

INDUÇÃO DE MUTANTES ALTAMENTE
PRODUTORES DE RENINA MICROBIA
NA DE Mucor miehei

07/85

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

INDUÇÃO DE MUTANTES ALTAMENTE
PRODUTORES DE RENINA MICROBIA
NA DE Mucor miehei

Tese de Mestrado

Lúcia Regina Santos Jafelice

PARCER

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Lúcia Regina Santos Jafelice
e aprovada pela Comissão Julgadora em 13.05.85
Campinas, 13 de maio de 1985*

Orientador:

Prof. Dr. Yong Kun Park

J. C. B.
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agríco
la da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título
de Mestre em "Ciências de Alimentos".

Campinas

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À meus pais e
meus irmãos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park pela sua orientação na preparação deste trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, através de sua Direção e Coordenação de Pós-Graduação, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica: Penha, Hélia, Marilena, Regina, Dora, Ingrid, Célia, Raul, Rubens e Wálter pela amizade e apoio.

À Seção de Processamento de Leite e Derivados do ITAL pela atenção e colaboração na elaboração dos queijos que foram utilizados neste trabalho.

E também a Domingos, Regina e Mauro, Fernanda, Dedé, Araripe, Jape, Dal, Marta, Wilson, Léo, Raquel e a todos os outros amigos, cujos incentivos foram muito valiosos para a realização deste trabalho.

Ao pessoal da Biblioteca da FEAA pela excelente colaboração prestada.

A Associação Brasileira de Indústrias da Alimentação (ABIA) pelas cópias deste trabalho.

A Irene pelo trabalho de datilografia.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3. MATERIAIS	19
3.1 - Linhagem Utilizada	19
3.2 - Reagentes	19
3.3 - Equipamentos	19
4. MÉTODOS	20
4.1 - Reativação da Linhagem	20
4.2 - Escolha do meio de cultura para a obtenção de colônias isoladas de <u>Mucor miehei</u>	20
4.3 - Técnica de mutação	21
4.4 - Seleção de colônias mutadas	22
4.5 - Produção da enzima renina microbiana de <u>Mucor miehei</u>	22
4.6 - Obtenção da enzima	22
4.7 - Teste da atividade coagulante da enzima	23
4.8 - Escolha da melhor linhagem	23
4.9 - Produção e obtenção da enzima usando-se a linhagem mutada escolhida	23

Página

4.10 - Purificação da enzima	23
4.10.1 - Fracionamento da enzima com sulfato de amônio.	23
4.10.2 - Cromatografia da enzima em coluna DEAE-Sephadex A-50.	24
4.10.3 - Cromatografia da enzima em coluna CM-celulose.	25
4.11 - Caracterização da enzima purificada	25
4.11.1 - Efeito do pH na atividade enzimática.	25
4.11.2 - Efeito do pH na estabilidade da enzima.	26
4.11.3 - Efeito da temperatura na atividade enzimática.	26
4.11.4 - Termoestabilidade da enzima.	26
4.11.5 - Efeitos de sais minerais e compostos orgânicos na atividade enzimática.	27
4.11.6 - Efeito da concentração de cloreto de cálcio na atividade enzimática.	27
4.12 - Aplicação da enzima coagulante de <u>Mucor miehei</u> na fabricação de queijo Minas frescal.	27
5. RESULTADOS	29
5.1 - Escolha do meio de cultura apropriado para a seleção de colônias mutadas de <u>Mucor miehei</u>	29
5.2 - Escolha do tempo de irradiação.	29
5.3 - Seleção de colônias mutadas	29
5.4 - Purificação da enzima.	30

	<u>Página</u>
5.5 - Caracterização da enzima	30
5.5.1 - Efeito do pH na atividade enzimática.	30
5.5.2 - Efeito do pH na estabilidade da enzima.	30
5.5.3 - Efeito da temperatura na atividade enzimática.	31
5.5.4 - Termoestabilidade da enzima	31
5.5.5 - Efeito de sais minerais na atividade enzimática.	31
5.5.6 - Efeito da concentração de CaCl_2 na atividade enzimática.	32
5.6 - Produção de queijo Minas frescal	32
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
<u>FIGURA 01:</u> Cromatografia da renina microbiana de <u>Mucor miehei</u> em coluna DEAE-Sephadex A-50.	36
<u>FIGURA 02:</u> Cromatografia da renina microbiana de <u>Mucor miehei</u> em coluna CM-celulose.	37
<u>FIGURA 03:</u> Efeito do pH da atividade da enzima renina microbiana de <u>Mucor miehei</u> .	38
<u>FIGURA 04:</u> Efeito do pH na estabilidade da enzima renina microbiana de <u>Mucor miehei</u> .	39
<u>FIGURA 05:</u> Efeito da temperatura na atividade da enzima renina microbiana de <u>Mucor miehei</u> .	40
<u>FIGURA 06:</u> Estudo da termoestabilidade da enzima renina de <u>Mucor Miehei</u> .	41
<u>FIGURA 07:</u> Efeito da concentração de CaCl_2 na atividade da enzima renina microbiana de <u>Mucor miehei</u> .	42
<u>FIGURA 08:</u> Fluxograma do processamento de queijo tipo Minas frescal.	43
<u>FIGURA 09:</u> Relação entre a dose de radiação Ultravioleta e sobrevivência de colônias de <u>Mucor miehei</u> .	44

ÍNDICE DE TABELAS

<u>TABELA 01</u> : Purificação da renina microbiana de <u>Mucor miehei</u> .	45
<u>TABELA 02</u> : Efeito de sais minerais e compostos orgânicos na atividade da enzima <u>renina</u> de <u>Mucor miehei</u> .	46

R E S U M O

A linhagem de Mucor miehei NRRL 3420, que é produtora de renina microbiana, foi submetida a diferentes períodos de exposição à radiação ultravioleta para induzir mutações com o objetivo de se obter uma linhagem altamente produtora da enzima coagulante de leite.

Após vários estudos, determinou-se que exposição à radiação durante 10' 15' e 20' provocava taxa de mortalidade superior a 99,99% aumentando a probabilidade de se encontrar mutantes entre os sobreviventes.

Novecentas colônias foram isoladas e estudadas quanto a produção enzimática comparando-se com a linhagem original não mutada.

Foi obtida uma linhagem mutada que apresentou 122% a mais de produtividade enzimática.

A enzima foi então produzida por fermentação semi-sólida em meio farelo de trigo:H₂O (1:1), purificada e caracterizada como protease ácida termoestável e que necessita de íons Ca²⁺ para sua ação.

A enzima bruta foi utilizada no processamento de queijo minas frescal resultando um produto de boa qualidade.

S U M M A R Y

The strain Mucor miehei NRRL 3420, which is a microbial rennet producer, was exposed to ultraviolet radiation during different time periods to promote its mutation. The objective of this treatment was to obtain a lineage with a high rate of milk clotting enzyme production.

After some experiments, 10' 15' and 20' of ultraviolet radiation exposure showed a mortality rate superior of 99,99%, indicating a great chance to find a mutant among the survivors.

The enzymatic production was studied comparing 900 isolated colonies with their original lineage. Through such a procedure one mutated strain was obtained which showed an increase of 122% in enzyme production.

The enzyme was produced by semi solid fermentation with wheat bran: water (1:1). It was purified and characterized as a thermostable acid protease, which reacted only in the presence of calcium ions.

To test the efficiency of the crude enzyme extract, was used a "minas frescal" cheese-processing system.

The product exhibited good quality.

1 - INTRODUÇÃO

A renina (EC 3.4.4.3) é uma protease ácida, tendo ponto isoelétrico igual a 4,6 (10,48,56,64) e é também chamada quimosina ou quimase. Apresenta a propriedade específica de hidrolisar a K caseína, fração protetora do estado coloidal da caseína, a qual é formada pelas frações α , β , γ e K. A renina hidrolisa a ligação entre fenilalanina e metionina da fração K (58), desestabilizando o micélio de caseína e conseqüentemente ocorre a coagulação na presença de íons de cálcio (18,28,56,58,62,64,65).

A fonte tradicional de renina é o coalho, que é extraído do quarto estômago de bezerro e a maneira usual para sua obtenção é através do sacrifício do animal. É importante notar que a renina é o agente proteolítico de coagulação do leite encontrado no coalho, sendo que outras enzimas podem estar presentes no extrato bruto comercial (18,58,64).

Em 1874, Christian Hansen iniciou em Copenhagem a produção industrial do coalho (28). Este extrato enzimático teve um papel dominante na produção industrial de queijos por mais de 90 anos. Em virtude da crescente demanda do coalho pela indústria de queijos, a partir da década de 60 tem havido um interesse muito grande no sentido de se obter um substituto eficiente e econômico da renina animal (2,3,4,28,33,54,56).

Os possíveis substitutos para renina de bezerro podem ser provenientes de fonte animal, vegetal e microrganismos (28,56,58,64).

Coagulantes de origem animal representam um número de diferentes proteases, sendo que os mais comumente utilizados são a pepsina bovina, pepsina suína e pepsina de frango (28,58,64).

Vegetais produzem proteases que podem coagular o leite, mas não há enzimas originárias de plantas superiores disponíveis comercialmente (56, 58).

É sabido que certas bactérias, notavelmente Serratia marcerens, Streptococcus liquefaciens, algumas espécies de Bacillus, Proteus e Pseudomonas produzem uma enzima do tipo renina, a qual, sozinha ou em combinação com outras proteases, coagulam o leite mas também provocam a hidrólise, geralmente, completa da caseína (5, 56, 58, 59). Estas enzimas não são produzidas em escala comercial.

As enzimas de origem fúngica que coagulam o leite são as que tem oferecido maiores vantagens como substitutos da renina animal. Muitos foram os microrganismos que forneceram resultados positivos, porém somente de alguns deles conseguiu-se obter produtos comerciais já disponíveis no mercado (5, 27, 55, 59). Estes microrganismos produzem renina com razões atividade coagulante/atividade proteolítica das mais altas entre as reninas de origem microbiana (5, 55).

As enzimas microbianas já produzidas em escala comercial para serem usadas na fabricação de queijos são obtidas de Mucor pusillus (15, 33, 51, 58), Mucor miehei (15, 33, 41, 45, 51, 58, 60) e Endothia parasitica (33, 53, 58).

Foi demonstrado que existem similaridades no mecanismo de coagulação da caseína do leite pelas enzimas quimosina de bezerro e a produzida por Mucor miehei (61).

O aumento na produção industrial de queijos que tem ocorrido na última década tem provocado a necessidade de se obter fontes alternativas de boa qualidade que possam substituir a enzima tradicional obtida de abomaso de bezerros.

As enzimas coagulantes microbianas são especialmente favorecidas porque podem ser produzidas em grande escala, por processos fermentativos. Por este motivo, neste trabalho,

utilizou-se a linhagem de Mucor miehei NRRL 3420, que é produtora de renina microbiana (60,61) a qual apresenta mecanismo de ação sobre a caseína similar ao da renina obtida de abomaso de bezerro (9,61).

Esta linhagem foi submetida à mutação convencional com a finalidade de se obter uma nova linhagem que apresentasse maior produção de enzima após fermentação semi-sólida.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Substitutos para renina animal

As enzimas que coagulam o leite para produção de queijos têm sido usadas por muitos séculos, sendo que as primeiras tribos do Oriente Médio já usavam a fermentação natural ou a inoculação do leite para a obtenção e preservação de produtos derivados (56,58). O uso de enzimas tanto de fonte animal como de vegetal para a produção de queijos foi relatado em 100 DC (58).

Tradicionalmente o extrato obtido do abomaso (4º estômago) de bezerros foi usado durante muito tempo e era preparado em pequena escala, até que em 1874 passou a ser fabricado industrialmente por Christian Hansen em Copenhagem (28).

A renina (EC 3.4.4.3), a enzima ativa que coagula o leite, presente no extrato enzimático de estômago de bezerros, é uma protease ácida também denominada quimosina ou quimase (10, 28,48,56,58,64).

Outras proteases brutas que podem coagular o leite e formar um coágulo relativamente estável também são denominadas reninas (56). Para distinguí-las da renina animal, elas são usualmente especificadas com o nome relacionado com a fonte e têm sido obtidas de outros animais, plantas e especialmente microrganismos (5,27,33,56,58,59).

O coalho obtido de abomaso é ainda o mais importante e é usado como padrão para coagulantes de outras fontes (58), embora em algumas áreas ele quase não exista. Koning (28) relatou métodos para determinar a atividade proteolítica da quimosina e vários outros coagulantes.

