos de centrifugação e de gravimetria. O IRA por centrifugação foi determinado através da centrifugação das amostras a 2000 rpm, 10°C, durante 20 min. Após, o sobrenadante foi drenado e os frascos pesados para determinação do índice de retenção de água (Equação 1) e da sinérese (Equação 2).

$$\%IRA = 100 - \left(\frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Sinérese} = 100 - \% \text{ IRA} \quad (2)$$

O índice de retenção de água dos queijos por gravimetria foi determinado através da pesagem dos tubos contendo as amostras armazenadas a 4°C em embalagens apropriadas contendo 50 g de amostra. O fluido sobrenadante presente na superfície das amostras foi drenado e os frascos pesados para determinação do %IRA e da sinérese.

2.1.2 Determinação da atividade de água (A_w) e composição química dos queijos

A A_w das diferentes formulações de queijo foi determinada a 25°C por meio do equipamento Aqua Lab modelo CX-2T - Decagon. A determinação da composição química foi realizada em relação à umidade, proteínas, lipídios, fibras, cinzas e sólidos solúveis segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). A determinação de carboidratos foi realizada por diferença e o valor calórico calculado a partir da soma do teor de proteínas x 4, lipídios x 9 e carboidratos x 4 (HORWITZ, 1997).

2.1.3 Análise do perfil de textura instrumental

O perfil de textura dos queijos foi determinado durante seu armazenamento através de dupla penetração realizada pelo texturômetro Instron Bluehill® a partir da curva de esforço em Newton (N) *versus* tempo (s). Foram determinadas as propriedades mecânicas de dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, mastigabilidade, gomosidade e resiliência (SANTINI et al., 2007). Os parâmetros utilizados foram: profundidade de penetração de 30 mm, velocidade de 1 mm/s, cerca de 10 N, diâmetro do penetrômetro de 12 mm, diâmetro de proveta de 36 mm, temperatura de 10°C.

2.1.4 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas em relação à contagem de bolores e leveduras, coliformes totais e termotolerantes, mesófilos aeróbios, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, seguindo os métodos oficiais (DOORES; SALFINGER; TORTORELLO, 2013).

2.1.5 Avaliação sensorial dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa

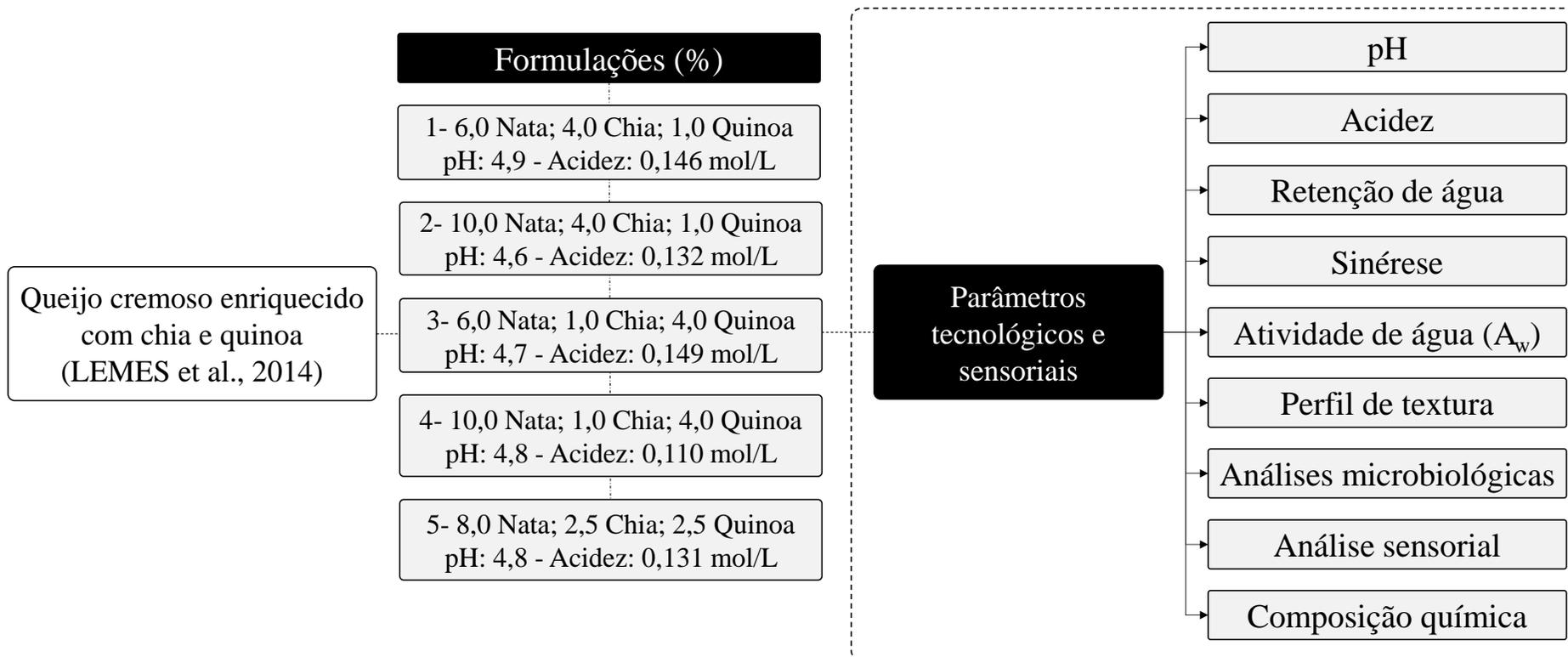
Os atributos sensoriais de textura e sabor foram avaliados para as cinco formulações termostatizadas a 10°C, mediante um painel de avaliadores treinados (Área de Avaliação Sensorial do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITA), FIQ, UNL), que utilizaram descritores de referências e escalas apropriadas para caracterizar este tipo de produto. O painel de avaliadores treinados realizou a avaliação em cabines individuais, ambientadas e equipadas para conferir ótima concentração do avaliador durante o ensaio. As amostras foram acondicionadas, codificadas e apresentadas aos avaliadores pela equipe treinada da área de avaliação sensorial mencionada. Os descritores de textura foram: consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência. As referências para a escala não estruturada de nove pontos para a consistência foram: 1 = forma fio que entra deixando um buraco que se fecha imediatamente; e 9 = Cai em bloco e se espalha pouco. Para o resto dos descritores de textura, os extremos da escala correspondente foram desde 1 = quase nada a 9 = muito.

O sabor foi analisado qualitativamente e quantitativamente, os descritores foram: ácido, salgado, doce, sabor a crema, soro, leite em pó e cozido. As referências para a escala utilizada nestes casos foram: 1 = apenas perceptível; 3 = pouco perceptível; 5 = moderadamente perceptível; 7 = muito perceptível e 9 = extremamente perceptível. Além disso, quando detectaram defeitos (sabores atípicos), classificaram e quantificaram usando as mesmas referências empregadas para os descritores de sabor.

Os resultados foram expressos como valor médio e seus respectivos desvios padrões, sendo analisados estatisticamente mediante análise de variância (ANOVA). Todas as análises foram feitas com 5% de nível de significância.

2.2 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância para detectar diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Figura 1 – Parâmetros tecnológicos, físico-químicos e sensoriais avaliados no queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Propriedades tecnológicas e sensoriais do queijo cremoso

3.1.1 Atividade de água e composição química

A composição química dos queijos mostrou uma composição típica deste tipo de produto, com resultados semelhantes em relação a proteínas, lipídios, umidade, cinzas e fibras (Tabela 1), estando os parâmetros dentro do esperado e indicado na literatura.

O teor de cinzas nas cinco formulações variou de 1,23 a 1,69%, com maior concentração na formulação 1, que contém menor concentração de nata e quinoa e maior concentração de chia. O teor de lipídios foi, de certo modo, proporcional ao conteúdo de nata adicionada durante a elaboração, sendo significativamente maior para as amostras 2, 4 e 5, que apresentaram 10% de lipídios. Enquanto as amostras 1 e 3 apresentaram 7,0 e 5,5%, respectivamente.

O conteúdo de umidade das cinco formulações foi superior a 70,0 %, sendo classificados pela legislação específica (ANVISA, 2001) como um produto de muito alta umidade, correspondente ao esperado para queijo cremoso.

A atividade de água dos queijos cremosos foi igual para todas as formulações (0,96), independente da concentração de nata e farinha de chia e quinoa utilizada. A determinação deste parâmetro é importante uma vez que está relacionado com a água disponível em um alimento que pode ser utilizada pelos micro-organismos para seu metabolismo. Além de promover a viabilidade das bactérias lácticas iniciadoras empregadas no processamento, pode ser utilizada por outros micro-organismos, incluindo os patogênicos e deterioradores, que ao se desenvolverem podem alterar a qualidade do produto e causar problemas à saúde humana.

O teor de fibras variou de 3,00 a 4,96%, sendo que a formulação 3 apresentou o maior conteúdo deste componente. Para um alimento ser considerado fonte de fibra alimentar deve conter em sua formulação pelo menos 3 g de fibra/100g (ANVISA, 2012). Desta forma, todas as formulações podem ser consideradas como fonte de fibra alimentar. Este fato é importante, uma vez que a ingestão de fibras vem diminuindo e causando distúrbios alimentares consideráveis, assim o desenvolvimento de produtos com elevados teores de fibras podem minimizar tais problemas e estimular um estilo de vida saudável. O aumento da expectativa de vida tem gerado grande interesse em alimentos que previnem doenças como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, obesidade e câncer de cólon, doenças que podem

ser prevenidas a partir do consumo de fibras (THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003).

O teor de proteínas variou de 5,4 a 7,4%, sendo significativamente maior para as amostras 1 e 3, com menor concentração de nata e maior de chia e quinoa, respectivamente. Isto indica a utilização destes produtos como fonte de proteínas no que diz respeito ao aporte de aminoácidos essenciais contidos nas sementes de chia e quinoa (MADL; STERK; MITTELBAACH, 2006).

A composição química das cinco formulações foi similar a outros tipos de queijos cremosos descritos na literatura. Lazzaroni (2014) verificou valores médios de 8,13% de proteínas, 70,18% de umidade, 13,7% de carboidratos, 6,1% de lipídio e 1,9% de cinzas em um queijo cremoso com reduzido teor de lipídios e colesterol. Além disso, foi verificado uma A_w entre 0,97 e 0,98. O pH do produto variou de 4,9 ao início do armazenamento (1º dia) a 4,8 ao 29º dia de armazenamento. Zulkunair et al. (2008) encontraram valores médios de 12,2% de lipídios, 15,4% de carboidratos, 10,6% de fibras, 63,8% de umidade, 4,3% de proteínas e 5,4% de cinzas em queijos cremosos elaborados à base de soja. Já Souza et al. (2012) encontraram valores de 62,4% de umidade, 7,95% de proteínas, 6,6% de lipídios, 1,0% de cinzas e 22,5% de carboidratos.

O enriquecimento nutricional de alimentos como os queijos cremosos, além de melhorar a qualidade da alimentação, resulta em novos produtos que atendem a uma nova demanda do mercado. Além disso, adição de componentes em alimentos industrializados que aportem benefícios ao organismo humano apresentam vantagens nutricionais e tecnológicas, tais como melhora do valor nutricional, aumento da retenção de umidade, melhora da textura e elasticidade (JIDEANI, 2011), justificando o uso das sementes de chia e quinoa como forma de enriquecimento.

Tabela 1 – Composição química dos queijos cremosos elaborados a partir da enzima queratinase purificada e enriquecidos com chia e quinoa.

	Amostras				
	1	2	3	4	5
Umidade (%)	72,24 ± 0,46 ^{bc}	73,42 ± 0,32 ^{ab}	72,04 ± 0,52 ^c	74,2 ± 0,51 ^a	73,01 ± 0,1 ^{abc}
Proteínas (%)	7,4 ± 0,21 ^a	5,7 ± 0,37 ^c	6,9 ± 0,62 ^{ab}	5,4 ± 0,42 ^c	6,2 ± 0,27 ^{bc}
Lipídios (%)	7,0 ± 0,72 ^b	10,0 ± 0,47 ^a	5,5 ± 0,62 ^b	10,0 ± 0,25 ^a	10,0 ± 0,82 ^a
Fibras (%)	3,54 ± 0,32 ^b	3,0 ± 0,81 ^b	4,96 ± 0,09 ^a	3,44 ± 0,07 ^b	4,08 ± 0,68 ^{ab}
Cinzas (%)	1,69 ± 0,02 ^a	1,29 ± 0,04 ^d	1,59 ± 0,02 ^b	1,23 ± 0,00 ^d	1,37 ± 0,03 ^{cd}
Carboidratos (%)	8,13	6,59	9,01	5,7	5,34
Sólidos Solúveis (%)	27,75 ± 0,57 ^{ab}	26,57 ± 0,32 ^{bc}	27,95 ± 0,64 ^a	25,79 ± 0,51 ^c	26,98 ± 0,13 ^{abc}
Atividade de água	0,962 ± 0,004 ^a	0,962 ± 0,002 ^a	0,958 ± 0,001 ^a	0,962 ± 0,004 ^a	0,961 ± 0,002 ^a
Valor calórico (kcal)	125,12	139,16	113,14	134,4	136,16

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ao nível de 5% de significância.

3.1.2 Retenção de água

Em relação ao índice de retenção de água e à sinérese entre as diferentes formulações para o mesmo período de armazenamento é possível observar que, de modo geral, que não houve diferenças, quando comparado entre a mesma forma de avaliação, gravidade (Figura 2) e centrifugação (Figura 3).

No entanto, foi possível verificar a diminuição do índice de retenção de água e respectivo aumento da sinérese a partir do 13º dia de armazenamento, com aumento significativo ($p < 0,05$) no período de armazenamento do produto em 25 dias, indicando maior liberação de água da matriz do queijo, principalmente quando avaliada por centrifugação.

Apesar da maior liberação de água do interior do produto no período de armazenamento de 25 dias, os valores de sinérese por gravidade, que simula a exposição do produto em condições normais de armazenamento, são quase nulos, indicando o baixo risco de que ocorra este defeito. Isto permite presumir que a utilização da enzima, em combinação com os componentes utilizados nas formulações, produz um coágulo com alta estabilidade, com índice de retenção de água superior a 99,0%.

Esta estabilidade é favorecida pela adição das farinhas de chia e quinoa, uma vez que as mesmas apresentam alta capacidade de retenção de água, principalmente pelo elevado conteúdo de proteínas em sua composição. Além disso, os agentes estabilizantes presentes na formulação, como a goma espina corona, tendem a “ligar” a água na estrutura do gel, melhorando de maneira geral a hidratação das proteínas (BHARGAVA; SHUKLA; OHRI, 2006; CAPITANI et al., 2012).

Apesar de a sinérese aumentar durante o armazenamento, o valor médio mais elevado, obtido por gravimetria (0,72%), é insignificante, não comprometendo tal atributo de qualidade.

Rozycki et al. (2010) também observaram alto índice de retenção de água ($\geq 99,0\%$) para amostras de queijo cremoso probiótico desenvolvido com reduzido teor de gordura e sem colesterol, demonstrando alta estabilidade do coágulo formado durante todo o período de armazenamento, sem liberação de soro, que é um defeito comum em produtos lácteos fermentados ou geleificados. Zulkurnain et al. (2008) observaram que queijos cremosos elaborados a partir de proteínas de soja também apresentaram alta estabilidade em relação à sinérese ao longo do período de 20 dias de armazenamento. O elevado teor de proteínas aliado ao elevado teor de lipídios contribui com a formação de uma estrutura estável e capaz de reter a água em seu interior ao longo do armazenamento.

Figura 2 - (A) Sinérese e (B) índice de retenção de água (IRA %) das diferentes formulações de queijo cremoso determinado por gravidade. **(1●)** - Nata 6%; Chia 4%; Quinoa 1%; **(2■)** - Nata 10%; Chia 4%; Quinoa 1%; **(3◇)** - Nata 6%; Chia 1%; Quinoa 4%; **(4▲)** - Nata 10%; Chia 1%; Quinoa 4%; **(5+)** - Nata 8%; Chia 2,5%; Quinoa 2,5%.

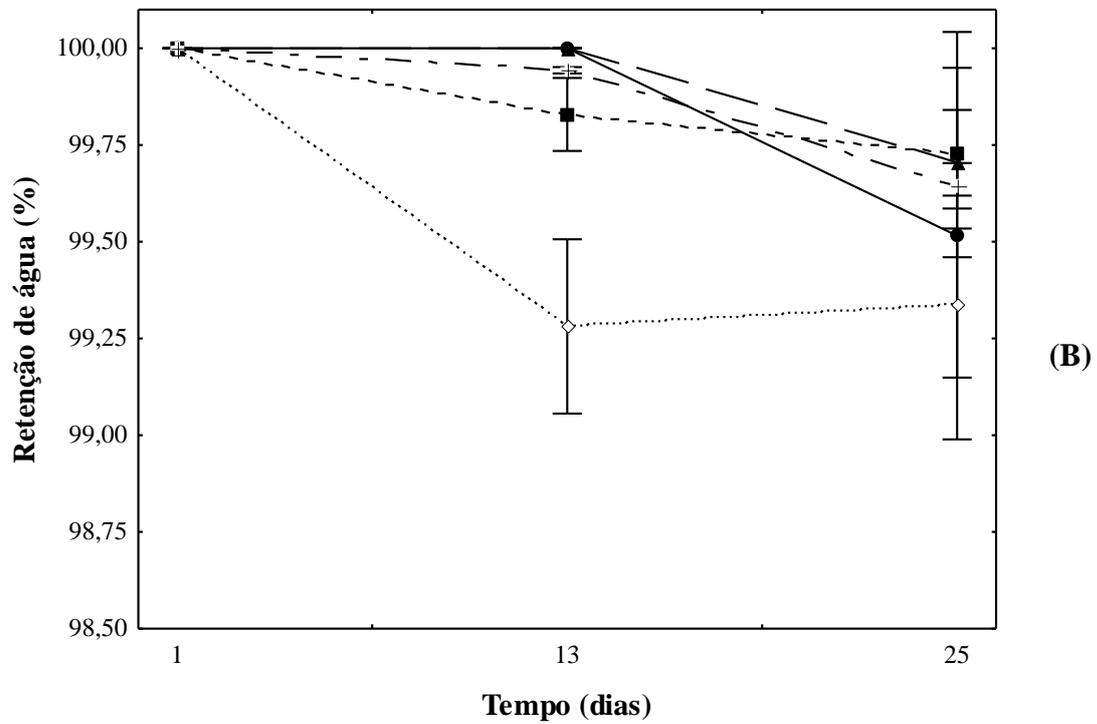
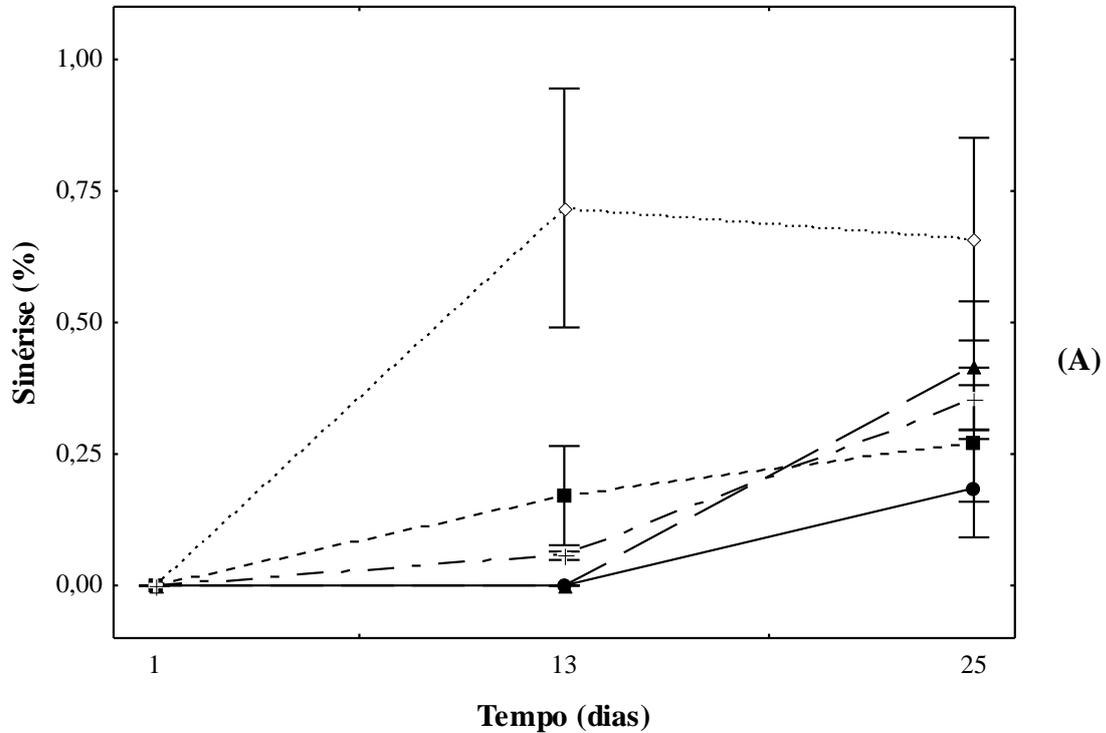
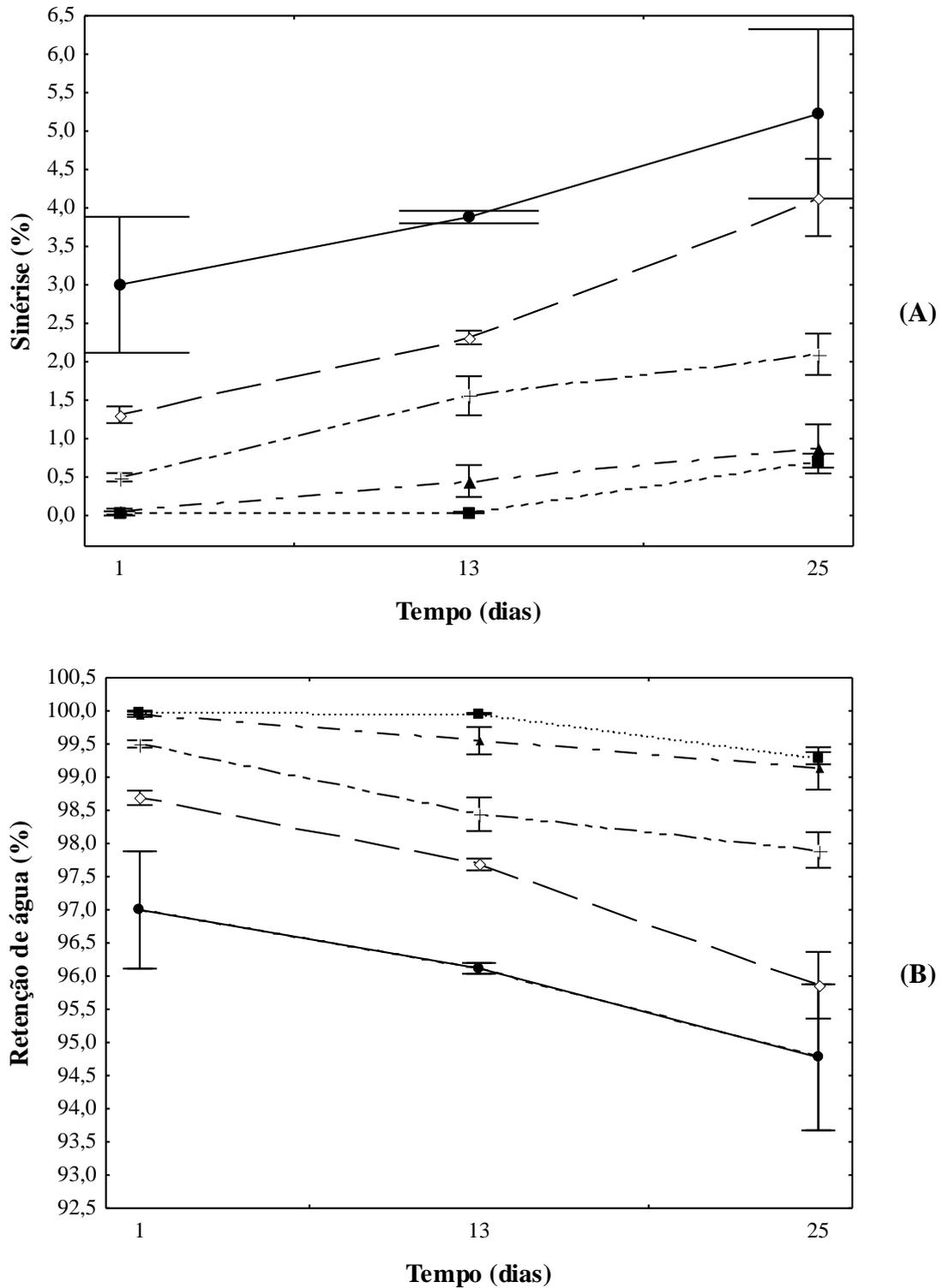


Figura 3 - (A) Sinérese e (B) índice de retenção de água (IRA %) das diferentes formulações de queijo cremoso determinado por centrifugação. (1●) - Nata 6%; Chia 4%; Quinoa 1%; (2■) - Nata 10%; Chia 4%; Quinoa 1%; (3◇) - Nata 6%; Chia 1%; Quinoa 4%; (4▲) - Nata 10%; Chia 1%; Quinoa 4%; (5+) - Nata 8%; Chia 2,5%; Quinoa 2,5%.



Esta constatação de Zulkurnain et al. (2008) vem ao encontro dos dados deste trabalho, onde as amostras 2 e 4, com maior concentração de nata (10%), apresentaram os maiores índices de retenção de água quando submetidos à centrifugação, e a menor sinérese, independente do período de armazenamento. Por outro lado, o inverso também é observado, as amostras com menor adição de nata, 6%, apresentaram o maior desprendimento de água do interior da matriz do queijo. Mesmo fenômeno foi observado por Mateo et al. (2009) que verificaram diminuição da liberação de soro com o aumento da concentração de gordura durante a elaboração de queijo, principalmente devido às propriedades emulsionantes.

