

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DA
CHICHA EM SORO DE LEITE POR MÉTODOS BIOQUÍMICOS
QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS**

MARIA BENVINDA YULE CARDOSO

Orientadora: PROFa. DRa. DANIELLE MARQUES VILELA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C268a Cardoso, Maria Benvinda Yule
ATVIDADE PROTEOLÍTICA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS
DA CHICHA EM SORO DE LEITE POR MÉTODOS BIOQUÍMICOS
QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS / Maria Benvinda Yule Cardoso --
Dourados: UFGD, 2018.
26f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Danielle Marques Vilela

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e
Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.
Inclui bibliografia

1. Chicha. 2. Proteases microbianas. 3. Tratamento de efluentes. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DA
CHICHA EM SORO DE LEITE POR MÉTODOS BIOQUÍMICOS
QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS**

por

Maria Benvinda Yule Cardoso

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção de título de
Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados.

Aprovado em: 12 de Abril de 2018.

Profa.Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes

FAEN-UFGD

Mst. Ludmila Vilela Rezende

FCBA-UFGD

Profa. Dra. Danielle Marques Vilela

Orientadora FCBA-UFGD

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e intercessão constante em todos os momentos da minha vida.

À universidade, UFGD, que permitiu com seus recursos e estrutura realizar esse trabalho. Toda experiência e crescimento acadêmico adquiridos não seriam alcançados, se não com o apoio discente, administrativo e técnico dessa instituição.

À professora Danielle Marques Vilela pela oportunidade, dedicação e incentivo. Ao grupo GEFER que se tornou uma família científica, gratidão por ter tido a oportunidade de dividir o laboratório e projetos, desejo sucesso a todos.

À professora Kelly Cristina da Silva Brabes e a mestranda Ludmila Vilela Rezende pela disponibilidade em contribuir na revisão e avaliação desse estudo.

A meus pais, a quem nenhum agradecimento seria suficiente para expressar o quanto grata sou por terem sido meu amparo, fortaleza e inspiração para nunca desistir.

A meus amigos, aqueles que tornaram tudo mais suportável dividindo as pequenas alegrias, as conquistas, as frustrações e a rotina diária. Aqueles a quem não encontro palavra que possa descrever a amizade construída em todos esses anos. Aos amigos de graduação por termos divididos o amor e ódio pela Biotecnologia, em aulas, laboratórios e festas desses longos semestres de alegrias compartilhadas, risadas sinceras e algumas lágrimas. A Aline, Silvia, Reiane, Pâmela, Jaqueline, Caroline, Stefany, Vitória, Flávia, Valéria, Cíntia, Fabiane, Everson, Rafael Fraga e Caio, meu obrigada por cada confiança, vidraria suja, lista de exercício, almoço e momentos compartilhados. Ao Trio Maloca, Maria Carolina e Mariele, que meu obrigada não seria suficiente para agradecer pela amizade de vida que construímos, nada teria sido tão excepcional e único se não fosse pela presença de cada uma em todos os anos de graduação. Aos amigos de ônibus que enfrentaram comigo tantos e todos os perrengues possíveis para uma viagem diária de mais de uma hora rumo à faculdade, obrigada a todos que foram companhia quando não se tinha aula (e quando ignorávamos as que tinham), aqueles com quem dividi a mesa do café da manhã de cada dia, aqueles que jogaram truco e não me deixaram dormir, mas que também dividiram a poltrona para falar de vida, perspectivas e cardápio do RU. Obrigada Patrick, Maria Fernanda, Isabela, Matheus, Vitor, Jean, Gabriel, Geisiane, Caio, Everson, Lucas e Matheus, aqueles que tornaram-se família nesses anos de graduação, seja sob rodas ou não. Aos meus amigos de vida e para além dela, Talita, Wesley, Bruno, Lucax e Luana que compreenderam cada ‘não’ nos fins de semanas de épocas de provas e que foram distração, ombro amigo e fonte de carinho a todo “oi, vamos se ver” em meio a essa rotina de cidades diferentes, amo vocês.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“O que somos é presente de Deus; no que nos transformamos é nosso presente a Ele.”

São João Bosco

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DA CHICHA EM SORO DE LEITE POR MÉTODOS BIOQUÍMICOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS

PROTEOLITIC ACTIVITY OF ISOLATED MICRO-ORGANISMS OF CHICHA IN MILK SERUM BY QUALITATIVE AND QUANTITATIVE BIOCHEMICAL METHODS

Maria Benvinda Yule Cardoso,

Danielle Marques Vilela*

*Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

RESUMO

As proteases são enzimas com amplo espectro de aplicações industriais e de reaproveitamento dos seus resíduos, como o soro de leite, que feitas análises de composição proximal e físico-químicas apresentaram condições que favorecem o crescimento e desenvolvimento microbiano. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção proteolítica por micro-organismos isolados da bebida indígena à base de milho Chicha para biotransformação do subproduto de fabricação de queijos, o soro de leite. Utilizando métodos bioquímicos qualitativos, avaliando a presença de halo de degradação em meios específico proteolítico como indicativo, e quantitativos, com a determinação de atividade proteolítica em uL.mg^{-1} analisando concentrações de meio sólido suplementado com concentrações do efluente, de proteína industrializada caseína e um controle sem suplementação em 24h, 48h e 72h de ensaio. Os isolados fúngicos *Lodderomyces elongisporus* AY391847.1 em AN com 0,01% de soro de leite em 72h de cultivo e *Candida metapsilosis* KF131734.1 em AN com 0,01% de soro de leite em 48h e 72h de cultivo apresentaram atividades proteolíticas analisadas em teste comparativo de média Tukey a 5% de significância ($p > 0,05$) que nessas condições são considerados como alternativa biológica com potencial proteolítico de reaproveitamento do efluente industrial de laticínios.

Termos para indexação: Chicha, proteases microbianas, tratamento de efluentes.

ABSTRACT

Proteases are enzymes with a broad spectrum of industrial applications and reuse of their residues, such as whey, which made analyzes of nutritional composition and physico-chemical conditions that favor growth and microbial development. The objective of this work was to evaluate the proteolytic production by microorganisms isolated from the indigenous beverage based on Chicha maize for biotransformation of the cheese making subproduct, whey. Using qualitative biochemical methods, evaluating the presence of degradation halo in specific proteolytic media as indicative, and quantitative, with the determination of proteolytic activity in uL.mg^{-1} analyzing solid media concentrations supplemented with effluent concentrations, industrialized casein protein and a control without supplementation in 24h, 48h and 72h assay. The fungal isolates *Lodderomyces elongisporus* AY391847.1 in AN with 0.01% of whey in 72h of culture and *Candida metapsilosis* KF131734.1 in AN with 0.01% of whey in 48h and 72h of culture presented activities ($p > 0.05$), which are considered as a biological alternative with a proteolytic potential for reuse of the industrial dairy effluent.