Embora o abomaso de bezerros seja a fonte mais importante de renina, o estômago de outros ruminantes como o cordeiro e cabrito também são usados (56,58). Joginder e colaboradores (26) testaram os extratos de estômagos de bezerros, cabritos, búfalos e porcos. O extrato de búfalo jovem produziu queijo de qualidade inferior.

A escassez de coalho de abomaso induziu o experimento para a produção de renina usando-se o animal vivo. Masek e colaboradores (32) usaram canículos plásticos para a coleta de coalhos de bezerros e encontrando rendimento considerável quando comparado com o método tradicional de extração.

A renina está relacionada com um sinônimo de coalho e isso ocasionalmente ainda é usado. Mas, além da renina, muitas outras enzimas estão presentes no extrato de abomaso de ruminantes jovens. Gradualmente, a pepsina substitui a renina conforme o animal cresce e começa a se alimentar de gramíneas.

Nelson (33) apresentou os seguintes resultados:

extrato de abomaso de bezerros - 94% renina e 6% de pepsina;
extrato de abomaso bovino adulto - 94% de pepsina e 6% de renina.

O extrato obtido de bovino adulto apresentou um rendimento mais baixo quando comparado com o extrato de abomaso de bezerros (14, 56,58).

O uso de pepsina e mais particularmente pepsina bovina no processamento de queijos foi verificado há alguns anos atrás, mas aparentemente sem sucesso (14,56).

Na prática não se usa apenas pepsina para o processamento de queijos, pois ela apresenta algumas desvantagens quando usada isoladamente. Entre elas podemos citar um período de tempo mais longo para a formação de um coágulo que não possui a mesma elasticidade e firmeza daquele obtido pela ação de renina de bezerro, resultando um produto final de qualidade inferior (56).

Em anos recentes, o uso de coalho de abomaso de bezerro misturado com pepsina suína tornou-se extenso, e ainda mais recentemente o uso de pepsina bovina combinada com reninas de outras fontes veio à tona novamente, juntando-se a estas também pepsina de frango (19, 21).

O aumento na produção mundial de queijos a partir de 1960 e o decréscimo na produção de coalho de abomaso de bezerro resultaram numa escassez da renina tradicional (4, 10, 28, 33, 56, 58, 61).

A produção de renina pelo método clássico em quantidade suficiente para atender a produção nacional de queijos, em estabelecimentos com Inspeção Federal estimada em 164.000 toneladas para 1982, exigiria o abate de 195.253 bezerros por ano (8) o que além de proibido por lei, levaria o mercado de carne bovina ao colapso, posto que não seria permitido que o bezerro atingisse desenvolvimento necessário para o corte.

Atualmente existem evidências de que o coalho de estômago de bezerros não participa significativamente na produção de queijos, tendo sido substituído por outros coalhos e coagulantes de origem animal, microbiana e vegetal (28,33, 52, 56, 63).

Estes fatores têm induzido maior atividade na pesquisa para obtenção de novos coagulantes a partir de fontes diferentes.

Qualquer substituto da renina de bezerro deve satisfazer um número de requerimentos rigorosos tais como coagulação efetiva do leite, sem indevida hidrólise do coágulo; aroma característico; desenvolvimento de corpo e textura; cor e odor aceitáveis; ausência de toxinas e patógenos e preço competitivo.

Plantas superiores produzem proteases que podem coagular o leite. A enzima proteolítica está presente nas diferentes partes da planta como frutos, folhas, flôres, raízes, sendo que uma revisão neste campo mostrou que inúmeras es

pécies de plantas, representando mais de 24 gêneros, foram estudadas em relação ao seu poder coagulante (56,58). Foi provado que as enzimas de origem vegetal têm alta atividade proteolítica para terem valores práticos bons no processamento de queijos. Poucas delas apresentaram resultados aceitáveis, entre as quais estão incluídas a abóbora (Curcubita pepo), a alcachofra (Cynara cardunculus) e a figueira (Ficus carica) (20,56,58).

Singh e colaboradores (56) descreveram a preparação de queijos com a enzima isolada e purificada a partir das bagas da Withania coagulans com o leve aparecimento de sabor amargo, que não desapareceu após a cura.

Durante os últimos 10 anos, a renina microbiana tem encontrado larga aplicação na indústria de queijos. Em 1892, Conn (12) e Gorini (17) independentemente, relataram a produção de enzima coagulante de leite por bactéria. A partir de então foi verificadø que muitas bactérias produzem enzima coagulante, mas a maior parte delas apresentando a razão atividade coagulante/atividade proteolítica muito baixa. Todavia existem algumas bactérias que produzem enzimas que têm sido usadas para produzir queijos, entre elas estão Bacillus cereus, Bacillus mesentericus, Bacillus polymyxa e Bacillus subtilis (7,28,46,56,58).

Apenas três reninas de origem fúngica tiveram sucesso na produção de queijos e estão disponíveis em escala comercial. São derivadas de Endothia parasitica (7,28,33,53,55,56,58), Mucor miehei (7,15,28,33,56,58,60,61) e Mucor pusillus Lindt (2,5,6,26,33,42). Estes três organismos produzem renina com razão de atividade coagulante/atividade proteolítica mais alta em relação a outras reninas microbinas.

Três proteases ácidas extracelulares produzidas por linhagens diferentes de Mucor miehei têm sido descritas na literatura.

São reninas produzidas por Mucor pusillus Lindt (7,28,33,56) caracterizado por Arima e colaboradores; renina de Mucor miehei produzida pela linhagem CBS nº 370.65, caracterizada por Ottensen Rickert (39,49,50) e uma outra também denominada Mucor miehei protease produzida pela linhagem NRRL 3420, caracterizada por Sternberg (60,61).

A renina derivada de Mucor miehei tem mostrado o maior sucesso na elaboração de vários tipos de queijos (1,7,22,32,42,47,58).

Estudos baseados em peso molecular e análise de aminoácidos sugerem que a protease produzida por Mucor miehei NRRL 3420 é distintamente diferente das outras duas proteases também produzidas por Mucor (51)

A coagulação do leite é o resultado final de uma série de eventos complexos. Neste processo, duas fases distintas podem ser observadas: a primeira, fase enzimática, na qual a enzima proteolítica cliva a ligação β -alanina-metionina da K caseína, liberando um glicomacropeptídeo e para K caseína e uma segunda fase, não enzimática, na qual ocorre a coagulação na presença de íons cálcio (28,52,58).

A K caseína é solúvel em 12% de ácido tricloroacético e contém caracteristicamente ácido N-acetilneuramínico. A liberação de ácido N-acetilneuramínico pela ação da enzima microbiana e renina de bezerro sobre a fração K da caseína é quase idêntica, sugerindo que a coagulação do leite pela protease de Mucor miehei NRRL 3420 parece seguir o mecanismo aceito para renina de bezerro (61).

As imagens eletroforéticas obtidas pela análise do leite coagulado por renina de bezerro e protease de Mucor miehei NRRL 3420 foram idênticas (28,52).

A ação proteolítica das duas enzimas sobre a caseína e sobre a cadeia beta da insulina oxidada parecem ser semelhantes (9,61) assim como a resposta a inibidores ao centro ativo das enzimas (61). Estas similaridades moleculares indicam a possibilidade de se substituir com sucesso a renina de bezerro na manufatura de queijos(61).

Ao longo do tempo, a renina de bezerro poderá ser amplamente substituída. A renina microbiana, principalmente as produzidas por Mucor, deverão ser aplicadas largamente na elaboração de diferentes tipos de queijos. Todavia, muito estudo deve ser feito ainda, sobretudo nas áreas que incluem modificação da renina microbiana por tratamentos físicos, químicos e/ou enzimáticos, assim como por manipulação genética e fisiológica das culturas(56).

Há que se estudar também a formulação de novas combinações de enzimas e inovações no processamento de queijos (56).

2.2 Mutação - Definições e Conceitos

Durante muitos anos a genética aplicada não foi capaz de desenvolver técnicas que preencheriam as necessidades da indústria de fermentação. Microbiologistas e bioquímicos identificaram muitos produtos de origem microbiana e durante décadas estes compostos foram produzidos pelo uso de culturas puras de microrganismos que eram selecionados através do estudo de um largo número de colônias (40).

Recentemente, a indústria da fermentação sofreu grande progresso devido principalmente a estudos de melhoramento genético, técnicas do isolamento e conservação adequadas, podendo-se então obter melhores linhagens, o que é

mais vantajoso para aplicações práticas.

Os métodos disponíveis atualmente para esses fins são: mutação convencional, fusão de protoplastos e DNA recombinante.

No senso estrito, mutação é qualquer mudança hereditária na sequência do par de bases do DNA de um organismo (25). Operacionalmente, uma mutação é definida por qualquer mudança hereditária detectável no fenotipo de um organismo (25).

Todas as propriedades da célula viva são em última análise controladas por genes, assim sendo, qualquer característica pode ser alterada como resultado de uma mutação. Entre elas, as mais importantes são (40):

- 1) Mutantes que exibem maior tolerância a agentes inibidores, particularmente antibióticos (mutantes antibióticos ou droga-resistentes).
- 2) Mutantes que demonstram capacidade fermentativa alterada ou habilidade aumentada ou diminuída para produzir algum produto final.
- 3) Mutantes nutritivamente deficientes, isto é, que requerem um meio mais complexo para seu crescimento, comparado com o meio que permite o desenvolvimento das células originais.
- 4) Mutantes que demonstram alterações morfológicas da colônia ou da capacidade de elaborar pigmentos.
- 5) Mutantes que exibem alguma alteração morfológica, como a perda da capacidade de produzir esporos, cápsulas ou flagelos.
- 6) Mutantes que apresentam alteração na composição química da célula (mutantes antigênicos).

7) Mutantes que são resistentes à ação de bacteriófagos.

A mutação ao nível de bases individuais numa sequência codicadora pode ser definida em termos de substituição de par de bases ou por eventos que modifiquem a leitura do esqueleto por inserção ou deleção de um par de bases (25).

A mutação causada por substituição de par de bases pode resultar na substituição de um aminoácido na proteína, podendo causar sua completa inativação, modificação de seu K_m , pH ótimo e mudanças na estabilidade térmica ou então a sequência codificadora torna-se uma sequência terminal e como resultado a cadeia polipeptídica é terminada antes de estar concluída e uma proteína modificada é formada (25).

A deleção e inserção resulta numa proteína com a sequência de aminoácidos inteiramente diferente (25).

Todas as mutações resultam de eventos os quais estão além da habilidade da célula em reparar danos genéticos. Razões espontâneas de mutação refletem o número de eventos os quais não são reparados sob condições normais. Este evento raramente acontece para uma dada população celular. O fato da maioria das mutações serem suprimidas torna mais importante as vantagens obtidas através de mutação convencional, ou seja, mutação induzida pelo uso de agentes mutagênicos (25).

2.2.1 Mutação Induzida - Agentes Mutagênicos

A frequência de mutação espontânea em qualquer sítio genético (DNA - Nucleotídeo) é usualmente baixa, sempre na média de 10^{-8} a 10^{-10} para cada replicação do genoma (24). O aumento da frequência de mutação pode ser obtido através de uma variedade de tratamentos mutagênicos. Tais agentes podem causar mudan

ças no DNA, as quais se não forem reparadas por mecanismos celulares, provocarão uma mutação permanente e hereditária (13,24,25,31). Assim a indução de mutação através de agentes mutagênicos tornou-se bastante desejada, visto que aumenta a taxa de mutabilidade.

A seleção de técnicas mutagênicas adequadas é a principal parte de qualquer programa que envolva melhoramento genético através de mutação induzida (24,25).

Os agentes mutagênicos disponíveis atualmente são numerosos, conforme serão descritos abaixo:

1) Agentes Mutagênicos Químicos(23,24,25)

1.a) Bases análogas

Bases análogas tais como 5-Bromouracil, 5-Bromodeoxiuridina e 2-Aminopurina, podem induzir mudanças genéticas pela indução direta de erros no pareamento de bases, o que significa a incorporação de bases análogas mutagênicas no DNA, as quais são quimicamente semelhantes às bases dos ácidos nucleicos. Mutagênese por bases análogas é usualmente fraca e geralmente ocorre reversão à linhagem original.

1.b) Nitrito

Ácido nítrico desamina oxidativamente a guanina, a adenina e a citosina conforme indicado abaixo:

adenina → hipoxantina (que pode parear com citosina).

