

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Proteases de Levedura de Cervejaria
(*Saccharomyces cerevisiae*): Obtenção, caracterização e
aplicação em panificação**

Alexandre Nunes Ponezi

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como requisito para obtenção do Título de Mestre
em Tecnologia de Alimentos.

Campinas, Agosto de 1997

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P773p

Ponezi, Alexandre Nunes

Proteases de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*): obtenção, caracterização e aplicação em panificação / Alexandre Nunes Ponezi. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Gil Eduardo Serra

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteases. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Panificação - tecnologia. 4. Massas. I. Serra, Gil Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Proteases de Levedura de Cervejaria
(*Saccharomyces cerevisiae*): Obtenção, caracterização e
aplicação em panificação.

Alexandre Nunes Ponezi

Biólogo

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ALEXANDRE NUNES PONEZI e aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de agosto de 1997.

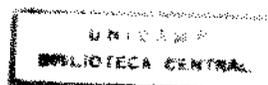
Campinas, 27 de agosto de 1997.


Prof. Dr. GIL EDUARDO SERRA
Presidente da Banca

Orientador:

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra

Campinas, Agosto de 1997



BANCA EXAMINADORA



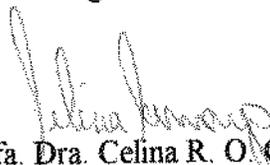
Prof. Dr. Gil E. Serra

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP



Profa. Dra. Hélia A. Sato

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP



Profa. Dra. Celina R. O. Camargo

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri

Instituto Tecnológico de Alimentos - ITAL

DEDICO

a todos que, direta ou
indiretamente, colaboraram para
a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gil E. Serra pela orientação e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Hélia A. Sato, pelas correções e sugestões da tese e pela participação na banca examinadora.

A Profa. Dra. Celina R. O. Camargo, pelo apoio, correções e sugestões da tese, pela utilização do laboratório de Cereais e Panificação para o desenvolvimento da parte prática e pela participação na banca examinadora.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos e especialmente ao funcionários do Laboratório de Cereais e Panificação, e da biblioteca da FEA, pela atenção e préstimos durante os anos de convivência.

Aos funcionários do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas CPQBA, pelo apoio e compreensão.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas CPQBA, Edilberto Princi Portugal e Marta Cristina Teixeira Duarte, pelo apoio, sugestões, compreensão, e paciência por todos estes anos de convivência.

Agradeço especialmente aos meus pais, irmã e avós, pela compreensão, apoio e paciência durante todos estes anos, e à minha amiga e esposa Marta Cristina, que além disso muito me ajudou na realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Sistema proteolítico de Leveduras.....	3
2.2. Localização celular das proteases.....	8
2.3. Inibidores das proteases.....	8
2.4. Fatores que influenciam a atividade das enzimas proteolíticas de Levedura.....	11
2.4.1. Efeito da temperatura.....	12
2.4.2. Efeito do pH.....	12
2.4.3. Efeito de íons metálicos.....	13
2.4.4. Efeito da força iônica.....	14
a) Cloreto de sódio.....	14
b) Uréia.....	14
2.4.5. Efeito de agentes químicos específicos.....	15
a) N-Etilmaleimida (NEM).....	15
b) β -Mercaptoetanol.....	15
c) Fenilmetanosulfonil Fluoreto (PMSF).....	16
d) N-Bromosuccinamida (NBS).....	16
2.5. Indutores de autólise das células de Levedura.....	17
2.6. Características do processo de autólise.....	18
2.7. Obtenção e aplicação das proteases de Leveduras.....	20
2.8. Enzimas proteolíticas em panificação.....	23
2.8.1. Ação das proteases em massas.....	23
2.8.2. Fontes de enzimas proteolíticas.....	24
2.8.3. Determinação dos efeitos das proteases em massas através de métodos reológicos.....	25
2.8.3.1. Efeito de proteases nas propriedades de mistura da massa determinados pelo Farinógrafo.....	26
2.8.3.2. Efeito de proteases nas propriedades viscoelásticas da massa determinadas pelo Extensógrafo.....	27

2. 8. 4. Efeito das proteases no processamento de pães	28
2. 8. 5. Proteases no processamento de biscoitos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3. 1. MATERIAL	32
3. 1. 1. Microrganismo.....	32
3. 1. 2. Proteases utilizadas no teste de aplicação	32
3. 1. 3. Reagentes e soluções	33
3. 1. 4. Equipamentos	33
3. 2. PROCEDIMENTOS E ENSAIOS.....	34
3. 2. 1. Obtenção das proteases.....	34
a) Limpeza da suspensão de Leveduras	34
b) Ensaio de autólise das células	36
c) Ensaio de solubilização das proteínas para obtenção do extrato protéico bruto	36
d) Purificação do extrato protéico por fracionamento com Sulfato de amônio em meio ácido.....	37
e) Ativação das proteases.....	37
f) Purificação das proteases.....	37
g) Concentração das proteases.....	37
h) Ensaio de liofilização das enzimas.....	38
3. 2. 2. Ensaio para caracterização das proteases de Levedura.....	38
3. 2. 2. 1. Atividade das proteases em função da temperatura.....	38
3. 2. 2. 2. Atividade das proteases em função do pH.....	38
3. 2. 3. Ensaio de aplicação das proteases de Levedura.....	39
3. 2. 3. 1. Análise da farinha de trigo.....	39
3. 2. 3. 2. Preparo da massa submetida à ação das proteases.....	39
3. 2. 3. 3. Concentração de enzimas adicionadas na farinha para estudo das modificações reológicas.....	40
3. 3. Métodos para determinação de proteínas e atividade das proteases, nos ensaios enzimáticos.....	40
3. 3. 1. Determinação de proteínas.....	40
a) Preparo do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250	41
b) Elaboração da reta padrão de proteína	41

3. 3. 2. Atividade enzimática	41
3. 4. Métodos para caracterização da farinha de trigo e massas preparadas.....	42
3. 4. 1. Parâmetros químicos e físico-químicos para análise da farinha de trigo	42
a) Proteína	42
b) Cinzas	42
c) Determinação de pH:	42
d) Determinação de umidade.....	43
e) Determinação de teor de glúten úmido e seco	43
f) Número de queda “Falling Number”	43
3. 4. 2. Métodos reológicos para avaliação da qualidade da farinha de trigo.....	44
3. 5. Análise estatística.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4. 1. Caracterização da farinha de trigo	46
4. 2. Obtenção das proteases.....	47
4. 2. 1. Avaliação da atividade enzimática sob temperatura e tempos diversos de autólise, em extratos brutos.	47
4. 2. 2. Avaliação dos dialisados obtidos sob temperatura e tempos diversos	50
4. 2. 3. Avaliação de diferentes solução tampão para obtenção de extrato enzimático bruto....	52
4. 2. 4. Liofilização das enzimas	55
4. 2. 5. Processo otimizado de obtenção das proteases	57
4. 3. Caracterização das proteases.....	58
4. 3. 1. Atividade das proteases em função da temperatura	58
4. 3. 2. Atividade das proteases em função do pH	62
4. 4. Avaliação do efeito de proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada) na massa através do extensógrafo.....	64
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7. ANEXO I.....	84
8. ANEXO II.....	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades das Proteases de Levedura.....	3
Tabela 2 - Resultados das características da farinha de trigo.....	39
Tabela 3 - Resultados referentes às características reológicas da farinha do tipo comercial, utilizada neste trabalho para teste do efeito de proteases na massa.....	46
Tabela 4 . Análise extensográfica da massa preparada. Resultados de resistência a extensão (RE); resistência máxima (RM); extensibilidade (E); número proporcional (RE/E) e energia (A).....	46
Tabela 5 - Atividade proteolítica e teor de proteínas dos extratos enzimáticos brutos obtidos obtidos por autólise da levedura a 30° e 50°C, em diferentes períodos de incubação.....	48
Tabela 6 - Atividade proteolítica e concentração de proteínas das preparações enzimáticas obtidas por dialise dos autolizados de levedura.....	51
Tabela 7 - Resultados obtidos nos extratos enzimáticos brutos, preparados com a utilização de diferentes solução tampão (0,05 m, pH 6,0): fosfato, citrato-fosfato e citrato.....	53
Tabela 8 - Resultados obtidos nos extratos enzimáticos dialisados, preparados com a utilização de diferentes solução tampão (0,05 m, pH 6,0): fosfato, citrato-fosfato e citrato.....	54
Tabela 9 - Atividade proteolítica e teor de proteína das proteases submetida a liofilização com diferentes estabilizantes.....	55

Tabela 10 - Efeito da temperatura e tempo de incubação das enzimas proteolíticas de <i>S. cerevisiae</i> , sobre a atividade em caseína a 1%. médias de 3 repetições, expressos em u/mL.....	60
Tabela 11 - Efeito da variação do pH na atividade das proteases de levedura, incubadas em caseína 1%, 37°C, durante 30 minutos.....	63
Tabela 12 - Efeito do extrato líquido de proteases de levedura nas propriedades extensográficas da massa.....	65
Tabela 13 - Efeito das proteases de levedura liofilizada nas propriedades extensográficas da massa.....	65
Tabela 14 - Efeito de protease bacteriana comercial nas propriedades extensográficas da massa.....	66
Tabela 15 - Efeito de protease fúngica comercial nas propriedades extensográficas da massa.....	66
Tabela 16 - Atividade proteolítica das enzimas de levedura (extrato líquido e liofilizado) e das proteases bacteriana e fúngica.....	84
Tabela 17 - Efeito do extrato líquido de protease de levedura adicionado à massa. Parâmetros avaliados: resistência a extensão (RE), resistência máxima (RM), extensibilidade (E), número proporcional (RE/E) e energia (A).....	85
Tabela 18 - Efeito da protease de levedura liofilizada adicionada à massa. Parâmetros avaliados: resistência a extensão (RE), resistência máxima (RM), extensibilidade (E), número proporcional (RE/E) e energia (A).....	85

Tabela 19 - Efeito da protease bacteriana adicionada à massa. Parâmetros avaliados: resistência a extensão (RE), resistência máxima (RM), extensibilidade (E), número proporcional (RE/E) e energia (A).....86

Tabela 20 - Efeito da protease fúngica adicionada à massa. Parâmetros: resistência a extensão (RE), resistência máxima (RM), extensibilidade (E), número proporcional (RE/E) e energia (A).....86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Obtenção e purificação das enzimas de <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	22
Figura 2 - Fluxograma para a obtenção e purificação das enzimas de <i>S. cerevisiae</i> (adaptado de WOODS & KINSELLA, 1980b), com a indicação dos tratamentos a serem testados.....	35
Figura 3 - Atividade proteolítica e teor de proteínas do extrato enzimático bruto de levedura de cervejaria (<i>S. cerevisiae</i>), obtidos por autólise a 30 ^o e 50 ^o C, em diferentes períodos de incubação.....	49
Figura 4 - Atividade proteolítica em extrato enzimático bruto de levedura de cervejaria (<i>S. cerevisiae</i>), obtidos por autólise a 30 ^o e 50 ^o C, em diferentes períodos de incubação.....	49
Figura 5 - Atividade proteolítica e teor de proteínas em dialisados de levedura obtidos por autólise a 30 ^o e 50 ^o C, em diferentes períodos de incubação.....	51
Figura 6 - Atividade proteolítica em dialisados de levedura de cervejaria (<i>S. Cerevisiae</i>) obtidos por autólise a 30 ^o e 50 ^o C, em diferentes períodos de incubação.....	52
Figura 7 - Atividade proteolítica e teor de proteínas dos extratos enzimáticos brutos (A) e dialisado (B), preparados com diferentes soluções tampão. Autólise a 50 ^o C com 3 horas de incubação.....	54
Figura 8 - Efeito de estabilizantes sobre a atividade das proteases de levedura (<i>S. cerevisiae</i>), incubadas em caseína a 1%, 37 ^o C durante 30 minutos. Os estabilizantes utilizados foram: 1) leite desnatado e sorbitol; 2) SPGA; e 3) H.....	56

Figura 9 - Etapas e condições desenvolvidas ou selecionadas para obtenção de proteases a partir de suspensão de <i>S. cerevisiae</i> proveniente de fermentação industrial da produção de cerveja.....	58
Figura 10 - Efeito da temperatura na atividade das enzimas proteolíticas de levedura na hidrólise da caseína sob diferentes temperaturas e períodos de tempo.....	61
Figura 11 - Efeito de diferentes valores de pH na atividade das enzimas proteolíticas de <i>S. cerevisiae</i> incubadas em caseína a 1% a 37°C por um período de incubação de 30 minutos.....	63
FIGURA 12 - Efeito de enzimas proteolíticas de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), proteases bacteriana e fúngica, na extensibilidade da massa.....	67
Figura 13 - Efeito de enzimas proteolíticas de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), proteases bacteriana e fúngica, na resistência à extensão da massa.....	67
Figura 14 - Efeito de enzimas proteolíticas de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), proteases bacteriana e fúngica, na resistência máxima da massa.....	68
Figura 15 - Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, na resistência à extensão (RE) da massa, expresso em % de unidades extensográficas (% UE).....	87
Figura 16 - Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, na resistência máxima (RM) da massa, expresso em % de unidades extensográficas (%UE).....	88
Figura 17 - Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, na extensibilidade da massa (E) da massa, expresso em % do comprimento (% cm).....	89

Figura 18 - Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, no número proporcional (RE/E) da massa, expresso em % de unidades extensográficas (UE/cm).....90

Figura 19 - Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, na energia da massa, expresso em % da área do extensograma (% dm²).....91

RESUMO

A obtenção de produtos a partir das células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), é de grande interesse devido à disponibilidade da biomassa excedente gerada nas indústrias cervejeira e sucroalcooleira.

O objetivo desse trabalho foi de obter proteases a partir de biomassa de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*) em diferentes graus de pureza (extrato bruto e purificado), otimização tecnológica de obtenção das proteases, bem como estudar seus efeitos sobre a massa de panificação.

A extração das proteases de levedura foi conduzida através de autólise com clorofórmio 1:1 (P/V), seguida de precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação, centrifugação, desalinização e purificação através de diálise. A melhor atividade enzimática obtida foi com autólise a 50°C durante 3 horas. As proteases obtidas mostraram uma atividade enzimática máxima entre 50 - 55°C (1,41U/mL), após 40 minutos a pH 6,0. Dentro de uma faixa de temperatura variando de 35 a 60°C e de 20 a 120 minutos, a atividade manteve-se em 80% da atividade máxima. A inativação das enzimas ocorreu a partir de 70°C em 10 minutos.

Testes de aplicação das proteases (extrato bruto e enzima liofilizada) no preparo de massas para panificação foram estudados. A ação das proteases de levedura sobre as modificações reológicas da massa mostrou ser similar a de proteases fúngica e bacteriana comerciais. Foi observado que as proteases de levedura provocaram um aumento na extensibilidade da massa e um decréscimo da resistência à extensão e resistência máxima, com o aumento da concentração de proteases.

ABSTRACT

The disponibility of resulting trash from beer and alcoholic fermentation industries has aroused an interest to its sideproducts.

The scope of this work was to obtain proteases from beer yeast biomass (*Saccharomyces cerevisiae*) with different degrees of purification (crude and purified extract), to study the effects on dough and technological optimization.

The yeast proteases extraction was carried out by autolysis with chloroform 1:1 (P/V), followed by sulfate precipitation with 70% of concentration, centrifugation, desalting and purification by dialysis. The greatest enzymatic activity was obtained with autolysis at 50°C during 3 hours. The maxim proteases activity was obtained with 50 - 55°C (1,41U/mL), after 40 minutes at pH 6,0. At temperature of 35 a 60°C during 20 to 120 minutes, the enzymatic activity observed was 80% of maxim one the inactivation of enzymes occurs at 70°C after 10 minutes.

Application test of proteases (crude and lyophilized enzymes) on dough were investigated. The yeast proteinases activity was comparable with commercial proteases of fungi and bacteria. An increase in extensibility, decrease of resistance to extension and resistance maxim were observed with increasing proteases concentration.

1. INTRODUÇÃO

Células de levedura oferecem grande potencial como fonte de proteínas para o uso na alimentação animal e humana, e também como matéria-prima para obtenção de produtos de interesse na indústria farmacêutica e de alimentos, como enzimas (invertase, β -glicanase, proteases), vitaminas (B2, B6, B12), polissacarídeos (parede celular), entre outros. Vários métodos são utilizados na obtenção desses produtos, que apresentam em comum a necessidade de um tratamento prévio para o rompimento da parede celular. Este rompimento pode ser efetuado através de tratamento enzimático, químico ou mecânico (KERY et al, 1991; LINDBLOM, 1977; HEDENSKOG et al, 1970). Entretanto, durante o rompimento da parede celular, ocorre liberação das enzimas proteolíticas endógenas, cuja atividade acarreta hidrólise das proteínas (LINDBLOM, 1977; KINSELLA e SHETTY, 1978; SHETTY e KINSELLA, 1978 e WOODS e KINSELLA, 1980b). A centrifugação de extratos protéicos obtidos por processo mecânico de ruptura celular, mostra que mais de 50% das enzimas proteolíticas são sedimentadas juntamente com os fragmentos celulares, indicando que essas enzimas são encontradas associadas à porção insolúvel da célula (WOODS e KINSELLA, 1980b) e também são encontradas no vacúolo, onde permanecem na forma inativa (MATILLE e WIENKEN, 1967; CABIB e ULANE, 1973a; HASILIK et al., 1974 e LENNEY et al., 1974).

As enzimas proteolíticas de leveduras podem ser separadas e purificadas durante o processo de isolamento de proteínas, obtendo-se assim, isolados protéicos e enzimáticos com rendimento e qualidade adequadas.

Seu uso estende-se à fabricação de queijos, carnes tenderizadas, pães, cerveja, detergentes e alimentos protéicos, (WOODS e KINSELLA, 1980a; WOODS e KINSELLA, 1980b; WOODS et al., 1980).

O interesse em conhecer a aplicabilidade dessas enzimas proteolíticas em indústrias de alimentos, como substituto ou coadjuvante a enzimas de origem vegetal e animal, é de grande interesse devido à disponibilidade da biomassa de levedura e ao baixo custo de obtenção.

A maioria das pesquisas efetuadas com proteases de levedura, teve como objetivo seu isolamento, purificação e testes de atividade com substratos convencionais. Os poucos trabalhos visando a utilização comercial dessas proteases, se limitaram ao relato superficial de testes e sua aplicação potencial. O objetivo desse trabalho é: a) obter proteases a partir de biomassa de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*) em diferentes graus de pureza (extrato bruto

Introdução

e purificado); b) otimização tecnológica de obtenção das proteases; c) quantificação de rendimentos do processo e de atividade enzimática. Paralelamente aos objetivos deste plano, também serão obtidas quantidades adequadas de enzimas e serão buscados parceiros para testes de aplicação do produto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistema proteolítico de Leveduras

Vários autores evidenciaram a presença de um sistema proteolítico em leveduras, que se constitui de 2 endopeptidases, denominadas proteínase A e proteínase B (LENNEY et al., 1974; LOOZE et al., 1979; MECHLER et al., 1982; NOWAK, 1979; SAHEKI & HOLZER, 1975); a carboxipeptidase Y (HASILIK & TANNER, 1978; HAYASHI et al., 1975a) ou a carboxipeptidase S, presente em mutantes onde a Y não aparece (WOLF & EHMANN, 1978); 4 aminopeptidases (MATILE et al., 1970; NOWAK & TSAI, 1988) e 1 dipeptidase (ROEHM, 1974). As enzimas de maior interesse são as endopeptidases A e B e as carboxipeptidases Y e S, devido à sua aplicação em determinados produtos alimentícios (Tabela 1)*.

Tabela 1. Propriedades das proteases de levedura.

Enzima	Proteínase A	Proteínase B	Carboxipeptida se Y	Carboxipeptidase S
Tipo Características	endopeptidase ácida	endopeptidase serina protease	serina protease	Metalo endopeptidase (Zn ²⁺)
pH ótimo	2-6	6-10	4-7	7
T ° C ótima *	35-40	45-55	45-55	60
Localização celular	vacúolo	vacúolo	vacúolo	vacúolo
Solubilidade	solúvel	solúvel	solúvel	solúvel
Peso molecular	60.000	32.000-44.000	61.000	não determinado
Ponto isoelétrico	3,8	5,8	3,6	-
Inibidores	Proteína I ^{A-3} , pepstatina, etc.	Proteína I ₂ ¹³ , cimostatina, etc.	Proteína I ^e , Hg ²⁺	EDTA
Degradação celular	proteólise	proteólise	proteólise	proteólise

Fonte: dados baseados em * MADDOX & HOUGH, 1970 e ACHESTER et al., 1985 .

A caracterização dessas enzimas teve início nos trabalhos de DERNBY (1917) apud: WOLF, (1980) e WILLSTÄTTER & GRASSMANN, (1926), apud: WOLF, (1980). Trabalhos posteriores de LENNEY & DALBEC (1967); DOI et al. (1967) apud: WOLF, (1980) e HATA et al. (1967a,b), relataram a separação e caracterização de três enzimas proteolíticas de *S. cerevisiae*, denominadas de proteases A, B, e Y (também denominada de C). HAYASHI et al. (1970, 1973) isolaram outra enzima proteolítica chamada de

carboxipeptidase Y. A verificação da ação das proteases A e B sobre as proteínas de levedura *in vivo*, e as suas possíveis implicações nos processos metabólicos, foram determinantes para o aumento do interesse dessas duas proteases (CABIB & FARKAS, 1971; KATSUNUMA et al., 1972; CABIB & ULANE, 1973a,b; HASILIK & HOLZER, 1973a; SAHEKI & HOLZER, 1974; SCHÖTT & HOLZER, 1974; JUSIC et al., 1976; ULANE & CABIB, 1976b). HATA et al. (1967b) descreveram que a protease A é uma endopeptidase ácida com peso molecular de 60.000 Daltons e ponto isoelétrico de 3,8. Essa enzima possui ação hidrolítica em caseína e hemoglobina com alta eficiência entre pH 2 e 4 (HATA et al., 1967a,b; LENNEY & DALBEC, 1967), mas não é ativa quando são utilizados substratos com peptídeos pequenos (HATA et al., 1967a). A utilização da pepstatina, como inibidor da atividade enzimática para a protease A, mostrou-se de grande eficiência, indicando que essa enzima possui sítio ativo para ácido aspártico ou ácido glutâmico (SAHEKI et al., 1974; TANG, 1976, apud: WOLF, 1980). Inibidores da protease A foram descobertos posteriormente no citosol, e denominados de proteína I^A (SAHEKI et al., 1974; HOLZER, 1976; BÜNNING & HOLZER, 1977; HOLZER et al., 1977 apud: WOLF, (1980).