3.1.3 Análise do perfil de textura instrumental

O perfil de textura dos queijos cremosos foi determinado a partir das propriedades de dureza, adesividade, elasticidade, coesividade, gomosidade, resiliência e mastigabilidade. Os parâmetros foram comparados entre as diferentes amostras para o mesmo período de armazenamento e para as mesmas amostras em relação aos diferentes tempos de armazenamento (Tabela 2).

De modo geral, todos os parâmetros avaliados apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em função do tempo e das variáveis estudadas. A elasticidade foi o único parâmetro que não apresentou diferença significativa, demonstrando que não há alteração no grau de recuperação das dimensões iniciais do queijo depois que a força deformante é eliminada (SANTINI et al., 2007).

A amostra 3, com maior porcentagem de quinoa e menor de nata, apresentou a maior dureza, indicando que a elevada capacidade da quinoa em absorver água, aliado a menor concentração de gordura, responsável pela cremosidade e suavidade do produto, pode contribuir com uma maior necessidade de força para que o produto obtenha uma deformação (SANTINI et al., 2007). Durante o armazenamento não houve alteração deste parâmetro na formulação 1. As amostras 2 e 5 apresentaram um aumento na dureza no 13º dia de armazenamento, enquanto as amostras 3 e 4 apresentaram aumento de dureza no 25º dia de armazenamento.

Tabela 2 – Valores médios dos parâmetros avaliados para determinação do perfil de textura dos queijos cremosos (dureza, adesividade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade, resiliência).

Armazenamento (Dias)	Amostra	Dureza (N)	Adesividade (N x s)	Coesividade	Gomosidade (N)	Mastigabilidade (N)	Resiliência
1	1	0,15±0,01 ^{dA}	0,37±0,13 ^{dA}	0,82±0,05 ^{aA}	0,13±0,00 ^{aA}	0,13±0,00 ^{dA}	0,07±0,05 ^{aA}
	2	0,24±0,01 ^{cA}	1,62±0,10 ^{cA}	0,72±0,02 ^{bA}	0,17±0,01 ^{aA}	0,17±0,01 ^{cA}	0,01±0,00 ^{abA}
	3	0,35±0,02 ^{aA}	4,38±0,33 ^{aA}	0,73±0,01 ^{bA}	0,41±0,28 ^{aA}	0,26±0,02 ^{aA}	0,01±0,00 ^{bA}
	4	0,31±0,00 ^{bA}	3,57±0,22 ^{bAB}	0,74±0,01 ^{bA}	0,23±0,00 ^{aA}	0,23±0,00 ^{bA}	0,01±0,00 ^{bA}
	5	0,32±0,01 ^{bA}	3,56±0,36 ^{bA}	0,70±0,02 ^{bA}	0,22±0,00 ^{aA}	0,22±0,00 ^{bA}	0,01±0,00 ^{bA}
13	1	0,16±0,01 ^{dA}	0,26±0,16 ^{cA}	0,87±0,05 ^{aA}	0,14±0,00 ^{bB}	0,14±0,01 ^{cB}	0,05±0,04 ^{aA}
	2	0,28±0,01 ^{cB}	2,33±0,28 ^{bA}	0,80±0,02 ^{bC}	0,22±0,01 ^{cB}	0,22±0,01 ^{bB}	0,01±0,00 ^{bB}
	3	0,34±0,02 ^{abA}	2,91±0,52 ^{bA}	0,72±0,01 ^{cA}	0,25±0,01 ^{aA}	0,25±0,01 ^{abA}	0,01±0,00 ^{bA}
	4	0,33±0,02 ^{bA}	3,17±0,34 ^{bB}	0,75±0,02 ^{bcA}	0,25±0,01 ^{aA}	0,25±0,01 ^{abA}	0,01±0,00 ^{bB}
	5	0,38±0,02 ^{aB}	4,26±0,30 ^{aAB}	0,69±0,01 ^{cA}	0,26±0,01 ^{aB}	0,26±0,01 ^{aB}	0,01±0,00 ^{bAB}
25	1	0,17±0,01 ^{cA}	0,15±0,08 ^{cA}	0,84±0,03 ^{aA}	0,14±0,00 ^{cB}	0,14±0,00 ^{cB}	0,04±0,01 ^{aA}
	2	0,29±0,01 ^{bB}	1,93±0,49 ^{bA}	0,74±0,04 ^{bAB}	0,21±0,00 ^{bB}	0,21±0,00 ^{bB}	0,01±0,00 ^{bB}
	3	0,40±0,01 ^{aB}	3,74±0,88 ^{aA}	0,68±0,02 ^{bcB}	0,27±0,01 ^{aA}	0,27±0,01 ^{aA}	0,01±0,00 ^{bB}
	4	0,40±0,03 ^{aB}	4,55±0,61 ^{aC}	0,66±0,01 ^{cB}	0,27±0,01 ^{aB}	0,27±0,01 ^{aB}	0,00±0,00 ^{bc}
	5	0,40±0,01 ^{aB}	4,74±0,20 ^{aB}	0,69±0,01 ^{bcA}	0,28±0,01 ^{aB}	0,28±0,01 ^{aB}	0,00±0,00 ^{bA}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ao nível de 5% de significância. Letras maiúsculas na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios em relação ao tempo de armazenamento ao nível de 5% de significância.

É possível verificar que a adesividade é mais elevada para amostras com maior porcentagem de quinoa, indicando a formação de uma estrutura mais resistente e que requer uma força maior para remoção do queijo da superfície de contato da boca, normalmente o palato ou língua (BRYANT; USTUNOL; STEFFE, 1995; KARAMAN; AKALIN, 2013). As amostras 1, 2 e 3 não apresentaram variação significativa na adesividade no período de armazenamento de 25 dias. Já as amostras 4 e 5 demonstram uma elevação da adesividade no 13º dia de armazenamento.

A coesividade foi significativamente maior para a amostra 1, onde é encontrado maior porcentagem de chia e menor concentração de nata. Tais condições parecem favorecer a formação de um gel mais elástico e que requer maior esforço para alcançar o ponto de ruptura do produto. Durante o armazenamento não houve alteração da coesividade para as amostras 1 e 5, no entanto, foi significativamente alterada nas amostras 2, 3 e 4 para o período de armazenamento de 25 dias.

Os atributos secundários gomosidade e mastigabilidade apresentaram o mesmo comportamento. Valores mais elevados foram encontrados para as amostras com maiores concentrações de quinoa, demonstrando mais uma vez influencia na textura dos queijos. Tanto a gomosidade quanto a mastigabilidade se mantiveram iguais para a amostra 3 durante os 25 dias de armazenamento, no entanto, houve diferença significativa para as amostras 1, 2 e 5 no 13º dia de armazenamento e alteração significativa nestes atributos para a amostra 4 somente no 25º dia de armazenamento.

As alterações no perfil de textura em algumas formulações verificadas durante o armazenamento podem ser desencadeadas pelos processos de proteólise, glicólise, lipólise e pelas alterações de pH. Tais alterações, juntamente com a solubilização total dos constituintes do queijo e a continuidade das atividades enzimáticas desencadeiam as alterações na textura em queijos (LUCEY; JOHNSON; HORNE, 2003). Além disso, o aumento da acidez dos queijos durante o armazenamento pode também provocar alterações nas características dos agregados de proteínas e, conseqüentemente, na textura (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005; QUEIROGA et al., 2013).

De modo geral as diferentes formulações não apresentaram grandes variações durante a elaboração e armazenamento, desta forma, sugere-se a utilização das formulações com menores teores de lipídios, uma vez que os consumidores têm buscado produtos mais saudáveis e com propriedades funcionais. Além disso, elevados teores de lipídios podem não ser desejáveis pela contribuição ao aumento de risco a saúde, uma vez que doenças cardiovasculares estão relacionadas a 9,4 milhões de mortes anuais, devido principalmente a

problemas alimentares e comportamentais (ANDRADE et al., 2013). Desta forma, levando-se em consideração as características finais desejáveis ao produto e em virtude do consumidor atual buscar produtos mais saudáveis pode-se indicar dois tipos de produtos: um com alta concentração de chia (formulação 1) e outro com elevado teor de quinoa (formulação 3), ambos com reduzido teor de lipídios.

3.1.4 Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas indicaram que os queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa apresentaram resultados compatíveis com as legislações vigentes (ANVISA, 2001; MAPA, 1996). Foi verificado <100 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva; ausência em 25 g para *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*; contagem de <0,3 NMP/g para coliformes totais e termotolerantes; contagem total de mesófilos aeróbios de até $1,0 \times 10^4$ UFC/g e bolores e leveduras na ordem de até $3,6 \times 10^3$ UFC/g. Desta forma é possível afirmar que os conservantes empregados e a manipulação adequada durante o processamento foram suficientes para garantir condições higiênico-sanitárias satisfatórias e a estabilidade microbiana ao longo dos 25 dias de armazenamento.

3.1.5 Avaliação do perfil sensorial dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa

Os resultados da análise de variância das notas atribuídas pelos avaliadores a cada descritor, consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência, para cada uma das cinco amostras de queijos cremosos avaliadas sensorialmente, são apresentadas nas Tabelas de 3 a 6. O perfil de cada uma das cinco formulações é mostrado graficamente para o mesmo período de armazenamento, 1, 13 e 25 dias, nas Figuras de 4 a 6, assim como o perfil das formulações durante o armazenamento, nas Figuras de 7 a 11 para melhor visualização. O valor médio atribuído pelos avaliadores a cada descritor é marcado no eixo correspondente. O centro da figura representa o ponto zero da escala utilizada na avaliação, enquanto a intensidade aumenta do centro para a extremidade. Assim, o perfil sensorial se revela quando se faz a conexão dos pontos.

É possível verificar, em relação a consistência, que as amostras com menor concentração de quinoa e/ou menores concentrações de nata (1, 2 e 5) apresentaram a menor consistência em relação as demais amostras. A amostra 3, com maior concentração de quinoa e menor de nata, apresentou a maior consistência entre as formulações, o que já havia sido constatado durante as análises utilizando texturômetro, que indicou uma maior dureza da

amostra. A capacidade de absorção de água da quinoa, aliado a menor concentração de nata, responsável pela cremosidade e suavidade do produto, interferem diretamente na consistência e dureza do queijo.

As amostras 2 e 4, com maiores concentrações de quinoa e nata, respectivamente, apresentaram aumento significativo da consistência durante o armazenamento, sendo iguais a amostra 3, com maior teor de quinoa, ao final dos 25 dias de armazenamento; as demais amostras não apresentaram alterações durante o armazenamento.

Tabela 3 – Propriedades de consistência ao longo do período de armazenamento dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.

Formulação	Armazenamento (dias)		
	1	13	25
1	4,4 ± 0,7 ^{bcA}	4,4 ± 0,8 ^{cA}	3,6 ± 0,8 ^{cA}
2	5,5 ± 0,7 ^{bcC}	6,8 ± 0,8 ^{bB}	8,0 ± 0,9 ^{aA}
3	8,5 ± 0,7 ^{aA}	8,6 ± 0,7 ^{aA}	7,7 ± 0,8 ^{aA}
4	6,0 ± 0,6 ^{bC}	8,0 ± 0,9 ^{aB}	8,5 ± 0,8 ^{aA}
5	4,4 ± 1,7 ^{cA}	4,4 ± 0,5 ^{cA}	5,4 ± 0,74 ^{bA}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ao nível de 5% de significância. Letras maiúsculas na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios em relação ao tempo de armazenamento ao nível de 5% de significância.

Em relação à untabilidade, é possível verificar novamente que amostras com maiores teores de quinoa e nata são as que apresentam maiores valores neste atributo (Tabela 3). Maior untabilidade é observada a medida que se aumenta a porcentagem de farinha de quinoa e nata nas amostras, indicando que ambas potencializam a untabilidade do produto. As amostras 2, 3 e 4 apresentaram a maior untabilidade, a qual se manteve constante durante todo o período de armazenamento. De modo contrário, formulações com menores concentrações de quinoa e nata apresentaram valores de untabilidade menores.

As amostras 2, 3 e 4 apresentaram boa untabilidade, sendo menos untável a amostra 1, seguida pela amostra 5, as quais apresentam respectivamente menores concentrações de nata e quinoa.

Pode-se observar que todas as amostras apresentaram alta suavidade ao paladar, no entanto, a amostra 1, com menor concentração de nata e quinoa, foi a única que diferiu significativamente das demais formulações. Já durante o armazenamento, as amostras não sofreram alterações no atributo suavidade ao paladar, não apresentando diferenças

significativas ($p>0,05$). Os valores obtidos para o atributo suavidade ao paladar, para todas as amostras, refletem uma característica positiva, já que indicariam que a presença da farinha de chia e quinoa não interferiram em tal atributo, indicando a viabilidade de incorporação deste produto no desenvolvimento dos queijos.

Tabela 4 – Propriedades de untabilidade ao longo do período de armazenamento dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.

Formulação	Armazenamento (dias)		
	1	13	25
1	$2,2 \pm 1,0^{cA}$	$2,8 \pm 0,9^{cA}$	$2,7 \pm 1,1^{cA}$
2	$7,4 \pm 0,8^{aB}$	$8,3 \pm 0,5^{aA}$	$8,6 \pm 0,4^{aA}$
3	$8,6 \pm 0,6^{aA}$	$8,7 \pm 0,5^{aA}$	$8,6 \pm 0,6^{aA}$
4	$8,3 \pm 0,8^{aA}$	$8,6 \pm 0,5^{aA}$	$8,8 \pm 0,4^{aA}$
5	$5,2 \pm 1,8^{bA}$	$5,3 \pm 0,7^{bA}$	$6,3 \pm 1,7^{bA}$

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ao nível de 5% de significância. Letras maiúsculas na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios em relação ao tempo de armazenamento ao nível de 5% de significância.

Tabela 5 – Valores de suavidade ao paladar ao longo do período de armazenamento dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.

Formulação	Armazenamento (dias)		
	1	13	25
1	$6,2 \pm 0,6^{bA}$	$6,3 \pm 1,0^{bA}$	$6,7 \pm 0,5^{bA}$
2	$7,9 \pm 1,0^{aA}$	$8,6 \pm 0,5^{aA}$	$8,5 \pm 0,4^{aA}$
3	$8,7 \pm 0,5^{aA}$	$8,4 \pm 0,7^{aA}$	$7,9 \pm 0,8^{aA}$
4	$8,1 \pm 0,8^{aA}$	$8,1 \pm 1,1^{aA}$	$8,4 \pm 0,9^{aA}$
5	$7,7 \pm 0,8^{aA}$	$8,0 \pm 0,9^{aA}$	$8,7 \pm 0,5^{aA}$

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ao nível de 5% de significância. Letras maiúsculas na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios em relação ao tempo de armazenamento ao nível de 5% de significância.

A adstringência, que causa a contração das mucosas da boca devido à presença de alguns compostos, não apresentou diferença significativa ao longo dos 25 dias de armazenamento (Tabela 6) nas formulações estudadas. A exceção foi a amostra 4, que mostrou aumento significativo da adstringência no 13º dia e se manteve constante até o 25º

dia. O aumento da adstringência nesta amostra, que apresenta maior concentração de quinoa, pode ser relacionado ao elevado teor de polifenóis (GAWLIK-DZIKI et al., 2013), que podem induzir a este efeito durante a degustação, passando a ser mais perceptível durante o período de armazenamento. No entanto, apesar de aumentar significativamente durante o período de armazenamento, os valores observados na formulação 4 não apresentam diferença significativa em relação às demais formulações. Assim, pode-se deduzir que a farinha de quinoa conferiu certa adstringência ao produto, ainda assim, os valores são baixos.

De mesma forma, Schwich (2014) verificou durante o desenvolvimento de queijos cremosos enriquecidos com 1, 3 e 5% de farinha de chia que a consistência foi maior para os queijos com maior concentração de chia, alcançando valores próximos a 9. O atributo untabilidade também foi maior para as amostras com maiores concentrações deste componente, apresentando valores médios de 9,4. Os dados indicam que a farinha de chia desenvolve um papel importante na textura do queijo cremoso, uma vez que o aumento da sua concentração leva a melhores resultados destes parâmetros.

Em relação a suavidade ao paladar foi verificado que não houve diferença para as diferentes concentrações da farinha de chia nas formulações, as quais alcançaram valores médios de 3,6 para este atributo. Para a adstringência foi verificado que maiores concentrações da farinha resultaram em maior adstringência, no entanto, os valores encontrados, próximos a 3,6, são considerados baixos, e não interferem na aceitabilidade do produto.

Tabela 6 – Parâmetros do atributo adstringência ao longo do período de armazenamento dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.

Formulação	Armazenamento (dias)		
	1	13	25
1	2,9 ± 0,9 ^{aA}	3,0 ± 0,9 ^{aA}	3,6 ± 1,1 ^{aA}
2	2,4 ± 0,9 ^{aA}	3,0 ± 0,8 ^{aA}	2,9 ± 0,9 ^{aA}
3	2,6 ± 0,5 ^{aA}	2,9 ± 1,0 ^{aA}	3,0 ± 0,8 ^{aA}
4	1,9 ± 0,6 ^{aA}	2,3 ± 0,5 ^{aAB}	3,0 ± 0,8 ^{aB}
5	2,7 ± 1,1 ^{aA}	3,1 ± 0,9 ^{aA}	3,3 ± 1,0 ^{aA}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios ao nível de 5% de significância. Letras maiúsculas na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as médias dos ensaios em relação ao tempo de armazenamento ao nível de 5% de significância.

Figura 4 – Representação gráfica de avaliação sensorial das amostras de queijo cremoso em relação ao 1º dia de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.

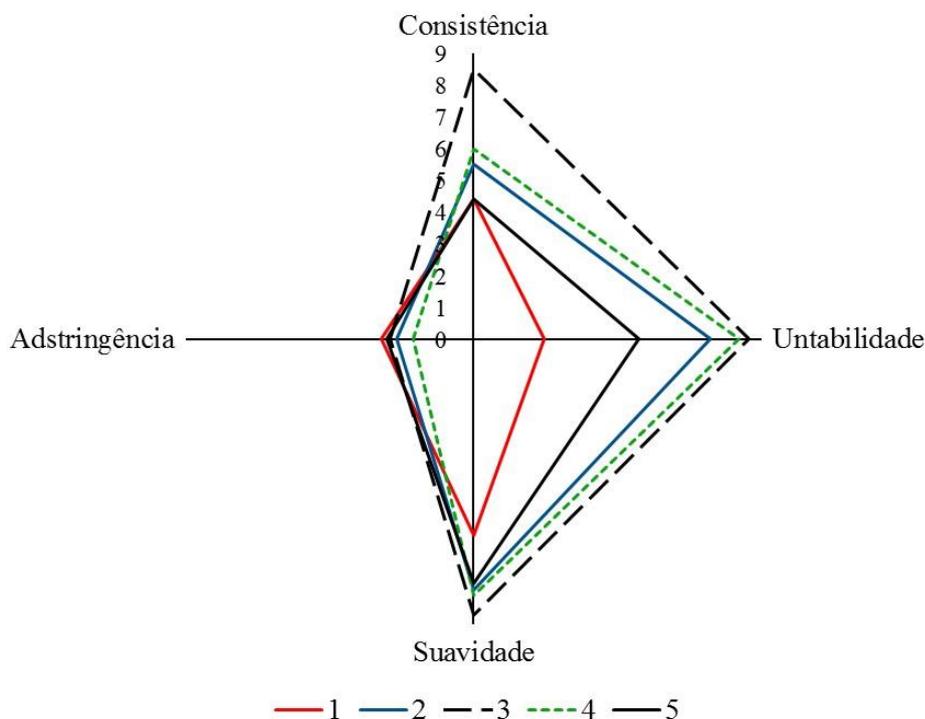


Figura 5 – Representação gráfica de avaliação sensorial das amostras de queijo cremoso em relação ao 13º dia de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.

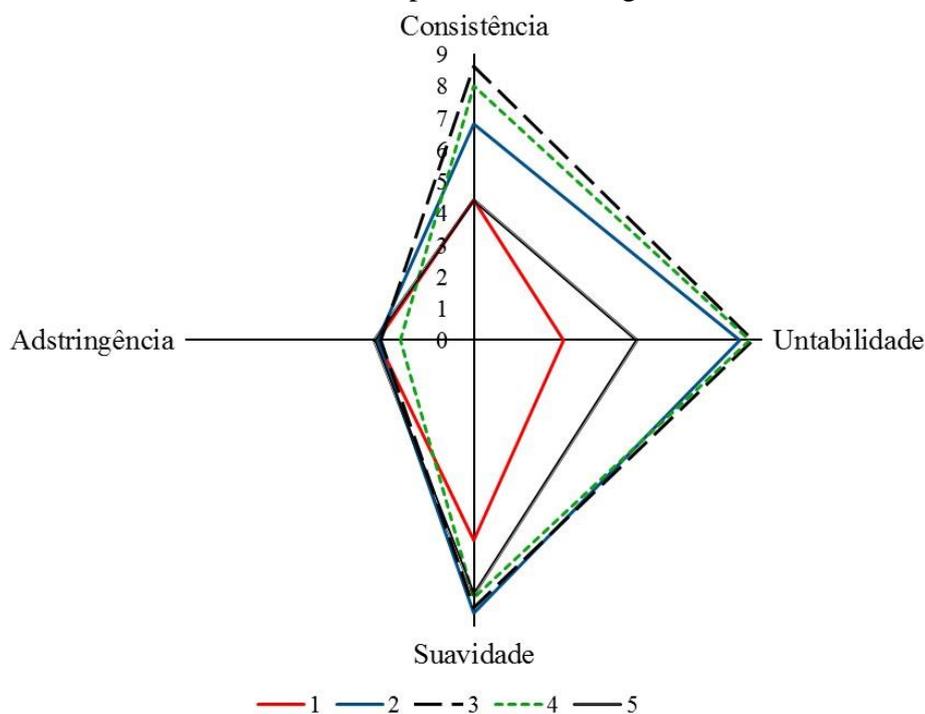


Figura 6 – Representação gráfica de avaliação sensorial das amostras de queijo cremoso em relação ao 25º dia de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.

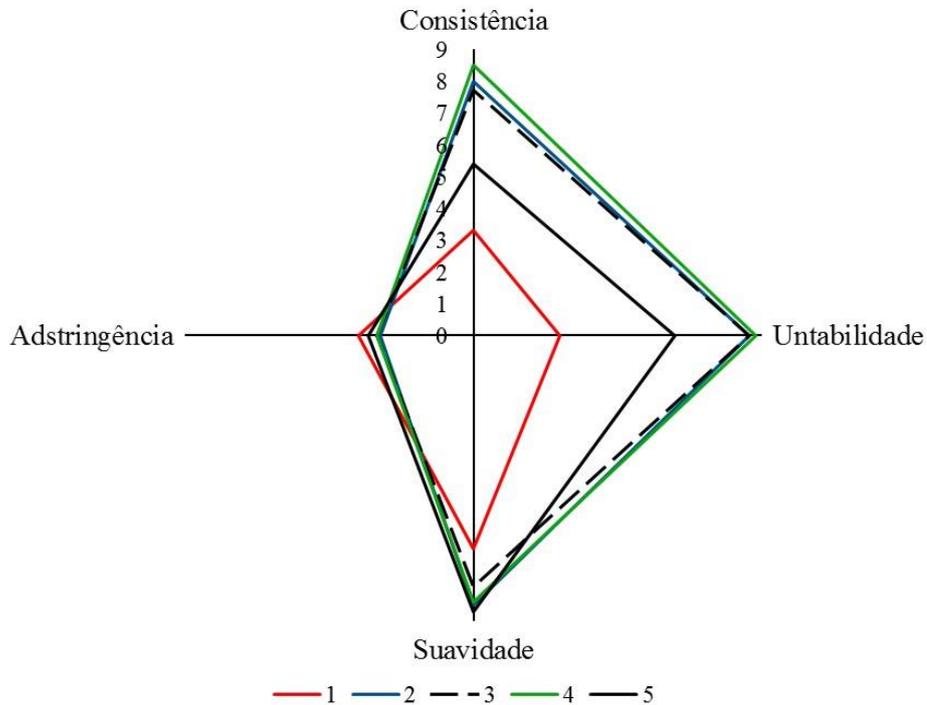


Figura 7 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 1 (6,0% nata; 4,0% chia; 1,0% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.

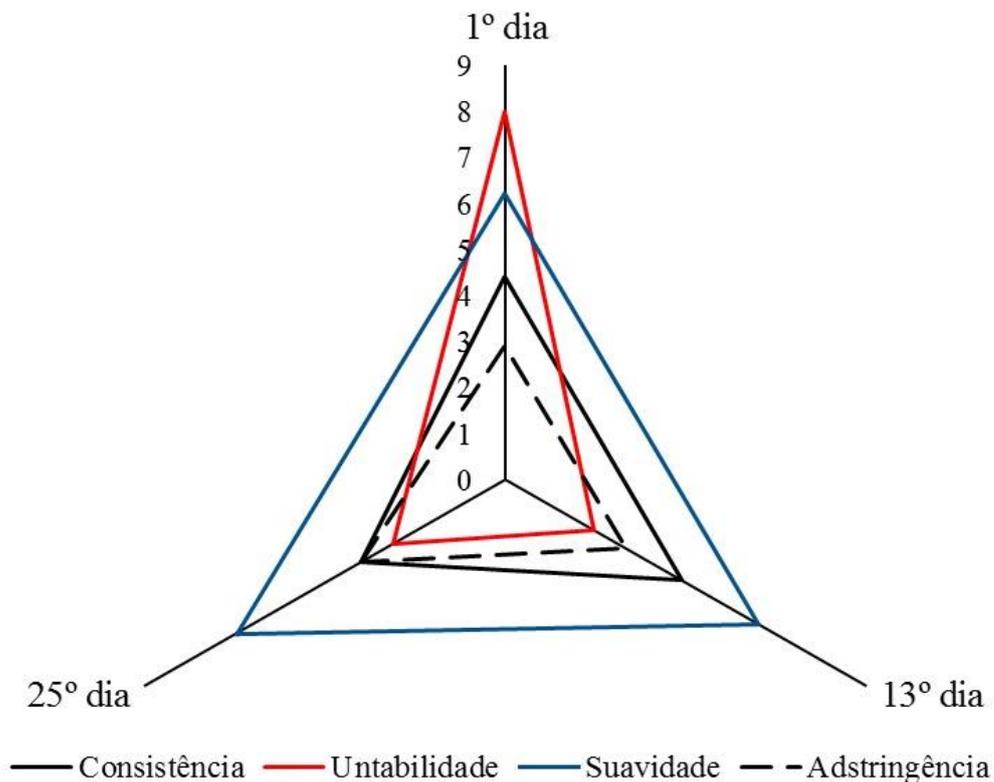


Figura 8 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 2 (10,0% nata; 4,0% chia; 1,0% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.