Citosina → uracil (que pode parear com adenina).

guanina → xantina (que não parecia com bases pirimidínicas e tem efeito letal).

1.c) Hidroxilamina

Promove a transformação de citosina a 4-hidroxiaminocitosina ou 5-hidroximetilcitosina ou 5,6-dehidro-6-hidroxiaminocitosina. Estes compostos podem parear com adenina.

1.d) Agentes Alquilantes

Também modificam as bases do DNA. Etilmetano sulfanato, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina e dietilsulfato transformam a adenina a 7-etilguanina por alquilação.

1.e) Proflavina e Acridina

Provocam alteração da cadeia de bases pela adição de bases estranhas, intercalando-se entre as bases do DNA.

2) Agentes Mutagênicos Físicos

2.1) Irradiação (23,25,30)

Não somente induz mutação no material genético mas pode produzir a formação de radicais ativos que influem indiretamente.

2.1.a) Radiações Ionizantes (23,25,30)

Raios X, raios gama (Co^{60}), podem provocar quebra na fita de DNA, quebra de ligações de hidrogênio entre bases complementares,

alteração das bases e ligação entre diferentes moléculas de DNA.

2.1.b) Radiação ultravioleta

A principal característica da radiação ultravioleta quando aplicada em fungos e em outros sistemas também, é a correlação geral entre atividade e comprimento de onda correspondente àquela da absorção do ácido nucleico(30)

Em termos gerais, podemos dizer que as moléculas de ácido nucleico dos cromossomos e gens especificamente, absorvem a energia da luz e sofrem mudanças químicas as quais em caso extremo podem ser fatais (23,31,40,44).

Pomper e Atwood (44) fizeram um estudo sobre os efeitos da luz ultravioleta em fungos e verificaram que a maioria deles mostraram uma ação similar do espectro e uma efetividade máxima da radiação a aproximadamente 260 nm. Concluíram que a radiação ultravioleta exerce seu efeito mutagênico através do ácido nucleico, mais comumente através do DNA nuclear.

Então as bases pirimidinas, timina e citosina, são mais sensíveis à radiação ultravioleta do que as bases purinas, adenina e guanina (29, 31, 40, 44). A alteração particular que mais parece ocorrer é a formação do dímero

ciclobutano de pirimidina. Três tipos de dímeros são possíveis:

Timina-Timina; Timina-Citosina e Citosina-Citosina, sendo que dímeros de timina são mais facilmente formados (13,23,31,40,44).

As lesões causadas por radiação ultravioleta podem ser reparadas por fotoreativação (40, 44), ou seja, fenômeno causado pela exposição do organismo à luz visível, ou então os dímeros de pirimidina podem ser cortados do DNA por um mecanismo de reparo que envolve a ação das enzimas ultravioleta endonuclease, DNA polimerase e DNA ligase (24).

As lesões que escapam ao sistema de reparo resultam numa variedade de mutações que dependem do local da lesão no gene (24)

2.2.2 Fusão Protoplástica

A fusão de protoplastos para formar células heterocarióticas é uma técnica bem desenvolvida em sistemas de mamíferos e plantas, que está surgindo agora como uma técnica a mais, útil no estudo da genética parasexual, isto é, de todos os processos não meióticos em células vegetativas que dão origem à recombinação genética (16).

A técnica consiste na produção de protoplastos pelo uso de enzimas líticas, como quitinases, a partir de células heterogêneas com no mínimo 2 genes para auxo

trofia crescidas separadamente em meio complexo estabilizado osmoticamente pela adição de sais inorgânicos. Após a ação das enzimas líticas faz-se a agregação dos protoplastos em meio mínimo contendo polietileno glicol e íons cálcio obtendo-se a fusão espontânea (16).

Em sistemas nos quais não existe ciclo sexual, a formação de heterocarion é difícil de ocorrer, e a conjugação interespecie é agora passível de estudos genéticos (38). A fusão protoplástica representa uma técnica importante para a criação de microrganismos de importância industrial, cujos sistemas genéticos não são entendidos (16).

Uma aplicação importante de fusão de protoplastos é o estabelecimento de um sistema de recombinação através de fusão em linhagens novas (16).

A fusão de protoplastos foi estudada utilizando-se Bacillus, Streptomyces e fungos superiores. As bactérias Gram negativas não estão sujeitas à fusão protoplástica, isto porque a sua membrana externa parece agir como uma barreira para o uso desta técnica (40).

A radiação ultravioleta da célula seguida por fusão tem mostrado um aumento de 40% na frequência da fusão protoplástica (40).

Outro aspecto interessante é que mais de duas linhagens podem ser combinadas em um experimento de fusão de protoplastos (16).

A fusão de protoplastos de Mucor pusillus e Mucor miehei foi estudada para desenvolver a criação de um sistema para a produção microbiana de renina. Este estudo foi realizado para desenvolver um método efetivo para a obtenção de heterocarion intra e interespecífico do Mucor termofílico (38).

2.2.3 DNA Recombinante

O uso de plasmídeos, enzimas de restrição e DNA polimerase torna possível a construção de DNA híbrido de diversas fontes. Existem técnicas disponíveis para fácil manipulação dos genes e construção de moléculas de DNA recombinante de tipos que provavelmente nunca seriam obtidos por evolução natural. Se estes DNA recombinantes forem plasmídeos, existem experimentos que permitem a inserção destes plasmídeos dentro de um hospedeiro bacteriano, onde possa ocorrer replicação. Se os genes do plasmídeo puderem ser completamente expressos na célula hospedeira, então um fenotipo completamente novo pode ser criado (24,40).

A técnica de DNA recombinante permite a construção de novas linhagens microbianas com propriedades de potencial útil (24). Por exemplo, genes de um microrganismo fixador de nitrogênio podem ser removidos e inseridos em um não fixador de nitrogênio, com a vantagem de aumentar a razão de bactérias capazes de fixar nitrogênio no solo (24,25).

Atualmente é mais significativa a possibilidade de introduzir-se genes de mamíferos em uma bactéria e obter produtos codificados por genes de mamíferos. Um interesse prático para isto é a produção de insulina humana usando organismos recombinantes e fermentação em larga escala (25). Outras possibilidades seriam a produção de hormônios, enzimas, anticorpos, vacinas, interferon, etc. também por processo de fermentação industrial (25).

Nishimori e colaboradores (34, 35, 36, 37) relataram o isolamento do mRNA específico para prorenina do tecido de 4º estômago de bezerros e o clonagem de seu DNA complementar em Escherichia coli o qual foi expresso efetivamente.

2.2.4 Mucor miehei - Mutação convencional através de exposição à radiação ultravioleta

Durante um estudo da resposta dos zigomicetos homotático e termofílico Mucor miehei NRRL 3420 à radiação ultravioleta foi observado uma classe de variantes que se assemelha ao mutante morfológico de Mucor hiemalis Wehmer (11,29).

A mudança morfológica estável sugere que a radiação ultravioleta altera irreversivelmente alguns aspectos do metabolismo do microorganismo.

3 - MATERIAIS

3.1 Linhagem utilizada

Foi utilizada a linhagem de Mucor miehei NRRL 3420 obtida do Northern Regional Research Laboratories, Peoria, ILL, USA.

3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram obtidos das firmas Carlo Erba, Merck e Sigma.

A glicose foi obtida da Merck enquanto amido solúvel, peptona, extrato de levedura, ágar, e ágar desoxicolato lactose para a formulação dos meios de cultura foram obtidos da Difco.

3.3. Equipamentos

Todas as pesagens envolvidas no presente trabalho foram executadas em balança analítica ou semi analítica SAUTER e as operações de centrifugação em centrífuga Beckman, modelo J-21B.

Para as diversas determinações de pH e preparações de tampões foi empregado pHmetro HORIBA H-5.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave SOC. FABBE LTD., enquanto a fermentação desenvolveu-se em estufa bacteriológica FANEM.

As leituras de absorbância a 280 nm para determinação de proteína foram feitas em Espectrofotômetro UV Perking-Elmer Coleman-124D.

4 - MÉTODOS

4.1 Reativação da linhagem

A linhagem de Mucor miehei NRRL 3420 foi transferida para tubos contendo ágar batata inclinado e incubadas a 30°C durante uma semana para reativação.

4.2 Escolha do meio de cultura para a obtenção de colônias isoladas de Mucor miehei

Os seguintes meios descritos abaixo foram testados quanto ao crescimento de colônias isoladas de Mucor miehei após tratamento com luz ultravioleta:

- ágar desoxicolato lactose.
- ágar desoxicolato lactose contendo 1% de leite desnatado preparado separadamente e misturados após a esterilização.
- ágar desoxicolato lactose contendo 1% de leite desnatado misturados antes da esterilização.
- ágar desoxicolato lactose contendo 2% de caseína (a caseína foi pesada assepticamente e dissolvida em água destilada e esterilizada e depois adicionada ao meio estéril).
- ágar YPG-20 (29): 3g de extrato de levedura
10g de peptona
20g de glicose
15g de ágar
volume final: 1 litro.
- ágar YpSs (29): 4g de extrato de levedura
15g de amido solúvel
1g de KH_2PO_4
0,5g de MgSO_4
volume final: 1 litro.

- ágar batata: ferver em água em ebulição durante 10 minutos 25g de batata cortada em pedaços pequenos, filtrar e ao filtrado adicionar 10g de dextrose e 8g de ágar. Completar o volume para 250ml com água destilada e ferver a té a dissolução completa do meio. Esterilizar a 121°C/15 minutos.
- ágar Sabouraud da Difco.
- meio YPG-20 líquido (a mesma composição descrita anteriormente sem o ágar).
- meio YpSs líquido (a mesma composição descrita anteriormente sem o ágar).

4.3 Técnica de Mutação

Esporos de Mucor miehei NRRL 3420 foram coletados de oito tubos contendo ágar batata inclinado. Adicionou-se água destilada e esterilizada em cada tubo para se obter um volume final de 50ml. A superfície do ágar foi raspada com uma alça estéril para facilitar a remoção dos esporos. Filtrou-se a suspensão de esporos duas vezes em lâ de vidro a fim de se obter apenas a presença de monoesporos. Fez-se a contagem de esporos presentes na suspensão usando-se um contador de leucócitos.

5ml desta suspensão foi adicionada a placas de Petri e expostas à radiação ultravioleta por diferentes períodos de tempo. Para a irradiação usou-se lâmpada de 15W com luz emitida a 300 nm a uma distância de 17cm das placas contendo suspensão de esporos.

Os tempos de exposição testados foram 5', 10', 15', 20', 25', 30', 35', 40' e 45'.

Após a irradiação foi adicionado 20ml de água destilada e esterilizada em cada placa.

Em placas contendo ágar batata, foi inoculado por esgotamento 0,1 ml das soluções com diferentes tempos de tratamento e incubadas a 30°C até crescimento de colônias isoladas que eram transferidas para tubo contendo ágar batata inclinado e incubado novamente a 30°C para crescimento.

4.4 Seleção de colônias mutadas

Para verificar a presença de mutação, as colônias isoladas de acordo com o item anterior foram testadas quanto a atividade coagulante da enzima produzida conforme descrito no item 4.7.

4.5 Produção da enzima renina microbiana de *Mucor miehei*

A enzima foi produzida por fermentação em meio semi-sólido farelo de trigo:água na proporção 1:1, sendo que para tanto 20g do meio de cultura foram esterilizados em erlenmeyer de 500ml a 121°C/20 minutos e inoculado com esporos das colônias obtidas no item 4.3 e incubados a 30°C /120 horas para crescimento e produção da enzima.

4.6 Obtenção da enzima

Adicionou-se 100ml de água destilada e esterilizada aos erlenmeyers descritos no item 4.5, misturou-se bem e deixou-se em repouso durante 1 hora. Após, filtrou-se em lâmina de vidro obtendo-se então o extrato bruto da enzima, do qual foi determinada a atividade coagulante de acordo com o item 4.7.

4.7 Teste da atividade coagulante da enzima

A atividade coagulante foi determinada de acordo com o método de Soxhlet (61), usando-se como substrato leite em pó desnatado diluído a 10% com água destilada e contendo 0,01 M de Cloreto de Cálcio.

10 ml de substrato foram colocados em tubos de ensaio e equilibrado à temperatura de 35°C/10 minutos em banho maria. Adicionou-se 1 ml da solução enzimática obtida no item 4.6 anotando-se o tempo exato para o aparecimento dos primeiros flóculos de coágulo. Uma unidade de atividade coagulante expressa como unidade.Soxhlet foi definida como sendo a quantidade de enzima que coagula 1 ml de substrato em 40 minutos nas condições descritas.