Utilizando cromatografia de afinidade a protease B foi isolada, apresentando-se como um polipeptídeo com peso molecular de 32.000 a 44.000 Daltons e ponto isoelétrico de 5,8 (ULANE & CABIB, 1976b, BÜNNING & HOLZER, 1977). A discrepância entre os diferentes pesos moleculares encontrados em um e outro trabalho, é decorrente do método de extração utilizado pelos pesquisadores. A esta endopeptidase atribui-se a degradação da hemoglobina e da caseína, mais facilmente entre pH 6,0 e 10,0 (HATA et al., 1967a), mas não foi detectada atividade quando foram utilizados substratos com peptídeos pequenos (LENNEY & DALBEC, 1967). Todavia, a protease B apresentou alguma atividade quando foram utilizados substratos contendo ésteres (HATA et al., 1967a; ULANE & CABIB, 1976b).

A protease B é fortemente inibida por diisopropilfluorofosfato e fenilmetilsulfonilfluoreto (HATA et al., 1967a; LENNEY & DALBEC, 1967), indicando que seu sítio ativo possui resíduos de serina (ULANE & CABIB, 1976b). A inibição da enzima por *p*-cloromercuriobenzoato ou cloreto de mercúrio, aponta a presença de resíduos sulfidrílicos em sua molécula, que ocorrem em proteínas com atividade hidrolizante (HATA et al., 1967a; LENNEY & DALBEC, 1967; ULANE & CABIB, 1976b; BÜNNING & HOLZER, 1977). Também foi descrito que a protease B ativa é fortemente inibida por metabólitos secundários de actinomicetos, quimostatina e antipaina (LENNEY, 1975; ULANE & CABIB, 1976b). A

existência de um inibidor intracelular denominado de proteína I^B causa uma forte inibição dessa protease (BETZ et al., 1974; ULANE & CABIB, 1976a; BÜNNING & HOLZER, 1977).

A grande especificidade da carboxipeptidase Y na hidrólise de aminoácidos implica, via de regra, na hidrólise de peptídeos no interior da célula (HAYASHI et al., 1970), o que tornou possível seu uso para estudo de sequenciamento de aminoácidos no trabalho de HAYASHI et al. (1973). Vários grupos de pesquisadores purificaram e caracterizaram essa enzima (DOI et al., 1967, apud: WOLF, 1980; AIBARA et al., 1971 e JOHANSEN et al., 1976, apud: WOLF, 1980; HAYASHI et al., 1973; KUHN et al., 1974). Foi descoberto que a mesma é composta por uma cadeia de polipeptídeo com peso molecular de 61.000 Daltons (HAYASHI et al., 1973; KUHN et al., 1974), exibindo ponto isoelétrico em torno de 3,6 (HATA et al., 1967b). HAYASHI et al. (1973) e KUHN et al. (1974), conseguiram isolar da carboxipeptidase Y, sessenta resíduos de glicosamina e cerca de 15% de hexoses. Esta enzima exibe uma proeminente atividade a pH 5,5 - 6,5 na hidrólise de vários tipos de resíduos de aminoácidos, incluindo a prolina da cadeia C-terminal de proteínas e peptídeos (HAYASHI et al., 1970, 1973; KUHN et al., 1974; HAYASHI et al., 1975b). A carboxipeptidase Y também apresentou grande atividade sobre substratos contendo ésteres como éster N-acetil-L-etil-fenilalanina, éster N-acetil-L-etil-tirosina (DOI et al., 1967 apud: WOLF, 1980; HAYASHI et al., 1975b) e éster N-acetil-DL-fenilalanina- β -nafitil (WOLF & FINK, 1975). Também substratos amínicos como N-benzoil-L-tirosina- p -nitroanilida, foram reduzidos pela carboxipeptidase Y (AIBARA et al., 1971 apud: WOLF, 1980).

A carboxipeptidase Y é fortemente inibida por diisopropilfluorofosfato e fenilmetilsulfonilfluoreto (DOI et al., 1967 apud: WOLF, 1980; KUHN et al., 1974; FELIX & BOUILET, 1966; MADDOX & HOUGH, 1970; WOODS & KINSELLA, 1980b). A análise quantitativa da enzima revelou que esta possui um resíduo de serina por molécula em seu sítio ativo (KUHN et al., 1974). Inibidores de atividade de peptidases e esterases também possuem efeito sobre a carboxipeptidase Y (KUHN et al., 1974; HAYASHI et al., 1975a). Assim como para as outras proteases da levedura, a carboxipeptidase Y também possui um inibidor endógeno conhecido como proteína I^C (MATERN et al., 1974).

Em células mutantes de *S. cerevisiae* que não apresentam a carboxipeptidase Y, foi encontrada uma segunda enzima denominada de carboxipeptidase S (WOLF & FINK, 1975; WOLF & WEISER, 1977). Em contraste com a carboxipeptidase Y, essa enzima depende de íons metálicos para a sua ativação e é fortemente inibida quando é usado quelante de metais como o EDTA ou o-fenantrolina (WOLF & WEISER, 1977).

Várias aminopeptidases foram descritas em *S. cerevisiae*. Uma enzima conhecida como aminopeptidase I foi purificada e caracterizada por MASUDA et al. (1975). Possui peso molecular em torno de 200.000 Daltons, e atividade a pH entre 7,5 - 8,0 para dipeptídeos e aminoácidos amínicos, sendo fortemente inibida por agentes quelantes como EDTA e o-fenantrolina, indicando ser dependente de cátions divalentes para a sua ativação. Experimentos demonstraram que a utilização de Zn^{2+} promove uma completa reativação da enzima quando tratada com agentes quelantes.

MATSUDA et al. (1975) também detectaram a presença de uma segunda aminopeptidase em leveduras, denominada de aminopeptidase II. A aminopeptidase II possui peso molecular de 34.000 Daltons e atividade sobre alguns dipeptídeos diferentes da aminopeptidase I. Ácido tetra-acético-diamino-etileno e o-fenantrolina possuem atividade inibitória sobre essa enzima, indicando que para a sua ativação é necessário a presença de íons divalentes (MASUDA et al., 1975). A aminopeptidase II descrita por MASUDA e colaboradores é provavelmente idêntica à aminopeptidase II descrita por FREY & RÖHN (1978). Outra enzima considerada idêntica à aminopeptidase I (MASUDA et al., 1975) foi descoberta por FREY & RÖHN (1978), denominada de aminopeptidase II, com peso molecular de 85.000 Daltons e sem atividade sobre uma grande variedade de aminoácidos N-terminal.

MATILE et al., (1971), apud: WOLF (1980) separaram por eletroforese em gel de amido, quatro aminopeptidases, sendo três delas não lisossomais. Estudos posteriores demonstraram também que essas enzimas não estavam correlacionadas com as aminopeptidases I, II e III. A quarta enzima, de alto peso molecular, foi localizada no vacúolo da célula e denominada de aminopeptidase vacuolar (MATILE et al., 1971, apud: WOLF, 1980). Posteriormente, FREY e RÖHN (1978) verificaram que essa enzima apresenta peso molecular de 640.000 Daltons e composta de 12 subunidades. A atividade enzimática da aminopeptidase lisossomal é inibida por agentes quelantes e sua especificidade depende da presença de Zn^{2+} . Essa enzima possui atividade para uma grande variedade de L-aminoácidos e peptídeos contendo aminoácidos livres no grupo amínico, exceto a lisina N-terminal (FREY & RÖHN, 1978). ACHESTTER et al. (1981, 1982, 1984) mencionaram que as aminopeptidases são ativas somente na presença de íons de cobalto (Co-aminopeptidase). Trabalhos mais recentes relatam características de novas enzimas proteolíticas em células de levedura como a carboxipeptidase S (WOLF & EHMANN, 1978), proteinase D e E (EMPTER & WOLF, 1984), protease P (ACHESTTER et al., 1983) e protease F (WOLF, 1984).

Revisão Bibliográfica

No sistema proteolítico de *S. carlsbergensis* várias de suas endopeptidases foram descritas por MADOX & HOUGH (1970). De acordo com os autores, estas apresentam-se menos eficazes se comparadas com as endopeptidases de *S. cerevisiae*. Até o ano de 1970 a levedura *S. carlsbergensis* era considerada uma espécie e por esse motivo até hoje essa variedade utilizada na indústria cervejeira é denominada desta maneira. De acordo com a classificação mais atualizada (BARNETT, 1992), dentre as quatro variedades existentes de *S. carlsbergensis*, três são classificadas como *S. cerevisiae* e apenas uma variedade como *S. pastorian*. Várias peptidases têm sido separadas e purificadas de leveduras, em sua grande maioria em trabalhos com linhagens de *S. carlsbergensis* (RAINBOW, 1970, apud: WOLF, 1980). FELIX & BROUILLET (1966) purificaram duas peptidases denominadas de proteases α e β . A peptidase α apresentou sensibilidade a agentes quelantes de íons metálicos como o EDTA e o-fenantrolina, como também a p -cloromercuriobenzoato e acetato de iodo. Essa enzima apresentou ação hidrolítica sobre a carboxipeptidases, degradando-a a N-carboxil-benzoil-dipeptideo. A peptidase β também hidroliza o N-carboxil-benzoil-dipeptideo. Em contraste à peptidase α , essa enzima é inativada por diisopropilfluorofosfato.

Uma dipeptidase e duas aminopeptidases foram identificadas em células de *S. carlsbergensis* (RÖHN, 1974, apud: WOLF (1980); METZ & RÖHN, 1976). A dipeptidase apresentou peso molecular de 130.000 Daltons e ponto isoelétrico de 6,3. Sua atividade é fortemente inibida por agentes quelantes como o EDTA. Essa enzima apresentou uma molécula de Zn^{+2} ligada firmemente à sua cadeia (RÖHN, 1974). A aminopeptidase I é uma glicoproteína com peso molecular de 640.000 Daltons, apresentando ponto isoelétrico de 4,7. A enzima é composta de 12 subunidades idênticas de 53.000 Daltons (METZ & RÖHN, 1976; MARX et al., 1977a, b apud: WOLF (1980); METZ et al., 1977, apud: WOLF (1980). Todos os tipos de L-aminoácidos e derivados peptídicos contendo aminoácidos terminais livres são degradados por essa enzima. Compostos contendo leucina ou outro resíduo de aminoácidos hidrofóbicos são reduzidos pela aminopeptidase I. Essa enzima é fortemente ativada por íons Zn^{2+} e Cl^- e inativada por agentes quelantes de íons metálicos (METZ & RÖHN, 1976).

Pouco se sabe sobre a segunda aminopeptidase, exceto que esta possui baixo peso molecular e difere em especificação quanto aos substratos para a sua ativação (METZ & RÖHN, 1976).

2. 2. Localização celular das proteases

Estudos de MATILE & WIEMKEM (1967), LENNEY et al. (1974), MATERN et al. (1974) e NORTH (1982) relatam que as proteases A e B e a carboxipeptidase Y estão localizadas no vacúolo da célula. Também foi encontrado nessa organela a aminopeptidase lisossomal (MATILE e WIEMKEM, 1967). Experimentos preliminares apontaram que a carboxipeptidase S não está presente no citosol e que sua atividade está associada com a membrana celular (BÜNNING, 1980).

MASUDA et al. (1975) não descreveram a localização das aminopeptidases I e II. A aminopeptidase II quando estudada por FREY & RÖHN (1978), mostrou grande semelhança com a aminopeptidase I descoberta por MASUDA et al. (1975), e foi localizada fora da membrana plasmática. Os autores ainda mencionaram que as dipeptidases estão localizadas fora do vacúolo, no citosol.

WOODS & KINSELLA (1980a, b) detectaram a presença de proteases no vacúolo das células de *S. cerevisiae*, confirmando os trabalhos de HASILIK et al. (1974) e de CABIB & ULANE (1973a).

2. 3. Inibidores das proteases

Em preparados frescos de extratos de *S. cerevisiae*, não foi detectada a atividade das proteases A e B, e carboxipeptidase Y, suspeitando-se da existência de inibidores endógenos no extrato (HAYASHI et al., 1968; LENNEY & DALBEC, 1967). Estudos posteriores descrevem a presença de inibidores dessas proteínas que tornaram as proteases ativas em inativas (LENNEY & DALBEC, 1969; LENNEY, 1973, apud: WOLF (1980). Três classes de inibidores foram isolados e caracterizados com atividade sobre as proteases A e B e sobre a carboxipeptidase Y (BETZ et al., 1974; MATERN et al., 1974; SAHEKI et al., 1974; ULANE & CABIB, 1976a; LENNEY, 1975; NUNEZ de CASTRO & HOLZER, 1976, apud: WOLF, 1980). A presença de inibidores endógenos na célula de levedura para tais proteases foi também mencionada por HASILIK et al. (1974), LENNEY et al. (1974) e MATERN et al. (1974).

SAHEKI et al. (1974) isolaram dois inibidores de protease A de *S. cerevisiae*, denominados de proteína I^{A2} e I^{A3}. Essas duas proteínas apresentaram pontos isoelétricos diferentes, sendo de 5,7 para I^{A2} e 6,3 para I^{A3}. Porém, quando submetidas a eletroforese em

SDS-PAGE, apresentaram o mesmo peso molecular. Estes pesquisadores também purificaram e testaram as propriedades do inibidor I^{A2} registrando que este inibidor é um tetrâmero que dissocia-se em 4 subunidades com peso molecular de 6.100 Daltons cada uma (SAHEKI et al., 1974; BÜNNING et al., 1977 apud: WOLF, 1980).

Experimentos utilizando linhagem haplóide de *S. cerevisiae* sugerem que neste microrganismo ocorre apenas o inibidor I^{A3} . Entretanto, o inibidor I^{A2} está presente em *S. carlsbergensis* (BÜNNING et al., 1977 apud: WOLF, 1980). A inibição pelo I^{A3} da protease A apresenta uma inibição “não estereoquímica pseudo-irreversível” com um aparente valor de K_i de $5,5 \times 10^{-8}$ M (NUNES de CASTRO & HOLZER, 1976, apud: WOLF, 1980). A proteína I^{A3} é constituída de 68 aminoácidos por molécula, contém um grande número de aminoácidos polares. Os aminoácidos prolina, arginina, cisteína e triptofano estão ausentes (NUNES de CASTRO & HOLZER, 1976 apud: WOLF, 1980). O peso molecular desta proteína I^{A3} foi estimado em torno de 7.676 Daltons. O inibidor apresentou estabilidade ao aquecimento e à ação de ácido tricloroacético (SAHEKI et al., 1974).

Inibidores da protease B foram purificados por BETZ et al. (1974), ULANE & CABIB (1976a) e HASILIKI & HOLZER (1973b). ULANE & CABIB (1976a) em experimentos com *S. cerevisiae* haplóide detectaram a presença de apenas um inibidor para a protease B. Já BETZ et al. (1974) conseguiram isolar e purificar dois inibidores, denominados de I^{B1} e I^{B2} . A discrepância encontrada nos dois trabalhos foi solucionada por BÜNNING & HOLZER (1977) apud: WOLF, 1980), que demonstraram que o inibidor I^{B1} ocorre apenas em *S. carlsbergensis*, e outro está presente apenas em *S. cerevisiae*.

A proteína I^{B2} tem atividade somente para a protease B, não apresentando atividade sobre protease A e carboxipeptidase Y (BETZ et al., 1974). A constante de dissociação do complexo enzima-inibidor foi calculado ser em torno de $3,9 \times 10^{-9}$ M (BÜNNING & HOLZER, 1977). Esse inibidor apresenta-se como uma proteína não competitiva atuando entre pH 6,0 a 9,0 (BETZ et al., 1974). O seu peso molecular foi calculado em torno de 8.500 Daltons, através de análise de aminoácidos por eletroforese em SDS-PAGE (ULANE & CABIB, 1976a; MAIER, et al., 1979). Essa proteína é estável ao aquecimento e à ação de soluções ácidas (BETZ et al., 1974; ULANE & CABIB, 1976a), constituindo-se de 74 aminoácidos polares. A proteína I^{B2} apresenta um resíduo de tirosina e não foram detectados resíduos de arginina, triptofano, metionina e cisteína (ULANE & CABIB, 1976a; MAIER et al., 1979).

A seqüência de aminoácidos do inibidor da protease B foi determinada por MAIER et al., (1979), apresentando a treonina como aminoácido inicial da cadeia N-terminal, e a seqüência VAL-HIS-THR-ASN-OH na cadeia C-terminal da proteína. O inibidor da protease B depende da seqüência C-terminal intacta para sua ativação.

Outros estudos realizados por HOLZER et al. (1973) e TSAI et al. (1973) envolveram a inativação da triptofano sintetase da levedura pela protease B e a inibição desta reação pela proteína I^B, demonstrando que inibidores dessa reação estão presentes no sistema regulatório do metabolismo celular.

A protease B de levedura parece ser responsável também pela inativação da frutose 1,6 - difosfatase da levedura, e um inibidor desta reação (provavelmente a proteína I^B) encontra-se também presente nas células (MOLANO & GRACEDO, 1974).

Em contraste com o que foi descrito sobre as proteases A e B, o inibidor da carboxipeptidase Y, denominado de proteína I^C, e purificado por MATERN et al. (1974), não é estável ao aquecimento e a meios de reação ácida. Em seu fracionamento, este apresentou uma cadeia de polipeptídeos com peso molecular em torno de 25.000 Daltons, constituída de 217 resíduos de aminoácidos (MATERN et al., 1974, 1975; BARTH et al., 1978). A proteína I^C apresentou ponto isoelétrico de 6,6 e mostrou-se específica para a carboxipeptidase Y, não apresentando atividade sobre as proteases A e B, e carboxipeptidase S. A inibição máxima da proteína I^C ocorre entre pH 5,0 e 9,0, e mostrou-se de caráter competitivo, exibindo um valor de K_i de $2,5 \times 10^{-9}$ M.

Todos os fatores que afetam a atividade da protease A em *S. cerevisiae* como o aquecimento e a estabilidade a ácidos, também afetam as proteases de *S. carlsbergensis* (BÜNNING et al., 1977 apud: WOLF, 1980). O inibidor da protease A (I^{A2}) nesta levedura possui peso molecular de 7.700 Daltons, similar ao encontrado em *S. cerevisiae*. O seu ponto isoelétrico de 5,7, difere em 0,6 unidades de pH do inibidor de protease A de *S. cerevisiae*.

Dois inibidores de protease B de *S. carlsbergensis* foram isolados por BÜNNING e HOLZER (1977), denominados de I^{B1} e I^{B3}. A proteína I^{B1} possui peso molecular de 8.500 Daltons, como em *S. cerevisiae* (MAIER, et al., 1979), e ponto isoelétrico de 8,0 (BETZ et al., 1974). A outra proteína, I^{B3}, isolada por MATERN et al. (1974), possui peso molecular de 14.000 Daltons, e ponto isoelétrico de 4,6.

Alguns autores consideram que todas as reações de inibição por proteases são competitivas, embora as constantes de dissociação sejam extremamente pequenas em alguns casos (LASKOWSKI & SEALOCK, 1971).

2. 4. Fatores que influenciam a atividade das enzimas proteolíticas de Levedura

Vários autores observaram que após o rompimento da parede celular, e a centrifugação da biomassa desintegrada, o sobrenadante geralmente apresenta baixa atividade proteolítica. O tratamento das enzimas a pH levemente ácido ou com uréia, causam uma ativação parcial ou completa das enzimas proteolíticas.

As proteases apresentam-se originalmente na forma inativa na célula e podem ser ativadas por influência de alguns fatores regulatórios.), HOLZER (1974), LENNEY (1975), SAHEKI & HOLZER (1975), BABAJAN et al. (1985) e MANGINI et al. (1986). Os autores mencionaram que o estado inativo das proteases está associado com a formação do complexo enzima-inibidor. O abaixamento do pH causa uma desativação dos inibidores ativando as proteases.

HALÁSZ (1988) mencionou que a atividade das enzimas proteolíticas de levedura depende das condições de crescimento. Em experimentos com *S. cerevisiae* sob diferentes condições de crescimento, a atividade das aminopeptidases, carboxipeptidases Y e S e das proteases A e B foram determinadas. O tratamento das células com aeração intensiva resultou em diminuição da atividade proteolítica. Altas concentrações de glicose também foram prejudiciais à atividade da enzima. Em geral a atividade máxima observada foi verificada em concentração de 0,5% de glicose. Inibidores específicos de proteases (I_a e I_b) foram investigados e sua atividade foi relacionada com a atividade das proteases.

KASSIM & HALÁSZ (1989) testaram a especificidade das proteases A, B, e Y com o intuito de determinação da concentração do complexo enzima-proteína de levedura, durante diferentes fases do crescimento celular. Os dados mostraram que a aeração não influenciou a síntese de proteases, e que a diminuição da atividade enzimática dependeu da intensidade da aeração. O aumento da atividade proteolítica durante a fase logarítmica de crescimento é devido a uma nova síntese de enzimas. Na fase estacionária o aumento da atividade proteolítica em comparação ao inóculo é, em parte, causada pela síntese enzimática ou pela ativação das proteases.

2. 4. 1. Efeito da temperatura

WOODS & KINSELLA (1980b) mediram a atividade das proteases de leveduras em temperaturas entre 25^o e 70^oC, por um período de 40 a 80 minutos, e observaram que a temperatura de atividade máxima foi de 45^oC para um período de 80 minutos, e 52^oC para um período de 40 minutos, sendo que acima dessas temperaturas as proteases sofrem redução da atividade. Os pesquisadores constataram ainda que a temperatura ótima para a estabilidade e atividade das proteases fica em torno de 37^oC, e a sua completa inativação ocorre quando é incubada por um período de 5 minutos a 70^oC.

MADDOX & HOUGH (1970) notaram que em *S. carlsbergensis*, a temperatura de atividade máxima das proteases neutras, B e carboxipeptidase Y, ocorre a 48^oC, quando incubadas a pH 6,0 por um período de 60 minutos. A atividade diminuiu sensivelmente quando as enzimas foram incubadas a temperaturas mais elevadas, durante o mesmo período.

