



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

VILMARA ALBUQUERQUE DE FARIAS

**PEPTIDASES CISTEÍNICAS DO FRUTO DE NONI (*Morinda citrifolia* L.) COMO
AGENTES COAGULANTES DE LEITE**

FORTALEZA - CE

2016

VILMARA ALBUQUERQUE DE FARIAS

PEPTIDASES CISTEÍNICAS DO FRUTO DE NONI (*Morinda citrifolia* L.) COMO
AGENTES COAGULANTES DE LEITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas

FORTALEZA - CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F238p Farias, Vilmara Albuquerque de.
Peptidases cisteínicas do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.) como agentes coagulantes de leite /
Vilmara Albuquerque de Farias. – 2016.
103 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
Coorientação: Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas.
1. Peptidase cisteínica. 2. *Morinda citrifolia*. 3. Atividade proteolítica. 4. Caseína. 5. Coalho. I. Título.
CDD 572
-

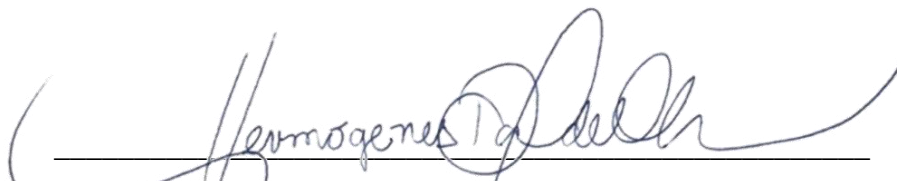
VILMARA ALBUQUERQUE DE FARIAS

PEPTIDASES CISTEÍNICAS DO FRUTO DE NONI (*Morinda citrifolia* L.) COMO
AGENTES COAGULANTES DE LEITE

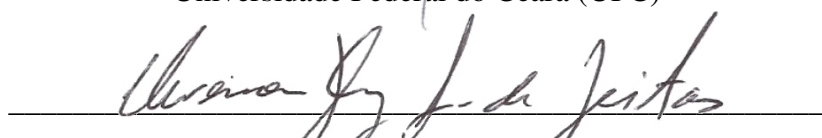
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 28 / 03 / 2016

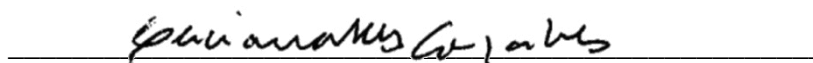
BANCA EXAMINADORA



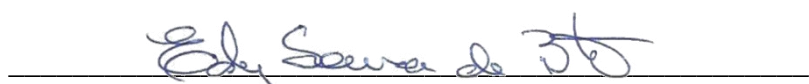
Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof^ª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical

Dedico com todo meu amor e admiração à
mulher mais importante da minha vida: minha
Mãe!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, por me proporcionar tantas oportunidades e por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho.

Aos meus pais, **Vilmar** e **Maria**, especialmente à minha mãe, pelo amor e apoio incondicional, mesmo quando minhas escolhas não foram de acordo com seus desejos. Pela a confiança de sempre e por todos os esforços na tentativa de garantir uma boa educação para suas filhas. À minha irmã **Maêva**, pela a parceria de uma vida inteira e por ser meio apoio em todos os momentos que precisei. E por cuidar sozinha de nossa mãe quando não pude estar presente durante esses dois anos.

À minha segunda mãe, **Rosélia**, por ser uma pessoa linda na minha vida. Nunca saberei como agradecer tanto cuidado, carinho e atenção.

Ao meu amor, **Helano**, por toda a paciência em meus momentos de estresse nessa reta final. Por todo seu amor e dedicação como namorado e como amigo. Por sempre colorir os meus dias a fazer a vida valer a pena.

Ao meu orientador do coração, **Dr. Hermógenes David de Oliveira**, por ser um exemplo de profissional e ser humano. Pela a palavra amiga nos momentos difíceis, pelos “puxões de orelha” nos momentos necessários, pela a paciência, pelas conversas e risadas. Por sempre estar a postos para ajudar, seja numa dúvida ou experimento. E por conseguir equilibrar tão bem os papéis de pai, amigo e professor.

Ao **Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas**, por aceitar participar deste trabalho como coorientador e por todas as valiosas contribuições.

Aos membros da banca examinadora, **Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves** e **Dr. Edy Sousa de Brito**, por aceitarem prontamente ao convite e pelas contribuições para o enriquecimento desse trabalho.

Ao meu amigo quase irmão **Thiago Fernandes**, pela a ajuda indispensável nesse trabalho, por me aguentar reclamando e chorando. Por me incentivar e garantir que tudo ia dar certo, enfim, pela cumplicidade de todos os dias. Jamais conseguirei expressar minha gratidão!

Aos meus companheiros de todos os dias, **Tarcymara**, por dividir seus dias comigo, se fazer sempre presente e ser uma irmã mais velha. Ao **João Xavier**, por todas as esperas nas noites e finais de semana de experimentos, pelas conversas e risadas proporcionadas.

Aos meus amigos queridos do laboratório, **Andréa, Dyély, Chris, Adriane, Ingrid, Éwerton, George e Roberta**, pelas ajudas cotidianas e por tornar os meus dias mais agradáveis. Agradeço imensamente a toda essa equipe.

Aos meus parceiros, **Sheila, Acrísio e Adson**, por toda ajuda prestada nos experimentos, pela cumplicidade e por serem as pessoas com as quais sei que sempre poderei contar.

À aluna de iniciação científica, **Amanda Dias**, com a qual tive o prazer de compartilhar a bancada, pela parceria nos experimentos realizados durante o mestrado. Por ser a IC dos sonhos de qualquer pessoa, pela eficiência, responsabilidade e proatividade.

Às minhas queridas, **Camila Lutif e Márjory Paiva**, pelo companheirismo, desabafos e alegrias compartilhadas.

À Professora **Dra. Márjory Lima Holanda**, por todos os auxílios e dedicação ao BioAP.

À **Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos**, por todo apoio através do Laboratório de Toxinas Vegetais e de seus alunos, em especial à **Helen, Lucas, Paulo, Lady, Ana Paula, Nadine** pela amizade e toda ajuda prestada.

Ao **Prof. Dr. Márcio Viana Ramos** e seus alunos do Laboratório de Plantas Laticíferas, em especial ao **Hugo**, pelos importantes auxílios em parte dos experimentos.

À Profa. **Ana Lúcia Pontes Freitas** e a seus alunos, **Poliana, Carla, Felipe e Willer**, pelo apoio de sempre.

Ao **Prof. Dr. José Tadeu Oliveira** e seus alunos do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, em especial à **Larissa, Handerson, Pedro, Rodolpho e Anna Lídia**, especialmente à **Ivna** pela a disponibilidade e ajuda em todos os momentos que precisei.

À equipe do Carbolec, em especial, **Ticiano, Neto, Annyta, Vitória e Edna**, pela ajuda de sempre, pela a amizade e pelo os momentos de descontração.

Aos demais professores do departamento, por todas as contribuições durante todo esse processo de formação.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial ao **Daniel**, pela simpatia, disponibilidade e por procurar sempre facilitar nossas questões no DBBM.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os trabalhos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas**, sob a coordenação do Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira e da Profa. Dra. Marjory Lima Holanda.

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) – através de concessão de bolsa de mestrado e de fomento à pesquisa.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) e **FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP)** – pela contribuição para melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca terão certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

A coagulação do leite é uma etapa básica na produção de todo queijo. O coalho de vitelo, que possui como principal constituinte a quimosina tem sido amplamente utilizado para esta finalidade, por apresentar alta especificidade de hidrólise pela κ -caseína. Em decorrência do aumento da demanda mundial de queijo e a escassez de coalho animal, tem se intensificado a busca por fontes alternativas. Quimosina produzida através de microrganismos geneticamente modificados provaram ser um substituinte eficiente, no entanto, a atenção tem sido voltada para fontes naturais de peptidases que possam conferir características diferenciadas ao produto final. Diante disso este trabalho objetivou caracterizar bioquimicamente as peptidases da polpa de noni (PPN), bem como avaliar seu potencial tecnológico e possível aplicação na hidrólise das proteínas do leite e na produção de queijos. Para isso, PPN extraídas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, foi submetido à: (I) Ensaios de atividade proteolítica e de (II) coagulação do leite variando-se as condições do ensaio e os pré-tratamentos de PPN; (III) Hidrólise da caseína total e κ -caseína, analisadas ao longo do tempo através de SDS-PAGE, em géis de 15% de poliacrilamida; (IV) Produção de queijo tipo “coalho”. Peptidases da polpa de noni apresentaram um pH ótimo de atividade em torno de 6,0 e temperatura ótima de 50 °C, sendo inibida por iodoacetamida e E-64. Apresentaram baixa estabilidade em pHs alcalinos e em temperaturas acima de 40 °C, após incubação por 30 min. Sob o efeito de íons divalentes, a atividade proteolítica foi inibida por Mn, Co, Cu e Zn, no entanto, não foi afetada por Fe, Mg e Ca, tampouco na presença de NaCl, onde houve, inclusive, um aumento significativo na atividade em todas as concentrações testadas. Quanto à atividade de coagulação do leite, houve uma redução nos valores de MCA (*inglês*, Milk-Clotting Activity) quando essa atividade ocorreu na presença de concentrações acima de 60 mM de CaCl₂ e 0,1 M de NaCl. PPN foram capazes de hidrolisar os três tipos de caseínas (α , β e κ), com β e κ -caseína apresentando maior susceptibilidade à degradação. Os produtos obtidos a partir da hidrólise da κ -caseína, realizados tanto com PPN quanto pelo coalho comercial (Coalhopar) apresentaram massa de aproximadamente 16 kDa, provavelmente correspondendo ao peptídeo *para*- κ -caseína. Os queijos produzidos com PPN e coalho comercial apresentam características semelhantes quanto aos valores de umidade, massa fresca e seca, diferindo no tempo de coagulação. Coalhopar coagulou o leite em cerca de 3 min, enquanto que PPN estendeu-se até 8 min. PPN apresentou um rendimento (m:m) cerca de 79,02 g de polpa de noni para a produção de cada quilo de queijo, o que equivale à massa inferior a de um fruto inteiro.

Palavras-chaves: Peptidase cisteínica. *Morinda citrifolia*. Atividade proteolítica. Polpa. Peptidases vegetais. Caseína. Coalho. Queijo.

ABSTRACT

Milk-clotting is a basic step in the production of the whole cheese. The calf rennet, which has as the main constituent chymosin has been widely used for this purpose since it has high specificity for hydrolysis of the κ -casein. As a result of increased global cheese demand, along with a reduced supply of calf rennet, it has intensified the search for alternative sources. Chymosin produced by genetically modified microorganisms have proven to be an efficient substituent, however, attention has been focused on natural sources of peptidases which may promote different characteristics to the final product. Therefore this study aimed to characterize biochemically the peptidases of the pulp of the fruits of noni, and evaluate their technological potential and possible application in the hydrolysis of milk proteins and the production of cheese. For this, PPN obtained in sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.0 was subjected: (i) proteolytic activity assays and (ii) milk-clotting by varying assay conditions and pretreatments PPN; (lii) Hydrolysis of the total casein and κ -casein, over time analyzed by SDS-PAGE in gels of 15% polyacrylamide; (IV) Cheese production type "rennet". PPN peptidases have optimum pH activity around 6.0 and temperature 50 °C, inhibited by iodoacetamide and E-64. They showed low stability at alkaline pHs and temperatures above 40 °C after incubation for 30 min. Under the effect of divalent ions, proteolytic activity was inhibited by Mn, Co, Cu and Zn, however, it was not affected by Fe, Mg and Ca, either in the presence of NaCl, where there was even a significant increase in activity in all concentrations tested. The clotting activity, a reduction in the MCA (Milk-Clotting Activity) values when that activity occurred at concentrations above 60 mM CaCl₂ and 0.1 M NaCl. PPN was able of to hydrolyse the three types of casein (α , β and κ). β - and κ - casein showed greater susceptibility to degradation. The products obtained from the hydrolysis of the κ -casein performed either by PPN as the commercial rennet (Coalhopar) had a mass of approximately 16 kDa, probably corresponding to the peptide para- κ -casein. The cheeses produced by PPN and commercial rennet have similar characteristics as the moisture values, fresh and dry mass, differing in clotting time. Coalhopar coagulated milk in about 3 min, while PPN extended to 8 min. PEN showed a yield (w:w) to about 79.02 g of noni pulp for the production a kilogram of cheese, which is equivalent to a mass of less than whole fruit.

Keywords: Peptidase cysteine. *Morinda citrifolia*. Proteolytic activity. Pulp. Vegetable peptidases. Casein. Rennet. Cheese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Receita global do mercado de enzimas industriais.	17
Figura 2	–	Mecanismo de catálise quanto ao modo de clivagem dos substratos por peptidases.	21
Figura 3	–	Sítios ativos de peptidases vegetais e de veneno de cobra.	22
Figura 4	–	Estrutura micelar da caseína.	28
Figura 5	–	Esquema de clivagem da κ -caseína promovida por quimosina.	30
Figura 6	–	<i>Morinda citrifolia</i> L.: visão geral dos aspectos morfológicos..	33
Figura 7	–	Variedades e cultivar da espécie <i>M. citrifolia</i>	36
Figura 8	–	Frutos de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.) nos estádios de maturação.	41
Figura 9	–	Esquema geral de obtenção de extrato total da polpa do fruto de noni.	44
Figura 10	–	Esquema geral de fabricação artesanal de queijo coalho	53
Figura 11	–	Concentrações de proteínas totais solúveis de extratos da polpa de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.) obtidos em diferentes soluções tampões.	55
Figura 12	–	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições desnaturantes de PPN.	56
Figura 13	–	Zimograma em gel de poliacrilamida (10%) acrescido de gelatina 0,2% de PPN.	56
Figura 14	–	Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica de PPN.	58
Figura 15	–	Determinação do pH ótimo da atividade proteolítica de PPN utilizando azocaseína e BANA como substrato da reação.	59
Figura 16	–	Determinação da temperatura ótima da atividade proteolítica de PPN.	60
Figura 17	–	Estabilidade da atividade proteolítica de PPN em função do pH..	62
Figura 18	–	Estabilidade da atividade proteolítica de PPN em função da temperatura	63
Figura 19	–	Efeito de cátions divalentes sobre a atividade proteolítica de PPN.	65
Figura 20	–	Efeito do CaCl_2 sobre a atividade proteolítica de PPN.	66
Figura 21	–	Estabilidade de PPN em função do armazenamento nas temperaturas de -20 e 4 °C nos tempos de 7 – 60 dias.	68
Figura 22	–	Coagulação de leite desnatado 10% (Molico®) por PPN ao final de 40 min.	69
Figura 23	–	Efeito de diferentes inibidores de peptidases sobre a atividade de coagulante de PPN.	70
Figura 24	–	Estabilidade da atividade coagulante de PPN em função da temperatura.	72
Figura 25	–	Efeito do NaCl sobre a atividade coagulante de PPN.	73
Figura 26	–	Efeito do CaCl_2 sobre a atividade coagulante de PPN.	74

Figura 27 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) sob condições redutoras da hidrólise de caseína ao longo do tempo de reação.	76
Figura 28 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) sob condições redutoras da hidrólise de κ -caseína.	77
Figura 29 –	Queijo do tipo coalho produzido com a utilização de coalho comercial – Coalhopar e de PPN.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação de enzimas e tipos de reações de catálise.	18
Tabela 2 –	Fontes vegetais de obtenção de peptidases com atividade coagulante do leite.	32
Tabela 3 –	Frutos de noni em diferentes estádios de desenvolvimento, mostrando as alterações na cor da pele e firmeza durante o amadurecimento.	35
Tabela 4 –	Composição físico-química da polpa do fruto de noni.	37
Tabela 5 –	Propriedades farmacológicas descritas para os frutos de noni.	38

Tabela 6 –	Proteínas totais solúveis e rendimento em diferentes proporções de extração e condição de re-extração em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0.	55
Tabela 7 –	Parâmetros de análise comparativa entre queijos produzidos com coalho animal e coagulante vegetal.	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BANA	<i>Na-benzoyl-D,L-arginina-p-naftilamida</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina (do ingles, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
DMACA	p-dimetilcinamaldeído
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
E-64	Trans-epoxisuccinil-l-leucilamido(4-guanidino)butano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
IAA	Iodoacetamida

PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto
PPN	Proteínas da polpa de noni
SDS	Duodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
UAC	Unidade de atividade coagulante
UAP	Unidade de atividade proteolítica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Enzimas: Visão Geral e Aplicações Biotecnológicas	17
1.2	Peptidases (EC 3.4): Aspectos bioquímicos e fisiológicos	19
1.3	Aplicação biotecnológica das peptidases	24
1.4	Produção de queijo	26
1.4.1	Coagulação do leite	27
1.4.2	Coalhos e coagulantes	29
1.5	Noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	32

1.5.1	Aspectos botânicos e distribuição geográfica.....	32
1.5.2	Constituição química e propriedades nutraceuticas do suco de noni	36
2	OBJETIVOS.....	40
2.1	Objetivo geral	40
2.2	Objetivos específicos	40
3	MATERIAIS	41
3.1	Material vegetal	41
3.2	Reagentes químicos	41
4	MÉTODOS	42
4.1	Obtenção da polpa dos frutos do noni	42
4.2	Determinação do teor de proteínas totais da polpa dos frutos do noni	42
4.3	Obtenção de extrato proteico da polpa dos frutos de noni.....	43
4.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	45
4.5	Determinação da atividade proteolítica total de PPN	45
4.6	Caracterização da atividade proteolítica de PPN	46
4.6.1	Efeito de inibidores na atividade proteolítica de PPN	46
4.6.2	Determinação de pH ótimo da atividade proteolítica de PPN.....	47
4.6.3	Determinação de temperatura ótima da atividade proteolítica de PPN	47
4.6.4	Estabilidade da atividade proteolítica em função do pH	48
4.6.5	Estabilidade da atividade proteolítica de PPN em função da temperatura	48
4.6.6	Atividade proteolítica de PPN na presença de cátions divalentes	48
4.6.7	Estabilidade da atividade proteolítica de PPN em função do armazenamento	49
4.7	Determinação da atividade coagulante de PPN	49
4.8	Caracterização da atividade coagulante de PPN	50
4.8.1	Efeito de inibidores na atividade coagulante de PPN	50
4.8.2	Efeito da temperatura na atividade coagulante de PPN	50
4.8.3.	Efeito do CaCl ₂ na atividade coagulante de PPN	50
4.8.4	Efeito do NaCl na atividade coagulante de PPN.....	51
4.9	Padrão de hidrólise da caseína utilizando PPN em comparação com o coalho comercial	51
4.10	Produção de queijo coalho artesanal	52
4.11	Análise Estatística	52
5	RESULTADOS	54
5.1	Obtenção da polpa dos frutos de noni e determinação do teor de proteínas totais	54

5.2	Extração de proteínas da polpa do noni e análise do perfil eletroforético	54
5.3	Caracterização da atividade proteolítica de PPN	57
5.3.1	Efeito de inibidores.....	57
5.3.2	Determinação do pH e da temperatura ótimos de atividade proteolítica	57
5.3.4	Estabilidade da atividade proteolítica em função do pH e temperatura.....	61
5.3.5	Atividade proteolítica na presença de cátions divalentes	64
5.3.6	Estabilidade de PPN em função do armazenamento.....	67
5.4	Determinação da atividade coagulante de PPN	69
5.5	Caracterização da atividade coagulante de PPN	69
5.5.1	Efeito de inibidores na atividade coagulante de PPN	69
5.5.2	Estabilidade de PPN em função da temperatura na coagulação do leite.....	71
5.5.3	Efeito do NaCl na atividade coagulante de PPN.....	71
5.5.4	Efeito do CaCl ₂ na atividade coagulante de PPN	71
5.5.5	Padrão de hidrólise da caseína utilizando PPN em comparação com o coalho comercial	75
5.6	Produção de queijo coalho artesanal	78
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONCLUSÃO.....	87
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>88</u>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Enzimas: Visão Geral e Aplicações Biotecnológicas

Enzimas são moléculas biológicas e em sua grande maioria, excetuando algumas moléculas de RNA chamadas de ribozimas, são de natureza proteica. Produzidas por todos os organismos vivos, conservaram durante a evolução sua função, bem como a integridade dos sistemas biológicos. São definidas como biocatalisadores que regulam a velocidade com que as reações bioquímicas ocorrem nos organismos (ILLANES, 2008).

Atuam de forma altamente específica com seus substratos. A reação enzimática ocorre no interior dos limites de uma cavidade na enzima chamada sítio ativo, onde a molécula que se liga a essa região é contornada com resíduos de aminoácidos cujos grupos substituintes se ligam ao substrato e catalisam a sua transformação (NELSON; COX, 2011).

A palavra enzima é derivada dos termos grego en (que significa “dentro”) e zima (que significa “levedura”) e foi primeiramente utilizado pelo fisiologista Wilhelm Kühne em 1878, ao observar a habilidade apresentada por leveduras em produzir álcool a partir de açúcares (ROBINSON, 2015).

As enzimas estão presentes em todos os organismos vivos, desempenhando um papel fundamental na conversão da luz ou da energia das ligações químicas em ATP na transformação de nutrientes contendo carbono e nitrogênio em metabólitos utilizáveis pelas células, na replicação e expressão da informação genética e na detecção e transdução de sinais químicos externos à célula (DEUTCH, 2007).

A atividade enzimática pode ser afetada por diversos fatores, como pH e temperatura, podendo induzir mudanças reversíveis e irreversíveis na estrutura da proteína. A maioria das enzimas tem um pH ótimo característico, onde ocorre a máxima velocidade da reação catalisada, e observa-se um declínio em valores inferiores ou superiores a este ponto (ROBINSON, 2015). Desde 1956, o *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) tem sido responsável pela nomeação e classificação das enzimas. Essa classificação é realizada de acordo com o modo de catálise exibido pela molécula, desconsiderando sua estrutura. Portanto, uma enzima pode pertencer a mais de uma classe, caso possua a capacidade de catalisar duas ou mais reações (CORNISH-BOWDEN, 2014). Na tabela 1 estão listadas as classes enzimáticas e os tipos de reações catalisadas por elas.

Tabela 1 – Classificação de enzimas e tipos de reações de catálise.

CLASSE ENZIMÁTICA	TIPO DE REAÇÃO CATALISADA
EC 1: Oxirredutases	Reações de transferência de elétrons de uma molécula à outra.
EC 2: Transferases	Transferem um grupo de átomos de uma molécula à outra ou de uma posição numa molécula à outra posição na mesma molécula.
EC 3: Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise, nas quais grupos funcionais são transferidos para a água.
EC 4: Liases	Liases catalisam a adição de grupos funcionais à duplas ligações de uma molécula ou a formação de ligações duplas por meio da remoção de grupos funcionais.
EC 5: Isomerases	Catalisam a transferência/reorganização de átomos dentro de uma mesma molécula.
EC 6: Ligases	Promovem a formação de ligações covalentes entre moléculas em processos de biossíntese por reação de condensação acoplada ao consumo de ATP, tornando esse tipo de enzima difícil de ser aplicada comercialmente.

Fonte: Adaptado de Novozymes (2015).

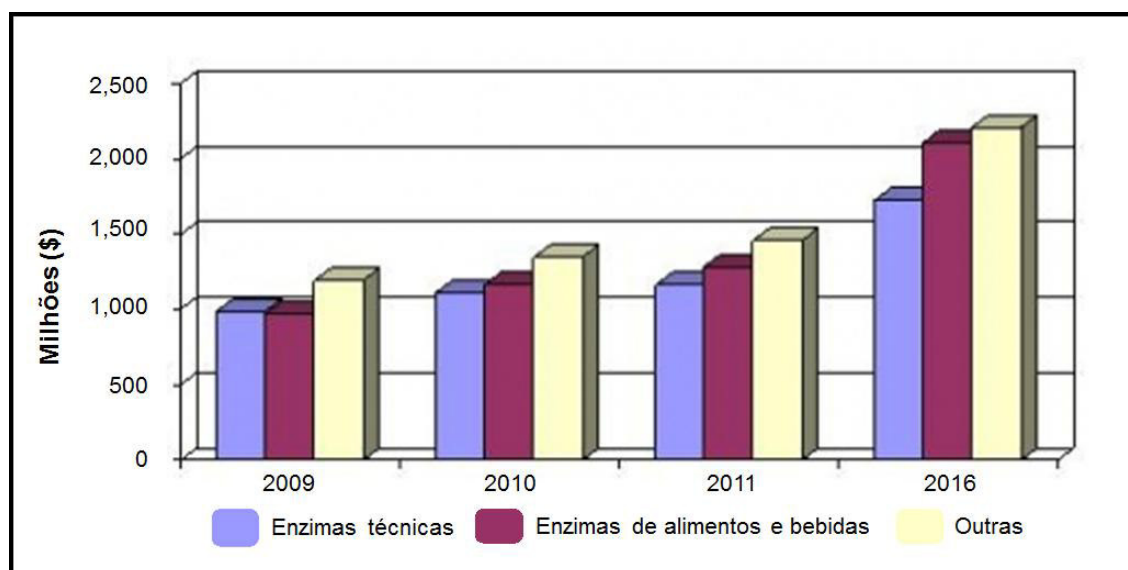
A descoberta da primeira enzima está descrita no trabalho de Payen e Persoz (1833), onde uma amilase foi isolada a partir de cevada e posteriormente observada a atividade catalítica da conversão de amido em açúcares. Anos após essas descobertas, técnicas de panificação comercial e produção de cerveja foram desenvolvidas, bem como a produção de enzimas fermentativas no início do século 20 (CUESTA, 2014).

Em decorrência de sua elevada seletividade e especificidade, as enzimas vem sendo continuamente utilizadas em diversos processos industriais, em substituição aos processos químicos convencionais, pois além de requerer menor custo, em decorrência da possibilidade de sua reutilização, e menor geração de resíduos poluentes, ainda apresentam desempenho superior quando comparadas ao uso de produtos químicos (COMYNS, 2009)

As enzimas comumente são utilizadas em quatro campos de comércio e tecnologia: como catalisadores industriais, agentes terapêuticos, reagentes analíticos e ferramentas para manipulação genética (ROBINSON, 2015). Os recentes avanços tecnológicos, bem como o cuidado com o meio ambiente, têm tornado obsoletos alguns processos industriais, tendo as enzimas, ganhado espaço no mercado em alguns desses processos. A figura 1 demonstra o crescente investimento mundial da utilização de enzimas

em alguns segmentos, são eles: de enzimas técnicas, destinadas principalmente aos setores de produtos de limpeza, têxtil, de couros, de álcool como combustível e de papel e celulose; de enzimas alimentares e de bebidas; dentre outros, como por exemplo, para ração animal. A maior utilização de enzimas em processos industriais é justificada pelo fato de serem moléculas de origem orgânica e são biodegradáveis, tendo assim, baixo impacto ambiental.

Figura 1 – Receita global do mercado de enzimas industriais



Fonte: Adaptado de BCC Research (2016).

A demanda mundial de enzimas é suplantada por cerca de 12 grandes fornecedores e outros 400 em menor escala. Aproximadamente 75% do total de enzimas são produzidas por três grandes companhias como a Novozymes (Denmark), DuPont (através da aquisição da empresa dinamarquesa Danisco em maio de 2011), e Roche (Switzerland) (LI, et al., 2012).

O mercado global de enzimas industriais movimentou quase US\$ 4,5 bilhões em 2012 e quase US\$ 4,8 bilhões em 2013. Estima-se que esse mercado tenha um crescimento anual de 8,2% de 2013 a 2018, resultando em um montante de até US\$ 7,1 bilhões em 2018 (BBC Research). Dentre essas enzimas industriais, as hidrolases se destacam por ocuparem cerca de 75% do mercado total de enzimas, tais como peptidases, lipases e amilases (SHEORAN; DHANKHAR, 2016).