O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Unidade Soxhlet} = \frac{\text{ml de substrato}}{\text{enzima (ml)}} \times \frac{2.400}{\text{tempo (seg)}}$$

4.8 Escolha da melhor linhagem

Foram testados aproximadamente 900 colônias obtidas de acordo com o item 4.4 comparando-se a atividade destas com a da linhagem original descrita no item 3.1, escolhendo-se a que apresentou menor tempo de coagulação ou seja maior atividade coagulante.

4.9 Produção e obtenção da enzima usando-se a linhagem mutada escolhida

A linhagem escolhida conforme o item 4.8 foi inoculada em 12 erlenmeyers de acordo com o item 4.5 e o extrato bruto obtido conforme o item 4.6.

4.10 Purificação da enzima

4.10.1) Fracionamento da enzima com sulfato de amônio

O extrato bruto (940 ml) de enzima foi saturado a

80% com sulfato de amônio (527,3g). A mistura foi deixada em repouso durante 24 horas/5°C, para completa sedimentação. A maior parte do sobrenadante foi retirada por decantação e o restante contendo a enzima, foi centrifugado a 20.000 x G durante 10 minutos, reservando-se o precipitado.

O precipitado obtido foi dissolvido em 20ml de água destilada sendo posteriormente dialisado contra água destilada em membrana de colágeno por 48 horas a 5°C e após em tampão fosfato 0,05M pH 7,0. A amostra dialisada foi reservada para posterior aplicação em coluna DEAE-Sephadex A-50.

4.10.2) Cromatografia da enzima em coluna DEAE-Sephadex A-50

Tratou-se previamente 20g de DEAE-Sephadex A-50 com 500ml de NaOH 0,5 N e lavou-se com água destilada. A seguir, tratou-se com 500ml de HCl 0,5 N e finalmente equilibrou-se em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0.

O fluxo da coluna foi regulado em 5ml/30 minutos e a amostra dialisada (60ml) obtida no item 4.10.1 aplicada à coluna DEAE-Sephadex A-50 (2,5cm x 30cm) foi eluída com concentrações crescentes de NaCl (0,1 N a 0,8 N) em tampão fosfato 0,05 M, pH 7. As frações de 5ml foram recolhidas a cada 30 minutos e o curso de eluição das proteínas da coluna foi seguido pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Coleman modelo 124D.

A atividade enzimática das frações foi determinado de acordo com o item 4.7.

As frações de número 72 a 108 contendo atividade coagulante foram reunidas num total de 180ml e diali-

sada contra tampão fosfato 0,05 M pH 7 em membrana de colágeno a 48 horas a 5°C e percolada em coluna CM-celulose de acordo com o item 4.10.3.

4.10.3) Cromatografia da enzima em coluna CM-celulose

Tratou-se previamente 30g de CM-celulose (carboximetil-celulose) com 500ml de HCl 1 N, lavou-se com água destilada para a remoção do HCl. Em seguida tratou-se com 500ml de NaOH 1 N, lavou-se com água destilada para remoção do NaOH e finalmente equilibrou-se com tampão fosfato 0,05 N pH 7. A solução enzimática obtida no item 4.10.2 (140ml) foi percolada em coluna CM-celulose (2,5cm x 30cm). As proteínas foram eluídas por aplicação de concentrações crescentes de NaCl (0,1N a 0,8N) em tampão fosfato 0,05 M pH 7. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm e atividade enzimática das frações foi determinada de acordo com o método descrito no item 4.7.

As frações de número 16 a 53 contendo atividade coagulante foram reunidas num total de 185ml e em seguida conservada em congelador.

4.11 Caracterização da enzima purificada

A enzima coagulante da linhagem mutada de Mucor miehei purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 4.10 foi utilizada para estudo de caracterização de renina.

4.11.1) Efeito do pH na atividade enzimática

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática usou-se o método descrito no item 4.7 utilizando-se como substrato leite em pó desnatado diluído a 10% em tampão de diferentes valores de pH e contendo 0,01 M de Cloreto de Cálcio. Os sistemas tam-

pões foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: tampão acetato de sódio/ácido acético 0,1 M de pH 3,6 a 5,5; tampão fosfato de sódio 0,1 M de pH 5,0 a 7,0; tampão ácido bórico-bórax 0,1 M de pH 7,5 a 9 e tampão borato-NaOH 0,1 M de pH 9 a 10.

4.11.2) Efeito do pH na estabilidade da enzima

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade da enzima, 1ml da solução enzimática foi incubada com 1 ml de tampão de diferentes valores de pH durante 24 horas à temperatura ambiente. Foram utilizados os mesmo sistemas tampões descritos no item anterior.

Após a incubação foram adicionados 2ml de tampão fosfato pH 5 0,2 M à solução enzimática e a atividade residual foi determinada pelo ensaio de atividade descrito no item 4.7.

4.11.3) Efeito da temperatura na atividade enzimática

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática utilizou-se o método descrito no item 4.7, sendo que o substrato foi previamente incubado a diferentes temperaturas entre 25°C e 80°C.

4.11.4) Termoestabilidade da enzima

Para o estudo da termoestabilidade enzimática 1 ml de solução enzimática foi colocado em tubos de rosca e pré incubados à diferentes temperaturas entre 25°C e 80°C por diferentes tempos que variaram de 5 minutos a 15 horas. Atividade residual da enzima foi determinada de acordo com as condições descritas no item 4.7.

4.11.5) Efeito de sais minerais e compostos orgânicos na atividade enzimática

O efeito de sais minerais na atividade enzimática foi verificado dentro da faixa onde não havia interferência como método de determinação de atividade (ítem 4.7).

Foram adicionados em tubos de ensaio 1ml de solução enzimática e 1ml dos seguintes sais: NaCl, KCl, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MnCl_2 \cdot 6H_2O$, $K_2Cr_2O_7$, K_2CrO_4 , $HgCl_2$, Al_2O_3 oxalato de sódio, molibdato de sódio, acetato de zinco, $Na_4P_2O_7$, $Na_2S_2O_5$ e dos compostos orgânicos:

EDTA e mercaptoetanol na concentração necessária para 1,0mM de sal em relação ao volume final da mistura. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente a atividade da enzima foi determinada de acordo com o ítem 4.7.

4.11.6) Efeito da concentração de cloreto de cálcio na atividade enzimática

O efeito da concentração de cloreto de cálcio na atividade coagulante da enzima foi determinado de acordo com o ítem 4.7, usando-se como substrato leite em pó desnatado diluído a 10% com água destilada e contendo cloreto de cálcio nas concentrações de: 0,1%; 0,25%; 0,5%; 0,75% e 1% respectivamente.

4.12 Aplicação da enzima coagulante de Mucor miehei na fabricação de queijo minas frescal

A figura 8 mostra o fluxograma do processamento de queijo tipo minas frescal.

Foram processados paralelamente queijo minas frescal utilizando a enzima bruta produzida pela linhagem mutada de Mucor

miehei e a enzima comercial Ha-La da Ha-La do Brasil
(Christian Hansen Indústria e Comércio Ltda.)

5 - RESULTADOS

5.1 Escolha do meio de cultura apropriado para a seleção de colônias mutadas de Mucor miehei.

Nos meios contendo ágar desoxicolato lactose não houve crescimento de colônias isoladas de Mucor miehei.

Nos meios YpSs e YP6-20 líquidos a produção de enzima foi muito baixa. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 4.7.

Nos demais meios o crescimento foi observado da seguinte maneira:

YP6-20 > ágar batata > YpSs > Sabourand

Devido ao menor custo e disponibilidade o meio ágar batata foi escolhido e usado durante todo o experimento.

5.2 Escolha do tempo de irradiação

Foi observado que 5' de irradiação não provocava crescimento de colônias isoladas. Os tempos de exposição de 25'a 45' foram letais aos microrganismos, não havendo crescimento.

Os tempos de irradiação ultravioleta utilizados durante todo o experimento foram 10', 15' e 20', pois provocaram uma taxa de mortalidade de 99,99% conforme mostra a figura IX.

5.3 Seleção de colônias mutadas

Das 900 colônias testadas foram selecionadas 4 que apresentaram atividade enzimática maior que a da enzima produzida pela linhagem original não mutada.

Para posterior caracterização da enzima apenas, utilizou-se a linhagem cuja atividade enzimática era maior de todas.

Atividade enzimática da linhagem original: 1'40'' correspondentes a 240 US.

Atividade original da mutada: 45'' correspondente a 533 US.

5.4 Purificação da enzima

As etapas de purificação da renina de Mucor miehei estão sumarizadas na tabela 1.

A preparação bruta da enzima foi purificada 2,4 vezes, ou seja, apresentou atividade específica 2,4 vezes maior que a do extrato bruto, após fracionamento com sulfato de amônio seguido de diálise, cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50 e CM-celulose.

A figura 1 ilustra o fracionamento obtido após a eluição das proteínas absorvidas em DEAE-Sephadex A-50 com concentrações crescentes de NaCl (0,1 M a 0,8 M) em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0.

Nesta etapa foi obtida uma atividade enzimática de 571,4 US/ml.

A figura 2 ilustra o fracionamento obtido após eluição das proteínas em coluna CM-celulose com concentrações crescentes de NaCl (0,1 a 0,8 M) em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0.

A tabela 1 indica que foi obtida uma purificação de 16,8 vezes e uma atividade enzimática de 55,8 US/ml.

5.5 Caracterização da enzima

5.5.1) Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática da enzima renina foi determinado de acordo com o item 4.11.1.

A figura 3 mostra que a enzima apresenta maior atividade a pH 5,0, em tampão acetato. Não foi possível de terminar-se atividade enzimática nos pH 3,6; 4,0 e 4,5, pois estes provocaram a precipitação ácida do substrato.

5.5.2) Efeito do pH na estabilidade da enzima

O estudo referente à influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item

4.11.2. A figura 4 ilustra a estabilidade enzimática, a enzima em estudo foi estável entre pH 3,6 e 4,0. A enzima foi completamente inativada a pH 8,0, sendo que a valores de pH superiores a 6,0 ela perde 50% de sua atividade.

5.5.3) Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade renina foi determinado de acordo com o item 4.11.3. A figura 5 mostra os resultados. A enzima apresenta maior atividade a 60°C.

5.5.4) Termoestabilidade da enzima

O estudo referente à influência da temperatura na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 4.11.4 e através dos resultados apresentados na figura 6 verificamos que a enzima retém 65% de atividade após 15 horas à temperatura de 30°C.

Após 15 horas a 35°C e 40°C, a atividade residual é de 6,0% sendo completamente inativada após 15 horas à temperaturas superiores.

5.5.5) Efeito de sais minerais na atividade enzimática

O efeito de sais minerais na atividade enzimática foi verificado de acordo com o item 4.11.5. A tabela 2 apresenta os resultados.

Observou-se que de 10^{-3} mM de NaCl, KCl, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ aumentam a atividade coagulante da enzima; oxalato de sódio em um grau reduzido diminui a atividade coagulante da enzima; HgCl_2 , Al_2O_3 e $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ reduzem em grau elevado a atividade enzimática.

A presença de EDTA e mercaptoetanol não interferem na atividade enzimática.

5.5.6) Efeito da concentração de CaCl_2 na atividade enzimática

O efeito da concentração de cloreto de cálcio na atividade enzimática foi determinado de acordo com o item 4.11.6.

A figura VII mostra que a uma concentração 0,5% de CaCl_2 a enzima apresenta 96% de sua atividade. A concentrações inferiores ela perde gradativamente sua atividade, atingindo valores máximos a concentrações superiores a 0,75%.

5.6 Produção de queijo minas frescal

O queijo produzido com a enzima obtida, linhagem mutada de Mucor miehei, apresentou as mesmas qualidades do queijo produzido com a enzima comercial Ha-La da Ha-La do Brasil (Christian Hansen Indústria e Comércio Ltda.) e após dez dias de armazenamento em câmara fria não houve mudança de textura e nem presença de sabor amargo, conforme foi verificado pelo autor do trabalho por comparação entre os queijos processados com as duas enzimas.

6 - DISCUSSÃO

- 6.1 A linhagem de Mucor miehei NRRL 3420, é produtora de enzima coagulante de alta qualidade (5, 24,26,39), a qual é produzida industrialmente e já foi testada na produção de queijos resultando num produto final de boa aceitabilidade (41, 42, 43, 44, 45).