JUNI & HEYM (1968) descreveram que a inativação total das proteases B de *S. cerevisiae* ocorre a 60^oC e pH 6,0, em 30 minutos. Concluíram portanto que para se obter uma ótima atividade das proteases, os extratos de levedura devem ser incubados a uma temperatura de 37^oC e pH entre 6,0 a 7,0, por um período de 30 a 80 minutos. Para inativação destas enzimas, a incubação deve ser conduzida a 70^oC e pH 6,0 a 7,0, durante 5 minutos.

2. 4. 2. Efeito do pH

Uma vez que para testes de pH entre 4,0 e 5,0, a caseína não pode ser utilizada devido à sua insolubilidade nessas condições, foi utilizada a hemoglobina desnaturada como substrato para a determinação do pH ótimo de atividade das enzimas proteolíticas de *S. carlsbergensis* (WOODS & KINSELLA, 1980b). Os autores observaram dois picos de atividade, a pH 3,0 e também a pH 6,0 e 8,0, demonstrando assim a presença de duas enzimas proteolíticas em leveduras. Utilizando a caseína como substrato, a atividade a pH 3,0 não foi alterada, enquanto que a pH 6,0 e 8,0 a atividade enzimática aumentou cerca de 7,5 vezes. Estes mesmos pesquisadores testaram a estabilidade das enzimas proteolíticas em colunas de hidroxapatita em diferentes faixas de pH, por um período de 30 minutos, a 25^oC. Em testes de atividade residual, foi observado que a melhor estabilidade ocorreu a pH 6,0.

Em estudos sobre a estabilidade de enzimas proteolíticas de *S. cerevisiae*, conduzidos por LENNEY (1956) e HATA et al. (1967a), a estabilidade máxima dessas enzimas ocorreu a pH 5,0 - 6,0, confirmando o resultado de WOODS & KINSELLA (1980b).

FELIX & BOUILLET (1966) utilizando peptídeos sintéticos como substrato, isolaram duas enzimas proteolíticas de *S. carlsbergensis*, que apresentaram atividade ótima a pH 6,0.

MADDOX & HOUGH (1970) trabalhando com autolisados de *S. carlsbergensis*, encontraram três faixas ótimas de pH para as enzimas proteolíticas: 2,9, 6,3 - 6,6 e 8,2. As enzimas com pH ótimo a 8,2 apresentaram-se muito instáveis. Este trabalho confirmou a presença de três proteases em *S. cerevisiae*, encontradas por LENNEY & DALBEC (1967). Estes autores também testaram a estabilidade das proteases e concluíram que estas apresentam estabilidade máxima na faixa de pH 6,0 e 6,5.

2. 4. 3. Efeito de íons metálicos

WOODS & KINSELLA (1980b) testaram vários íons divalentes e trivalentes, visando avaliar seu efeito na atividade de proteases de leveduras, a pH 6,0. Os pesquisadores observaram que baixos níveis de magnésio são ligeiramente estimuladores da atividade das proteases. Ferro na forma ferrosa (Fe^{2+}) e férrica (Fe^{3+}) inibiram a atividade proteolítica, sendo que esta diminuiu em 40%, na presença de 1mM de Fe_2SO_4 . A pH 3,0 a atividade proteolítica não diminuiu na presença de Fe_2SO_4 . Os autores adicionaram EDTA em uma concentração de 10mM ao substrato incubado a 25°C, por 30 minutos, e constataram que na presença de 2,25mM de Fe^{2+} , a atividade da enzima é completamente restaurada. Uma vez que a enzima responsável pela proteólise a pH 6,0 de extratos de *S. carlsbergensis*, é uma serina protease, a presença de íons metálicos no substrato promove uma inibição dessa enzima, e esta é uma possível explicação para a inibição pelo ferro.

A caseína e a hemoglobina, que são substratos padrões para ensaios com proteases, incluindo aquelas de *S. cerevisiae*, mostraram resultados similares para avaliação da atividade enzimática (HATA et al., 1967a). Entretanto, a pH 6,0, as proteases de *S. carlsbergensis* hidrolisaram caseína cerca de 7 vezes mais do que hemoglobina; a cor marrom-avermelhada da hemoglobina evidencia a presença de ferro neste substrato, o qual pode ter inibido a proteólise a pH 6,0 (WOODS & KINSELLA, 1980b).

2. 4. 4. Efeito da força iônica

a) Cloreto de sódio

Quando proteases de *S. carlsbergensis* foram submetidas à presença de cloreto de sódio, a atividade diminuiu gradativamente com o aumento da concentração do sal. Com aproximadamente 2,25 M de NaCl (13%), a atividade proteolítica a pH 6,0 foi reduzida cerca de 50% (WOODS & KINSELLA, 1980b). Estudos anteriores de FELIX & BOUILLET (1966) onde os pesquisadores analisaram o uso de NaCl na diminuição da atividade proteolítica, mostraram que a concentração máxima inibitória é de 0,5 M para as proteases A e B de *S. carlsbergensis*. A inibição pelo NaCl pode ser por interferência com o substrato, uma vez que o NaCl pode desagregar as ligações eletrostáticas entre as proteases e a proteína (WOODS & KINSELLA, 1980b).

Uma outra explicação para o efeito inibitório do NaCl é por aumento da interação enzima-inibidor. Ligações hidrofóbicas podem ser responsáveis pela associação da protease e seu inibidor endógeno em *S. cerevisiae* (CASTRO & HOLZER, 1976). Tais associações devem aumentar em um meio com alta força iônica, reduzindo a atividade da protease. EDDY (1958) citou uma concentração de 0,1 a 0,5 M de NaCl como uma estimativa razoável para o equivalente osmótico da levedura, e dentro desta faixa, houve aumento da atividade proteolítica a pH 6,0.

b) Uréia

Proteases de *S. carlsbergensis* foram incubadas por 30 minutos a 25°C e pH 6,0, na presença de concentrações crescentes de uréia, e posteriormente testou-se a atividade residual. Foi observado que a enzima foi progressivamente ativada com o aumento da concentração de uréia. Segundo WOODS & KINSELLA (1980b), com uma concentração 2M de uréia, a atividade aumentou cerca de 50%. Concentrações de uréia superiores a 3 M induzem uma dissociação do complexo enzima-inibidor das proteases B e C (atualmente denominada de Y) de *S. cerevisiae* (LENNEY, 1956; HATA et al. 1967b; CASTRO & HOLZER, 1976).

A uréia enfraquece as cadeias hidrofóbicas em proteínas, por ruptura da estrutura de água, reduzindo a barreira de entropia para o desdobraimento da proteína. Existem evidências de que os complexos enzima-inibidor em *S. carlsbergensis* sejam similares àqueles de

S. cerevisiae (ULANE & CABIB, 1976a; LENNEY, 1975), o que pode explicar a ativação da protease de *S. carlsbergensis* pela uréia.

2. 4. 5. Efeito de agentes químicos específicos

a) N-Etilmaleimida (NEM)

WOODS & KINSELLA (1980b) estudaram o efeito do NEM sobre proteases de *S. carlsbergensis* e observaram uma reação irreversível com os grupos sulfidríla livres na forma de éter tiol, inibindo ligeiramente a protease de levedura a pH 6,0, mostrando que os grupos sulfidríla livres são necessários para a completa atividade da enzima. A aparente necessidade de grupos sulfidríla livres para a completa atividade enzimática já havia sido demonstrada por FELIX & BOUILLET (1966) e MADDOX & HOUGH (1970). Isto também é verdadeiro para a protease B e carboxipeptidase Y de *S. cerevisiae* (HATA et al., 1967b).

b) β -Mercaptoetanol

O β -mercaptoetanol, que possui a propriedade de reduzir as ligações dissulfeto de proteínas, estimula a atividade de proteases de *S. carlsbergensis* a pH 6,0 (WOODS & KINSELLA, 1980b). Estes pesquisadores observaram que 35% de estimulação ocorre na presença de 1mM de β -Mercaptoetanol. O estímulo da atividade proteolítica por este reagente explica a ação na adição de tiol ao extrato de *S. carlsbergensis* desintegrado mecanicamente (SHETTY & KINSELLA, 1978), observando-se um aumento da proteólise.

SHETTY & KINSELLA (1979) notando a existência de inibidores de protease em extratos brutos de *S. cerevisiae*, sugeriram que reagentes tiol ativam a proteólise por desagregação do complexo inibidor. Todavia, segundo ULANE & CABIB, 1976a e CASTRO & HOLZER, 1976, isto é improvável, pelo fato dos principais inibidores de proteases em *S. cerevisiae* não conterem aminoácidos ácidos com enxofre e não poderem formar pontes de dissulfetos.

Inibidores de proteases, sem aminoácidos sulfidrílicos, já haviam sido encontrados em *S. carlsbergensis* (ULANE & CABIB, 1976a). CASTRO & HOLZER (1976) sugeriram que as bandas hidrofóbicas contêm o complexo enzima-inibidor juntos. É possível que mudanças estruturais da protease, induzidas pelo tiol, permitam a dissociação do complexo enzima-

inibidor, ou talvez, o estímulo da atividade proteolítica pelo β -mercaptoetanol, seja um efeito sobre a própria enzima, possivelmente liberando grupos sulfidríla necessários para a atividade da enzima.

c) Fenilmetanosulfonil Fluoreto (PMSF)

O reagente PMSF, com seletividade para os resíduos de serina, é um potente inibidor da atividade proteolítica de *S. carlsbergensis*, sendo que 1mM de PMSF evita completamente a hidrólise da caseína pela protease, a pH 6,0. Assim, a enzima responsável pela proteólise, a pH 6,0, em *S. carlsbergensis*, é provavelmente uma serina protease (WOODS & KINSELLA, 1980b). Proteases de *S. carlsbergensis* também são sensíveis ao diisopropilfluorofosfato (DFP), um outro reagente específico para serina (FELIX & BOUILET, 1966; MADDOX & HOUGH, 1970).

PRINGLE (1975) concluiu que a principal atividade proteolítica em *S. cerevisiae* deve-se à protease B, e propôs o uso de PMSF para controle de isolados protéicos ou para obtenção de enzimas. Todavia, apesar deste reagente poder controlar efetivamente a proteólise em estudos de laboratório, ele é extremamente tóxico para ser usado na indústria de alimentos.

d) N-Bromosuccinimida (NBS)

O tratamento de proteases de levedura com N-bromosuccinimida (NBS), reagente que oxida os resíduos de triptofano, causa uma diminuição de 15% da atividade enzimática quando se utiliza hemoglobina como substrato, e quando a enzima tratada foi analisada para atividade sobre caseína, apenas 20% da atividade inicial permaneceu (WOODS & KINSELLA, 1980b).

O NBS é capaz de provocar mudanças conformacionais da proteína, podendo ou não afetar o sítio ativo da enzima, o que explica a inibição por esse reagente (SPANDE & WITKOP, 1967).

2. 5. Indutores de autólise das células de Levedura

WELSCH (1958) formulou a hipótese de que qualquer distúrbio no suprimento de energia da célula, independente da causa, induz sua autólise. Uma análise dos poucos exemplos de indutores de autólise em células eucarióticas, permite concluir que indutores de várias naturezas podem causar distúrbios tanto funcionais como estruturais. Como exemplo, os efeitos da temperatura e a ação de detergentes são reduzidos por mudanças na organização estrutural da membrana. HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) sugeriram que embora diferentes fatores possam iniciar a autólise de células de levedura, o mais importante é a ausência de qualquer fonte de carbono. Este efeito pode ser reforçado por outros fatores, como o aumento da temperatura ou a remoção de oxigênio.

Dentre os indutores físicos de autólise de leveduras, podemos citar a temperatura. A autólise pode ser ocasionada por elevação da temperatura de incubação, alternada ao congelamento (OHMIJA & SATO, 1975a). No primeiro caso, a autólise é acompanhada por mudanças na estrutura da membrana celular. No segundo caso, os cristais de gelo formados resultam em violação mecânica da integridade física de estruturas celulares (BELOUS, 1981).

A pressão osmótica do meio é outro fator que pode afetar as células da levedura. Mudanças de pressão osmótica podem ter duas conseqüências, que são a degradação completa da célula ou a formação de autoplasto (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). Um terceiro efeito seria a plasmólise celular, quando certas concentrações de sacarose ou cloreto de sódio são empregadas.

Outros fatores físicos que podem induzir a autólise celular é a irradiação por ultravioleta e raios-X, e a desintegração mecânica (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991).

Quanto aos indutores químicos, vários compostos membranotrópicos, incluindo detergentes, proteínas, peptídeos e aminoácidos, podem ser usados para a indução de autólise (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1991). O efeito degradante desses agentes sobre a membrana é causado por sua habilidade para solubilizar certos componentes, ou por causar mudanças nas interações hidrofóbicas, o que acarreta mudanças na permeabilidade e lise enzimática. Antibióticos, por sua vez, induzem autólise como um resultado do desbalanço entre sintetases e despolimerases.

A utilização de solventes orgânicos não-polares (clorofórmio, acetato de etila, entre outros), ou sais inorgânicos, ativam as enzimas autolíticas da célula e aceleram o processo de

autólise. JOHNSON (1977) menciona em seu trabalho que processos de autólise da célula podem ser co-ajudados através de tratamento térmico.

SHETTY & KINSELLA (1978) observaram que compostos do tipo tióis de baixo peso molecular são efetivos para a ativação das enzimas endógenas que degradam a parede celular. As células de leveduras submetidas a um tratamento com monotioglicerol, 2-mercaptoetanol e ditioneitol a temperatura de 37°C, mostraram uma autólise gradual da parede celular. O monotioglicerol apresentou maior eficiência que os demais compostos. O tratamento com monotioglicerol facilitou a extratibilidade das proteínas da célula de levedura, indicando que o tratamento está associado com a desestruturação da parede celular. A grande desvantagem deste tratamento é a degradação das proteínas da levedura e a ativação das enzimas proteolíticas. A quantidade de proteínas com peso molecular abaixo de 100.000 Daltons teve uma diminuição de 80 para 20% após 10 h de incubação.

2. 6. Características do processo de autólise

A autólise tem início imediatamente após a morte da célula. O efeito desencadeador desse processo pode ser natural ou não, ocasionando a diminuição da função da membrana (o que inclui o desarranjo enzimático das células), e a diminuição da energia química para a síntese dos processos de reconstituição da membrana. Por definição, apenas alguns tratamentos são capazes de iniciar o processo de autólise como exemplo altas temperaturas. Por outro lado, células submetidas a um tratamento térmico em água sob ebulição, causam a morte das células mas não provocam autólise devido à inativação das enzimas autolíticas presentes no interior da célula. (ARNOLD, 1981)

A autólise em células de levedura é acompanhada por características visuais, como mudanças reológicas e de coloração. A presença de dois estágios de autólise foi identificado pelas mudanças morfológicas da célula de levedura, através de estudos por microscopia eletrônica. O primeiro estágio da autólise é caracterizado pela degradação das endoestruturas celulares, sem a destruição da estrutura da parede celular. O segundo passo da autólise envolve a hidrólise dos biopolímeros intracelulares, com a difusão dos produtos da hidrólise de dentro para fora da célula (BABAYAN et al., 1985).

No processo de autólise da parede celular da maioria das células de levedura, modificações estruturais podem ser observadas através da difusão gradual do material

intracelular para o exterior da célula. A autólise depende da idade da cultura e de suas condições fisiológicas. Em culturas em proliferação, as células autolisam-se rapidamente, sendo maior a degradação naquelas em estágio estacionário de crescimento, devido à grande intensidade da síntese de enzimas autolíticas durante a fase exponencial de crescimento. Portanto, a autólise ocorre quando há uma indução pelo meio, promovendo a degradação das células pelas enzimas autolíticas endógenas em condições ótimas para a sua ação (BROWN et al., 1975, apud: WOLF, 1980).

O processo natural de autólise ocorre no final do estágio estacionário de crescimento celular, quando as condições fisiológicas da célula apresentam-se satisfatórias para tal. A autólise natural também pode ser causada pela presença de microrganismos contaminantes na cultura, que promovem microlises nas leveduras, causando a desestruturação da parede celular e o rompimento da célula (BROWN et al., 1975 apud: WOLF, 1980). A natureza dos compostos utilizados durante a autólise são importantes para a atividade das proteases, mananases, glicanases, lipases e fosfolipases. A ação destas enzimas estão associadas com as modificações da parede celular. CHARPENTIER et al. (1986) observaram modificações na parede celular em seus estudos por microscopia eletrônica de transmissão, e relataram mudanças estruturais da membrana.

BACON (1981) estudou as modificações químicas da composição da parede celular em diferentes estádios da autólise, associadas com outros componentes em quantidades adequadas, mencionando que as glicanas são as principais responsáveis pela matriz rígida da parede celular.

VOSTI & JOSLYN (1954a) estudaram o processo de autólise em *S. cerevisiae*, à temperatura de 53°C, e de *S. uvarum*, *Candida lipolytica* e espécies de *Torulopsis*, à temperatura de 45°C. Durante o tratamento das culturas, formas de aminoácidos e a concentração total de nitrogênio foram monitoradas. Esses pesquisadores relataram que sob tais temperaturas não foi notada a ruptura celular. Em um trabalho posterior (VOSTI & JOSLYN, 1954b) através de observação em microscópio, notaram que a parede celular não apresentou grandes modificações após 3 dias de tratamento térmico. Entretanto, foi observado que a porosidade da parede celular aumentou devido a ação da β -glicanase.

O método para extração de enzimas de levedura proposto por BLACK & WRIGHT (1955) envolve um tratamento das células a baixíssima temperatura (-195°C) em nitrogênio líquido, e posterior estocagem sob refrigeração a -20°C. O processo continua à temperatura

de 5°C com a adição de água a pH alcalino, sob baixa agitação, por um período de 1 a 2 dias. Após a centrifugação foi obtido um extrato enzimático com baixo rendimento.

2. 7. Obtenção e aplicação das proteases de Leveduras

A maioria das enzimas utilizadas em grande quantidade na indústria são extracelulares, isto é, obtidas do meio cultivado com microrganismos, do qual são facilmente separadas por centrifugação. Entretanto, a maior parte das enzimas presentes na célula estão localizadas no seu interior e/ou na membrana plasmática. O pleno potencial de utilização das enzimas intracelulares depende de um método eficiente de extração e purificação, devido a baixa concentração em que se encontram nas células, usualmente em torno de 1% em peso (DARBYSHIRE, 1981).

As enzimas intracelulares são usualmente liberadas do interior das células através do rompimento da parede celular por métodos mecânicos ou químicos. Os métodos mais comuns de rompimento celular incluem o uso de homogeneizadores de alta pressão, moinhos de bolas, congelamento e descongelamento, alterações drásticas de pH, temperatura e choque osmótico. Pode-se também submeter a membrana das células a digestão enzimática com enzimas líticas. Como resultado, obtém-se um preparado bruto com atividade enzimática, que pode ser separado das células rompidas por filtração ou centrifugação, e então clarificado. A centrifugação é o método mais comum para este propósito. O extrato livre de células pode ser então purificado por métodos consecutivos de fracionamento e concentração. Estes incluem cromatografia de troca iônica e técnicas de ultrafiltração com membranas ou osmose reversa. A precipitação das enzimas também é um método comumente utilizado devido a sua reversibilidade e por não permitir a desnaturação das proteínas, podendo ser utilizado em processos de grande escala (KANG & COTTRELL, 1979). A precipitação inclui a utilização de solventes orgânicos, polietileno glicol (PEG), dextranas, ácidos poliacrílicos ou sulfato de amônio. Coagulação e floculação são também utilizadas para este propósito. Melhor extração e rendimento de enzimas se dá quando as condições de fermentação são controladas, devendo-se utilizar células na fase exponencial de crescimento.

NOWAK & TSAI (1989) utilizaram o processo de ruptura mecânica para a lise celular, baseando-se em trabalhos de MARFFY & KULA (1974). Os autores purificaram três endopeptidases de *S. cerevisiae*, proteases A, B e Y. Duas diferentes formas moleculares da

protease A foram obtidas através de eletroforese em SDS-PAGE. Estas enzimas apresentaram atividade sobre a caseína e hemoglobina em pH ótimo para ativação em torno de 5,0. A atividade foi aumentada em cerca de 30-50% quando a solução foi adicionada de uréia 4-6M. A protease B apresentou atividade na coagulação do leite e grande estabilidade à estocagem a baixas temperaturas, quando preservada em glicerol a 40%. A terceira endopeptidase, denominada protease Y, foi purificada através de filtração em gel. Esta enzima não apresentou atividade sobre a coagulação do leite, e teve baixa atividade sobre a hemoglobina, sendo porém estável ao congelamento.

FUKAL et al. (1986) utilizaram o método de autólise por clorofórmio, e obtiveram cerca de 50% de lise celular. Uma posterior separação das proteases foi feita pela adição de sulfato de amônio a 90% de saturação, a pH 5,0. Os autores obtiveram enzimas com ótima atividade para a hidrólise da caseína e hemoglobina, bem como para a clarificação de cerveja não pasteurizada. WOODS & KINSELLA (1980b) já haviam descrito que a utilização de sulfato de amônio em concentrações maiores que 60%, são satisfatórias para se obter proteases purificadas com rendimento de cerca de 90%. Os autores testaram a atividade de um extrato bruto de proteases de *S. carlsbergensis* e observaram que estas hidrolizam a caseína mais rapidamente do que outras proteínas. Nesse trabalho foi testada também a atividade sobre frações brutas de soja (7s), proteína de soja (11s), hemoglobina, albumina de soro bovino e ovo. Concluíram que a fração bruta de proteases é insuficiente para uma completa coagulação do leite, mas possuem grande capacidade de hidrólise na maturação de queijos.

As proteases A, B e Y obtidas de autolisados de *S. carlsbergensis* foram parcialmente purificadas pela precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de hidroxiapatita, por WOODS & KINSELLA (1980a). Estas enzimas apresentaram pH ótimo de atividade de 3,0 e 6,8. As propriedades gerais destas enzimas foram determinadas sendo que a temperatura ótima para atividade foi 37°C em pH 6,0. As proteases foram fortemente inibidas por íons metálicos e por NEM, PMSF e NaCl, enquanto apresentaram um aumento da atividade quando foram tratadas com β -mercaptoetanol e uréia.