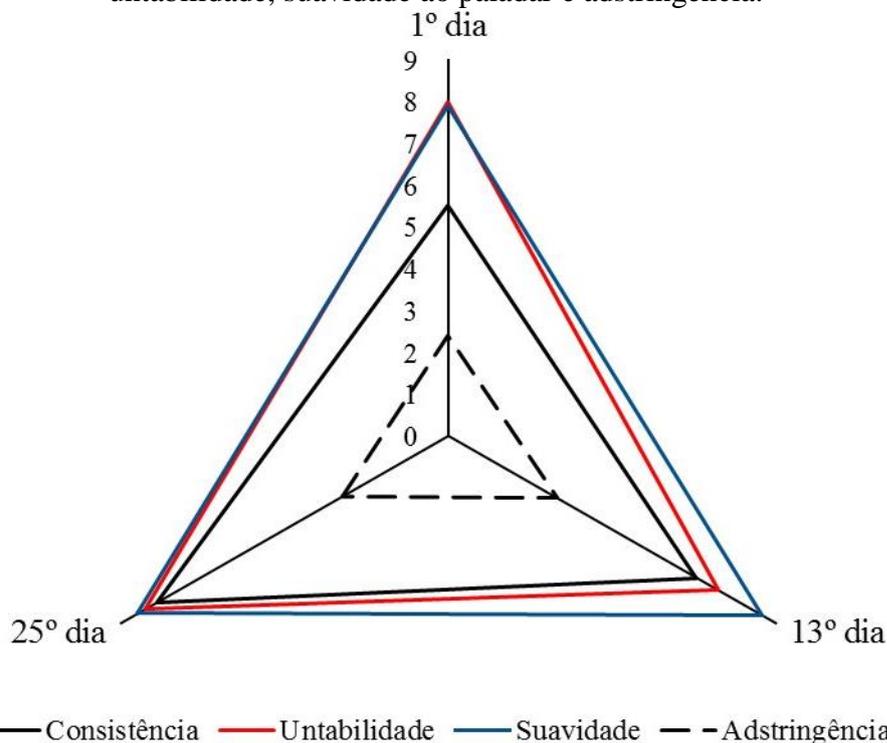


Figura 9 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 3 (6,0% nata; 1,0% chia; 4,0% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.

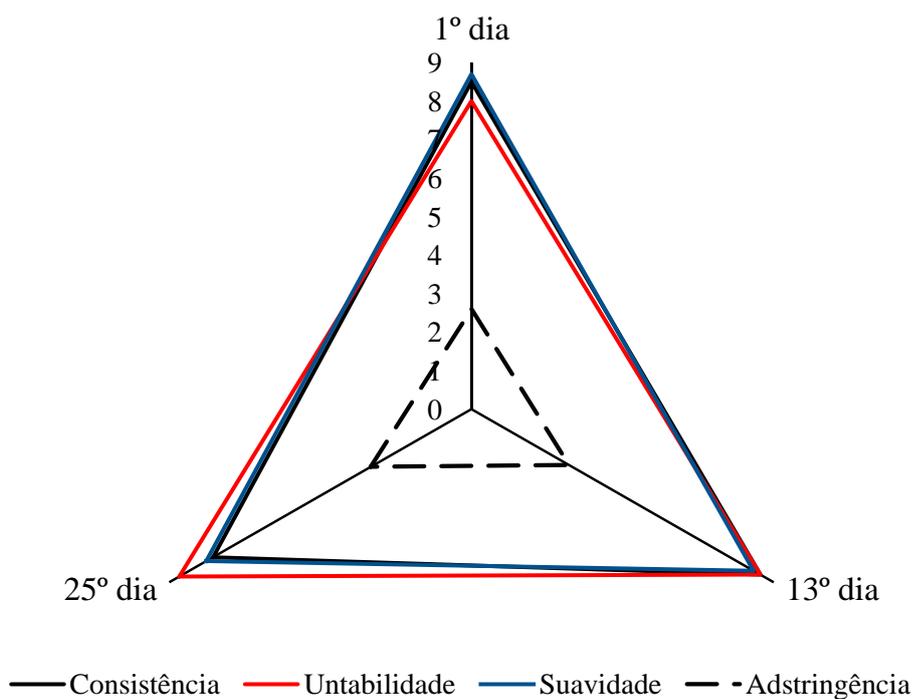


Figura 10 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 4 (10,0% nata; 1,0% chia; 4,0% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.

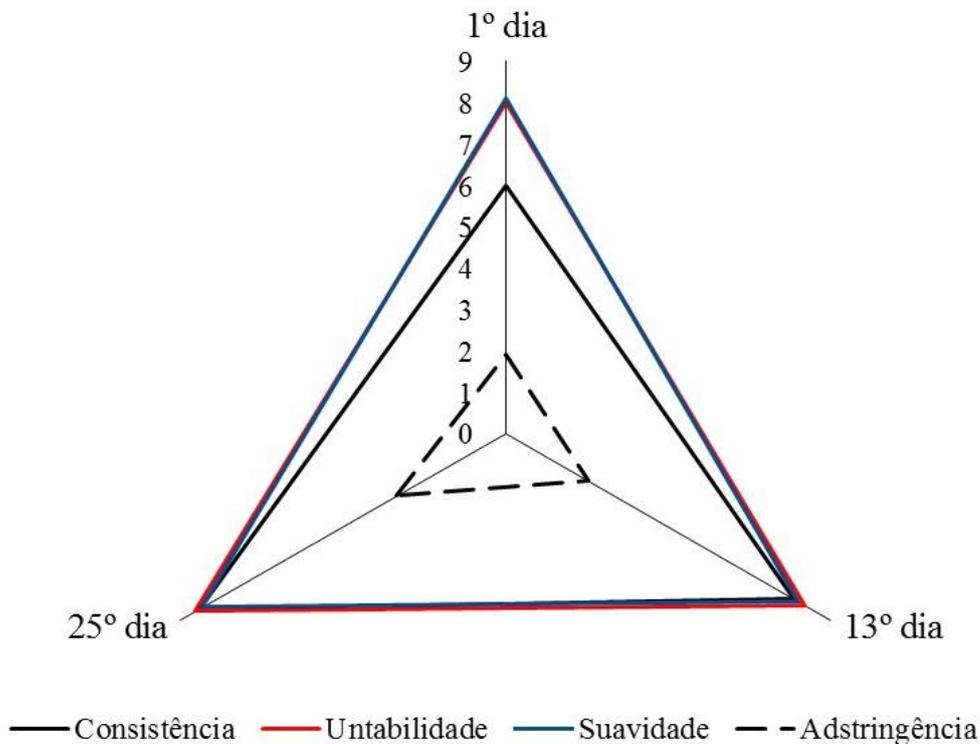
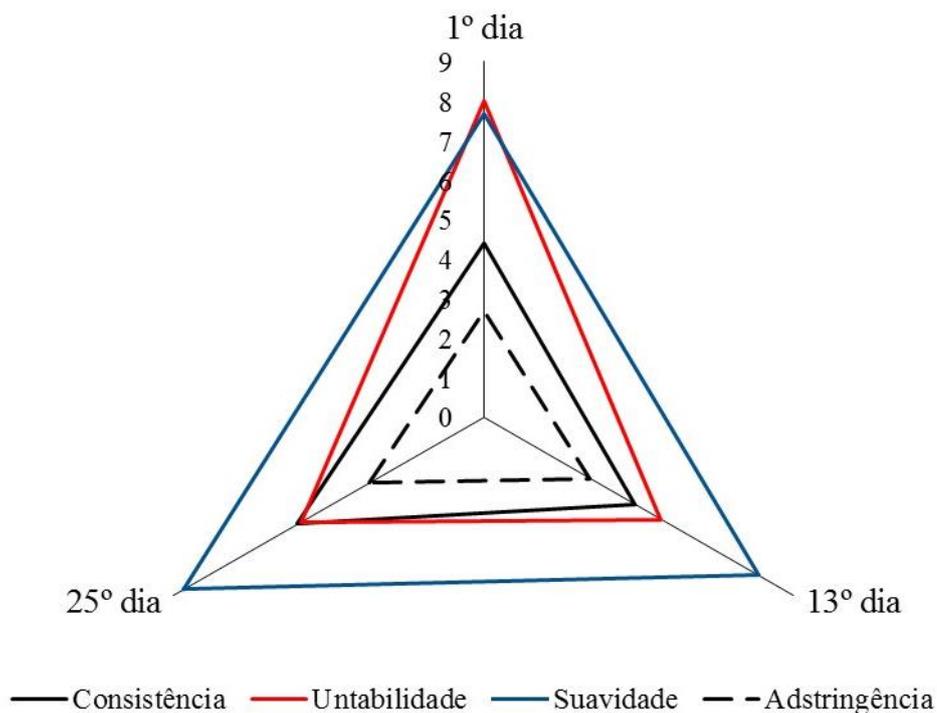


Figura 11 – Representação gráfica de avaliação sensorial da amostra 5 (8,0% nata; 2,5% chia; 2,5% quinoa) em relação ao período de armazenamento para os atributos de consistência, untabilidade, suavidade ao paladar e adstringência.



Os defeitos das cinco formulações analisadas, e que foram percebidos pelos avaliadores, estão apresentados na Tabela 7. É possível verificar que em todas as amostras, independentemente do período de armazenamento, foram identificados os defeitos estranho ou esquisito por pelo menos dois avaliadores. Além disso, foram descritos sabor a queimado para a formulação 4 por pelo menos um avaliador para o 1º e o 25º dia de armazenamento.

Sabor a metálico foi verificado para todas as formulações por um avaliador, principalmente durante o 25º dia de armazenamento. Além disso, foram verificados defeitos como sabor a cereal (amostras 2 e 3), ranço (amostras 2, 4 e 5 no 13º dia de armazenamento), amargo (amostra 5 no 25º dia de armazenamento) e sabor a velho (amostra 3 no 13º dia de armazenamento).

A identificação de defeitos de sabores durante o desenvolvimento de novos produtos é uma maneira de resolver problemas relacionados à redução da aceitação ou até mesmo a inviabilidade de produção. Esses defeitos incluem sabores e aromas indesejáveis, que podem interferir na vida útil do produto e relacionam-se a perdas econômicas significativas e ao surgimento de defeitos tecnológicos que comprometem a qualidade sensorial dos derivados lácteos (CERQUEIRA et al., 2012).

Tabela 7 - Defeitos descritos pelos avaliadores durante determinação do perfil sensorial dos queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa. São apresentados o número de avaliadores que perceberam tal atributo, seguido pela nota média, entre parênteses, calculada com base nos avaliadores que perceberam tal atributo.

Amostras	Armazenamento (dias)	Queimado	Estranho	Pepino	Metálico	Cereal	Ranço	Amargo	Velho
1	1°	-	2 (6,0)	1 (3,4)	-	-	-	-	-
	13°	-	2 (4,1)	-	-	-	-	-	-
	25°	-	2 (6,2)	1 (6,2)	1 (6,2)	-	-	-	-
2	1°	-	4 (4,7)	-	-	-	-	-	-
	13°	-	3 (4,5)	-	1 (4,1)	-	1 (4,1)	-	-
	25°	-	2 (6,2)	-	1 (8,4)	1 (5,7)	-	-	-
3	1°	-	4 (3,7)	-	-	-	-	-	-
	13°	-	3 (3,8)	-	-	-	-	-	1 (6,4)
	25°	-	2 (4,9)	-	1 (7,5)	1 (6,4)	-	-	-
4	1°	1 (2,6)	3 (5,7)	1 (2,6)	-	-	-	-	-
	13°	-	2 (5,0)	-	-	-	1 (5,0)	-	-
	25°	1 (3,7)	2 (5,0)	-	1 (5,0)	-	-	-	-
5	1°	-	3 (6,5)	1 (3,4)	-	-	-	-	-
	13°	-	2 (6,9)	-	-	-	2 (4,0)	-	-
	25°	-	2 (5,9)	-	1 (6,8)	-	-	1 (2,3)	-

De acordo com Delgado et al. (2011), o sabor do queijo depende de várias reações, especialmente o metabolismo da lactose e do lactato, lipólise e proteólise na matriz de queijo.

Durante o desenvolvimento e armazenamento de produtos lácteos, ocorre o processo de degradação e oxidação de ácidos graxos livres (via oxidativa ou hidrolítica), resultando na produção de compostos voláteis responsáveis pelo sabor característico do queijo. Por outro lado, os ácidos graxos poli-insaturados também ficam susceptíveis aos processos de oxidação, levando à formação de aldeídos insaturados (BOSKOU; ELMADFA, 2011) que podem apresentar sabor intenso, (FOX et al., 2000; OLMEDO; NEPOTE; GROSSO, 2013), defeito este relacionado a rancidez.

Além disso, o gosto amargo em queijos pode estar relacionado com o aumento do teor de ácidos graxos específicos que conferem ao produto aumento deste atributo, conferindo um aspecto de rançoso e envelhecido (POVEDA et al., 2008).

Já em relação aos descritores de sabores e gosto, foram determinados os seguintes: sabor a creme (nata), a soro, a leite em pó e a cozido; e gosto: ácido, salgado e doce, com o objetivo de caracterizar o produto, observar a influência da chia, quinoa e da nata adicionadas e verificar a variação dos atributos com o tempo (Figuras 12 a 16). Tais determinações são importantes, uma vez que o sabor, é consequência de uma completa informação sensitiva proporcionada pelo gosto, olfato e as sensações táteis que se produzem quando um alimento está na boca e é mastigado.

Em geral, as diferentes amostras de queijos cremosos não apresentaram nenhuma tendência no perfil de intensidade dos atributos sensoriais descritivos, no entanto, pode-se observar que o sabor a ácido, soro e a creme foram os mais perceptíveis.

O atributo sabor a creme, é uma propriedade essencial para muitos produtos lácteos e está relacionada de forma positiva com a preferência do produto pelo consumidor (RICHARDSON-HARMAN et al., 2000), que tendem a considerar um produto cremoso o qual apresenta alto teor de gordura, sabor de leite, viscoso, e que confere textura de revestimento gorduroso na boca.

Os parâmetros tecnológicos encontrados merecem destaque, uma vez que não há dados disponíveis sobre a avaliação dos parâmetros tecnológicos e sensoriais de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.

Figura 12 – Intensidade de gosto e sabor detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 1 em relação à porcentagem de percepção.

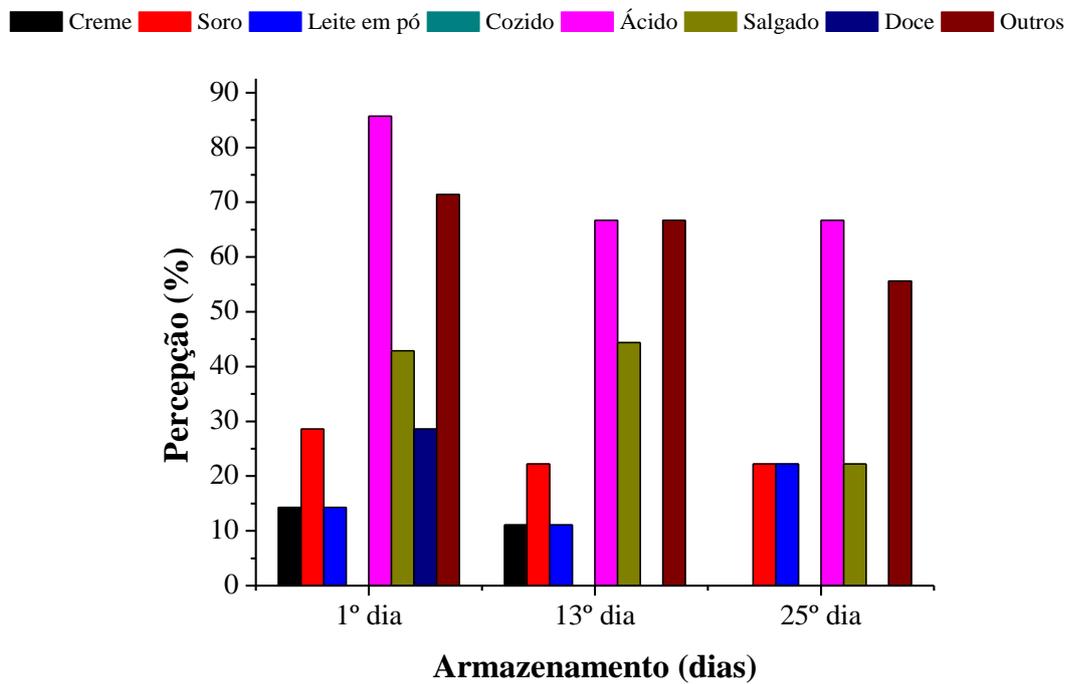


Figura 13 – Intensidade de gosto e sabor detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 2 em relação à porcentagem de percepção.

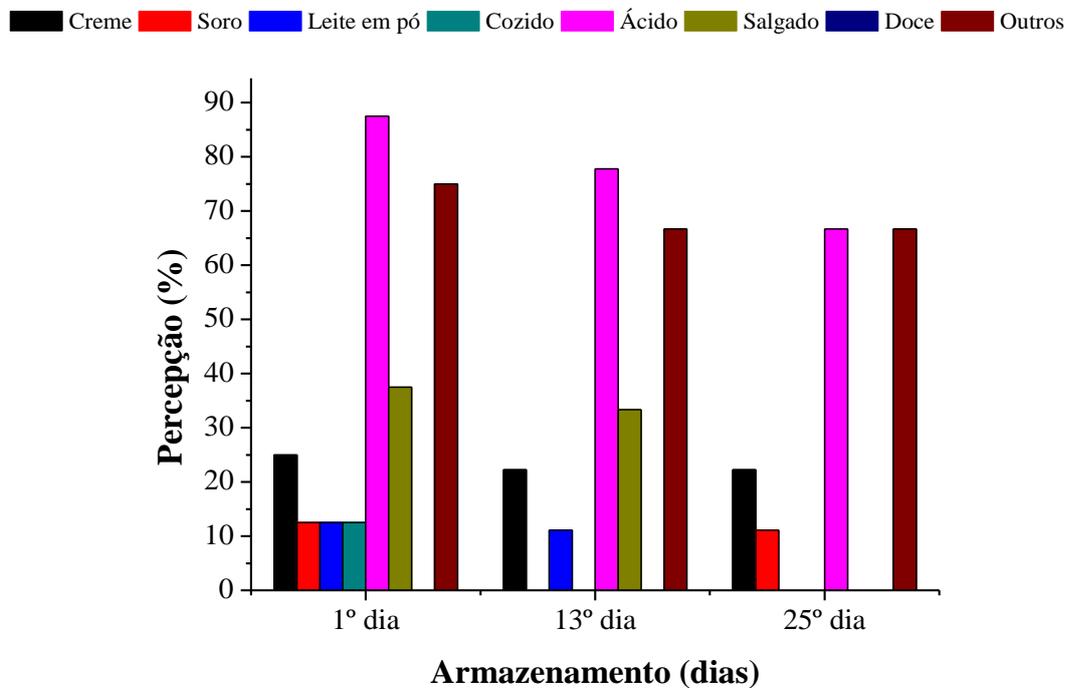


Figura 14 – Intensidade de gosto e sabor detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 3 em relação à percentagem de percepção.

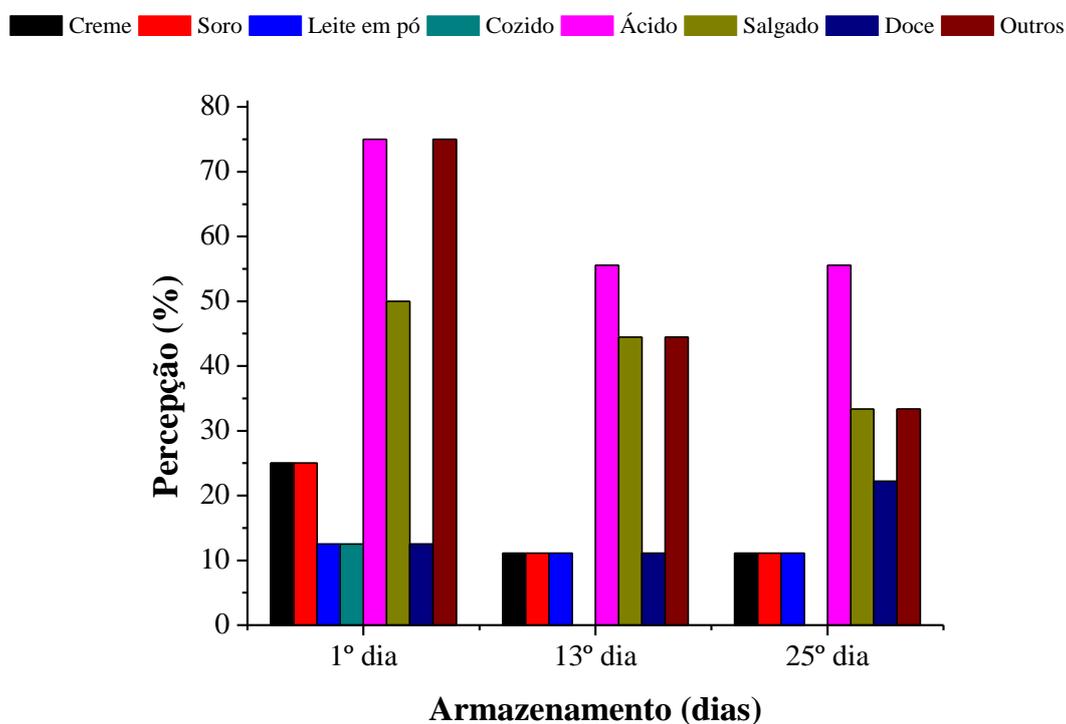


Figura 15 – Intensidade de gosto e sabor detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 4 em relação à percentagem de percepção.

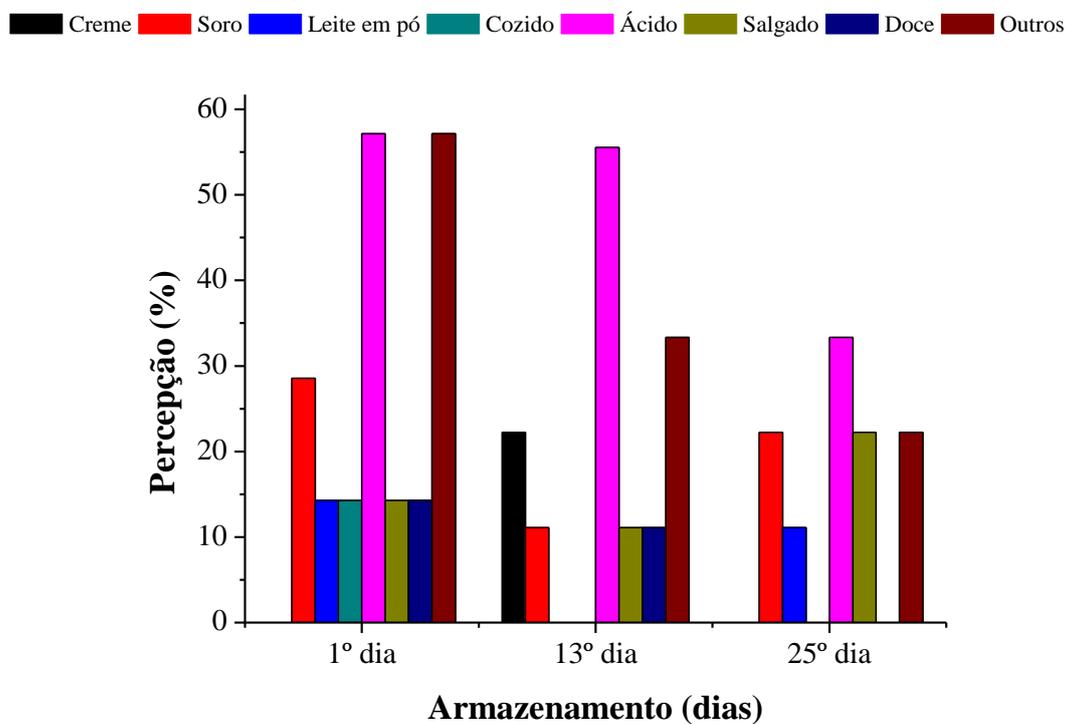
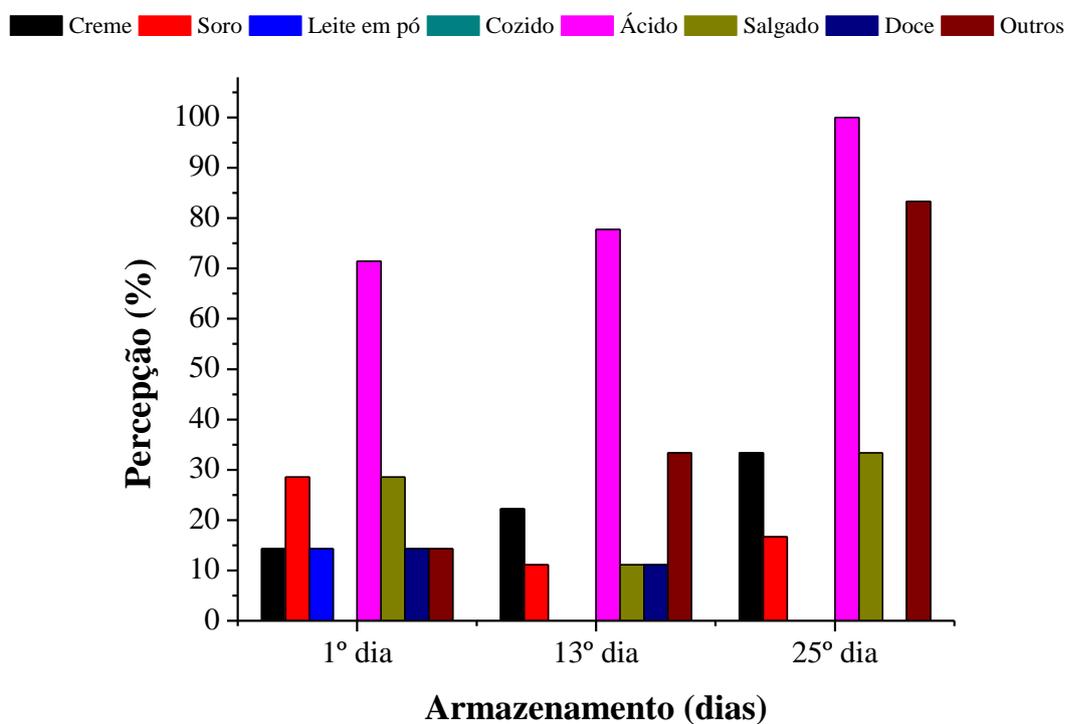


Figura 16 – Intensidade de gosto e sabores detectados pelos avaliadores para a formulação de queijo cremoso 5 em relação à porcentagem de percepção.