Index terms: Chicha, microbial proteases, effluent treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de obtenção do soro de leite a partir da produção de queijo.

Figura 2. Curva padrão da tirosina.

Figura 3. Distribuição da atividade proteolítica de micro-organismos testados em cinco (I,II,III,IV e V) concentrações por 24h, 48h e 72h de cultivo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados avaliados quanto à atividade proteolítica por indicativo de halo.

Tabela 2. Composição proximal e análises físico-químicas do soro do leite.

Tabela 3. Ensaio de atividade proteolítica por três espécies de leveduras sob agitação 150 rpm em 24h, 48h e 72h.

SUMÁRIO

Página

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 2 |
| 2.1. Obtenção dos isolados de micro-organismos | 2 |
| 2.2. Cultivo | 2 |
| 2.3. Análise qualitativa de protease em meio sólido | 2 |
| 2.4. Obtenção do soro de leite | 3 |
| 2.5. Análise proximal do soro do leite | 4 |
| 2.6. Análise físico-química do soro do leite | 4 |
| 2.7. Crescimento dos micro-organismos e produção de enzimas em substrato testando concentrações de soro de leite | 4 |
| 2.8. Determinação quantitativa da atividade proteolítica | 5 |
| 2.9. Análise estatística | 5 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 6 |
| 4. CONCLUSÃO | 14 |
| 5. REFERÊNCIAS | 14 |

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, várias tribos indígenas produzem alimentos e bebidas utilizando a fermentação, geralmente realizada em pequena escala, para uso medicinal e em rituais sagrados (RAMOS et al., 2010). Chicha, uma bebida alcoólica tradicional produzida na Colômbia e outros países da América do Sul, como o Equador, o Peru, Bolívia e Brasil (HAYASHIDA, 2008; RAMOS, 2011) Pode ser considerada a bebida mais antiga da América Latina onde o nome possivelmente se origina da palavra *chichab*, do idioma original falado no atual território do Panamá, que significa milho. Outras teorias sugerem que o nome deriva da palavra *Chibcha*, uma civilização que povoou a Colômbia e o Panamá, ou relaciona a palavra chicha a Chichas, uma etnia presente no sul da Bolívia antes do estabelecimento dos incas (GOMES et al, 2009). Desde os tempos pré-hispânicos, a chicha produzida principalmente a partir de milho, mas também de outros grãos ou frutas, tem sido uma fonte de refresco e nutrição, bem como um elemento-chave nas trocas sociais, políticas e rituais (HAYASHIDA, 2008; RAMOS, 2011).

A microbiota da maioria dos alimentos indígenas fermentados é desconhecida e complexa, caracterizada pela associação entre bactérias do ácido lático, bacilos, leveduras e fungos. Esta complexidade estabelece a ecologia de alimentos fermentados como fronteira de descobertas (NOUT,1997). Um dos fatores que mais influenciam um processo fermentativo são a composição e características do substrato selecionado, que será utilizado pelo micro-organismo como fonte de carbono, nitrogênio e outros componentes indispensáveis à manutenção celular, reprodução e produção de metabólitos, como as enzimas. No caso de proteases, a presença de um alto teor de proteínas no meio de cultivo, pode servir como indutor para a produção dessa enzima pelos micro-organismos (GIONGO, 2006), que é o caso do resíduo soro de leite.

Os resíduos líquidos da indústria de laticínios, mais conhecidos como efluentes industriais são despejos líquidos originários de diversas atividades desenvolvidas na indústria, que contém açúcar, pedaços de frutas, essências, condimentos, produtos químicos oriundos dos processos, além de leite e derivados do leite (MARCHIORI, 2006). O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Esses nutrientes que participam do processo de coagulação do leite influenciam na textura do queijo. O líquido residual cujo teor varia com o tipo de queijo, sendo chamado de lactosoro, ou soro de leite, que é durante o processo de fabricação (PERRY, 2004). Dos componentes presentes no soro, a lactose e proteínas solúveis são os mais importantes. As proteínas possuem alto valor nutricional, pois contêm todos os aminoácidos essenciais por ser fonte de material energético para diversos processos biotecnológicos (TIMOFIECSYK, 2000).

A identificação de alternativas para um adequado aproveitamento do soro de leite é de fundamental importância em função de sua qualidade nutricional, do seu volume e de seu poder poluente. O tratamento biológico tem por objetivo a remoção da matéria-orgânica (carboidratos, proteínas e lipídeos) do efluente, através da transformação desta em biomassa e gases. Possuindo tais composições nutricionais e o alto custo para os seus adequados tratamentos, importante o desenvolvimento de tecnologias para o adequado aproveitamento dos soros nas indústrias, pois, ao mesmo tempo em que ocorre a transformação dos soros em produtos, se minimiza o problema ambiental causado pela poluição através do descarte incorreto, além de promover ganhos às indústrias através do desenvolvimento de novos produtos ou a agregação do soro aos já existentes (BALD et al., 2014).

O presente estudo tem por objetivo a avaliação do potencial enzimático de forma quantitativa e qualitativa de isolados microbianos quanto à produção de proteases e sua aplicação para tratamento soro de leite, um resíduo industrial de laticínios, como forma alternativa biológica de baixo custo de conversão e aproveitamento desse efluente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos isolados de micro-organismos

No estudo foram utilizados micro-organismos isolados da tradicional bebida indígena Chicha não alcoólica à base de milho (RESENDE E PINHEIRO, 2018), preparada pelos índios da etnia Guarani-Kaiowá, na aldeia Jaguapiru, situada na região de Dourados, Mato Grosso do Sul. As amostras, mantidas em refrigeração foram espécies de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus capiti*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter asburiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella oxytoca*, subtipos *Candida metapsilosis* e *Lodderomyces elongisporus*, além de outras não identificadas.

2.2. Cultivo

Para reativação dos isolados as culturas-estoque foram utilizados caldos específicos. Para isolados bacterianos foram utilizado o meio nutriente (AN) (em m/v: extrato de carne 0,3% e peptona bacteriológica 0,5%) pH 6,8 e para isolados leveduriformes o meio YPD (em m/v: 1% extrato de levedura, 2% glicose, 2% peptona).