A obtenção de proteases de *S. carlsbergensis* foi conduzida por WOODS & KINSELLA (1980b) segundo as condições e etapas resumidas na Figura 1, a seguir.

Revisão Bibliográfica

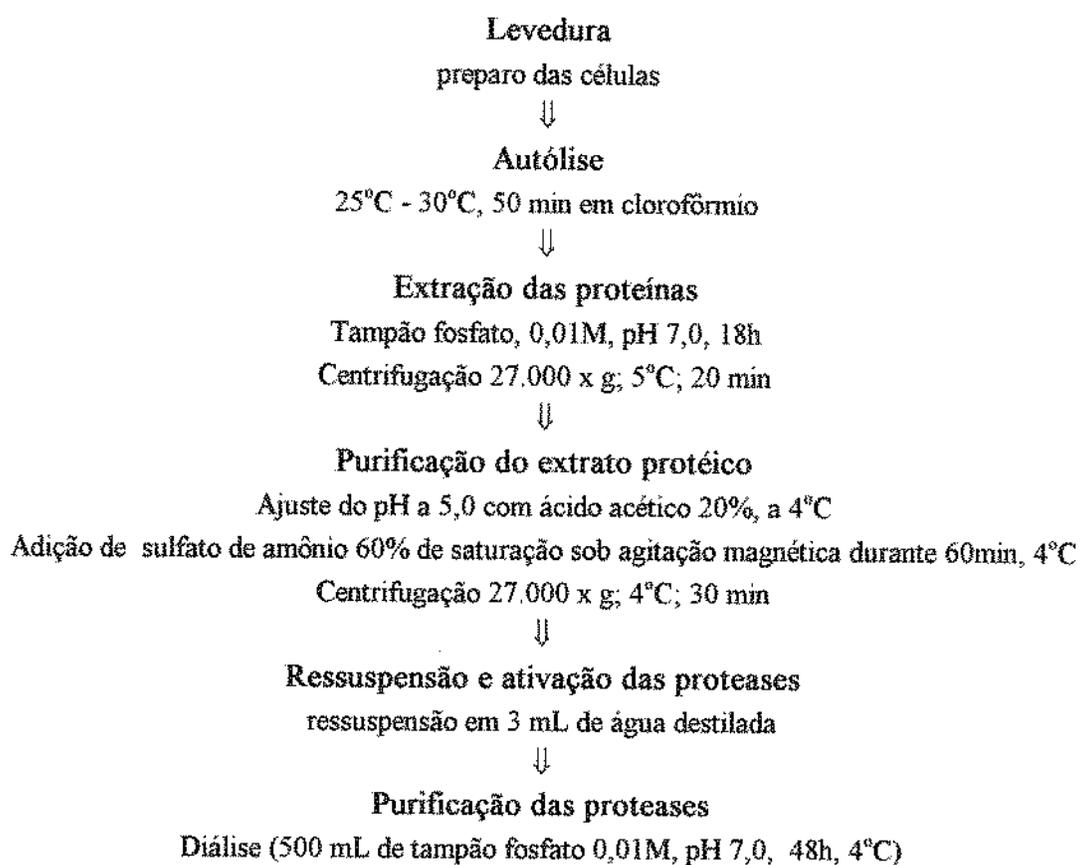


Figura 1. Obtenção e purificação das enzimas de *Saccharomyces carlsbergensis*.

2. 8. Enzimas proteolíticas em panificação

A utilização de proteases em panificação ganhou maior importância por volta de 1950, quando teve início a substituição das amilases do malte pelas amilases fúngicas. As amilases fúngicas foram introduzidas no preparo de massas com o intuito de aumentar a atividade amilolítica destas mas as enzimas proteolíticas contaminantes provocavam modificações significativas na massa. Os preparados de enzimas passaram, então, a ser padronizados com relação às atividades proteolítica e amilolítica (SHELLENBERGER, 1971; PYLER, 1973).

Atualmente, através da grande experiência na produção industrial de enzimas microbianas, é possível produzir preparados de amilases praticamente livres de proteases e preparados de proteases com baixa atividade amilolítica. Desta forma, as enzimas podem ser melhor caracterizadas, o que permite um maior controle da suplementação enzimática em panificação (MONNIER & GORDON, 1975; BARRET, 1975).

2. 8. 1. Ação das proteases em massas

As proteases são específicas, ou seja, elas não hidrolisam moléculas em qualquer ligação peptídica, mas apenas em ligações entre certos aminoácidos específicos. Se tais ligações existirem em abundância na proteína, pode-se esperar uma considerável degradação protéica. Entretanto, existem proteases menos específicas quanto a composição de aminoácidos podendo hidrolizar a proteína em vários fragmentos menores. As proteases são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação sendo mais conveniente do ponto de vista tecnológico estas serem classificadas em endopeptidases e exopeptidases (SPROBLER, 1981). As exopeptidases possuem eficiência limitada nas transformações reológicas, causando pequenas modificações no comprimento da cadeia; dessa forma, não apresentam importância tecnológica, quando se trata da modificação das propriedades do glúten da farinha de trigo no processamento de pães e biscoitos. As endopeptidases, por outro lado, são altamente eficientes na modificação das características do glúten na massa. Essas enzimas atuam em vários sítios ao longo da cadeia protéica, liberando grandes fragmentos moleculares e modificando a viscosidade da massa, mesmo com quebra de poucas ligações (BRUNO, 1989).

As proteases foram utilizadas como agentes hidrolizantes durante muito tempo, devido à analogia dos efeitos causados por estes dois tipos de enzimas (exo e endopeptidases) sobre as propriedades físicas do glúten (MONNIER & GORDON, 1975).

As enzimas proteolíticas atuam na hidrólise das cadeias de proteínas nas ligações peptídicas, criando no sistema linhas protéicas transversais e diagonais unidas por pontes S-S, ocasionando uma nova orientação das cadeias através da formação de ligações frágeis, que podem ser facilmente rompidas (BRUNO, 1989).

Em vários trabalhos foi testada a utilização de proteases em panificação, sendo observado que estas podem controlar a textura e a uniformidade da massa. Segundo WOODS et al. (1980); EL-DASH & JOHNSON, (1967); e BARRET, (1975), outros aspectos também observados foram uma melhora na facilidade de manipulação da massa, refletida pelo aumento na elasticidade do glúten, além de uma diminuição do tempo de mistura, aumento do volume do pão e melhora na textura da crosta. Proteases são adicionadas à massa de pães como auxiliares da textura e uniformidade.

2. 8. 2. Fontes de enzimas proteolíticas

As proteases podem ser obtidas de diferentes fontes como a farinha de trigo, as leveduras, os cereais maltados, as proteases de origem vegetal (papáina, bromelina e ficina) e os preparados enzimáticos obtidos a partir de culturas bacterianas e fúngicas (PETIT & AUDIER, 1967). Dentre as proteases exógenas à farinha, devem ser consideradas as proteases de levedura. Entretanto, tem sido afirmado que nenhuma ação proteolítica ocorre, exceto quando as células das leveduras são rompidas (MONNIER & GORDON, 1975; WOODS & KINSELLA, 1980).

A maioria das proteases vegetais comerciais, tais como papáina, bromelina e ficina, são extremamente simples de ser processadas, entretanto, o seu suprimento depende da demanda pelas matérias-primas de origem. Estas proteases apresentam uma produção sazonal que limita um fornecimento adequado e contínuo, além do fato de as condições ambientais não serem reprodutíveis, o que resulta na não uniformidade dos extratos enzimáticos (LOFFLER, 1986).

A utilização das proteases exógenas pela adição de malte à farinha de trigo apresentam algumas desvantagens devido a aquelas apresentarem no seu processo de extração um alto grau de amilases. Além disso, apresentam atividade amilolítica baixa em relação à atividade proteolítica. Deve-se, portanto, trabalhar com uma fonte de proteases tão pura quanto possível. Esta é o caso das enzimas proteolíticas industriais obtidas a partir de vegetais, bactérias e fungos (BRUNO, 1986).

As enzimas microbianas podem ser produzidas industrialmente em grandes quantidades com custos relativamente reduzidos. Além disso, não são alteradas por fatores ambientais o que pode resultar em uniformidade na pureza, estabilidade e atividade adequada nos preparados. As proteases mais usadas nas indústrias de panificação são as de origem bacteriana e fúngica. Sendo usualmente provenientes respectivamente de *Bacillus subtilis* e do fungo *Aspergillus oryzae*. Estas enzimas são consideradas geralmente “seguras” para uso alimentar (Generally Recognized As Safe-GRAS) pela FDA (LOFFLER, 1986).

Nos Estados Unidos, 2/3 do pão branco produzido é acrescido com proteases de *Aspergillus oryzae* (BARRET, 1975). As indústrias de pão utilizam exclusivamente preparações de proteases extraídas de *Aspergillus oryzae*, entretanto podem ser utilizados outros tipos de proteases em pão branco como a bromelina e a papaína. Proteases bacterianas foram testadas com sucesso em massas experimentais. Um controle cuidadoso da quantidade de proteases adicionada na massa é importante, pois o excesso pode causar o amolecimento da massa, tornando-a pegajosa e gomosa e de textura dura, e a perda de suas características de viscoelasticidade (JOHNSON & MILLER, 1949; BARRET, 1975).

Apenas certos tipos de proteases são aceitáveis para o uso em massas. Por exemplo, farinhas de trigo contendo inibidores de tripsina e papaína são limitantes para o uso dessas enzimas (BARRET, 1975). A quantidade de papaína necessária para reverter o efeito inibitório é deletério para o volume da massa (EL-DASH & JOHNSON, 1967).

A levedura de panificação, oferece uma perfeita fonte de enzimas, como também uma potencial fonte de prolinas para consumo humano (MATELES & TANNENBAUM, 1968; KINSSELLA & SHETTY, 1978). O procedimento para uma purificação parcial dessas proteases e sua caracterização foram descritas por WOODS & KINSSELLA (1980b).

2. 8. 3. Determinação dos efeitos das proteases em massas através de métodos reológicos.

A atividade proteolítica é geralmente determinada através de procedimentos viscosimétricos ou através de modificações da mesma pela ação das proteases (POMERANZ et al., 1966).

Quando a farinha de trigo e os demais ingredientes da massa são homogeneizados durante a mistura, ocorre a hidratação das proteínas e a associação das mesmas através de pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals e pontes S-S, formando um complexo

reticular denominado glúten. O glúten se apresenta como uma rede de fibras elásticas que confere à massa a sua propriedade de extensibilidade sob pressão de um gás. Em panificação, as características reológicas das massas relacionadas com as proteínas do glúten são particularmente importantes, sendo responsáveis pelo volume e estrutura típica dos pães (BOBBIO & BOBBIO, 1984).

Quando proteases são adicionadas às massas, estas apresentam ação hidrolítica sobre as proteínas do glúten, provocando um enfraquecimento da sua rede, conseqüentemente, modificando as propriedades reológicas da massa. Geralmente o efeito se dá pela redução da elasticidade do glúten, tornando a massa mais extensível, facilitando o manuseio e seu processamento, resultando em um produto final com melhor qualidade. O efeito das proteases na massa não podem ser determinados através de métodos bioquímicos de análise que utilizam como substratos a hemoglobina e caseína. Para isto é necessário a utilização de métodos que mostrem as variações reológicas das proteínas do glúten da massa (PETIT & AUDIDIER, 1967).

O efeito das proteases nas propriedades viscoelásticas da massa pode ser estudada através do farinógrafo e extensógrafo Brabender. Com estes equipamentos e com testes em panificação, podem ser determinadas as dosagens de enzimas recomendadas para cada tipo de produto final (REED, 1967).

2. 8. 3. 1. Efeito de proteases nas propriedades de mistura da massa determinados no Farinógrafo

O farinógrafo Brabender é utilizado como ferramenta para medir a resistência que a massa oferece ao movimento das pás na mistura, gerando um torque que é registrado graficamente. O valor do torque em unidades arbitrárias é definido como a consistência da massa, em unidades Brabender (BRUNO, 1986).

LANDIS (1935) desenvolveu um método para determinar a atividade proteolítica de preparados enzimáticos comerciais através do farinógrafo. Este pesquisador notou que ao ser adicionado proteases em massas ocorre um decréscimo da energia de desenvolvimento com o tempo, causado pela adição da enzima, em relação ao substrato padrão (farinha de trigo sem adição de protease). Foi constatado que a taxa inicial de decréscimo da energia de desenvolvimento com o tempo é proporcional à concentração de protease adicionada.

JOHNSON & MILLER (1953) estudaram o efeito da proteólise, através do farinógrafo, na consistência de massas farinha-água em um período de 4 horas de descanso a 30° C. Foi constatada uma diminuição da consistência da massa pela adição de proteases, em relação à massa padrão. Estas medidas foram tomadas como medida da atividade proteolítica nas massas por estes pesquisadores.

PETIT & AUDIDIER (1967) utilizaram o farinógrafo para a análise da variação da consistência de uma massa farinha-água, diretamente durante a mistura em função da adição de doses crescentes de proteases de *Bacillus subtilis*. Estes pesquisadores observaram que apenas doses superiores a 45 HU (unidades de hemoglobina) por 100 g de farinha, foram adequadas para registrar modificações perceptíveis na consistência das massas.

Os resultados encontrados por PETIT & AUDIDIER (1967) estão de acordo com os estudos de DUCROO (1974) que considerou a sensibilidade do farinógrafo insuficiente para demonstrar a atividade proteolítica fraca em massas farinha-água. Desta forma, este pesquisador relata que o uso do farinógrafo não soluciona o problema de se correlacionar atividade proteolítica com modificações nas características da massa. Contudo, a facilidade de manuseio torna este aparelho adequado para o estudo de atividade proteolítica forte, como é o caso observado na produção de certos tipos de pães e determinados biscoitos.

2. 8. 3. 2. Efeito de proteases nas propriedades viscoelásticas da massa pelo Extensógrafo

A adição de proteases torna as massas mais macias e provoca modificações em sua elasticidade e extensibilidade. Estas características podem ser determinadas graficamente através do uso do extensógrafo Brabender, o qual registra a resistência à extensão oferecida pela massa quando submetida ao teste. Portanto, este aparelho permite o acompanhamento das modificações reológicas da massa causadas pela proteólise. Em geral, doses crescentes de enzimas proteolíticas provocam uma diminuição da resistência à extensão (elasticidade) e um aumento da extensibilidade das massas (HASEBORG, 1981).

POMERANZ et al. (1966) utilizaram o extensógrafo com o intuito de estudar a ação de proteases microbianas em massas farinha-água em dosagem constante (600 HU). Foi observado que o uso de proteases fúngicas ocasionou um decréscimo da área sob a curva extensográfica, isto é, um enfraquecimento da massa, enquanto que o uso de proteases bacterianas nas mesmas condições, destruiu a estrutura da massa.

SPROBLER, (1981), relata em seu estudo a utilização do extensógrafo na determinação da resistência à extensão de massas farinha-água utilizando dosagens crescentes de proteases de origem vegetal (papaína), bacteriana e fúngica. Este pesquisador mencionou que não existe uma correlação entre os efeitos de proteases de diferentes fontes sobre a hemoglobina e sobre o glúten na massa.

2. 8. 4. Efeito das proteases no processamento de pães

As proteases naturais da farinha não são ativas no pH normal das massas e, conseqüentemente, não desempenham papel em panificação. Dessa forma, a suplementação da atividade proteolítica deve ser feita através de proteases de outras fontes. Atualmente a utilização de métodos contínuos de produção de pães requerem rígido controle dos tempos de mistura e de produção de massas, o que vem sendo alcançado através da adição de proteases. (BARRET, 1975).

Historicamente, as características desejadas dos pães eram obtidas aumentando-se o tempo de mistura e/ou de fermentação das massas. Atualmente se produz pães com boa qualidade e maior rapidez com a adição de proteases à massa (BARRET, 1975).

A adição de proteases exógenas visa principalmente o enfraquecimento do glúten, devendo ser feita em função da qualidade da farinha utilizada e do produto desejado. Na produção de pães a partir de farinhas fortes, as massas com alta elasticidade e pouca maleabilidade no manuseio podem ser melhoradas com a adição de protease (MONNIER & GORDON, 1975). A utilização de farinhas fortes em panificação produzem pães de baixa qualidade, entretanto com a adição de proteases à massa, pela hidrólise das cadeias do glúten, as massas tornaram-se extensíveis e com grande capacidade de retenção de gás, formando pães com maior volume, melhor simetria, textura e granulidade do miolo (UHLIG & SPROBLER, 1971; GAMS, 1979).

A adição de proteases no processamento de pães é uma prática amplamente empregada em países que produzem farinhas a partir de variedades de trigos fortes, sendo geralmente utilizadas proteases de origem fúngica (MONNIER & GORDON, 1975).

Nem todas as proteases são igualmente adequadas à produção de pães. Pequenas quantidades de proteases de origem bacteriana e vegetal (papaína e bromelina), podem provocar uma hidrólise excessiva do glúten, tornando a massa altamente extensível, pegajosa e com características inadequadas para o processamento. Essas enzimas não são recomendadas

para pães, devido ao perigo de dosagem excessiva. Por outro lado, a ação mais fraca das proteases fúngicas na massa sugere o seu emprego no tratamento de farinhas fortes para pães. As proteases fúngicas causam um efeito de amolecimento na massa, tornando-a mais flexível e facilitando o seu manuseio. A maior flexibilidade de dosagem dessas enzimas é vantajosa, uma vez que diminui consideravelmente o risco de super dosagem (DUCROO, 1974).

A maioria das proteases fúngicas utilizadas em panificação são de *Aspergillus oryzae* (BARRET, 1975). Normalmente, os preparados de proteases fúngicas contêm alguma atividade amilolítica, que também deve ser padronizada para um maior controle da sua aplicação. Geralmente, as proteases são misturas de endo e exopeptidases, com pH ótimo na faixa de 4,0 a 5,0, e temperatura ótima variando de 30 a 50°C (LYONS, 1982). Essas enzimas são comumente usadas em níveis de adição de aproximadamente 50.000 a 100.000 HU (Unidades de Hemoglobina) por 50 Kg de farinha (COLE, 1973).

Além da ação direta das proteases na massa, essas enzimas também podem influenciar as propriedades organolépticas dos pães processados através da liberação de grupos NH₂ os quais podem reagir com os açúcares redutores, quer presentes na formulação, quer produzidos pela ação da α -amilase, para promover a reação de Maillard, que é responsável pelo escurecimento da crosta e pela formação de aromas característicos do pão (HASENBORG, 1981; LYONS, 1982).

EL-DASH & JOHNSON (1967) estudaram a influência da adição de enzimas proteolíticas de origem fúngica e vegetal (papaína) no aroma e no sabor dos pães. Estes pesquisadores observaram que o aroma foi melhorado pelo uso de proteases, o que pode ser atribuído a um aumento na formação de compostos carbonílicos, causado pela ação enzimática. No entanto, não foram detectadas alterações no sabor dos pães.

2. 8. 5. Proteases no processamento de biscoitos

As proteases também podem ser usadas com sucesso na produção de biscoitos doces, "crackers" e "waffles". A adição de proteases é particularmente benéfica na produção de "crackers", onde é necessária uma massa mole e extensível para controlar a textura e o volume do produto (FOX & MULVIHILL, 1982). Essas enzimas atuam sobre o glúten durante o período de fermentação para fornecer um balanço adequado entre extensibilidade e elasticidade das massas. Isto permite que as massas sejam laminadas sem ruptura e que produzam, durante

o cozimento, biscoitos com superfície lisa, sem bolhas ou deformação nas bordas (BARRET, 1975).

As proteases também exercem um papel importante na produção de "waffles". Para esse tipo de produto, devem ser produzidas massas fluidas de baixa viscosidade, que possam ser bombeadas durante o processamento. Para isso é preciso usar grande quantidade de água na formulação. A viscosidade da suspensão pode também ser reduzida através da degradação do glúten pelas proteases, o que diminui a quantidade de água necessária. Com isso, pode haver uma redução de gastos com energia, tempo de cozimento e conseqüentemente aumento na produção (HASEBORG, 1981).

O uso de proteases pode ser de grande utilidade no processamento de biscoitos semidoces duros. Algumas normas particulares para a produção desses biscoitos devem ser seguidas. Primeiro, devem ser utilizadas farinhas de trigo de baixo teor de proteínas. Também deve-se limitar ao máximo a absorção de água das partículas protéicas durante a mistura da massa, reduzindo ao mínimo o grau de hidratação da massa, através da adição de açúcares e de outros componentes secos que possam absorver água. Finalmente, deve-se evitar a formação de uma rede de glúten forte, para que as massas possam ser moldadas e assegurar um bom produto final. Dessa forma, o objetivo da mistura é promover uma homogeneização dos ingredientes com um mínimo de desenvolvimento do glúten, utilizando baixas velocidades (GUÉRIVIÈRE & BUSSIÈRE, 1974).

Massas produzidas com farinha forte são freqüentemente elásticas e pouco extensíveis, tendendo a voltar em sua forma original, quando esticadas. Os biscoitos feitos com essas massas, geralmente com problemas de laminação, são duros, pesados e com bolhas na superfície após o cozimento. A adição de proteases em farinhas fortes permite a redução desses efeitos na massa, devido à hidrólise de proteínas na farinha de trigo. O uso dessas enzimas possibilita, portanto, a utilização de farinhas inicialmente inadequadas à produção de biscoitos (GAMS, 1976).

Os efeitos das proteases nas propriedades plásticas do glúten são encontrados na textura do produto final. A dispersão ou enfraquecimento da rede de proteínas possibilita a formação de um produto mais friável, de menor densidade e dureza e de melhor aparência geral (MONNIER & GORDON, 1975). Além da textura, as proteases também podem agir na cor e nas propriedades organolépticas dos biscoito, de forma análoga ao que ocorre com pães (HASEBORG, 1981; LYONS, 1982).

Revisão Bibliográfica

De um modo geral, as proteases de origem bacteriana e vegetal (papaina e bromelina), são consideradas mais adequadas ao processamento de biscoitos em relação às fúngicas, por apresentarem maior eficácia na degradação do glúten (SPROBLER, 1981).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. MATERIAL

3. 1. 1. Microorganismo

A suspensão de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada como fonte para extração de proteases, foi proveniente de fermentação industrial para a produção de cerveja, sendo fornecida pela Prodesa- Produtos Especiais para Alimentos Ltda.