4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o produto desenvolvido é estável e viável. A composição química indicou elevados teores de proteínas e fibras, sugerindo assim que o produto poderia ser consumido como fonte de fibras, com benefícios à saúde. O produto apresentou alta estabilidade para a sinérese e alto índice de retenção de água ($\geq 99,0\%$) durante o armazenamento de 25 dias.

O processamento empregado e os componentes da formulação foram suficientes para garantir condições higiênico-sanitárias satisfatórias e a estabilidade microbiológica ao longo do período de armazenamento. Além disso, os resultados alcançados apontam de maneira positiva o desenvolvimento deste novo produto lácteo enriquecido com ingredientes potencialmente funcionais.

Com respeito à análise sensorial as amostras com maiores concentrações de quinoa e nata apresentaram os maiores valores de consistência e untabilidade. Além disso, o produto apresentou elevada suavidade ao paladar, o que permite concluir que, tanto a farinha de chia como a de quinoa, não interferem neste atributo, sendo ótimas alternativas para enriquecimento de derivados lácteos.

Além disso, levando-se em consideração que o consumidor atual busca produtos mais saudáveis pode-se indicar dois tipos de produtos: um com alta concentração de chia (formulação 1) e outro com elevado teor de quinoa (formulação 3), ambos com reduzido teor de lipídios.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICHINGER, P. A.; MICHEL, M.; SERVAIS, C.; DILLMANN, M. L.; ROUVET, M.; D'AMICO, N.; ZINK, R.; KLOSTERMEYER, H.; HORNE, D. S. Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, p. 243-255, 2003.

ALBUQUERQUE, L. C. **Queijos no mundo: origem e tecnologia** – 2ª edição. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora. 130 p. 2002.

ANDRADE, J. P.; MATTOS, L. A. P.; CARVALHO, A. C.; MACHADO, C. A.; OLIVEIRA, G. M. M. National physician qualification program in cardiovascular disease prevention and integral care. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, p. 203-211, 2013.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Disponível: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado em: Março de 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 de novembro de 2012. Disponível: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado em: Março de 2014.

AYERZA, R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1366-1371, 2011.

BHARGAVA, A.; SHUKLA, S.; OHRI, D. *Chenopodium quinoa* - An Indian perspective. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 73-87, 2006.

BOSKOU, D.; ELMADFA, I. **Frying of food: Oxidation, nutrient and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperatures**. Boca Raton: CRC Press, 2011.

BRYANT, A.; USTUNOL, Z.; STEFFE, J. Texture of cheddar cheese as influenced by fat reduction. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 1216-1220, 1995.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1279–1288, 2005.

CAPITANI, M. I.; SPOTORNO, V.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 94-102, 2012.

CERQUEIRA, M. M. P. O.; PAIVA, C. A. V.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Impacto da qualidade da matéria-prima na indústria de laticínios. **Multimedia**, v. 1, p. 1-15, 2012.

DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; RAMÍREZ, R. Effect of high-pressure treatment on the volatile profile of a mature raw goat milk cheese with paprika on rind Innovative. **Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 98–103, 2011.

DOORES, S.; SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association, Washington DC, USA, 2013.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Cheese Rheology and Texture: Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg: Aspen, 2000.

FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção de queijos**. São Paulo: Dipemar LTDA. p. 30-32, 1994.

GAWLIK-DZIKI, U.; SWIECA, M.; SUŁKOWSKI, M.; DZIKI, D.; BARANIAK, B.; CZYZ, J. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts – In vitro study. **Food Chemical Toxicology**, v. 57, p. 154–160, 2013.

HINRICHS, J. Incorporation of whey proteins in cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 495–503, 2001.

HORWITZ, W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC, 1997. 1200 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - **Normas Analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 4 edição. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JIDEANI, V. A. **Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology Functional Properties of Soybean Food Ingredients in Food Systems**. InTech. 2011. 642 p.

KARAMAN, A. D.; AKALIN, A. S. Improving quality characteristics of reduced and low fat Turkish white cheeses using homogenized cream. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 503-510, 2013.

KUMAR, A.; GROVER, S.; SHARMA, J.; BATISH, V. K. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 243-258, 2010.

LEMES A.C.; GALVAN F.; SCHWICH M. A.; ROZYCKI S. D.; BRANDELLI A.; KALIL S. J. Development of cream cheese enriched with chia and quinoa. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, 5., 2014, Córdoba, Argentina. **Anais do V-CICYTAC**, 2014. p. 1-9.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Perspectives on the basis of rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2725-2743, 2003.

MADL, T.; STERK, H.; MITTELBAACH, M. Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, p. 795-806, 2006.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. Publicado no **Diário Oficial da União** de 11/03/1996, Brasília, DF. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acessado em: 22/02/2015.

MARINELI, R. S.; MORAES, E. A.; LENQUISTE, S. A.; GODOY, A. T.; EBERLIN, M. N.; MARÓSTICA-JR, M. R. Chemical characterization and antioxidant potential of *Chilean chia* seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 1304-1310, 2014.

MATEO, M. J.; EVERARD, C. D.; FAGAN, C. C.; O'DONNELL, C. P.; CASTILLO, M.; PAYNE, F. A.; O'CALLAGHAN, D. J. Effect of milk fat concentration and gel firmness on syneresis during curd stirring in cheese-making. **International of Dairy Journal**, v. 19, p. 264–268, 2009.

NSIMBA, R. Y.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. **Food Chemical**, v. 106, p. 760-766, 2008.

OLMEDO, R. H.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 409-417, 2013.

POVEDA, J. M.; SÁNCHEZ-PALOMO, E.; PÉREZ-COELLO, M. S.; CABEZAS, L. Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. **Dairy Science & Technology**, v. 88, p. 355–367, 2008.

- QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 538-544, 2013.
- RABELO, S. F.; LEMES, A. C.; FRATA, M. T.; TAKEUCHI, K. P.; CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Development of cassava doughnuts enriched with *Spirulina platensis* biomass. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p. 42-51, 2013.
- RICHARDSON-HARMAN, N. J., STEVENS, R., WALKER, S., GAMBLE, J., MILLER, M., WONG, M. Mapping consumer perceptions of creaminess and liking for liquid dairy products. **Food Quality and Preference**, v. 11, p. 239-246, 2000.
- ROZYCKI, S.; LAZZARONI, S.; KOCK POMERANTZ, E.; CRISTALDI, J.; MARANO, A.; SABBAG, N.; COSTA, S. Modelización del comportamiento reológico de queso untado probiótico, reducido en grasas y sin colesterol. In: CONGRESO MUNDIAL Y EXPOSICIÓN INGENIERIA, 2010, Buenos Aires, Argentina. **Anais do CMEI**, 2010, v. 1, p. 1-11.
- SAINANI, M. R.; VYAS, H. K.; TONG, P. S. Characterization of particles in cream cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2854-2863, 2004.
- SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S.J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 2016-2024, 2014.
- SANTINI, Z. G.; ALSINA, D. A.; STHAUS, R.; MEINARDI, C.; FREYRE, M.; DÍAZ, J. R.; GONZÁLEZ, C. Evaluación de la textura en quesos de oveja. Aplicaciones del análisis factorial discriminante. **Fave**, v. 5/6, p. 1-2, 2007.
- SHOEMAKER, C. F.; NANTZ, J.; BONNANS, S.; NOBLE, A. Rheological characterization of dairy products. **Food Technology**, v. 46, p. 98-104, 1992.
- SOUZA, V. R.; CARNEIRO, J. D. S.; PINTO, S. M.; SOUZA, A. B.; STEPHANI, R. Effect of concentration of fat in the physical, chemical and sensory petit suisse cheese produced with retention of serum. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 20-28, 2012.
- STIKIC, R.; GLAMOCLJIA, D.; DEMIN, M.; VUCELIC-RADOVIC, B.; JOVANOVIC, X.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; JACOBSEN, S. E.; MILOVANOVIC, M. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 132-138, 2012.
- THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes – a boon to human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, p. 507-518, 2003.
- VELEZ-RUIZ, J. F.; BARBOSA-CANOVAS, G.V. Rheological properties of selected dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 311-359, 1997.

ZHUN, N.; SHENG, S.; SANG, S.; JHOO, J. W.; KARWE, M. V.; ROSEN, R. T.; HO, C. T. Triterpene saponins from debittered quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 865-867, 2002.

ZULKURNAIN, M. G.; KARIM, A. A.; LIONG, M. Development of a soy-based cream cheese. **Journal of Texture Studies**, v. 39, p. 635-654, 2008.

**ARTIGO 4: EXTRAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE E REUTILIZAÇÃO DE
BIOMASSA RESIDUAL PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES A PARTIR DE
Bacillus sp. P45**

EXTRAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE E REUTILIZAÇÃO DE BIOMASSA RESIDUAL PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES A PARTIR DE *Bacillus* sp. P45

RESUMO

A necessidade de desenvolvimento de processos que possibilitem o aproveitamento total de coprodutos em processos biotecnológicos para obtenção de enzimas de interesse industrial é uma realidade, justificada pelas preocupações ambientais e pela necessidade de redução dos custos de obtenção destes bioprodutos. Desta forma, a utilização de processos integrados de produção da enzima β -galactosidase e de proteases, em especial queratinases, são alternativas interessantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o método de ruptura ultrassônica para obtenção da enzima intracelular β -galactosidase e a utilização da biomassa residual do processo para produção de queratinase através do cultivo do *Bacillus* sp. P45 em substituição ao substrato convencional, farinha de penas. Além disso, a própria produção da enzima queratinase gera resíduos sólidos que podem ser reutilizados como substrato para produções consecutivas. O método ultrassônico empregado foi eficiente para ruptura das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e extração da enzima β -galactosidase, apresentando altos valores de atividade enzimática (35,0 U/mL) e rendimento (876,0 U/g de biomassa). O processo integrado desenvolvido permitiu a obtenção de enzimas com propriedades proteolíticas (1300 U/mL) e queratinolíticas (89,2 U/mL) a partir da utilização de biomassa e farinha de penas residual, com aproveitamento dos coprodutos gerados, representando assim, uma alternativa interessante para gestão destes coprodutos.

Palavras-chave: ruptura celular, enzima, coprodutos, biomassa, ultrassom, abrasão, protease.

ABSTRACT

The necessity for the development of processes involving the full use of byproducts in biotechnological processes for obtaining enzymes of industrial interest is a reality, justified by environmental concerns and the need to reduce the costs of obtaining these bioproducts. Thus, the use of integrated processes for the production of β -galactosidase and protease, in particular, keratinase are interesting alternatives. The objective of this study was to evaluate the ultrasonic disruption method for obtaining the β -galactosidase intracellular enzyme and the use of residual biomass of the process for the production of keratinase by *Bacillus* sp. cultivation P45 replacing the conventional substrate, feather meal. Furthermore, the production of keratinase enzyme itself generates waste, which can be reused as a substrate for consecutive production. The ultrasonic method employed was effective for disruption of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 cells and extraction of β -galactosidase, showing high enzyme activity values (35.0 U/mL) and yield (876.0 U/g of biomass). The process integrated developed allowed to obtain enzymes with proteolytic (1300 U/mL) and keratinolytic (89.2 U/mL) properties from the utilization of biomass and waste feather meal, also using the byproducts generated, thus representing an interesting alternative for management of these byproducts.

Keywords: cell disruption, enzyme, byproducts, biomass, ultrasound, abrasion, protease.

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse no desenvolvimento de processos que apontem o uso total da matéria-prima e que não resultem em impactos negativos ao meio ambiente implica no aproveitamento de coprodutos em processos biotecnológicos (SINGH; KAPOOR; KUMAR, 2012).

Além de problemas ambientais, os coprodutos gerados podem representar perda de matéria-prima e de energia, exigindo investimentos em tecnologias para seu reaproveitamento (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007), uma vez que podem conter diversas substâncias de alto valor. Assim, se a tecnologia adequada for empregada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003).

Dentro desta temática destaca-se o aproveitamento dos resíduos sólidos, farinha de penas, resultantes do cultivo do *Bacillus* sp. P45 para a produção de proteases e a biomassa residual da produção de β -galactosidase, que apresenta elevado teor de proteínas. A enzima β -galactosidase é utilizada para hidrólise da lactose e na produção de galactooligosacarídeos (GEKAS; LÓPEZ-LEIVA, 1985), componente funcional com efeitos benéficos ao organismo humano (HSU et al., 2007). Ela é produzida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus*, no entanto, sua produção ocorre intracelularmente e, assim como qualquer outro produto intracelular, requer uma etapa de ruptura das células para sua liberação (NEVES, 2003).

O método de ruptura mecânico com esferas de vidro e o rompimento por ultrassom, são métodos eficientes que são utilizados em processos de *downstream*. O rompimento manual com pérolas de vidro é um método que não necessita de grande aparato operacional. Utiliza basicamente pérolas de vidro e o procedimento consiste na adição das mesmas em um tubo, contendo suspensão celular. O tubo é agitado vigorosamente por um tempo determinado, obtendo-se a enzima extraída pela força do atrito devido à moagem com pequenas esferas como abrasivos (GURPILHARES; PESSOA-JR; ROBERTO, 2003; MEDEIROS et al., 2008). Já no método ultrassônico, as ondas ultrassônicas são dissipadas no meio líquido através de bolhas de cavitação, as quais formam uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e conseqüente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de romper as células (BOSSIO; HARRY; KINNEY, 2008), liberando a enzima.

O rompimento ultrassônico tem sido aplicado em diversos processos de separação, seja como uma etapa de pré-tratamento ou como processo integral, e também como método para acompanhamento de cultivos microbianos (BOSSIO; HARRY; KINNEY, 2008).

Além disso, o uso de reatores de cavitação hidrodinâmica para rompimento celular tem sido aprovado e empregado de forma eficiente em larga escala, uma vez que tem demonstrado maior eficiência em comparação com técnicas convencionais baseadas na utilização da energia mecânica (GOGATE; KABADI, 2009), facilidade de operação, pouca necessidade de manutenção e pela possibilidade de ser empregado em processos executados por longos tempos sem a necessidade de qualquer cuidado devido a sua automação (HU; ZHENG; QIU, 2006). Adicionalmente, já foi verificada a aplicação da técnica de ultrassom de forma eficiente na estimulação da atividade enzimática, em processos de desnaturação controlada, como melhorador em processos de extração, na estimulação de germinação de sementes na agricultura e ainda na esterilização de superfícies associado a outras técnicas (MASON; PANIWNKYK; LORIMER, 1996).

Após a etapa de extração, a enzima β -galactosidase é destinada à sua aplicação, e a biomassa residual com elevado teor de proteínas, superior a 46%, ao invés de ser descartada, pode ser utilizada como ração animal, na produção de biocombustíveis (ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014), como ingrediente alimentar (RAMOS et al., 2011) ou ainda empregada em processos biotecnológicos como substrato para micro-organismos (FERREIRA et al., 2010), como por exemplo para obtenção de proteases, especialmente queratinases.

As proteases de origem microbiana podem ser produzidas a partir do *Bacillus* sp. P45, o qual foi isolado do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*) da Bacia Amazônica. Uma caracterização parcial baseada no sequenciamento 16S rDNA mostrou que esta cepa enquadra-se no grupo *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS, podendo ser utilizado na produção de alimentos e fármacos. Estas enzimas vêm apresentando grande potencial na hidrólise de proteínas (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009; SIRTORI et al., 2006), podendo ser aplicada em processos de coagulação enzimática do leite e na síntese de hidrolisados proteicos. Além disso, apresentam características que indicam sua utilização na indústria de alimentos, como, por exemplo, no processo de amaciamento de carne, no setor de panificação, em cervejarias, na elaboração de produtos farmacêuticos, como aditivos na indústria de detergentes e têxtil, e também no

processo de depilação e transformação do couro (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2014).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo biotecnológico integrado e inovador para obtenção de enzimas de interesse industrial, principalmente visando o aproveitamento dos coprodutos gerados. Para tal, foi avaliado o método de ruptura ultrassônico para extração da enzima β -galactosidase obtida intracelularmente a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, assim como a utilização de biomassa e farinha de penas residual para produção de proteases através do cultivo do *Bacillus* sp. P45.

2 MATERIAL E MÉTODOS

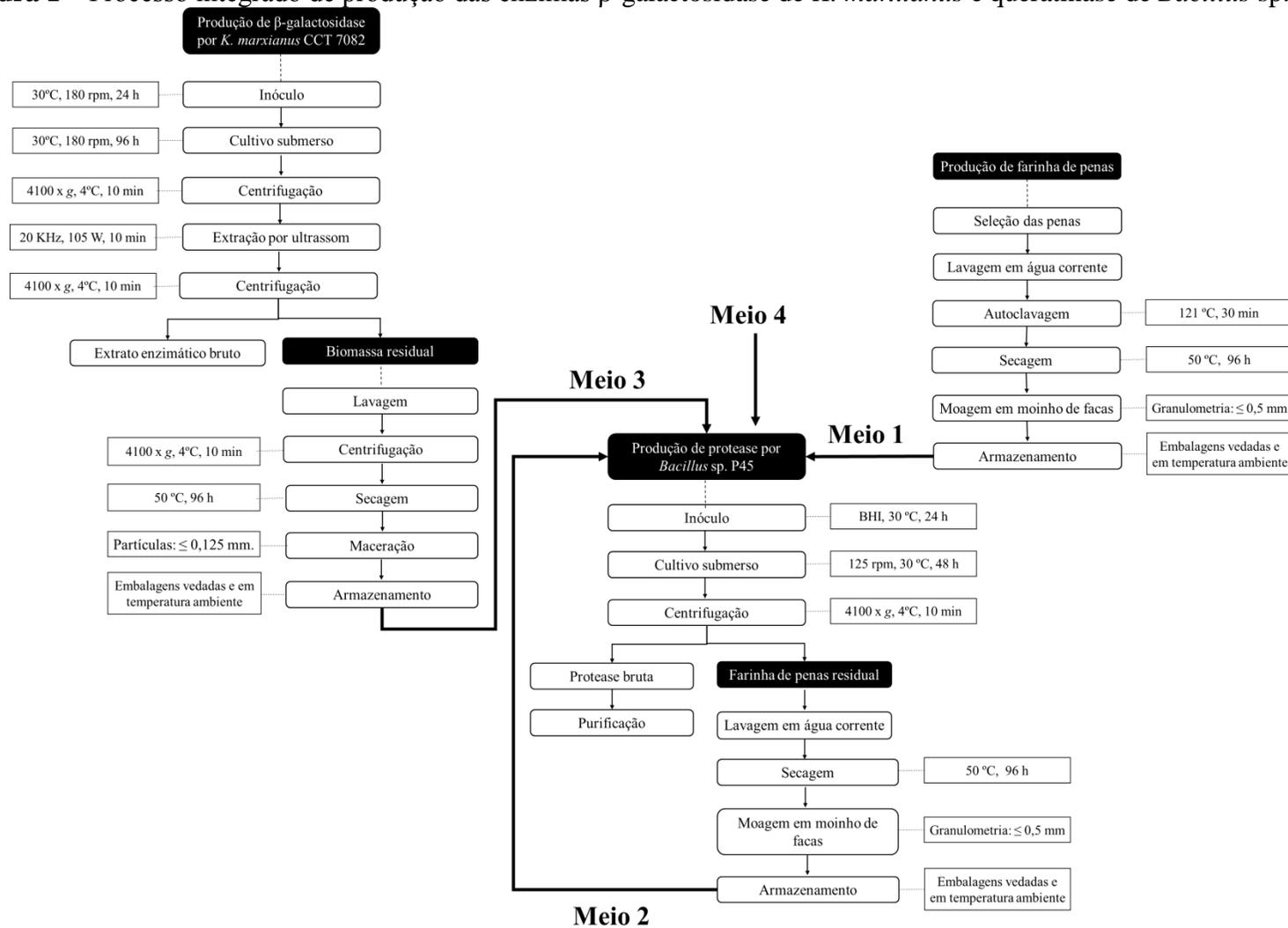
A obtenção dos substratos proteicos para cultivo do *Bacillus* sp. P45, assim como a obtenção da enzima β -galactosidase de *K. marxianus* por método ultrassônico e a reutilização da biomassa residual para produção da enzima queratinase foi realizada conforme esquema apresentado na Figura 1, visando o aproveitamento total dos coprodutos gerados nos processos biotecnológicos integrados

2.1 Obtenção e caracterização dos substratos proteicos para obtenção de proteases

A farinha de penas foi produzida a partir de penas de aves fornecidas por um abatedouro da região sul do Rio Grande do Sul. As penas foram primeiramente separadas das impurezas maiores, lavadas em água corrente e autoclavadas a 121°C por 30 min. Após o processo de esterilização, as penas foram secas em estufa com circulação de ar a 50°C durante 96 h (umidade \leq 10,0%). Após o processo de secagem, o material foi triturado em moinho de facas até granulometria \leq 0,5 mm e armazenadas em embalagens apropriadas para posterior uso.

A biomassa residual foi obtida a partir do processo de extração da enzima β -galactosidase do interior das células da levedura *Kluyveromyces marxianus*. Após aplicação das ondas ultrassônicas o extrato enzimático foi centrifugado e o precipitado, contendo o material celular rompido, foi lavado com água destilada e novamente centrifugado. A biomassa foi disposta em placas de petri e secas em estufa a 50°C por 96 h. Posteriormente, a biomassa seca foi raspada da superfície das placas e macerada com gral e pistilo, sendo padronizada quanto a sua granulometria em peneira de Tyler 115 (partículas \leq 0,125 mm).

Figura 1 – Processo integrado de produção das enzimas β -galactosidase de *K. marxianus* e queratinase de *Bacillus* sp. P45.



Meios: (1) Farinha de penas; (2) Farinha de penas reutilizada; (3) Biomassa residual (4) 50% Farinha de penas + 50% de biomassa residual

A farinha de penas reutilizada foi obtida ao final do cultivo do *Bacillus* sp. P45 com a farinha de penas produzida anteriormente. Após o cultivo do micro-organismo o meio foi centrifugado e o precipitado lavado para remoção da biomassa do cultivo. As penas lavadas foram dispostas em placas de petri e submetidas a secagem a 50°C durante 96 h (umidade \leq 10,0%). Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas até granulometria \leq 0,5 mm e armazenadas em embalagens apropriadas para posterior reuso no cultivo do *Bacillus* e produção de protease.

Os substratos proteicos, farinha de penas e biomassa residual, foram utilizados no preparo dos meios de cultivo para produção do *Bacillus* sp.P45 para obtenção de queratinases conforme descrito a seguir.

2.2 Extração de β -galactosidase: micro-organismo, inóculo e cultivo submerso

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, gentilmente cedido pelo Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP, e selecionado por Manera et al. (2008) como produtor da enzima. A cepa foi mantida a 4°C em tubos inclinados, contendo ágar YM (ágar extrato de malte e levedura), composto por (g/L): extrato de malte (3,0), extrato de levedura (3,0), peptona (5,0), glicose (10,0) e ágar (20,0).

O inóculo foi preparado em frascos de erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL do meio de cultura composto por (g/L): extrato de levedura (1,0), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,2), KH_2PO_4 (5,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,4) e lactose (10,0), em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 5,5 (PINHEIRO et al., 2003). O meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min, exceto a lactose. A lactose foi esterilizada por filtração em membrana de ésteres de celulose de 47 mm de diâmetro e 0,22 μm de diâmetro de poros. Após a esterilização, o meio foi resfriado a temperatura ambiente para adição da lactose esterilizada por filtração e em seguida realizou-se a inoculação da levedura. As condições de cultivo foram 30°C, 180 rpm por 24 h (MANERA et al., 2008).

Após o crescimento do inóculo, este foi adicionado ao meio de cultivo em uma relação 10% (v/v). Os cultivos foram realizados em meio composto por (g/L): extrato de levedura (17,0), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (8,8), KH_2PO_4 (5,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,4) e lactose estéril (28,2), em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,0. O cultivo foi realizado em agitador orbital a 30°C, 180 rpm por 96 h (MANERA et al., 2008).

2.1.1 Extração de β -galactosidase por método abrasivo e ultrassônico

Os processos de extração foram realizados a partir de uma suspensão celular da levedura *K. marxianus* CCT 7082 em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6 (MEDEIROS; BURKERT; KALIL, 2012) com concentração equivalente a 40 mg de célula seca por mL.

O processo de abrasão foi realizado em agitador tipo vórtex utilizando pérolas de vidro, 1,1 g de pérola de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm para cada mililitro de suspensão celular. A suspensão foi agitada por 40 min, com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células (MEDEIROS et al., 2008).