1.2 Peptidases (EC 3.4): Aspectos bioquímicos e fisiológicos

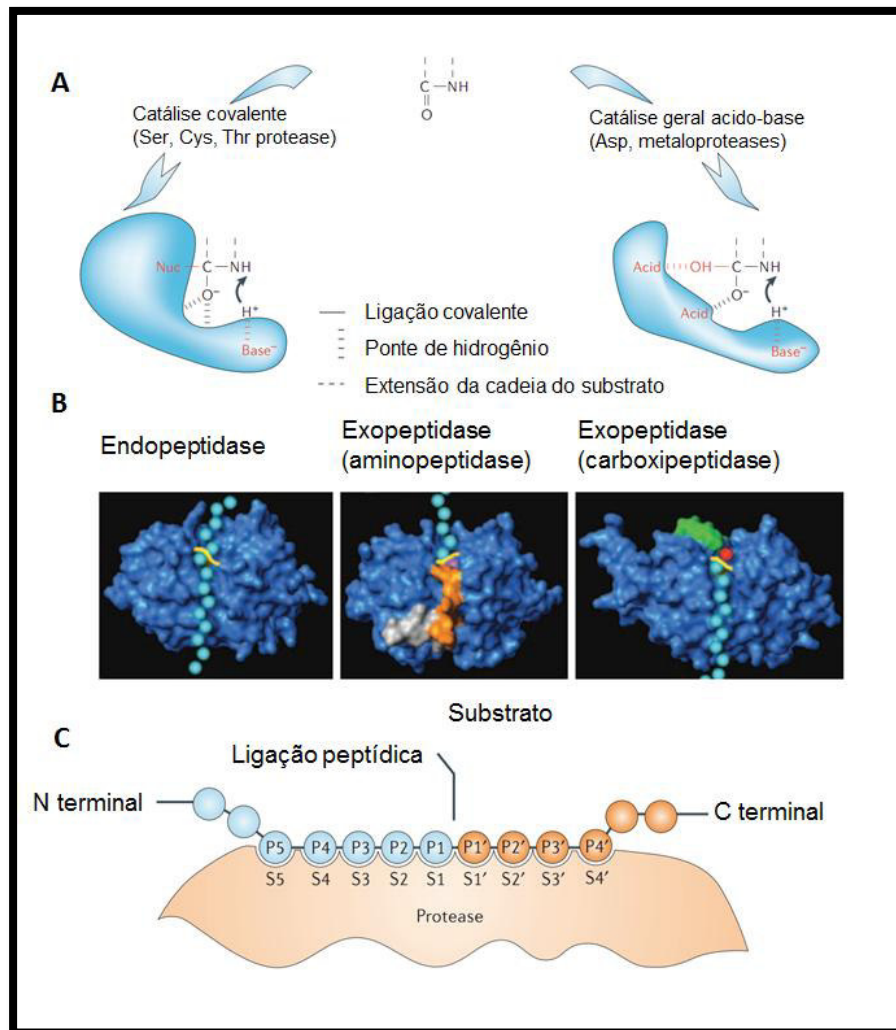
Genericamente, segundo a definição descrita por Barret (1994), acrescidas com colocações de Berg *et al.* (2002), Nelson e Cox (2011), peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação peptídica, tendo como produto a liberação de peptídeos e/ou aminoácidos. A reação de hidrólise da ligação peptídica é um processo termodinamicamente favorável, porém de cinética lenta, tendo as peptidases papel catalítico nesse processo (BERG, 2002). Comumente, sua cadeia polipeptídica contém um segmento de ativação de 2 a 100 aminoácidos, tornando esse precursor inativo, também denominado de zimogênio, necessitando da hidrólise deste fragmento para se tornar cataliticamente ativa e com isso prevenir uma degradação proteica indesejada (KHAN; JAMES, 1998).

As peptidases (EC 3.4), também denominadas de peptídeo hidrolases ou simplesmente peptidases. Devido à existência de uma grande variedade de peptidases, estas são agrupadas em clãs e famílias, que atualmente contam com 60 clãs e 277 famílias (MEROPS Database). As famílias derivam de um mesmo ancestral comum e compreendem as peptidases que apresentam alto grau de identidade na sequência de aminoácidos da região responsável pela atividade catalítica. Já as peptidases de um mesmo clã pertencem a um conjunto de famílias que evoluíram a partir de um único ancestral comum, no entanto, divergiram de tal maneira que a análise por comparação da estrutura primária não pode ser comprovada (RAWLINGS; BARRET, 1995).

Podem ser classificadas de acordo com a região da cadeia polipeptídica que clivam, em: exopeptidases (3.4.11-19) e endopeptidases (3.4.21-99) (Figura 2B e 2C). Outra classificação, de acordo com o pH em que apresentam maior atividade catalítica, é citada em alguns trabalhos, onde: peptidases ácidas apresentam maior atividade na faixa de pH 2,0 – 6,0, neutras de 6,0 – 8,0 e alcalinas de 8,0 – 13,0 (RAO *et al.*, 1998; VERMELHO *et al.*, 2008).

As exopeptidases clivam ligações peptídicas nas extremidades da cadeia polipeptídica liberando um único aminoácido, di ou tripeptídeo. Se a clivagem da ligação peptídica ocorre na porção anino- ou carboxi-terminal, essas enzimas podem ser classificadas em aminopeptidases ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases catalisam a hidrólise dentro da cadeia liberando peptídeos, podendo em alguns casos desencadear processos de digestão proteica, sendo esses peptídeos alvos de exopeptidases (Figura 2) (RAWLINGS *et al.*, 2010).

Figura 2 – Mecanismo de catálise quanto ao modo de clivagem dos substratos por peptidases. Modelo estrutural das endo e exopeptidases e representação esquemática de uma endopeptidase acoplada ao seu substrato.



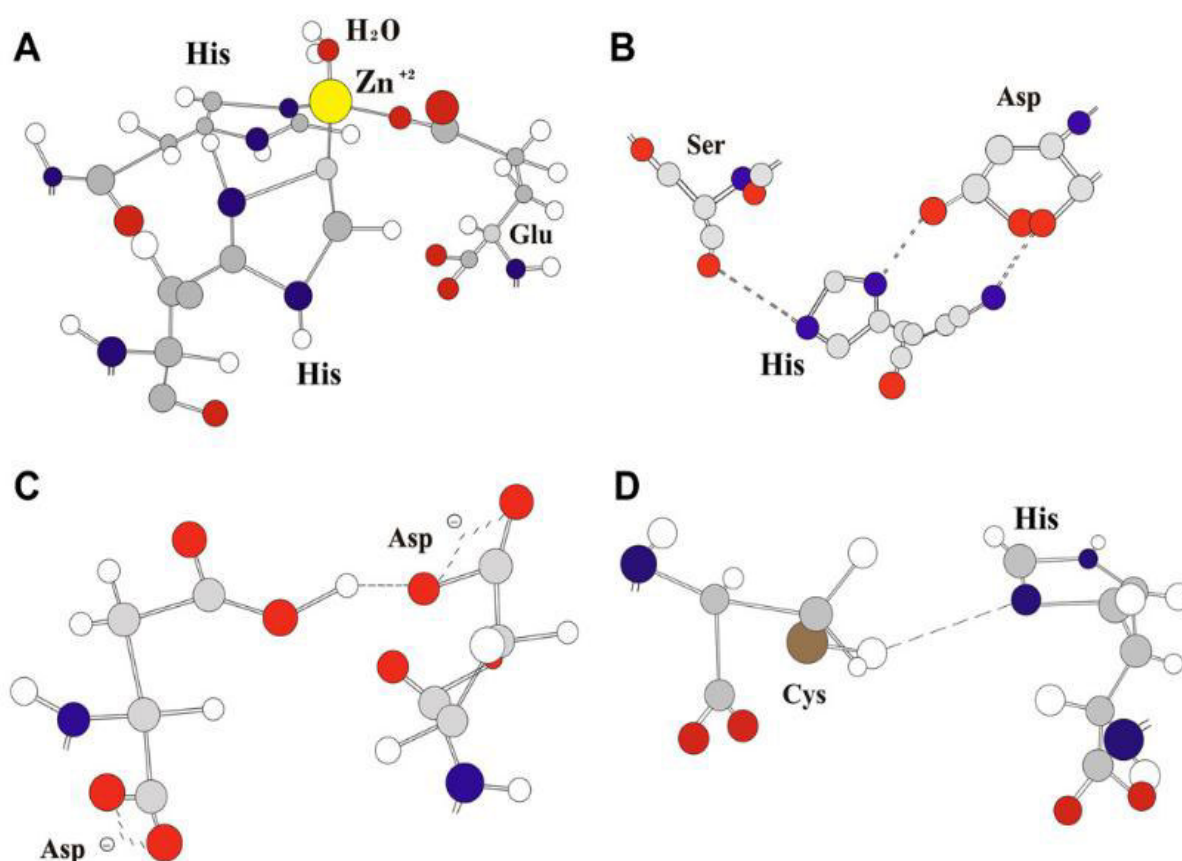
Fonte: Modificado de Turk, 2006.

Outra subdivisão pode ser empregada às endopeptidases, levando em consideração o grupo reativo no sítio catalítico da enzima, dentre as principais podemos citar, as serino-peptidases (EC 3.4.21) possuem um único resíduo de serina no sítio catalítico, as cisteína-peptidases (EC 3.4.22) dispõem de um resíduo de cisteína, as aspártico-peptidases (EC 3.4.23) possuem dois resíduos de ácido aspártico no centro catalítico sendo classificadas em peptidases aspárticas típicas, peptidases aspárticas atípicas de acordo com a sequência gênica e estrutura da proteína e, por fim, as metalopeptidases (EC 3.4.24) necessitam de íon metálico para exibir atividade catalítica (Figura 3) (RAO *et al.*, 1998; VERMELHO *et al.*, 2008). O mecanismo catalítico pode ser determinado diretamente através da reatividade da enzima em relação a inibidores de resíduos de aminoácidos na região do sítio ativo (LI; YANG; SHEN, 1997).

As cinco principais classes catalíticas de proteases usam dois mecanismos catalíticos fundamentalmente diferentes para estabilizar o intermediário tetraédrico da reação

de hidrólise. Nas peptidases serínicas, cisteínicas e treonina, o nucleófilo do sítio catalítico faz parte de um aminoácido (catálise covalente), enquanto que nas metalopeptidases e peptidases aspárticas o nucleófilo é uma molécula de água ativada (catálise não covalente). Na catálise covalente, as histidinas funcionam normalmente como uma base, enquanto que na catálise não covalente os resíduos Asp ou Glu e o zinco (metalopeptidases) servem como ácidos e bases. Outra diferença entre os dois grupos é na formação dos produtos da reação a do intermediário tetraédrico, o qual para cisteína e serina peptidases requer um passo intermediário adicional (intermediário acil-enzima) (Figura 2A) (TURK, 2006).

Figura 3. Sítios ativos de peptidases vegetais e de veneno de cobra. A) Metalopeptidases; B) Serino-peptidases; C) Aspártico-peptidases; D) Cisteíno-peptidases. (●) oxigênio, (●) nitrogênio, (●) zinco, (●) enxofre, (●) carbono, (○) hidrogênio (COSTA *et al.*, 2010)



As peptidases são moléculas ubíquas, sendo encontradas em todos os organismos, nos quais são codificadas por cerca de 2% dos genes (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2006), desempenhando diversas funções fundamentais à manutenção de processos biológicos, tais como, processamento proteolítico de histonas (AZAD; TOMAR, 2014), mecanismo de

apoptose (ROBERTSON *et al.*, 2016), vias do sistema imunológico desempenhando funções relevantes na inflamação (SAFAVI, 2012), cascata de coagulação sanguínea (CHAPIN; HAJJAR, 2015), transdução de sinal via proteína G (MOSS II *et al.*, 2015), crescimento tumoral e processo metastático (DUFFY; MCGOWAN; GALLAGHER, 2008). Ocorrem tanto intra como extracelularmente, e a regulação da atividade proteolítica é um fator importante, inclusive, na aplicação como agentes terapêuticos, como é o caso da utilização dos fatores de coagulação recombinantes (FVIII, FIX e FVII) no tratamento de paciente hemofílicos.

Nas plantas, assim como em todos os organismos, as peptidases possuem grande destaque no “*turnover*” de proteínas não funcionais em aminoácidos, bem como, importantes reguladores (ESTELLE, 2001), adicionalmente, estudos apontam para o envolvimento de peptidases serínicas como reguladores de respostas de defesa, promovendo uma maior expressão de genes que codificam proteínas PR (*Pathogenesis-related*) que atuam diretamente no mecanismo de defesa contra agentes patogênicos (LIU *et al.*, 2008). Van der Hoorn (2008) relata o envolvimento de metalopeptidases na nodulação, termotolerância, meiose e que peptidases aspárticas promovem uma maior sobrevivência celular durante a gametogênese e embriogênese.

O papel biológico das peptidases de plantas são surpreendentemente diversos e importantes em seus diferentes estádios de desenvolvimento, desde a meiose, sobrevivência do gametófito, formação de camadas da semente, desenvolvimento de estômatos e cloroplastos, no reconhecimento de patógenos, até na floração e ramificação. Por esse motivo a ocorrência de mutações em genes que codificam essas proteínas são frequentemente letais à planta (Van der Hoorn, 2008). Em sistemas vegetais, essas enzimas são reguladas pela manutenção na forma de zimogênios ou, ainda, por combinação com inibidores, preservando-as em sua forma inativa (KULKARNI; RAO, 2009).

Dentre as peptidases vegetais, as do grupo cisteína representam aproximadamente 16% do total de sequências depositadas, de acordo com a distribuição citada em 2004 para genes de cisteíno-peptidases em *Arabidopsis* (SCHALLER, 2004).

A estrutura tridimensional de cisteíno-peptidases (por exemplo, papaína) apresentam dois domínios: L (C-terminal) e R (N-terminal), e o sítio catalítico dessas peptidases encontra-se na reentrância formada entre os domínios. O resíduo de cisteína encontra-se no domínio L e o de histidina no domínio R (McGRATH, 1999). Em algumas famílias de cisteíno-peptidases um resíduo de glutamina e asparagina auxiliam na formação da cavidade do oxianion. A glutamina estabiliza a estrutura tetraédrica intermediária durante a

hidrólise do substrato e a histidina orienta o anel imidazólico (RAWLINGS, BARRET, 2000). O estado ionizado do resíduo de cisteína nucleofílico no sítio ativo é independente da ligação do substrato (POLGAR; HALASZ, 1982).

O mecanismo de ação das cisteíno-peptidases usualmente ocorre em dois passos: acilação e desacilação. Primeiramente há o ataque nucleofílico do grupo tiol (Cys²⁵-papaína) do sítio ativo ao carbono da carbonila do substrato. O íon imidazólico protona o nitrogênio da ligação peptídica. Com o rompimento dessa ligação peptídica forma-se o intermediário acil-enzima e o primeiro produto é liberado (N-terminal). Em seguida, a his¹⁵⁹ desprotona uma molécula de água, que ataca o carbono da carbonila da cisteína ligada ao intermediário, resultando no produto C-terminal e na regeneração da enzima (desacilação) (RAO *et al.*, 1998).

As cisteíno-peptidases podem ser inibidas por agentes alquilantes do grupo tiol, como o iodoacetato e clorometilcetonas, por complexantes do grupo tiol, como compostos orgânicos inorgânicos que contenham mercúrio e íons de metais pesados, e inibidores de natureza proteica (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997). Dentre os inibidores de cisteíno-peptidases podemos citar o E-64, descoberto nos anos 70, que utiliza um grupo epoxisuccinil para interagir covalentemente com o enxofre reativo do sítio ativo (HANADA *et al.*, 1978).

Dentre as cisteíno-peptidases vegetais mais estudadas estão as extraídas de plantas tropicais, como *Carica papaya* (papaína, quimopapaína, caricaina, glicol endopeptidase), *Ananas comosus* (bromelina de frutos, bromelina de caule, ananaina, comosaina) e *Ficus glabrata* (ficina), por possuírem uma considerável importância comercial.

1.3 Aplicação biotecnológica das peptidases

Peptidases de plantas tem sido utilizadas desde os tempos antigos, como ilustrado nos escritos homéricos, onde o látex da figueira já era utilizado na coagulação do leite para a fabricação do queijo e utilizado também como anti-helmíntico, assim como o suco do abacaxi (.

As peptidases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas com aplicações em diversos processos industriais, perfazendo aproximadamente 60% do total de enzimas no mercado (ZAMBARE; NILEGAONKAR; KANEKAR, 2011). São extensamente utilizadas como aditivos em detergente, nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e curtume, sendo essa ampla aplicabilidade devido à diversidade de especificidades na ação hidrolítica (LI *et al.*, 2013).

Dentre as peptidases caracterizadas na literatura, as de origem vegetal tem tomado grande espaço em indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. Apresentam baixo de custo de produção e vasta gama de especificidades proteolíticas, Além disso , apresentam resistência à variação de temperaturas e valores de pH (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011).

De acordo com o site da empresa Novozymes (<http://www.novozymes.com>), a indústria de curtume é uma das mais tradicionais e, como em outras indústrias, a procura pelos produtos tem aumentado juntamente com as exigências na fabricação, sendo necessárias algumas adaptações e/ou inovações nos processos de fabricação, bem como no tratamento dos resíduos gerados pelos processos, melhorando a produção, qualidade do produto e diminuição dos impactos ambientais, estando assim, as peptidases inseridas nesse contexto.

Uma das utilizações de peptidases neste segmento industrial é na degradação de resíduos sólidos, sendo um destes o “*animal flashing*”, material rico em proteína e que comumente, são necessários diferentes tratamentos químicos e térmicos para sua degradação. Tendo a utilização de peptidases, redução de energia e tempo gasto no processamento deste resíduo (AHMAD; ANSARI, 2013; GODECKE; RODRIGUES; NAIME, 2012).

Outra grande área industrial que utiliza as peptidases em processos é a farmacêutica, aplicando essa classe de moléculas de diversas formas. A utilização de peptidases por outras áreas, alimentícia por exemplo, necessitam da produção em grande escala e eficiência com pouco processamento. Já na farmacêutica, as peptidases são requeridas em poucas quantidades, aja vista a necessidade de longos processos de purificação (FELIX; NORONHA; MARCO, 2004). Possuem aplicações no preparo de medicamentos na forma de pomadas, no preparo de soluções para limpezas de dentaduras e lentes de contato (SAWANT; NAGENDRAM, 2014). Queratinases são exemplos de peptidases aplicadas à farmacêutica por serem moléculas eficientes no tratamento de dermatofitose e psoríase, podendo também auxiliar no processo de cicatrização (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

Grande parte de peptidases comerciais são destinadas para produção de detergentes. O primeiro detergente contendo protease foi comercializado em 1960, utilizando subtilisinas de *Bacillus licheniformis*, mas seu uso na indústria de detergentes foi proposto pela primeira vez em 1913 (SAEKI *et al.*, 2007). As proteases alcalinas são as mais apropriadas como aditivos detergentes, uma vez que as enzimas hidrolíticas agem a pH altamente alcalino (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998). As subtilisinas são as peptidases mais estudadas para o desempenho de lavagem, levando-se em consideração sua resistência

aos oxidantes químicos e atividade em diferentes temperaturas, características importantes para o uso de peptidases como aditivo em detergentes (SAEKI *et al.*, 2007).

Na indústria alimentícia as peptidases podem ser utilizadas a fim de causar mudanças nas propriedades funcionais de proteínas alimentares, podendo alterar características como: solubilidade, gelificação, emulsificação e formação de espuma. Em alguns casos, essas mudanças ocasionadas pela hidrólise podem resultar na diminuição da alergenicidade de algumas proteínas. Muitas proteínas necessitam de altos graus de hidrólise para alterar a sua alergenicidade. Portanto, não é qualquer peptidase que pode realizar este efeito. Além disso, um baixo grau de hidrólise pode agravar a reatividade por exposição de epítopos presentes no interior das cadeias polipeptídica (TAVANO, 2013). A proteólise pode resultar, inclusive, na liberação de peptídeos bioativos, que são definidos como fragmentos de proteínas específicas que exercem um impacto positivo nas funções do corpo e pode influenciar na saúde (KITTS; WEILER, 2003).

São amplamente utilizadas na indústria de panificação, sendo possível encontrar diversos trabalhos na literatura empregando estas biomoléculas na produção de pão. Após a adição de peptidases no processo de fabricação do pão, em alguns casos retarda o processo de envelhecimento e melhora a consistência da massa do interior do pão, tendo assim um produto final de melhor qualidade (LINKO; JAVANAINEN; LINKO, 1997; HUTTNER; ARENDT, 2010; LI *et al.*, 2016).

A produção de cerveja é um processo bem estabelecido e tradicional, mas esses fatos não o isentam de melhorias, havendo no mercado atual a constante busca pela otimização do processo. A utilização de peptidases na fabricação de cerveja é um exemplo de aperfeiçoamento desse processo, sendo empregadas para a obtenção de maior rendimento e redução de perdas e tempo de maturação. Alguns dos produtos aromatizantes derivados de leveduras são derivados do processamento de açúcares e aminoácidos, estando as peptidases envolvidas na metabolização de aminoácidos, podendo liberar para o meio, compostos que favoreçam maior palatabilidade da cerveja (PIDDOCKE, 2011; MERZ *et al.*, 2015).

No entanto, a maior aplicação de peptidases dentro da indústria de alimentos é na produção de queijo (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012). Em decorrência da ação das proteases, incluindo a coagulação, características importantes como sabor e textura, podem ser significativamente alteradas de acordo com a razão de hidrólise durante o processo de maturação do queijo (McSWEENEY, 2004).

1.4 Produção de queijo

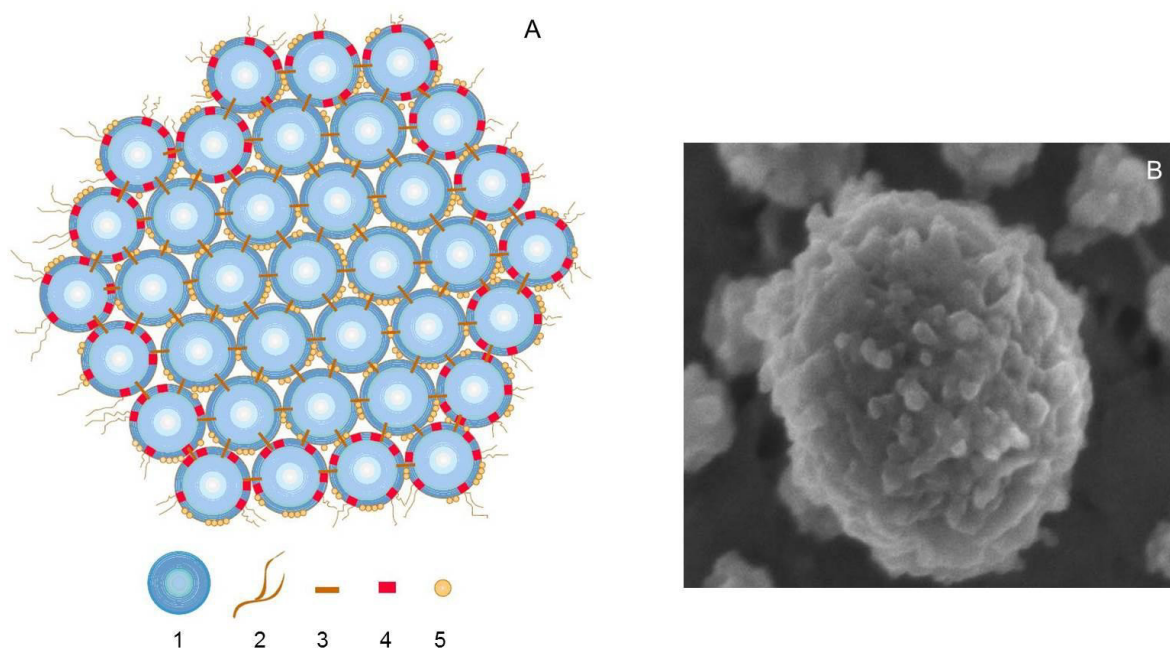
1.4.1 Coagulação do leite

As proteínas do leite bovino comumente se dividem em dois grupos: as proteínas do soro, especialmente α -lactoalbuminas (α_1 e α_2) e β -lactoalbuminas, e as caseínas, que se organizam em forma de micelas e originam partículas coloidais. As caseínas são fosfoproteínas, com o grupo fosfato, em alguns casos ligado a serina em diferentes regiões da cadeia polipeptídica, conferindo um caráter anfipático a essas moléculas. Possuem formato globular e são insolúveis em pH 4,6 a 20 °C (ROBINSON; WILBEY, 1998).

As caseínas correspondem a 80% do total de proteínas presentes no leite e suas micelas resultam da combinação de três tipos proteicos, α - (α_{s1} e α_{s2}), β - e κ -caseína (Figura 3A). A κ -caseína difere das demais por possuir apenas um grupo fosfato e por possuir uma região glicosilada composta por três monossacarídeos, que podem ser galactose, N-acetilgalactosamina ou ácido N-acetilneuramínico (SGARBIERI, 2005). Essa proteína exibe uma alta solubilidade em água, além de apresentar pouca afinidade por cálcio, e desse modo, interage hidrofobicamente formando uma camada protetora ao redor das caseínas que se ligam fortemente ao cálcio (α_{s1} -, α_{s2} e β -), evitando a precipitação dessas e conferindo estabilidade às micelas (CRABBE, 2004). A presença dos filamentos na extremidade c-terminal da κ -caseína na superfície da micela previne a agregação de outras submicelas e também é responsável pela estabilidade da micela contra floculação no leite devido a repulsão eletrostática e impedimento estérico (WALSTRA, 1999).

Análises de microscopia eletrônica mostraram que as micelas de caseína possuem uma superfície desigual e são construídas a partir da união de submicelas (Figura 3B), embora o modelo da estrutura ainda não tenha sido totalmente elucidado (FOX; BRODKORB, 2008). De acordo com Cheftel *et al.* (1989) as caseínas são classificadas em α_{s1} -caseína, não possuem cisteína e apresentam maior susceptibilidade ao efeito de peptidases; α_{s2} -caseína, altamente hidrofílica, fosforilada e sensível ao cálcio ionizável; β -caseína, apresenta maior quantidade de prolina, ficando mais suscetível às peptidases em baixas temperaturas e κ -caseína, proteína de pequeno tamanho e sofre pouco efeito do cálcio livre.

Figura 4 – Estrutura micelar das caseínas. (A) Desenho esquemático – 1: submicela, 2: cadeias proteicas, 3: fosfato de cálcio, 4: κ -caseína, 5: grupos fosfato (B) Eletromicrografia de uma micela de caseína individual.



Fonte: Dalgleish, Spagnuolo e Goff (2004)

A coagulação do leite é a etapa fundamental na produção de queijos e é realizada em duas etapas, podendo ser afetadas por qualquer variação química no ambiente. Na primeira fase ocorre a clivagem da κ -caseína e a segunda fase consiste na coagulação das micelas de caseína que foram desestabilizadas após a proteólise (YEGIN *et al.*, 2011). Com a clivagem, α - e β -caseínas são liberadas do interior das micelas e precipitam na presença de cálcio formando o coágulo (FOX *et al.*, 2000; SGARBIERI, 2005; ABREU, 2005). De acordo com o processamento sofrido pelo coágulo, diferentes tipos de queijos poderão ser produzidos (SARDINAS, 1972).

O cálcio é importante no processo de coagulação, pois funciona como uma ponte entre as micelas, criando condições isoelétricas favoráveis para que isso ocorra (CRABBE, 2004; MERHEB-DINI *et al.*, 2010). Quando esse íon se encontra em baixa concentração no leite a coagulação se dá de forma lenta e o coágulo formado não é firme, contudo, em concentrações adequadas de cálcio o coágulo se torna mais compacto, flexível, impermeável e contrátil, condições que permitem que a massa do queijo suporte as etapas do processo de fabricação (BONATO *et al.*, 2006).