2.3. Análise qualitativa de protease em meio sólido

Para testes de caráter qualitativo da atividade extracelular dos micro-organismos avaliou-se levando em consideração o diâmetro do halo de degradação, incluindo a colônia, e expressa como índice enzimático. A fonte de carbono à base de proteína hidrossolúvel utilizada como meio de

avaliação da atividade proteolítica dos micro-organismos foi composta por ágar 1,8%, gelatina 1,0%, leite desnatado 1,0%, tampão citrato-fosfato 400 mL 0,1 M pH 5,0 permitindo avaliar as culturas.

O ágar foi adicionado em 400 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 5,0), homogeneizado com bastão de vidro e esterilizado, a 120 °C, durante 15 minutos. Solução de gelatina a 10%: foram adicionados 5 g de gelatina em 50 mL de solução tampão citrato-fosfato, deixando em repouso durante 3 minutos e, em seguida, homogeneizando-se. A solução foi aquecida em banho-maria para a dissolução completa da gelatina e, posteriormente, esterilizada, a 120 °C, durante 15 minutos. Solução de leite desnatado a 10%: foram dissolvidos 5 g de leite desnatado em 50 mL de água destilada. A solução foi esterilizada sob vapor fluente (autoclave com válvulas abertas), durante 30 minutos, por dois dias consecutivos. Para a obtenção do ágar-gelatina-leite, as soluções esterilizadas de ágar, leite e gelatina foram misturados com cuidado asséptico, obtendo-se um volume final de 0,5 L. A reação enzimática para protease foi detectada pela modificação química no meio de cultura sólido, em que a reação positiva foi visualizada com a formação de um halo translúcido ou esbranquiçado, não sendo necessária a adição de solução reveladora na superfície do ágar. Os micro-organismos que apresentaram diâmetro superior igual a 2,5 cm que apresentaram maior diâmetro na medição do halo de degradação foram considerados potenciais de produtores de protease.

2.4. Obtenção do soro de leite

A partir de 10 litros de leite bovino integral pasteurizado da marca CambyTM que foi aquecido a uma temperatura de 40°C acrescentado-se 9 mL de coagulante líquido contendo enzima quimosina microbiana *Aspergillus niger var. awamori* para após coalhar, sendo o soro resultante da produção desse queijo, mantido a uma temperatura de refrigeração (Figura 1).

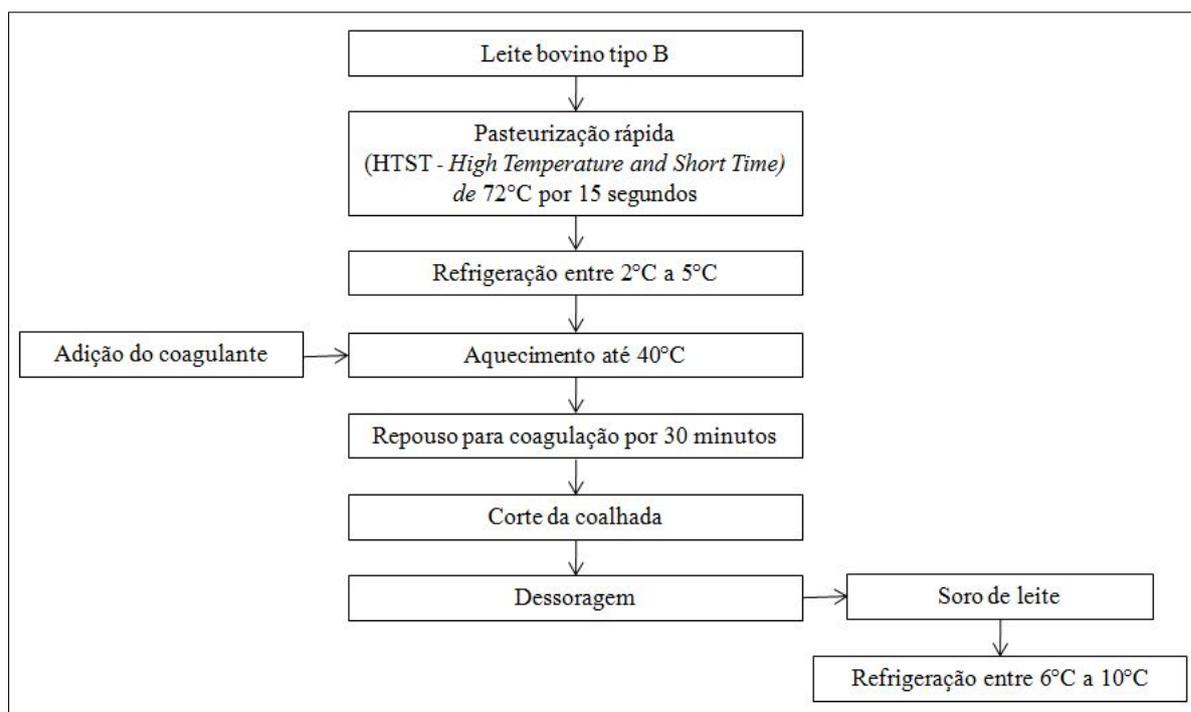


Figura 1. Fluxograma de obtenção do soro de leite a partir da produção de queijo.

2.5. Análise proximal do soro do leite

Na composição proximal foram determinados teores de umidade em estufa com circulação de ar a 70°C, método nº 44-15.02 (AACC, 2010), resíduo mineral fixo em mufla a 550°C (AACC-2010), proteínas pelo procedimento de Kjeldahl, método nº 37.1.35, (AOAC-1995) e lipídeos totais pelo método a frio (BLIG E DYER, 1959). A determinação de fibra bruta foi realizada em digestor semi-industrial enzimático-gravimétrico (AOAC-1995). A determinação de carboidratos foi realizada por diferença (100g de amostra – g de umidade-cinzas-lipídeos-proteínas-fibras).

2.6. Análise físico-química de soro do leite

O soro de leite bovino obtido foi submetido às análises físicas e químicas onde foram utilizadas amostras de 50 mL em triplicatas aferindo o pH por leitura direta utilizando-se o potenciômetro digital Medidor Lab, método nº 981.12 (AOAC, 1997), e acidez titulável foi determinada por volumetria de neutralização, expressa em gramas de ácido cítrico por 100 g no método nº 942.15 (AOAC, 1997).