Através da radiação ultravioleta da cultura, foi verificado que esta linhagem sofre mutação morfológica (27).

Neste trabalho a linhagem foi submetida à mutação convencional por exposição à radiação ultravioleta, com o intuito de se conseguir uma mutação fisiológica da cultura que resultasse numa maior produtividade enzimática.

- 6.2 Foi determinado que tempos de exposição à radiação ultravioleta de 10', 15' e 20' provocaram uma taxa de mortalidade superior a 99,99% aumentando a chance de ocorrer alterações a nível de DNA nuclear, ou seja, formação de dímeros de pirimidina entre os sobreviventes. Esta possível modificação no sistema genético está relacionada com mudanças no metabolismo do microrganismo e que se não forem reparadas resulta num mutante estável.
- 6.3 Foi obtida uma linhagem altamente produtora e após produção e caracterização da enzima verificou-se que ela manteve as mesmas propriedades da linhagem original não mutada.
- 6.4 A protease coagulante isolada da linhagem mutada é de acordo com a figura I, o principal componente do extrato bruto enzimático.
- 6.5 O pH ótimo e a faixa de pH dentro do qual a enzima é estável colocam-na no grupo das proteases ácidas.

- 6.6 De acordo com as figuras V e VI, verificamos que a enzima estudada é termoestável, com uma temperatura ótima de atividade de 60°C e após 15 horas à temperatura de 30°C a enzima retém 65% de sua atividade original, sendo completamente inativada à temperaturas superiores à 45°C.

As enzimas derivadas de Mucor miehei, Mucor pusillus Lindt, Endothia parasitica, renina de abomaso de bezerro, pepsina suína e pepsina bovina foram estudadas e verificou-se que a enzima obtida de Mucor miehei é a que apresenta maior termoestabilidade (33)

Verificou-se também que a termoestabilidade aumenta com a diminuição do pH, o que indica que os fatores pH e temperatura estão intimamente relacionados.

- 6.7 Conforme mostra a figura VII, a atividade enzimática é afetada pela concentração de íons cálcio.

Ativadores metálicos são frequentemente necessários para a produção industrial de enzimas. Eles podem ligar-se ao sítio ativo da enzima ou em algum lugar fora dele e aumentando a sua atividade, ou então podem combinar-se com o substrato.

A presença de íons cálcio é extremamente importante para a atividade coagulante tanto da enzima obtida de abomaso de bezerro (28, 56, 58), quanto para a enzima em estudo, através da formação de paracaseinato de cálcio.

7 - CONCLUSÃO

- 7.1 A linhagem de Mucor miehei NRRL 3420 sofre mutação quando exposta à radiação ultravioleta que resulta numa taxa de mortalidade superior a 99,99%.

Esta mutação deve ocorrer devido a alterações no sistema genético e parece ser estável.

De acordo com Pelczar e colaboradores (38) as linhagens obtidas se enquadram na classe dos mutantes que demonstram capacidade fermentativa alterada ou habilidade aumentada para produzir algum produto final. Neste caso, houve alteração fisiológica da cultura resultando numa maior produtividade enzimática coagulante.

- 7.2 A enzima produzida mantém as mesmas propriedades da enzima original não mutada (60) podendo então como esta, ser aplicada na elaboração de queijo fresco.

- 7.3 A enzima produzida é termoestável podendo causar problemas quando usada na produção de queijos que requerem temperaturas mais altas de cozimento, pois pode não apresentar perda de atividade durante o processamento, conforme ocorre com a renina de abomaso de bezerro.

- 7.4 O queijo minas frescal produzido com a enzima teve boa qualidade quando comparado com o queijo produzido pela enzima comercial Ha-La da Ha-La do Brasil, confirmando, então, os resultados encontrados em literatura (1,22,42,47).

FIGURA 01: Cromatografia da renina microbiana de Mucor miehei em coluna de DEAE-Sephadex A-50.

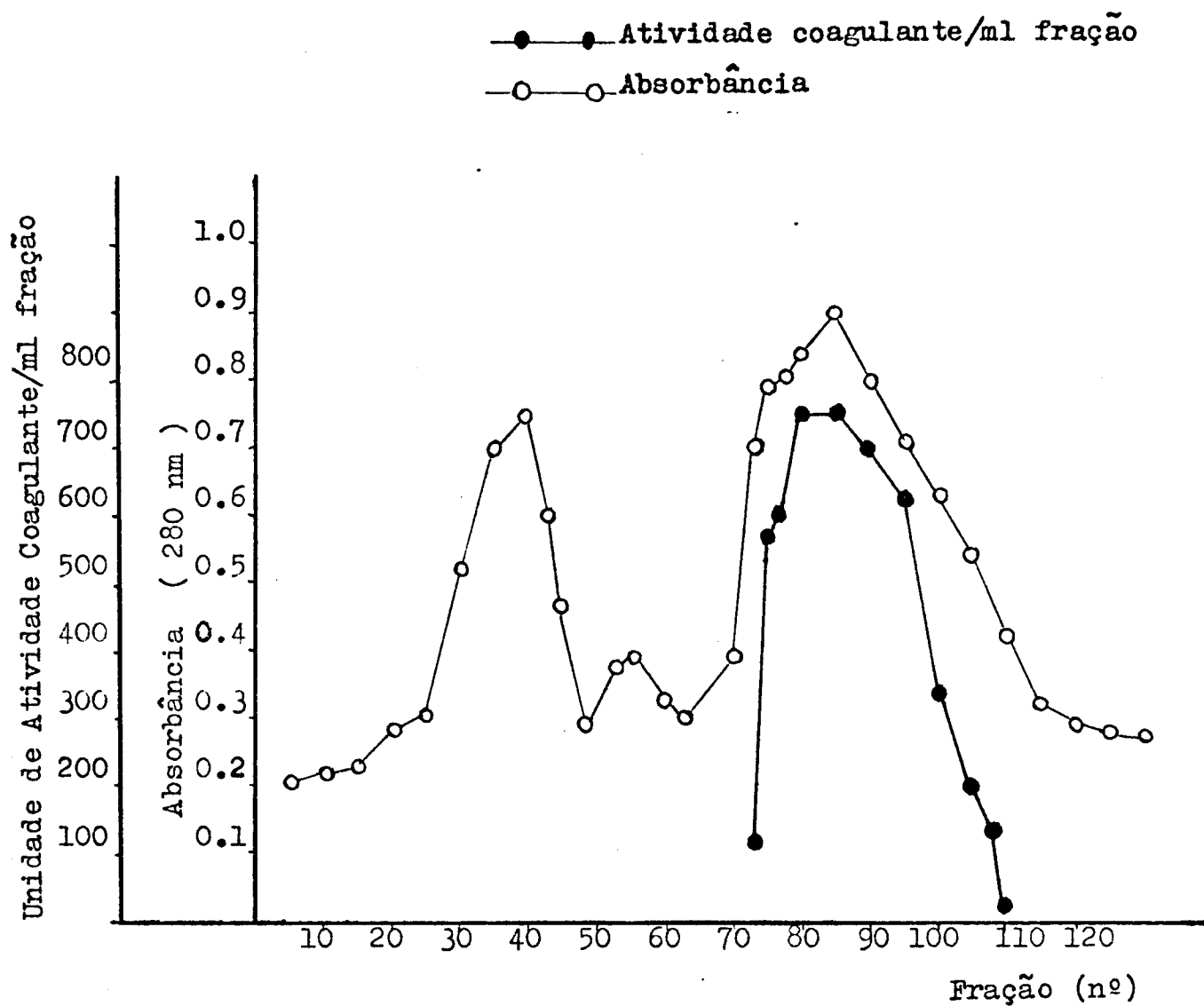


FIGURA 02: Cromatografia da renina microbiana de Mucor miehei em coluna de CM-celulose.

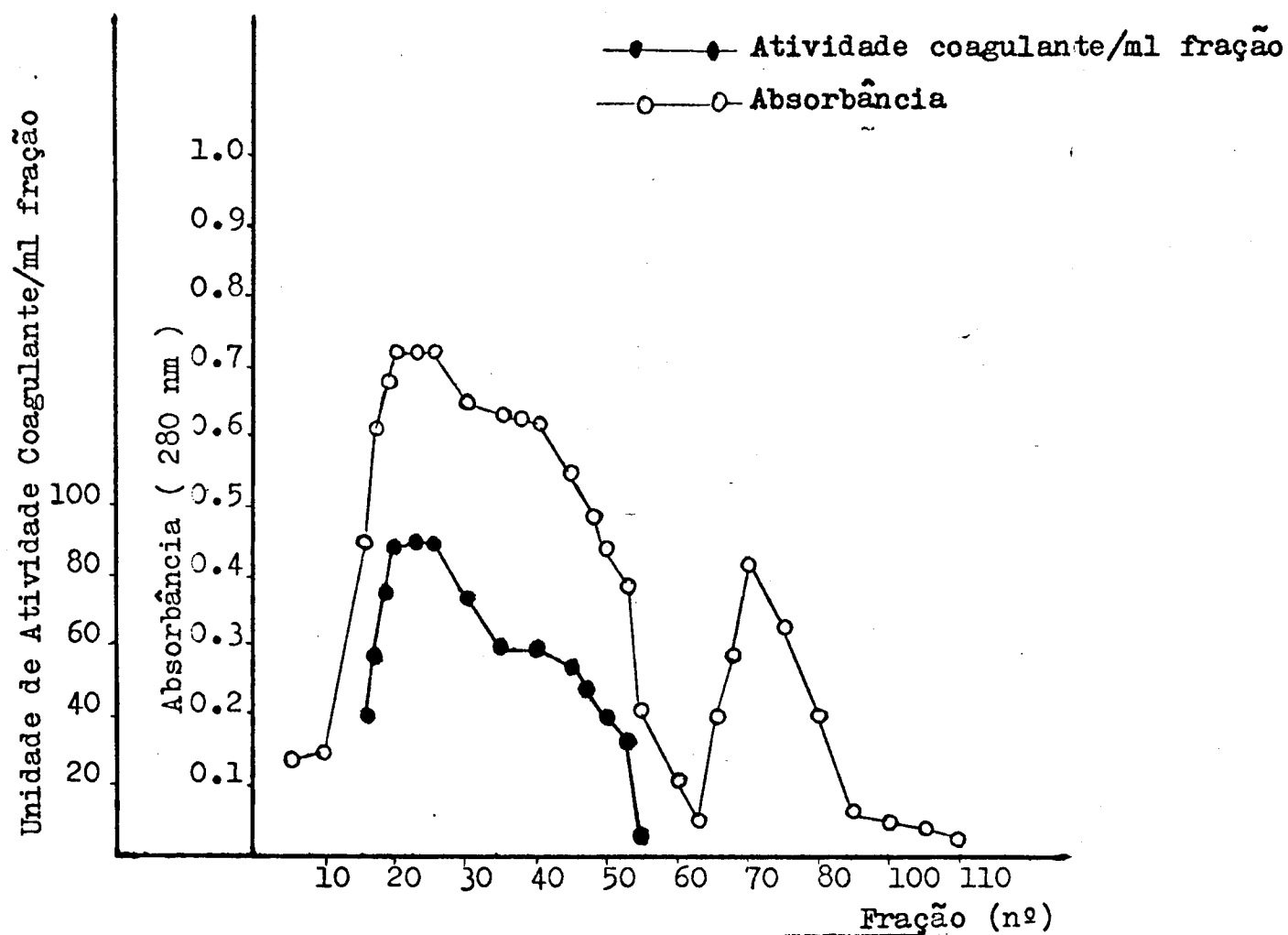


FIGURA 03: Efeito do pH na atividade da enzima renina microbiana de Mucor miehei.