Vários fatores podem influenciar no processo de coagulação do leite, incluindo pH, temperatura, força iônica, concentração de enzimas, presença de sais e o tipo de coagulante. Trata-se de uma reação dependente do pH, ocorrendo geralmente pH 6,3 - 6,6. A taxa de coagulação aumenta com a temperatura, desde que a enzima seja estável. O tipo de

coagulante exerce grande influência no rendimento dos queijos, que acaba sendo reduzido quando em condições de alta atividade proteolítica. Contudo, esse problema pode ser minimizado por meio da padronização do tempo de coagulação (LUCEY; KELLY, 1994)

1.4.2 Coalhos e coagulantes

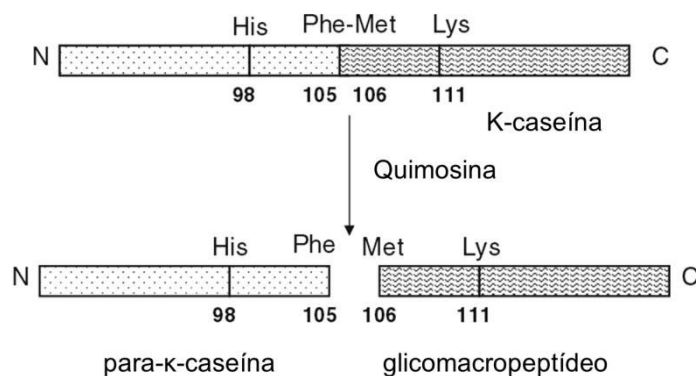
Por definição, na indústria de queijo o termo coalho refere-se à enzima obtida do abomaso de animais ruminantes, que se trata de uma combinação de renina, ou quimosina (EC 3.4.23.4) e pepsina (EC 3.4.23.3). As enzimas usadas para a coagulação do leite que não são obtidas de outras fontes alternativas são denominadas coagulantes (ANDRÉN, 2002).

A escolha do coagulante é importante, pois o uso de peptidases com elevada atividade proteolítica e baixa especificidade pode resultar em uma taxa de hidrólise excessiva, liberando pequenos peptídeos contendo resíduos hidrofóbicos que irão conferir sabor amargo ao queijo, além de minimizar sua vida útil e rendimento (FOX & LAW, 1991; GAJO *et al.*, 2012).

A quimosina é uma peptidase aspártica conhecida por promover proteólise limitada da caseína, e por este motivo, a mais utilizada para a coagulação do leite. Esta é uma característica desejável na escolha de substitutos para o coalho (FOX *et al.*, 2000). O pH ótimo para a atividade da quimosina é 5,8 e a temperatura varia entre 30 a 50 °C. É relativamente estável a temperaturas de até 50 °C (KUMAR *et al.*, 2010).

Durante a coagulação enzimática do leite, a κ -caseína é a única proteína hidrolisada pela quimosina, especificamente na ligação entre os aminoácidos Phe105-Met106 (Figura 4) (CRABBE, 2004; FOX, *et al.*, 2000). Essa ligação é particularmente instável, devido à natureza dos aminoácidos envolvidos, à presença de uma serina adjacente a fenilalanina (Phe) e resíduos hidrofóbicos (Leu, Ala e Ile) (ECK, 1987). Após a hidrólise, a porção N-terminal da κ -caseína (resíduos de 1 a 105) dá origem à para- κ -caseína, molécula insolúvel, e permanece associada à micela de caseína, enquanto a parte C-terminal, referida como glicomacropéptídeo (resíduos de 106 a 169), por possuir caráter hidrofílico, se solubiliza no soro (ROBINSON; WILBEY, 1998; DEJMEK; WALSTRA, 2004; FOX, *et al.*, 2000). Desse modo, a para- κ -caseína pode precipitar, na presença de cálcio, formando o paracaseinato de cálcio, assim como as frações α e β da caseína (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

Figura 5 – Esquema de clivagem da κ -caseína promovida por quimosina



Fonte: Yegin *et al.* (2011)

Tradicionalmente, quimosina bovina é obtida a partir do abomaso de bezerros desmamados, visto que a relação quimosina-pepsina varia consideravelmente com a idade do animal, ou seja, quanto mais jovem, maior a proporção de quimosina (80%:20%). Essa é uma condição mais apropriada, uma vez que a pepsina apresenta menor grau de especificidade, hidrolisando ligações indesejáveis, o que diminui a qualidade do queijo e aumenta o amargor (VISSER, 1993, GAJO *et al.*, 2012).

Em decorrência do aumento da produção mundial de queijos e a redução de coalhos de bezerros, além de preocupações étnicas e religiosas associada com a produção, a busca por substitutos do coalho tem se intensificado (FOX *et al.*, 2000; SOUZA; ARDO; MCSWEENEY, 2001). Diante disso, várias fontes de coagulantes têm sido propostas, como de origem vegetal, microbiana e a quimosina obtida através de técnica de expressão heteróloga (BENEDET, 1993).

Dentre as fontes de peptidases de origem microbiana podemos citar as espécies, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* (CLAVERIE-MARTIN; VEGA-HERNANDEZ, 2007), *Termomucor indicae-seudaticae* (MERHEB-DINI *et al.*, 2012), *Termitomyces clypeatus* (MAJUMDER *et al.*, 2015), *Thermoascus aurantiacus* (MERHEB *et al.*, 2007) e *Bacillus* sp (SHIEH; THI; SHIH, 2009; LEMES *et al.*, 2016) dentre outras.

A quimosina obtida através de técnicas de expressão heteróloga, já é bastante utilizada, onde os principais vetores utilizados são *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactics*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* (WALSTRA *et al.*, 2006; NEELAKANTAN *et al.*, 1999).

A utilização de peptidases de origem vegetal para o emprego na coagulação do leite tem despertado grande interesse, pela a facilidade de obtenção de extratos, fácil purificação e/ou isolamento de coagulante natural, além de agregar valor nutricional ao

produto (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012). Muitas peptidases vêm sendo extensivamente estudadas em espécies vegetais, dentre as quais podemos citar: *Cucumis melo*, *Calotropis procera*, *Ananas comosus*, *Ficus religiosa*, *Lactuca sativa*, *Oryza sativa* e *Cynara cardunculus* (Tabela 3). No entanto, coagulantes vegetais em sua grande maioria conferem ao queijo um sabor amargo, em decorrência da alta taxa de hidrólise e falta de especificidade. Há exceções, como é o caso do extrato de flores do cardo *C. cardunculus*, que já é utilizado há séculos na fabricação de queijos artesanais principalmente em Portugal e Espanha (SOUZA; MALCATA, 1998). Uma de suas enzimas com potencial coagulante, cardosina A, possui especificidade de clivagem semelhante a da quimosina. Outras espécies vegetais também apresentaram padrão de hidrólise da κ -caseína semelhante ao coalho animal (Phe₁₀₅ – Met₁₀₆), como é o caso do extrato de sementes de girassol (*H. annuus*) (EGITO *et al.*, 2007) e *O. sativa* (ASAKURA *et al.*, 1997). Bruno *et al.* (2010) relata que o queijo produzido a partir do extrato dos frutos de *Bromelia hieronymi* apresentou condições aceitáveis de aparência, textura e sabor. Os queijos produzidos com o extrato de sementes de *Albizia julibrissin* não desenvolveram amargura mesmo após três meses de maturação (OTANI; MATSUMORI; HOSONO, 1991)

Embora haja uma grande diversidade de enzimas coagulantes e em alguns casos até mesmo possuam especificidades semelhantes, os produtos obtidos com o uso dessas enzimas, podem possuir características bem peculiares. A utilização de extratos de frutos na indústria alimentícia apresenta vantagens, como o baixo custo e a fácil reprodutibilidade na obtenção de extratos. Por fazerem parte, em alguns casos, da dieta, os frutos também apresentam baixas implicações com relação à toxicidade e desde modo, melhor aceitação por parte dos consumidores.

Tabela 2 – Fontes vegetais de obtenção de peptidases com atividade coagulante do leite.

Espécie	Enzima	Parte da planta	Referência
<i>Cucumis melo</i>	Cucumisina	Fruto	UCHIKOBA, T., KANEDA, 1996
<i>Lactuca sativa</i>	“Lettucine”	Folha	LO PIERO <i>et al.</i> , 2002
<i>Oryza sativa</i>	Orizasina	Semente	ASAKURA <i>et al.</i> , 1997

<i>Calotropis procera</i>	–	Látex	AWORTH; MULLER, 1987
<i>Cynara cardunculus</i>	Cardosinas A e B	Flor	HEIMGARTNER et al., 1990
<i>Helianthus annuus</i>	–	Semente	EGITO et al., 2007
<i>Euphorbia nivulia</i>	NivuliaN I e II	Látex	BADGUJAR; MAHAJAN, 2010; BADGUJAR; MAHAJAN, 2014
<i>Moringa oleifera</i>	–	Flor	PONTUAL et al., 2012
<i>Ficus religiosa</i>	Religiosina B	Látex	KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012
<i>Cynara scolymus</i>	–	Flor	CHAZARRA et al., 2007
<i>Maclura pomifera</i>	–	Látex	CORRONS et al, 2012
<i>Ananas comosus</i>	–	Fruto	CATTANEO et al., 1994
<i>Solanum dubium</i>	–	Semente	AHMED et al., 2009
<i>Bromelia hieronymi</i>	–	Fruto	BRUNO et al., 2010
<i>Albizia julibrissin</i>	–	Semente	OTANI; MATSUMORI; HOSONO, 1991

1.5 Noni (*Morinda citrifolia* L.)

1.5.1 Aspectos botânicos e distribuição geográfica

Classificação taxonômica:

- Reino: Plantae
 - Divisão: Magnoliophyta
 - Classe: Magnoliopsida
 - Ordem Gentianales
 - Família: Rubiaceae
 - Gênero: *Morinda*
 - Espécie: *Morinda citrifolia* L.

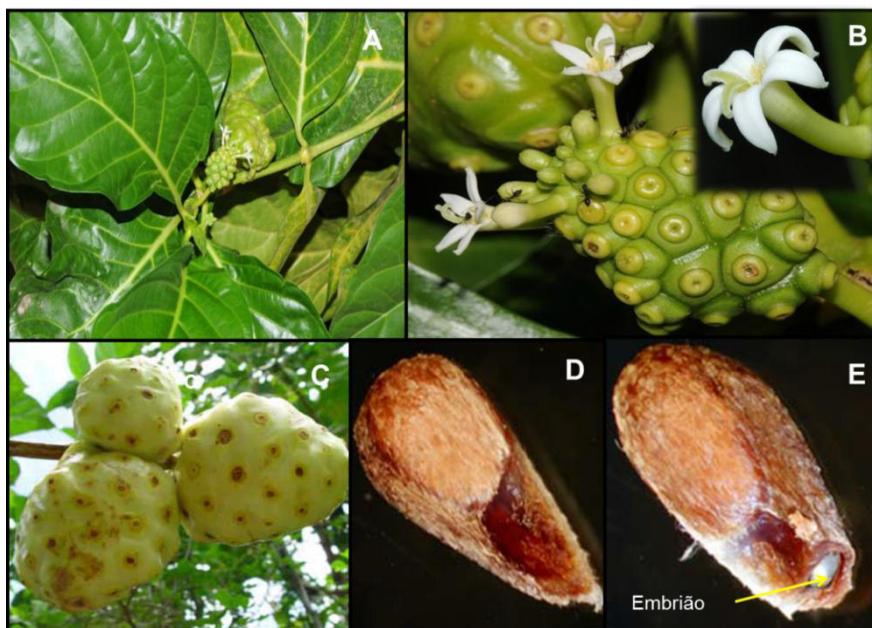
Morinda citrifolia L. é uma espécie pertencente à família Rubiaceae, da qual fazem parte também o café (*Coffea arabica* L.) e algumas plantas ornamentais, como a ixora (*Ixora coccinea*) e gardênia (*Gardenia jasminoides*). Nativa do sudoeste da Ásia (Indonésia) à Austrália é popularmente conhecida no Brasil e no Havaí, como noni, porém recebe outras denominações em diferentes localidades, como “indian mulberry” na Índia, “mengkudu” na Malásia, “cheese fruit” na Austrália, dentre outros. Possui ciclo de vida perene, de clima tropical e temperado, geralmente encontrada a partir a 400 m de altitude do nível do mar,

embora se adapte melhor às regiões costeiras (LÜ BERCK; HANNES, 2001). No Brasil é possível encontrar seu cultivo nos estados do Acre, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Sergipe e Ceará (CORREIA *et al.*, 2011).

O noni apresenta porte arbustivo ou arbóreo de pequeno porte, com 3 – 10 m de comprimento. Adaptada aos mais variados ambientes, se desenvolve tanto em solos férteis como inférteis, secos ou úmidos, ácidos ou alcalinos e apresenta ampla tolerância à exposição ao vento, inundações, salinidade, competição com espécies alelopáticas, dentre outros fatores (NELSON, 2006).

Suas folhas são simples, elípticas e opostas. Apresentam coloração verde brilhante na face adaxial e opaca na abaxial, podendo atingir 25 cm de largura na fase adulta (WANG *et al.*, 2002). As flores são pequenas e tubulares, agrupadas e inseridas no pedúnculo (Figura 5). Possuem corola branca, composta de cinco lóbulos e cálice esverdeado.

Figura 6 – *Morinda citrifolia* L.: visão geral dos aspectos morfológicos. Folhas (A), flores (B), frutos (C), semente íntegra (D) e corte transversal da semente indicando a localização do embrião (E).



Fonte: Nelson (2006).

Seus frutos são formados a partir de ovários de várias flores (infrutescência), assumem um formato ovalado, são carnudos, ligeiramente enrugados e sua frutificação pode ocorrer no ano todo. Sua coloração varia de acordo com o estágio de maturação, desde verde até branco e acinzentado (Tabela 4) no momento da colheita (MORTON, 1992).

A mudança do estágio de maturação 4 (amarelo-esbranquiçado) para o 5 (translúcido-acinzentado) ocorre muito rapidamente e em cerca de poucas horas, adquirindo uma textura gelatinosa, bem como desenvolve um cheiro forte e desagradável, que se deve à presença de ácido butírico (DIXON *et al.*, 1999; CHAN-BLANCO, 2006). A colheita dos frutos geralmente é realizada antes do amadurecimento total, a fim de evitar alguns problemas, tais como a infestação de insetos e ataques por aves (MACPHERSON *et al.*, 2007), além de perdas pós-colheita durante o transporte e o armazenamento, garantindo dessa forma, a integridade dos frutos. Os frutos costumam ser estocados até que atinjam a senescência (CHAN-BLANCO, 2006)

As sementes são triangulares, de coloração marrom, medem cerca de 3 – 10 mm de comprimento e podem estar presentes em número maior do que 100 por fruto (VEIGA *et al.*, 2005). Possuem uma distinta câmara de ar e podem permanecer viáveis mesmo depois de flutuar na água por meses, podendo ser distribuídas por correntes oceânicas, o que contribui para sua propagação (NELSON, 2006; MACPHERSON *et al.*, 2007).

Dois variedades (*M. citrifolia* var. *citrifolia* e *M. citrifolia* var. *bracteata*) e uma cultivar (*M. citrifolia* cv. *potteri*) são descritas para essa espécie e diferem entre si quanto sua distribuição geográfica e morfologia de suas folhas e frutos (Figura 6). *M. citrifolia* var. *citrifolia* é mais amplamente distribuída entre os continentes, possui maior importância econômica e diferencia-se das demais por possuir frutos maiores. *M. citrifolia* var. *bracteata* é caracterizada pela presença de brácteas envolvendo o fruto e está localizada em países entre os oceanos Índico e Pacífico, enquanto que, *M. citrifolia* cv. *potteri* é uma planta ornamental, apresentando folhas com coloração verde e branca, tendo distribuição em todo o Pacífico (McCLATCHEY, 2003; RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010; ASSI *et al.*, 2015).







Tabela 3 – Frutos de noni em diferentes estádios de desenvolvimento, mostrando as alterações na cor da pele e firmeza durante o amadurecimento (CHAN-BLANCO, 2006).

Características	Estádios de maturação				
	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4	Estádio 5
Cor	Verde-escuro,	Verde-amarelado,	Amarelo-esbranquiçado,	Amarelo-esbranquiçado,	Translúcido-acinzentado,
Firmeza	Muito duro	Muito duro	Muito duro	Razoavelmente duro	Macio

← Após a colheita: a mudança do estágio 2 para o 5 leva cerca de 5-7 dias. →

← Maturação do fruto 20 dias →

← Floração 5-7 dias →

Fonte: Adaptado de Motshakeri; Ghazali (2015).

Figura 7 – Variedades e cultivar da espécie *M. citrifolia*. *M. citrifolia* var. *citrifolia* (A), *M. citrifolia* var. *bracteata* (B) e *M. citrifolia* cv. “Potteri” (C).



Fonte: Nelson (2006).

1.5.2 Constituição química e propriedades nutracêuticas do suco de noni

O noni tem sido utilizado há mais de 2000 anos pelos polinésios para fins alimentares e medicinais. Anteriormente a esse período, cerca de 4700 anos, já era utilizado na China como antídoto para ervas venenosas, na forma de chá (WHISTLER, 1985; WANG *et al.*, 2002).

Aproximadamente 200 compostos fitoquímicos já foram isolados e identificados em *M. citrifolia*. No entanto, a composição química varia de acordo com as partes da planta (SINGH, 2012), o país de origem (DENG *et al.*, 2010) e com a época da colheita (ILOKI ASSANGA *et al.*, 2013). Os micronutrientes mais abundantes são os compostos fenólicos, considerados o maior grupo funcional e encontrado em diferentes partes da planta, ácidos orgânicos e alcaloides. Dentre os compostos fenólicos, os mais importantes são as antraquinonas, como é o caso do damnacantal, aucubina, asperulosida e escopoletina (WANG; SU, 2001). Os principais ácidos orgânicos são os ácidos caprótico e caprílico (DITTMAR, 1993) e dentre os alcalóides destaca-se a xeronina (HEINICKE, 1985).

O fruto tem em sua constituição cerca de 90% de água, enquanto que sólidos solúveis, fibras dietéticas e proteínas perfazem a matéria seca (CHUNHIENG, 2003). No suco do noni está presente ainda a proxeronina, um precursor do alcaloide xeronina, que quando em combinação com proteínas, promove sua funcionalidade, sendo deste modo, apontada como a responsável pela maioria dos efeitos benéficos atribuídos ao suco (SOLOMON, 1999). A polpa do fruto de noni pode sofrer variações quanto à sua constituição físico-

química, de acordo com o ambiente de seu desenvolvimento, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 4 – Composição físico-química da polpa do fruto de noni.

Parâmetros físico-químicos	Faria et al. (2014)	West et al. (2011)	Nascimento (2012)
Umidade (g/100g)	90,66 ± 0,01	91.63 ± 1.98	90,00 ± 0,01
Carboidratos totais (g/100g)	5,27 ± 0,41	7.21 ± 1.81	2,68 ± 0,01
Carboidratos Redutores (g/100g)	3,71 ± 0,17	–	–
Sólidos solúveis (°Brix)	9,2 ± 0,00	–	8,17 ± 0,05
Proteínas (g/100g)	2,36 ¹	0.55 ± 0.11	4,20 ± 0,01
Lipídios (g/100g)	0,04 ± 0,01	0.10 ± 0.12	0,34 ± 0,04
Fibras Dietéticas (g/100g)	1,00 ± 0,05	2.01 ± 0.27	1,96 ± 0,04
Cinzas (g/100g)	0,66 ± 0,04	0.54 ± 0.19	0,82 ± 0,01
pH	3,54 ± 0,19	–	3,95 ± 0,07
Na (mg/100g)	19,76 ± 0,06	16.99 ± 5.98	–
K (mg/100g)	5013 ± 0,17	214.34 ± 56.91	–
P (mg/100g)	–	20.35 ± 6.78	–
Mg (mg/100g)	–	26.10 ± 8.33	–

¹ Proteínas = 100 – (umidade + lipídeos + cinzas + carboidratos totais+fibras dietéticas).

Comumente, o noni é consumido na forma de suco feitos a partir dos frutos, embora folhas, flores, casca e raízes também sejam utilizadas (DIXON *et al.*, 1999; MCCLATCHEY, 2002). Em decorrência dos vários benefícios terapêuticos e nutricionais atribuídos ao suco de noni (SINGH *et al.*, 1984), foi observado um aumento considerável no consumo do fruto nos últimos anos, sendo comercializado tanto em sua forma fresca, suco pasteurizado como em associação com outros frutos, frequentemente uva ou amora. Dentre as várias propriedades farmacológicas, algumas se encontram listadas na Tabela 6, sendo muitos desses efeitos relacionados à metabólitos secundários tais como, damnacanthal, escopoletina, óxido nítrico, alcaloides e esteróis (CHAN-BLANCO, 2006).

Tabela 5– Propriedades farmacológicas descritas para os frutos de noni.

Propriedades	Referência
Anti-inflamatória	AKIHISA et al., 2007; YU et al., 2008
Antioxidante	ZIN; ABDUL-HAMID; OSMAN, 2002; SU et al., 2005; DUSSOSSOY et al., 2011
Anti-cancerígena	HIRAZUMI et al, 1994; FURUSAWA et al., 2003; KAMIYA et al., 2010
Analgésica	LEVAND; LARSON, 1979;
Antinociceptiva	PUNJANON; NADHASRI, 2005
Cardioprotetor	KAMIYA et al, 2004
Imunomoduladora	PALU et al., 2008; LI et al., 2008
Antimicrobiana	DUNCAN et al., 1998; JAYARAMAN et al., 2008 JAINKITTIVONG et al, 2009
Anti-hipertensiva	DENG, 2007
Ansiolítica e sedativo	DENG et al., 2007
Hipoglicemiante	HORSFAL et al., 2008; PURANIK et al, 2013
Antiemética	PRAPAITRAKOOL; ITHARAT, 2010
Antiviral	KAMATA et al., 2006
Anti-artrítica	SARASWATHI; WAGH SAGAR; KUNAL, 2012

Quanto à segurança de uso do fruto de noni, alguns casos de hepatotoxicidade foram associados ao consumo diário do suco para fins terapêuticos (MILLONIG *et al.*, 2005; STADLBAUER *et al.*, 2005; YÜCE *et al.*, 2006). No entanto, a associação entre o suco dos frutos e lesões hepáticas permanece controversa, uma vez que estudos subsequentes não identificaram efeitos tóxicos no fígado de roedores (WEST *et al.*, 2006 WANG *et al.*, 2002; WEST et al., 2009). Além disso, o suco comercial foi aprovado como um novo alimento pela União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2003) e foi concluído que a sua ingestão regular não era susceptível de causar efeitos tóxicos (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2006).

Segundo Mohamad-Shalan *et al.* (2017), nos frutos de noni uma diversidade de metabólitos secundários são produzidos e é provável que os principais problemas de saúde apresentados em seu estudo tenham relação com o teor de antraquinonas carcinogênicas, em particular a alizarina, rubiadina e lucidina. As investigações do Programa Nacional de Toxicologia dos EUA concluíram que as antraquinonas podem causar câncer de fígado, rim, bexiga urinária e tireóide em ratos e camundongos (National Toxicology Program, 2005). Diante disso uma alternativa para a utilização segura seria o fracionamento de compostos do fruto de noni, visando a remoção de metabólitos secundários ou outras moléculas indesejáveis.

Embora muito se tenha a respeito dos frutos de noni, uma abordagem voltada para o estudo de suas proteínas ainda é bastante exígua. Há alguns estudos realizados com a polpa de noni, onde foi realizado uma caracterização parcial de peptidases em diferentes estádios de maturação (ISHARTANI *et al.*, 2011; ISMAIL; RAZAK, 2014), onde o estágio 5 (translúcido-acinzentado) apresentou uma maior atividade específica em relação ao estágio 1 (verde-escuro). Em outro estudo foi conduzido a purificação de uma peptidase bromelaina-like (SMITH-MARSHALL; GOLDEN, 2012). No entanto, não há relatos sobre a avaliação do potencial de uso para essas moléculas.

Diante do exposto surgem os seguintes questionamentos:

- A polpa dos frutos de noni teria mais de um tipo de peptidase? Em caso afirmativo, em qual grupo estão inseridas?
- As peptidases da polpa dos frutos de noni apresentam características favoráveis para seu uso em processos biotecnológicos?
- Seriam essas peptidases capazes de hidrolisar proteínas do leite a fim de serem utilizada como substituinte ao coalho animal na produção de queijo?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar bioquimicamente as peptidases da polpa dos frutos de noni (*M. citrifolia* L.), bem como avaliar seu potencial tecnológico e possível aplicação na hidrólise das proteínas do leite e na produção de queijos.

2.2 Objetivos específicos

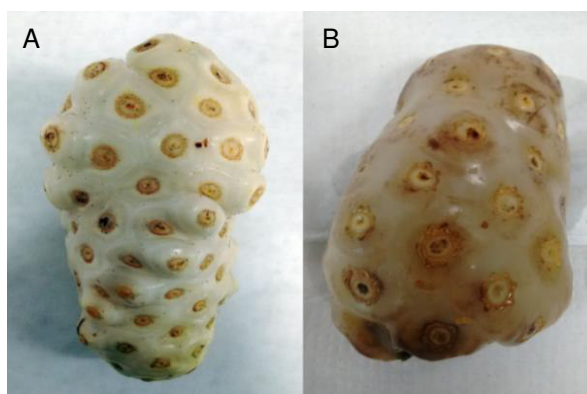
- Determinar a composição proteica da polpa dos frutos de noni;
- Estabelecer um protocolo de extração das proteínas dos frutos de noni;
- Determinar a atividade proteolítica total e específica dos extratos proteicos obtidos;
- Caracterizar bioquimicamente as peptidases da polpa dos frutos de *M. citrifolia*, quanto à massa molecular, temperatura e pH ótimo de atividade, efeito de inibidores e estabilidade frente à diferentes parâmetros;
- Analisar a estabilidade das peptidases da polpa dos frutos de noni na atividade de coagulação das proteínas do leite;
- Avaliar o perfil de hidrólise das peptidases do extrato proteico da polpa de noni frente às caseínas;
- Avaliar o desempenho das peptidases da polpa dos frutos de noni na produção de queijo do tipo “coalho”.

3 MATERIAIS

3.1 Material vegetal

Os frutos de *Morinda citrifolia* L. var. *citrifolia* foram coletados no Campus do Pici Prof. Prisco Bezerra (Pici), Fortaleza – CE (3°44'24.1''S 38°34'36.2''N), Universidade Federal do Ceará, no mês de junho de 2015. A coleta foi realizada com o fruto no estágio amarelo esbranquiçado (Figura 7A). Em seguida, os frutos foram levados para o laboratório em temperatura ambiente, onde foram higienizados através de uma extensa lavagem com água destilada, secos em papel toalha e postos para amadurecer na bancada em recipiente fechado até o estágio de maturação translúcido-acinzentado (Figura 7B). Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (BioAP), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC.

Figura 8 – Frutos de noni (*Morinda citrifolia* L.) nos estágios de maturação. Amarelo esbranquiçado (A) e translúcido-acinzentado (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Reagentes químicos

Acrilamida, N, N' – bisacrilamida, persulfato de amônio, N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), Coomassie Brilliant Blue G-250, dodecil sulfato de sódio (SDS), albumina sérica bovina (BSA), ácido tricloroacético (TCA), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pepstatina A, fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF), trans-epoxisuccinil-l-leucilamido(4-guanidino)butano (E-64), iodoacetamida, N- α -benzoil-DL-arginina-*p*-naftilamida (BANA), dimetilsufóxido (DMSO), 4-dimetilaminocinamaldeído (DMACA),

azocaseína, β -mercaptoetanol, uréia, gelatina, triton X-100, caseína de estômago bovino e κ -caseína foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

Os marcadores de massa molecular (LMW-SDS Marker Kit) e ditioneitol (DTT) foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (NY, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

4 MÉTODOS

4.1 Obtenção da polpa dos frutos do noni

Após atingir o estágio de maturação translúcido-acinzentado, os frutos foram novamente lavados extensivamente em água destilada. As sementes foram eliminadas através de um crivo, resultando em um purê composto por casca e polpa dos frutos. Esse purê, subsequentemente, foi submetido à extração de proteínas solúveis na forma fresca, e parte foi liofilizado para posterior determinação do teor de proteínas totais.