2.7. Crescimento dos micro-organismos e produção de enzimas em substrato testando concentrações de soro de leite

As estirpes testadas *Candida metapsilosis* KP738148.1, *Candida metapsilosis* KF131734.1 e *Lodderomyces elongisporus* AY391847.1 isoladas da bebida fermentada indígena chicha estavam mantidas em AN a 4°C de onde foram reativadas para as posteriores análise. As culturas puras

inoculadas em meio de composição específica para determinação do potencial proteolítico foram incubadas em caldo nutritivo durante 24hs a 28°C para 3 ml desta cultura serem transferidas em erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL do meio a avaliar produção proteolítica, estes mesmos foram incubados em shaker a 28°C e 150 rpm para ser avaliada atividade proteolítica em 24hs, 48hs e 72hs.

Os meios de cultura testados em duplicata foram, o controle (AN sem adição de tratamento, pH 7) e demais tratamentos em concentrações AN com 0,01% de caseína pH 7, AN com 0,01% p/p de soro de leite pH 7, AN com 0,1% de soro de leite pH 7 e AN com 1% de soro de leite pH 7 todos mantidos durante 24hs a 28 °C a 150 rpm. Amostras de 10 ml foram coletadas em cada tempo de análise para determinação atividade proteolítica, onde o sobrenadante foi obtido por centrifugação da amostra a 6.000rpm a 4°C por 15 minutos.

2.8. Determinação quantitativa da atividade proteolítica

Para avaliação de atividade e quantificação proteolítica um ensaio foi feito em triplicata com 250 uL de extrato enzimático (sobrenadante obtido por centrifugação das amostras coletadas às 24 hs, 48 hs e 72 hs) em 500 uL de caseína (m/v 0,5%) com tampão Tris-HCl 50mM pH 6,4 mantidas a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Para parar reação 500 uL de TCA(Ácido Tricloroacético 10%) foi acrescido às amostras que foram centrifugadas por 15 minutos 4°C 9000 rpm onde o sobrenadante foi reservado para leitura de absorbância.

A determinação se fez com a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro a 275 nm em cubeta de quartzo utilizando 500 uL de caseína (m/v 0,5%) dissolvida em tampão Tris-HCl 50mM pH 6,4 acrescido de 250uL de água destilada como branco. Construiu-se a curva de calibração utilizando-se diferentes concentrações do padrão de tirosina. O resultado foi expresso em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tirosina por amostra.

2.9. Análise estatística

O experimento de ensaio de quantificação de proteína produzida pelos micro-organismos selecionados no teste qualitativo foi conduzido em delineamento fatorial simples, onde os dois fatores avaliados foram a atividade proteolítica em 5 tratamentos administrados nos micro-organismos quantificando-a pelo fator tempo de 24h, 48h e 72h foram comparados em teste de média Tukey com 5% de significância ($p > 0,05$) empregando-se o *software* GENES®, Visual Basic 5.0. A comparação de produção proteolítica foi feita por meio de conversão da absorbância a 275nm, em triplicata, com a curva padrão da tirosina gerada com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação apresentada na figura 2.

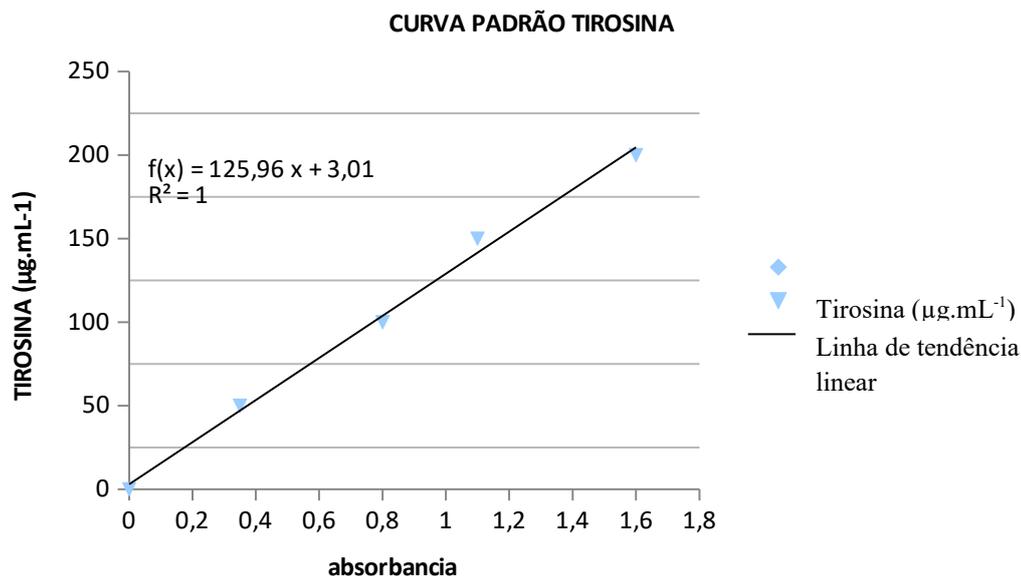


Figura 2. Curva padrão da tirosina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o as análises qualitativa das amostras em meio específico para determinação de produção proteolítica, foram obtidos 24 micro-organismos produtores de halos de degradação do substrato como indicativo. Na Tabela 1 mostra o potencial proteolítico dos isolados expresso pelo diâmetro do halo em centímetros como indicativo de produção da enzima protease onde as medidas no reverso das placas variaram de 1,5 - 2,5 cm, dos quais 11 isolados apresentaram halos entre 1,5 – 1,9, e os demais entre 2,0 - 2,5 cm.