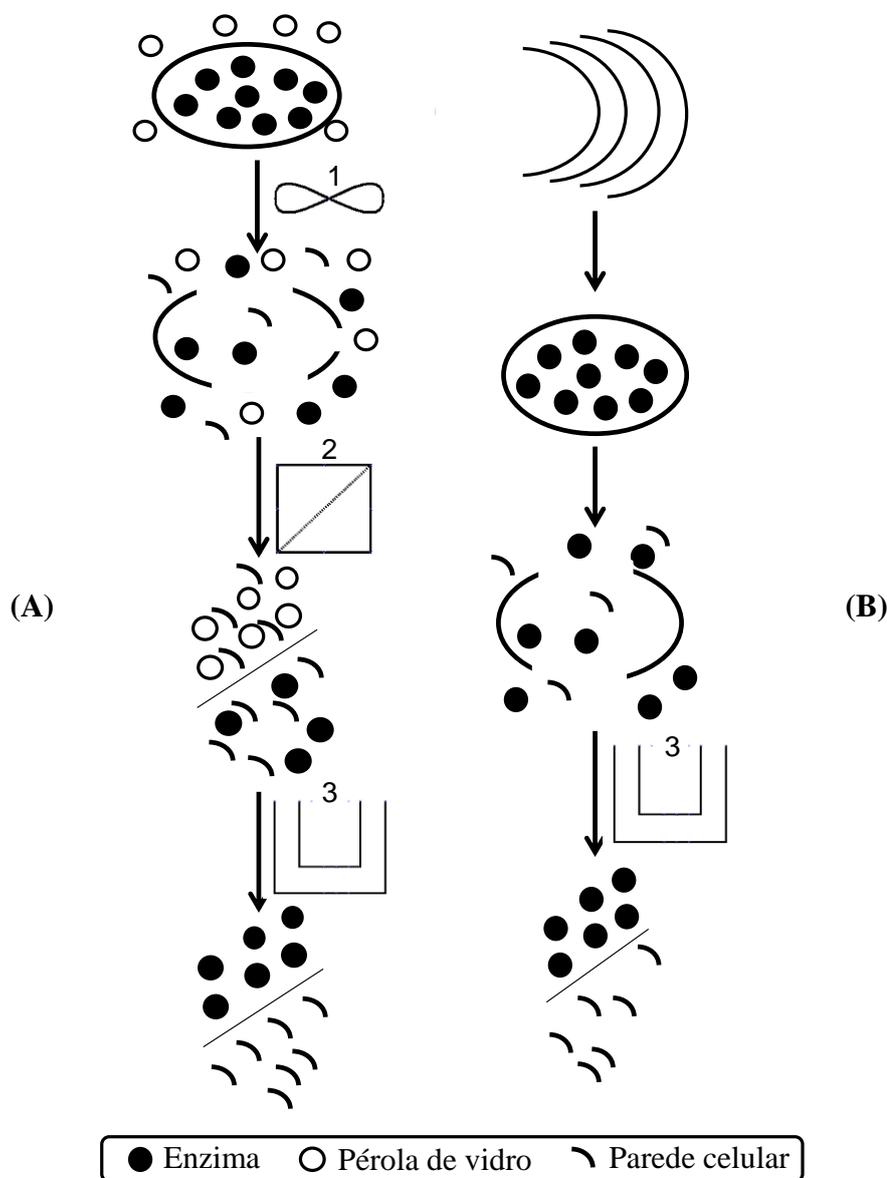
A ruptura pelo método ultrassônico foi realizada através de um homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250) com frequência de 20 kHz e potência máxima de 150 W, onde 40 mL da suspensão celular mantida sob constante refrigeração foi submetida às ondas ultrassônicas constantes por até 30 min, utilizando uma micro ponteira (Mp) (40% de potência) e uma ponteira intermediária (Pi) (70% de potência), ambas de titânio.

Para obtenção do extrato enzimático clarificado, a suspensão celular, obtida a partir dos diferentes processos de ruptura, foi centrifugada a 4700 x g, 4°C durante 10 min. Os mecanismos de ação dos métodos empregados estão representados na Figura 2.

A eficiência dos métodos de ruptura foi avaliada através da determinação da atividade enzimática e proteína total. Além disso, foi determinada a atividade específica, estabelecida pela relação entre a atividade enzimática (U/mL) e a concentração de proteína (mg/mL) e o rendimento do processo, relação da atividade enzimática total (U) e biomassa utilizada no processo de extração (g). As análises foram realizadas através da retirada de alíquotas a cada 2 min durante o processo de extração por ultrassom utilizando a micro ponteira, a cada 1 min para a ponteira intermediária e no tempo fixo de 40 min para o processo de abrasão, conforme estabelecido por Medeiros et al. (2008).

A ruptura das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 foi também verificada através da visualização microscópica, utilizando corante (combinação de cristal violeta/fucsina) e ampliação de 1000 vezes.

Figura 2 – Mecanismo de ruptura celular pelo método por abrasão utilizando pérola de vidro (A) e pelo método ultrassônico (B). 1 – Agitação; 2 – Filtração; e 3 – Centrifugação.



Fonte: LEMES; ÁLVARES; KALIL (2012)

2.3 Produção de queratinase: micro-organismo, inóculo e produção da enzima

O *Bacillus* sp. P45 (Número de acesso no GenBank: AY962474), foi utilizado na produção de proteases. Uma caracterização parcial mostrou que a cepa enquadra-se no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS (SIRTORI et al., 2006). A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30°C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma

solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011).

A enzima foi produzida por cultivo submerso conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011) utilizando meio mineral composto por (g/L): NaCl (0,5), KH₂PO₄ (0,4), K₂HPO₄ (0,3), NH₄Cl (1,9) e diferentes substratos proteicos (farinha de penas, farinha de penas residual, biomassa residual e uma mistura de farinha de penas e biomassa residual). Os substratos proteicos foram adicionados ao meio respeitando-se a mesma proporção de proteínas em sua composição final. O cultivo foi realizado a 30°C, 125 rpm por 72 h. Alíquotas do meio de cultivo foram retiradas em intervalos pré determinados, clarificado por centrifugação (4°C, 5000 \times g por 20 min) e o sobrenadante contendo a enzima utilizado para acompanhamento do pH e da atividade enzimática.

2.3.1 Determinação da produtividade de protease por *Bacillus* sp. P45

A produtividade de protease (P , U/mL/h) foi determinada para cada curva de crescimento, a partir dos valores máximos de atividade para cada substrato utilizado. A produtividade enzimática foi calculada através da Equação 1 (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P = (A_{m\acute{a}x} - A_0) / t \quad (1)$$

Onde: A_0 é a atividade enzimática inicial (U/mL), $A_{m\acute{a}x}$ é a atividade máxima encontrada (U/mL) e t é o tempo necessário para atingir a $A_{m\acute{a}x}$ (h).

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática de β -galactosidase foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato (INCHAURRONDO; YANTORNO; VOGET, 1994). A mistura reacional foi composta por 50 μ L do extrato enzimático, 2000 μ L de ONPG preparado em tampão KH₂PO₄ 50 mM com MnCl₂.4H₂O 0,1mM pH 6,6 e incubada em banho com agitação a 37°C por 5 min. A reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de solução de carbonato de sódio 10%. O produto formado, *o*-nitrofenol, (ONP) foi medido espectrofotometricamente em 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto, a 37°C e pH 6,6.

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009). O substrato utilizado foi a azocaseína 1% (m/v) em tampão tris-HCl 100 mM pH 7,5. A mistura reacional foi composta por 100 µL de tampão tris-HCl 100 mM pH 7,5, 300 µL de azocaseína e 100 µL do extrato enzimático. A reação foi incubada em banho com agitação a 40°C durante 30 min e finalizada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 x g por 20 min) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,8 M. A transmitância foi medida a 420 nm.

A atividade queratinolítica foi verificada utilizando protocolo similar à atividade proteolítica, exceto pela utilização do substrato específico azoqueratina 1% (m/v). Uma unidade de atividade proteolítica e/ou queratinolítica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância, sob as condições do ensaio.

2.4.2 Determinação de proteína solúvel e de nitrogênio total

A determinação da proteína solúvel durante a extração da enzima β -galactosidase foi realizada segundo metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

A determinação da concentração de nitrogênio total dos substratos proteicos foi realizada em base seca através do método de Kjeldahl segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985), convertendo-se o nitrogênio quantificado em proteína por um fator de conversão de 6,25.

2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância para detectar diferenças significativas entre os tratamentos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração de β -galactosidase

Os resultados obtidos a partir da ruptura pelo método ultrassônico estão apresentados na Figura 3 que mostra a atividade de β -galactosidase (A), proteína total (B) e

atividade específica (C) ao longo do tempo, utilizando a micro ponteira (MP) e a ponteira intermediária (PI) no processo de extração.

A utilização da ponteira intermediária (Pi) no ruptor ultrassônico, que fornece uma potência de 105 W, alcançou valores de atividade enzimática similares aos obtidos pelo método de ruptura por abrasão. Isto é confirmado pelo fato de que neste processo a atividade enzimática foi apenas 10% menor do que em relação ao método por abrasão, que foi de 39,1 U/mL com atividade específica de 8,8 U/mg.

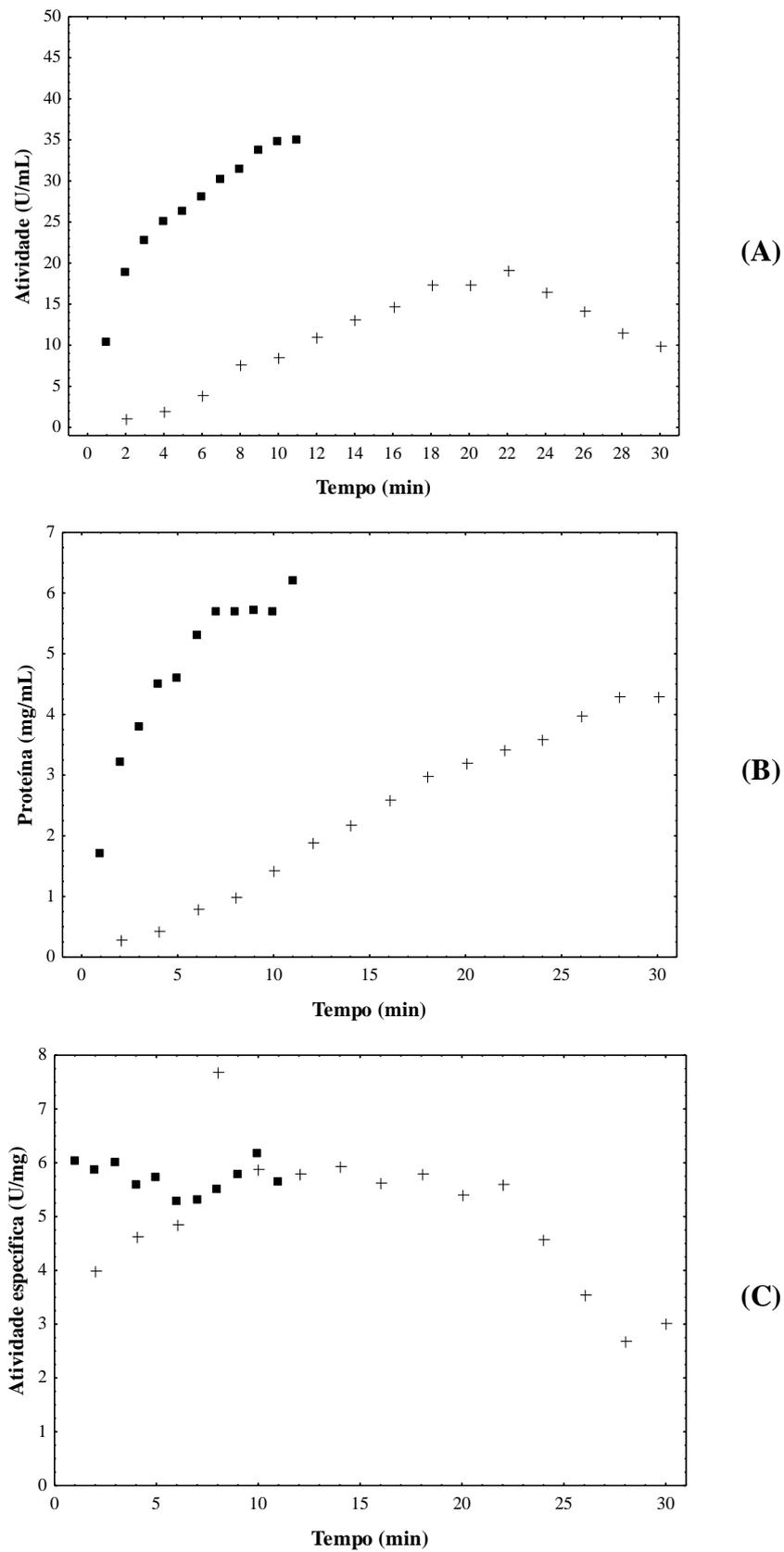
Já a micro ponteira (Mp), que fornece uma potência menor, (60 W), resultou em valores bem inferiores de atividade enzimática, até 50% menor em relação ao método de extração que utiliza pérolas de vidro e 45% em relação à ponteira intermediária, de maior potência.

A utilização das diferentes ponteiros no processo que utiliza ultrassom foi positivamente favorável na extração enzimática, principalmente no comparativo entre o grau de ruptura celular da levedura, que aumentou com o incremento da potência e das ondas ultrassônicas dissipadas no meio contendo as células.

A ponteira intermediária mostrou-se mais eficiente na ruptura celular para liberação da enzima e das demais proteínas (Figura 3A e 3B). No entanto, a micro ponteira proporcionou em alguns pontos maiores atividades específicas devido à menor liberação de proteínas do interior da célula da levedura, resultando em certo momento do processo em uma maior atividade específica (Figura 3C). Ou seja, a ponteira que fornece menor potência foi, em um ponto específico do processo (8 min), capaz de liberar menor quantidade de proteína do interior da célula, aumentando a atividade específica da enzima alvo.

Além disso, o menor aquecimento conferido, já que por limitação técnica fornece uma potência menor ao meio, pode ter reduzido o grau de desnaturação enzimática, resultado da menor dissipação de ondas ultrassônicas e consequente redução da dissipação de calor. Ainda em relação à atividade específica é possível verificar que se manteve praticamente constante durante o processo utilizando a ponteira intermediária, o que é devido a liberação simultânea da enzima e demais proteínas do interior da célula da levedura. Já o ensaio com a micro ponteira apresentou uma queda drástica da atividade específica, ocasionada pela desnaturação enzimática após 22 min de processo e da ininterrupta liberação e fragmentação de proteínas para o meio contendo a enzima.

Figura 3 – Atividade enzimática (A), proteína total (B) e atividade específica (C) durante o processo de extração de β -galactosidase. (■) Ponteira intermediária; (+) Micro ponteira.



O rendimento do processo com ultrassom foi superior quando se utilizou a ponteira intermediária, 876 U/g, quase duas vezes superior ao rendimento proporcionado pela utilização da micro ponteira, 480 U/g (Tabela 1). Apesar do maior rendimento obtido utilizando-se o método de abrasão com pérolas de vidro, atingindo 977,5 U/g, o processo ultrassônico apresenta-se como uma alternativa eficiente para extração da enzima produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Tabela 1 – Atividade enzimática, proteína, atividade específica e rendimento do processo de extração de β -galactosidase com a utilização do método ultrassônico e abrasivo.

Método de ruptura	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (U/g)
Abrasão*	39,1 ^a	4,4	8,8	977,5 ^a
Ultrassom (PI)**	35,0 ^b	6,2	6,0	876,0 ^b
Ultrassom (MP)**	19,2 ^c	4,3	7,7	480,0 ^c

*valores no tempo de 40 min. **valores máximos obtidos no acompanhamento do processo de extração utilizando ultrassom. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$).

O rendimento do processo que por muitas vezes é negligenciado deve ser levado em consideração, pois em muitos casos, pode inviabilizar e limitar o desenvolvimento e implementação de novas metodologias para obtenção de enzimas de interesse.

Diversos trabalhos publicados reportam a utilização eficiente do ruptor ultrassônico para os mais variados bioprodutos obtidos a partir de micro-organismos. Medeiros et al. (2008) estudaram a extração da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081, utilizando sistema de sonicação em combinação com o processo de abrasão com pérolas de vidro em uma carga de 1,1 g de pérolas de vidro por mL de suspensão celular (diâmetro entre 0,95 - 1,05 mm), por um período de 40 min, o que proporcionou um rendimento do processo de extração de 550,4 U/g.

Gerde et al. (2012) utilizaram o método de extração ultrassônico para extração de lipídios do interior da célula de microalgas autotróficas e heterotróficas, o qual se mostrou eficiente. Em ambos os tipos de algas, a extração de material intracelular aumentou com o aumento do tempo e da energia dissipada. No entanto, foi constatado que as condições operacionais devem ser bem estabelecidas e controladas, pois o processo sem controle pode resultar na formação de radicais livres que prejudicam a qualidade do óleo extraído neste processo.

Michelon et al. (2012) estudaram a extração de carotenóides de *Phaffia rhodozyma*, utilizando diversos métodos de extração, entre eles, a utilização de banho ultrassônico. Este processo em conjunto com o congelamento da biomassa proporcionou uma extração de 88,3 µg/g de carotenóides. Do mesmo modo Fonseca et al. (2011) também realizaram a extração de astaxantina de *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268, utilizando ondas de ultrassom. O método mostrou-se eficaz na ruptura da parede celular da levedura quando utilizado em conjunto com a secagem como pré-tratamento, alcançando atividade específica de astaxantina de 2198,4 µg/g. Além disso, o método foi apontado como alternativa potencial em relação a outros métodos para determinação analítica.

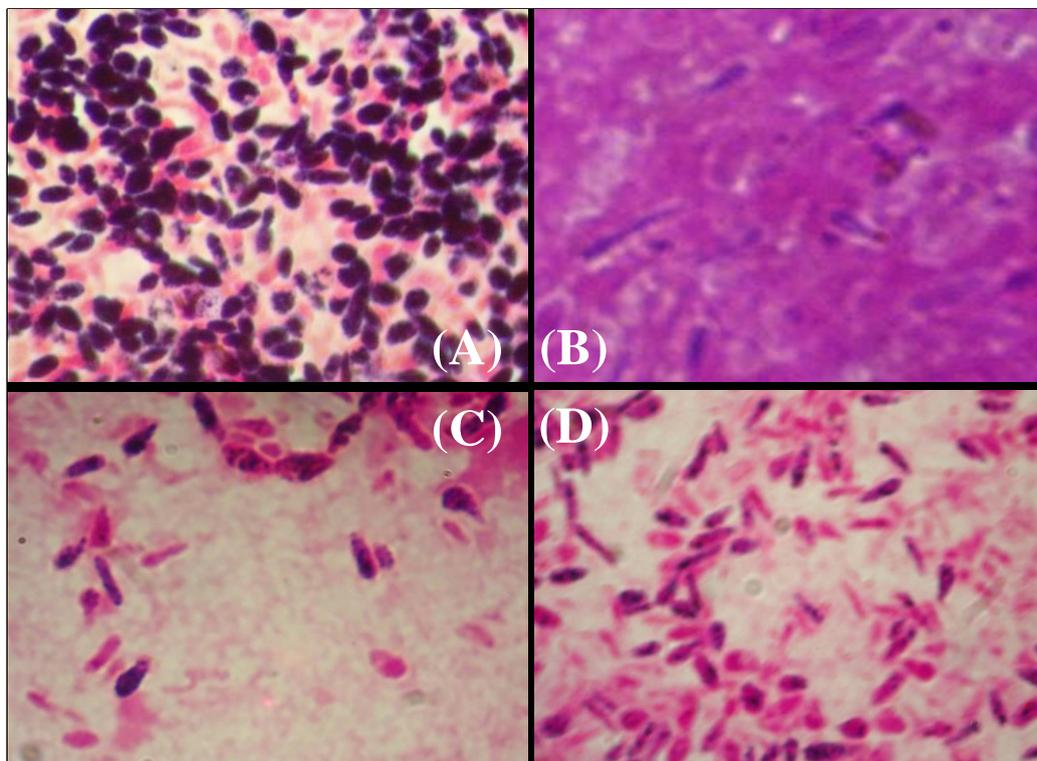
Através da microscopia (Figura 4) foi possível verificar que o método de extração, utilizando abrasão com pérolas de vidro (4B), resultou em maior ruptura das células em relação à célula da levedura sem tratamento (4A), confirmado pela maior atividade enzimática, seguido pelo método de ruptura, utilizando ponteira intermediária (4C) e, por último, a micro ponteira, que explica também a menor atividade enzimática.

Apesar dos ótimos resultados apresentadas pelo método de extração por ultrassom, a temperatura, durante o processo, deve ser controlada, já que a dissipação das ondas na suspensão celular gera calor e pode resultar na desnaturação da enzima e consequente perda da eficiência do processo.

Se por um lado o aumento da temperatura deve ser observado com cautela e possa parecer um fator negativo à utilização deste método de extração, por outro tem que se considerar e destacar as vantagens, já que o método mostrou-se potencialmente eficiente, pois, além de resultar em atividade enzimática similar à técnica por abrasão, é uma técnica muito menos laboriosa, por não necessitar de trabalho manual constante. Além disso, o rápido desenvolvimento tecnológico permite a aplicação desta técnica em escala industrial, uma vez que este tipo de aparato já foi utilizado com sucesso em grande escala para os mais variados processos (GOGATE; KABADI, 2009; HU; ZHENG; QIU, 2006; MASON; PANIWNKY; LORIMER, 1996), sendo, portanto, viável em grande escala para a ruptura de material celular visando a obtenção de bioprodutos.

Outra vantagem associada à utilização da técnica de extração com ultrassom está o menor consumo de solvente, quando comparada aos métodos de extração com solventes, e a não exigência de equipamentos de alto custo (MELLO; LOBO; YABE, 2009) que, na maioria das vezes, inviabiliza a obtenção do bioproduto de interesse.

Figura 4 – Células da levedura *K. marxianus* CCT 7082 sem nenhum pré-tratamento (A); (B) Células após ruptura por abrasão; (C) Células após ruptura ultrassônica utilizando ponteira intermediária (D); Células após ruptura ultrassônica utilizando micro ponteira.



Além disso, ao final do processo é necessário realizar apenas uma etapa de centrifugação para retirada do material celular disperso na solução aquosa, enquanto que no processo por abrasão é necessária uma etapa de filtração adicional para retirada do material abrasivo e posterior centrifugação para separar o material celular (Figura 2). Por mais simples que pareça a etapa adicional, qualquer alteração do processo pode prejudicar e até mesmo inviabilizá-lo, em razão de perdas do composto de interesse e aumento do custo de obtenção.

Desta forma, o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos processos de extração dos compostos de interesse devem ser constantemente abordados de modo a reduzir tempo de extração e, principalmente, aumentar o rendimento do processo.

A utilização do método de extração por ultrassom permitiu a obtenção da enzima β -galactosidase com atividade superior a 35,0 U/mL, a qual pode ser destinada a processos de purificação e/ou aplicada em processos de hidrólise da lactose em leite e derivados lácteos, e também para a produção de galactooligosacarídeos, que atuam como alimentos funcionais, trazendo diversos efeitos benéficos para o organismo humano (HSU et al., 2007). Adicionalmente, o extrato rompido, além de conter a enzima, apresenta em sua composição

cerca de 40 mg/mL de biomassa, a qual, depois de centrifugada, separada e seca, pode apresentar um teor de proteína superior a 40,0%, tornando-a atrativa para a obtenção de proteases a partir de sua utilização como fonte de nitrogênio.

3.2 Obtenção de protease através do cultivo do *Bacillus* sp. P45

Todos os substratos proteicos utilizados no cultivo do *Bacillus* sp. P45 permitiram a produção de enzimas proteolíticas e queratinolíticas (Tabela 2). Em comum todos os substratos apresentaram elevado teor de proteínas (Tabela 3). A biomassa residual do processo de produção da enzima β -galactosidase apresentou 46,3% de proteínas enquanto a farinha de penas apresentou 91,5% em sua composição. Já a farinha de penas residual apresentou 98,8%, conteúdo superior a pena sem reutilização. O que podemos supor, é que o micro-organismo, durante o primeiro cultivo, metaboliza e utiliza outros componentes, como lipídios e minerais, além das proteínas, resultando em uma farinha residual composta basicamente de proteínas.

Tabela 2 – Atividade proteolítica, queratinolítica e produtividade obtidos no pico máximo de produção da enzima (U/mL).

Meio	Tempo (h)	Atividade proteolítica (U/mL)	Produtividade (U/mL/h)	Atividade queratinolítica (U/mL)	Produtividade (U/mL/h)
1 – Farinha de penas	48	699,3±15,5 ^d	14,6±0,32 ^c	52,3±2,7 ^b	1,09±0,06 ^c
2 – Farinha de penas reutilizada	32	1009,30±32,93 ^b	31,1±0,34 ^b	89,2±1,98 ^a	2,79±0,06 ^a
3 – Biomassa residual	32	1306,60±21,26 ^a	40,8±0,66 ^a	35,2±2,5 ^c	1,1±0,08 ^c
4 – 50 % farinha de penas + 50 % biomassa residual	32	903,25±33,03 ^c	25,15±5,9 ^b	54,0±3,25 ^b	1,69±0,1 ^b

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$).

Entre as fontes de nitrogênio verificadas, a biomassa residual da levedura mostrou-se o melhor substrato para a produção da enzima com propriedades proteolíticas após 32 h de cultivo submerso, apresentando significativamente ($p < 0,05$) a maior atividade

enzimática, aproximadamente 1306,6 U/mL, seguido da farinha de penas reutilizada (1009,3 U/mL) e do cultivo com substratos mistos (903,25 U/mL), ambos após o período de cultivo de 32 h. A menor produção da enzima proteolítica foi verificada com a utilização da farinha de penas (699,3 U/mL), onde o pico máximo de produção ocorreu após 48 h de cultivo (Figura 6).

Tabela 3 – Composição em relação a proteína (base seca) dos substratos proteicos utilizados no cultivo do *Bacillus* sp. P45 para produção de protease.

Substrato	Proteína (%)
Farinha de penas	91,5 ± 1,0
Biomassa residual de levedura	46,3 ± 0,8
Farinha de penas reutilizada	98,8 ± 1,2

Uma maior ou menor produção da enzima está relacionada com a qualidade e quantidade de nitrogênio disponível durante o cultivo e que pode interferir na produção da enzima, bem como a relação carbono-nitrogênio imposta no meio de cultivo, que pode aumentar o número de íons de amônio, causando um efeito positivo ou indesejável sobre o metabolismo celular (LANG et al., 1997). Em bactérias, as fontes de nitrogênios são metabolizadas para a produção de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e componentes da parede celular (GUPTA; KHARE, 2007).