4.2 Determinação do teor de proteínas totais da polpa dos frutos do noni

A quantificação de proteína total presente na polpa do fruto de *Morinda citrifolia* foi realizada através do método micro Kjeldahl (BAETHGEM; ALLEY, 1989), utilizando sulfato de amônio como padrão. Para isso a polpa obtida foi liofilizada e 0,02 g de material submetidos à mineralização com 1,5 mL de ácido sulfúrico e 1,1 g de catalisador – sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio metálico (100:10:1) – em digestor nas seguintes temperaturas: 100 °C por 15 min; 150 °C por 15 min; 250 °C por 15 min; 350 °C por 30 min; 400 °C por 45 min. Em seguida, a amostra foi ajustada com água destilada para o volume final de 50 mL e armazenada em alíquotas protegidas da luz. A determinação foi obtida por meio de medidas de absorvância, a 650 nm, da reação ocorrida entre 100 μ L da amostra mineralizada, 900 μ L de diluente (catalisador 2,2%, ácido sulfúrico 1,1 M a 6,11% e água destilada q.s.p), 5,5 mL de solução 1 (fosfato de sódio bibásico 2,68%, tartarato de sódio e potássio 5%, hidróxido de sódio 4% e água q.s.p.), 4 mL de solução 2 (salicilato de sódio 15%, nitroprussiato de sódio 0,003% e água q.s.p.) e 2 mL de solução 3 (hipoclorito de sódio 0,315% em água), incubados em banho-maria a 37 °C por 15 min. Sabendo-se que o teor de N nas proteínas é em torno de 16% (fator de conversão 6,25), o cálculo é feito da seguinte forma:

$$P (\%) = \frac{A \times F \times Vd \times 6,25}{Va \times m \times 10}$$

Onde:

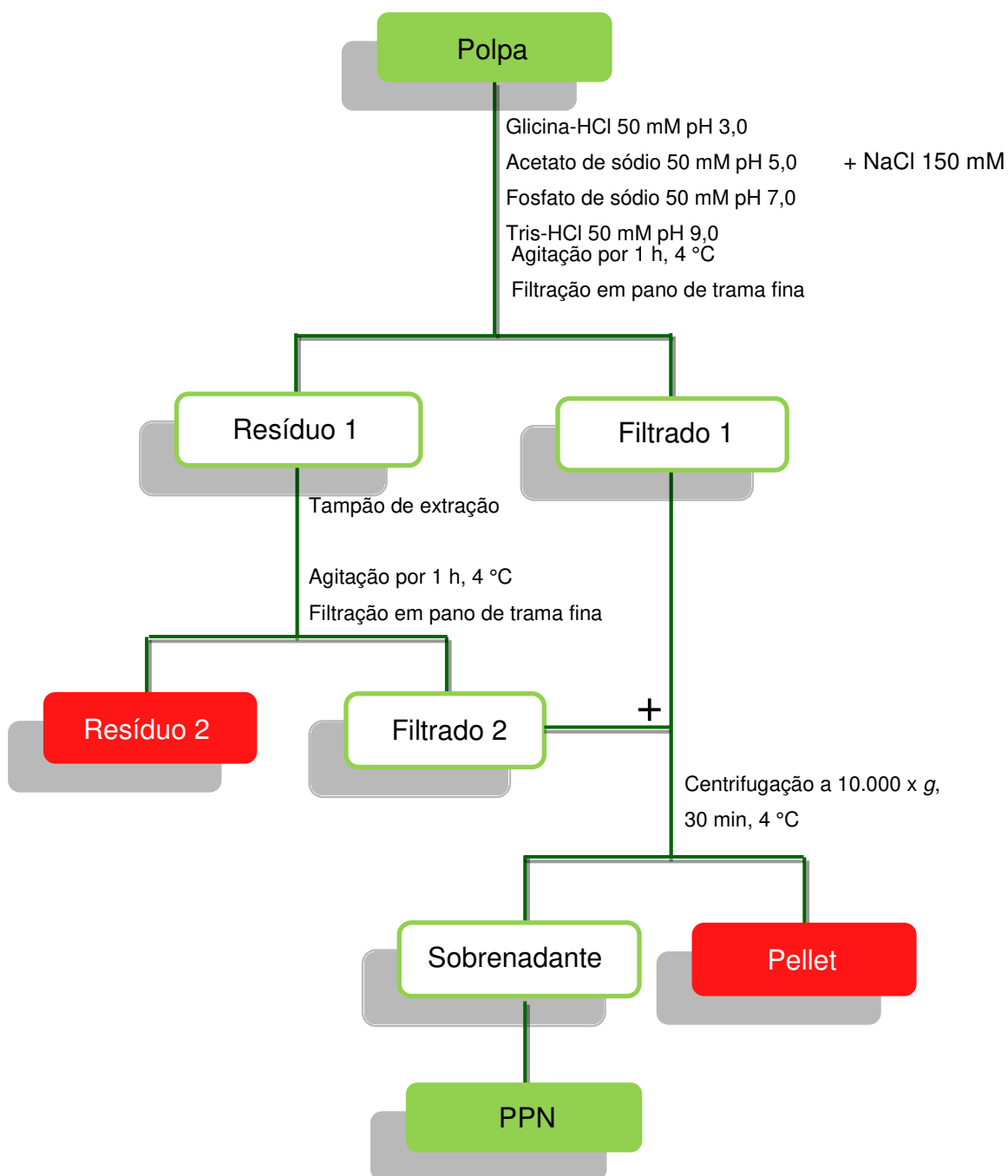
A: Absorbância; F: fator da curva padrão com sulfato de amônio; Vd: volume de diluição da amostra digerida; Va: volume da amostra utilizada no ensaio; m: massa total de polpa mineralizada.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados obtidos, expressos em g de proteína por 100 g de polpa.

4.3 Obtenção de extrato proteico da polpa dos frutos de noni

Para a obtenção do extrato proteico, a polpa do noni foi homogeneizada nos tampões: glicina-HCl, pH 3,0; acetato de sódio, pH 5,0; fosfato de sódio, pH 7,0 e tris-HCl, pH 9,0, todos na concentração de 50 mM e contendo NaCl 150 mM, nas proporções de 1:3 e 1:5 (m/v), sob constante agitação durante 1 h, 4°C. Em seguida, os extratos foram individualmente filtrados em pano de trama fina e os materiais retidos no tecido de filtração ressuspendidos nos tampões mencionados na proporção de 1:3, e submetidos novamente à agitação por 1 h para reextração de proteínas. Após a reextração, os materiais foram centrifugados a 10.000 x g, por 30 min a 4 °C e os sobrenadantes da extração e reextração, reunidos a determinação do teor de proteínas pelo método de Bradford (1976). O teor de proteínas totais por grama de polpa fresca foi utilizado como critério de seleção da melhor condição para a extração de proteínas. As extrações foram feitas em triplicata, sendo calculadas a média e o desvio padrão de média para cada condição. O extrato proteico obtido na melhor condição de extração foi liofilizado, ressuspendido em água destilada para concentração desejada e centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4°C, sendo abreviado como PPN (Proteínas da polpa de noni). PPN foi, então, utilizado nas análises posteriores (Figura 2).

Figura 9 – Esquema geral de obtenção de extrato total da polpa do fruto de noni.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético de PPN foi obtido através da análise em géis de poliacrilamida 12,5% de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Para isso, as proteínas (PPN) foram concentradas por precipitação com ácido tricloroacético (TCA)/acetona, tal como descrito por Damerval *et al.* (1986), com modificações. A uma amostra de 2 mL de PPN (2,0 mg/mL) foi adicionada acetona P. A. gelada e em seguida, TCA 100%, na proporção de 1:8:1, respectivamente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 15 min a 4 °C, sendo o pellet submetido a sucessivas lavagens com acetona gelada, para a total remoção do TCA e seco à temperatura ambiente (25 °C). As proteínas resultantes da precipitação foram solubilizadas em uréia 8 M e tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo SDS 1,0% azul de bromofenol 0,1%. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical e submetidos a uma diferença de potencial de 200 V e corrente de 20 mA. Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (67,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), inibidor de tripsina da soja (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R-250 0,025%, dissolvido em metanol (40%), ácido acético (10%) e água destilada até o aparecimento das bandas e descorados em solução de metanol 30% e ácido acético 10%. As massas moleculares aparentes das bandas proteicas foram mensuradas utilizando-se o software GelAnalyzer 2010.

4.5 Determinação da atividade proteolítica total de PPN

A atividade proteolítica de PPN foi determinada utilizando azocaseína 1% como substrato (XAVIER-FILHO *et al.*, 1989). Foram misturados 40 μ L de DTT 3 mM, 25 μ L de PPN (0,03 mg/mL), 435 μ L de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0, 200 μ L de azocaseína 1% e incubados a 37 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 300 μ L de TCA 20%. Para o branco, o substrato foi adicionado somente após a precipitação com TCA. Após centrifugação a 10.000 x g por 10 min, 500 μ L do sobrenadante foram coletados e acrescidos de 500 μ L de NaOH 2,0 M. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. Os valores de pH e temperatura adotados no ensaio foram baseados nas condições ideais para a realização da atividade de coagulação do leite, como será proposto adiante.

Uma unidade de atividade proteolítica (UAP) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,01. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão da média da atividade proteolítica específica (UAP/mgP)

4.5.1 Zimograma

Para a detecção *in gel* da atividade proteolítica, amostras de PPN (10 μ g de proteínas/poço) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguido os mesmos parâmetros de corrida citados anteriormente, mas utilizando géis de poliacrilamida 10%, contendo gelatina 0,2% como substrato, de acordo com a metodologia descrita por Macedo *et al.* (2004). Após a corrida eletroforética, os géis foram incubados por 20 min em uma solução de Triton X-100 2,5%, a 25 °C, para retirada do SDS e renaturação das proteínas. Essa etapa foi repetida uma vez para a completa retirada do SDS. Em seguida, os géis passaram por sucessivas (5 ao todo) lavagens em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 para remoção do Triton X-100 e foram novamente incubados em uma solução ativadora (tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 contendo DTT 1 mM) por 3 h a 37 °C. Para avaliar o efeito do SDS sobre a atividade proteolítica de PPN, a etapa de renaturação das enzimas com a adição de Triton X-100 foi eliminada e os géis foram apenas incubados em solução ativadora por 3 h a 37 °C.

Géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R-250 0,025%, dissolvido em metanol (40%), ácido acético (10%).

4.6 Caracterização da atividade proteolítica de PPN

4.6.1 Efeito de inibidores na atividade proteolítica de PPN

Para avaliação dos tipos de peptidases presentes no extrato da polpa de noni, uma amostra de PPN (0,03 mg/mL de proteínas em água) foi previamente incubada, por 30 min a 25 °C, com diferentes inibidores na proporção de 1:1 (v:v), a saber: PMSF 5 mM (fenilmetanosulfonilfluoreto - inibidor de peptidase serínica), EDTA 10 mM (ácido etilenodiaminotetraacético - inibidor de metalopeptidases), pepstatina A 0,05 mM (inibidor de peptidases aspárticas), E-64 (trans-epoxisuccinil-l-leucilamido(4-guanidino)butano) 0,18 mM e iodoacetamida 0,1 mM (inibidores de peptidase cisteínicas). Em seguida, as amostras foram

ensaiadas em triplicata com relação à sua atividade proteolítica utilizando azocaseína 1% como substrato tal como descrito anteriormente e os dados expressos como atividade proteolítica residual (%), sendo comparados com o controle (sem inibidores), onde a atividade proteolítica foi considerada 100%.

4.6.2 Determinação de pH ótimo da atividade proteolítica de PPN

Para determinação do pH ótimo da atividade hidrolítica das peptidases extraídas da polpa de noni, foram utilizados dois substratos de reação: azocaseína e BANA (*N* α -benzoyl-*D,L*-arginina-*p*-naftilamida). Os substratos foram solubilizados em diferentes tampões (50 mM), a saber: glicina-HCl, pH 3,0; acetato de sódio, pH 4,0; acetato de sódio, pH 5,0; fosfato de sódio, pH 6,0; fosfato de sódio, pH 7,0; Tris-HCl, pH 8,0 e glicina-NaOH, pH 9,0. Devido à insolubilidade da azocaseína em pH abaixo de 5, BANA também foi utilizado como substrato de reação. O ensaio de atividade proteolítica utilizando azocaseína foi conduzido de acordo com a metodologia descrita no item 4.5, utilizando amostras de PPN (0,03 mg/mL), solubilizadas em água destilada.

Para a atividade proteolítica utilizando BANA como substrato foi adotado o método descrito por *Abe et al.* (1987). O meio reacional foi constituído por 40 μ L de solução ativadora (DTT 3 mM), 25 μ L de PPN (0,03 mg/mL), 235 μ L de solução tampão e 200 μ L da solução do substrato de α -*N*-benzoyl-arginina-*p*-naftilamida (BANA) 1 mM, preparado em DMSO a 1% (v/v) e nos tampões já citados acima, para o ensaio utilizando azocaseína como substrato. Decorridos vinte minutos de incubação a 37 °C, a reação foi interrompida com 500 μ L de uma solução de 2% de HCl em etanol (v/v) e acrescida de 500 μ L de *p*-dimetilcinamaldeído (DMACA) a 0,06%. Após 30 min, o desenvolvimento da cor foi medido em espectrofotômetro a 540 nm. Para os brancos, o substrato BANA foi adicionado apenas após a interrupção da reação. Para este ensaio, uma UAP, também representa diferenças de absorbância de 0,01, em 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso como valores de atividade específica (UAP/mg). O pH ótimo, aqui determinado, foi adotado nos ensaios posteriores.

4.6.3 Determinação de temperatura ótima da atividade proteolítica de PPN

Para determinação da temperatura ótima de reação da enzima, foi utilizado azocaseína como substrato e o ensaio foi conduzido nas mesmas condições da metodologia

descrita no item 4.5, porém variando-se apenas a temperatura de reação. Amostras de PPN (0,03 mg/mL), solubilizadas em água destilada foram incubadas em meio reacional nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso como valores de atividade específica (UAP/mg/min).

4.6.4 Estabilidade da atividade proteolítica em função do pH

Para análise da estabilidade em função do pH, uma amostra de PPN (0,03 mg/mL) foi incubada por 30 min, 25 °C com os tampões (50 mM): glicina-HCl, pH 3,0; acetato de sódio, pH 4,0; acetato de sódio, pH 5,0; fosfato de sódio, pH 6,0; fosfato de sódio, pH 7,0; Tris-HCl, pH 8,0 e glicina-NaOH, pH 9,0. Em seguida, essa amostra de PPN foi ensaiada quanto à sua atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato, tal como descrito, em meio reacional de pH ótimo já determinado a 37 °C, temperatura que será utilizada posteriormente nos ensaios de coagulação do leite. Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados expressos como atividade proteolítica residual (%), sendo comparados com o controle (sem incubação), onde a atividade proteolítica foi considerada 100%.

4.6.5 Estabilidade da atividade proteolítica de PPN em função da temperatura

Para análise da estabilidade em função do pH, uma amostra de PPN (0,03 mg/mL) foi incubada previamente por 30 min, nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Em seguida, essa amostra de PPN foi submetida ao ensaio de atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato, tal como descrito. Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados expressos como atividade proteolítica residual (%), sendo comparados com o controle (sem incubação), onde a atividade proteolítica foi considerada 100%.

4.6.6 Atividade proteolítica de PPN na presença de cátions divalentes

A estabilidade frente a cátions divalentes foi avaliada procedendo-se à prévia incubação de PPN (0,03 mg/mL) em soluções aquosas contendo FeCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, MgCl₂ ou CuCl₂, por 30 min à 25 °C, nas concentrações de 0,5 e 5 mM. Adicionalmente a atividade proteolítica foi também avaliada na presença de cloreto de cálcio (CaCl₂) 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mM ou NaCl (0,1 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2,0 M e 2,5 M) previamente incubados com PPN nas mesmas condições.

O efeito dos cátions divalentes foi determinado em triplicata e expresso como percentual de atividade proteolítica residual em relação à atividade da enzima na ausência de cátions. Essa atividade foi determinada utilizando azocaseína como substrato tal como descrito no item 4.5.

4.6.7 Estabilidade da atividade proteolítica de PPN em função do armazenamento

Para análise da estabilidade em função do tempo e temperatura de armazenamento, o PPN (0,03 mg/mL) foi estocado em solução aquosa, sem adição de sais ou ativadores nas temperaturas de – 20 e 4 °C e analisados após os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias. O efeito do tempo e temperatura de armazenamento foi expresso em percentagem de atividade proteolítica residual em relação à atividade da enzima no tempo zero. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando azocaseína como substrato tal como descrito no item 4.5.

4.7 Determinação da atividade coagulante de PPN

A atividade coagulante do leite foi determinada de acordo com Arima et al. (1970). Para o ensaio foram utilizados, em triplicata, 2 mL de leite em pó desnatado, reconstituído a 10% (Molico[®]) com CaCl₂ 10 mM previamente incubado a 37 °C por 10 min. Ao leite foi adicionado 80 µL (0,3 mg/mL) de PPN, solubilizadas em água sem adição de ativadores, tendo início a contagem do tempo. Controles negativos foram preparados substituindo-se PPN por água destilada em volume equivalente e aos controles positivos foi adicionado um coalho comercial (Coalhopar), segundo recomendações do fabricante (0,06 mg/mL) . A formação do coágulo foi observada a 37 °C, sendo os tubos manualmente invertidos e o tempo de coagulação foi determinado quando foi possível discernir pequenas partículas após análise a olho nu. Uma unidade coagulante de leite foi definida como a quantidade de enzima necessária para a coagulação de 10 mL de leite em 40 min, sendo calculado da seguinte forma, de acordo com:

$$UAC = \frac{2400 \times V_s \times D}{V_a \times t}$$

Onde:

UAC: Unidade de atividade coagulante

Vs: volume de substrato (mL); D: diluição do material teste; Va: volume da amostra (mL); t: tempo de coagulação (s).

A eficiência do coagulante foi mensurada através da razão entre a atividade de coagulação do leite pela atividade proteolítica total de PPN e foi expressa em UAC/mL).

4.8 Caracterização da atividade coagulante de PPN

4.8.1 Efeito de inibidores na atividade coagulante de PPN

Para a análise do efeito de inibidores na coagulação do leite, o PPN (0,6 mg/mL) foi submetido à incubação prévia com diferentes inibidores de peptidases por 30 min a 25 °C, na proporção de 1:1. Os inibidores utilizados foram os mesmos testados e apresentados no item 4.6.1. Em seguida, procedeu-se ao ensaio de determinação de coagulação das proteínas do leite, tal como descrito. O efeito dos inibidores foi expresso em percentagem de unidade de atividade coagulante de leite residual em relação à atividade na ausência de inibidores.

4.8.2 Efeito da temperatura na atividade coagulante de PPN

Para avaliar o efeito da temperatura na coagulação das proteínas do leite, o PPN (0,3 mg/mL) foi incubado nas temperaturas de 20, 30, 40, 50 e 60 °C. Em seguida, prosseguiu-se com a determinação da coagulação de proteínas do leite, tal como descrito (ver item 4.7).

O efeito da temperatura foi expresso em percentagem de unidade de atividade coagulante de leite residual em relação à atividade da enzima não incubada.

4.8.3 Efeito do CaCl₂ na atividade coagulante de PPN

Para avaliar o efeito do CaCl₂ na coagulação das proteínas do leite, o leite foi preparado com diferentes concentrações deste sal, a saber: 20, 40, 60, 80 e 100 mM. Em seguida, prosseguiu-se com a determinação da coagulação de proteínas do leite, tal como descrito (ver item 4.7) utilizando PPN (0,3 mg/mL).

O efeito do CaCl₂ foi expresso em percentagem de unidade de atividade coagulante de leite residual em relação à atividade da enzima na presença da concentração de 10 mM de CaCl₂.

4.8.4 Efeito do NaCl na atividade coagulante de PPN

Para a análise do efeito do NaCl na coagulação das proteínas do leite, o leite foi preparado com diferentes concentrações deste sal, a saber: 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 M. Em seguida, prosseguiu-se com a determinação da coagulação de proteínas do leite, segundo o item 4.7 utilizando PPN (0,3 mg/mL).

O efeito do NaCl foi expresso em percentagem de unidade de atividade coagulante de leite residual em relação à atividade da enzima na ausência do sal.

4.9 Padrão de hidrólise da caseína utilizando PPN em comparação com o coalho comercial

Para a análise do perfil da hidrólise da caseína por PPN, foi adotado o método descrito por Egito *et al.* (2007). Para isso, caseína e κ -caseína foram solubilizadas em solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,0 a uma concentração de 10 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente. Para a reação de hidrólise foram misturados à solução de caseína e κ -caseína, o PPN, variando sua concentração final no meio reacional (2,4 μ g/mL – 2,18 UAP/mg/min e 6 μ g/mL – 5,47 UAP/mg/min) e o coalho comercial Coalhopar (1 mg/mL), composto enzimático à base de quimosina e pepsina bovina. Em seguida, o meio reacional foi encubado a 37 °C e alíquotas foram retiradas no momento em que os coalhos foram adicionados (tempo zero) e em intervalos de 5 min em um tempo total de 30 min. Para a análise eletroforética em géis de 15% de poliacrilamida, 300 μ L de solução tampão Tris-HCl pH 6,8, contendo 0,1% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol foram adicionados à 100 μ L de cada solução de hidrolisado e aquecidos a 100 °C por 3 min imediatamente após a retirada de cada alíquota, deste volume, 5 μ L foram aplicados em cada poço. Os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie R-250 0,025%, dissolvido em metanol (40%), ácido acético (10%) e água destilada até o aparecimento das bandas e descorados em solução de metanol 30% e ácido acético 10%. Para avaliar a intensidade das banda proteicas, realizou-se análise por densitometria através do software GelAnalyzer 2010.

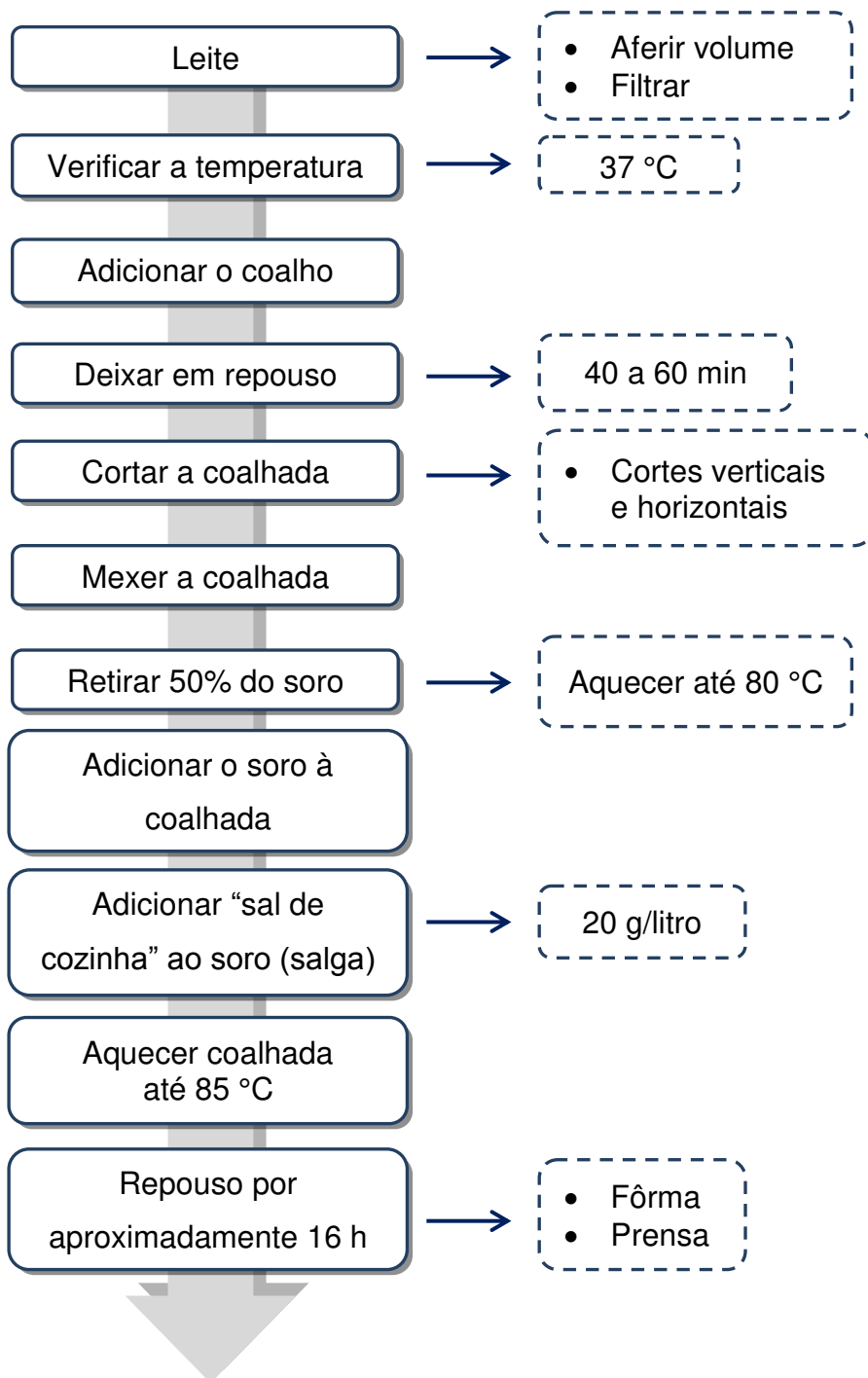
4.10 Produção de queijo coalho artesanal

Para a produção do queijo os experimentos foram conduzidos seguindo a cartilha “Queijo de Coalho” publicada pela Embrapa (ARAÚJO *et al.*, 2012) conforme fluxograma descrito na Figura 9, com algumas modificações. Os queijos foram produzidos a partir de 500 mL de leite integral pasteurizado do tipo C (Maranguape). O leite primeiramente foi aquecido até atingir a temperatura de 37 °C, sendo acrescido de 50 mM de CaCl₂. Em seguida, PPN (10 mg de proteína) e coalho comercial Coalhopar (recomendações do fabricante: 30 mg/500 mL) foram solubilizados em um volume de 3 mL de água destilada. Após a adição do cloreto de cálcio (50 mM) e homogeneização dos coagulantes, o leite permaneceu em repouso durante cerca de 40 min, até o ponto de corte da coalhada, sendo realizados cortes verticais e horizontais originando pequenos cubos. Em seguida, cerca de 50% do soro foi retirado, acrescido de 10 g de “sal de cozinha” e devolvido para a coalhada, que posteriormente foi aquecida até atingir a temperatura de 80 °C para cozimento da massa. A coalhada foi filtrada em tecido de trama fina (dessador), para a retirada do soro, e a massa foi prensada em fôrma plástica, permanecendo nessa forma por aproximadamente 16 horas. Parâmetros como rendimento, textura, umidade, massa fresca e seca dos queijos foram avaliados.

4.11 Análise Estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média ± desvio padrão da média e foram analisados utilizando o software GraphPad Prism v.5.03 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Para comparação de médias foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e testes de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerados como significativos os resultados que apresentaram $P < 0,05$.

Figura 10 – Esquema geral de fabricação artesanal de queijo coalho.



Fonte: Adaptado de ARAÚJO *et al.* (2012)

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção da polpa dos frutos de noni e determinação do teor de proteínas totais

Após o processo de liofilização a polpa apresentou um rendimento de 10%. Através do método micro Kjeldahl, foi verificado que a polpa dos frutos de noni apresenta um teor de 5,2 g de proteínas por 100 g ($\pm 0,4$).de polpa seca.