Tabela 1. Isolados avaliados quanto à atividade proteolítica por indicativo de halo.

| Espécie | Numero de acesso | Protease* |
|----------------------------------|------------------|-----------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NR_074913.1 | 1,5±0,001 |
| <i>Enterobacter kobei</i> | NR_028993.1 | 2,0±0,003 |
| <i>Enterobacter kobei</i> | NR_028993.1 | 2,5±0,004 |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | - | 2,5±0,003 |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | - | 1,5±0,003 |
| <i>Staphylococcus capitis</i> | L37599.1 | 1,5±0,002 |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> | KC408999.1 | 2,0±0,004 |
| Não identificada | - | 2,3±0,002 |
| Não identificada | - | 2,3±0,003 |
| Não identificada | - | 2,3±0,002 |
| Não identificada | - | 1,5±0,002 |
| Não identificada | - | 2,3±0,003 |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> | JN606251.1 | 2,3±0,002 |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> | JN606251.1 | 2,1±0,002 |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> | AY391847.1 | 2,5±0,002 |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> | KP341544.1 | 2,5±0,005 |
| Não identificada | - | 1,8±0,002 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NR_074913.1 | 1,5±0,003 |
| <i>Candida metapsilosis</i> | KP738158.1 | 1,8±0,002 |
| <i>Candida metapsilosis</i> | KF134534.1 | 1,8±0,002 |
| <i>Candida metapsilosis</i> | KF131734.1 | 1,7±0,002 |
| <i>Candida metapsilosis</i> | KP738148.1 | 2,0±0,001 |
| <i>Candida metapsilosis</i> | KF131734.1 | 1,9±0,002 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KJ18307.1 | 0,9±0,03 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KJ854995.1 | 0,8±0,05 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KT959293.1 | 0,7±0,04 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KF725105.1 | 0,5±0,09 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KJ18307.1 | 0,5±0,1 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KJ854995.1 | 1,3±0,02 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KT959293.1 | 0,7±0,03 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KF725105.1 | 0,7±0,08 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KJ18307.1 | 0,9±0,09 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KJ854995.1 | 0,9±0,07 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KT959293.1 | 0,9±0,05 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KF725105.1 | 1,0±0,07 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KJ18307.1 | 0,9±0,09 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | AJ536198.1 | 0,6±0,14 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | - | 0,9±0,30 |

*Atividade enzimática proteolítica expressa em cm \pm desvio padrão.

A seleção dos micro-organismos, com identificação por MALDI-TOF disponível no banco de dados GenBank, foi feita considerando potenciais produtores de protease os que apresentaram maiores valores médios da triplicata, com seus respectivos desvios padrões. Os isolados fúngicos *Candida metapsilosis* KP738148.1, *Candida metapsilosis* KF131734.1 e *Lodderomyces elongisporus* AY391847.1 que apresentaram os maiores indicativos de produção de protease por métodos qualitativos com halo de degradação, em centímetros, sendo superiores aos demais avaliados. Protease uma enzima extracelular que executa hidrólise em proteínas menores para absorção da célula, executando papel vital na regulação do metabolismo, possui aplicabilidade na indústria química e alimentícia, com funções catalíticas, em processos industriais de fabricação (NEURATH, 1990), e potencial de biotransformação, com aproveitamento e recuperação de efluentes com presença de proteínas hidrossolúveis.

Dentre os principais fatores encontrados na *Candida spp.*, estão termotolerância; a presença de adesinas; a expressão de genes de resistência, como a produção de enzimas extracelulares, como proteases (ANDREOLA, 2016). Analisando a homologia de uma sequência de DNA não homóloga, sugeriu que estes 3 grupos serão reclassificados como espécies separadas, *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, e *Candida metapsilosis*, respectivamente, que são fenotipicamente indistinguível (TAVANTI et al.,2005). Espécies do gênero *Candida*, onde ocorre uma dificuldade de distinção de patogenia de colonizadores e comensalismo, independentemente da fonte de isolamento, diferença estatisticamente significativa foi observado na capacidade da produção de protease (CHAKRABARTI, 1991). Assim, os isolados de *Candida metapsilosis*, em seus subtipos, oriundos da produção tradicional da bebida indígena Chicha do presente estudo destacam a relação entre produção de protease por essa espécie. A levedura ascomicota, *Lodderomyces elongisporus*, teleomorfo de *Candida parapsilosis* em recentes sequenciamentos do gene rRNA de subunidade pequena mostraram que ele é uma espécie intimamente relacionada, mas distinta (JAMES, 1994). Em um estudo de análise de sequência multigênica de *Candida* e espécies relacionadas, *Lodderomyces elongisporus* se enquadra no clado de espécies patogênicas contendo *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* (DIEZMANN, 2004), mas são escassos os resultados para atividade proteolítica das mesmas, reforçando assim o estudo dessas espécies taxonômicas próximas quanto ao potencial de produção e aplicação com fins de biotransformação e aproveitamento de efluentes, como o soro de leite, sub-produto de fabricação de queijos em laticínios.

Do soro do leite *in natura* foram determinadas a composição proximal e feitas análises físico-químicas. Apresentando teor de umidade de $90,64\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, aproximados 90%, e dos constituintes de sólidos totais, o teor de cinza foi de $0,53\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, proteínas $1,69\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, 1,7% aproximados, para gorduras totais $0,17\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, 0,17%, sem presença significativa de fibras e carboidratos com diferença de $6,76\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, 6,7% (Tabela 2). Nas análises físico-químicas o valor de pH em temperatura ambiente foi de 6,24 e acidez titulável de 0,90g ácido láctico/100g (Tabela 2). Toda conversão de unidades em mililitros para gramas, para uso dos protocolos adotados, foi feita usando densidade do soro do leite com valor de $1,03\text{g/mL}$ aproximados (TEIXEIRA E FONSECA, 2008).

Tabela 2. Composição proximal e análise físico-química do soro do leite.

| Constituinte | Valor médio* |
|----------------------------|---|
| Umidade | $90,64\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \pm 0,012$ |
| Sólidos Totais | |
| Cinzas | $0,53\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \pm 0,018$ |
| Proteína | $1,69\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \pm 0,08$ |
| Gorduras Totais | $0,17\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \pm 0,02$ |
| Fibra Alimentar | $0,00\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} \pm 0,02$ |
| Carboidratos por diferença | $6,76\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ |
| pH | $6,24 \pm 0,02$ |
| Acidez titulável | $0,90^{**} \pm 0,12$ |

* Valores são expressos com média \pm desvio padrão. **Unidade expressa em g de ácido láctico/100g amostra.

Na determinação e quantificação proximal dos nutrientes do subproduto de fabricação de queijos, o soro de leite, os valores apresentados na Tabela 2 se mostraram semelhantes a outros trabalhos, sendo $0,53\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ com teor de cinzas comparados ao soro de queijo prato com $0,51\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e para soro de queijo mussarela com $0,52\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (BALD et al., 2014), $1,69\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de teor de proteínas entre $0,87$ e $2,55\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e entre $0,7$ e $1,66\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para soro de queijos minas-padrão e mozzarella (SIQUEIRA, 2000), respectivamente. Gorduras totais com 0,17% dentro da média de 0,10 a 0,35% (BALD et. al., 2014). As proteínas do soro podem exibir diferenças na sua composição de macronutrientes e micronutrientes, dependendo da forma utilizada para sua obtenção, apresentando 8g de carboidratos em 100g de concentrado protéico do soro do leite (SALZANO, 2002) como valor próximo ao apresentado de $6,76\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ pelo cálculo por diferença feito no presente estudo. E sem presença significativa de fibras alimentares, não avaliadas em outros estudos, mas dentro dos padrões (USDA, 2013).