A maior produção da enzima proteolítica utilizando a biomassa residual pode ser relacionada com uma maior assimilação desse substrato pelo micro-organismo, uma vez que durante o processo de ruptura por ultrassom o material celular é fragmentado, sendo assim, apresenta uma maior superfície de interação substrato/enzimas/micro-organismo, conseqüentemente facilitando sua conversão e utilização como fonte de nitrogênio.

Além disso, os dados referentes à biomassa residual de levedura intacta demonstram haver em sua composição um elevado teor de proteínas, vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), minerais, macro e microelementos, particularmente selênio e fibras dietéticas, representados por carboidratos da parede celular, principalmente mananas e glicanas (HALASZ; LÁSZTITY, 1991), e ainda, quantidades apreciáveis de fósforo, potássio, cálcio, magnésio e sódio (BORCHANI et al., 2014; ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014), sendo o magnésio, principalmente, apontado

como estimulador da produção de queratinase durante o cultivo de *Bacillus* (DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011).

A partir dos dados disponíveis na literatura referentes à biomassa integral pode-se supor que, mesmo após o processo de ruptura, podem ainda ser encontrados resíduos desses componentes na biomassa fragmentada, os quais podem ser utilizados para manutenção do metabolismo do micro-organismo durante o seu desenvolvimento, influenciando no aumento da produção da enzima. Já em relação à biomassa fragmentada, é relatado que esta apresenta uma alta digestibilidade quando submetida ao processo de fragmentação, a qual é atribuída às alterações e diminuição da resistência da parede celular, o que facilitaria o processo de proteólise pelas enzimas produzidas durante o cultivo do *Bacillus* (YAMADA et al., 2003).

Já a razão pela qual a farinha de penas reutilizada apresentou um maior efeito na produção da enzima em relação a farinha de penas sem reuso, pode ser associada à modificação estrutural do substrato causada pela ação do micro-organismo ou enzimas produzidas durante seu crescimento.

Isso se deve ao fato de que as penas são compostas por cerca de 90% de queratina (BRANDELLI, 2008) e que apresentam uma estrutura complexa, possuindo em sua cadeia proteica estruturas de α -hélice (α -queratina), β -folhas (β -pregueada) e uma cadeia polipeptídica com elevado nível de enovelamento. Além disso, a queratina apresenta um alto grau de ligações inter e intracadeia devido às ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (FRASER; PARRY, 2008; PARRY; NORTH, 1998). Desta forma, foi presumido que durante o cultivo, as ligações, ou boa parte delas, são quebradas, permitindo a utilização de forma mais efetiva desse substrato pelo micro-organismo no segundo cultivo, principalmente por ocasionar uma maior acessibilidade do micro-organismo e enzimas envolvidas no seu metabolismo às moléculas de queratina.

Assim, pode-se dizer que as ligações dissulfetos da queratina presentes na farinha de pena são atacadas em um primeiro momento por enzimas dissulfeto redutases, as quais produzem uma proteína parcialmente “fragmentada”, que se torna um ótimo substrato para uma ação posterior de proteases (YAMAMURA et al., 2002).

Além do mecanismo de queratinólise, compreendido pela degradação da queratina, outro fenômeno, o sistema sulfitolítico, parece estar associado a essa “melhora” da disponibilidade do substrato. O processo de sulfitólise compreende a redução das ligações dissulfeto, e evidências da ocorrência e importância deste processo surgem do fato de que níveis elevados de queratinólise ocorrem somente com a clivagem destas ligações (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010), corroborando com a ideia de que esse fenômeno

possa ter ocorrido previamente na farinha de penas reutilizada, resultando em um material com a queratina mais disponível e resultando na maior produtividade enzimática quando o substrato foi a farinha de penas reutilizada.

Em relação à produtividade da enzima com propriedades proteolíticas, pode-se observar que foi significativamente superior ($p < 0,05$) quando utilizada biomassa residual de *K. marxianus*, com produção máxima de 40,8 U/mL/h em 32 horas de cultivo (pico máximo de produção). Os cultivos realizados com farinha de penas reutilizada e com substratos mistos (farinha de penas + biomassa) foram significativamente iguais, com produtividade máxima em 32 h e 31,1 e 25,1 U/mL/h, respectivamente. A produtividade máxima para o cultivo utilizando farinha de penas sem reuso foi significativamente menor, com 14,6 U/mL/h em 48 h de cultivo. Embora a produção neste meio tenha aumentado até 48 h, o rendimento da enzima foi sempre inferior aos observados nos demais substratos, um comportamento que parece ser relacionado com a capacidade do *Bacillus* em utilizar de forma mais eficiente os demais substratos.

Já em relação a produtividade da enzima com propriedades queratinolíticas é possível verificar que uma maior produção ocorreu quando se aplicou a farinha de penas reutilizada como substrato (2,79 U/mL/h), com pico máximo de produção em 32 h, seguido do meio com utilização de coprodutos mistos (farinha de pena + biomassa residual), com 1,69 U/mL/h, em 32 h.

Apesar da atividade queratinolítica do cultivo utilizando farinha de penas ter sido superior (52,3 U/mL) ao uso da biomassa residual (35,2 U/mL), as produtividades foram significativamente iguais, devido a diferença do pico de produção máxima da enzima, 48 h para o cultivo utilizando farinha e 32 h para o cultivo com biomassa.

Daroit, Corrêa e Brandelli (2009), de mesmo modo, verificaram a produção de proteases extracelulares e queratinase por *Bacillus* sp. P45 utilizando farinha de penas como substrato com valores máximos de atividade enzimática em 48 h de cultivo, aproximadamente 600 U/mL, a qual diminuiu em seguida.

A atividade enzimática nos cultivos utilizando biomassa residual, seja de forma parcial ou integral, apresentou queda drástica após o período de produção máxima da enzima, 36 h (Figura 6). A produção de diferentes proteases, com moléculas alvos não tão específicas, pode resultar em um processo de “ataque” às demais enzimas, uma vez que, por serem proteínas, podem ser degradadas por outras enzimas, levando a tal redução.

Já os cultivos utilizando farinha de penas como substrato, resultaram em uma queda após o pico de máxima produção, permanecendo constante até o final do cultivo. Isto pode indicar uma menor produção de proteases inespecíficas ou a produção de proteases que assimilam outros tipos de componentes diferentes das proteínas ou enzimas produzidas no meio.

A interrupção da produção enzimática no tempo de 32 h, principalmente para os cultivos utilizando biomassa residual, é indispensável, sendo necessário que a temperatura do meio de cultivo seja reduzida, de forma a cessar ou retardar a atividade enzimática, e que este material seja submetido a etapas de purificação para posterior aplicação da enzima alvo, de forma a não comprometer sua viabilidade e rendimento.

Em relação ao pH dos meios de cultivos foi possível verificar um aumento de 6,0 para aproximadamente 9,4 após 72 h de cultivo utilizando o *Bacillus* sp. P45 (Figura 5), independente do substrato utilizado. O aumento do pH do meio indica, então, a capacidade do *Bacillus* em degradar e utilizar esses substratos em seu metabolismo, uma vez que esse incremento do pH é resultado da produção de amônia por meio da desaminação dos peptídeos e aminoácidos derivados da degradação da queratina e da biomassa residual dos meios (KUMAR et al., 2008).

Figura 5 – pH durante o cultivo do *Bacillus* sp. P45 para produção de protease utilizando diferentes substratos proteicos. 1 - (●) Farinha de penas; 2 - (■) Farinha de penas reutilizada; 3 - (▲) Biomassa residual; e 4 - (◇) Farinha de penas (50%) / Biomassa residual (50%).

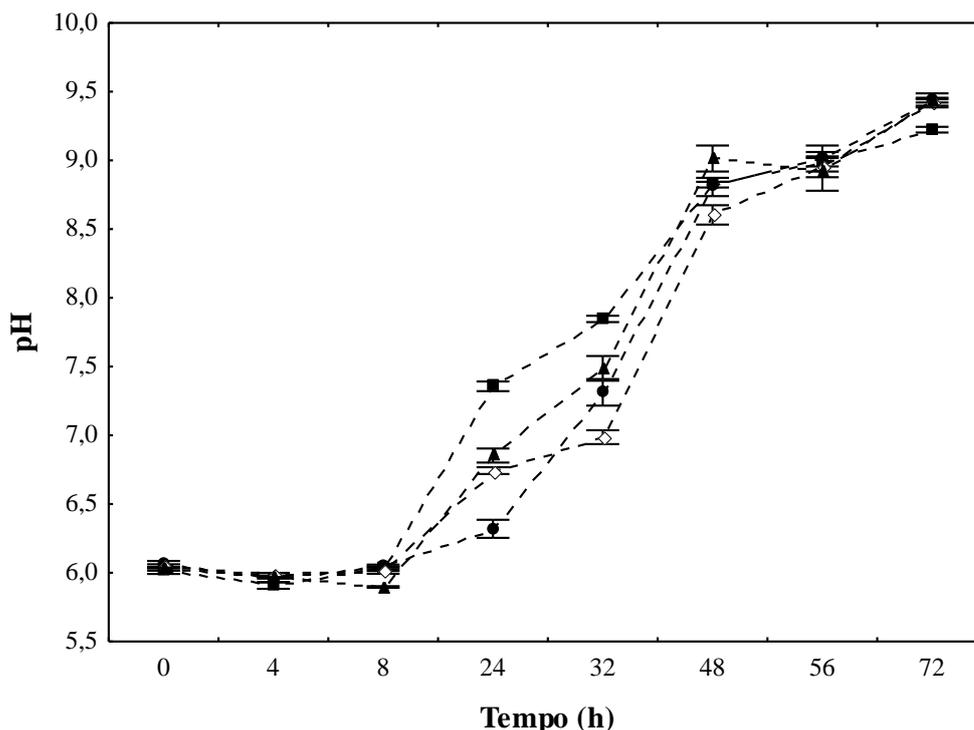
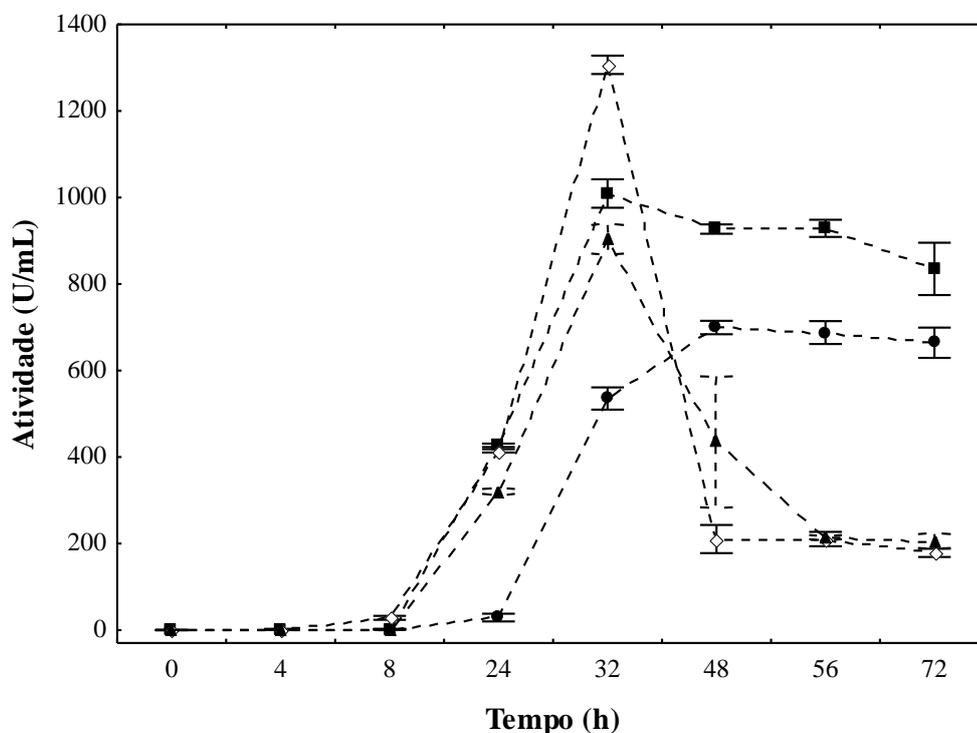


Figura 6 – Atividade de protease durante o cultivo do *Bacillus* sp. P45 utilizando diferentes substratos proteicos. 1 - (●) Farinha de penas; 2 - (■) Farinha de penas reutilizada; 3- (◇) Biomassa residual; e 4 - (▲) Farinha de penas (50%) / Biomassa residual (50%).



Genckal e Tari (2006) também verificaram o aumento do pH durante o cultivo do *Bacillus* sp., o qual passou de 7,0 para 12,0 durante as 96 h de cultivo, resultando em picos máximos de atividade em torno de 200 U/mL. Daroit; Corrêa e Brandelli (2011), por sua vez, também relataram o aumento do pH do meio de cultivo de 7,1 a 8,6 após 3 dias de cultivo com *Bacillus* sp. P45, indicando que este fenômeno é típico durante o crescimento de microorganismos em substratos proteicos.

Apesar da atividade proteolítica no cultivo com biomassa residual de levedura ser significativamente maior em relação aos demais substratos (1306,6 U/mL), o inverso foi observado em relação a atividade queratinolítica (35,2 U/mL). Os cultivos realizados com farinha de penas apresentaram as maiores atividades queratinolíticas, o que confirma a participação da queratina como indutor no processo de produção da queratinase pelo *Bacillus*. O cultivo com farinha de penas reutilizadas apresentou significativamente a maior atividade queratinolítica (89,2 U/mL), seguidos pelos cultivos utilizando meio misto (farinha de penas +

biomassa) e com farinha de penas sem reuso, com atividade queratinolítica de 54,0 e 52,3 U/mL, respectivamente.

Os resultados encontrados demonstraram que, apesar da menor atividade queratinolítica em relação aos demais substratos, a biomassa residual de levedura pode ser uma alternativa interessante para destino deste coproduto e, após otimização de cultivo, para produção de proteases com propriedades queratinolíticas a partir do cultivo de *Bacillus*.

Adicionalmente, considerando que o alto custo dos substratos em meio de cultivo para a obtenção comercial de enzimas é um dos principais obstáculos, pois representam em torno de 40% dos custos (JOO; CHANG, 2005), a busca por substratos alternativos pode contribuir para redução de custos de bioprocessos onde a enzima é aplicada. Além disso, a necessidade do aproveitamento total de coprodutos gerados, como, por exemplo, a utilização de biomassa residual em um outro processo biotecnológico, representa uma alternativa interessante para obtenção de proteases a partir do *Bacillus* sp. P45.

Além da obtenção de proteases, a biomassa microbiana residual pode ser utilizada em outros processos como na produção de biocombustíveis (ESPINOSA-GONZALEZ et al., 2014), ingrediente alimentar (RAMOS et al., 2011), ração animal, substrato para microorganismos (FERREIRA et al., 2010), entre outros.

4 CONCLUSÃO

O método de extração utilizando ruptor ultrassônico (frequência de 20 KHz e potência máxima de 150 W) com ponteira intermediária (70% de potência) mostrou-se eficiente para extração de β -galactosidase do interior das células da levedura *K. marxianus*, pois propiciou altos valores de atividade enzimática e rendimento de processo, com valores similares ao método de extração por abrasão que utiliza pérolas de vidro. Além disso, foi possível obter a partir deste processo um coproduto, a biomassa residual, com elevado teor de proteínas, superior a 46,0%, o qual pôde ser utilizado como substrato para o cultivo do *Bacillus* sp. P45.

Em relação à produção de enzimas proteolíticas por *Bacillus*, a biomassa residual foi o substrato que conferiu maior produção enzimática, 1300 U/mL, durante os cultivos com pico de produção em 32 h. Já em relação à atividade queratinolítica, a farinha de penas reutilizada foi a que apresentou a maior atividade (89,2 U/mL) em 32 h de cultivo.

O processo integrado de produção de bioprodutos desenvolvido permitiu a obtenção de protease a partir de um processo com substratos alternativos e que permitiu o

aproveitamento dos coprodutos gerados, biomassa e farinha de penas residuais, representando uma alternativa interessante para gestão desse coproduto.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORCHANI, C.; FONTEYN, F.; JAMIN, G.; PAQUOT, M.; BLECKER, C.; THONART, P. Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). **Food Chemistry**, v. 163, p. 108–113, 2014.

BOSSIO, J. P.; HARRY, J.; KINNEY, C. A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. **Chemosphere**, v. 50, n. 9, p. 858-864, 2008.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 105-116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1735-1750, 2010.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 358-363, 2009.

DAROIT, D. J.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Kinetic stability modelling of keratinolytic protease p45: influence of temperature and metal ions. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 165, p. 1740–1753, 2011.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, n.1, p.45-51, 2011.

ESPINOSA-GONZALEZ, I.; PARASHAR, A.; BRESSLER, D. C. Hydrothermal treatment of oleaginous yeast for the recovery of free fatty acids for use in advanced biofuel production. **Journal of Biotechnology**, v. 187, p. 10–15, 2014.

- FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVAREL, J.G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 77-84, 2010.
- FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1165-1171, 2011.
- FRASER, R. D. B.; PARRY, D. A. D. Molecular packing in the feather keratin filament. **Journal of Structural Biology**, v. 46, p. 4515-4520, 2009.
- GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 1-12, 1985.
- GENCKAL, H.; TARIB, C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 703–710, 2006.
- GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175–181, 2012.
- GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 60–72, 2009.
- GUPTA, A.; KHARE, S.K. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 11–16, 2007.
- GURPILHARES, D. B.; PESSOA- JR, A.; ROBERTO, I. C. Obtenção de glicose-6-Fosfato desidrogenase a partir de Células de *Candida guilliermondii* cultivadas em Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz. In: **XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. 2003, Florianópolis: Simpósio Nacional de Fermentações, p. 1-7.
- HALASZ, A.; LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. Boca Raton: CRC Press; 1991. 312p.
- HSU, C. A.; YU, R. C.; LEE, S. L. & CHOU, C. C. Cultural condition affecting the growth and production of beta-galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 186-189, 2007.
- HU, A.; ZHENG, J.; QIU, T. Industrial experiments for the application of ultrasound on scale control in the Chinese sugar industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 329–333, 2006.
- INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 47-54, 1994.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 44-45.

- JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, 1263-1270, 2005.
- KUMAR, A. G.; SWARNALATHA, S.; GAYATHRI, S.; NAGESH, N.; SEKARAN, G. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 411-419, 2008.
- LANG, C.; GOLLNITZ, C.; POPOVIC, M.; STAHL, U. Optimization of fungal polygalacturonase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch culture. **Chemical Engineering Journal**, v. 65, p. 219-226, 1997.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (a) the upgrading concept; (b) practical implementation. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.
- LAZZARONI, S. M. **Desarrollo de quesos probióticos de alta actividad de agua, reducidos en grasas y colesterol**. Tese de Doctorado en Tecnología Química. Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Ingeniería Química. 348 p. 2014.
- LEMES, A. S.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 7-13, 2012.
- MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, p. 66-72, 2008.
- MASON, T. J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, p. 253-260, 1996.
- MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.
- MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Purification of β -galactosidase by ion exchange chromatography: elution optimization using an experimental design. **Chemical Engineering Technology**, v. 5, n. 35, p. 911-918, 2012.
- MELLO, P. C. M.; LOBO, I.; YABE, M. J. S. Optimization of ultrasonic extraction and analyses methodology by HPLC for determination of diuron and its metabolites in soil cultivation of sugar cane. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2009.
- MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Extraction of Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2012.

NEVES, L. C. M. **Obtenção de glicose-6-fosfato desidrogenase a partir de *S. cerevisiae* W303-181**. Ribeirão Preto, 2003, 284 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Fermentações), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).

PARRY, D. A. D.; NORTH, A. C. T. Hard α -keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains. **Journal of Structural Biology**, v. 122, n. 1-2, p. 65-75, 1998.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. D. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, p. 118-127, 2007.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 438-442, 2003.

RAMOS, G. R. V.; BIRCHAL, V. S.; SEARA, L. M.; PEREIRA, F. D.; ALVISI, P. Chemical characterization of yeast autolysate and assessment of the acceptability of cheese buns containing dried autolysate. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 3, p. 473-484, 2011.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. ISBN: 85-212-0279-2, 2001.

SCHWICH, M. A. **Caracterización fisicoquímica de harina de chíá. Influencia de su agregado, en un queso untable funcional, sobre las características sensoriales**. Tesis de grado de Licenciatura en Nutrición. Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Ingeniería Química. 112 p. 2014.

SINGH, R.; KAPOOR, V.; KUMAR, V. Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic actinomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1545-1552, 2012.

SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. Strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General Applied of Microbiology**, v. 52, p. 357-363, 2006.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARUS, S.; VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 27-34, 2014.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Centesimal composition and protein nutritive value of yeast from ethanol fermentation and of yeast derivatives. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.

YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; RAO, S. R.; MURAKAMI, Y.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 595-600, 2002.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

CONCLUSÃO GERAL

Uma estratégia de purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 em maiores quantidades foi implementada com sucesso, sem comprometer a sua recuperação e pureza. Nestes sistemas o fator de purificação obtido através da estratégia de purificação adotada, foi de até 2,6 vezes no primeiro sistema aquoso bifásico (SAB), 6,7 vezes no segundo SAB e de 4,0 vezes na etapa de diafiltração. A recuperação enzimática alcançou valores de até 75,3% no primeiro SAB, 75,1% no segundo sistema e 84,3% na etapa de diafiltração.

Durante a caracterização, a enzima purificada mostrou elevada atividade na presença de CaCl_2 , CaO , $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ e MgSO_4 . Além disso, a temperatura de 55°C e pH 7,5 foram encontrados como ótimos para sua atividade, e meia vida próxima a 232,3 min foi verificada a 40°C. O valor da energia de desativação médio foi de 118,0 kJ/mol e os valores de z e D variaram de 13,6 a 18,8°C, e 6,7 a 237,3 min, respectivamente.

A enzima purificada, com atividade coagulante, foi empregada de forma eficiente no desenvolvimento de um queijo cremoso enriquecido com farinha de chia e quinoa. Os resultados alcançados apontaram de maneira positiva a aplicação da enzima como coagulante alternativo para o desenvolvimento de novos produtos lácteos.

O produto desenvolvido apresentou propriedades tecnológicas e sensoriais similares a outros produtos, sendo altamente estável e viável. A composição química indicou elevado teor de fibras, sugerindo seu consumo como fonte de fibras com benefícios à saúde. Além disso, o produto apresentou alta estabilidade microbiológica, alto índice de retenção de água e baixos valores de sinérese durante seu armazenamento.

Adicionalmente, o processo integrado de obtenção de enzimas de interesse industrial permitiu a extração de β -galactosidase utilizando o método ultrassônico. Além disso, foi possível utilizar a biomassa residual da levedura e farinha de penas residual para a produção de enzimas proteolíticas (1300 U/mL) e queratinolíticas (89,2 U/mL), respectivamente, a partir do cultivo do *Bacillus* sp. P45, sendo uma alternativa para gestão desses coprodutos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da especificidade de hidrólise da enzima proteolítica de *Bacillus* sp. P45 sobre as proteínas do leite bovino;
- Aplicação da enzima queratinase em processos de hidrólise, visando a obtenção de compostos com propriedades bioativas;
- Otimização da produção de proteases a partir do cultivo de *Bacillus* sp. P45 utilizando biomassa residual da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 como substrato;
- Caracterização da biomassa residual da levedura de *K. marxianus*, em relação às suas propriedades tecnológicas.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, R.; SYLVAIN, M.; ARCALIS, E.; ALTMANN, F.; FEVEREIRO, P.; STOGER E. Plants as biorreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. **Journal of Biotechnology**, v. 120, p. 121-134, 2005.
- AHMED, I. A.; MORISHIMA, M. I.; BABIKER, E. E.; MORI, N. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. **Food Chemical**, v. 116, p. 395-400, 2009.
- AICHINGER, P. A.; MICHEL, M.; SERVAIS, C.; DILLMANN, M. L.; ROUVET, M.; D'AMICO, N.; ZINK, R.; KLOSTERMEYER, H.; HORNE, D. S. Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, p. 243-255, 2003.
- ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**. 3 ed. New York: Wiley, 1986. 346 p.
- ALBERTSSON, P. A.; TJERNELD, F. Phase diagrams. **Methods in Enzymology**, v. 228, p. 3-13, 1994.
- ALBUQUERQUE, L. C. **Queijos no mundo: origem e tecnologia** – 2ª edição. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora. 130 p. 2002.
- ANBU, P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, n. 1, p. 162– 168, 2013.
- ANDRADE, J. P.; MATTOS, L. A. P.; CARVALHO, A. C.; MACHADO, C. A.; OLIVEIRA, G. M. M. National Physician Qualification Program in Cardiovascular Disease Prevention and Integral Care. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, p. 203-211, 2013.
- ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, n. 2, p. 214–220, 2013.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Disponível: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado em: Março de 2014.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 de novembro de 2012. Disponível: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado em: Março de 2014.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175-183, 1998.

AOAC International. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18th ed. International Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2005.

ASPELUND, M. T.; GLATZ, C. E. Clarification of aqueous corn extracts by tangential flow microfiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 365, n. 1, p. 123-129, 2010.

AYERZA, R.; COATES, W. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1366-1371, 2011.

BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 477-485, 2009.

BANSAL, S.; OBEROI, H. S.; DHILLON, G. S. PATIL, R. T. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 337-341, 2008.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a protease information system. **Journal of Structural Biology**, v. 134, n. 2-3, p. 95-102, 2001.

BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p.294-304, 2003.

BEG, Q. K.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. De-repression and Subsequent induction of protease syntesis by *Bacillus mojavensis* under fed batch operations. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1103-1109, 2002.

BEKA, R. G.; KRIER, F.; BOTQUIN, M.; GUIAMA, V. D.; DONN, P.; LIBOUGA, D. G.; MBOFUNG, C. M.; DIMITROV, K.; SLOMIANNY, M. C.; GUILLOCHON, D.; VERCAIGNE-MARKO, D. Characterisation of a milk-clotting extract from *Balanites aegyptiaca* fruit pulp. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 25-31, 2014.