5.2 Extração de proteínas da polpa do noni e análise do perfil eletroforético

A figura 10 mostra a concentração de proteínas e atividade proteolítica dos extratos da polpa de noni obtidos em diferentes tampões na proporção 1:5 (m:v). Observa-se que no tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, obteve-se a maior atividade proteolítica, quando comparado às demais condições utilizadas. Os extratos obtidos em Tris-HCl, pH 9,0 apresentaram o menor teor de proteínas e atividade proteolítica, quando comparado aos demais tampões ($0,27 \text{ mg/g} \pm 0,02 - 11,31 \text{ UAP/mg/min} \pm 4,71$). Em função do melhor rendimento obtido na extração de peptidases com tampão fosfato pH 7,0, essa condição foi escolhida para dar prosseguimento às demais etapas do trabalho.

Tendo definido o tampão para extração de proteínas, resolveu-se otimizar esse processo, variando-se a proporção (m:v) de polpa para tampão (1:3 e 1:5) e adicionando-se uma etapa de re-extração. Os resultados dessa etapa encontram-se sumarizados na Tabela 7. A proporção de 1:3 (m:v) apresentou o menor rendimento de proteínas totais ($1,669 \text{ mg/g} \pm 0,009$). Todavia, após a re-extração ($1,870 \text{ mg/g} \pm 0,050$), não diferiu significativamente ($p < 0,05$) do resultado obtido quando se utilizou a proporção 1:5 ($1,940 \text{ mg/g} \pm 0,030$), sem re-extração. O maior rendimento foi alcançado quando a proporção de 1:5 com re-extração foi utilizada ($2,070 \text{ mg/g} \pm 0,002$). Desse modo a condição de extração adotada foi em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 com adição de 50 mM de NaCl, na proporção de 1:5 com reextração. A figura 11 exhibe o perfil eletroforético de PPN obtido na condição de extração adotada, onde é possível visualizar apenas três regiões de proteínas mais abundantes, com massas moleculares aparentes de 53, 21, 16 e 15 kDa.

Quanto à atividade proteolítica, PPN apresentou uma atividade específica de aproximadamente $911,85 \text{ UAP/mg/min} (\pm 36,34)$ e um rendimento de $1718,69 (\pm 41,99)$ unidade de atividade proteolítica por grama de polpa fresca. O padrão de bandas com atividade proteolítica (apresentadas em claro) pode ser observado na Figura 12A, mostrando a

existência de uma grande variedade dessas enzimas. A Figura 12B mostra o zimograma onde as peptidases não passaram pela etapa de renaturação, demonstrando assim, que as mesmas não são totalmente desnaturadas quando em presença de SDS.

Figura 11 – Concentrações de proteínas totais solúveis e atividade proteolítica de extratos da polpa de noni (*Morinda citrifolia* L.) obtidos em diferentes tampões. As barras indicam desvio padrão feita em triplicata. Letras iguais indicam valores que não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

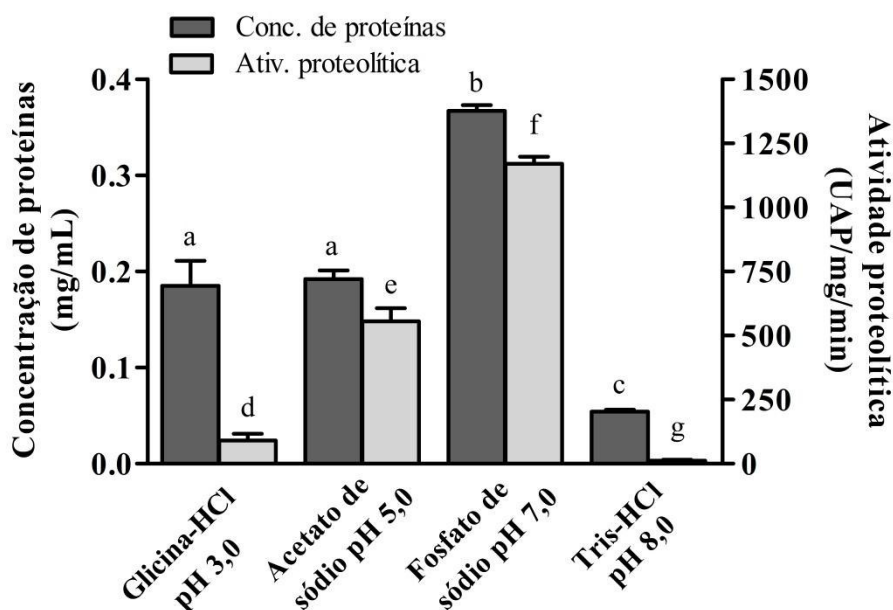


Tabela 6 – Concentração e rendimento de PPN após a adição de uma etapa de re-extração.

Proporção	Proteína total (mg/mL)	Rendimento (mg/g)*
1:3	0,506 ± 0,050 ^a	1,669 ± 0,009 ^a
1:3 (Com re-extração)	0,638 ± 0,050 ^b	1,870 ± 0,050 ^b
1:5	0,367 ± 0,006 ^{c, d}	1,940 ± 0,030 ^b
1:5 (Com re-extração)	0,451 ± 0,005 ^{a, d}	2,070 ± 0,002 ^c

Média ± desvio padrão de três análises, cada uma em triplicata.

Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

* Massa de proteínas solúveis (mg) por grama de polpa de fruto fresco.

Figura 12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sob condições desnaturantes de PPN. Raia 1: Marcadores de massa molecular (fosforilase B – 97,0 kDa; albumina sérica bovina – 66,0 kDa; ovoalbumina – 45,0; anidrase carbônica bovina – 29,0; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz – 20,1 e α -lactalbumina – 14,4 kDa. Raia 2: PPN obtido com a extração em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 com adição de 50 mM de NaCl, na proporção de 1:5 com re-extração (75 μ g).

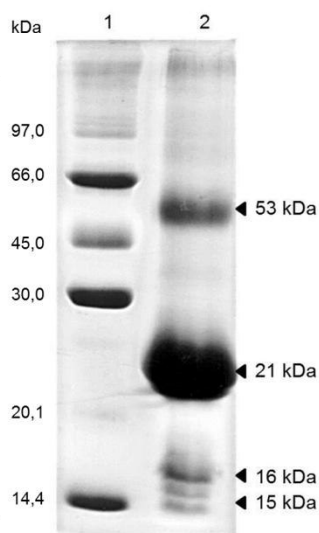
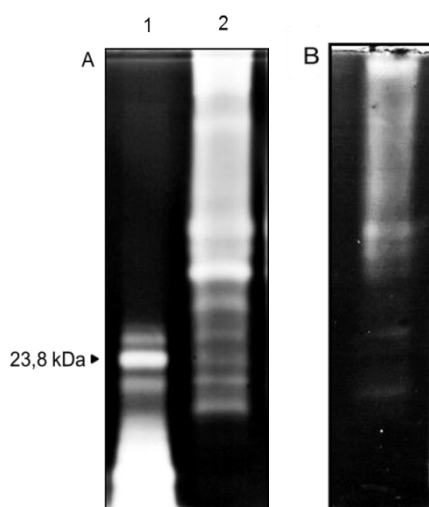


Figura 13 – Zimograma em gel de poliacrilamida (10%) acrescido de gelatina 0,2% de PPN. (A) Gel após incubação em solução de Triton X-100 para retirada de SDS e renaturação de proteínas. Raia 1: Tripsina (controle) - 3 μ g. Raia 2: PPN (10 μ g). (B) Gel não incubado em Triton X-100.



5.3 Caracterização da atividade proteolítica de PPN

5.3.1 Efeito de inibidores

De acordo com a figura 13 as PPN não foram inibidas significativamente na presença de EDTA (94,23% de atividade proteolítica residual) ou PMSF (100% de atividade residual), enquanto que na presença de pepstatina A houve uma inibição de 8,65% da atividade proteolítica total. As PPN tiveram sua atividade proteolítica inibida significativamente ($p < 0,05$) e em 97,87% e 98%, quando incubadas com iodoacetamida (0,1 mM) e E-64 (0,18 mM), respectivamente. Isto indica que as peptidases presentes no extrato da polpa de noni, pertencem, em sua grande maioria, à classe de peptidases cisteínicas.

5.3.2 Determinação do pH e da temperatura ótimos de atividade proteolítica

Para a determinação do pH ótimo, foram utilizados os substratos: azocaseína (substrato inespecífico) e BANA (substrato específico para cisteíno-peptidases). A maior taxa de hidrólise foi alcançada quando a reação se deu em pH 6,0 (885,92 UAP/mg/min \pm 21,64), não apresentando diferença significativa em pH 7,0 (911,85 UAP/mg/min \pm 36,34), quando azocaseína foi utilizada (Figura 14A). Entretanto, ao se utilizar BANA como substrato da reação, a atividade específica em pH 6,0 (265,01 UAP/mg/min \pm 6,75) apresentou valores cerca de cinco vezes maior em relação ao pH 7,0, (56,55 UAP/mg/min \pm 6,75) (Figura 14B), determinando assim, o pH 6,0 como o ótimo para que a atividade proteolítica ocorra. Sob condições de pH mais ácido ou básico, as PPN apresentaram baixa atividade proteolítica.

Para a determinação da temperatura ótima de catálise das PPN, foi utilizado azocaseína como substrato de reação. Na Figura 5 é possível observar que as peptidases exibiram baixa atividade catalítica, 154,76 (\pm 4,28), 257,93 (\pm 43,74), 215,60 (\pm 12,15) e 94,57 (\pm 6,54) UAP/mg/min quando a reação ocorreu nas temperaturas de 20, 30, 70 e 80 °C, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre si ao nível de $p < 0,05$. Diferentemente, nas temperaturas de 40 e 60 °C foram obtidas atividades específicas de 667,98 (\pm 62,20) e 646,16 (\pm 21,51) UAP/mg/min, respectivamente. Contudo, PPN atingiram um máximo de atividade na temperatura de 50 °C (1240,08 \pm 56,77 UAP/mg/min).

Figura 14 – Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica de PPN. As amostras do PPN (0,03 mg/mL e encerrando 1617,9 UAP) foram incubadas em inibidores das diferentes classes de peptidases, por 30 minutos antes dos ensaios de determinação da atividade proteolítica, conduzidos em pH 6,0 a 37 °C, utilizando azocaseína como substrato. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ em relação às peptidases na ausência de inibidores (ctrl) pelo teste de Tukey.

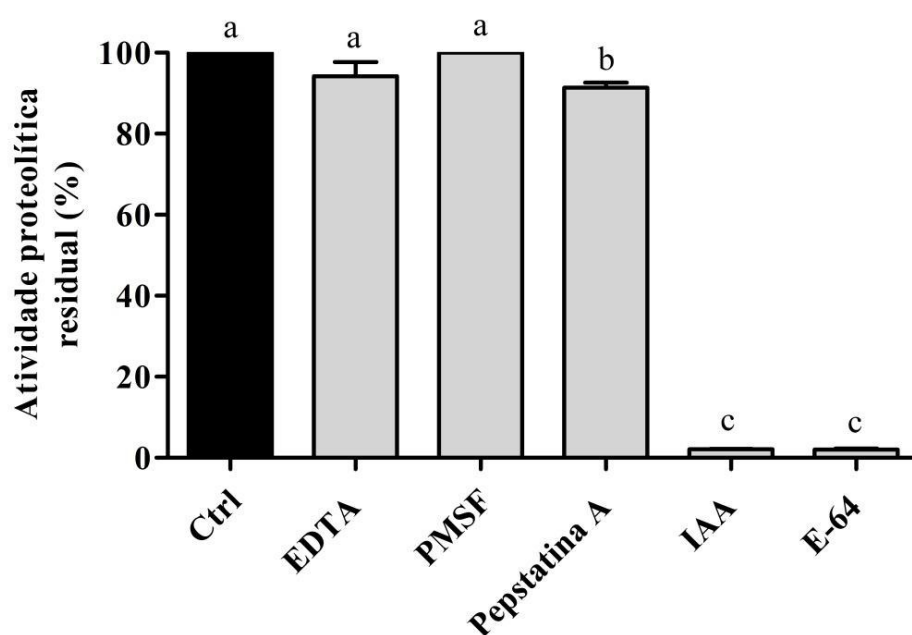


Figura 15 – Determinação do pH ótimo da atividade proteolítica de PPN utilizando azocaseína (A) e BANA (B) como substrato da reação. Os substratos foram solubilizados nos tampões, glicina pH 3,0 e 9,0, acetato de sódio pH 4,0 e 5,0, fosfato de sódio pH 6,0 e 7,0, tris-HCl pH 8,0, todos na concentração de 50 mM, com exceção dos tampões glicina pH 3,0 e acetato de sódio pH 4,0 para azocaseína, em virtude de sua insolubilidade nessas condições. Os ensaios de atividade proteolítica foram conduzidos a 37 °C. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam valores que não apresentaram diferença estatística ao nível de $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

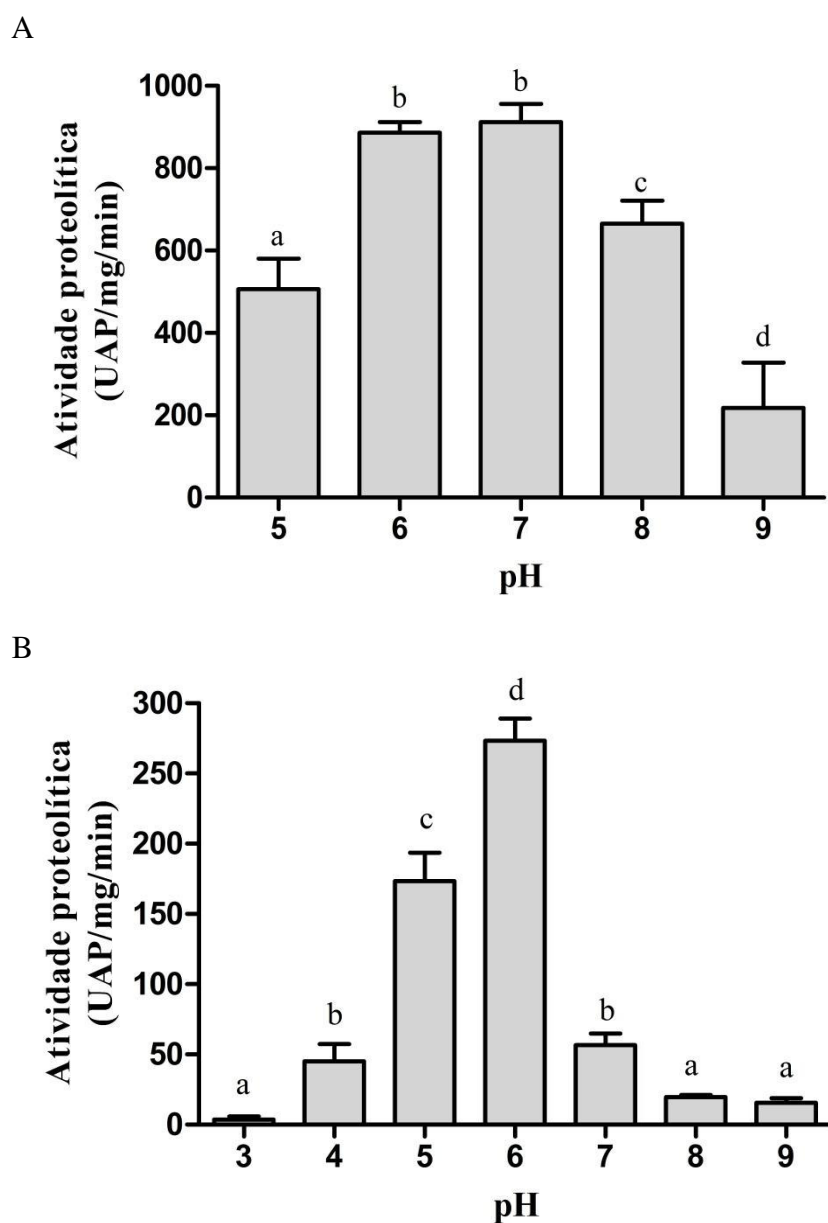
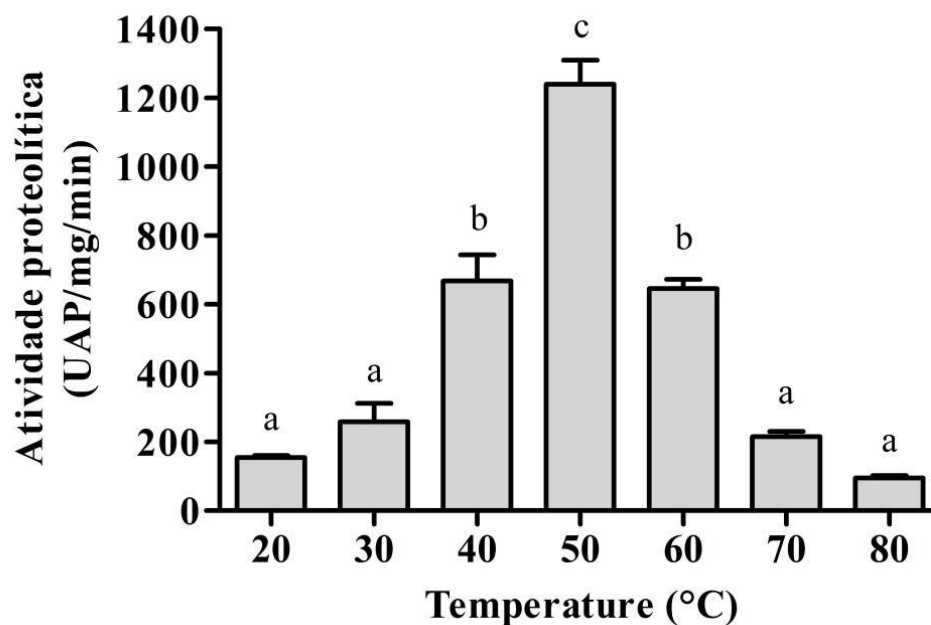


Figura 16 – Determinação da temperatura ótima da atividade proteolítica de PPN. O ensaio de atividade proteolítica foi realizado em diferentes temperaturas, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C, utilizando-se azocaseína, pH 6,0, como substrato. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Símbolos iguais indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.



5.3.4 Estabilidade da atividade proteolítica em função do pH e temperatura

Quando incubadas durante 30 min em todos as condições de pH testadas, as peptidases da polpa de noni apresentaram reduções em suas atividades catalíticas (Figura 16). A maior redução ocorreu em pHs mais básicos, 89,96% de redução da atividade proteolítica total em pH 8,0 e 91,56% em pH 9,0. Em pH neutro (7,0), a atividade proteolítica foi reduzida em 59,3% após incubação por 30 minutos. Diferentemente do observado em valores de pH mais alcalinos, em pHs mais ácidos houve menor redução na atividade proteolítica total. Nos pHs 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 as atividades foram reduzidas significativamente em 34,93% , 23,29%, 17,80% e 18,34%, respectivamente, após 30 minutos de incubação nessas condições.

Nos testes de estabilidade em diferentes temperaturas observou-se que as peptidases do extrato da polpa de noni sofreu uma redução significativa (80,21%) em sua atividade proteolítica já na temperatura de 20 °C. Tais perdas de efeito foram equivalentes para as temperaturas de 30 e 40°C, sendo ainda mais pronunciadas na temperatura de 50 °C. A partir da temperatura de 60 °C houve perda total da atividade proteolítica residual (Figura 17).

Figura 17 – Estabilidade da atividade proteolítica de PPN em função do pH. As amostras do PPN (0,03 mg/mL e encerrando 1617,9 UAP) foram incubadas nos tampões, glicina pH 3,0 e 9,0, acetato de sódio pH 4,0 e 5,0, fosfato de sódio pH 6,0 e 7,0, tris-HCl pH 8,0, todos na concentração de 50 mM, por 30 minutos antes dos ensaios de determinação da atividade proteolítica, conduzidos em pH 6,0 a 37 °C utilizando azocaseína como substrato. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ em relação às peptidases não incubadas (ctrl) pelo teste de Tukey.

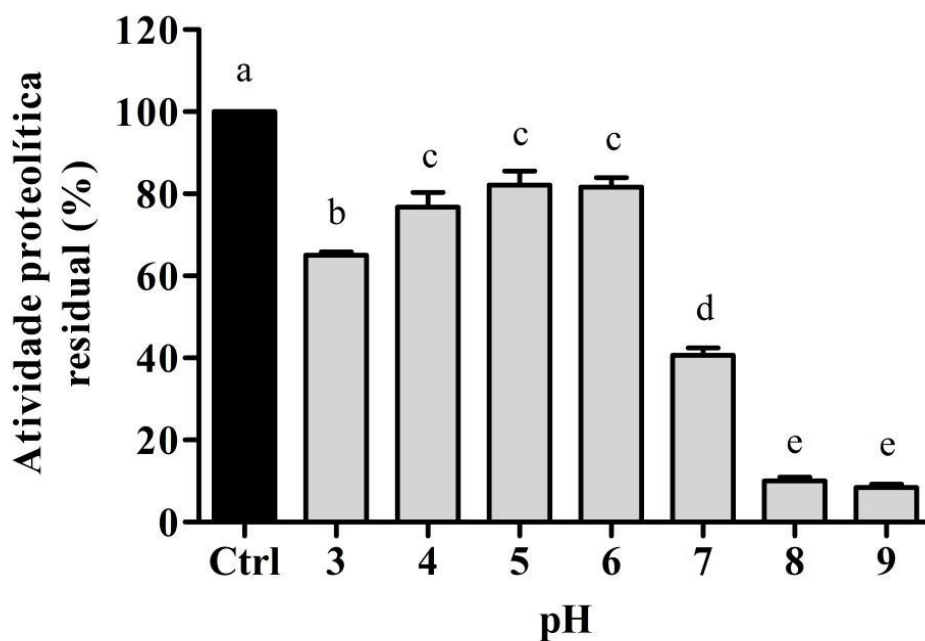
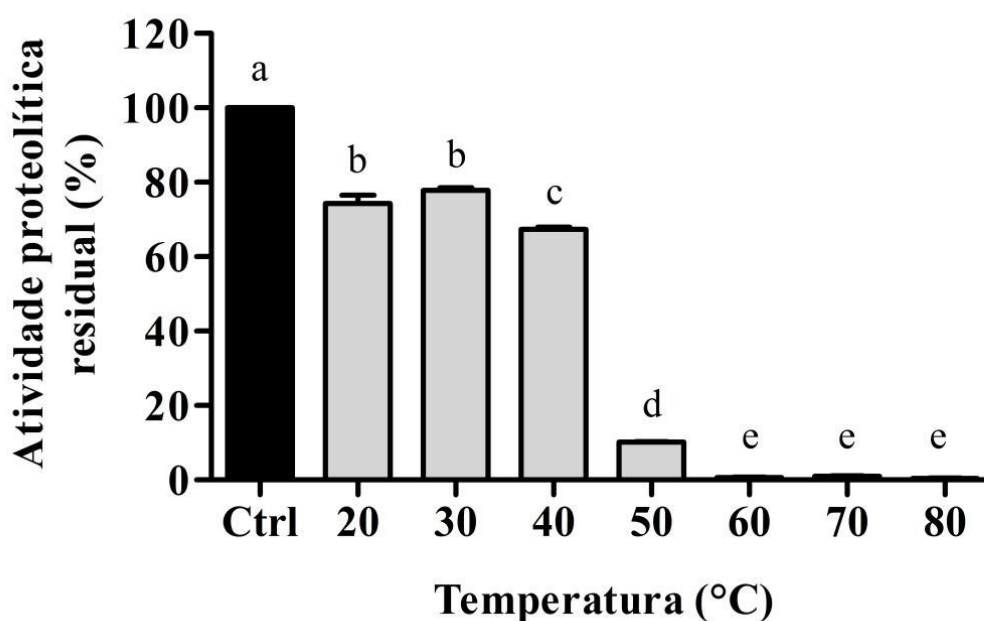


Figura 18 – Estabilidade da atividade proteolítica de PPN em função da temperatura. As amostras do PPN (0,03 mg/mL e encerrando 1617,9 UAP) foram incubadas nas diferentes temperaturas, por 30 minutos antes dos ensaios de determinação da atividade proteolítica, conduzidos em pH 6,0 a 37 °C utilizando azocaseína como substrato. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ em relação às peptidases não incubadas (ctrl) pelo teste de Tukey.



5.3.5 Atividade proteolítica na presença de cátions divalentes

A atividade proteolítica de PPN não sofreu alterações quando em presença dos cátions de ferro II e magnésio, nas duas concentrações testadas (0,5 e 5 mM). Para o manganês e zinco foram observadas alterações significativas nas duas concentrações testadas. Em 0,5 mM de Mn^{2+} a atividade proteolítica residual foi reduzida em 27,51% e em 5 mM, em 49,27%. Para o Zn^{2+} as reduções foram de 34,41% e 85,72% para as concentrações de 0,5 e 5 mM, respectivamente. Para a incubação com os cátions cobalto e cobre foram observadas reduções significativas apenas na concentração de 5 mM, a qual promoveu uma perda de 56,27% (para a incubação com Co) e 68,52% (para a incubação com Cu) na atividade proteolítica total (Figura 18).

Para os experimentos com $CaCl_2$ não foram observados efeitos de redução da atividade proteolítica total para todas as concentrações testadas. Na verdade, para a concentração de 100 mM de $CaCl_2$ foi observado um aumento significativo de 39,48% na atividade proteolítica total em relação ao controle experimental (Figura 19).

Figura 19 – Efeito de cátions divalentes sobre a atividade proteolítica de PPN. As amostras de PPN (0,06 mgP/mL e encerrando 3235,8 UAP) foram incubadas com os cátions divalentes nas concentrações de 0,5 mM e 5 mM, antes dos ensaios de determinação da atividade proteolítica, conduzidos em pH 6,0 a 37 °C utilizando azocaseína como substrato. Barras indicam a média \pm desvio padrão da média da atividade proteolítica residual (%) determinada em triplicata. Letras iguais indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ em relação às peptidases na ausência de cátions (ctrl) pelo teste de Tukey.