A umidade apresentou valor inferior de teor, aproximados 90%, ao obtido para o soro de fabricação de queijo prato de 94,35% (BALD et al., 2014), 93,67% para queijo mussarela

(TEIXEIRA E FONSECA, 2008) e 92,13% para queijo coalho (PAULA et al., 2012). A divergência dos valores obtidos de teores de umidade pode ser explicada de acordo com o tipo de queijo fabricado e os processos tecnológicos empregados no leite para obtenção do soro, assim como a matéria-prima.

A acidez titulável apresentada indicou que o soro de leite é caracterizado doce por estar dentro do estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite (BRASIL, 2013). O valor de potencial hidrogeniônico (pH) de 6,24 conferindo a amostra neutralidade minimamente ácida garante que ocorra crescimento microbiano pelo amplo espectro de micro-organismos que encontram nessa faixa de concentração de íons OH^+ as condições favoráveis de crescimento e desenvolvimento, onde pH inferiores a 4,0 são considerados muito ácidos restringindo a presença de bactérias e fungos. O valor de densidade de 1,03g/mL aproximados (TEIXEIRA E FONSECA, 2008) utilizado para conversões de unidades do soro, se assemelhou a valores obtidos para leite bovino fluído.

Enzimas proteolíticas, como outras proteínas, possuem condições de concentração, disponibilidade e afinidade ao substrato, temperatura e pH que tem influência direta na sua capacidade de uma enzima catalisar uma reação como sua propriedade mais significativa. A atividade catalítica de uma enzima proporciona um meio sensível e específico para sua própria mensuração, sob condições apropriadas de uma reação depende da concentração de enzima e substrato (SAID e PIETRO, 2002). O teor de proteínas mesmo que dentro dos padrões para produto de fabricação de leite, tem valor nutritivo de proteínas que depende principalmente da capacidade desta em suprir as necessidades do organismo, de todos os aminoácidos dieteticamente indispensáveis, sendo que o aproveitamento biológico, biodisponibilidade (LEVESQUE et al., 2010) permite a disponibilidade de substrato para micro-organismos proteolíticos, associando assim a faixa de pH neutra do soro de leite *in natura* aplicando-o no ensaio de determinação quantitativa permitiu avaliar o potencial microbiano direto nas mesmas condições do efluente.

Com relação à análise de variância dos tratamentos foi observado que não houve diferença estatística significativa entre os tempos avaliados de atividade protéica nos três micro-organismos, ou seja, as amostras se mostraram homogêneas sem variação das médias nesse fator. No entanto, estatisticamente, a 5% de significância pelo teste Tukey, o fator atividade proteolítica, nas linhas em letras minúsculas, se diferenciaram quando comparado as concentrações do efluente administradas em cada micro-organismo.

Tabela 3. Ensaio de atividade proteolítica por três espécies de leveduras sob agitação 150 rpm durante 72 horas.

| Espécie | Tratamento | Atividade proteolítica* | | |
|---------|------------|-------------------------|----------------|----------------|
| | | 24h | 48h | 72h |
| CM1 | I | 25,003±1,65Ab | 44,140±0,32Aab | 58,744±1,35Aa |
| | II | 27,101±2,49Ab | 10,399±8,60Ab | 63,319±3,59Aa |
| | III | 23,912±2,79Aa | 22,275±3,80Aa | 38,642±1,22Aa |
| | IV | 27,102±4,22Aa | 12,791±3,17Aa | 22,989±0,41Aa |
| | V | 23,912±0,38Aa | 30,165±0,59Aa | 23,618±0,44Aa |
| CM2 | I | 22,611±3,85Aa | 34,697±4,90Aa | 15,351±0,62Aa |
| | II | 14,260±1,00Ab | 52,072±2,28Aa | 22,653±5,13Ab |
| | III | 15,686±2,99Ab | 52,533±7,98Aa | 20,4713±6,08Ab |
| | IV | 22,863±6,11Aa | 26,430±1,54Aa | 32,977±0,50Aa |
| | V | 7,797±1,36Aa | 10,776±8,07Aa | 25,884±8,78Aa |
| LD1 | I | 18,079±2,50Aa | 17,491±1,60Aa | 25,884±0,89Aa |
| | II | 16,274±1,78Aa | 14,511±0,32Aa | 32,515±5,43Aa |
| | III | 26,975±3,97Aa | 24,416±6,02Aa | 37,215±3,70Aa |
| | IV | 15,099±0,35Aa | 14,721±2,90Aa | 27,479±3,47Aa |
| | V | 7,713±0,15Ab | 27,185±3,47Aa | 28,360±0,51Aa |

Legenda: Espécies: CM1 - *Candida metapsilosis* KP738148.1; CM2 - *Candida metapsilosis* KF131734.1; LD1 - *Lodderomyces elongisporus* AY391847.1. Tratamentos: I – controle AN; II - AN. + 0,01% caseína; III - AN. + 0,01% soro de leite; IV - AN. + 0,1% soro de leite; V - AN. + 1% soro de leite. *Atividade proteolítica expressa em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ \pm desvio padrão. Valores médios seguidos de letras maiúsculas iguais na horizontal (linha) e minúsculas iguais na vertical (coluna) dentro de cada espécie não diferem significativamente entre si ao nível de 5 % ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.

Em CM1, as maiores produtividade foram com 63,319 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 58,744 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ em AN. + 0,01% caseína e no controle, respectivamente, ambos em 72h de cultivo, ambas superiores e com diferenças estatísticas das demais concentrações de efluente soro de leite administradas. Comparando as mesmas concentrações em CM2, AN. + 0,01% caseína e AN. + 0,01% soro de leite, respectivamente, 52,072 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 52,533 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, se mostrou com maiores produtividades mas sem diferenças estatísticas com as demais concentrações, com exceção das mesmas concentrações em 24h e 72h de cultivo. A menor produção proteolítica expressa foi em 24h de cultivo com concentração de 1% de soro de leite com AN, com 7,713 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ que inferior as demais médias de concentrações em LD1 com maior produção em 0,01% de soro de leite em AN com 72h de cultivo, mas ainda sem diferenças estatísticas significativas das demais.