3. 1. 2. Proteases utilizadas no teste de aplicação

Nos testes de aplicação, para efeito de comparação das proteases de levedura, foram utilizadas outras duas proteases, uma de origem bacteriana e outra fúngica, fornecidas pela Prozyn Indústria e Comércio Ltda. As enzimas utilizadas para os testes em massas fermentadas foram:

a) Proteases de levedura: obtidas neste trabalho, a partir de *S. cerevisiae* proveniente de fermentação industrial da produção de cerveja. Foram preparados um extrato bruto (enzima líquida) e um extrato concentrado e liofilizado (enzima liofilizada). A atividade enzimática desses dois extraos foi de 1,06 e 1, 57 unidades/mL respectivamente, a pH 6,0, a uma temperatura de 50°C, utilizando como substrato a caseína.

b) Protease bacteriana: foi utilizado o produto conhecido comercialmente como "Proten", que é uma preparação de grau alimentício, obtida pela fermentação controlada de *Bacillus subtilis*.

c) Protease fúngica: foi utilizado o produto conhecido comercialmente como "Protezyn FX", que é uma preparação enzimática de grau alimentício, obtida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*. Essa enzima não possui alfa amilase segundo dados fornecido pelo fabricante.

3. 1. 3. Reagentes e soluções

Os principais reagentes e soluções utilizadas foram: clorofórmio P.A. (Merck); solução tampão de fosfato de sódio 0,05M, pH 6,0; solução tampão de citrato 0,05M, pH 6,0; solução tampão de citrato-fosfato 0,05M, pH 6,0; azida de sódio (Merck), sulfato de amônio (Merck), uréia (Merck), ácido tricloroacético, caseína seg. Hammarsten (Merck), ácido clorídrico (Merck), corante Coomassie brilliant blue G-250 (Gibco BRL), solução de soro de albumina bovina (Merck), dodecil sulfato de sódio -SDS (Merck).

3. 1. 4. Equipamentos

Entre os equipamentos podem ser mencionados: incubadora com agitação New Brunswick Scientific G-27, centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B com rotores GSA e SS-34, espectrofotômetro UV-VIS Beckman DU-70, potenciômetro Micronal B-222, cromatógrafo gasoso HP 5890 acoplado com sistema integrador e impressor, sistema de ultrafiltração Pellicon Millipore, centrífuga de cesto IEC Chemical Centrifuge, farinógrafo e extensógrafo Brabender, determinador de glúten úmido Glutomatic Petern modelo Glúten Index, determinador de glúten seco Glutork Petern modelo 2020, liofilizador de bandeja, balança analítica Mettler, balança semi-analítica Acatec, determinador de umidade por infravermelho AND, determinador de Falling Number Petern modelo 1800, agitador magnético.

3. 2. Procedimentos e Ensaio

3. 2. 1. Obtenção das proteases

O processamento da suspensão de levedura para extração e purificação das proteases (Figura 2) foi conduzido tomando por base o método descrito por WOODS & KINSELLA (1980b) e FUKAL et al. (1986), conforme Figura 2, com a inclusão de uma etapa de eliminação de impurezas da suspensão industrial de levedura. Com a biomassa obtida foram realizados ensaios para autólise com o estudo das variáveis: temperatura e tempo de autólise, soluções tampão para extração das enzimas, e estabilizantes para proteção da atividade enzimática durante a liofilização.

a) Limpeza da suspensão de Leveduras

A suspensão de levedura foi submetida a um processo de lavagem com água destilada e posterior peneiramento, para retirada de impurezas grosseiras. Foram utilizadas peneiras de malhas diferentes, tendo sido o material primeiro submetido a peneiramento em malha de 0,102 mm e a seguir 0,062 mm. Após a limpeza, o material celular foi separado em centrífuga de cesto de laboratório (IEC Chemical Centrifuge), a 2.000 rpm, 25^oC e 10 min, utilizando filtro de tecido de porosidade de 0,45µm, para retirada do excesso de água e concentração da biomassa. A biomassa retida na tela foi submetida a aspersão com água destilada para lavagem e arraste de impurezas solúveis. Este procedimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do CPQBA.

Procedimentos e Ensaios

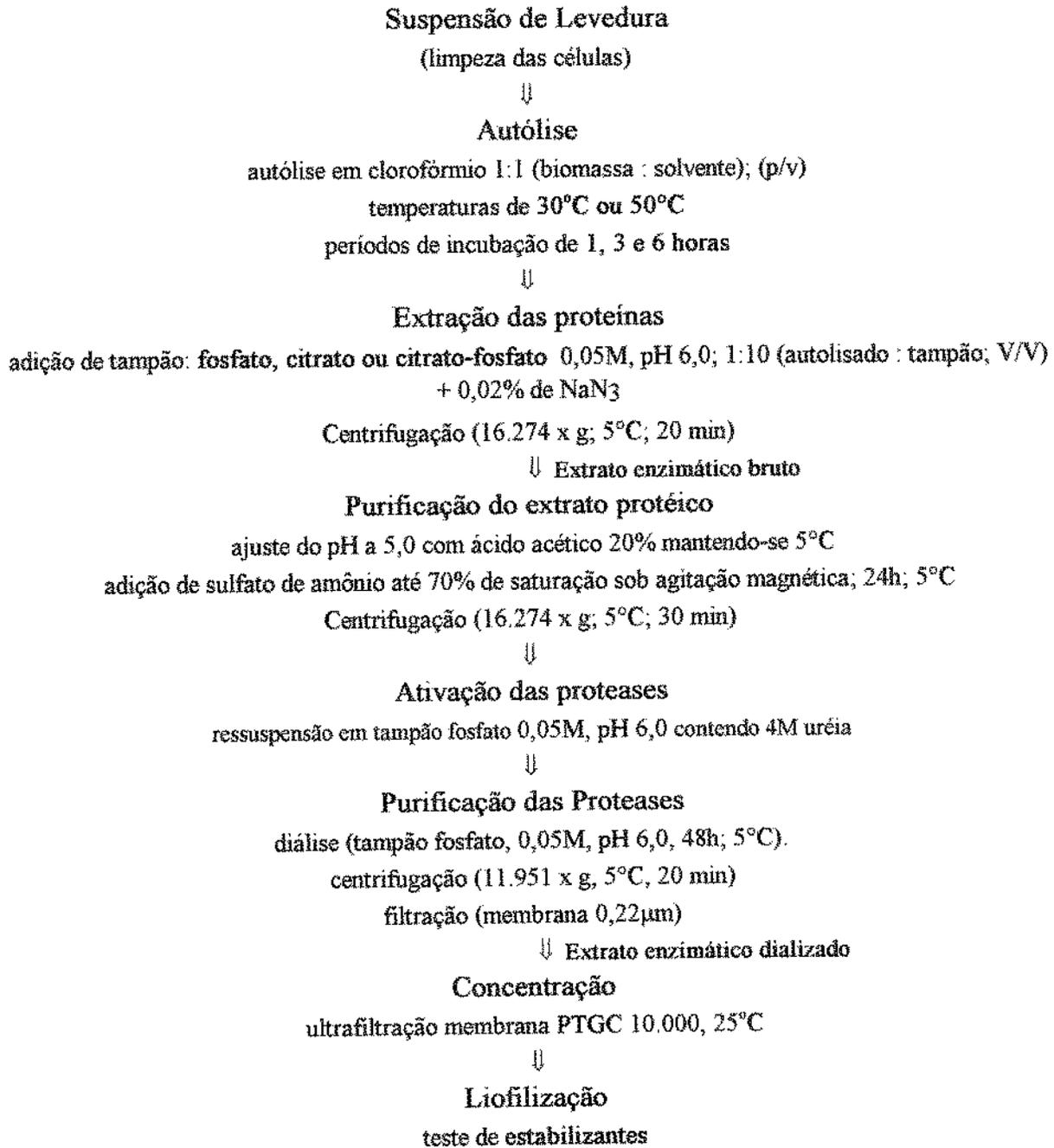


Figura 2. Fluxograma para a obtenção e purificação das enzimas de *S. cerevisiae* (adaptado de WOODS & KINSELLA, 1980b), com a indicação dos tratamentos a serem testados.

b) Ensaaios de autólise das células

A autólise das células limpas foi realizada fazendo a ressuspensão em clorofórmio, na proporção 1:1, (P/V), seguida de incubação sob agitação de 200 rpm em "shaker", na temperatura e tempos dos tratamentos adotados.

Com o intuito de otimizar esta etapa, foram realizados experimentos testando temperaturas de 30^o C e 50^o C por períodos de 60, 180 e 360 minutos de incubação. Após o término da autólise, o autolisado foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de enzimas (U/mL) e proteínas totais (mg/mL); a partir dos resultados foi calculada a atividade específica (U/mg).

c) Ensaaios de solubilização das proteínas para obtenção do extrato protéico bruto

Após ter sido definida a condição ideal para o processo de autólise em função dos parâmetros analisados, o autolisado foi submetido a extração com diferentes soluções tampão, com o intuito de se estudar a melhor condição de preservação da atividade enzimática das proteases durante o processo. Ao material autolisado foi adicionado tampão na concentração de 0,05M, pH 6,0 na proporção de 1:10 (autolisado: tampão); também foi adicionado azida de sódio na proporção de 0,02%. A suspensão foi mantida sob agitação durante 24 horas. Após centrifugação (16.247 x g, 5^oC, 20 min) o sobrenadante foi reservado e o precipitado foi ressuspensão em 200 mL do mesmo tampão e novamente centrifugado, juntando-se ao sobrenadante original. As soluções tampão utilizadas foram:

- 1) fosfato 0,05M, pH 6,0
- 2) citrato 0,05M, pH 6,0
- 3) citrato-fosfato 0,05M, pH 6,0

d) Purificação do extrato protéico por fracionamento com Sulfato de amônio em meio ácido

A precipitação das proteases foi feita através da adição de ácido acético 20% ao sobrenadante, até pH 5,0, sob agitação e temperatura de 5°C mantida em banho de gelo, seguida da adição de sulfato de amônio até 70% de saturação, mantendo-se o material sob agitação e refrigeração durante 24 horas. Após esse período o material obtido foi centrifugado (16.274 x g, 5°C, 20 min) e coletado o precipitado.

e) Ativação das proteases

A ativação das proteases foi feita através da ressuspensão do precipitado com 30 mL de solução tampão fosfato (0,05M, pH 6,0) em uréia 4M, permanecendo em repouso por 30 minutos.

f) Purificação das proteases por diálise e filtração

A purificação das proteases foi feita através de diálise em tampão fosfato (0,05M, pH 6,0) sob refrigeração a 5°C, por um período de 48 horas. O material obtido foi centrifugado (11.951 x g, 5°C, 20 min) e submetido a filtração em membrana Millipore 0,22 µm, para retirada de partículas oriundas do processo.

Após o término da diálise, foram coletadas amostras para determinação da concentração de enzimas (U/mL) e proteínas totais (mg/mL); a partir dos resultados foi calculada a atividade específica (U/mg).

g) Concentração das proteases

A concentração das enzimas foi feita por ultrafiltração em sistema Pellicon com membrana Millipore PTGC 10.000. Cerca de 500 mL de extrato enzimático foi submetido a ultrafiltração pela membrana, a uma pressão de 1,0 Bar e temperatura de 5°C.

h) Ensaio de liofilização das enzimas

As enzimas proteolíticas foram submetidas a processo de liofilização sendo testados três estabilizantes comerciais. Para a liofilização o material foi acondicionado em frascos de vidro contendo 1 mL de enzima e 1 mL de estabilizante. Os estabilizantes utilizados foram fornecidos pela CBM Produtos Biológicos, formulados pela própria empresa, sendo:

1) leite desnatado e sorbitol;

2) SPGA, constituído por sacarose, fosfato de potássio dibásico e monobásico, glutamato de sódio, e soro albumina bovina fração V;

3) H, constituído por sacarose, peptona e glutamato de sódio.

3. 2. 2. Ensaio para caracterização das proteases de Levedura

3. 2. 2. 1. Atividade das proteases em função da temperatura

O efeito da temperatura na atividade (U/mL) das enzimas proteolíticas foi avaliado com amostras em triplicata e temperaturas variando de 25°C a 90°C, a cada 5 ou 10°C. Os ensaios para determinação de atividade, em caseína 1% seg. Hammarsten, foram conduzidos mantendo os tubos por período de 5 a 120 minutos de incubação para cada temperatura testada.

3. 2. 2. 2. Atividade das proteases em função do pH

O efeito do pH sobre a atividade (U/mL) das enzimas proteolíticas foi realizado em triplicata com o pH variando de 5,0 a 8,0, a cada 0,5 unidades, em período de 60 minutos de incubação.

3. 2. 3. Ensaios de aplicação das proteases de Levedura

3. 2. 3. 1. Análise da farinha de trigo

A caracterização da farinha de trigo, utilizada para o preparo de massas a serem submetidas aos testes de aplicação de enzimas, foi realizada através das determinações de cinzas, proteína, pH, glúten úmido e seco, e Falling number (avaliação da atividade amilolítica). Os resultados podem ser observados na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2 - Resultados das características da farinha de trigo

proteína	10,64%
cinzas	0,66%
umidade	13,95%
pH	6,15
glúten úmido	3,09%
glúten seco	1,05%
número de queda "falling number"	490 s *

* s = segundos

3. 2. 3. 2. Preparo da massa submetida à ação das proteases

As massas foram preparadas segundo a metodologia descrita por SHIIBA et al. (1990), onde 300g de farinha de trigo foram acrescidas de 2% de fermento, nas concentrações das enzimas citadas no item 3.2.3.3. Todos os ingredientes foram misturadas com (56% de água) no misturador do farinógrafo, sendo que parte da água total da formulação (168 mL) foi usada para a dissolução prévia da protease e do fermento. Assim que a massa começou a se formar, as paredes internas do misturador foram raspadas com espátula e o mesmo coberto durante a mistura. As massas foram acondicionadas em bequer de 2000 mL e submetidas a uma etapa de descanso por um período de 90 minutos em câmara de descanso, em condições médias de 30°C e 98% de umidade relativa. Duas amostras de massa, de 150g cada, foram boleadas e modeladas no extensógrafo. As massas foram colocadas em celas, permanecendo em repouso por 45 minutos em câmara de descanso à 30°C e 98% de umidade relativa. As massas foram analisadas no extensógrafo, segundo o método AACC 54-10, de onde foram obtidos os

gráficos que determinaram as suas características. Uma massa foi preparada sem a adição de enzima para controle.

3. 2. 3. 3. Concentração de enzimas adicionadas na farinha para estudo das modificações reológicas

Foram utilizadas 3 tipos de proteases, nas concentrações abaixo apresentadas, as quais foram estabelecidas em testes preliminares, com base no efeito de amaciamento provocado pelas mesmas nas massas, após a mistura e maturação.

1) proteases de levedura (*S. cerevisiae*):

a) líquida bruta

1,0; 3,0; 4,0; 8,0; e 11,0 mL/Kg

b) liofilizada:

0,10; 0,30; 0,40; 0,80; e 1,10 mg/Kg

2) protease bacteriana (*Bacillus subtilis*):

0,06; 0,12; 0,25; e 0,50 mg/Kg

3) protease fúngica (*Aspergillus niger*):

0,25; 0,50; e 1,00 mg/Kg

3. 3. Métodos para determinação de proteínas e atividade das proteases nos ensaios enzimáticos

3. 3. 1. Determinação de proteínas

O método utilizado para a determinação de proteínas foi o descrito por BRADFORD (1976) modificado por SEDMAK e GROSSBERG (1977), no qual a concentração de proteína é determinada através da associação desta ao corante Coomassie Brilliant Blue G-250, e

analisada em espectrofotômetro a 595nm; a associação da proteína com o corante se dá em dois minutos, e sua coloração é estável por um período de 60 minutos.

a) Preparo do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250

Uma solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,06%), foi preparada diluindo-se 0,6g do corante em água destilada, completando-se o volume para 1.000 mL com ácido clorídrico 2,2% (p/v) - 0,6N. A solução foi mantida sob agitação magnética por 10 minutos e filtrada em papel Whatman nº 1 para remoção do material insolúvel. O reagente apresenta coloração laranja escuro, e foi padronizado para uma absorbância de 1,3 a 465nm, diluindo-se quando necessário a solução com ácido clorídrico 2,2%.

b) Elaboração da reta padrão de proteína

Uma solução padrão de soro albumina bovina (BSA) foi preparada dissolvendo-se 20 mg de BSA em 200mL de solução salina 0,15M. Para elaboração da reta padrão, 0,1 a 1,0 mL foram transferidos para tubos de ensaio, completando-se o volume para 1,0 mL com tampão acetato 0,1M, SDS 0,01%, pH 5,0. A seguir 2,0 mL do reagente G-250 foram adicionados. Um "branco" foi elaborado utilizando-se tampão acetato ou solução salina ao invés da solução padrão de proteína. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595nm.

Para quantificação da proteína extraída das células de levedura, foram utilizados 0,1 a 0,5 mL das amostras obtidas a partir do item 3. 3. 1.

3. 3. 2. Atividade enzimática

A atividade das proteases foi determinada segundo o método de KUNIMTSU e YASUNOBU (1970) modificado por TSAI et al. (1973), onde 1g de caseína seg. Hammarsten (Merck) é dissolvida em 100 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,0. A mistura foi aquecida em banho de água em ebulição por um período de 15 minutos e resfriada em água corrente. Para o teste de atividade enzimática, 1,0 mL da solução de caseína e 1,0 mL da solução de enzima foram adicionadas em tubos de ensaio, e incubadas a 37°C por um período de 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 3,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, deixando-se em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. O material foi filtrado em papel Whatman nº 1 e a absorbância lida a 280nm em espectrofotômetro. Um "branco" foi elaborado com as

soluções de caseína e de enzima, adicionando-se TCA no início da reação. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma mudança de 0,001 na unidade de absorvância por minuto (KUNIMITSU & YASUNOBO, 1970).

3. 4. Métodos para caracterização da farinha de trigo e massas preparadas

3. 4. 1. Parâmetros químicos e físico-químicos para caracterização da farinha de trigo

Foi utilizada no preparo da massa uma farinha de trigo comercial do tipo especial, tendo sido caracterizada através dos seguintes parâmetros:

- a) Proteína: AACC Método 46-11 (1969) ,
- b) Cinzas: AACC Método 08-01 (1969),
- c) Determinação de pH:

A determinação do pH da farinha foi feita segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Foram pesadas 10 g da amostra de farinha em frascos “Erlenmeyer” de 250 mL, adicionando-se 100 mL de água destilada. Os frascos foram agitados para homogeneização da solução por um período de 30 minutos. Após este período as amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos para decantação e foi medido o pH do sobrenadante previamente separado do precipitado.

d) Determinação de umidade

A umidade da farinha de trigo foi determinada com o auxílio do equipamento de infravermelho para determinação de umidade.

Amostras de 5,0g de farinha foram pesadas no próprio equipamento, e mantidas à temperatura de 130°C por um período de 15 minutos. Após este período foram tomadas as medidas de umidade das amostras. As análises foram feitas em duplicata.

e) Determinação de teor de glúten úmido e seco

Amostras de 9,96g de farinha de trigo (13,95% de umidade) foram pesadas e colocadas na câmara de lavagem do equipamento, previamente montada. Adicionou-se 4,8 mL de uma solução de cloreto de sódio 2% com o auxílio de dispensador à farinha de trigo, na câmara de ensaio agitando-a suavemente para homogeneização da água e da farinha. A câmara de ensaio foi antes colocada no equipamento onde foram feitas as misturas da farinha por 20 segundos, e a lavagem do glúten com solução de cloreto de sódio 2% por 5 minutos.

Ao término da lavagem as amostras foram retiradas da câmara e pesadas, para a determinação da percentagem de glúten úmido da farinha.

O teor de glúten seco foi determinado com o auxílio do equipamento “glutork 2025”, onde as amostras de glúten úmido foram colocadas uma de cada vez, onde permanecendo por um período de 4 minutos a 150°C. Após o término da secagem as amostras foram retiradas do equipamento e pesadas, para a determinação da percentagem de glúten seco.

f) Número de queda “Falling Number”

A atividade amilolítica da farinha de trigo foi determinada pelo número de queda, com o auxílio do equipamento Falling number.

Amostras de 7,0g de farinha (14% de umidade) foram pesadas e acondicionadas em tubos de ensaio em duplicata, onde foram adicionados 25 mL de água destilada através de um dosador do próprio equipamento. As amostras foram homogeneizadas manualmente por 30 a 40 segundos, colocadas imediatamente no equipamento, e agitadas por 60 segundos. Após este período foi determinado o tempo, em segundos, que o misturador levou para alcançar o final do percurso nas suspensão gelatinizadas. Portanto o valor do índice de queda “Falling Number” é expresso em tempo (segundo).

3. 4. 2. Métodos reológicos para avaliação da qualidade da farinha de trigo

As análises reológicas da farinha de trigo foram feitas em Farinógrafo Brabender, segundo AACC (1969) método 54-21 e em Extensógrafo Brabender, segundo método AACC (1969) método 54-10. Os parâmetros analisados estão descritos a seguir.

a) Parâmetros farinográficos

- 1) Absorção de água (g), definida como a quantidade de água necessária para que a massa atinja 500 unidades farinográficas (UF).
- 2) Tempo de chegada (min), definido como o tempo necessário para que a massa atinja 500 UF, após a adição de água.
- 3) Tempo de desenvolvimento (min), definido como o tempo desde o início da mistura até o desenvolvimento máximo da curva, imediatamente antes da primeira indicação de queda.
- 4) Estabilidade (min), definida como a diferença de tempo entre o ponto onde o topo da curva intercepta a linha de 500 UF e o ponto onde o topo da curva deixa a linha de 500 UF.
- 5) Índice de tolerância, definido como a diferença em unidades farinográficas entre o valor no topo da curva no pico e o valor no topo da curva medido 5 minutos após o pico ser alcançado.

b) Parâmetros extensográficos

O extensograma foi elaborado segundo o método da AACC Methods 54-10, onde 300 g de farinha de trigo foram colocadas no misturador do farinógrafo, acrescentando-se sob mistura 6 g de NaCl dissolvido em parte da água, e o restante da água calculada com base na porcentagem obtida no farinograma, (cerca de 3% inferior). A mistura foi homogeneizada durante 1 minuto, e deixada em repouso por 5 minutos. O misturador foi novamente ligado por mais 2 minutos, devendo após este tempo a resistência da massa atingir 500 unidades farinográficas. Após desligar o misturador, duas amostras de massa de 150g cada foram boleadas e modeladas no extensógrafo. As massas foram colocadas em dispositivos especiais,

que permaneceram em repouso por 45, 90 e 135 minutos em câmara de descanso a 30⁰C e 98% de umidade relativa. As massas foram analisadas no extensógrafo, de onde foram obtidos os dados que determinaram as seguintes características reológicas da massa.