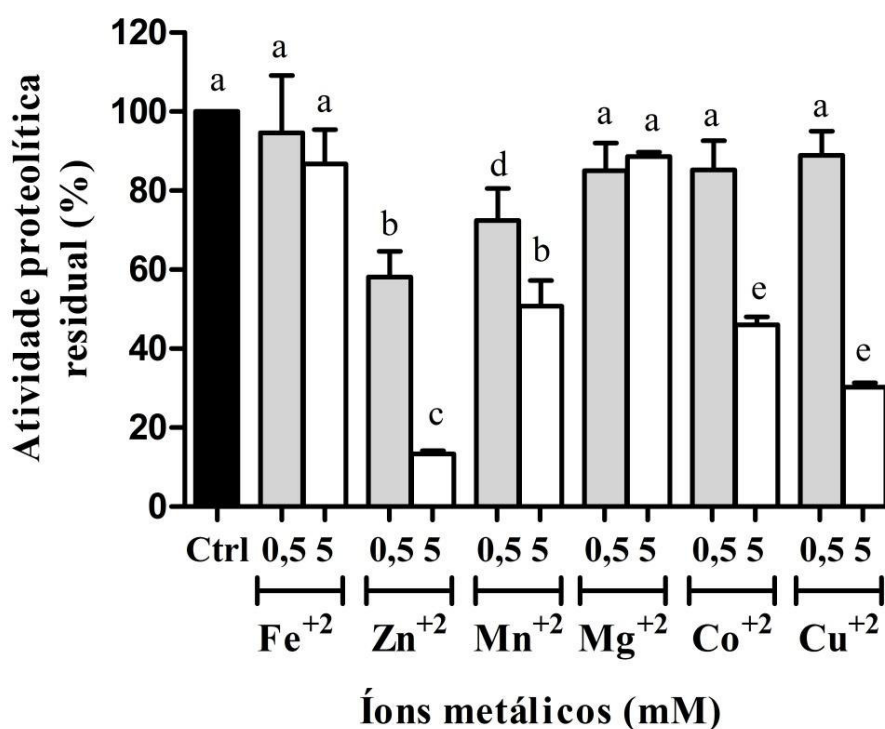
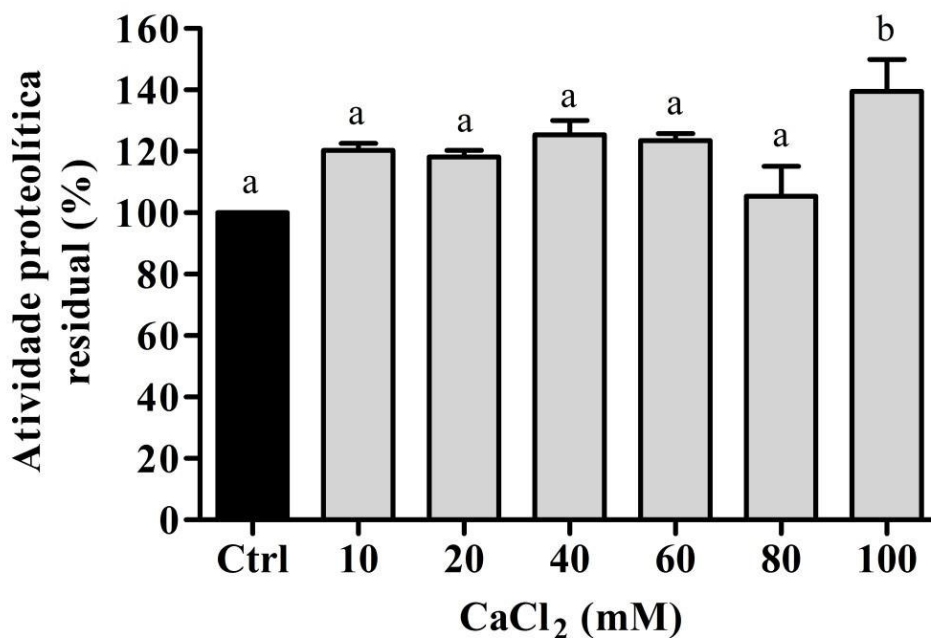


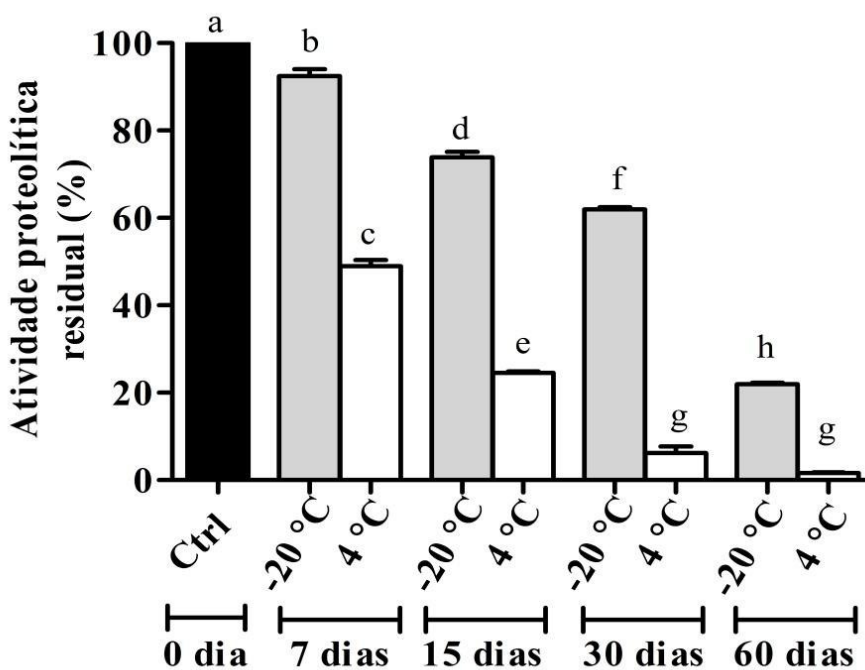
Figura 20 – Efeito do CaCl_2 sobre a atividade proteolítica de PPN. As amostras de PPN (0,06 mgP/mL e encerrando 3235,8 UAP) foram incubadas em soluções de CaCl_2 nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mM, antes dos ensaios de determinação da atividade proteolítica, conduzidos em pH 6,0 a 37 °C utilizando azocaseína como substrato. Barras indicam a média \pm desvio padrão da média da atividade proteolítica residual (%) determinada em triplicata. Asteriscos (*) indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ em relação às peptidases na ausência de cátions (controle) pelo teste de Tukey.



5.3.6 Estabilidade de PPN em função do armazenamento

As PPN foram armazenadas em solução aquosa sem adição de sais ou ativadores nas temperaturas de -20 °C e 4 °C durante o tempo máximo de 60 dias. Mesmo após 7 dias na temperatura de 4 °C, as PPN já apresentaram uma redução de 51% em sua atividade proteolítica em comparação ao tempo zero. As perdas de atividade proteolítica foram graduais e significativas ao longo do tempo. As reduções ocorridas a 4 °C foram de 51%, 75,45%, 93,82% e 95,82% para os tempos de 7, 15, 30 e 60 dias, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os dois últimos tempos, já que em 30 dias as PPN perdem quase totalmente sua atividade, quando armazenadas em solução na temperatura de 4 °C. Enquanto que na temperatura de -20 °C as PPN foram capazes de conservar sua atividade proteolítica por mais tempo. As perdas nessa temperatura foram 7,57%, 26,1%, 38,03% e 60,05%, nos tempos de 7, 15, 30 e 60 dias, respectivamente (Figura 21).

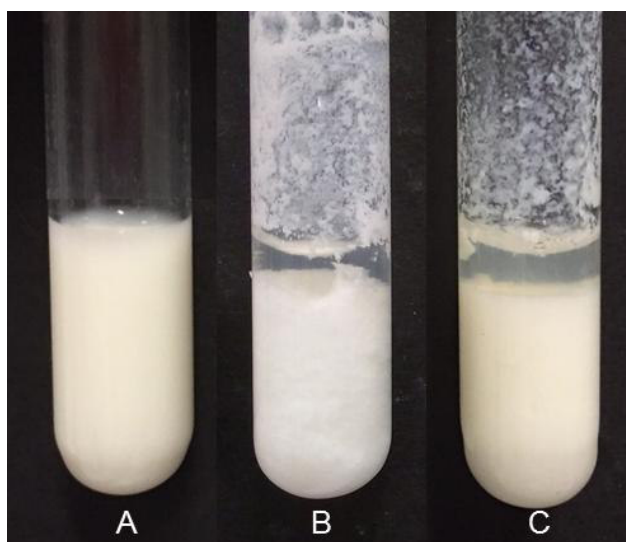
Figura 21 – Estabilidade de PPN em função do armazenamento nas temperaturas de -20 e 4 °C nos tempos de 7 – 60 dias. As amostras do PPN (0,03 mg/mL e encerrando 1617,9 UAP) foram armazenadas em solução aquosa, não protegidas da luz. Após cada intervalo de tempo foram realizados os ensaios de determinação da atividade proteolítica, conduzidos em pH 6,0 a 37 °C utilizando azocaseína como substrato. Barras indicam a média \pm desvio padrão da média da atividade proteolítica residual (%) determinada em triplicata. Letras iguais indicam valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ pelo teste de Tukey. N.I.: não armazenada.



5.4 Determinação da atividade coagulante de PPN

A coagulação do leite (2mL) foi realizada mediante a adição de 0,024 mg de PPN (1294,39 UAP) e a formação das primeiras partículas visíveis iniciou em 5,73 minutos ($\pm 0,05$). PPN apresentou atividade coagulante de 174,5 UAC/mL e atividade coagulante específica de $269,6 \times 10^{-3}$ UAC/mg. A Figura 22 mostra os coágulos resultantes da hidrólise realizada pelo coalho comercial (B) e por PPN (C). Os sobrenadantes visíveis nos tubos tratase do soro resultante da coagulação.

Figura 22 – Coagulação de leite desnatado 10% (Molico®) por PPN ao final de 40 min. Amostras de PPN (80 μ L - 0,3 mg/mL), solubilizadas em água, foram utilizadas na coagulação de 2 mL de leite. (A) Controle (água). (B) Coalho comercial - Coalhopar (0,12 mg). (C) PPN (1294,39 UAP).



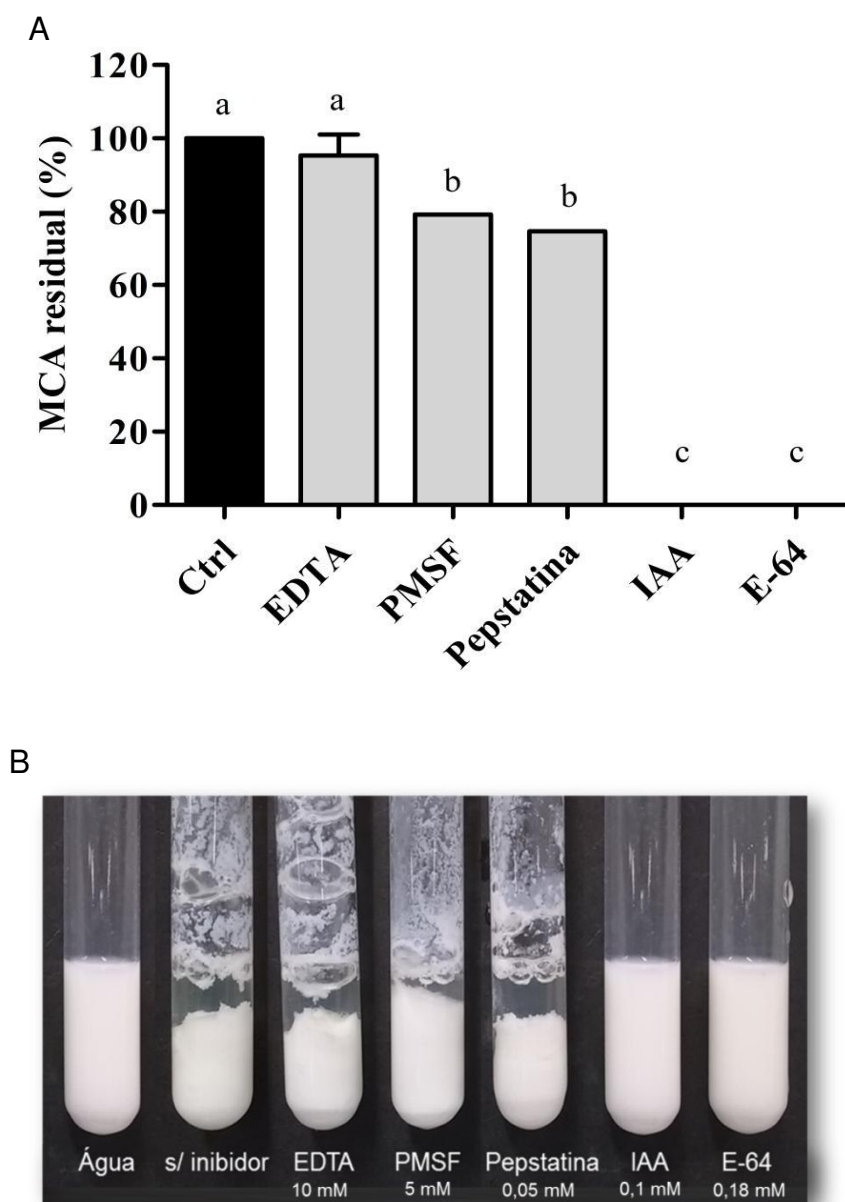
5.5 Caracterização da atividade coagulante de PPN

5.5.1 Efeito de inibidores na atividade coagulante de PPN

Tal como observado nos resultados anteriores de inibição da atividade proteolítica com E-64 e IAA, as peptidases presentes na polpa do noni não apresentaram atividade coagulante do leite na presença desses compostos (Figura 23). Por outro lado, decréscimos significativos de 20,74 e 25,35% em UAC foram observados após incubação das peptidases da polpa do noni com PMSF (5 mM) e pepstatina A (0,05 mM), respectivamente.

Quando incubados em EDTA, não houve diferença significativa em relação às PPN na ausência de inibidores.

Figura 23 – Efeito de diferentes inibidores de peptidases sobre a atividade de coagulante de PPN. As amostras do PPN (0,3 mg/mL e encerrando 1294,39 UAP) foram incubadas em inibidores das diferentes classes de peptidases, por 30 minutos antes dos ensaios de determinação da atividade coagulante, conduzidos em pH 6,0 a 37 °C, utilizando leite desnatado 10% como substrato. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ em relação às peptidases na ausência de inibidores pelo teste de Tukey.



5.5.2 Estabilidade de PPN em função da temperatura na coagulação do leite

PPN quando incubadas a 20 °C não apresentaram diferença significativa em relação às proteínas não incubadas (ressuspensas instantes antes do ensaio de atividade proteolítica). Todos os ensaios de atividade proteolítica foram realizados na temperatura de 37 °C. Já na temperatura de 30 °C houve uma redução de 16,48% em sua atividade coagulante, não havendo diferença significativa em relação à temperatura de 40 °C, onde o decréscimo foi de 18%. PPN foram completamente desnaturadas quando aquecida a 50 °C, não havendo desta forma, coagulação do leite (Figura 24).

5.5.3 Efeito do NaCl na atividade coagulante de PPN

A presença de NaCl resultou em perdas de atividade de coagulação, no entanto, as reduções foram: 11,84; 11,72; 21,88; 16,8; 19,65 e 23,58, na presença de 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5% de NaCl, respectivamente (Figura 25).

5.5.4 Efeito do CaCl₂ na atividade coagulante de PPN

A coagulação do leite em presença de 10 mM de CaCl₂ foi utilizada como controle, visto que a coagulação não ocorre na ausência deste sal. Quando essa concentração foi alterada para 20 e 40 mM, não houve variações significativas em relação ao controle (na presença de 10 mM de CaCl₂). Embora seja possível observar uma redução nos valores de UAC na coagulação do leite em presença de maiores concentrações de CaCl₂, 60 a 100 mM, esse decréscimo teve uma média de apenas 16,66%, não havendo diferença significativas entre as três concentrações (Figura 26).

Figura 24 - Estabilidade da atividade coagulante de PPN em função da temperatura. As amostras do PPN (0,3 mg/mL e encerrando 1294,39 UAP) foram incubadas em diferentes temperaturas, 20, 30, 40 e 50 °C, por 30 minutos antes dos ensaios de atividade coagulante, conduzidos em pH 6,5 a 37 °C utilizando leite desnatado 10%. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata. Letras iguais indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ em relação às peptidases não incubadas pelo teste de Tukey. N.I.: não incubadas.

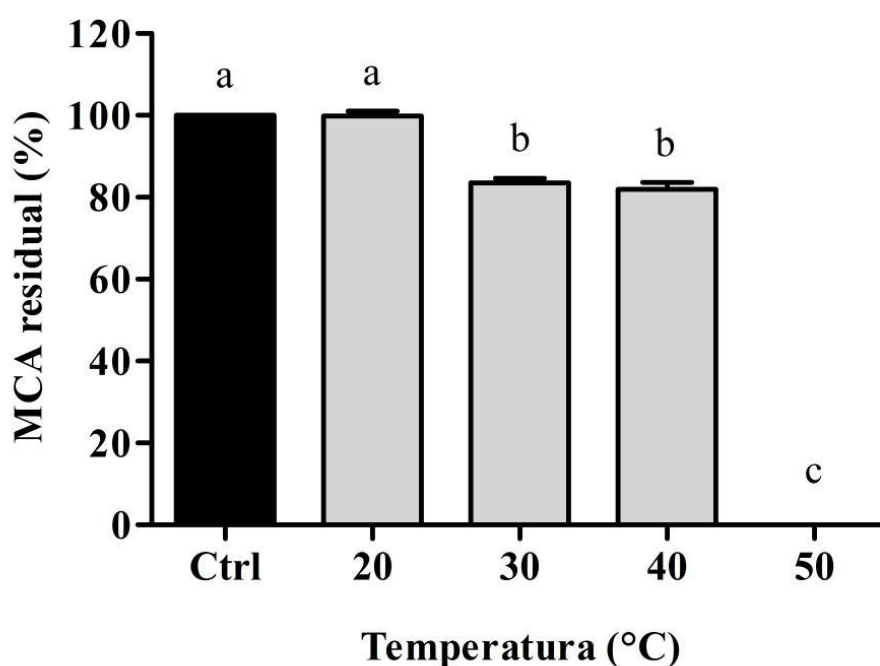


Figura 25 – Efeito do NaCl sobre a atividade coagulante de PPN. As amostras de PPN (0,3 mgP/mL e encerrando 3235,8 UAP) foram incubadas em soluções de NaCl nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 mM, antes dos ensaios de determinação da atividade coagulante, conduzidos em pH 6,0 a 37 °C utilizando leite desnatado 10% como substrato. Barras indicam a média \pm desvio padrão da média da atividade proteolítica residual (%) determinada em triplicata. Letras iguais indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

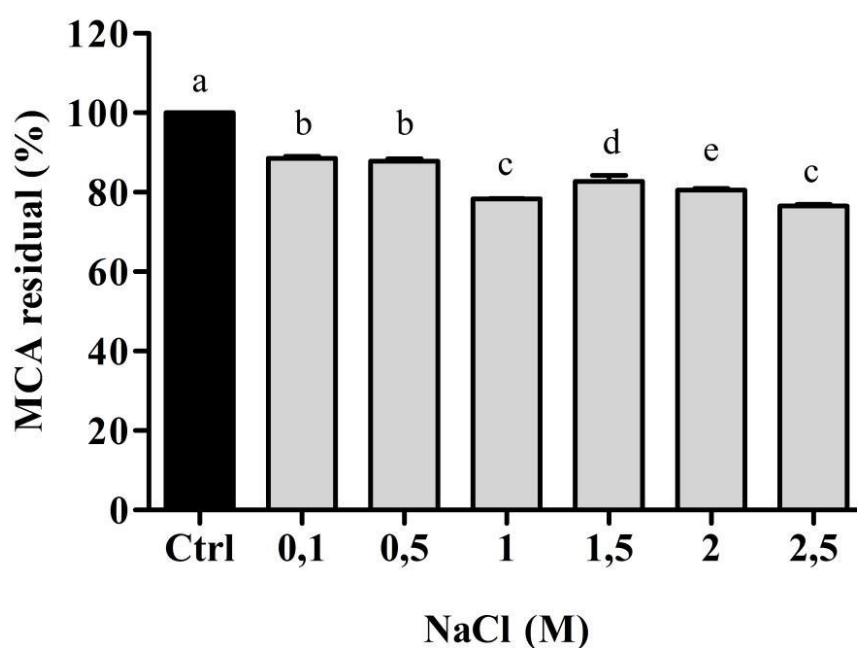
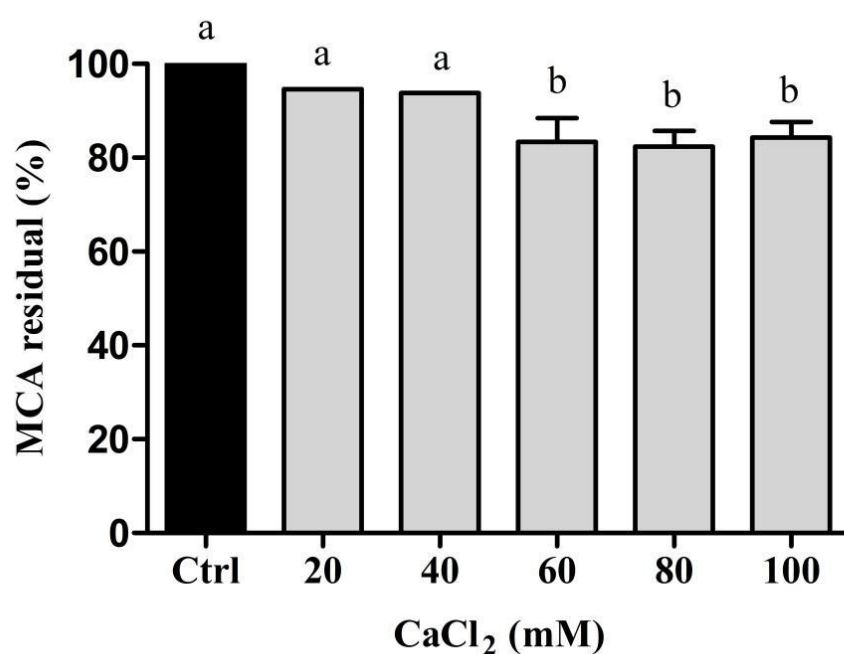


Figura 26 – Efeito do CaCl_2 sobre a atividade coagulante de PPN. As amostras de PPN (0,3 mgP/mL e encerrando 3235,8 UAP) foram incubadas em soluções de CaCl_2 nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mM, antes dos ensaios de determinação da atividade coagulante, conduzidos em pH 6,0 a 37 °C utilizando leite desnatado 10% como substrato. Barras indicam a média \pm desvio padrão da média da atividade proteolítica residual (%) determinada em triplicata. Letras iguais indicam os valores que não apresentaram diferença significativa ao nível de $p < 0,05$ em relação às peptidases na presença de 10 mM de CaCl_2 pelo teste de Tukey.



5.5.5 Padrão de hidrólise da caseína utilizando PPN em comparação com o coalho comercial

O perfil eletroforético da hidrólise das caseínas ao longo do tempo está exibido na Figura 27, onde é possível observar que PPN apresentam uma preferência sobre a β e κ -caseína, visto que a banda correspondente à α -caseína permanece visível por mais tempo. Na concentração de 6 μg de proteínas por mL de leite (Figura 27B), ou seja, cerca de 323,6 UAP, a hidrólise total de caseínas ocorre praticamente em 10 min de reação. A análise densitométrica confirma a diminuição das intensidades das bandas proteicas ao longo do tempo (α , β e κ).

PPN apresentaram uma hidrólise da κ -caseína semelhante aparentemente com a obtida utilizando-se o coalho comercial (Coalhopar), onde é possível observar a formação do peptídeo para- κ -caseína (Figura 28).

Figura 27 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) sob condições redutoras da hidrólise de caseína (CN) ao longo do tempo de reação. As raias indicam o tempo de reação em min. M: marcador. (A) PPN: 2,4 $\mu\text{g/mL}$ (2,18 UAP/mg/min). (B) PPN: 6 $\mu\text{g/mL}$ (5,47 UAP/mg/min). Abaixo análises de densitometria mostram a diminuição da intensidade das caseínas ao longo do tempo, indicando que as mesmas estão sofrendo degradação.

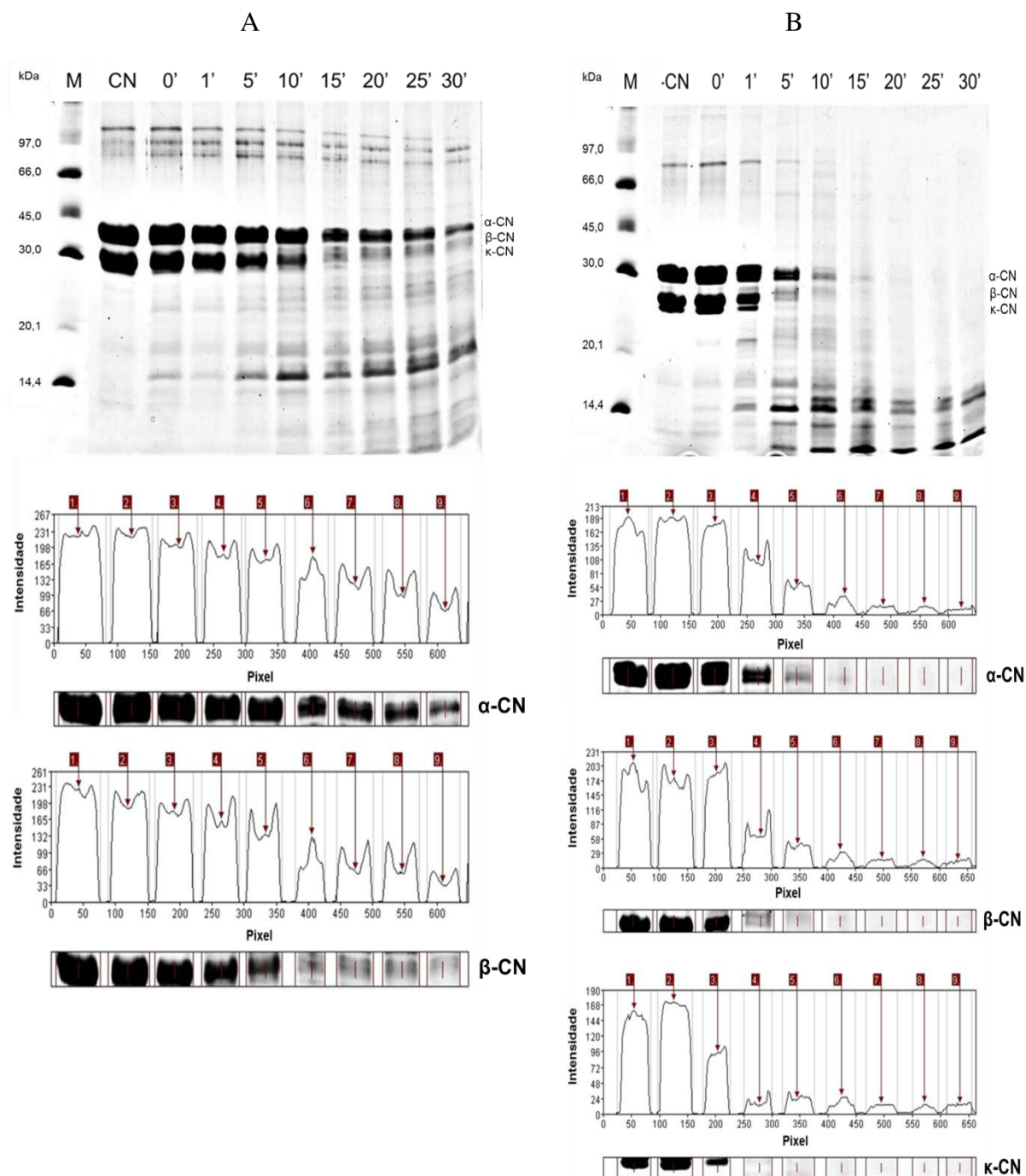
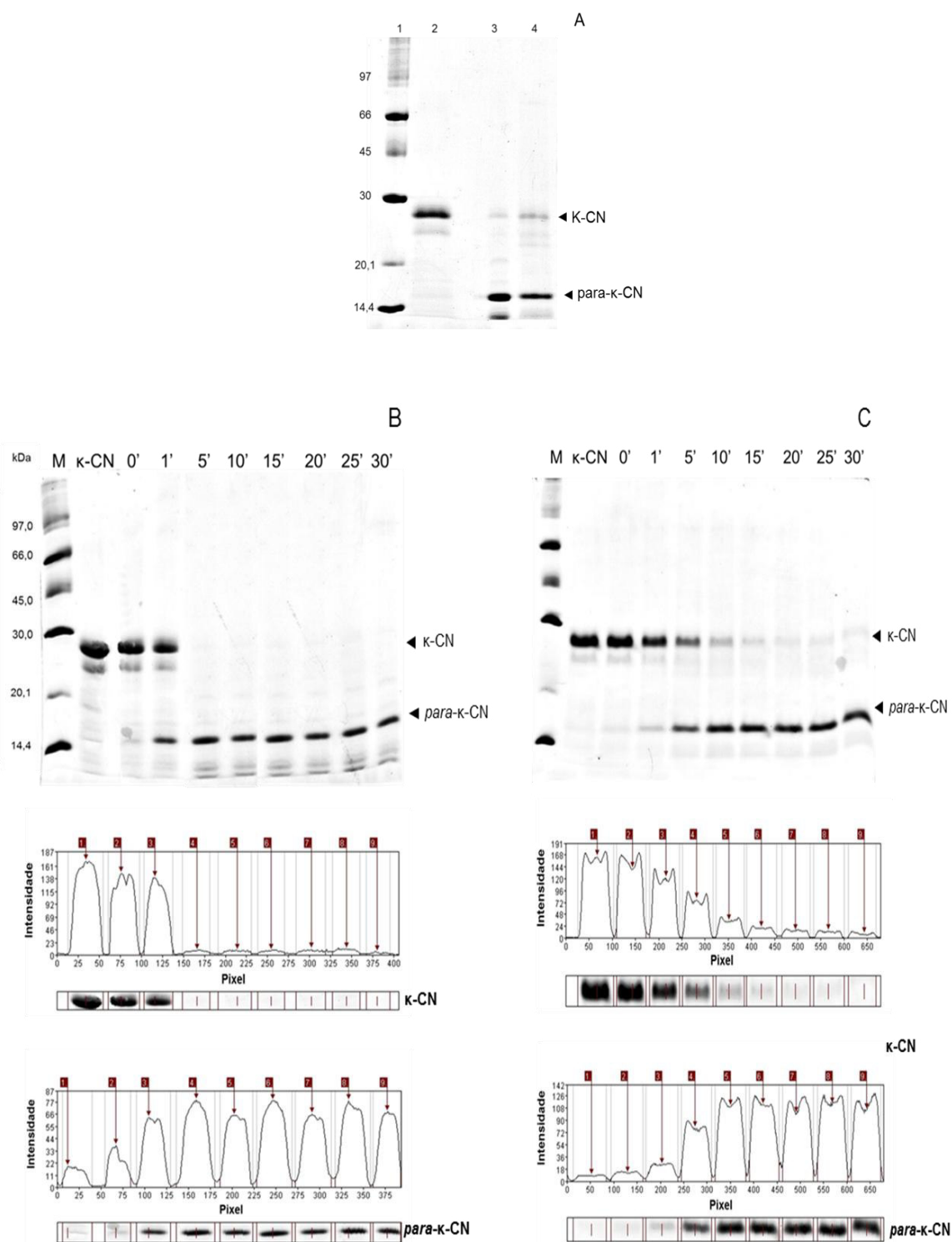


Figura 28 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) sob condições redutoras. (A) Hidrólise da κ -CN após 10 min. Raia 1: Marcadores de massa molecular. Raia 2: κ -CN. Raia 3: Hidrólise por Coalhopar. Raia 4: Hidrólise por PPN. (B e C) Hidrólise da κ -CN ao longo do tempo de reação e análise de densitometria. (B) Coalhopar – 0,1 mg/mL. (C) PPN – $1,2 \cdot 10^{-3}$ mg/mL (64,71 UAP).