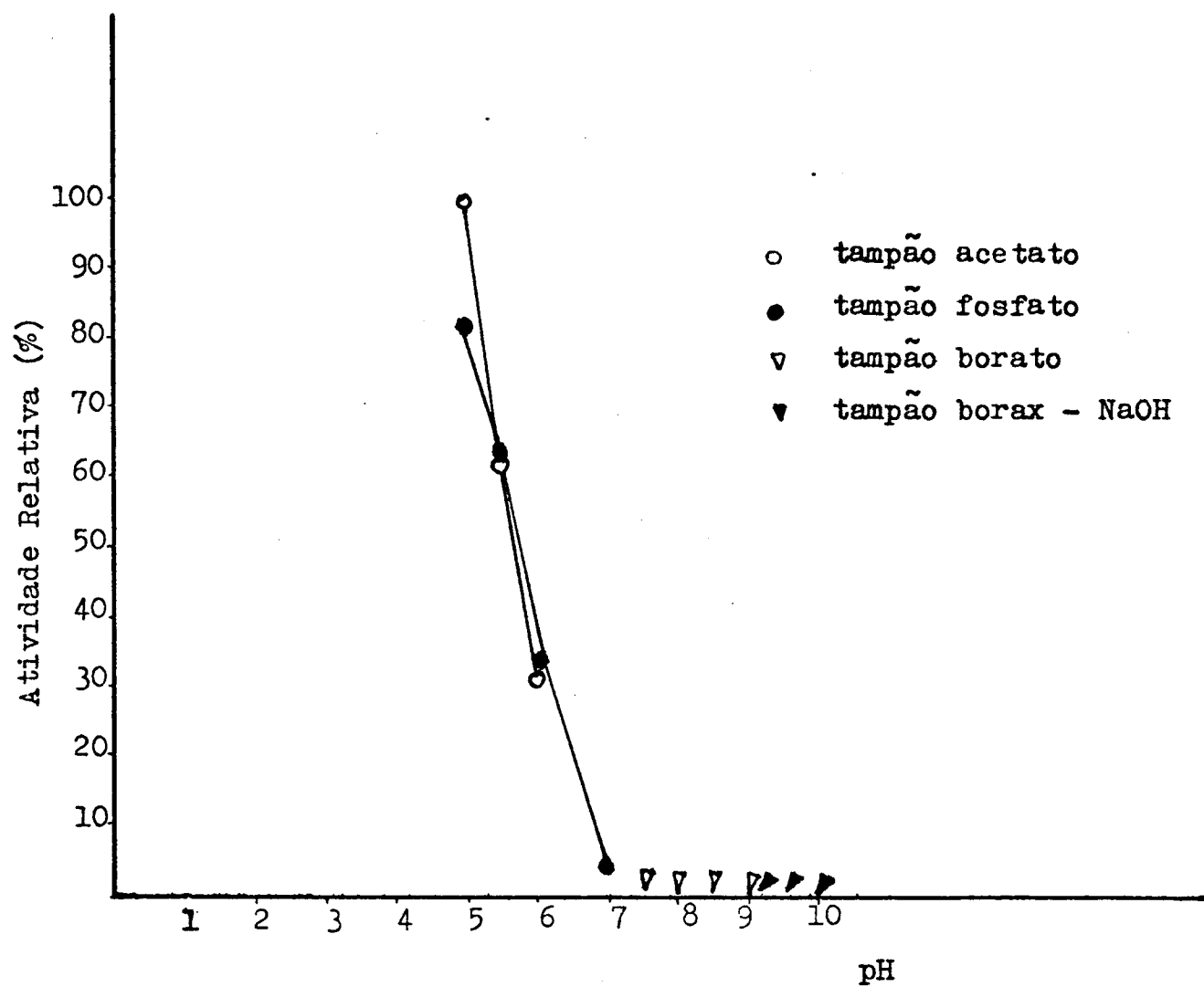


FIGURA 04: Efeito do pH na estabilidade da enzima renina microbiana de Mucor miehei.

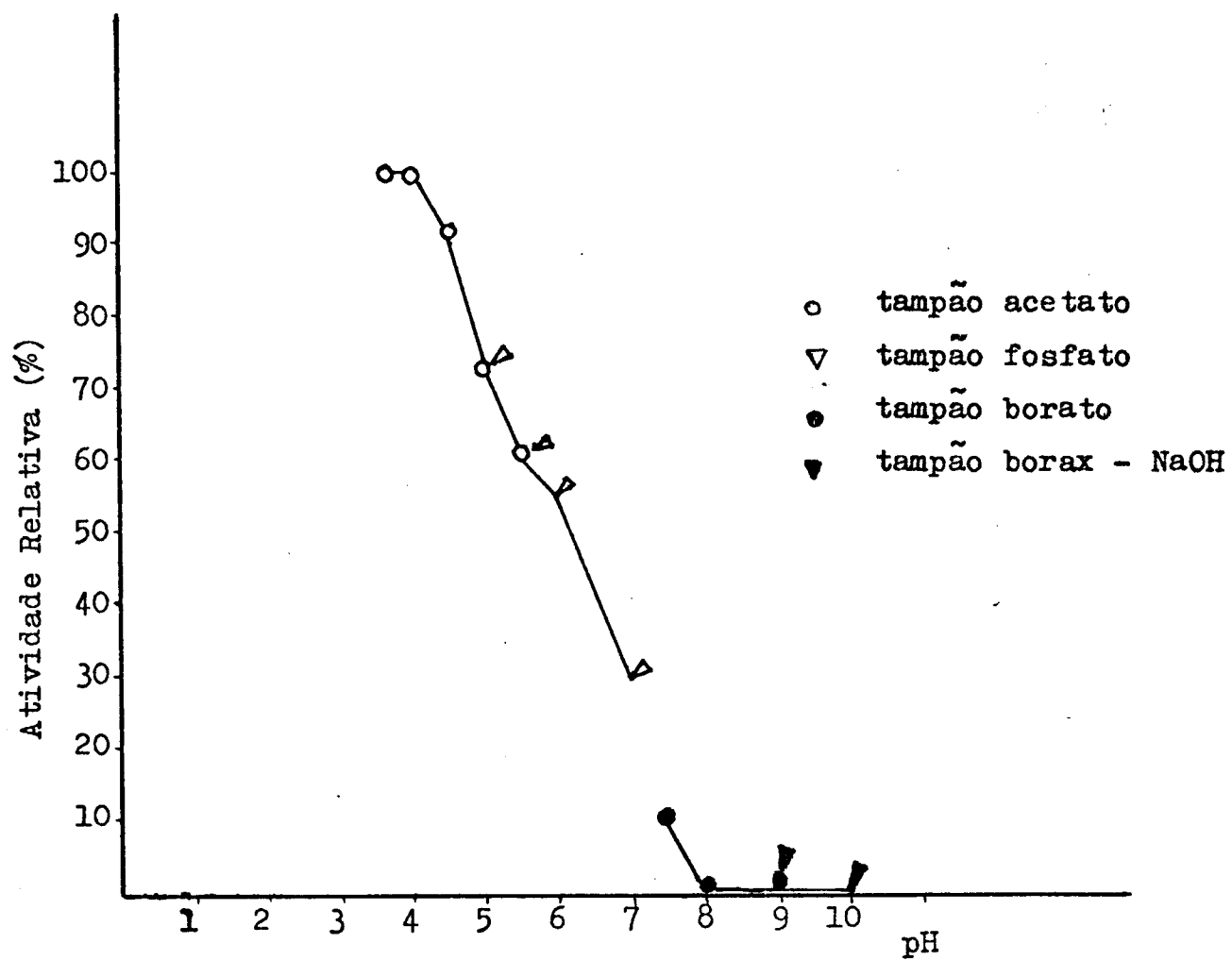


FIGURA 05: Efeito da temperatura na atividade da enzima renina microbiana de Mucor miehei.

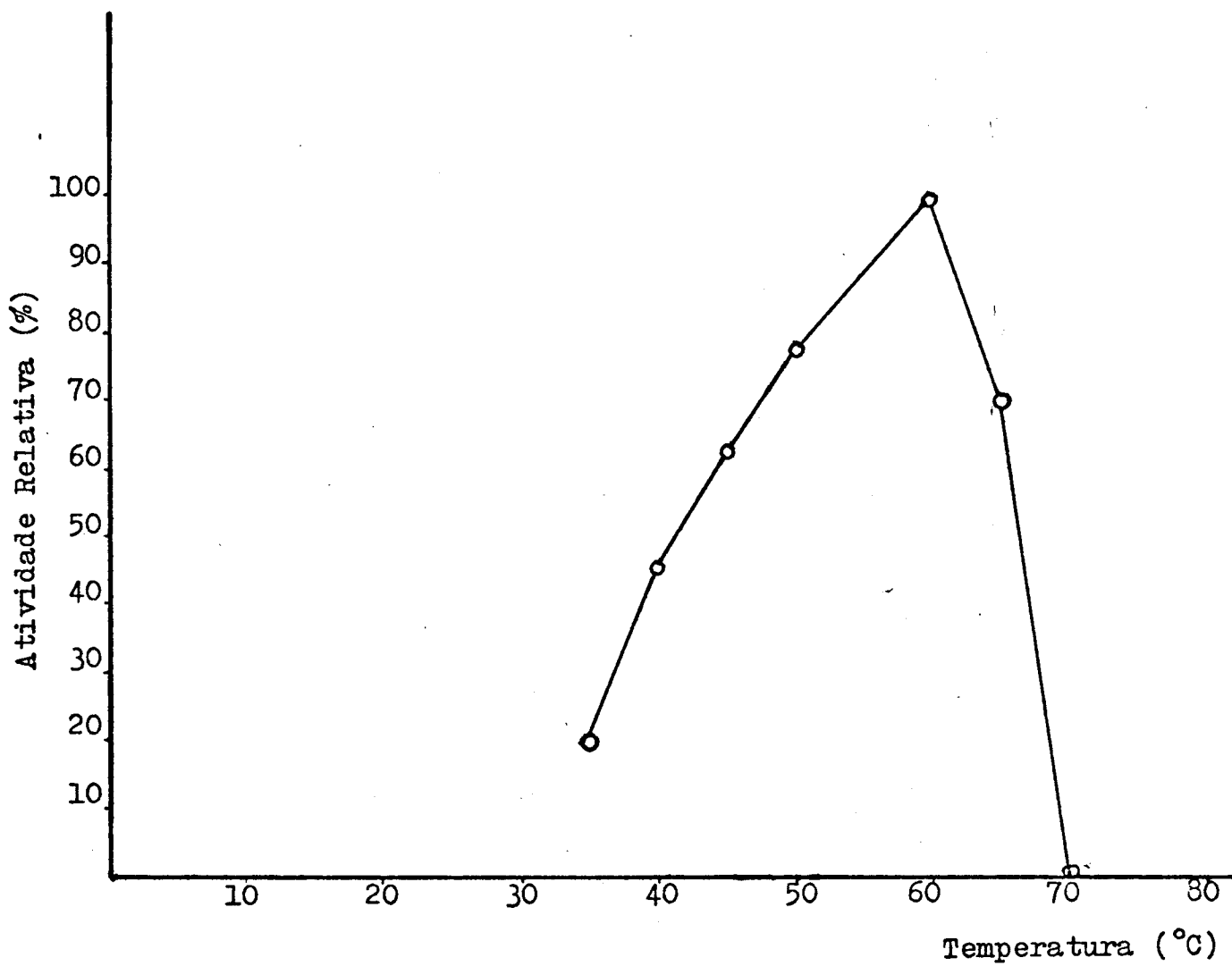


FIGURA 06: Estudo da termoestabilidade da enzima renina microbiana de Mucor miehei.