- 1) Resistência à extensão (RE), definida como o valor da curva, em unidades extensográficas obtido a 50 mm da origem.
- 2) Resistência máxima (RM), definida como o valor, em unidades extensográficas, obtido no ponto mais alto da curva.
- 3) Extensibilidade (E), definida como o comprimento da curva, do início ao fim, em mm.
- 4) Número proporcional (RE/E), definido como a razão entre a resistência à extensão e a extensibilidade.
- 5) Energia (A), definida como a área abaixo da curva, em cm².

3. 5. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados dos ensaios foi aplicado, quando conveniente, a análise de variância (teste F) e comparação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. Caracterização da farinha de trigo

A farinha de trigo utilizada neste trabalho foi previamente caracterizada através de parâmetros Farinográficos e Extensográficos determinando suas características, as quais podem ser observadas nas Tabelas 3 e 4 a seguir.

Tabela 3 Resultados referentes às características reológicas da farinha de trigo, utilizada neste trabalho para teste do efeito de proteases na massa.

Parâmetros farinográficos	Valores
absorção de água	58%
tempo de chegada	1,0 min
tempo de desenvolvimento	1,5 min
estabilidade	5,5 min
tempo de saída	16,5 min
índice de tolerância	20 UF

Tabela 4 . Análise extensográfica da massa preparada. Resultados de resistência a extensão (RE); resistência máxima (RM); extensibilidade (E); número proporcional (RE/E) e energia (A).

tempo	RE	RM	E	RE/E	A
45	380	540	167	2,27	1,21
90	445	645	162	2,75	1,32
135	445	645	162	2,75	1,29

Através dos resultados obtidos pelo farinógrafo e pelo extensógrafo podemos concluir que a farinha de trigo utilizada para os testes com proteases apresentou ser uma farinha medio forte, a qual segundo vários autores adequada para adição de proteases.

4. 2. Obtenção de proteases

4. 2. 1. Avaliação da atividade enzimática sob temperatura e tempos diversos de autólise, em extratos brutos.

Após a limpeza da suspensão de levedura de acordo com o método descrito no item 3. 2. 1. a, obteve-se uma biomassa com aproximadamente 70% de umidade; foram eliminadas impurezas grosseiras e material fibroso provavelmente constituído por restos de lúpulo. Estas células foram submetidas ao processo de autólise com clorofórmio (WOODS & KINSELLA, 1980; e FUKAL et al 1986).

ARNOLD (1981) menciona em seus estudos que o uso de solventes orgânicos não polares ativam as enzimas autolíticas da levedura e aceleram o processo de autólise.

Os resultados apresentados na Tabela 5 e Figura 3 mostram que a autólise a 30^oC permitiu recuperar maior quantidade de enzimas. A quantidade de enzimas tem a tendência de diminuir com 6 horas de autólise, tanto realizada a 30^oC como a 50^oC. Para a autólise a 30^oC a atividade enzimática manteve-se estável até 3 horas; nessa temperatura, nos tempos de 1 e 3 horas a atividade atingiu 0,46 e 0,41 unidades/mL, respectivamente, diminuindo a 6 horas para 0,23. A 50^oC a atividade enzimática mostrou ser mais elevada a 3 horas; a 1 hora foi de 0,21, a 3 horas de 0,32 e a 6 horas de 0,15 unidades/ mL. O teor de proteína é mais reduzido na autólise a 50^oC, o que é atribuído à maior atividade das enzimas proteolíticas nessa temperatura (Tabela 1). Devido a esse resultado a pureza das enzimas ou a atividade específica das mesmas é mais elevada sob a temperatura de 50^oC. O aumento da temperatura pode ocasionar uma variação da atividade enzimática, resultando em dois efeitos antagônicos: o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima, ou pode ocasionar a desnaturação das proteínas enzimáticas (RICHARD, 1985).

Nos estudos de MADDOX e ROUGH (1970), WOODS e KINSELLA (1980b) e FUKAL et al. (1986), as proteases de levedura apresentaram atividade máxima entre

Resultados e Discussão

temperaturas de 45 e 52°C. A utilização de temperaturas mais elevadas para o processo foi também mencionada por OHMIJA e SATO (1975b) e HALÁSZ e LÁSZTITY (1991) que verificaram que a taxa de autólise depende da temperatura, que deve estar compreendida no intervalo de 45 a 60°C.

Em resumo, os resultados indicam que para o uso direto de autolisado bruto como fonte de proteases, a autólise a 30°C e 3 horas de incubação, forneceu melhores resultados.

Todavia, a utilização de temperaturas mais elevadas durante o processo, apresenta a vantagem de inibir o crescimento de microrganismos contaminantes. Nenhum dos autores mencionados neste trabalho, utilizaram temperaturas mais elevadas (50°C) para o processo de autólise de células de levedura, tendo trabalhado a 25 -30°C.

Tabela 5 - Atividade proteolítica e teor de proteína dos extratos enzimáticos brutos obtidos por autólise da levedura a 30° e 50°C, em diferentes períodos de incubação.

	Atividade enzimática			Proteína			Atividade específica		
	U/mL			mg/mL			U/mg		
Autólise	Incubação (h)								
	1	3	6	1	3	6	1	3	6
30°C	0,46 Aa	0,41 Aa	0,23 Ba	0,66 Aa	0,61 Ba	0,52 Ca	0,70 Ab	0,67 Ab	0,44 Bb
50°C	0,21 Bb	0,32 Ab	0,15 Cb	0,24 Ab	0,14 Bb	0,12 Bb	0,86 Ca	2,34 Aa	1,23 Ba
C.V.	7.5			4.6			7.2		

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas : comparação na horizontal; letras minúsculas : comparação na vertical

Resultados e Discussão

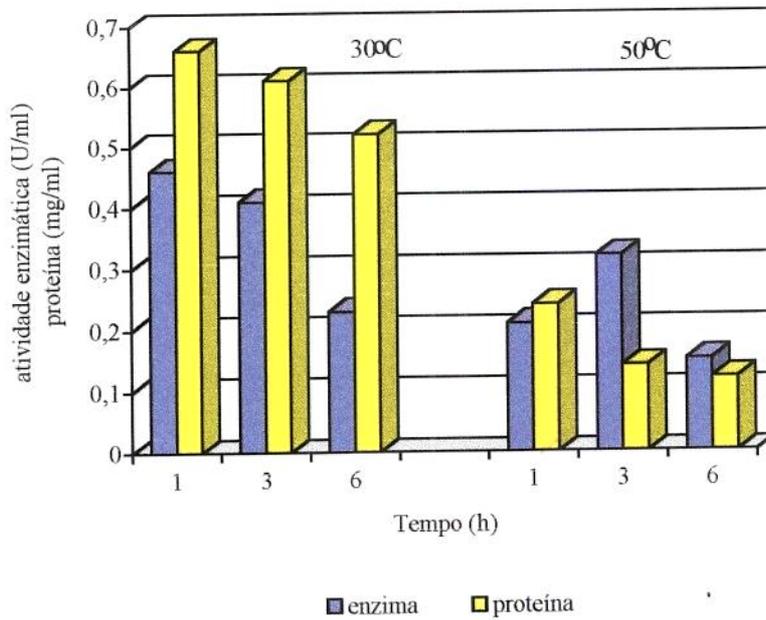


Figura 3 - Atividade proteolítica e teor de proteínas do extrato enzimático bruto de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*), obtidos a partir de autólise a 30^o e 50^oC, em diferentes períodos de incubação.

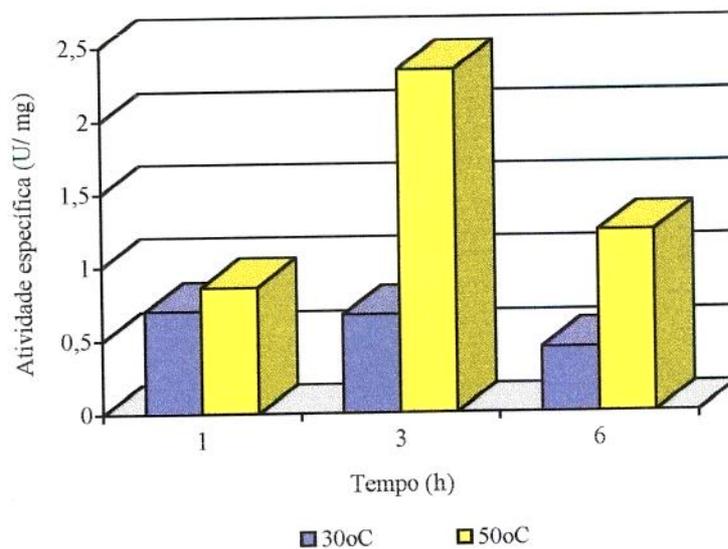


Figura 4 - Atividade proteolítica em extrato enzimático bruto de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*), obtidos por autólise a 30^o e 50^oC, em diferentes períodos de incubação.

4. 2. 2. Avaliação dos dialisados obtidos sob temperatura e tempos diversos

Os dialisados provenientes de autolisados obtidos sob incubação a 30°C e 50°C, e períodos de incubação de 1, 3 e 6 horas, foram avaliados para verificar as condições que propiciam os melhores resultados com relação às proteases purificadas.

A Tabela 6 e Figuras 5 e 6 mostra que a autólise a 50°C por 3 horas apresentou a mais elevada concentração de enzimas; nessa temperatura a atividade enzimática foi de 1,46 - 1,57 unidades/mL nos tempos de 1 e 3 horas, respectivamente, diminuindo a 6 horas para 1,08. A 30°C, a atividade enzimática foi estável entre 1 a 6 horas, com valores de aproximadamente 1,29 unidades/mL. Ou seja, as proteases provenientes de autólise a 30°C mantiveram atividade enzimática idêntica, para todos os períodos testados; para aquelas obtidas de autólise a 50°C, tal como no experimento anterior de avaliação do autolisado (Tabela 2), verifica-se que ocorreu uma elevação da atividade em autolisados obtidos com 3 horas de incubação, seguindo-se uma queda acentuada para aquela de 6 horas.

Observa-se que há também, tal como no experimento anterior de avaliação do autolisado, uma tendência do material proveniente de autólise a 50°C apresentar menores teores de proteína, devido à maior atividade das proteases nesta temperatura.

Assim, pode-se obter em autólise de 50°C e 1 ou 3 horas de incubação, atividade específica (pureza) bastante elevada, de 2,16 e 2,37 unidades por mg de proteína, respectivamente.

Em resumo, a protease purificada que apresentou melhores resultados foi proveniente de autólise a 50°C e conduzida até 3 horas de incubação. Assim, o autolisado obtido nestas condições foi selecionado para realização dos experimentos a seguir.

Resultados e Discussão

Tabela 6 - Atividade proteolítica e concentração de proteínas das preparações enzimáticas obtidas por diálise dos autolisados de levedura.

Dialisado	Atividade enzimática			Proteína			Atividade específica		
	U/ mL			mg/ mL			U/ mg		
	Incubação (h)								
	1	3	6	1	3	6	1	3	6
30°C	1,30 Aa	1,28 Ab	1,29 Aa	0,82 Aa	0,80 Aa	0,78 Aa	1,58 Ab	1,59 Ab	1,65 Aa
50°C	1,46 Aa	1,57 Aa	1,08 Bb	0,67 Ab	0,66 Ab	0,76 Aa	2,16 Aa	2,37 Aa	1,42 Ba
C.V.	7,7			9,4			9,9		

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Letras maiúsculas : comparação na horizontal; letras minúsculas : comparação na vertical

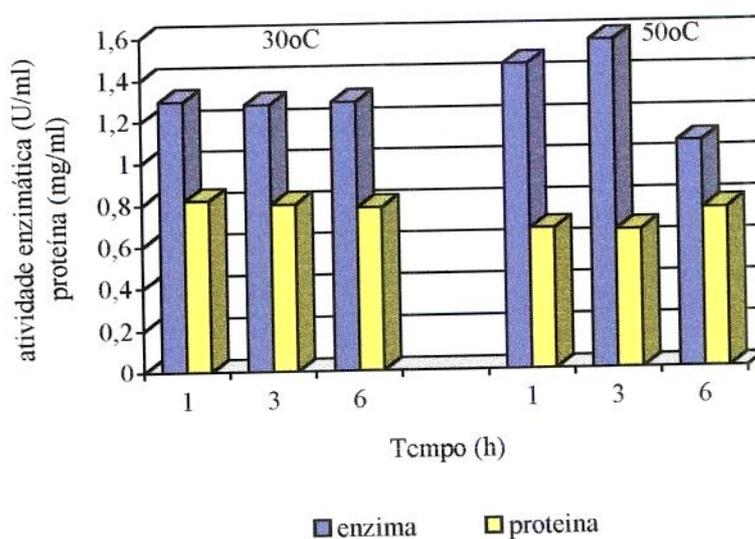


Figura 5 - Atividade proteolítica e teor de proteínas em dialisados de levedura obtidos por autólise a 30^o e 50^oC, em diferentes períodos de incubação.

Resultados e Discussão

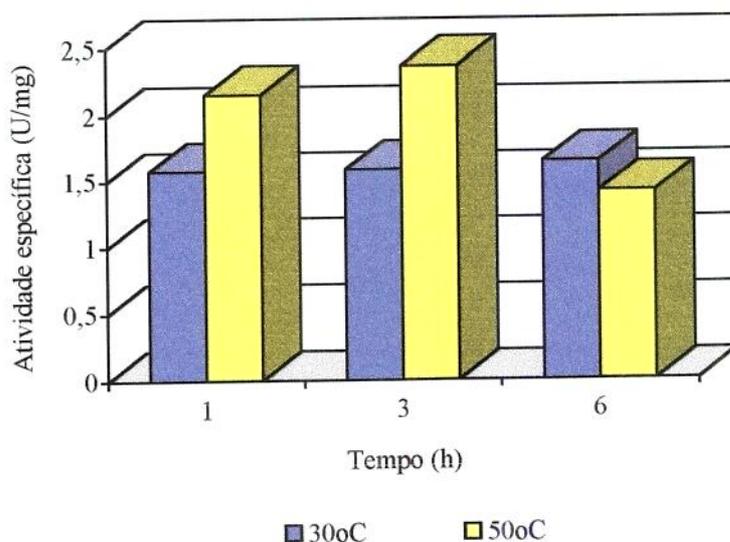


Figura 6 - Atividade proteolítica em dialisados de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*) obtidos por autólise a 30^o e 50^oC, em diferentes períodos de incubação.

4. 2. 3. Avaliação de diferentes soluções tampão para obtenção de extrato enzimático bruto.

Outro aspecto estudado foi a solubilização das enzimas com diferentes soluções tampão e seu efeito sobre a conservação da atividade enzimática, em extratos obtidos a partir de autólise a 50°C em período de incubação de 3 horas. As soluções tampão (0,05 M, pH 6,0) utilizadas foram: fosfato, citrato-fosfato e citrato. Os resultados referentes às análises efetuadas no extrato enzimático bruto e no dialisado, no que diz respeito a atividade enzimática (U/mL), teor de proteínas (mg/mL) e atividade específica (U/mg), podem ser observados nas Tabelas 7 e 8.

De acordo com os resultados podemos notar que para as condições propostas no ensaio o tampão fosfato foi mais favorável à preservação da atividade enzimática, assim como para a atividade enzimática e teor de proteínas, tanto no autolisado como no dialisado (Tabela 5). O tampão fosfato já havia sido utilizado por vários autores com resultados satisfatórios para a extração e conservação da atividade enzimática; no entanto, em outros estudos da literatura foram utilizados diferentes soluções tampão com resultados semelhantes ao tampão fosfato. Os resultados mostraram que para a metodologia aplicada para a extração das

Resultados e Discussão

enzimas, o tampão fosfato agiu de maneira mais eficiente do que os demais sendo este eleito para a continuidade do trabalho.

Uma vez selecionadas as condições otimizadas básicas, a temperatura e tempo de autólise, para obtenção de proteases purificadas, foi realizado um ensaio para verificar o resultado da utilização de duas diferentes soluções tampão (0,05M, pH 6,0), além daquela de fosfato utilizada nos ensaios anteriores: citrato-fosfato e citrato.

Para a avaliação foram analisadas amostras de autolisado e de dialisado. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8 e Figura 7, mostrando que o tampão fosfato permitiu obter recuperação comparável ou superior aos demais.

Pode ainda ser observado que a solubilização de proteínas permitiu elevar a atividade enzimática das proteases no extrato enzimático bruto, em cerca de 8 vezes, em relação à atividade enzimática no autolisado. Após a purificação o dialisado mostrou que o tampão fosfato e o citrato, apresentaram resultados idênticos (1,40 unidades/ mL) e superiores ao citrato-fosfato (1,00 unidade/ mL). No dialisado a atividade enzimática de 1,40 unidades/ mL é compatível com aquela obtida em outro ensaio (Tabela 3), de 1,57 unidades/ mL.

Tabela 7 - Resultados obtidos nos extratos enzimáticos brutos, preparados com a utilização de diferentes soluções tampão (0,05 M, pH 6,0): fosfato, citrato-fosfato e citrato.

Solução tampão	Atividade enzimática U/mL	Proteína mg/mL	Atividade Específica U/mg
fosfato	2,61 a	0,62 a	4,23 a
citrato-fosfato	2,54 a	0,61 a	4,17 a
citrato	2,47 a	0,64 a	3,88 a
C.V.	3,8	6,3	7,4

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Condições de autólise: 50°C, durante 3 horas. Média de 3 repetições.

Resultados e Discussão

Tabela 8 - Atividade proteolítica e teor de proteínas dos extratos enzimáticos dialisados, com diferentes soluções tampão.

Solução Tampão	Atividade enzimática U/mL	Proteína mg/mL	Atividade Específica U/mg
fosfato	1,40 a	1,20 b	1,16 a
citrato-fosfato	1,00 a	1,12 b	0,88 a
citrato	1,40 a	1,34 a	1,05 a
C.V.	10,0	4,7	10,0

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Condições de autólise: 50°C; durante 3 horas de incubação. Média de 3 repetições.

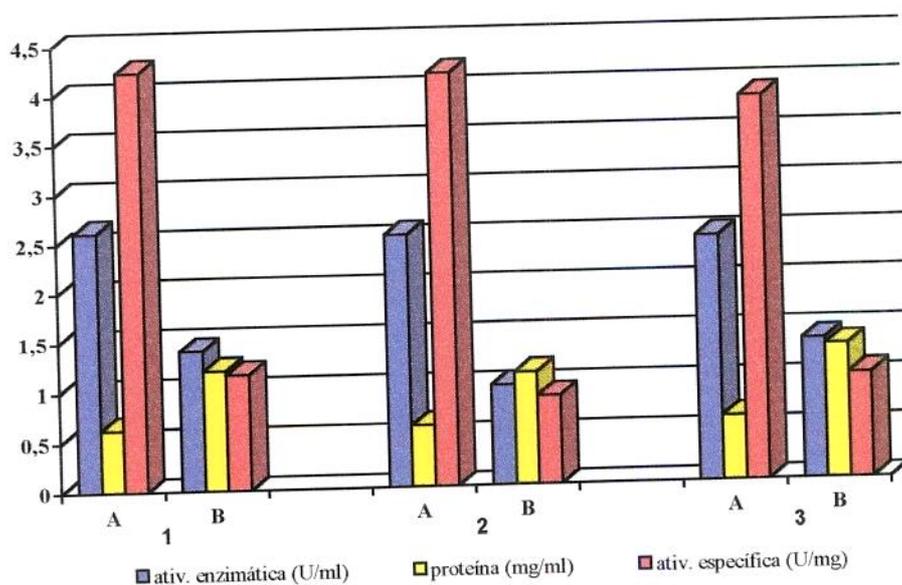


Figura 7 - Atividade proteolítica e teor de proteínas dos extratos enzimáticos brutos (A) e dialisado (B), preparados com diferentes soluções tampão. Autólise a 50°C com 3 horas de incubação.

4. 2. 4. Liofilização das enzimas

Durante o processo de liofilização (item 3. 2. 1. h) é geralmente relatada a perda de atividade enzimática na grande maioria dos casos. Com o intuito de estudar o melhor estabilizante para a conservação da atividade enzimática das enzimas de levedura, foram testados três tipos de estabilizantes: leite desnatado-sorbitol, SPGA e H; apenas o estabilizante H apresentou resultado adequado. Os resultados apresentados na Tabela 9 e Figura 8 demonstram que o estabilizante H além de estabilizar a atividade enzimática das proteases, causa pequeno aumento na atividade. Este aumento pode ser devido à composição do estabilizante o qual pode ter estimulado algum sítio ativo da enzima ou provocado alguma desassociação do complexo enzima-inibidor. O uso de leite desnatado-sorbitol ou SPGA apresentaram uma diminuição da atividade em relação ao controle.

Tabela 9. Atividade proteolítica e teor de proteína das proteases submetida a liofilização com diferentes estabilizantes.