Para comparar o efeito do tempo de cultivo associado às concentrações de suplementação do substrato no rendimento de atividade proteolítica expressa em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a Figura 1 compara a produtividade entre os micro-organismos testados.

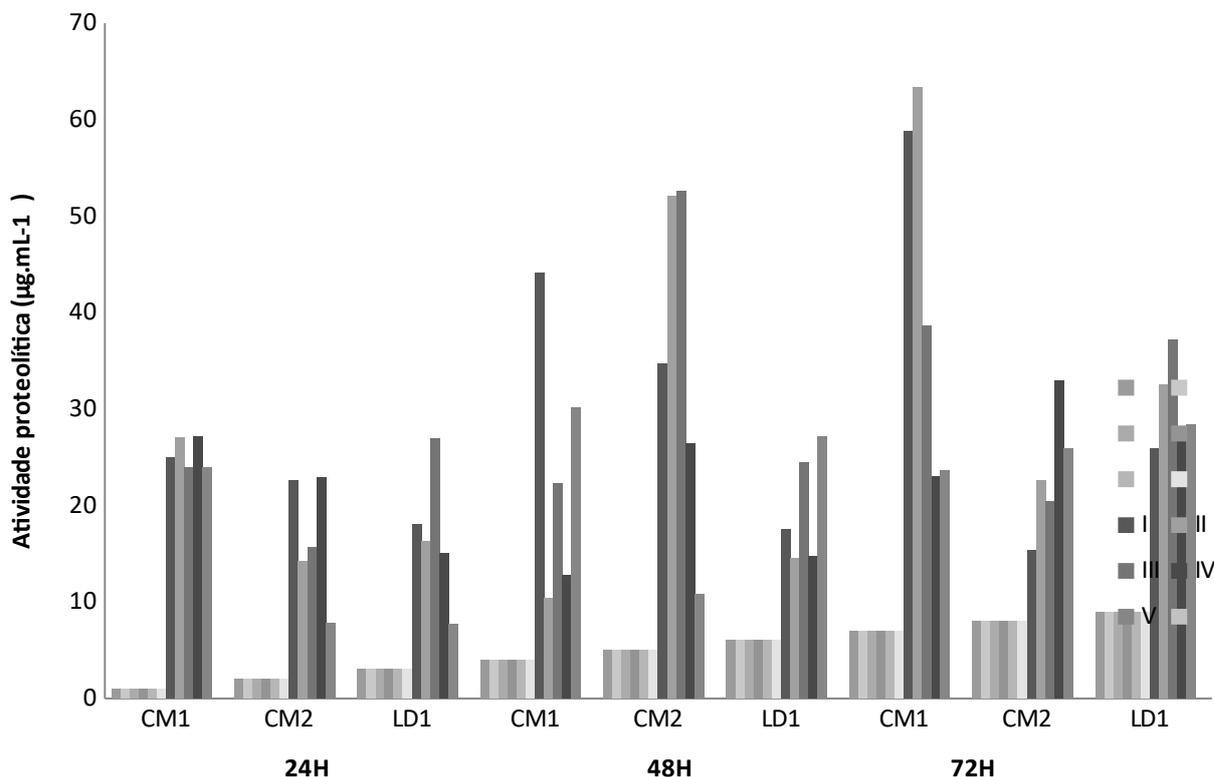


Figura 1. Distribuição da atividade proteolítica de micro-organismos testados em cinco (I,II,III,IV e V), respectivamente, concentrações por 24h, 48h e 72h de cultivo. Legenda: CM1 - *Candida metapsilosis* KP738148.1; CM2 - *Candida metapsilosis* KF131734.1; LD1 - *Lodderomyces elongisporus* AY391847.1. Atividade proteolítica expressa em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Sendo CM1, CM2 e LD1 em tratamentos de concentrações controle de AN sem adição proteica, AN. + 0,01% caseína, AN. + 0,01% soro de leite, AN. + 0,1% soro de leite e AN. + 1% soro de leite, respectivamente, I, II, III, IV e V em 24h, 48h e 72h de cultivo podendo-se observar que a os fatores, combinados ou individuais, sem considerar relações estatísticas significativas, afetaram nos valores médios obtidos de atividade proteolítica.

Enzimas proteolíticas, como outras proteínas, possuem condições de concentração, disponibilidade e afinidade ao substrato, temperatura e pH que tem influência direta na sua capacidade de uma enzima catalisar uma reação como sua propriedade mais significativa. A atividade catalítica de uma enzima proporciona um meio sensível e específico para sua própria mensuração, sob condições apropriadas de uma reação depende da concentração de enzima e substrato (SAID e PIETRO, 2002). O teor de proteínas mesmo que dentro dos padrões para produto de fabricação de leite, tem valor nutritivo de proteínas que depende principalmente da

capacidade desta em suprir as necessidades do organismo, de todos os aminoácidos dieteticamente indispensáveis, sendo que o aproveitamento biológico, biodisponibilidade (LEVESQUE et al., 2010) permite a disponibilidade de substrato para micro-organismos proteolíticos, associando assim a faixa de pH neutra do soro de leite *in natura* aplicando-o no ensaio de determinação quantitativa permitiu avaliar o potencial microbiano direto nas mesmas condições do efluente.

No entanto, não se pode desconsiderar a influência do micro-organismo sobre esse processo de conversão. Nas diferentes condições de cultivo observou-se nesse estudo que as maiores atividades foram obtidas com o inóculo de menores concentrações, controle para CM1 em 48h e 72h, como com CM2 AN com 0,01% de caseína e AN com 0,01% de soro de leite em 48h. comprovando que a produção de enzimas de origem microbiana depende também principalmente do próprio micro-organismo, visto que nos cultivos em sistema fechado a concentração de nutrientes, biomassa e os metabólitos alteram constantemente, devido ao metabolismo microbiano (BRUMANO et al., 1993; TEIXEIRA, 1997; TUCKER & THOMAS, 1994). A maior produção da CM1 foi na amostra controle, onde não ocorre presença de proteínas oriundas do soro de leite, o que permite considerar que o micro-organismo não possui rendimento em substrato suplementado não sendo uma opção para tratamento do efluente, antes de serem avaliados outros aspectos, como a temperatura.