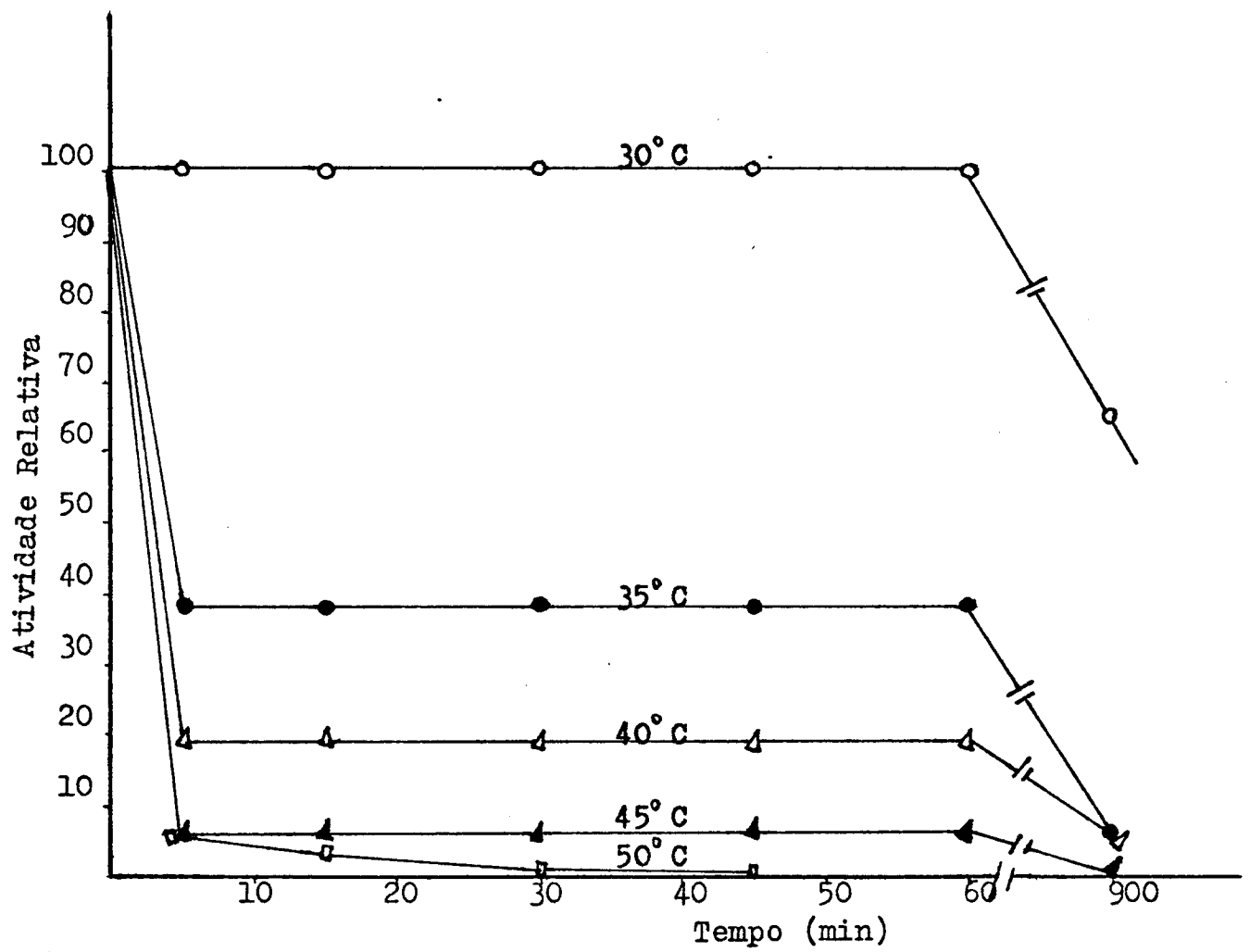


FIGURA 07: Efeito da concentração de CaCl_2 na atividade da enzima renina microbiana de Mucor miehei.

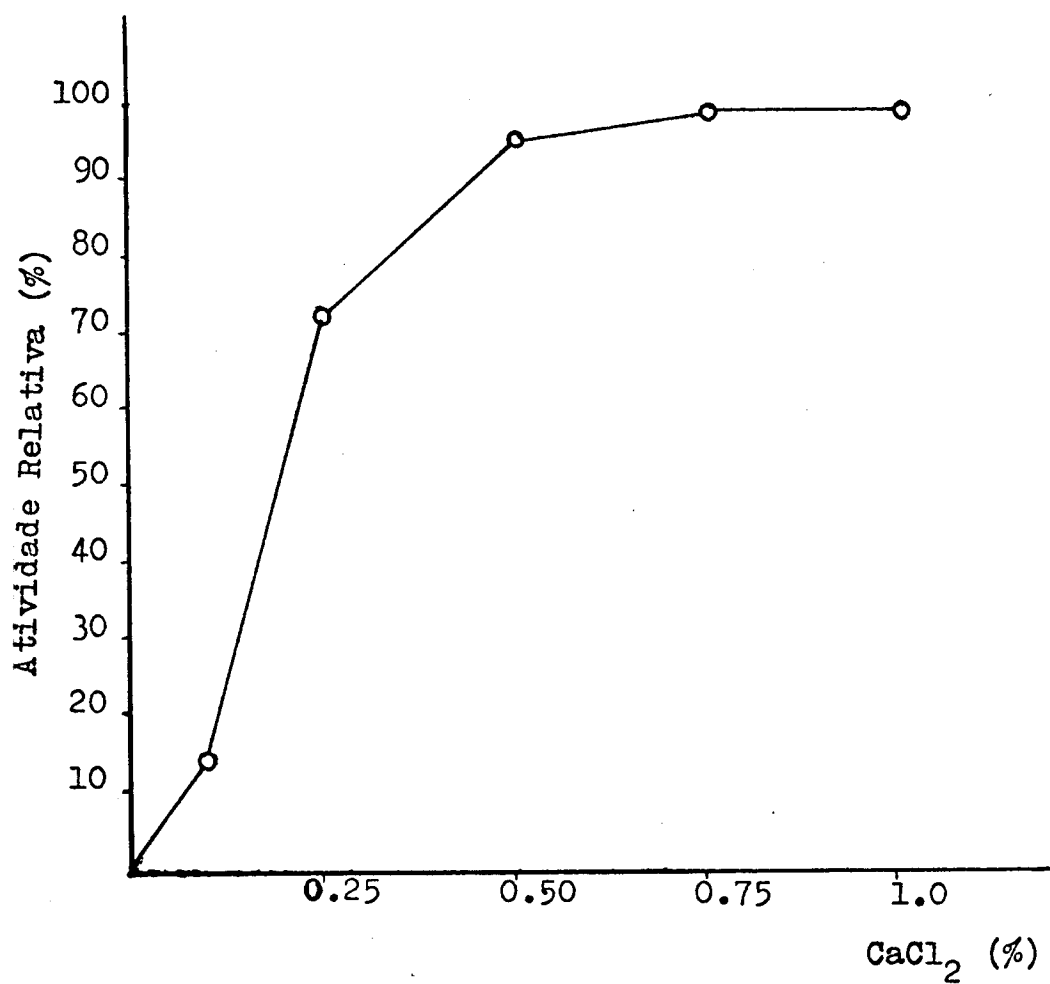


FIGURA 08: Fluxograma do processamento de queijo tipo Minas fres_ cal.

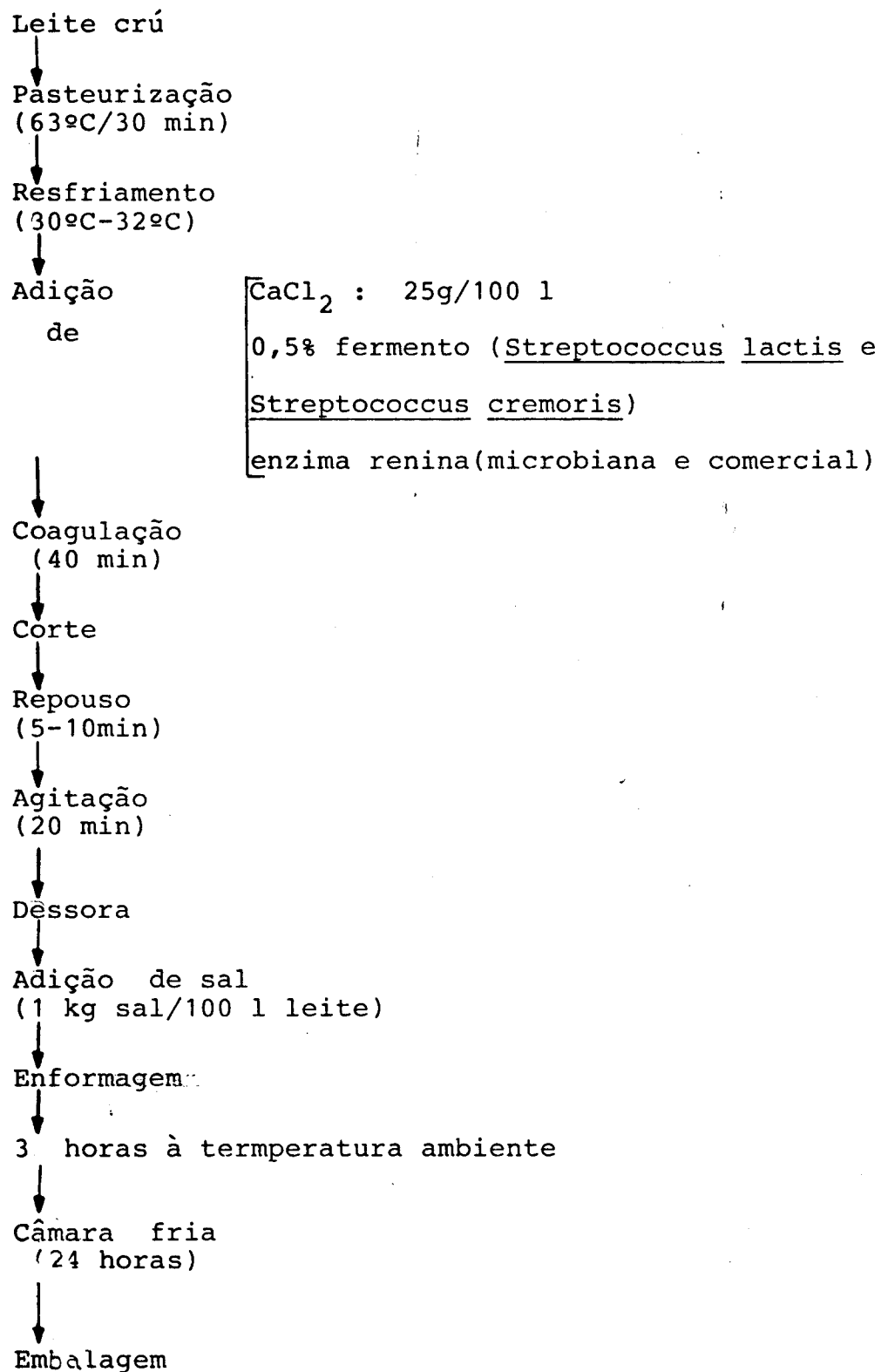


FIGURA 09: Relação entre a dose de radiação Ultravioleta e sobrevivência de colônias de Mucor miehei.

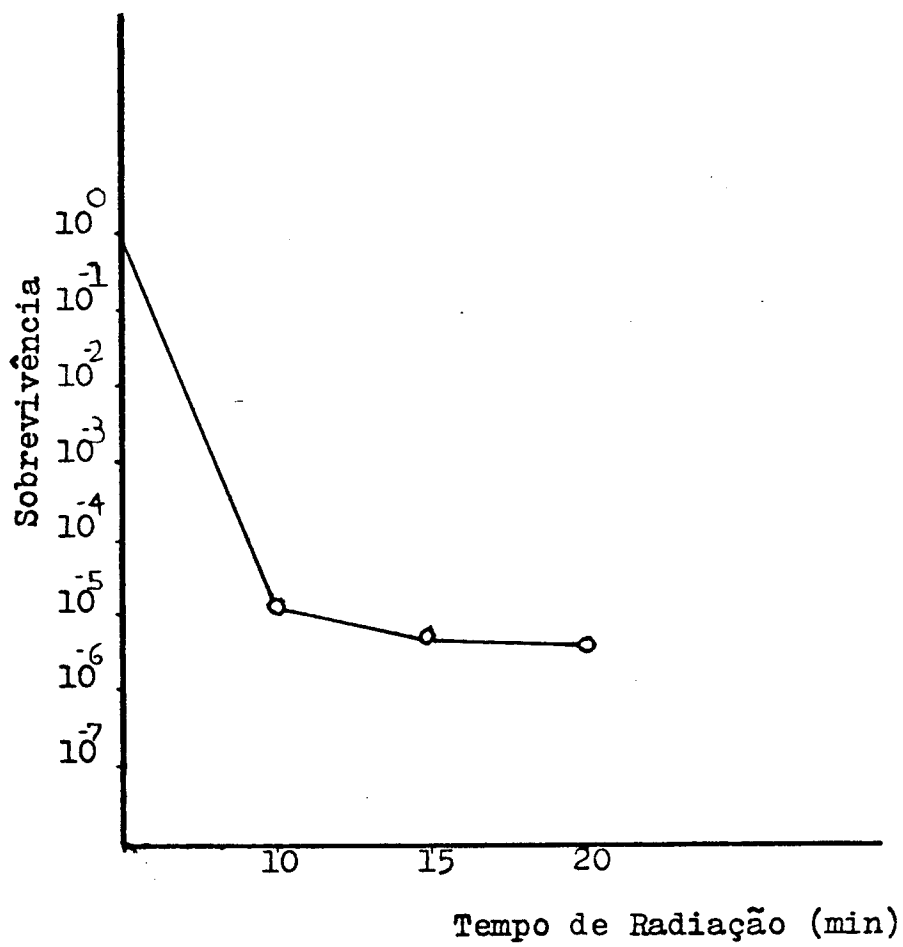


TABELA 01

Purificação da renina microbiana de Mucor miehei

Etapas	Volume (ml)	Atividade (US ^a /ml)	Ativ. total (US)	Proteína (mg/ml)	Ativ. Espec. (US/mg)	Recup. (%)	Purif. vezes
Extrato bruto	940	533,30	501.302,00	115,90	4,60	100	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ Precip. ^b	125	1.091,90	136.387,50	198,60	11,10	27,20	2,4
DEAE-Sephadex A-50	180	571,40	102.852,00	23,90	23,90	20,50	5,2
Dialisado	140	160,00	22.400,00	3,30	48,80	4,5	10,6
CM-celulose	184	55,80	10.267,20	0,72	77,50	2,1	16,8