Estabilizante	Atividade enzimática	Proteína	Atividade Específica
	U/mL	mg/mL	U/mg
controle	0,1008 c	0,17 c	0,59 a
leite desnatado e sorbitol	0,1058 a	0,58 a	0,18 b
SPGA	0,1000 d	0,55 b	0,18 b
H	0,1045 b	0,17 c	0,61 a
CV	0,09	2,7	2,6

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Resultados e Discussão

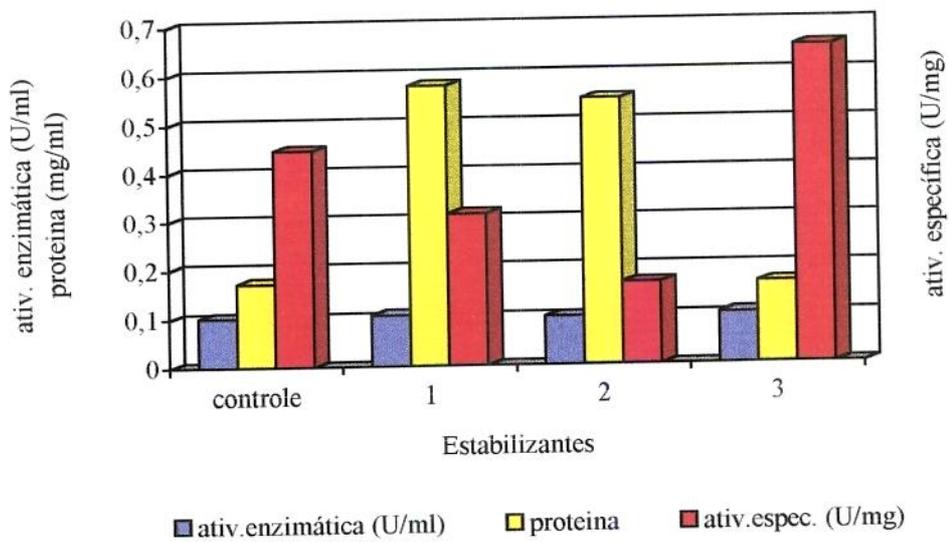


Figura 8. Efeito de estabilizantes sobre a atividade das proteases de levedura (*S. cerevisiae*), incubadas em caseína a 1%, 37°C durante 30 minutos. Os estabilizantes utilizados foram: 1) leite desnatado e sorbitol; 2) SPGA; e 3) H.

Resultados e Discussão

4. 2. 5. Processo otimizado de obtenção das proteases

Os resultados obtidos permitiram definir as etapas e condições apresentadas na Figura 9, para obtenção de proteases, a partir de suspensão de *S. cerevisiae* proveniente de fermentação industrial da produção de cerveja.

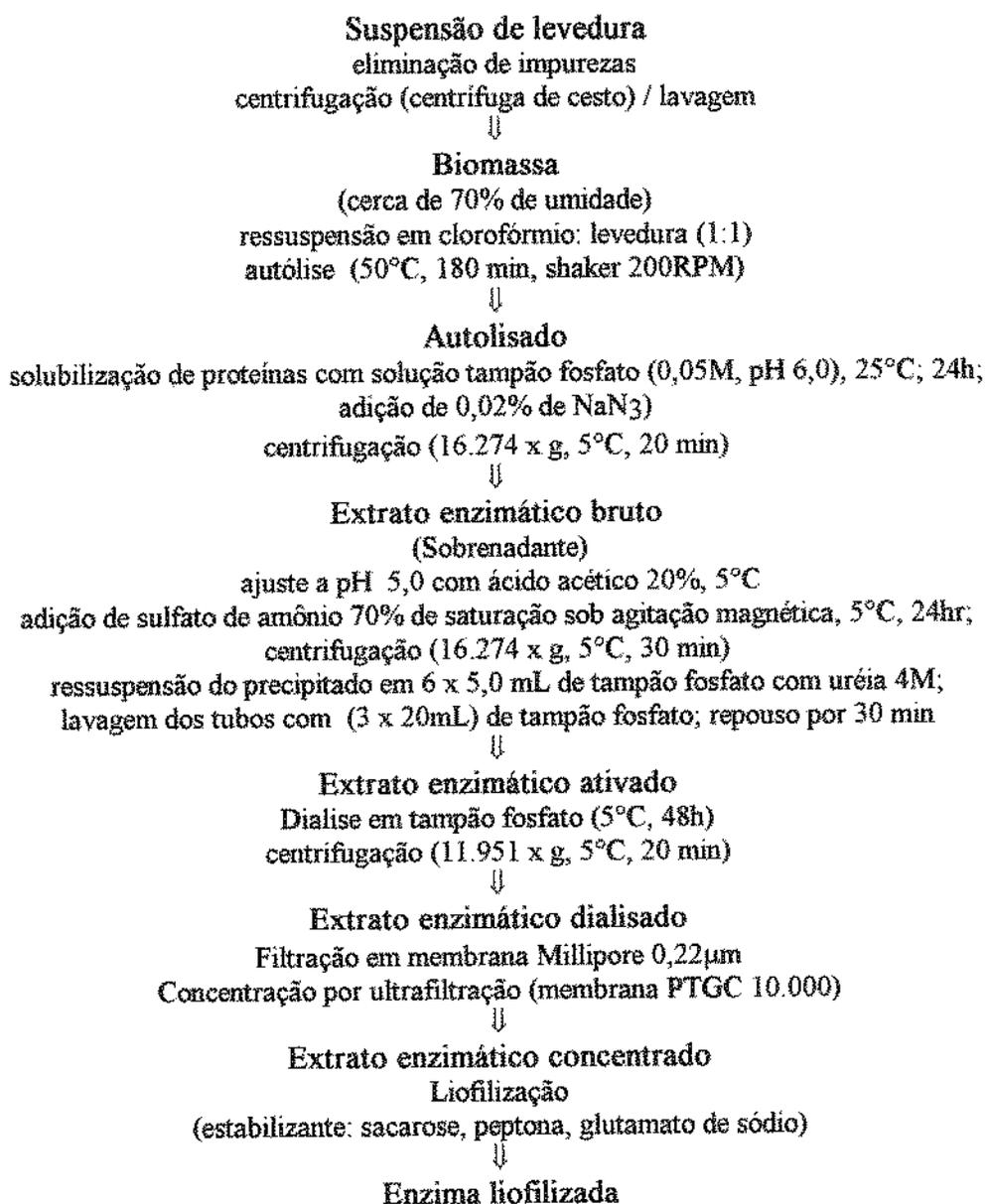


Figura 9. Etapas e condições desenvolvidas ou selecionadas para obtenção de proteases a partir de suspensão de *S. cerevisiae* proveniente de fermentação industrial da produção de cerveja.

4. 3. Caracterização das proteases

4. 3. 1. Atividade das proteases em função da temperatura

O efeito da temperatura sobre a atividade das proteases obtidas foi determinado com temperaturas variando de 25°C a 90°C, em intervalos de 5 ou 10°C, em períodos de 5 a 120 minutos de incubação.

Na amplitude de temperatura e tempo de incubação estudados, a atividade das proteases variou entre 0,056 a 1,414 unidades/ mL (Tabela 10).

Através dos dados da Tabela 10 e Figura 10 podemos observar que sob temperaturas de até 30°C as enzimas apresentaram baixa atividade em todos os períodos testados. Em temperaturas entre 35 e 60°C a atividade enzimática apresentou valores mais elevados, principalmente entre 40 e 120 minutos de incubação, entre 1,207 e 1,414 unidades/ mL. A maior atividade enzimática ocorreu à temperatura de 55°C por um período de 60 a 70 minutos de incubação. Quanto a inativação das proteases, esta ocorreu quando as enzimas foram incubadas a temperatura de 70°C por um período de 10 minutos.

WOODS e KINSELLA (1980b) mediram a atividade das proteases de levedura em temperaturas entre 25°C e 70°C, por um período de 40 a 80 minutos, e observaram que a temperatura de atividade máxima da enzima foi de 45°C para um período de 80 minutos, e 52°C para um período de 40 minutos. Acima de tais temperaturas, as proteases sofrem redução da atividade. Os pesquisadores constataram ainda que a temperatura ótima para a estabilidade e atividade da enzima ficou em torno de 37°C, e a sua completa inativação ocorreu quando esta foi incubada por um período de 5 minutos a temperatura de 70°C.

MADDOX e HOUGH (1970) notaram que para *S. carlsbergensis* a temperatura de atividade máxima das proteases neutras B e carboxipeptidase Y, foi de 48°C, quando incubadas por um período de 60 minutos. A atividade diminuiu sensivelmente quando as enzimas foram mantidas a 50°C durante o mesmo período.

JUNI & HEYM (1968) descreveram que a inativação total da protease B de *S. cerevisiae* ocorreu a 60°C em 30 minutos. Os autores concluíram que para se obter uma ótima atividade da protease, os extratos de levedura devem ser incubados a uma temperatura

Resultados e Discussão

de 37°C por um período de 30 a 80 minutos. Para inativação desta enzima, a incubação deve ser conduzida a 70°C durante 10 minutos.

Podemos observar que em relação à temperatura de atividade máxima dessas enzimas, os resultados obtidos neste trabalho estão próximos aos encontrados por outros autores, porém em relação à temperatura de inativação das enzimas os dados não são coincidentes. Vários autores observaram que as enzimas proteolíticas de levedura são inativadas à temperatura de 70°C em curto período de tempo. A inativação das enzimas obtidas neste trabalho ocorreu a 70°C após um período de 50 minutos, mas apresentaram uma queda acentuada na sua atividade a partir de 60°C após 80 minutos. Essa diferença encontrada para a temperatura de inativação das enzimas, em relação a trabalhos anteriores, pode ser devido a temperatura empregada para autólise, ou seja, 50°C. Na maioria dos trabalhos os autores autolizaram as células de levedura à 30°C.

Os resultados mostraram que as enzimas proteolíticas obtidas apresentam melhor estabilidade em temperaturas de 45 a 50°C, mantendo sua atividade até o final do ensaio, ou seja, por 2 horas.

Resultados e Discussão

Tabela 10 - Efeito da temperatura e tempo de incubação sobre a atividade das enzimas proteolíticas de *S. cerevisiae*. Substrato: caseína a 1%; valores expressos em U/mL.

Tempo (min)	Temperatura °C										
	25	30	35	40	45	50	55	60	70	80	90
5	E 0,056 a	E 0,104 e	CD 0,793 c	D 0,661 f	B 0,963 c	BC 0,961 d	A 1,144 cd	A 1,161 a	AB 1,021 a	E 0,171 ab	E 0,095 a
10	E 0,070 a	DE 0,108 e	BC 0,915 c	C 0,802 ef	A 1,116 bc	A 1,089 cd	A 1,163 bcd	A 1,224 a	AB 1,074 a	D 0,223 a	DE 0,093 a
20	D 0,088 a	D 0,160 de	AB 1,096 b	BC 0,941 de	A 1,220 ab	A 1,184 bc	A 1,250 abc	A 1,217 a	A 1,111 a	D 0,193 ab	D 0,117 a
30	D 0,133 a	D 0,184 cde	AB 1,167 ab	B 1,022 cd	A 1,255 ab	A 1,245 abc	A 1,252 abc	A 1,291 a	AB 1,128 a	D 0,200 ab	D 0,088 a
40	EF 0,151 a	E 0,211 bcde	ABC 1,187 ab	C 1,104 bcd	A 1,302 a	D 1,244 abc	AB 1,294 abc	AB 1,283 a	BC 1,126 a	EF 0,169 ab	F 0,102 a
50	DE 0,177 a	D 0,268 abcde	AB 1,211 ab	B 1,140 abc	A 1,339 a	AB 1,244 abc	AB 1,288 abc	AB 1,290 a	B 1,150 a	DE 0,183 ab	E 0,036 a
60	EF 0,191 a	E 0,292 abcd	AB 1,234 ab	BC 1,266 abc	A 1,334 a	AB 1,258 abc	A 1,404 a	AB 1,279 a	BC 1,116 a	EF 0,164 ab	F 0,045 a
70	EF 0,207 a	E 0,291 abcd	ABC 1,258 ab	BC 1,173 abc	AB 1,324 a	ABC 1,295 ab	A 1,414 a	ABC 1,253 a	C 1,136 a	EF 0,181 ab	F 0,054 a
80	DE 0,200 a	D 0,327 abcd	A 1,309 a	AB 1,205 ab	AB 1,274 ab	AB 1,299 ab	AB 1,300 abc	A 1,318 a	B 1,136 a	DE 0,160 ab	E 0,066 a
90	DE 0,198 a	D 0,353 abc	AB 1,283 a	AB 1,208 ab	A 1,323 a	A 1,354 ab	A 1,311 abc	AB 1,207 a	B 1,128 a	E 0,181 ab	E 0,049 a
100	E 0,127 a	D 0,365 ab	A 1,323 a	AB 1,227 ab	A 1,351 a	A 1,360 a	A 1,305 abc	AB 1,221 a	B 1,129 a	E 0,166 ab	E 0,059 a
110	E 0,138 Aa	D 0,406 a	AB 1,222 ab	AB 1,287 a	A 1,322 a	A 1,385 a	A 1,320 ab	AB 1,230 a	B 1,138 a	E 0,176 ab	E 0,090 a
120	E 0,171 a	D 0,386 a	AB 1,268 ab	AB 1,267 ab	A 1,349 a	A 1,364 a	A 1,303 abc	AB 1,252 a	B 1,101 a	E 0,205 ab	E 0,092 a

Letras maiúsculas: análise na horizontal, letras minúsculas, análise na vertical, ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Médias de 3 repetições

Resultados e Discussão

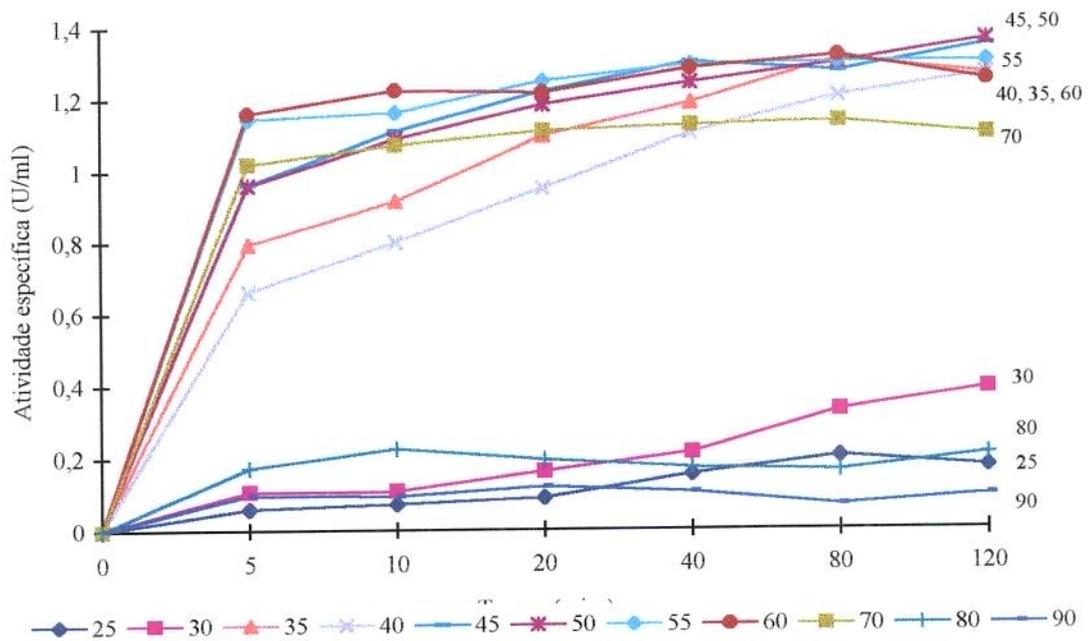


Figura 10 Efeito da temperatura na atividade das enzimas proteolíticas de levedura na hidrólise da caseína sob diferentes temperaturas e períodos de tempo.

4. 3. 2. Atividade das proteases em função do pH

Uma vez que a caseína é insolúvel em pH ácido (inferior a 5), os ensaios foram conduzidos em pH acima desses valores, visando a determinação do pH ótimo de atividade das enzimas proteolíticas de *S. carlsbergensis*.

Através dos resultados apresentados na Tabela 11 e Figura 11, podemos notar que a atividade máxima das proteases é desenvolvida em pH 6,0; em valores abaixo e acima desse pH ocorre um decréscimo acentuado da atividade das enzimas.

WOODS e KINSELLA (1980b) observaram em seu estudo dois picos de atividade, um a pH 3,0 e outro a pH 6,0 e 8,0, demonstrando assim a presença de duas enzimas proteolíticas em *S. carlsbergensis*. Utilizando hemoglobina como substrato, a atividade a pH 3,0 não foi alterada, enquanto que a pH 6,0 e 8,0 a atividade enzimática aumentou cerca de 7,5 vezes. Estes mesmos pesquisadores testaram a estabilidade das enzimas proteolíticas em colunas de hidroxiapatita em diferentes faixas de pH, por um período de 30 minutos, a 25°C. Em testes de atividade residual, foi observado que a melhor estabilidade ocorreu a pH 6,0.

Em estudos sobre a estabilidade de enzimas proteolíticas de *S. cerevisiae*, conduzidos por LENNEY (1956) e HATA et al. (1967a), a estabilidade máxima dessas enzimas ocorreu dentro da faixa de 5,0 a 6,0.

FELIX e BOUILLET (1966) utilizando peptídeos sintéticos como substrato, isolaram duas enzimas proteolíticas de *S. carlsbergensis*, que apresentaram atividade ótima a pH 6,0.

MADDOX e HOUGH (1970) trabalhando com autolisados de *S. carlsbergensis*, encontraram três pontos ótimos de pH para as enzimas proteolíticas: 2,9, 6,3 - 6,6 e 8,2. As enzimas com pH ótimo a 8,2 apresentaram-se muito instáveis. Este trabalho confirmou a presença de três proteases em *S. cerevisiae*, encontradas por LENNEY e DALBEC (1967). Estes autores também testaram a estabilidade das proteases e concluíram que estas apresentam estabilidade máxima na faixa de pH 6,0 a 6,5.

Resultados e Discussão

Tabela 11 Efeito da variação do pH na atividade das proteases de levedura, incubadas em caseína 1%, 37°C, durante 30 minutos.

pH	atividade enzimática (%)
5,0	45
5,5	76
6,0	100
6,5	74
7,0	54
7,5	32
8,0	12

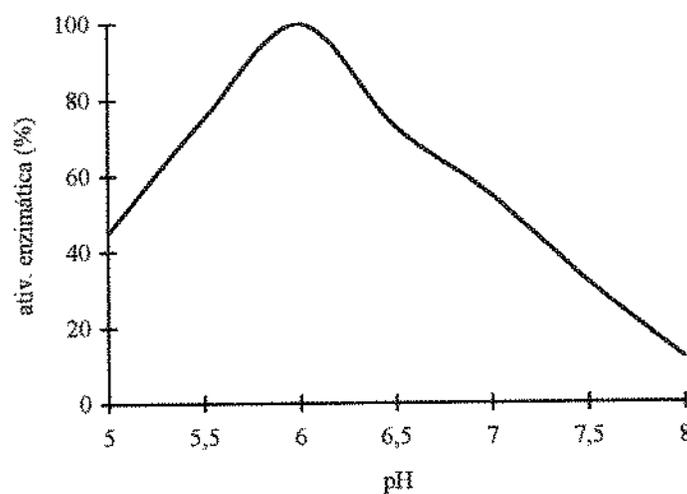


Figura 11. Efeito de diferentes valores de pH na atividade das enzimas proteolíticas de *S. cerevisiae* incubadas em caseína a 1% a 37°C por um período de incubação de 30 minutos.

4. 4. Avaliação do efeito de proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada) na massa através do extensógrafo.

O efeito da adição das proteases na massa foi analisado através dos parâmetros extensográficos (extensibilidade, resistência à extensão e resistência máxima), conforme apresentados nas Tabelas 12, 13, 14 e 15. No anexo II são apresentados outras características extensográficas como número proporcional e área, assim como as dosagens utilizadas de cada protease, levedura (extrato líquido e liofilizado), bacteriana e fúngica, e os valores equivalentes de protease bacteriana em mg/Kg, tomada como referência. A adição de proteases de levedura à massa contribuiu para um pequeno aumento nos valores de extensibilidade, como ocorreu no caso das proteases fúngica e bacteriana. Porém, concentrações mais elevadas de proteases de levedura foram necessárias para produzir efeitos similares aos observados com as proteases comerciais bacteriana e fúngica (Figura 12). Os resultados da Tabela 13 mostram que a maior extensibilidade alcançada com proteases de levedura liofilizada foi de 99 mm, quando empregou-se 0,8mg/Kg de massa. Por outro lado, a máxima extensibilidade obtida com protease bacteriana foi de 84 mm, sendo necessário empregar 0,25 mg/Kg, Figura 13. De uma maneira geral, teores crescentes de proteases, independente de sua fonte, provocaram uma maior diminuição de resistência à extensão e resistência máxima, o que concorda com os resultados citados por HASEBORG, 1991.

Comforme apresentado nas Figuras 14 e 15, a adição de teores crescentes de proteases de levedura líquida causaram uma pequena redução nos valores de resistência à extensão e resistência máxima das massas, o que não se verificou com o uso de dosagens crescentes de protease bacteriana, que provocaram uma redução drástica desses parâmetros extensográficos das massas. Esses resultados mostram que existe uma maior flexibilidade de utilização das enzimas de levedura em relação a bacteriana, o que é vantajoso uma vez que diminui consideravelmente o risco de superdosagem.

Os aumentos de extensibilidade e diminuição da elasticidade se justificam pela ação das proteases na rede do glúten, o que é desejável na produção de biscoitos e 'crackers', onde se deseja uma massa mole e extensível para evitar a deformação dos biscoitos e controlar a textura, volume e cor do produto final. (BARRET, 1975; MONIER & GORDON, 1975; LYONS, 1982; HASEBORG, 1991).

Resultados e Discussão

Tabela 12. Efeito do extrato líquido de proteases de levedura nas propriedades extensográficas da massa.

Parâmetros extensográficos	mL/Kg de massa					
	0,0	1,0	3,0	4,0	8,0	11,0
Extensibilidade (mm)	78	81	84	81	88	85
Resist. à extensão (UE)	260	220	240	210	200	210
Resist. máxima (UE)	260	220	240	210	200	210

mg equivalente enzima bacteriana: 1,0 = 0,016; 3,0 = 0,048; 4,0 = 0,064; 8,0 = 0,128; 11,0 = 0,176

UE : unidades extensográficas.

Tabela 13. Efeito das proteases de levedura liofilizada nas propriedades extensográficas da massa.