Em relação ao tempo de cultivo, as menores atividades proteolíticas se mostraram em 24h, no geral, permitindo concluir que nessas condições a presença ou não de suplemento no substrato não é o mais indicado quando se visa alta produtividade, mas que pode estar relacionado a fase de adaptação dos micro-organismos ao substrato que restringiu a produção. Em outros estudos o aumento nos níveis de variáveis como aumento de pH, concentração de substrato e tempo favorecem reações enzimática, já que a eficiência do sítio ativo das enzimas no aumento do grau de conversão avaliados (LIRA et al., 2010), confirmando que aumento no tempo em relação a ação da enzima é importante para se elevar o rendimento de extração que produz uma hidrólise mais acentuada da molécula protéica, com a formação de peptídeos de cadeias mais curtas (FISHER, 2001).

Embora a qualidade nutricional das proteínas do soro seja amplamente conhecida, estudos que compararam entre a qualidade nutricional das proteínas do soro com outras fontes protéicas se mostraram oportunas (ANTUNES, 2003). No presente estudo o desempenho dos micro-organismos em diferentes concentrações de inóculo em fermentação submersa suplementados com 0,01% de soro de leite e igualmente em caseína, mostrou resultados em 72h para LD1 e nas mesmas concentrações em 48h e 72h de CM2 em que as maiores atividades proteolíticas foram

obtidas, para ambos os micro-organismos, com soro de leite, permitindo concluir que nessas condições o efluente confere maior rendimento que a proteína industrializada (Figura 1).

5. CONCLUSÃO

Portanto a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o isolado de *Lodderomyces elongisporus* AY391847.1 em AN com 0,01% de soro de leite em 72h de cultivo e *Candida metapsilosis* KF131734.1 em AN com 0,01% de soro de leite em 48h e 72h de cultivo possuem potencial proteolítico para serem utilizados como forma biológica de reaproveitamento desse efluente de laticínios.

6. REFERENCIAS

AACC. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. St Paul: Approved Methods Committee, 2010.

ANDREOLA, P. et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. Rev. odontol. UNESP. vol.45, n.4, pp.219-226. Epub Sep 01, 2016.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists International Official Methods of Analysis. 16th Edition, 1995.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists International Official Methods of Analysis. 16th Edition, 1997.

ANTUNES, A. J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. São Paulo: Ed. Manole, p.142, 2003.

BALD, J. A. et al. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzidos no Vale do Taquari, RS. Revista Jovens Pesquisadores, Santa Cruz do Sul, v. 4, n. 1, p. 90-99, 2014.

BLIGH E.G., DYER W.J. A lipid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem., 37, 911-917, 1959.

CASSONE A, BERNADIS FD, MENDELLO F, CEDDIA T. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidiasis. J Inf Dis; 156(5): 777-83. 1987

CHAKRABARTI A., NAYAK N., TALWAR P. In vitro proteinase production by *Candida* species. Mycopathologia 114:163–168; 1991.

- DIEZMANN, S.; COX, C.J.; SCHÖNIAN, G.; VILGALYS, R. J.; MITCHELL, T.G. Filogenia e evolução de espécies medicinais de *Candida* e taxa taxonômica relacionada: uma análise multigênica. J. Clin. Microbiol. 5624 -5635, 2004 .
- GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 2006.
- GRANDI, J. G. Leite fermentado, manteiga e queijo. In: AQUARONE, Eugênio (Coord.) Alimentos e bebidas produzidas por fermentação. São Paulo. Editora Edgar Blucher Ltda., 1983.
- GOMES, F.C.O., LACERDA, I.C.A., LIBKIND, D., LOPES, C., CARVAJAL, E.J., ROSA, C.A.. Traditional foods and beverages from South America: microbial communities and production strategies. J. Krause, O. Fleischer (Eds.), Industrial Fermentation: Food Processes, Nutrient Sources and Production Strategies, Nova Science Publishers Inc, New York, USA (2009).
- JAMES, S.A.; COLLINS, M. D.; ROBERTS, I. N. A relação genética de *Lodderomyces elongisporus* com outras espécies de ascomicetos de levedura, conforme revelada por sequências de genes de subunidades pequenas de rRNA. Lett. Appl. Microbiol. 1994.
- FISCHER, M. et al. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. J. Agric. Food Chem., Easton, v. 49, n. 9, p. 4463-4469, sep. 2001
- LEVESQUE, C.L.; MOEHN, S.; PENCHARZ, P.B.; BALL, O.B. Review of advances in metabolic bioavailability of amino acids. Livestock Science Journal (133)4–95, 2010.
- LIRA, T. B. F. et al. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. Pesq. agropec. bras. 2010, vol.45, n.9, pp.1036-1043.
- RESENDE, L. V.; PINHEIRO, L. K. Microbial community and physicochemical dynamics during the production of “Chicha”, a traditional beverage of Indigenous people of Brazil. Article. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018.
- NAKASE T, KOMAGATA K, FUKUZAWA Y. A comparative taxonomic study ohn two forms of *Candida parapsilosis*. J Gen Appl Microbiol. 1979;25:375-86.
- NEURATH, H. The versatility of proteolytic enzymes. Journal of Cellular Biochemistry, v. 32, n. 1, p. 35-49, 1986.
- NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Eds.). Proteolytic enzymes - a practical approach. Oxford: JRL Press, 1990.

- NOUT, M. J. R.; MOTARJEMI, Y. Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety : a joint FAO / WHO workshop. Food Control, 8(5/6), 221–226, 1997.
- PAULA, J. C. J. et al. Aproveitamento de soro de queijo de coalho na elaboração de bebida láctea fermentada. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 67, p. 25-33, 2012.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Quím. Nova 2004, vol.27, n.2, pp.293-300. ISSN 0100-4042.
- RAMOS, C.L.; DE ALMEIDA, E.G.; PEREIRA, G.V.D.M.; CARDOSO, P.G.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. Int. J. Food Microbiol., 140 (2 e 3), 225, 231, 2010.
- SAID, S., PIETRO, R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Edição 2002, p.121.
- SALZANO, Jr. Nutritional supplements: practical applications in sports, human performance and life extension. São Paulo; 1996-2002. p.75-202.
- SIQUEIRA, I.M.C. Avaliação da Qualidade físico-química e microbiológica de quatro tipos de soro de queijo. 2000. 104f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C. Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol 43:284–292, 2005.
- TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.
- TIMOFIECSYK, F.R et al. Minimização de resíduos em indústria de alimentos. In: Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos. Vol. 18, nº2 jul/dez p. 221-235, 2000.
- USDA. Padrão de Referência Nacional da Base de Dados de Nutrientes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), versão 25, 2013.