5.6 Produção de queijo coalho artesanal

Os queijos produzidos com o coalho animal (Coalhopar) e coagulante vegetal (PPN) podem ser observados na Figura 28. Ambos apresentaram poucas diferenças em relação à massa fresca dos queijos, entretanto, diferiram quando ao tempo de coagulação (Tabela 8). Parâmetros como rendimento, textura, massa fresca e seca dos queijos foram avaliados. O queijo produzido com a utilização de PPN como coagulante apresentou textura macia, e apresentou maior taxa de umidade (Figura 29). e um rendimento de 79,02g de polpa fresca necessários para a manufatura de um quilo de queijo. Os queijos produzidos com os dois coagulantes apresentaram rendimentos semelhante levando-se em consideração a massa de queijo recuperada após a retirada do soro a partir de 500 mL de leite.

Figura 29 – Queijo do tipo coalho produzido com a utilização de coalho comercial – Coalhopar (A) e de PPN (B). Para a coagulação de 500 mL de leite foram utilizados 10 mg de PPN (9118,5 UAP) a 37 °C durante 36 min. Coalho comercial foi utilizado na concentração de 0,06 g/L).



Tabela 7 – Parâmetros de análise comparativas entre queijos produzidos com coalho animal e coagulante vegetal.

Parâmetros	Coalhopar	PPN
Tempo de coagulação (min)	3	8
Massa fresca (g)	57,49 ± 0,87	65,17 ± 0,84
Massa seca (g)	32,84 ± 5,46	25,86 ± 1,52
Umidade (%)	41,34 ± 7,01	60,27 ± 2,83
Rendimento (%)*	11,49 ± 0,17	12,98 ± 0,16

* Rendimento calculado a partir da massa de queijo recuperada a partir de um volume de 500 mL de leite.

6 DISCUSSÃO

As peptidases têm uma ampla variedade de aplicações na indústria de alimentos, como na fabricação de queijos, no processamento de bebidas e carnes, na hidrólise para produção de peptídeos bioativos, dentre outros. Comumente são extraídas de diversas fontes, sejam elas de origem animal, vegetal, microbiana ou produzidas através de recombinação genética.

A principal peptidase utilizada na fabricação de queijo é a quimosina, aspártico-peptidase de origem animal. Essa enzima possui alta especificidade sobre a κ -caseína e baixa atividade proteolítica total, sendo estas características desejáveis na escolha de qualquer outro coagulante (FOX; STEPANIAK, 1993). Visando a substituição deste tipo de coalho, bem como a diversificação dos produtos, várias pesquisas têm sido direcionadas para a busca de novas fontes de peptidases com potencial para coagulação do leite, que possam resultar em queijos com características diferenciadas, como o odor, o sabor e a textura. Nesse contexto, coagulantes de origem vegetal apresentam-se como uma alternativa viável, por possuir ampla especificidade quanto ao substrato, atividade em uma ampla faixa de pH, temperatura e pela presença de compostos orgânicos (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012).

Quase todas as peptidases utilizadas como coagulantes do leite pertencem à classe de aspártico-peptidases, mas outros grupos de enzimas, tais como cisteíno e serino-peptidases também já foram estudadas (TAMER; MAVITUNA, 1997). Alguns coagulantes vegetais são inadequados para a produção de queijos, pois conferem baixo rendimento e sabor amargo ao produto final, em decorrência de uma proteólise excessiva (LLORENTE *et al.*, 2014). Portanto, a busca de novas fontes em potencial de enzimas eficientes na coagulação do leite a partir de plantas está em processo contínuo, de forma a torná-las industrialmente úteis para atender a crescente demanda mundial de produção de queijos diversificados e de alta qualidade (HASHIM *et al.*, 2011)

.Diante dessa temática e dos estudos existentes na literatura acerca da presença de peptidases na polpa dos frutos de noni, e por se tratar de um fruto consumível, não apresentando, desta forma, implicações quanto ao seu uso em pequenas quantidades, a estratégia adotada neste trabalho foi a de caracterizar estas peptidases visando sua aplicação futura como coagulante na produção de queijos.

Através do método de micro Kjeldahl foi determinado que a massa seca dos frutos de noni apresenta 5,2% de proteína em sua constituição. Alterações nesse teor são observadas em frutos coletados em ambientes diversos. Frutos de noni coletados em Cuiabá – MT, Brasil

(FARIA *et al.*, 2014) e Camboja (CHUNHIENG, 2003) apresentaram teores proteicos correspondentes a 2,36% e 2,5%, respectivamente. Baixos teores de proteínas são comuns em frutos, visto que geralmente estas se encontram armazenadas em suas sementes (SLAVIN; LLOYD, 2012).

Para extração de proteínas do fruto foram testados diferentes pHs e a maior concentração de proteína foi obtida quando o tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 com adição de NaCl, com um rendimento total de 2,07 mg de proteína / g de polpa (0,451 mg/mL). No entanto, levando-se em consideração a concentração total de proteínas na polpa (5,2%), é possível constatar que apenas cerca de 4% das proteínas são solúveis nessas condições. Isso sugere que os frutos de noni contém uma grande diversidade de proteínas que são extraídas provavelmente em diferentes condições de pH, solventes e sais. Ishartani *et al.* (2011) relatou uma concentração de 0,51 mg/mL em extratos obtidos a partir de frutos de noni no 4º estágio de maturação (amarelo-esbranquiçado), em contraste com os valores encontrados por Ismail e Razak (2014), apenas 0,16 mg/mL.

O pericarpo do fruto de noni é uma fonte rica de peptidases que podem ser empregadas na fabricação de queijos. Sua atividade proteolítica de 1718,69 UAP/g ultrapassa a da maioria dos vegetais, como é o caso do kiwi (*Actinidia deliciosa*), abacaxi (*Ananas comosus*), mamão (*Carica papaya*) e figo (*Ficus carica*) que apresentam uma média de 25,92 UAP/g (Sun *et al.*, 2016). Apenas 79,02 g (peso médio do fruto: $212,17 \pm 11,25$ g) de pericarpo de noni são necessários para a manufatura de um quilo de queijo, desse modo a partir de apenas um fruto é possível obter uma larga quantidade de peptidases, o que diminuiria os custos para produção de queijos e ao mesmo tempo dispensa a técnica de expressão heteróloga, que muitas vezes é utilizada visando o aumento nos rendimentos de biomoléculas. Além disso, essa é uma espécie perene e frutifica ao longo de todo o ano (Nelson, 2006)

O perfil eletroforético apresentado foi semelhante ao do fruto maduro relatado por Ismail & Razak (2014), onde grande parte das proteínas, possuem massas menores que 30 kDa, entretanto, o presente trabalho diferiu por apresentar uma banda proteica em torno de 53 kDa. O zimograma (Figura 3) apresentou diversas bandas correspondentes às peptidases, que não foram visualizadas em SDS-PAGE comum (Figura 2), mesmo aplicando-se grande quantidade de proteínas (75 µg). Isso sugere que a atividade proteolítica dos frutos de noni, provém de uma grande variedade de peptidases com alta capacidade de hidrólise, no entanto, presentes em baixas concentrações, pois mesmo não sendo observadas em SDS-PAGE comum, a quantidade de proteína aplicada para a realização do zimograma (10 µg) foi

suficiente para que houvesse digestão da gelatina presente no gel. Foi observado também que essas peptidases não foram totalmente desnaturadas na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), visto que houve hidrólise de proteínas durante a corrida eletroforética, comprovada pelo “arrastado” na parte superior do gel.

Em ensaios de atividade proteolítica utilizando diferentes inibidores de peptidases, PPN foram completamente inibidas quando incubadas na presença dos inibidores, iodoacetamida e E-64. Esses inibidores são específicos para cisteíno-peptidases, entretanto sua utilização não permite distinguir entre as enzimas desta classe. Inibem irreversivelmente, por alquilação ou oxidação, causando modificações em grupos tiol (-SH). Esse resultado demonstra que grupos -SH podem estar envolvidos no mecanismo de catálise dessas enzimas, indicando que PPN pertencem a classe das cisteíno-peptidases.

PPN apresentaram atividade ótima em torno de pH 6,0 para ambos os substratos utilizados. Essa condição de pH é comum em cisteíno-peptidases vegetais, como é o caso da bromelaina, extraída a partir do fruto de *Ananas comosus*, que apresentou atividade caseinolítica máxima em pH 5,0 – 6,0 (HA *et al.*, 2012), da nivulian II, purificada a partir do látex de *Euphobia nivulia* (BADGUJAR; MAHAJAN, 2014), e a ervatamina B, proveniente do látex de *Ervatamia coronaria* (KUNDU; SUNDD; MEDICHERAL, 2000), que apresentaram atividade ótima em pH 6,3. Coalho de vitelo exibiu a mesma dependência em relação ao pH, desempenhando melhor atividade de coagulação sob condições ácidas do que sob condições alcalinas (RICHARDSON, *et al.*, 1967)

A atividade proteolítica aumentou progressivamente com o aumento da temperatura até um ponto máximo em 50 °C, decaindo em temperaturas superiores (Figura 6). Comportamento semelhante foi observado em látex de *Ficus carica*, *Calotropis procera* (BADGUJAR; MAHAJAN, 2012) e folhas de *Lactuca sativa* (LO PIERO *et al.*, 2002), que apresentaram uma temperatura ótima de atividade de 50, 45 e 50 °C, respectivamente. PPN apresentaram ainda uma atividade proteolítica bastante expressiva nas temperaturas de 40 e 60 °C.

Quanto à estabilidade em função do pH, PPN apresentou aproximadamente 80 % de sua atividade quando incubada previamente 4 – 6, e 60% em pH 3 (Figura 7). Apresentou baixa estabilidade frente pHs alcalinos. Peptidases de sementes de *Lagenaria siceraria* também sofreram uma redução na atividade proteolítica em pH acima de 7,0 (DASH; MAHARANA; GHOSH, 2015). Sabe-se que o pH afeta a forma, as propriedades de carga, o posicionamento correto do substrato e a ionização das cadeias laterais dos aminoácidos, tanto no local ativo, como em toda a estrutura enzima (PURICH, 2010).

A incubação prévia em diferentes temperaturas também ocasionou reduções na atividade proteolítica de PPN, principalmente em temperaturas acima de 40 °C. Este fato pode estar associado à ocorrência de autólise, quando PPN são incubados nas suas condições ideais de reação, pH 6,0 a 50 °C, visto que esse processo é bastante comum em peptidases, e depende de fatores como concentração, temperatura, tempo e ativadores. (TOMAR *et al.*, 2008). Alta estabilidade em função da temperatura e do pH é um importante critério na escolha de peptidases para serem utilizadas em processos industriais (VIEILLE; ZEIKUS, 1996).

Outro parâmetro utilizado para avaliação da estabilidade de PPN foi o efeito de íons na atividade proteolítica, que podem ser determinantes na organização molecular da proteína e assim influenciar na atividade e estabilidade da enzima (MERHEB-DINI *et al.*, 2009). Mn, Co, Cu e Zn foram capazes de inibir a atividade proteolítica de PPN na concentração de 5 mM, enquanto que, Fe, Mg e Ca não exerceram influência na atividade. Esse perfil de inibição também foi encontrado em religiosina B (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012), enquanto que nivulian-II sofreu inibição por Fe e Zn (BADGUJAR; MAHAJAN, 2014). O Na foi capaz de melhorar em 50% a atividade catalítica de PPN de 2,5 M, isso também foi reportado por Sousa, Malcata (1996), onde houve um aumento na atividade proteolítica do extrato bruto de flores de *Cynara cardunculos* de acordo com o aumento da concentração de NaCl. Já peptidases dos frutos de *Bromelia hieronymi* sofreram uma perda de sua atividade em cerca de 48% na presença de 2,5 M de NaCl (BRUNO *et al.*, 2010).

Quanto à sua estabilidade de armazenamento em função do tempo e da temperatura, PPN armazenadas apenas em solução aquosa a - 20 °C mantiveram 60% de sua atividade mesmo após 30 dias, enquanto que a 4 °C o decaimento da atividade ocorreu mais rapidamente. Todavia, quando liofilizadas e armazenadas na temperatura de -20 °C, sua atividade catalítica permaneceu intacta mesmo após 6 meses (dados não mostrados). Diante disso, tornam-se necessários estudos acerca de sua estabilidade em diferentes temperaturas quando liofilizadas.

A razão entre a atividade coagulante do leite e a atividade proteolítica é um indicador da eficiência da peptidase utilizada na produção de queijo (ARIMA *et al.*, 1970) e esse parâmetro é utilizado na escolha de coagulantes alternativos. A coagulação do leite por PPN ocorreu sem a adição de ativadores e apresentou uma razão de 174,5 UAC/mL.

Quando realizado o ensaio de atividade de coagulação do leite utilizando inibidores de peptidases, o resultado obtido corroborou com o ensaio de atividade proteolítica

utilizando-se azocaseína como substrato e confirmou a presença de cisteíno-peptidases, visto que não ocorreu coagulação do leite quando PPN foram incubadas em iodoacetamida e E-64. Várias cisteíno peptidases têm sido apontadas como coagulantes alternativos, como é o caso das espécies *Ficus racemosa* (DEVARAJ *et al.*, 2008), *Actinidia chinensis* (KATSAROS *et al.*, 2010), *Ficus carica sylvestris* (FACCIA *et al.*, 2012), *Euphorbia nivulian* (BADGUJAR; MAHAJAN, 2014), *Calotropis procera* (BADGUJAR; MAHAJAN, 2012), *Helianthus annuus* (EGITO *et al.*, 2007), dentre outras.

Outro parâmetro avaliado foi o efeito do NaCl e CaCl₂ na coagulação do leite. Sabe-se que o NaCl influencia na maturação do queijo, como no controle do crescimento microbiano, na sinerese da coalhada, causando uma redução na umidade do queijo, bem como na atividade de proteínas que podem ocasionar mudanças físicas no queijo, como por exemplo, a textura (GUINEE; FOX, 2004). A presença de NaCl ocasionou uma redução na UAC de PPN, embora em ensaios de atividade proteolítica mostrados anteriormente, o sal tenha potencializado o efeito de PPN sobre a azocaseína. A salga do queijo de coalho ocorre apenas ao final do processo de coagulação, o que não coloca em risco a atividade da enzima. Esse resultado apresenta uma vantagem, pois a inativação parcial de PPN por NaCl associado à sua inativação total na temperatura de 50 °C, garantem que ao final do processo de produção de queijo, não continue havendo proteólise durante a etapa de maturação, diminuindo assim, a liberação de peptídeos indesejados.

O cálcio também interfere na coagulação do leite e tem sido descrito como uma importante substância na formação do coágulo durante a coagulação do leite, que ocorre quando sua concentração é alta o suficiente (ANEMA, LEE, KLOSTERMEYER, 2005). Tem importância na agregação da caseína no segundo passo (não enzimático) do processo de coagulação, provocado pela neutralização dos resíduos negativos das micelas de caseína (grupos fosfoerina e carboxil) e formação de complexos de fosfato de cálcio (PIRES; ORELLANA; GATTI, 1999), de modo que um aumento na sua concentração leva a um aumento na taxa de coagulação (ARIMA *et al.*, 1970). Houve uma redução nos valores de UAC apenas na presença de concentrações maiores ou iguais a 60 mM de CaCl₂, diferentemente dos ensaios de atividade proteolítica, onde sua atividade de PPN não foi afetada por nenhuma das concentrações testadas. Ahmed; Babiker; Mori (2010) e Preetha; Boopathy (1997), relataram uma atividade máxima de peptidases purificadas na coagulação de leite na presença de 0,2 e 0,4 M de CaCl₂, respectivamente. Religiosina B também sofreu um decaimento quando na presença de concentrações acima de 0,3 M de CaCl₂ e foi

associado ao aumento da força iônica ou a saturação de resíduos negativos das micelas com o aumento de Ca^{2+} no meio (KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012).

Quando um potencial substituto do coalho é considerado, é importante avaliar adequadamente os padrões de degradação de caseínas por causa de seus efeitos sobre o rendimento, consistência e sabor do queijo final. A hidrólise lenta de α e β -caseína é garantia da produção de uma coalhada firme, o que ocorre quando quimosina é utilizada (FOX, 1989). PPN foi capaz de hidrolisar os três tipos de caseína (α , β e κ) originando vários peptídeos de baixa massa molecular (Figura 19), sendo β e κ -caseína mais susceptíveis à ação de PPN do que a α -caseína. Esse padrão foi reproduzido por peptidases de sementes de *Solanum dubium* (AHMED; BABIKER; MORI, 2010). Quimosina cliva apenas uma ligação peptídica da molécula de κ -caseína, produzindo um peptídeo insolúvel, para- κ -caseína, e um glicopeptídeo C-terminal (RAO *et al.*, 1998). A hidrólise da κ -caseína (Figura 20) realizada tanto por PPN como pelo coalho comercial (Coalhopar) resultou em um perfil semelhante, com uma banda com massa molecular de aproximadamente 16 kDa, provavelmente corresponde ao peptídeo para- κ -caseína.

Diferentes graus de proteólise entre diferentes peptidases representam uma vantagem, visto que podem levar à produção de novos queijos caracterizados pelo seu sabor único, juntamente com diferentes teores de gordura (TRUJILLO *et al.*, 2000). PPN mostrou-se eficiente na produção de queijo de coalho, entretanto, novos estudos para otimização das condições ideais devem ser realizados para confirmar sua utilidade na indústria de laticínios.

7 CONCLUSÃO

A polpa dos frutos de noni demonstrou ser uma fonte em potencial de uma grande variedade de enzimas proteolíticas com atividade de coagulação do leite e através de testes com inibidores de peptidases foi revelado que PPN pertencem à classe das cisteíno-peptidases. Apresentaram uma maior atividade catalítica no pH 6,0, utilizando-se tanto azocaseína como BANA, e na temperatura de 50 °C. No entanto, os ensaios subsequentes para caracterização dessas enzimas utilizou a temperatura de 37 °C, que é a mesma utilizada para os ensaios de coagulação do leite.

Foi observada uma perda drástica na atividade proteolítica em meio alcalino e em temperaturas superiores a 40 °C. Foram estáveis na presença dos íons Fe e Mg, embora Mn, Co, Cu e Zn tenham induzido uma inibição da enzima. CaCl₂ e NaCl não exerceram efeito negativo sobre a atividade proteolítica de PPN, no entanto, causaram uma redução nos valores de UAC, quando em concentrações mais elevadas, durante a coagulação do leite. Foi verificado que o armazenamento da enzima em solução aquosa na temperatura de 4 °C, mesmo após 7 dias, e de -20 °C por período superior a 30 dias não é procedimento adequado.

PPN foram capazes de hidrolisar os três tipos de caseína (α , β e κ), apresentando maior especificidade para as β e κ -caseínas, em detrimento das α -caseína. A degradação da κ -caseína utilizando PPN foi semelhante à do coalho comercial (Coalhopar), com a geração de um peptídeo com uma massa molecular de aproximadamente 16 kDa, correspondente à para- κ -caseína.

O queijo produzido com PPN apresentou valores de massa (fresca e seca) e umidade semelhante ao produzido com o coalho comercial, sendo necessários 79,02 g para a produção de um quilo de queijo (aproximadamente um fruto inteiro).

Diante disso, frutos de noni constituem uma fonte promissora de peptidases a serem usadas na indústria de laticínios, sendo necessários ainda estudos para a otimização das condições de produção do queijo e para garantir a segurança do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. R. Processamento do leite e tecnologia de produtos lácteos. Lavras: UFLA/FAEPE. (2005).
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Informe Técnico nº. 25, de 29 de maio de 2007, atualizado em 18 de junho de 2008. Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança realizadas de produtos contendo *Morinda citrifolia*. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/25_290507.htm. Acesso em: 10 jan. 2016.
- AHMAD, J.; ANSARI T. A. Alkaline peptidase production using proteinaceous tannery solid waste. **Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1–4, 2013.
- AHMED, I. A. M.; BABIKER, E. E.; MORI, N. pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. **LWT - Food Science and Technology**. v. 43, p. 759–764, 2010.
- AHMED, I. A. M. MORISHIMA, I.; BABIKER, E. E.; MORI, N. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 395–400, 2009.
- AKIHISA, T., MATSUMOTO, K., TOKUDA, H., YASUKAWA, K., SEINO, K.I., NAKAMOTO, K., KUN-INAGA, H., SUZUKI, T., KIMURA, Y. Anti-inflammatory and potential cancer chemopreventive constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 754–757, 2007.
- ANDRÉN, A. Rennets and coagulants In Encyclopedia of Dairy Sciences, Academic Press London, p. 281-286, 2002.
- ANEMA; S. G.; LEE, S. K.; KLOSTERMEYER, H. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 99-106, 2005.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. ALKALINE PROTEASES: A REVIEW. BIORESOURCE TECHNOLOGY, V. 64, P. 175-183, 1998.**
- ARAÚJO, J. B. C.; PIMENTEL, J. C. M.; PAIVA, F. F. A.; MACEDO, B. A. Produção artesanal de queijo coalho, ricota e bebida láctea em agroindústria familiar. Embrapa, Brasília, ed. 1, 2012.
- ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var lindt. **Methods in Enzymology**, v. 19, p. 446-459, 1970.
- ASAKURA, T.; WATANABE, H.; ABE, K.; ARAI, S. Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization and application to milk clotting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1070-1075, 1997.
- ASSI, R. A.; DARWIS, Y.; ABDULBAQI, I. M.; KHAN, A. A.; VUANGHAO, L.; LAGHARI, M. H. MORINDA CITRIFOLIA(NONI): A COMPREHENSIVE REVIEW**

ON ITS INDUSTRIAL USES, PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES, AND CLINICAL TRIALS. ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, P. 3-17, 2015.

AWORTH, O. C.; MULLER, H. G. Cheese-making properties of vegetable rennet from Sodom apple (*Calotropis procera*). **Food Chemistry**, v. 26, p. 71-79, 1987.

AZAD, G. K.; TOMAR, R. S. pROTEOLYTIC CLIPPING OF HISTONE TAILS: THE EMERGING ROLE OF HISTONE PROTEASES IN REGULATION OF VARIOUS BIOLOGICAL PROCESSES. MOLECULAR BIOLOGY REPORTS, V. 41, N. 5, P. 2717-2730, 2014.

BADGUJAR, S. B.; MAHAJAN, R. T. Characterization of milk clotting cysteine peptidase of *Euphorbia nivulia* Buch.Ham. latex. **Green Farming**, v. 1, n. 6, p. 645–648, 2010.

BADGUJAR, S. B.; MAHAJAN, R. T. Comparison of cysteine peptidases of four laticiferous plants and characterization of *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham. latex glycosylated cysteine peptidase. **Indian Journal of Natural Products and Resources**. v. 3, n. 2, p. 152-160, 2012.

BADGUJAR, S. B.; MAHAJAN, R. T. Nivulian-II a new milk clotting cysteine peptidase of *Euphorbia nivulia* latex. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 70, p. 391-398, 2014.

BAETHGEN W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis.**, v. 20, n. 9-10, p. 961-969, 1989.

BARRET, A. Proteolytic enzymes: Serine and cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, v. 244, ed. 1, 1994.

BBC Research. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Global Markets . A BBC Research Report. Jun 2014. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>. Acesso em 14/03/2017 às 00:55.

BCC RESEARCH (2012). Global market for industrial enzymes to surpass \$ 6 billion in 2016. Disponível em: [http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-industrial-enzymes-surpass-\\$6-billion-2016](http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-industrial-enzymes-surpass-$6-billion-2016). Acesso em: 03 fev. 2016.

BENEDET, H. D. Enzimas coagulantes obtidas a partir da *Endothia parasítica*, *Mucor miehei* e renina: Diferenciação em gel de ágar caseína. **B. Ceppa**, v. 11, n. 01, p. 47-52, 1993.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Biochemistry*. 5ª ed. London: **W. H. Freeman and Company**, 2002.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.722, p. 248-254, 1976.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1735–1750, 2010.

BRUNO, M. A.; LAZZA, C. M.; ERRASTI, M. E.; LÓPEZ, L. M. I.; CAFFINI, N. O.; PARDO, M. F. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT - Food Science and Technology**. v. 43, p. 695–701, 2010.

CATTANEO, T. M. P.; NIGRO, F.; MESSINA, G.; GIANGIACOMO, R. Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Rennet Substitute Milchwissenschaft*, v.49, n. 5, 1994.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A. M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 645-654, 2006.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**, v. 29, n. 1, p. 17–30, 2015.

CHAZARRA, S.; SIDRACH, L.; MOLINA, D. L.; LÓPEZ, J. N. R. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. **International Dairy Journal**. v. 17, n. 12, p. 1393-1400, 2007

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

CHUNHIENG, M.T., 2003. Developpement de nouveaux aliments sante tropicale: application a la noix du Bresil *Bertholettia excelsa* et au fruit de Cambodge *Morinda citrifolia*. Ph.D. thesis, INPL, France. 2003.

CLAVERIE-MARTIN F, VEGA-HERNANDEZ MC Aspartic proteases in cheese making. In: Polaina J, Maccabe AP (eds) *Industrial enzymes*. Springer, Netherlands, pp 207–219, 2007.

COMYNS, A.E. The US industrial enzymes markets. **Focus on Surfactants**. v. 2009, N. 1, P. 3-4, 2009.

CORNISH-BOWDEN, A. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1-6, p. 74–87, 2014.