BELHOCINE, D.; GRIB, H.; ABDESSMED, D.; COMEAU, Y.; MAMERI, N. Optimization of plasma proteins concentration by ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 142, n. 2, p. 159-171, 1998.

BELTER, P. A; CUSSLER, E. L. **Bioseparations-downstream processing biotechnology**. Jonh Wiley and Sons, 1988.

BERRIDGE, N. J. An improved method of observing the clotting of milk containing rennin. **Journal of Dairy Research**, v. 19, p. 328-332, 1952.

BHARGAVA, A.; SHUKLA, S.; OHRI, D. *Chenopodium quinoa* - An Indian perspective. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 73-87, 2006.

BIJINA, B.; CHELLAPPANA, S.; BASHEERA, S. M.; ELYASA, K. K.; BAHKALIC, A. H.; CHANDRASEKARANA, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2291–2300, 2011.

BORCHANI, C.; FONTEYN, F.; JAMIN, G.; PAQUOT, M.; BLECKER, C.; THONART, P. Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). **Food Chemistry**, v. 163, p. 108–113, 2014.

BOSKOU, D.; ELMADFA, I. **Frying of food: Oxidation, nutrient and non-nutrient antioxidants, biologically active compounds and high temperatures**. Boca Raton: CRC Press, 2011.

BOSSIO, J. P.; HARRY, J.; KINNEY, C. A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. **Chemosphere**, v. 50, n. 9, p. 858-864, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. AVEIRO.; KALIL, S. J. Formulation of Culture Medium with Agroindustrial Waste for β -Galactosidase Production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1653-1663, 2012.

BRAGA, A. R. C.; MANERA, A. P.; ORES, J. C.; SALA, L.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J. Kinetics and thermal properties of crude and purified β -galactosidase with potential for the production of galacto-oligosaccharides. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 45-52, 2013.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 105-116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1735-1750, 2010.

BRIGHENTI, M.; GOVINDASAMY-LUCEY, S.; LIM, K.; NELSON, K.; LUCEY, J. A. Characterization of the rheological, textural, and sensory properties of samples of commercial us cream cheese with different fat contents. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4501-4517, 2008.

BRYANT, A.; USTUNOL, Z.; STEFFE, J. Texture of cheddar cheese as influenced by fat reduction. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 1216-1220, 1995.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1279–1288, 2005.

CAMPESE, G.M.; TAMBOURGI, E. B. Índice de recuperação de proteína em sistemas de duas fases aquosas PEG-Policajú, usando coluna pulsada. In: VI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2007.

CAO, Z.J.; ZHANG, Q.; WEI, D.K.; CHEN, L.; WANG, J.; ZHANG, X.Q.; ZHOU, M.H. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and

purification of the enzyme. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.36, n.2, p.181-188, 2009.

CAPITANI, M. I.; SPOTORNO, V.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 94-102, 2012.

CARDOSO, M. V. C. **Efeito do centro metálico nas interações intramoleculares dos complexos [M(CN)5NO]x- com o poli(óxido de etileno) em sistema aquoso bifásico**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

CASTRO, R. J. S., SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813–821, 2013.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.12.001>.

CAVELLO, I. A.; HOURS, R. A.; ROJAS, N. L.; CAVALITTO, S. F. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5-6, p. 972–978, 2013.

CERQUEIRA, M. M. P. O.; PAIVA, C. A. V.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Impacto da qualidade da matéria-prima na indústria de laticínios. **Multimedia**, v. 1, p. 1-15, 2012.

CESAR, A.C.W. **Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

CHANG, J. J.; HO, F. J.; HO, C. Y.; WU, Y. C.; HOU, Y. H.; HUANG, C. C.; SHIH, M. C.; LI, W. H. Assembling a cellulase cocktail and a cellodextrin transporter into a yeast host for CBP ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 19, 2013.

CHAZARRA, S.; SIDRACH, L.; LOPEZ-MOLINA, D.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1393-1400, 2007.

CHOCKCHAIWASDEE, S.; ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using h-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, p. 434-443, 2005.

CHOUYYOK, W.; WONGMONGKOL, N.; SIWARUNGSON, N.; PRICHANONT, S. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. **Process Biochemistry**, v.40, p.3514-3518, 2005.

- COBOS, E.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 810–818, 2003.
- CORRONS, M. A.; BERTUCCI, J. I.; LIGGIERI, C. S.; LÓPEZ, L. M. I.; BRUNO, M. A. Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, p. 103-109, 2012.
- CORTÉS, G.; TRUJILLO-ROLDAN, M. A.; RAMIREZ, O. T.; GALINDO, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochemistry**, v.40, p.773-778, 2005.
- CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration – an example of multi-scale complex systems. **China Particuology**, v. 3, p. 343-348, 2005.
- DAGBAGLI, S.; GOKSUNGUR, Y. Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 1-12, 2008.
- DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 358-363, 2009.
- DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.
- DAROIT, D. J.; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A. Kinetic Stability Modelling of Keratinolytic Protease P45: Influence of Temperature and Metal Ions. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 165, p. 1740–1753, 2011.
- DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, n.1, p.45-51, 2011.
- DEEGAN, K. C.; HOLOPAINEN, U.; MCSWEENEY, P. L. H.; ALATOSSAVA, T.; TUORILA, H. Characterisation of the sensory properties and market positioning of novel reduced-fat cheese. **Innovative Food Science Emergency and Technology**, v. 21, p. 169–178, 2014.
- DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; RAMÍREZ, R. Effect of high-pressure treatment on the volatile profile of a mature raw goat milk cheese with paprika on rind Innovative. **Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 98–103, 2011.
- DODIA M. S.; BHIMANI H. G.; RAWAL C. M.; JOSHI R. H.; SINGH S. P. Salt dependent resistance against chemical denaturation of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6223–6227, 2008.

DOORES, S.; SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association, Washington DC, USA, 2013.

EIJSINK, V. G. H.; MATTHEWS, B. W.; VRIEND, G. The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease. **Protein Science**, v. 20, p. 1346–1355, 2011.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. High pressure enhancement of enzymes: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 331–347, 2009.

ERTAN, H.; CASSEL, C.; VERMA, A.; POLJAK, A.; CHARLTON, T.; ALDRICH-WRIGHT, J.; OMAR, S. M.; SIDDIQUI, K. S.; CAVICCHIOLI, R. A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. isolated from refrigerated milk: Role of calcium in improving enzyme productivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 1–8, 2015.

ESPINOSA-GONZALEZ, I.; PARASHAR, A.; BRESSLER, D. C. Hydrothermal treatment of oleaginous yeast for the recovery of free fatty acids for use in advanced biofuel production. **Journal of Biotechnology**, v. 187, p. 10–15, 2014.

ESPITIA-SALOMA, E.; VÁZQUEZ-VILLEGAS, P.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Review - Continuous aqueous two-phase systems devices for the recovery of biological products. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 2, p. 101–112, 2014.

FAÇANHA, S. L. O. **Aquisições, fusões e alianças estratégicas na cadeia sucroenergética brasileira**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. 339 p.

FACUNDO, H. V. V.; GURAK, P. D.; MERCADANTE, A. Z.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Storage at low temperature differentially affects the colour and carotenoid composition of two cultivars of banana. **Food Chemistry**, v. 170, p. 102–109, 2015.

FAKHFAKH, N.; KANOUN, S.; MANNI, L.; NASRI, N. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather degrading *Bacillus licheniformis* RPK. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 427–436, 2009.

FARAG, A. M.; HASSAN, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 2, p. 85–93, 2004.

FARKADE, V. D.; HARRISON, S.; PANDIT, A. B. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 247–257, 2005.

FEDERICI, F.; FAVA, F.; KALOGERAKIS, N.; MANTZAVINOS, D. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v.84, p.895–900, 2009.

- FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVAREL, J.G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 77-84, 2010.
- FOLEY, G. Water usage in variable volume diafiltration: comparison with ultrafiltration and constant volume diafiltration. **Desalination**, v. 196, n. 1-3, p. 160-163, 2006.
- FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1165-1171, 2011.
- FONTAN, R. C. I.; ALCÂNTARA, L. A. P.; NETO, S. C. A. L.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, G. C. R. Inactivation kinetics of peroxidase from coconut water. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 249-258, 2012.
- FOUKIS, A.; STERGIIOU, P. Y.; THEODOROU, L. G.; PAPAGIANNI, M.; PAPAMICHAEL, E. M. Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 214–220, 2012.
- FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Cheese Rheology and Texture: Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg: Aspen, 2000.
- FRASER, R. D. B.; PARRY, D. A. D. Molecular packing in the feather keratin filament. **Journal of Structural Biology**, v. 46, p. 4515-4520, 2009.
- FRASER, R.B.D.; MACRAE, T.P.; ROGERS, G.E. **Keratins – their composition, structure and biosynthesis**. Illinois: Charles C. Thomas, p.304, 1972.
- FREEDONIA-GROUP. Markets and Business: World enzymes to 2017 and 2022. **Focus on Catalysts**, v. 2014, n. 2, p. 2, 2014.
- FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção de queijos**. São Paulo: Dipemar LTDA. p. 30-32, 1994.
- GALÁN, E.; CABEZAS, L.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. **International Dairy Journal**, v. 25, p. 92-96, 2012.
- GAWLIK-DZIKI, U.; SWIECA, M.; SUŁKOWSKI, M.; DZIKI, D.; BARANIAK, B.; CZYZ, J. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts – In vitro study. **Food Chemical Toxicology**, v. 57, p. 154–160, 2013.
- GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 1-12, 1985.
- GENCKAL, H.; TARIB, C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 703–710, 2006.

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175–181, 2012.

GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 513–518, 2003.

GHOSH, R.; CUI, F.F. Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 167, p. 47-53, 2000.

GHOSH, R.; CUI, Z. F. Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane surface pretreatment. **Journal of Membrane Science**, v.139, p.17-28, 1998.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 60–72, 2009.

GUPTA, A.; KHARE, S.K. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 11–16, 2007.

GUPTA, M. N. *Review*: Enzyme function in organic solvents. **Europe Journal Biochemical**, v, 203, p. 25-32, 1992.

GURPILHARES, D. B.; PESSOA- JR, A.; ROBERTO, I. C. Obtenção de glicose-6-Fosfato desidrogenase a partir de Células de *Candida guilliermondii* cultivadas em Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz. In: **XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. 2003, Florianópolis: Simpósio Nacional de Fermentações, p. 1-7.

HALASZ, A.; LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. Boca Raton: CRC Press; 1991. 312p.

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

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C.; KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2012.

HINRICHS, J. Incorporation of whey proteins in cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 495–503, 2001.

HO, P. L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D. M. O.; SILVA, A. R. B. P.; RAMOS, C. R. R.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A arte de purificar proteínas: uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v.13, p.24-26, 2000.

HSU, C. A.; YU, R. C.; LEE, S. L. & CHOU, C. C. Cultural condition affecting the growth and production of beta-galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar fermenter. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 186-189, 2007.

HU, A.; ZHENG, J.; QIU, T. Industrial experiments for the application of ultrasound on scale control in the Chinese sugar industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 329–333, 2006.

INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 47-54, 1994.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - **Normas Analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 4 edição. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 44-45.

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

JAIN, D.; PANCH, I.; MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents. **Bioresource Technology**, v. 115, n. 1, p. 228–236, 2012.

JELLOULI, K.; GHORBEL-BELLAJ, O.; AYED, H. B.; MANNI, L.; AGREBI, R.; NASRI, M. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1248–1256, 2011.

JONES, L.N.; SIMON M.; WATTS, N.R.; BOOY, F.P.; STEVEN, A.C.; PARRY, D.A. Intermediate filament structure: hard alpha-keratin. **Biophysical Chemistry**, v.68, n.1-3, p.83-93, 1997.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, 1263-1270, 2005.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme Microbial Technology**, v. 34, n. 1, p. 33–40, 2004.

KARAMAN, A. D.; AKALIN, A. S. Improving quality characteristics of reduced and low fat Turkish white cheeses using homogenized cream. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 503-510, 2013.

KATROLIA, P.; JIA, H.; YAN, Q.; SONG, S.; JIANG, Z.; XU, H. Characterization of a protease-resistant α -galactosidase from the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* and its application in removal of raffinose family oligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 110, n. 1, p. 578–586, 2012.

KIELING, K. **Enzimas: aspectos gerais**. Material didático: Engenharia bioquímica. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro tecnológico. Florianópolis, 2002.

KUMAR, A. G.; SWARNALATHA, S.; GAYATHRI, S.; NAGESH, N.; SEKARAN, G. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 411–419, 2008.

KUMAR, A.; GROVER, S.; SHARMA, J.; BATISH, V. K. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 243-258, 2010.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

LANG, C.; GOLLNITZ, C.; POPOVIC, M.; STAHL, U. Optimization of fungal polygalacturonase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch culture. **Chemical Engineering Journal**, v. 65, p. 219-226, 1997.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (a) the upgrading concept; (b) practical implementation. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

LAVORENTI, A.; ROCHA, A. A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L.; PINTO, O. B. Comportamento do diclosulam em amostras de um latossolo vermelho distroférrico sob plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 1, p. 183-190, 2003.

LAWRENCE, R. C.; HEAP, H. A.; GILLES, J. A controlled approach to cheese technology. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1632-1645, 1984.

LAZZARONI, S. M. **Desarrollo de quesos probióticos de alta actividad de agua, reducidos en grasas y colesterol**. Tese de Doctorado en Tecnología Química. Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Ingeniería Química. 348 p. 2014.

LEE, H.; SUH, D. B.; HWANG, J. H.; SUH, H. J. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 123-133, 2002.

LEITE-JÚNIOR, B. R. C.; TRIBST, A. A. N.; CRISTIANINI, M. Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 21, n. 1, p. 44-49, 2014.

LEMES A.C.; GALVAN F.; SCHWICH M. A.; ROZYCKI S. D.; BRANDELLI A.; KALIL S. J. Development of creamy cheese enriched with chia and quinoa. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, 5., 2014, Córdoba, Argentina. **Anais do V-CICYTAC**, 2014. p. 1-9.

LEMES, A. C.; MACHADO, J. R.; BRITES, M. L.; DI-LUCCIO, M.; KALIL, S. J. Design Strategies for Integrated beta-Galactosidase Purification Processes. **Chemical Engineering Technology**, v. 37, n. 10, p. 1–9, 2014.

- LEMES, A. S.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 7-13, 2012.
- LI, G. Y.; CAI, Y. J.; LIAO, X. R.; YIN, J. A novel nonionic surfactant- and solvent-stable alkaline serine protease from sp. SYBC H with duckweed as nitrogen source: production, purification, characteristics and application. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 845–853, 2011.
- LIMA, A. L.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, A. J. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 63-68, 2002.
- LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 70–75, 2005.
- LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Perspectives on the basis of rheology and texture properties of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2725-2743, 2003.
- MADL, T.; STERK, H.; MITTELBAACH, M. Tandem mass spectrometric analysis of a complex triterpene saponin mixture of *Chenopodium quinoa*. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, p. 795-806, 2006.
- MANERA, A. P. **Otimização do meio de cultura para a produção da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 e caracterização parcial da enzima**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2006.
- MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, p. 66-72, 2008.
- MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI-FILHO, F. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de Beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, p. 155-161, 2011.
- MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. Publicado no **Diário Oficial da União** de 11/03/1996, Brasília, DF. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acessado em: 22/02/2015.
- MARINELI, R. S.; MORAES, E. A.; LENQUISTE, S. A.; GODOY, A. T.; EBERLIN, M. N.; MARÓSTICA-JR, M. R. Chemical characterization and antioxidant potential of *Chilean chia* seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 1304-1310, 2014.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Revisão: Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MARTINS, T. M.; ROSÁRIO, V. E.; DOMINGOS, A. Expression and characterization of the *Babesia bigemina* cysteine protease BbiCPL1. **Acta Tropica**, v. 121, n. 1, p. 1–5, 2012.

MARUTHIAH, T.; ESAKKIRAJ, P.; PRABAKARAN, G.; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Purification and characterization of moderately halophilic alkaline serine protease from marine *Bacillus subtilis* AP-MSU6. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 116–119, 2013.

MASON, T. J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, p. 253-260, 1996.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MATEO, M. J.; EVERARD, C. D.; FAGAN, C. C.; O'DONNELL, C. P.; CASTILLO, M.; PAYNE, F. A.; O'CALLAGHAN, D. J. Effect of milk fat concentration and gel firmness on syneresis during curd stirring in cheese-making. **International of Dairy Journal**, v. 19, p. 264–268, 2009.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J. M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 325-330, 2013(a).

MAZORRA-MANZANO, M. M.; PEREA-GUTIÉRREZ, T. C.; LUGO-SÁNCHEZ, M. E.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CORDOBA, B. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemical**, v. 141, p. 1902–1907, 2013(b).

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Purification of b-Galactosidase by Ion Exchange Chromatography: Elution Optimization Using an Experimental Design. **Chemical Engineering Technology**, v. 5, n. 35, p. 911-918, 2012.

MELLO, P. C. M.; LOBO, I.; YABE, M. J. S. Optimization of ultrasonic extraction and analyses methodology by HPLC for determination of diuron and its metabolites in soil cultivation of sugar cane. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2009.

MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A. C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 859–865, 2012.

- MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Extraction of Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A Comparison between Different Techniques of Cell Disruption. **Food Science Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2012.
- MIESZCZAKOWSKA-FRAC, M.; MARKOWSKI, J.; ZBRZEZNIAK, M.; POCHARSKI, W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 251-256, 2012.
- MORAES, C. C.; BURKERT, J. F.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 133-148, 2010.
- MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D.G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Science**, v. 4, p. 137-148, 2011.
- NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal inactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 57-67, 2003.
- NAJÉRA, A. I.; DE-RENOBALES, M.; BARRON, L. J. R. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. **Food Chemical**, v. 80, p. 345-352, 2003.
- NEGI, S., BENERJEE, R. Optimization of amylase and protease production from *Aspergillus awamori* in Single Bioreactor Through EVOP Factorial Design Technique. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44 (2), p. 257-261, 2006.
- NEVES, L. C. M. **Obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase a partir de *S.cerevisiae* W303-181**. Ribeirão Preto, 2003, 284 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Fermentações), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).
- NG, P.; LUNDBLAD, J.; GAUTAM, M. Optimization of solute separation by diafiltration. **Separation Science**, v. 11, n. 5, p. 499-502, 1976.
- NONHEBEL, S. Energy from agricultural residues and consequences for land requirements for food production. **Agricultural Systems**, v.94, p.586-592, 2007.
- NSIMBA, R. Y.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. **Food Chemical**, v. 106, p. 760-766, 2008.
- OLMEDO, R. H.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 409-417, 2013.
- ONIFADE, A. A.; AL-SANE, N. A.; AL-MUSALLAM, A. A.; AL-ZARBAN, S. A review: potential of biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed sources. **Bioresource Technology**, v.66, n. 1, p.1-11, 1998.

PANTOLIANO, M. W.; WHITLOW, M.; WOOD, J. F.; ROLLENCE, M. L.; FINZEL, B. C.; GILLILAND, G. L.; POULOS, T. L.; BRYAN, P. N. The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: subtilisin as a test case. **Biochemistry**, v. 27, n. 22, p. 27:8311–8317, 1988.

PARRY, D. A. D.; NORTH, A. C. T. Hard α -keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains. **Journal of Structural Biology**, v. 122, n. 1-2, p. 65-75, 1998.

PECOTA, D. C.; RAJGARHIA, V.; SILVA, N. A. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Biotechnology**, v.127, p.408-416, 2007.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. D. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, p. 118-127, 2007.

PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Editora Manole, 2005.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 438-442, 2003.

POSPISKOVA, K.; SAFARIK, I. Magnetically responsive enzyme powders. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 380, p. 197–200, 2015.

POVEDA, J. M.; SÁNCHEZ-PALOMO, E.; PÉREZ-COELLO, M. S.; CABEZAS, L. Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. **Dairy Science & Technology**, v. 88, p. 355–367, 2008.

PZSCZOLA, D. E. From soybeans to spaghetti: the broadening use of enzymes. **Food Technology**, n. 55, p. 54-62. 2001.

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats, cows milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 538-544, 2013.

RABELO, S. F.; LEMES, A. C.; FRATA, M. T.; TAKEUCHI, K. P.; CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Development of cassava doughnuts enriched with *Spirulina platensis* biomass. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p. 42-51, 2013.

RAMOS, G. R. V.; BIRCHAL, V. S.; SEARA, L. M.; PEREIRA, F. D.; ALVISI, P. Chemical characterization of yeast autolysate and assessment of the acceptability of cheese buns containing dried autolysate. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 3, p. 473-484, 2011.

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

- RAUT, G.; VETAL, S.; BIAO, R.; LIU, X. Y.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Purification and characterization of organic solvent and detergent stable protease isolated from marine *Saccharopolyspora* sp. A9: Application of protease for wound healing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 196–203, 2012.
- RAVIKUMAR, G.; GOMATHI, D.; KALAISELVI, M.; UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 411-417, 2012.
- RICHARDSON-HARMAN, N. J., STEVENS, R., WALKER, S., GAMBLE, J., MILLER, M., WONG, M. Mapping consumer perceptions of creaminess and liking for liquid dairy products. **Food Quality and Preference**, v. 11, p. 239-246, 2000.
- RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C. M.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; TAVARES, F. C. A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 3, p. 693–703, 2007.
- ROCHA, T. C.; SILVA, B. A. N. Utilização da farinha de pena na alimentação de animais monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 1, p. 35-43, 2004.
- RODRIGUEZ, A. P.; LEIRO, R. F.; TRILLO, M. C.; CERDAN, M. E.; SISO, M. I. G.; BECERRA, M. Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis*–*Aspergillus niger* beta-galactosidase. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 1–13, 2006.
- ROJAS-CASTRO, W. N.; CHACÓN-VILLALOBOS, A.; PINEDA-CASTRO, M. L. Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. **Agronómica Mesoamérica**, v. 18, p. 221-237, 2007.
- ROLET-RÉPÉCAUD, O.; BERTHIER, F.; BEUVIER, E.; GAVOYE, S.; NOTZ, E.; ROUSTEL, S.; GAGNAIRE, V.; ACHILLEOS, C. Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 459-468, 2013.
- ROLET-RÉPÉCAUD, O.; BERTHIER, F.; BEUVIER, E.; GAVOYE, S.; NOTZ, E.; ROUSTEL, S.; GAGNAIRE, V.; ACHILLEOS, C. Characterization of the non-coagulating enzyme fraction of different milk-clotting preparations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 459-468, 2013.
- ROSEIRO, L. B.; BARBOSA, M.; AMES, J. M.; WILBEY, R. A. Cheese making with vegetable coagulants e the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 76-85, 2003.
- ROZYCKI, S.; LAZZARONI, S.; KOCK POMERANTZ, E.; CRISTALDI, J.; MARANO, A.; SABBAG, N.; COSTA, S. Modelización del comportamiento reológico de queso unttable probiótico, reducido en grasas y sin colesterol. In: CONGRESO MUNDIAL Y EXPOSICIÓN INGENIERIA, 2010, Buenos Aires, Argentina. **Anais do CMEI**, 2010, v. 1, p. 1-11.
- RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Scaling-up of a *B*-phycoerythrin production and purification bioprocess involving aqueous two-phase systems: Practical experiences. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 738–745, 2013.

SAINANI, M. R.; VYAS, H. K.; TONG, P. S. Characterization of particles in cream cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2854-2863, 2004.

SALA, L. **Purificação de queratinase por SAB integrado à UF**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). FURG, Rio Grande, RS, 2013.

SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S.J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 2016–2024, 2014.

SANT'ANNA, V.; UTPOTT, M.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Kinetic modeling of thermal inactivation of the bacteriocin-like inhibitory substance P34. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3147–3152, 2010.

SANT'ANNA-JUNIOR, G. L. **Produção de enzimas microbianas**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351- 362.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.567-572, 2004.

SANTINI, Z. G.; ALSINA, D. A.; STHAUS, R.; MEINARDI, C.; FREYRE, M.; DÍAZ, J. R.; GONZÁLEZ, C. Evaluación de la textura en quesos de oveja. Aplicaciones del análisis factorial discriminante. **Fave**, v. 5/6, p. 1-2, 2007.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in colloid and interface science**, v. 145, p. 1-22, 2009.

SCAPIM, M. R. S.; LOURES, E. G.; ROSTAGNO, H.; CECON, P. R.; SCAPIM, C. A. Avaliação nutricional da farinha de penas e de sangue para frangos de corte submetida a diferentes tratamentos térmicos. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p.91-98, 2003.

SCHAAFSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 458-465, 2008.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n.1, p.1-17, 2004.

SCHIFFER, C. A.; DOTSCHE, V. The role of protein–solvent interactions in protein unfolding. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 428–432, 1996.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA. ISBN: 85-212-0279-2, 2001.

SCHWICH, M. A. **Caracterización fisicoquímica de harina de chía. Influencia de su agregado, en un queso unttable funcional, sobre las características sensoriales**. Tesis de grado de Licenciatura en Nutrición. Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Ingeniería Química. 112 p. 2014.