45

a - Unidade Soxlet

b - Saturação = 80%

TABELA 02

Efeito dos sais minerais e compostos orgânicos
na atividade da enzima renina de Mucor miehei

Sais minerais e compostos orgânicos	Concentração no sis tema de reação (M)	Atividade Residual(%)
Sais minerais ou compostos orgânicos	-	100
<u>Sais minerais</u>		
NaCl	$0,5 \times 10^{-3}$	123
KCl	$0,5 \times 10^{-3}$	114
MgCl ₂	$0,5 \times 10^{-3}$	123
MnCl ₂	$0,5 \times 10^{-3}$	123
K ₂ Cr ₂ O ₇	$0,5 \times 10^{-3}$	123
K ₂ CrO ₄	$0,5 \times 10^{-3}$	100
HgCl ₂	$0,5 \times 10^{-3}$	56
Al ₂ O ₃	$0,5 \times 10^{-3}$	80
Oxalato de sódio	$0,5 \times 10^{-3}$	90
Molibdato de sódio	$0,5 \times 10^{-3}$	100
Acetato de zinco	$0,5 \times 10^{-3}$	100
Pirofosfato de sódio	$0,5 \times 10^{-3}$	60
Metabissulfito de sódio	$0,5 \times 10^{-3}$	100
<u>Compostos orgânicos</u>		
EDTA	$0,5 \times 10^{-3}$	100
Mercaptoetanol	$0,5 \times 10^{-3}$	100

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aapola, M; Kylä-Siuro, A.L. & Antila, V. Über die enzymatischen Wirkungen der verschiedenen mikrobiologischen Laben in der Käse- reifung. Milchwissenschaft 28, 195, 1973.
2. Alais, C. Recherches sur les enzymes coagulants le lait: biochimie de la coagulation, l'enzyme de "Endothia parasitica", activité de la présure et de la pepsine, Ind. del Latte, Lodi, 6, 207, 1970.
3. Alais, C. Les enzymes coagulant le lait. Tech. Laitière, 79, 719, 1971.
4. Alais, C. & Lagrange, A. Etude biochimique d'une protéase coagulante produite par "Mucor miehei". Le lait, 52, 407, 1972.
5. Arima, K. & Yu, J. Milk-clotting enzymes from microorganisms. Appl. Microbiol., 16, 1727, 1968.
6. Arima, K.; Iwasaki, S & Tumura, G. Milk-clotting enzyme from microorganisms. I. Screening test and the identification of the potent fungus. Agric. Biol. Chem., 31, 540, 1967.
7. Aunstrup, K. Proteinases In "Microbial Enzymes and Bioconversions" ed. A.H. Rose 5, 75-101, Academic Press Inc., London, 1980.
8. Barros, G.A. & Levy, J.E. A indústria de laticínios em Minas Gerais - BH, 61 pg - 1982.
9. Benedet, H.D. & Park, Y.K. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide gel eletrophoresis of purified casein fraction treated with milk-clotting enzymes. J. of Dairy Sci 65, 899, 1982.

10. Berridge, N.J. Methods in enzymology. Vol. 2, pg. 72, Academic Press, New York, NY, 1955.
11. Blakeslee, A.F. Mutations in *Mucors*.
J. of Heredity, 11(6), 278, 1920.
12. Conn, H.W. Centralbl. Bacteriol., 3, 527, 1892.
13. Deering, R.A. Ultraviolet radiation and nucleic acid.
Scient. Am., 207, 135, 1962.
14. Emmons, D.B. Bovine pepsine for cheesemaking
J. Dairy Sci 57, 590 (Abstr.), 1974.
15. Etoh, Y., Shoun, H., Beppu, T. & Arima, K. Physicochemical and immunochemical studies on similarities of acid proteases "Mucor pusillus" rennin and "Mucor miehei" rennin.
Agric. Biol. Chem., 43 (2), 209, 1979.
16. Ferenczy, L., Kevei, F, & Zsolt, J. Fusion of fungal protoplast
Nature (London) 248, 793, 1974.
17. Gorini, C. Riv. Ing. Sanit. 3, 527, 1892.
18. Gould, B.J. Enzyme Data in "Handbook of Enzyme Biotechnology"
ed. A. Wiseman, 149, Ellis Horwood Limited, England, 1975.
19. Green, M.L. J. Dairy Res. 39, 261, 1972.
20. Green, M.L. Review of the progress of dairy science: milk coagulants J. Dairy res. 44, 159, 1977.
21. Gutfeld, M. Dairy Industries, 40, 52, 1975.
22. Hamdy, A. Quality of Domiati cheese prepared by using microbial enzyme as coagulant. Indian J. of Dairy Sci. 25, 73, 1972.

23. Hoppwood, D.A. The isolation of Mutants in "Methods in Microbiology" ed. J.R. Norris and D.W. Ribbons, Vol. 3A, 363-424, Academic Press London, 1970.
24. Hoppwood, D.A. The Genetic Programming of Industrial Microorganisms in "Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering". A Scientific American Book - USA - 1981.
25. Jacobson, G.K. Mutation in "Biotechnology" ed. H.J. Rehm e G. Reed, Vol 1, 280-301, Verlag Chemie, 1981.
26. Joginder, S.; Chander, H. & Rao, V.R.B. Rennet from buffalo, cow, goat and pig. J. Food Sci. and Tech., India, 12 (6), 317, 1975.
27. Knight, S.C. Production of a rennin like enzyme by molds Canadian Journal Microbiol. 12, 420, 1966.
28. Koning, P.J. Coagulating enzymes in cheesemaking Dairy Industries International, julho, 1978.
29. Lasure, L.L. A morphological variant of "Mucor miehei" Mycologia, 73, 355, 1981.
30. Leach, C.M. A Pratical Guide to the effects of Visible and Ultraviolet Light on Fungi in "Methods in Microbiology" ed. C, Booth, Vol. 4, 602-693, Academic Press, London & New York, 1971.
31. Lewin, B. Modification and Repair of DNA in "Gene Expression -1" ed. CELL, Vol. 1, 471-532, John Wiley & Sons - London.
32. Masek J.; Holy, L. and Mikowá, L. Milchwissenschaft, 27,488, 1972.
33. Nelson, J.H. Impact of new milk clotting enzymes on cheese technology. J. Dairy Sci. 58 (11), 1739, 1975.

34. Nishimori, K.; Kawaguchi, Y.; Hidata, M.; Uozumi, T. & Beppu, T. Cloning in "Escherichia coli" of the structural gene of prorennin, the precursor of calf milk-clotting enzyme rennin. J. Biochem., 90, 901, 1981.
35. Nishimori, K.; Kawaguchi, Y.; Hidata, M.; Uozumi, T. & Beppu, T. Nucleotide sequence of calf prorennin cDNA cloned in "Escherichia coli". J. Biochem., 91, 1085, 1982.
36. Nishimori, K.; Kawaguchi, Y.; Hidata, M.; Uozumi, T. & Beppu, T. Expression of cloned calf prorennin gene sequence in "Escherichia coli" gene, 19, 337, 1982.
37. Nishimori, K.; Kawaguchi, Y.; Hidata, M.; Uozumi, T. & Beppu, T. Application of immobilized antibody for analysis and purification of prochymosin specific mRNA from calf tissue Agric. Biol. Chem., 48 (4), 1091, 1984.
38. Ohnuki, T.; Etoh, Y. & Beppu, T. Intraspecific and interspecific hybridization of "Mucor pusillus" and Mucor miehei by protoplast fusion. Agric. Biol. Chem., 46 (2), 451, 1982.
39. Ottesen, M. & Rickert, W., Methods in Enzymology Vol. 19, 459-460, 1970.
40. Pelczar, M.; Reid, R. & Chan, E.C.S. Modificações, Mutações e Genética em "Microbiologia" ed. J.M. Braga e K.E. Grassmuck, Vol. 1, 235-267, Mc Graw-Hill, Brasil, 1980.
41. Peterson, R.F. High resolution of milk-clotting protease from "Mucor miehei" and some of its properties, J.Dairy Sci., 54, 159, 1963.
42. Phelan, J.A. Laboratory and field tests on new milk coagulants. Dairy Industries 38, 418, 1973.

43. Pomper, S. & Atwood, K.C. in "Radiation Biology", Vol. 2, 431-453, ed. A. Holloender, Mc Graw-Hill, New York.
44. Pomper, S. The Physical Environment for Fungal Growth - Effects of Radiation in "The Fungi" ed. G.C. Ainsworth & A.S. Sussman, Vol. 1, 575-592, Academic Press, New York & London, 1965.
45. Prins, J. & Nelson, T.K. Microbial rennet from "Mucor miehei". Process Biochem., 5, 34, 1970.
46. Puhon, Z. & Irvine, D.M. Reduction of proteolytic activity of "Bacillus subtilis" protease by acidification of milk before Cheddar cheese manufacture. J.Dairy Sci., 56, 323, 1973.
47. Ramet, J. P. & Alais, C. Etude d'une protease produit par "Mucor miehei". Le lait 53, 154, 1973.
48. Richardson, G.H. & Chaudhari, R.V. Differences between calf and adult bovine rennet. J.Dairy Sci., 53, 1367, 1970.
49. Richardson, G.H. Dairy Industry in "Enzymes in Food Processing" G.Reed, 361-391, Academic Press, New York.
50. Rickert, W.S. The degradation on the B-chain of oxidized insulin by "Mucor miehei" protease. C.R. Trav. Lab. Carsberg, 38, 1, 1970.
51. Rickert, W. S. Structural and functional determinants of "Mucor miehei" protease. Biochim. Biophys, Acta. 271, 93, 1972.
52. Rickert, W.S. & Elliot, J.R. Acid proteases from species of Mucor. Molecular weight of "Mucor miehei" protease from amino acid analysis data. Canadian J. Biochem. 51, 1638, 1973.
53. Sardinas, J.L. Rennin enzyme of "Endothia parasitica". Appl. Microbiol., 16, 248, 1968.
54. Sardinas, J.L. New sources of rennet. Process Biochem. 4 (7), 13, 1969.

55. Sardinas, J.L. Microbial rennets. *Adv. Appl. Microbiol.*, 15, 39, 1972.
56. Sardinas, J.L. Calf rennet substitutes *Process Biochem.* 11 (4), 10, 1976.
57. Scott, R. Rennet and rennet substitutes. *Process Biochem.*, 8(12), 10, 1973.
58. Scott, R. Rennets and Cheese in "Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology" ed. Alan Wiseman, Vol. 3, 110-155, Ellis Horwood Limited, 1979.
59. Shrinivasan, R.A.; Iyengar, M.K.; Babbar, I.J.; Chakravorty, S.C., Dudani, A.T. & Iya, K.K., Milk-clotting enzymes from microorganisms. *Appl. Microbiol.* 12 (6), 475, 1964.
60. Sternberg, M.Z. Crystalline milk-clotting protease from "Mucor miehei" and some of its properties. *J.Dairy Sci.*, 54 (2), 159, 1971.
61. Sternberg, M.Z. Bond specificity, active site and milk-clotting mechanism of the "Mucor miehei" protease. *Biochem. Biophys. Acta.* 285, 383, 1972.
62. Wiseman, A. Industrial Practice with Enzymes in "Handbook of Enzyme Biotechnology" ed Alan Wiseman, 260, Ellis Horwood Ltd., 1975.
63. Wiseman, A. Enzyme Utilization in Industrial Process in "Handbook of Enzyme Biotechnology" ed. Alan Wiseman, 111, Ellis Horwood Ltd., 1975.
64. Yamamoto, A. Proteolytic Enzymes in "Enzymes in Food Processing" ed. G. Reed, 7, 154-158, Academic Press, N.Y., 1975.
65. Zannoni, L. La caseina ed il meccanismo della coagulazione presamica. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* 30 (2), 129, 1979.