CORREIA, A. A da S.; GONZAGA, M. L .da C.; AQUINO, A. D. de.; SOUZA, P. H. M de; FIGUEIREDO, R. W de; MAIA, G. A. Caracterização química e físico-química de polpa de noni (*Morinda citrifolia* L.) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição.**, v. 22, n.04, p. 606-615, 2011.

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* peptidases. **LWT-Food Science and Technology**. v. 47, p. 103-109, 2012.

COSTA, J. O.; FONSECA, K. C.; CARROTE-FILHO, M. S.; CUNHA, C. C.; FREITAS, M. V.; SILVA, H. S.; ARAÚJO, R. B.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochimie**, v. 92, p. 1760-1765, 2010.

CRABBE, M. J. C. **Rennets: General and Molecular Aspects**. [s.l.] Elsevier Ltd, v. 1, 2004.

CUESTA, S. M. The chemistry and evolution of enzyme function: Isomerases as a case study. **Current Opinion in Structural Biology**, v. n. p. 121-130, 2014.

DALGLEISH, D. G.; SPAGNUOLO, P. A.; GOFF, H. D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. **International Dairy Journal**. v. 14, p. 1025–1031, 2004.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, p. 52-64, 1986.

DASH, P.; MAHARANA, L.; GHOSH, G. Proteolytic and milk clotting activity of fractionated protein of *Lagenaria siceraria*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 5, n. 12, p. 86-91, 2015.

DEJMEK, P.; WALSTRA, P. The syneresis of rennet-coagulated curd. Pages 71–103 in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1: General aspects. 3rd ed. P. Fox, P. McSweeney, T. Cogan, and T. Guinee, ed. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 2004

DENG, S. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. **Food Chemistry**, v.122, p.267- 270, 2010.

DENG, S., WEST, B., PALU, A., ZHOU, B., JENSEN, C. Noni as an anxiolytic and sedative: a mechanism involving its gamma-aminobutyric acid effects. **Phytomedicine**, 14, 517–522, 2007.

DEVARAJ, K.B; GOWDA, L. R.; PRAKASH, V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). **Phytochemistry**, v. 69, n. 3, p.647–655, 2008

DEUTCH, C. Degradative enzymes from the pharmacy or health food store: Interesting examples for introductory biology laboratories. **American Biology Teacher**, v. 69, n. 6, p. 64-70, 2007.

DITTMAR, A. *Morinda citrifolia* L.: Use in indigenous Samoan medicine. **Journal of Herbs, Spices and Medicine Plants**, v. 1, p. 77–92, 1993.

DIXON, A.R., MCMILLEN, H., ETKIN, N.L. Ferment this: the transformation of noni, a traditional polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). **Ecological Botony**, 53, 51–68, 1999.

DUFFY, M. J.; MCGOWAN, P. M.; GALLAGHER, W. M. **CANCER INVASION AND METASTASIS: CHANGING VIEWS. THE JOURNAL OF PATHOLOGY, V. 214, N. 3, P. 283-293, 2008.**

DUNCAN, S.H., FLINT, H.J., STEWART, C.S. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* O157 mediated by dietary plant metabolites. **FEMS Microbiology Letters**, v. 164, p. 258–283, 1998.

DUSSOSSOY, E.; BRAT, P.; BONY, E.; BOUDARD, F.; POUCHERET, P.; MERTZ, C.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 108–115, 2011.

ECK, A. O queijo. Lisboa: Publicações Europa-América (Coleção EUROAGRO), v. 1 ed. 137.024/5.141, 336 p, 1987.

EGITO, A. S.; GIRARDET, L.E.; POIRSON, C. MOLLÉ, D; MICLO, L.; HUMBERTO, G. GAILLARD, J. L. Mik-clotting activity extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **Internationa Dairy Journal**, v. 17, p. 816-825, 2007.

ESTELLE, M. Peptidases and cellular regulation in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 3, p. 254–260, 2001.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION DECISION of 5 June 2003 authorising the placing on the market of “noni juice” (juice of the fruit of *Morinda citrifolia* L.) as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. **Official Journal of the European Union**, n. June, p. 13–14, 2003.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion on a request from the Commission related to the safety of noni juice (juice of the fruits of *Morinda citrifolia*). **European Food Safety Authority Journal**, v. 376, n. September, p. 1–12, 2006.

FACCIA, M.; PICARIELLO, G.; TRANI, A.; LOIZZO, P.; GAMBACORTA, G.; LAMACCHIA, C.; DI LUCCIA, A. Proteolysis of Cacioricotta cheese made from goat milk coagulated with caprifig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology*, v. 234, p. 527-533, 2012.

FARIA, W. C. S.; BETT, S. C.; SANTOS, C. G. B.; BRASIL, A. S.; GAUTO, R. F.; BESERRA, A. M. S. S.; OLIVEIRA, A. P. Caracterização físico-química e análise fitoquímica preliminar do fruto noni (*Morinda citrifolia* L.) produzido na cidade de Cuiabá – MT. **Revista Brasileira de Tecnologia Industrial**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. v. 8, n. 1, p. 1208-1215, 2014.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and biotechnologically engineered plant peptidases with industrial applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1066–1088, 2011.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; MARCO, J. L.; In: Enzimas como agentes biotecnológicos; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, cap. 18, p 237-247, 2004.

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

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg, MD: Aspen. 2000.

FOX, P. F.; LAW, J. Enzymology of cheese ripening. **Food Biotechnology**, v. 5, p. 239–262, 1991.

FOX, P. F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening a review. **Journal of Dairy Science**, n. 68, p. 531–540, 1989.

FOX, P.F.; STEPANIAK, L. Enzyme in cheese technology. **International Dairy Journal**, v. 3, n. 4-6, p. 509-530, 1993.

FURUSAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY, S.; JENSEN, J. ANTITUMOUR POTENTIAL OF A POLYSACCHARIDE-RICH SUBSTANCE FROM THE FRUIT JUICE OF MORINDA CITRIFOLIA (NONI) ON SARCOMA 180 ASCITES TUMOUR IN MICE. PHYTOTHERAPY RESEARCH, V. 17, N. 10, P. 1158-1164, 2003.

GAJO, A. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, M. S.; PAIXÃO, M. G.; PINTO, S. M.; DAVID, F. M. Estudo sensorial de queijo similar ao minas padrão com leite de ovelha utilizando coagulante coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 61-65, 2012.

GODECKE, M. V.; RODRIGUES M. A. S.; NAIME R. H. Resíduos de curtumes: estudo das tendências de pesquisa. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 7, n. 7, p. 1357–1378, 2012.

GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology. General aspects*, London, UK: Chapman and Hall. v. 1, 3^o ed., p. 207–259, 2004.

HA, M.; BEKHIT, A. E. A.; CARNE, A.; HOPKINS, D. L. Characterization of commercial papain, bromelain, actinidin, zingibain peptidase preparations and their activities toward meat proteins. **Food Chemistry**, v. 134, p. 95-105, 2012.

HASHIM, M. M.; MINGSHENG, D.; IQBAL, M. F.; XIAOHONG, C. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine peptidase. **Phytochemistry**, v. 72, p. 458–464, 2011.

HEIMGARTNER, U; PIETRZAK, M.; GEERTSEN, R.; BRODELIUS, P.; FIGUEIREDO A. C. S.; PAIS, M. S. S. Purification and partial characterization of milk clotting peptidases from flowers of *Cynara cardunculus*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1405-1410, 1990.

HEINICKE, R. M. The pharmacologically active ingredient of Noni. **Bulletin of the National Tropical Botanical Garden**, v. 15, p. 10–14, 1985.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E.; CHOU, S. C.; HOKAMA, Y. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. **Process West Pharmacology Society**, v. 37, p. 145-146, 1994.

HORSFAL, A. U.; OLABIYI, O. A.; OSINUBI, A. A.; NORONHA, C. C.; OKANLAWON, A. O. Antidiabetic effect of fruit juice of *Morinda citrifolia* (Tahitian Noni Juice®) on experimentally induced diabetic rats. **Nigerian Journal and Health Biomedical Sciences.**, v. 7, n. 2, p. 34–37, 2008.

HÜTTNER, E. K.; ARENDT, E. K. Recent advances in gluten-free baking and the current status of coats. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 30, p. 303–312, 2010.

ILLANES, A. Enzyme Biocatalysis – Principles and Applications. Chile: **Springer**, p. 398. 2008.

ILOKI ASSANGA, S.B.; LEWIS LUJÁN, L.M.; RIVERA-CASTAÑEDA, E.G.; GIL-SALIDO, A.A.; ACOSTA-SILVA, A.L.; MEZA-CUETO, C.Y.; RUBIO-PINO, J.L. Effect of maturity and harvest season on antioxidant activity, phenolic compounds and ascorbic acid of *Morinda citrifolia* L. (noni) grown in Mexico (with track change). **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 29, p. 4630-4639, 2013.

ISHARTANI, D.; ELFI; ANDARWULAN, N.; SYAH, D. Purification of peptidases from fruits and leaves of noni (*Morinda citrifolia* L.). **Jurnal Teknologi dan Industri Pangan**, v. 22, p. 78-84, 2011.

ISMAIL, N.; RAZAK, N. A. Characterization and purification of peptidase extracted from two maturity stages of ‘noni’ (*Morinda citrifolia* L.) fruit. **Scientific Research Journal**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2014.

JAINKITTIVONG, A.; BUTSARAKAMRUHA, T.; LANGLAIS, R. P. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 108, n. 3, p. 394-398, 2009.

JAYARAMAN, S.K.; MANOHARAN, M.S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **International Journal Integrative Biology.**, v. 3, p. 44, 2008

KAMATA, M.; WU, R. P.; AN, D. S.; SAXE, J. P.; DAMOISEAUX, R.; PHELPS, M. E.; HUANG, J.; CHEN, I. S. Y. Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthol as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 3, p. 1101–1106, 2006.

KAMIYA, K.; HAMABE, W.; TOKUYAMA, S.; HIRANO, K.; SATAKE, T.; KUMAMOTO-YONEZAWA, Y.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, Band Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 725–730, 2010.

KAMIYA, KOHEI, TANAKA, YOHEI, ENDANG, HANANI, UMAR, MANSUR, SATAKE, TOSHIKO. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. **Journal Agricultural. Food Chemistry.**, v. 52 n. 19, p. 5843–5848, 2004.

KATSAROS, G. I.; TAVANTZIS, G.; TAOUKIS, P. S. Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 47–51, 2010.

KHAN, A. R.; JAMES, M. N. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. **Protein Science**, v. 7, n. 4, p. 815–836, 1998.

KITTS D.D., WEILER K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1309–1323,

KÜHNE, W.; FOSTER, M. M. On the photochemistry of the retina and on visual purple, London, **MacMillan e Co. trans**, p. 1-104, 1878.

KULKARNI, A.; RAO, M. Differential elicitation of an aspartic protease inhibitor: Regulation of endogenous protease and initial events in germination in seeds of *Vigna radiata*. **Peptides**, v.30, n. 12, p. 2118-2126, 2009.

KUMAR, A.; GROVER, S.; SHARMA, J.; BATISH, V.K. Chymosin and other milk coagulants: Sources and biotechnological interventions. Critical Reviews in Biotechnology, v. 30, n. 4, p. 243-258, 2010.

KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine peptidase from *Ficus religiosa*. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1295-1303, 2012.

KUNDU S.; SUNDD, M.; JAGANNADHAM, M. V. Purification and characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 2, p. 171-179, 2000.

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

LEMES, A.; PAVÓN, Y. L.; LAZZARONI, S.; KALIL, S. J. A NEW MILK-CLOTTING ENZYME PRODUCED BY BACILLUS SP. P45 APPLIED IN CREAM CHEESE DEVELOPMENT. LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, V. 66, 2016.

LEVAND, O., LARSON, H.O. Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*. **Planta Medica**, v. 36, p. 186–187, 1979.

LI, D. C; YANG, Y. J.; SHEN, C. Y. Peptidase production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycological Research**, V 101, N. 1, P. 18-22, 1997.

LI, J.; STICKEL, S. L.; BOUTON-VERVILLE, H.; BURGIN, K. E.; YU, X.; WONG D. K. Fermented noni exudate (fNE): a mediator between immune system and anti-tumor activity. **Oncology Report**, v. 20, p. 1505-1509, 2008.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial peptidases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 8, n. 587, p. 1155–1163, 2013.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**. v. 2, n. 3, p. 1-11, 2012.

LI, Y.; YU, J.; GOKTEPE, I.; AHMEDNA, M. The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1338–1345, 2016.

LINKO, Y. Y.; JAVANAINEN, P.; LINKI, S. Biotechnology of bread baking. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 97, p. 339–345, 1997.

LIU, H.; WANG, X.; ZHANG, H.; YANG, Y.; GE, X.; SONG, F. A rice serine carboxypeptidase-like gene *OsBISCP1* is involved in regulation of defense responses against biotic and oxidative stress. **Gene**, v. 420, n. 1, p. 57–65, 2008.

LO PIERO, A. R.; PUGLISI, I.; PETRONE, G. Characterization of “lettucine”, a serine-like peptidase from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2439–2443, 2002.

LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. **Food Chemistry**, v. 159, p. 55–63, 2014.

LÜBECK, W.; HANNES, H. Noni el valioso tesoro de los mares del sur. Madrid: EDAF, p. 173, 2001.

LUCEY, J.; KELLY, J. Cheese yield. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v 47, n. 1, p. 1-14, 1994.

MACEDO, M. L.; AS, C. M.; FREIRE, M. D.; PARRA, JR. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran peptidases, isolated from *Adenantha pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal and Agricultural Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2533-2540, 2004.

MACPHERSON, H.; DANIELLS, J.; WEDDING, B.; DAVIS, C. The potential for a new value adding industry for noni tropical fruits producers. Austrália: Rural Industries Research and Development Corporation. 55p. ISBN 1-4151-529-7, 2007.

MAJUMDER, R.; BANIK, S. P.; RAMRAKHANI, L.; KHOWALA, S. BIOREMEDIATION BY ALKALINE PROTEASE (AKP) FROM EDIBLE MUSHROOM *TERMITOMYCES CLYPEATUS*: OPTIMIZATION APPROACH BASED ON STATISTICAL DESIGN AND CHARACTERIZATION FOR DIVERSE APPLICATIONS. JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. V. 90, N. 10, P. 1886-1896, 2015.

MCCLATCHEY, W.C. Diversity of growth forms and uses in the *Morinda citrifolia* L. complex. Proceedings of the 2002 Hawai'i noni conference. S.C. Nelson (ed.) CTAHR. p 5-10, 2003.

MCCLATCHEY, W. From Polynesian healers to health food stores: Changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies** v.1, n. 2, p. 110-120, 2002.

McGRATH, M. E. The lysosomal cysteine proteases. **Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure**, v. 28, p. 181-204, 1999.

McSWEENEY, P. L. H. BIOCHEMISTRY OF CHEESE RIPENING. INTERNATIONAL JOURNAL OF DAIRY TECHNOLOGY, v. 57, n. 2-3, p. 127-144, 2004.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. PARTIAL CHARACTERIZATION OF PROTEASE FROM A THERMOPHILIC FUNGUS, *THERMOASCUS AURANTIACUS*, AND ITS HYDROLYTIC ACTIVITY ON BOVINE CASEIN. FOOD CHEMISTRY, V. 104, N. 1, P. 127-131, 2007.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, H.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLIN, L. M.; OKAMOTO, D. N.; RODRIGUEZ, G. O. B.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Biochemical and functional characterization of a metallopeptidase from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 20, 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, p. 859- 865, 2012.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; SILVA, R. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF A MILK-CLOTTING PROTEASE IN THE CRUDE ENZYMATIC EXTRACT FROM THE NEWLY ISOLATED *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICAE* N31: (MILK-CLOTTING PROTEASE FROM THE NEWLY ISOLATED *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICAE* N31). FOOD CHEMISTRY, V. 120, N. 1, P. 87-93, 2010.

MEROPS. The Peptidase Database. Disponível em: <http://merops.sanger.ac.uk>. Acesso em 16 mar 2017.

MERZ, M.; EISELE, T.; BERENDS, P.; APPEL, D.; RABE, S.; BLANK, I.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: Automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 5682–5693, 2015.

MILLONIG, G.; STADLMANN, S.; WOLFGANG, V. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 4, p. 445-447, 2005.

MOHAMAD-SHALAN, N. A.; MUSTAPHA, N.M.; MOHAMED, S. Chronic toxicity evaluation of *Morinda citrifolia* fruit and leaf in mice. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 83, p. 46-53, 2017.

MORTON, J.F. The ocean-going Noni, or Indian mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its “colourful” relatives. **Ecological Botany**, 46, 241–256, 1992.

MOSS II, C. R.; GILBERT, C. A.; GABRIEL, S. A.; GU, Q. Peptidase-activated receptor-2 inhibits BK channel activity in bronchopulmonary sensory neurons. **Neuroscience Letters**, v. 589, p. 13–18, 2015.

MOTSHAKERI, M.; GHAZALI, H. M. Nutritional, phytochemical and commercial quality of Noni fruit: A multibeneficial gift from nature. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 118-129, 2015.

NAGODAWITHANA, T.; REED, G. Enzymes in food processing, 3rd edn. San Diego, CA: Academic Press Inc, 1993.

NASCIMENTO, L. C. S. Caracterização Centesimal, Composição Química e Atividade Antioxidante do Noni (*Morinda Citrifolia* L.) Cultivado no Município de Zé Doca-MA. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2012.

NEELAKANTAN, S; MOHANTY, A. K.; KAUSHIK, J. K. Production and Use of Microbial Enzymes for Dairy Processing. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 143-148, 1999.

NELSON, D. L.; COX, M.M.; LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica de Lehninger, 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 95. 2011.

NELSON, S.C. *Morinda citrifolia*L: Rubiaceae Coffee family. Permanent Agriculture Resources (PAR), HI 96725 USA, 2006. Disponível em: http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/downloads/morinda_species_profile.pdf. Acesso em: 15 dez 2015.

NELSON, S.C. Species profiles for Pacific island agroforestry *Morinda citrifolia* noni. In: Elevitch, Craig R. (Ed.). Permanent Agriculture Resources 2006. Disponível <http://www.traditionaltree.org>. Acesso em: 15 dez 2015.

NOVOZYME (2013). Enzymes at work. Disponível em: http://www.novozymes.com/en/aboutus/brochures/documents/enzymes_at_work.pdf. Acesso em: 03 fev. 2016.

NTP. Ntp Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Naphthalene in F344 / N Rats (Inhalation Studies) National Toxicology Program. **National Toxicology Program Technical Report Series**, n. 500, 2005.

OTANI, H.; MATSUMORI, M.; HOSONO, A. Purification and some properties of a milk clotting peptidase from the young seeds of *Albizia julibrissin*. **Animal Science and Technology**, v. 62, n. 5, p. 424-432, 1991.

PALU, A. K.; KIM, A. H.; WEST, B. J.; DENG, S.; JENSEN, J.; WHITE L. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: its molecular mechanisms of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, out. 2008.

PAYEN, A.; PERSOZ, J. Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions, et leurs applications aux arts industriels. **Annales de Chimie et de Physique**, v. 53, p. 73–92, 1833.

PIDDOCKE, M. P.; FAZIO, A.; VONGSANGNAK, W.; WONG, M. L.; HELDT-HANSEN, H. P.; WORKMAN, C.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Revealing the beneficial effect of peptidase supplementation to high gravity beer fermentations using “-omics” techniques. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 27, p. 1–14, 2011.

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

POLGAR, L.; HALASZ, P. Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteinases. **Biochemical Journal**, v. 207, p. 1-10, 1982.

PONTUAL, E. V.; CARVALHO, B. E. A.; BEZERRA, R. S.; COELHO, L. C. B. B.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M.G. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry**, v.135, p. 1848-1854, 2012.

PRAPAITRAKOOL, S.; ITHARAT, A. *Morinda citrifolia* Linn. for prevention of postoperative nausea and vomiting. **Journal of Medical Association of Thailand**, v. 93, n.7, p. 204–209, 2010.

PREETHA, S.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of a milk clotting peptidase from *Rhizomucor miehi*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 573–578, 1997.

PUNJANON, T.; NADHASRI, P. Analgesic effect of the alcoholic extract from the fruits of *Morinda citrifolia*. **Acta horticulturae**, v. 678, p. 103-106, 2005.

PURANIK, D. S.; FARAZ, M.; NAGARAJU, B.; PATAN, F.; NAZEER, A.; SHANTHRAJ, P.; BOLOURI, A. Preclinical evaluation of antidiabetic activity of noni fruit juice. **International Journal of Bioassays**, v. 2, n. 2, p. 475–482, 2013.

PURICH, D. L. Factors influencing enzyme activity. In D. L. Purich (Ed.), *Enzyme kinetics: catalysis & control – A Reference of Theory and Best-Practice Methods*. Elsevier. 2010.

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

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 183-228, 1995.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. The peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 323-325, 2000.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 1, p. 270-272, 2010.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; MCDOWELL, T. D.; HALFORD, D. A.; BREMER, B. Origin of the pantropical and nutraceutical *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae): comments on its distribution range and circumscription. **Journal of Biogeography**, n.37, p. 520-529, 2010.

RICHARDSON, G. G.; NELSON, J. H.; LUBNOW, R. E.; SCHWARBERG, R. L. Rennin-like enzyme from *Mucor pusillus* for cheese manufacture. **Journal of Dairy Science**, v. 50, p. 1066–1072, 1967.

ROBERTSON, A.; HEADEY, S. J.; NG, N. M.; WIJEYEWICKREMA, L. C.; SCANLON, M. J.; PIKE, R. N.; BOTTOMLEY, S. P. Protein unfolding is essential for cleavage with in the α -helix of a model protein substrate by the serine peptidase, thrombin. **Biochimie**, v. 122, p. 1–8, 2016.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 2015.

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

SAEKI, K; OZAKI, K; KOBAYASHI, T.; ITO, S. **Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 103, n. 6, p. 501-508, 2007.

SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. Role of serine peptidases in inflammation: Bowman–Birk peptidase inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 93, n. 3, p. 428–433, 2012.

SARASWATHI, C.D.; PRAKASH, SAGAR, W.; KUNAL, P.W. Antiarthritic activity of *Morinda citrifolia* L. fruit juice in Complete Freund's adjuvant induced arthritic rats. **Journal Pharmacy Research.**, v. 5, n. 2, p. 1236–1239, 2012.

SARDINAS, J. L. Microbial rennets. In PERLMAN. D (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**, v.15, p. 39-73, 1972.

SAWANT, R; NAGENDRAN, S. Peptidase: an enzyme with multiple industrial applications. **Word Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 6, p. 568–579, 2014.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, v. 220, n. 2, p. 183–197, 2004.

SGARBIERI, V. C. Revisão : Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite Review : Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins. **Brazilian journal of food technology**, v. 8, n. 1, p. 43–56, 2005.

SHEORAN, S.; DHANKHAR, R. A Review on technological innovations and cost effectiveness: A green industrial approach for amylase production. **Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology**. v. 5, n. 1, p. 45-60, 2016.

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

SINGH, D. R. *Morinda citrifolia* L. (Noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, v. 3, n. 6, p. 77-91, 2012.

SINGH Y, IKAHIHIFO T, PANUVEM, SLATTER C. Folk medicine in Tonga. A study on the use of herbal medicines for obstetric and gynecological conditions and disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, p. 305-25, 1984.

SLAVIN, J. L.; LLOYD, B. Health benefits of fruits and vegetables. **Advance Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 506-516, 2012.

SMITH-MARSHALL, J.; GOLDEN, K. D. Characterization of Bromelain from *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 2, p. 445-456, 2012.

SOLOMON, N. The Noni Phenomenon. Direct Source Publishing, Utah, 1999.

SOUSA, M. J.; ARDO, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 327-345, 2001.

SOUSA, M. J.; MALCATA, F. X. Effects of processing conditions on the caseinolytic activity of crude extract of *Cynara cardunculus* L. **Food Science and Technology International**, v. 2, p. 255-263, 1996.

SOUSA, M. J.; MALCATA, F. X. Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 5, p. 305-314, 1998.

STADLBAUER, V.; FICKERT, P.; LACKNER, C.; SCHMERLAIB, J.; KRISPER, P.; TRAUNER, M. AND STAUBER, R. E. Hepatotoxicity of Noni juice: Report of two cases. **World Journal Gastroenterology**, v. 11, n. 30, p. 4758-4760, 2005.

SU, B. N.; PAWLUS, A. D.; JUNG, H. A.; KELLER, W. J.; MCLAUGHLIN, J. L.; KINGHORN, A. D. Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 592-595, 2005.

SUN, Q. et al. Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. **Food Chemistry**, v. 213, p. 708-713, 2016.

TAMER, M. I.; MAVITUNA, F. Peptidase from freely suspended and immobilized *Mirabilis jalapa*. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 195-200, 1997.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, V. 90, P. 1-11, 2013.

TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M. V. A stable serine peptidase, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1479-1487, 2008.

TRUJILLO, A. J.; BUENAVENTURA, G.; LAENCINA, J.; LÓPEZ, M. B. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. **Food Chemistry**, v. 71, p. 449-457, 2000.

TURK, B. Targeting peptidases: successes, failures and future prospects. **Nature Review**, v. 7, n. 10, p. 785–799, set. 2006.

UCHIKOBA, T.; KANEDA, M. Milk-clotting activity of cucumisin, a plant serine peptidase from melon fruit. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 325-330, 1996.

VAN DER HOORN, R. A. plant peptidases: From phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 191–223, 2008.

VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.; MENDACOLLI, S. L. J. TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. A. noni: frutífera medicinal em introdução e aclimação no Brasil. **O Agrônômico**, v. 57, n. 1, p. 20-21, 2005.

VERMELHO, A. B. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. *In*: Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: **Interciências Ltda**, 2008.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Thermozyms: Identifying molecular determinant of protein structural and functional stability. **Trends in Biotechnology**, v. 14, p. 183–189, 1996.

VISHWANATHA, K. S; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A. Characterization of acid peptidase expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, p. 402-407, 2009.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation cheese ripening and flavour. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.329–350, 1993.

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

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. Dairy Science and Technology. 2ed. Taylor & Francis. 763 p., 2006.

WANG, M. Y.; SU, C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 952, p. 161–168, 2001.

WANG, M. Y.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in noni research. Review. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, p. 1127–1141, 2002.

WEST, B. J.; DENG, S.; JENSEN, C. J. Nutrient and phytochemical analyses of processed noni puree. **Food Research International**, v. 44, p. 2295–2301, 2011.

WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; WESTENDORF, J. Noni juice is not hepatotoxic. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 22, p. 3616-3619, 2006.

WEST, B. J.; SU, C. X.; JENSEN, C. J. Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. **The Journal of toxicological sciences**, v. 34, n. 5, p. 581–585, 2009.

WHISTLER, W. A. Traditional and herbal medicine in the cook islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, p. 239-280, 1985.

XAVIER-FILHO, J. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 1139-1143, 1989.

YEGIN, S.; FERNANDEZ-LAHORE, M.; SALGADO, A. J. G.; GUVANE, U.; GOKSUNGUR, Y.; TARI, C. Aspartic proteinases from *Mucor* spp in cheese manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 89, p. 949-960, 2011.

YU, H.; LI, S.; HUANG, M.T.; HO, C.T. Antiinflammatory constituents in noni (*Morinda citrifolia*) fruits. In: ACS Symposium Series. Oxford University Press, United Kingdom, p. 179–190, 2008.

YÜCE, B.; GÜLBERG, V.; DIEBOLD, J.; GERBES, A. L. Hepatitis induced by noni juice from *Morinda citrifolia*: a rare cause of hepatotoxicity or the tip of the iceberg? **Digestion**, v. 73, n. 2-3, p. 167-170, 2006.

ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular peptidase from *Pseudomonas aeruginosa* MCMB-327: enzyme production and its partial characterization. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 173–181, 2011.

ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 227–231, 2002.