- SEVERO, E. E.; OLIVEIRA, J. G.; MACHADO, J. R. (2011). **Separação de uma protease queratinolítica de *Bacillus* sp.P45 utilizando ultrafiltração**. Projeto de Graduação (Engenharia de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande.
- SHAMTSYAN, M.; DMITRIYEVA, T.; KOLESNIKOV, B.; DENISOVA, N. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, p. 343–347, 2013.
- SHIAH, C.D. **Topical hair coloring formulation in the form of suspension, lotion and cream**. US Patent 4173453, 1979.
- SHOEMAKER, C. F.; NANTZ, J.; BONNANS, S.; NOBLE, A. Rheological characterization of dairy products. **Food Technology**, v. 46, p. 98-104, 1992.
- SILVA, L. H. M; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. Ed. Varela. São Paulo, SP 295p. 1997.
- SINGH, R.; KAPOOR, V.; KUMAR, V. Utilization of agro-industrial wastes for the simultaneous production of amylase and xylanase by thermophilic actinomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1545-1552, 2012.
- SINHA, J.; DEY, P. K.; PANDA, T. Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 476-486, 2000.
- SINHA, R.; KHARE, S. K. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. **Bioresource Technology**, v. 145, n. 1, p. 357–361, 2013.
- SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. Strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General Applied of Microbiology**, v. 52, p. 357-363, 2006.
- SOUZA, V. R.; CARNEIRO, J. D. S.; PINTO, S. M.; SOUZA, A. B.; STEPHANI, R. Effect of concentration of fat in the physical, chemical and sensory petit suisse cheese produced with retention of serum. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 20-28, 2012.
- SPOTTI, M. J.; SANTIAGO, L. G.; RUBIOLO, A. C.; CARRARA, C. R. Mechanical and microstructural properties of milk whey protein/espina corona gum mixed gels. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 69-74, 2012.
- STIKIC, R.; GLAMOCLJIA, D.; DEMIN, M.; VUCELIC-RADOVIC, B.; JOVANOVIC, X.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; JACOBSEN, S. E.; MILOVANOVIC, M. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 132-138, 2012.

SWALLOW, D. M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 197-219, 2003.

TAMIME, A.; ROBINSON, R. **Yoghurt: science and technology**. Pergamon Press. Gran Bretaña. 1985.

TANUJA, S.; SRINIVAS, D. N.; GOWTHAMAN, K. M.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction coupled with ultrafiltration for purification of amyloglucosidase. **Bioprocess Engineering**, v.23, n. 1, p.63-68, 2000.

THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes – a boon to human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, p. 507-518, 2003.

TIMOFIECSYK, F.D.R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos na indústria de alimentos: Revisão. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Ed. ArtMed. 894p. 2005.

TRUJILLO, A. J.; GUAMIS, B.; LAENCINA, J.; LOPEZ, M. B. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. **Food Chemical**, v. 71, p. 449-457, 2000.

VALERIANO-ZAPANA, J. A.; SEGOVIA-CRUZ, F. S.; ROJAS-HUALPA, J. M.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 231–240, 2012.

VEIDE, A.; LINDBÄCK, T.; ENFORS, S. O. Recovery of β -galactosidase from a poly (ethylene glycol) solution by diafiltration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 11, p. 744-751, 1989.

VELEZ-RUIZ, J. F.; BARBOSA-CANOVAS, G.V. Rheological properties of selected dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 311-359, 1997.

VENUGOPAL, M.; SARAMMA, A. V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1239–1243, 2006.

VERMA, J.; MODI, D. R.; SHARMA, R.; SAXENA, S. Vital role of alkaline protease in bio-industries: a review. **Plant Archives**, v. 11, n. 11, p. 1083-1092, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARUS, S.; VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 27–34, 2014.

WANG, D.; ZHENG, Z. Y.; FENG, J.; ZHAN, X. B.; ZHANG, L. M.; WU, J. R.; LIN, C. C.; ZHU, L. Influence of sodium chloride on thermal denaturation of a high-salt-tolerant neutral protease from *Aspergillus oryzae*. **Food Science Biotechnology**, v, 22, p. 1359–1365, 2013.

- WANG, Q.; ZHANG, S.; LUO, X.; HOU, J.; ZHU, X.; CAI, X. Cloning and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Taenia pisiformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 194, n. 1, p. 26–34, 2013.
- WHITEHURST, R. J.; OORT, M. V. **Enzymes in Food Technology**. 2ª edição. Wiley-Blackwell. 384 p. 2009.
- YADAV, R. P.; PATEL, A. K.; JAGANNADHAM, M. V. Neriifolin S, a dimeric serine protease from *Euphorbia nerifolia* Linn.:Purification and biochemical characterization. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1296–1304, 2012.
- YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Centesimal composition and protein nutritive value of yeast from ethanol fermentation and of yeast derivatives. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.
- YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; RAO, S. R.; MURAKAMI, Y.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 595-600, 2002.
- YAZDANSHENAS, M.; TABATABAEENEZHAD, A. R.; ROOSTAAZAD, R.; KHOSHFETRAT, A. B. Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 47, n. 1-2, p. 52-57, 2005.
- YU, X. W.; LI, Y. Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 1-2, p. 44-50, 2006.
- ZHUN, N.; SHENG, S.; SANG, S.; JHOO, J. W.; KARWE, M. V.; ROSEN, R. T.; HO, C. T. Triterpene saponins from debittered quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 865-867, 2002.
- ZULKURNAIN, M. G.; KARIM, A. A.; LIONG, M. Development of a soy-based cream cheese. **Journal of Texture Studies**, v. 39, p. 635–654, 2008.
- ZUÑIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **CEPPA**, v. 21, p. 61-82, 2003.

APÊNDICE

Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method

Extração de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico

Títulos abreviados:

Extraction of β -galactosidase by ultrasonic method

Extração de β -galactosidase por método ultrassônico

Ailton Cesar Lemes^{1*}, Gabriel Teixeira Álvares¹, Susana Juliano Kalil¹

ABSTRACT

The β -galactosidase is an intracellular enzyme obtained from the yeast *Kluyveromyces marxianus* and its role is hydrolyse lactose and therefore, is important in the dairy industry. However, for their effective use is necessary to better understand the extraction methods available. The ultrasonic disruption method has been applied as a separation step of intracellular products on laboratory scale and consists of ultrasonic waves dissipation in the solution through cavitation bubbles and produce velocity gradient that creates a force capable of breaking the cells. The aim of this study was to evaluate the rupture ultrasonic extraction of the enzyme β -galactosidase obtained from the yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 compared with abrasion method using glass beads. The method using ultrasonic ruptor (150 W) with an intermediate tip (70% power) was effective for cell disruption of yeast, showing high enzyme activity and yield, similar values to the extraction method using abrasive glass beads.

Keywords: cell disruption, enzyme, ultrasound, abrasion.

RESUMO

A enzima intracelular β -galactosidase, obtida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus*, é utilizada na hidrólise da lactose e importante na indústria de produtos lácteos. No entanto, para sua efetiva utilização, faz-se necessário entender melhor os métodos de extração disponíveis. O método de ruptura ultrassônica tem sido aplicado como etapa de separação de produtos intracelulares em escala laboratorial e consiste na dissipação de ondas ultrassônicas na solução através de bolhas de cavitação que produzem um gradiente de velocidade, criando uma força capaz de romper as células. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ruptura ultrassônica para extração da enzima β -galactosidase, obtida da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, em comparação com método de abrasão com pérolas de vidros. O método, utilizando ruptor ultrassônico (20 kHz) com ponteira intermediária (70% de potência), mostrou-se eficiente para ruptura das células da levedura, pois apresentou altos valores de atividade enzimática e rendimento, similares ao método de extração por abrasão, utilizando pérolas de vidro.

Palavras-chave: ruptura celular, enzima, ultrassom, abrasão.

¹ Universidade Federal do Rio Grande - RS

* Autor para correspondência ailtonelemes@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A β -galactosidase é uma enzima que cataliza a hidrólise da lactose, sendo importante na indústria de produtos lácteos (GEKAS e LÓPEZ-LEIVA, 1985). Pode ser produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, que é reconhecida e considerada como segura (GRAS), podendo ser utilizada na produção de alimentos e fármacos sem oferecer riscos (CABALLERO et al., 1995). No entanto, a produção da enzima ocorre intracelularmente e, assim como qualquer outro produto intracelular, requer uma etapa de ruptura das células para sua liberação, etapa esta crucial nos processos de *downstream*, pois qualquer dano causado ao produto que ocorra nesta fase inicial, pode comprometer e invalidar todos os processos subsequentes (NEVES, 2003).

Dentre os métodos de ruptura destacam-se o rompimento mecânico com esferas de vidro e o rompimento por ultrassom (GURPILHARES; PESSOA-JR; ROBERTO, 2003), métodos eficientes que são utilizados durante o estabelecimento de processos de *downstream*, e ainda, no acompanhamento da produção de determinado bioproduto em escala laboratorial.

O rompimento manual com pérolas de vidro é um método mecânico que não necessita de grande aparato operacional. Utiliza basicamente pérolas de vidro e o procedimento consta da adição das mesmas em um tubo, contendo suspensão celular. O tubo é agitado vigorosamente por um tempo determinado, obtendo-se a enzima extraída pela força do atrito devido à moagem com pequenas esferas como abrasivos (MEDEIROS et al., 2008).

O rompimento ultrassônico tem sido aplicado em diversos processos de separação, seja como uma etapa de pré-tratamento ou como processo integral, e também como método potencial para acompanhamento de cultivos microbianos. A maior parte das ondas ultrassônicas é dissipada no sistema líquido através de bolhas de cavitação, as quais formam uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e consequente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de romper as células (BOSSIO, HARRY E KINNEY, 2008) e liberar a enzima.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o método de ruptura ultrassônico para utilização em escala laboratorial em comparação ao método que utiliza abrasão com pérolas de vidro para extração da enzima β -galactosidase obtida intracelularmente a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção da enzima

A enzima β -galactosidase foi produzida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, selecionada como a maior produtora da enzima (MANERA et al., 2008) e mantida em ágar extrato de malte e levedura. O inóculo foi preparado utilizando o meio de cultura, conforme descrito por Pinheiro et al. (2003), e mantido a 30°C, 180 rpm por 24 horas. A enzima foi obtida por fermentação submersa utilizando meio de cultura otimizado por Manera et al. (2008), mantido a 30°C, 180 rpm por 96h.

Extração da enzima por abrasão com pérolas de vidro e método ultrassônico

Os processos de extração foram realizados a partir de uma suspensão celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,6 (MEDEIROS; BURKERT; KALIL, 2012) com concentração equivalente a 40 mg de célula seca por mL.

O processo de abrasão foi realizado em agitador tipo vórtex utilizando pérolas de vidro, 1,1 g de pérola de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm para cada mililitro de suspensão celular. A suspensão foi agitada por 40 min, com intervalos de 2 min de repouso em banho de gelo, obtendo-se o extrato bruto com células (MEDEIROS et al., 2008).

A ruptura pelo método ultrassônico foi realizada através de um homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250) com frequência de 20 kHz e potência máxima de 150 W, onde 40 mL da suspensão celular mantida sob constante refrigeração foi submetida às ondas ultrassônicas constantes por até 30 minutos, utilizando uma micro ponteira (Mp) (40% de potência) e uma ponteira intermediária (Pi) (70% de potência), ambas de titânio.

Para obtenção do extrato enzimático clarificado, a suspensão celular, obtida a partir dos diferentes processos de ruptura, foi centrifugada sob refrigeração (4700xg, 4°C, 10 min). Os mecanismos de ação dos métodos empregados estão apresentados na Figura 1.

A eficiência dos métodos de ruptura foi avaliada através da determinação da atividade enzimática e proteína total. Além disso, foi determinada a atividade específica, estabelecida pela relação entre a atividade enzimática (U/mL) e a concentração de proteína (mg/mL) e o rendimento do processo, relação da

atividade enzimática total (U) e biomassa utilizada no processo de extração (g). As análises foram realizadas através da retirada de alíquotas a cada 2 minutos durante o processo de extração por ultrassom utilizando a micro ponteira, a cada 1 minuto para a ponteira intermediária e no tempo fixo de 40 minutos para o processo de abrasão, conforme estabelecido por Medeiros et al. (2008).

Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada usando *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) como substrato (INCHAURRONDO; YANTORNO; VOGET, 1994). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *o*-nitrofenol por minuto, a 37°C e pH 6,6.

Determinação da proteína total

A determinação da proteína foi realizada segundo metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da ruptura pelo método ultrassônico estão apresentados na Figura 2 que mostra a atividade de β -galactosidase (A), proteína total (B) e atividade específica (C) ao longo do tempo, utilizando as duas diferentes ponteiras (Pi e Mp) no processo de extração.

A utilização da ponteira intermediária no ruptor ultrassônico, que fornece uma potência de 105 W, alcançou valores de atividade enzimática equivalentes aos obtidos pelo método de ruptura por abrasão. Isto é confirmado pelo fato de que neste processo a atividade enzimática foi apenas 10% menor do que em relação ao método por abrasão, que foi de 39,1 U/mL com atividade específica de 8,8 U/mg.

Já a micro ponteira, que fornece uma potência menor, (60 W), resultou em valores bem inferiores de atividade enzimática, até 50% menor em relação ao método de extração que utiliza pérola de vidro e 45% em relação à ponteira intermediária, de maior potência.

Figura 1 – Mecanismo de ruptura celular pelo método ultrassônico (A) e pelo método por abrasão utilizando pérola de vidro (B).

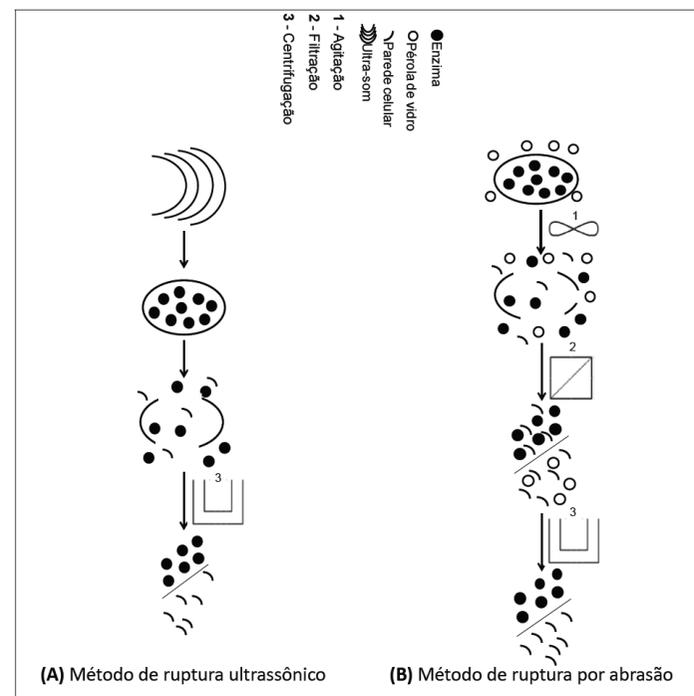
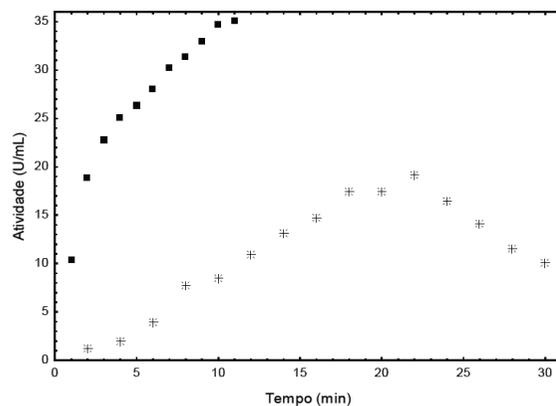
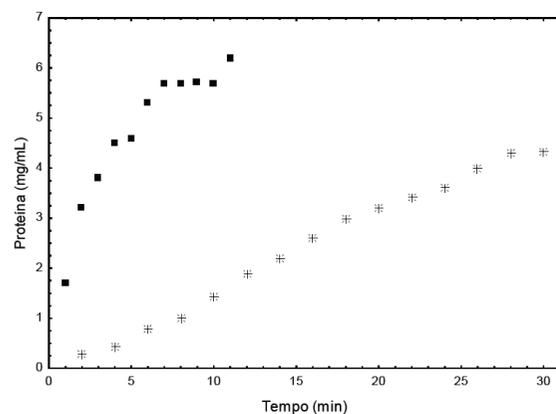


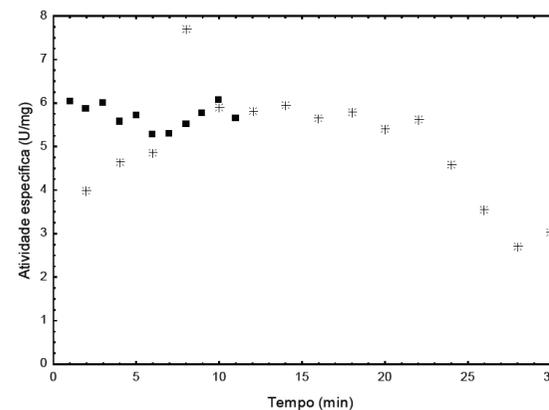
Figura 2 – Atividade enzimática (A), proteína total (B) e atividade específica (C).
 (● Ponteira intermediária; * Micro ponteira).



(A)



(B)



(C)

A utilização das diferentes ponteiros no processo que utiliza ultrassom foi positivamente favorável na eficiência da extração enzimática, principalmente no comparativo entre o grau de ruptura celular da levedura, que aumentou com o incremento da potência e das ondas ultrassônicas dissipadas no meio contendo as células. A ponteira intermediária mostrou-se mais eficiente na ruptura celular para liberação da enzima e das demais proteínas (Figura 2A e 2B). No entanto, a micro ponteira proporcionou em alguns pontos maiores atividades específicas devido à menor liberação de proteínas do interior da célula da levedura, resultando em certo momento do processo em uma maior atividade específica (Figura 2C). Ou seja, a ponteira que fornece menor potência foi, em um ponto específico do processo (8 minutos), capaz de liberar menor quantidade de proteína do interior da célula, aumentando a atividade específica da enzima alvo. Além disso, o menor aquecimento conferido, já que por limitação técnica fornece uma potência menor ao meio, pode ter reduzido o grau de desnaturação enzimática, resultado da menor dissipação de ondas ultrassônicas e consequente redução da dissipação de calor. Ainda em relação à atividade específica é possível verificar que esta se manteve praticamente constante durante o processo, quando se utilizou a ponteira intermediária, resultado da liberação simultânea

da enzima e demais proteínas do interior da célula da levedura. Já o ensaio com a microponteira apresentou uma queda drástica da atividade específica, ocasionada pela desnaturação enzimática após 22 minutos de processo e da ininterrupta liberação de proteínas para o meio contendo a enzima.

No presente estudo, o rendimento do processo com ultrassom foi superior quando se utilizou a ponteira intermediária, 876 U/g, quase duas vezes superior ao rendimento proporcionado pela utilização da microponteira, 480 U/g (Tabela 1). Já o rendimento, utilizando método de abrasão com pérolas de vidro, foi de 977,5 U/g, demonstrando que o processo ultrassônico apresenta-se como uma alternativa analítica eficiente para extração da enzima produzida pela levedura *Kluyveromyces marxianus*. O rendimento do processo que por muitas vezes é negligenciado deve ser levado em consideração, pois em muitos casos, pode inviabilizar e limitar o desenvolvimento e implementação de novas metodologias.

Diversos trabalhos publicados reportam a utilização eficiente do ruptor ultrassônico para os mais variados bioprodutos obtidos a partir de microorganismos. Medeiros et al. (2008) estudaram a extração da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7081, utilizando sistema de sonicação em combinação com o processo de abrasão com pérolas de vidro em uma carga de 1,1 g de pérolas de vidro por mL de suspensão celular (diâmetro entre 0,95 - 1,05 mm), por um período de 40 min, o que proporcionou um rendimento do processo de extração de 550,4 U/g. O método combinado foi eficiente para a extração da enzima em escala laboratorial.

Gerde et al. (2012) utilizaram o método de extração ultrassônico para extração de lipídeos do interior da célula de microalgas autotróficas e heterotróficas, o qual se mostrou eficiente. Em ambos os tipos de algas, a extração de material intracelular aumentou com o aumento do tempo e da energia dissipada. No entanto, foi constatado que as condições operacionais devem ser bem estabelecidas e controladas, pois o processo sem controle pode resultar na formação de radicais livres que prejudicam a qualidade do óleo extraído neste processo.

Michelon et al. (2012) estudaram a extração de carotenóides de *Phaffia rhodozyma*, utilizando diversos métodos de extração, entre eles, a utilização de ultrassom. Este processo em conjunto com o congelamento da biomassa proporcionou uma extração de 88,3 μ g/g de carotenóides.

Fonseca et al. (2011) também realizaram a extração de astaxantina de

Phaffia rhodozyma NRRL-Y 17268, utilizando ondas de ultrassom. O método mostrou-se eficaz na ruptura da parede celular da levedura quando utilizado em conjunto com a secagem como pré-tratamento, alcançando atividade específica de astaxantina de 2198,4 μ g/g. Além disso, o método foi apontado como alternativa potencial em relação a outros métodos para determinação analítica.

Tabela 1 – Atividade, proteína, atividade específica e rendimento do processo de extração com a utilização de método ultrassônico.

Método de ruptura	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (U/g)
Ultrassom (Micro ponteira) *	19,2	4,3	7,7	480,0
Ultrassom (Ponteira intermediária) *	35,04	6,2	6,0	876,0
Abrasão** (Pérola de vidro e vórtex)	39,1	4,4	8,8	977,5

* valores máximos obtidos no acompanhamento do processo de extração utilizando ultrassom.

** valores no tempo de 40 minutos.

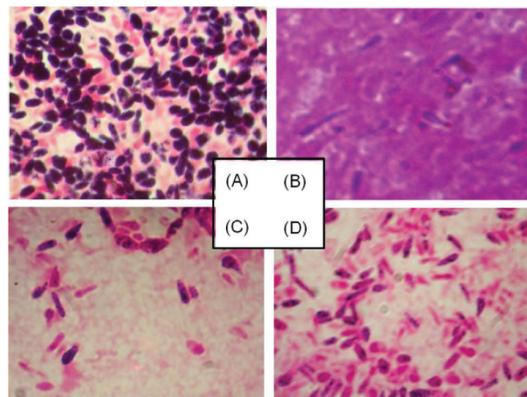
A ruptura das células da levedura foi verificada através da visualização por microscópica óptica, utilizando corante (combinação de cristal violeta/fucsina) e ampliação de 1000 vezes. Pela microscopia apresentada na Figura 3, é possível verificar que o método de extração, utilizando abrasão com pérolas de vidro (3B), resultou em maior ruptura das células em relação à célula da levedura sem tratamento (3A), confirmado pela maior atividade enzimática, seguido pelo método de ruptura, utilizando ponteira intermediária (3C) e, por último, a microponteira, que explica também a menor atividade enzimática.

Apesar dos ótimos resultados apresentadas por este método de extração, a temperatura, durante o processo, deve ser controlada, já que a dissipação das ondas na suspensão celular gera calor e pode resultar na desnaturação da enzima e consequente perda da eficiência do processo.

Se por um lado o aumento da temperatura deva ser observado com cautela e possa parecer um fator negativo à utilização deste método de extração, por outro temos que considerar e destacar as vantagens, já que o método mostrou-

se potencialmente eficiente para escala laboratorial, pois, além de resultar em atividade enzimática similar à técnica por abrasão, é uma técnica muito menos laboriosa, por não necessitar de trabalho manual constante. Além disso, a utilização da técnica de extração com ultrassom apresenta como vantagem o menor consumo de solvente, quando comparada aos métodos de extração com solventes, e a não exigência de equipamentos de alto custo (MELLO, LOBO E YABE, 2009) que, na maioria das vezes, inviabiliza a obtenção de determinado bioproduto.

Figura 3 – Células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 sem nenhum pré-tratamento (A); (B) Células após ruptura por abrasão; (C) Células após ruptura ultrassônica utilizando ponteira intermediária (D); células após ruptura ultrassônica utilizando micro ponteira.



Outra vantagem é que ao final do processo é necessário realizar apenas uma centrifugação para retirada do material celular disperso na solução aquosa, enquanto que no processo por abrasão é necessária uma etapa de filtração adicional para retirada do material abrasivo e posterior centrifugação para separar o material celular (Figura 1). Por mais simples que pareça a etapa adicional, qualquer alteração do processo pode prejudicar e até mesmo inviabilizá-lo, em razão de perdas do composto de interesse e aumento do custo de obtenção.

Assim, o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos processos de extração

dos compostos de interesse devem ser constantemente abordados de modo a reduzir tempo de extração e, principalmente, aumentar o rendimento do processo.

Desta forma, concluímos que o método de extração, utilizando ruptor ultrassônico (frequência de 20KHz e potência máxima de 150 W) com ponteira intermediária (70% de potência), mostrou-se eficiente para utilização em escala laboratorial no processo de extração de β -galactosidase do interior das células da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, pois apresentou valores de atividade enzimática e rendimentos similares ao método de extração por abrasão que utiliza pérolas de vidro.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro das entidades: CAPES, CNPq e FAPERGS.

REFERÊNCIAS

- BOSSIO, J. P.; HARRY, J.; KINNEY, C. A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. *Chemosphere*, v. 50, n. 9, p. 858-864, 2008.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CABALLERO, R.; OLGUIN, P.; CRUZ-GUERRERO, A.; GALLARDO, F.; GARCIA-GARIBAY, M.; GBMEZ-RUIZ, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as baker's yeast. *Food Research International*, v. 28, p. 37-41, 1995.
- FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 1165-1171, 2011.
- GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochemistry*, v. 20, p. 1-12, 1985.
- GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*, v. 125, p. 175-181, 2012.
- GURPILHARES, D. B.; PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I. C. Obtenção de glicose-6-Fosfato desidrogenase a partir de Células de *Candida guilliermondii* cultivadas em Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações. 2003, Florianópolis: Simpósio Nacional de Fermentações, p. 1-7.
- INCHAURRONGO, V. A.; YANTORNO O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Process Biochemistry*, v. 29, p. 47-54, 1994.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. *Food Technology Biotechnology*, v. 46, p. 66-72, 2008.

MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Purification of β -Galactosidase by Ion Exchange Chromatography: Elution Optimization Using an Experimental Design. *Chemical Engineering Technology*, n. 35, v. 5, p. 911-918, 2012.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MELLO, P. C. M.; LOBO, I.; YABE, M. J. S. Optimization of ultrasonic extraction and analyses methodology by HPLC for determination of diuron and its metabolites in soil cultivation of sugar cane. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2009.

MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Extraction of Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A Comparison between Different Techniques of Cell Disruption. *Food Science Biotechnology*, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2012.

NEVES, L.C.M. Obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase a partir de *S.cerevisiae* W303-181. Ribeirão Preto, 2003, 284 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Fermentações), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, p. 438-442, 2003.

Received 19 October 2012

Accepted 26 March 2013