Parâmetros extensográficos	mg/Kg de massa					
	0,0	0,1	0,3	0,4	0,8	1,10
Extensibilidade (mm)	80	69	83	75	99	89
Resist. à extensão (UE)	250	200	180	180	140	130
Resist. máxima (UE)	250	200	180	180	140	130

mg equivalente enzima bacteriana: 0,1 = 0,04; 0,3 = 0,12; 0,4 = 0,16; 0,8 = 0,32; 1,10 = 0,43

UE : unidades extensográficas.

Tabela 14. Efeito de protease bacteriana comercial nas propriedades extensográficas da massa.

Parâmetros extensográficos	mg/Kg de massa				
	0.0	0.06	0.12	0.25	0.50
Extensibilidade (mm)	77	77	84	84	76
Resist. à extensão (UE)	300	260	235	220	130
Resist. máxima (UE)	310	270	235	225	140

UE : unidades extensográficas.

Tabela 15. Efeito de protease fúngica comercial nas propriedades extensográficas da massa.

Parâmetros extensográficos	mg/Kg de massa			
	0.0	0.25	0.50	1.0
Extensibilidade (mm)	69	64	72	65
Resist. à extensão (UE)	245	240	225	190
Resist. máxima (UE)	280	265	230	210

mg equivalente enzima bacteriana: 0,25 = 0,05; 0,50 = 0,10; 1,00 = 0,20

UE : unidades extensográficas.

Resultados e Discussão

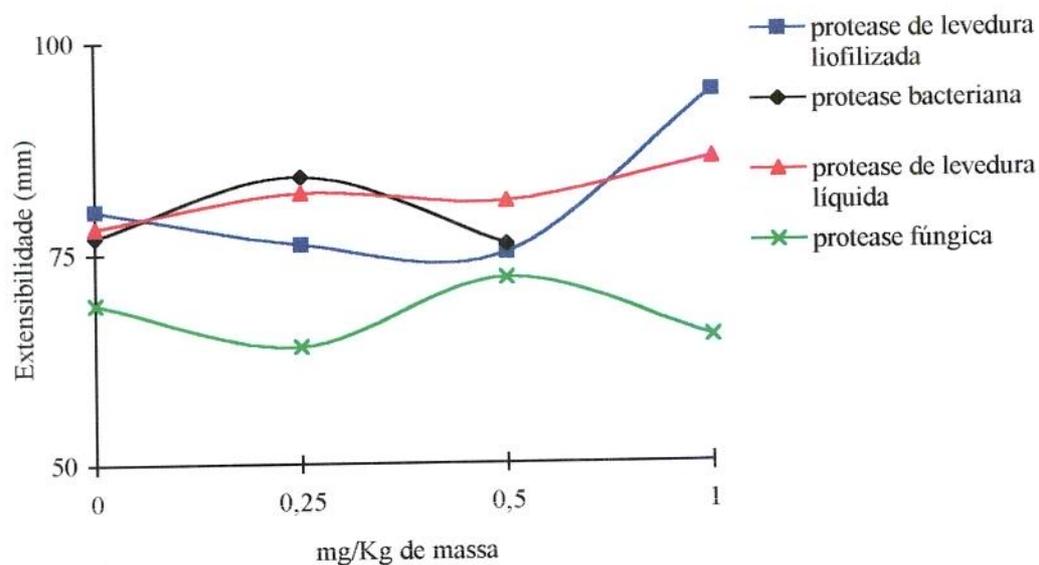
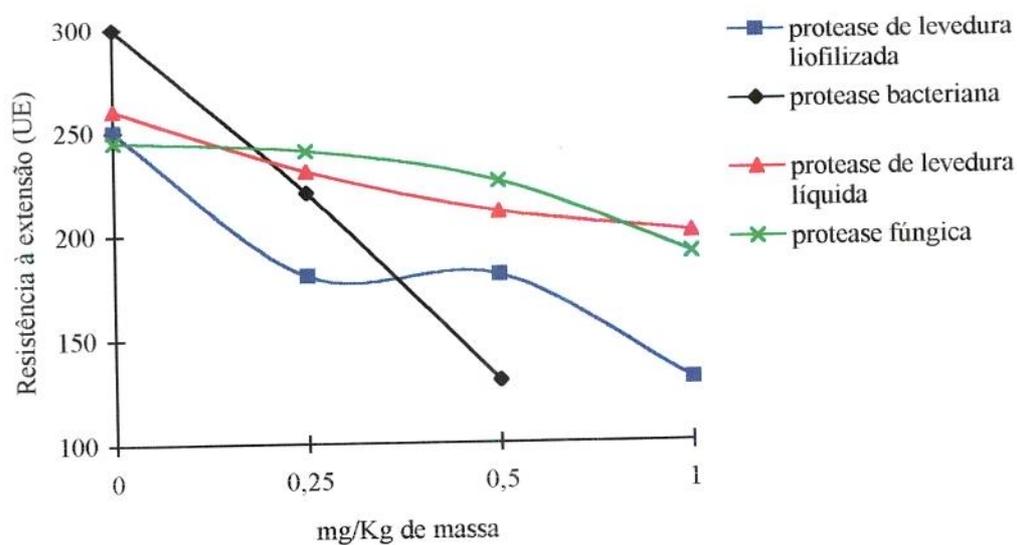


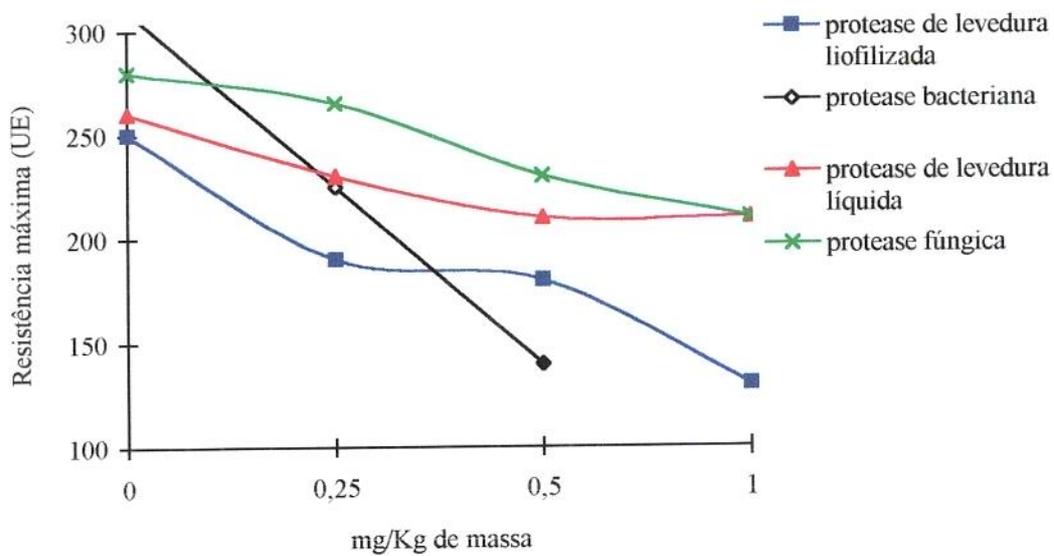
Figura 12. Efeito das enzimas proteolíticas de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), proteases bacteriana e fúngica, na extensibilidade da massa.



UE = unidade extensográficas

Figura 13 - Efeito das enzimas proteolíticas de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), proteases bacteriana e fúngica, na resistência à extensão da massa.

Resultados e Discussão



UE = unidades extensográficas

Figura 14. Efeito das enzimas proteolíticas de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), proteases bacteriana e fúngica, na resistência máxima da massa.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

1. Foi desenvolvido um procedimento para extração e purificação que permitiu a obtenção de proteases de *Saccharomyces cerevisiae* procedente de biomassa residual de indústria cervejeira. A autólise conduzida a uma temperatura mais elevada, de 50°C; proporcionou melhor rendimento sem a perda da atividade enzimática durante o processo.
2. A liofilização do extrato líquido de levedura mostrou ser uma etapa importante, devido a sensibilidade dessas enzimas às condições empregadas. Estabilizante à base de sacarose, peptona e glutamato de sódio foi o mais eficiente na preservação da atividade enzimática, dentre os estabilizantes testados.
3. As proteases obtidas mostraram uma atividade enzimática máxima entre 45 - 55°C a partir de 40 minutos, estendendo-se até o limite adotado de 120 minutos, em pH 6,0. Dentro de uma faixa de 35 a 60°C a atividade manteve-se em 80% da atividade máxima, num período de 20 a 120 minutos.
4. A adição de proteases de levedura líquida e liofilizada obtidas neste trabalho a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, modificaram os parâmetros extensográficos da massa mostrando atuação dessas enzimas nas proteínas do glúten.
5. Um estudo mais detalhado do efeito das proteases de levedura na hidrólise do glúten deve ser efetuado para determinação de quais proteases da levedura são responsáveis pela modificações reológicas na massa.
6. Estudos utilizando as proteases de levedura em produtos acabados tendo como matéria-prima (farinha de trigo) devem ser efetuados para avaliação do seu efeito nas características de textura, cor e sabor desses produtos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AACC AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 7 ed, St. Paul, 1969, v. 1-2.
2. ACHESTTER, T.; EHMANN, C.; WOLF, D. H. - Proteinase yscD. Purification and characterization of a new yeast peptidase. *J. Biol. Chem.* 260: 4585-4590, 1985.
3. ACHESTTER, T.; EHMANN, C.; WOLF, D. H. - Aminopeptidase-Co, A new yeast peptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109: 341, 1982.
4. ACHESTTER, T.; EHMANN, C.; WOLF, D. H. - New proteolytic enzymes in the yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 207: 445, 1981.
5. ACHESTTER, T.; EHMANN, C.; WOLF, D. H. - Proteolysis in eucariotic cells: Proteinase Ysc, A new peptidase. *J. Biol. Chem.* 259: 13344, 1984.
6. ACHESTTER, T.; EHMANN, C.; WOLF, D. H. - Proteolysis in eucariotic cells: Aminopeptidase and dipeptidyl-aminopeptidase of yeast revisited. *Arch. Biochem. Biophys.* 226: 292, 1983.
7. ARNOLD, W. N. - Autolysis in Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure, vol 2, Arnold, W. N., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fl, 65, 1981.
8. BABAJAN, T., BEZRRUKOV, M., and KALUMYANE, K. - Metabolites - inductors of the autolysis of yeast *S. cerevisiae* (in Russian), *Acta Biotechnol.* 5: 279, 1985.
9. BACON, J. S. D. - Nature and disposition of polysaccharides within the envelope, In: Autolysis in Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure, vol. 1, Arnold, W. N., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fl, 65, 1981.

Referências Bibliográficas

10. BARNETT, J. A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Res: a short review for non-taxonomists. *Yeast*, Chichester, v.8, n.1, p.1-23, 1992.
11. BARRET, F. F. - Enzymes uses in the milling and baking industries. In: Reed, G., Ed., *Enzymes in food processing*, 2nd, Ed., Academic Press., NW., cap 11, pp.301-330., 1975.
12. BARTH, R., WOLF, D. H. and HOLZER, H. -Studies on the carboxipeptidase Y. Inhibitor complex of yeast. *Biochimica and Biophysica Acta* 527: 63-69, 1978.
13. BELOUS, A. M. - Molecular and intracellular mechanisms of membrane cryodamage. In: *Autolysis in Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure*, vol. 1, Arnold, W. N., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fl, 65, 1981.
14. BETZ, H.; HINZE, H. and HOLZER, H. -Isolation and properties of two inhibitors of proteinase B from yeast. *Journal of Biological Chemistry* 249(14): 4515-4521, 1974.
15. BLACK, S. and WRIGHT, N. G. - β -aspartokinase and β -aspartyl phosphate. *J. Biol. Chem.* 213: 27, 1955.
16. BOBBIO, P. A. & BOBBIO, F. O. - Química do processamento de alimentos. Campinas, Fundação Cargill, cap. 7, p. 161-175, 1984.
17. BRADFORD, M.M. - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248-254, 1976.
18. BRUNO, M. C. E. -Utilização dre proteases de origem bacteriana e fúngica na produção de biscoitos semi-doces duros. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tcnologia de Alimentos, FEA / UNICAMP, 1986.
19. BÜNNING, P. and HOLZER, H. -Natural occurence and chemical modification of proteinase B inhibitors from yeast. *Journal of Biological Chemistry* 252 (15): 5316-5323, 1977.

Referências Bibliográficas

20. BÜNNING, P. In: "Control of Metabolism in yeast and other lower eukaryotes through action of proteinase" WOLF, D. H. Ed., *Advances in Microbial Physiology* 21: 267-338, 1980.
21. CABIB, E. & ULANE, R. - Chitin syntetase activating factor from yeast, a protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50: 186-191, 1973b.
22. CABIB, E. & ULANE, R. -Yeast chitin syntetase: Separation of the zymogen from its activating factor and recovery of the latter in the vacuole fraction. *J. Biol. Chem.* 248: 1451-1458, 1973a.
23. CABIB, E. and FARKAS, V. -The control of morphogenesis: An enzymatic mechanism for the initiation of septum formation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (9): 2052-2056, 1971.
24. CASTRO, I. N. & HOLZER, H. - Studies on the proteinase A inhibitor Ia³ from yeast. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357: 727-734, 1976.
25. CHARPENTIER, C., NGUYEN, V. L., BENALY, R., and FEULLAT, M. - Alteration of cell wall structure in *S. cerevisiae* and *S. bayanus* autolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 405, 1986.
26. COLE, M. S. - An overview of modern dough conditioners. *Bak. Dig.* 47 (6): 21-23, 1973.
27. DARBYSHIRE, J. - In: *Topics in enzymes and fermentation biotechnology*. 5 Ed., (Wiseman, A.), pp.147-183, 1981.
28. DUCROO, P. - Étude de l'action des protéases sur la farine de blé au moyen du farinographe Brabender. *Ann. Technol. Agric.* 23 (2): 249-256, 1974.
29. EDDY, A. A. - Aspects of the chemical composition of yeast. in: "The Chemistry and Biology of yeasts, (A. Cook,ed.) Academic Press, New York., 1958.

Referências Bibliográficas

30. EL-DASH, A. A. and JONHSON, J. A. - Protease enzymes: effect on bread flavor. *Cereal Sci. today*, 12: 282-288, 1967.
31. EMPER, O., and WOLF, D. - Vacuole are not the sole compartments of proteolytic enzymes in yeast. *FEBS Letters*. 166: 321, 1984.
32. FELIX, F. & BROUILLET, N. Purification et propriétés de deux peptidases de levure de brasserie. *Biochim. Biophys. Acta* 122: 127-144, 1966.
33. FOX, P. F. & MULVIHILL, D. M. - Enzymes in wheat, flour and bread. In: POMERANZ, Y. *Advances in Cereal Science and Technology*. ed., St. Paul, Minnesota. AACC, 1982, v. 5, cap. 3, p. 107,156.
34. FREY, J. and RÖHN, K. H. -Subcellular localization and levels of aminopeptidase and dipeptidase in *S. cerevisiae*. *Biochimica and Biophysica Acta* 527: 31-41, 1978.
35. FUKAL, B.; KAS, J.; RAUCH, P. - Properties of yeast proteinase. *J. Int. Brew.* 92:357-359, 1986.
36. GAMS, T. C. - Der einsatz von mikrobiellen enzymen in der bäckerei. *Greited, Mehl. und Brot.* 30 (5): 113-116, 1976.
37. GUÉRIVIÈRE, J. F. de la & BUSSIRÉ, G. - Utilisation des protéases dans les industries de cusson de cereales. *Ann. Technol. Agric.* 23 (2): 257-268, 1974.
38. HALÁSZ, A. and LÁSZTITY, R. - Use of yeast biomass in food production. Ed., CRC Press., NW., Boca Raton, 1991.
39. HALAZS, A. - Biochemical and biotechnological principles of use of yeast biomass in food industry. Dr. thesis, Budapest, 1988.

Referências Bibliográficas

40. HASEBORG, E. - Enzymes in flour and baking applications, especially waffle batters. *Process Biochem.* 16 (5): 16-19, 1981.
41. HASILIK, A. & HOLZER, H. - Participation of the tryptophan synthase inactivating from yeast in the activation of chitin synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53: 552-559, 1973a.
42. HASILIK, A. & HOLZER, H.- Compartmentation of the tryptophan-synthetase inactivating systems in *S. cerevisiae*. *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354: 1198, 1973b.
43. HASILIK, A. & TANNER, W.-Biosynthesis of the vacuolar yeast glycoprotein carboxipeptidase Y. Conversion of precursor into enzyme. *Eur. J. Biochem.* 91: 567-575, 1978.
44. HASILIK, A.; MULLER, H.; HOLZER, H.- Compartmentation of the tryptophan-synthetase-proteolysing system in *S. cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 48: 111-117, 1974.
45. HATA, T.; HAYASHI, R.; DOI, E. - Purification of yeast proteinases. Part I. Fractionation and some properties of the proteinases. *Agr. Biol. Chem.* 3: 150- 159, 1967a.
46. HATA, T.; HAYASHI, R.; DOI, E.- Purification of yeast proteinases. Part III. Isolation and physicochemical properties of yeast proteinase A and C. *Agr. Biol. Chem.* 31: 357-367, 1967b.
47. HAYASHI, R.; AIBARA, S.; and HATA, T. -A unique carboxipeptidase activating of yeast proteinase C. Short communication *Biochimica et Biophysica Acta* 212: 359-361, 1970.
48. HAYASHI, R.; BAI, Y. and HATA, T. -Evidence for an essential histidine in carboxipeptidase Y. *Journal of Biological Chemistry* 250(13): 5221-5226, 1975b.
49. HAYASHI, R.; BAI, Y.; HATA, T.- Further conformation of carboxipeptidase Y as a metal -free enzyme having a reactive serine residue. *J. Biochem.* 77: 1313-1318, 1975a.

Referências Bibliográficas

50. HAYASHI, R.; MOORE, S. and STEIN, W. H. - Carboxypeptidases from yeast. *J. Biol. Chem.* 248: 2296-2302, 1973.
51. HAYASHI, R.; OKA, Y.; DOI, E.; HATA, T. - Activation of intracellular proteinases of yeast. *Agric. Biol. Chem.* 32: 359-373, 1968.
52. HEDENSKOG, G.; MOGREN, H.; ENEBO, L. - A method for obtaining protein concentrates from microorganismos. *Biotechnol. Bioeng.* 12: 974-959, 1970.
53. HOLZER, H. - Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Science.* 1: 178-181, 1976.
54. HOLZER, H., - Possible mechanism for a selective control of proteinase action. *Adv. Enzymol. Regul.* 12: 1, 1974.
55. HOLZER, H.; KATSUNUMA, T.; SCHOTT, E. G.; FERGUSON, A. R.; HASILIK, A.; BETS, H.- Studies on a tryptophan syntetase inactivating system from yeast. *Adv. Enzyme Regul.* 11: 53-60, 1973.
56. JOHNSON, J. A. & MILLER, B. S. - The relationship between dough consistency and proteolytic activity. *Cereal Chem.* 30(6): 471-479, 1953.
57. JOHNSON, J. A. and MILLER, B. S. - Studies on the role of alpha-amylase and proteinase in breadmaking. *Cereal Chem.* 26: 371-383, 1949.
58. JOHNSON, J. C. - Yeast for food and other purposes, Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ, 1977.
59. JUNI, E. & HEYM, G. A. - Properties of yeast pyruvate decarboxylase and their modification by proteolytic enzymes. II. Selective alteration by yeast protease. *Arch. Biochem. Biophys.* 127: 89-100, 1968.

Referências Bibliográficas

60. JUSIC, M.; HINZE, H. and HOLZER, H. - Inactivation of yeast enzymes by proteinase A and B and carboxypeptidase Y from yeast. *Hoope -Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357: 735-740, 1976.
61. KANG, K.S. and COTTRELL, I.W. - Polysaccharides, in: *Microbiol Technology*, 2nd ed., vol. I, PEPLER, H.J. and PERLMAN, D. Eds., Academic Press., New York, 1979, 417.
62. KASSIM, M. M. and HALAZS, A. - The effect of date syrup concentration on growth rate, protein, RNA content and protease activity of *S. cerevisiae*, *C. guilliermondii* and *R. glutinis*. *Acta Aliment.* 18: 177, 1989.
63. KATSUNUMA, T.; SCHÖTT, E.; ELSÄSSER, S. and HOLZER, H. - Purification and properties of tryptophan-synthetase inactivating enzymes from yeast. *European Journal of Biochemistry* 27(3): 520-526, 1972.
64. KÉRY, V.; KOGAN, G.; ZAJACOVÁ, K.; MASLER, L. ALFÖLDI, J. - hydrolysis of yeast cell-wall glucan by extracellular (1-3)- β -glucanase from *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 13: 87-90, 1991.
65. KINSELLA, J. E. & SHETTY, K. J. - Yeast proteins: Recovery, nutritional and functional properties. in: "Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins", (M. Friedman, ed.) pp. 797-825, Plenum Press, New York., 1978.
66. KUHN, R. W.; WALSH, K. A. and NEURATH, H. - Isolation and partial characterization of an acid carboxipeptidase from yeast. *Biochemistry*, 13(19): 3871-3877, 1974.
67. KUMINITSU, D.K. and YASUNOBU, K.J. - Chymopapain B, in: *methods in enzymology*, vol. 19, 244-252, 1970.
68. LANDIS, Q. - An index of proteolytic activity by the use of the farinograph. *Cereal Chemistry* 12 25-33, 1935.

Referências Bibliográficas

69. LASKOWSKI, Jr. M. & SEALOCK, R. W. - Protein-proteinase inhibitors-molecular aspects, pp. 391. in P. D. Boyer (ed), The enzymes, vol. 3 3rd ed. Academic Press Inc., New York, 1971.
70. LENNEY, J. F. & DALBEC, J. M. - Purification and properties of two proteinases from *S. cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 120: 42-48, 1967.
71. LENNEY, J. F. & DALBEC, J. M. - Yeast proteinase B: Identification of the inactive form as enzyme-inhibitor complex. Arch. Biochem. Biophys. 129: 407-409, 1969.
72. LENNEY, J.F. - Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B and C. J. Bacteriol. 122: 1265-1273, 1975.
73. LENNEY, J. F.; MATILE, P. H.; WIEMKEN, A.; SCHELLENBERG, M.; MEYER, J. Activities and cellular localization of yeast proteases and their inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 1378-1383, 1974.
74. LENNEY, J.F. - A study of two yeast proteinase. J. Biol. Chem. 221: 919-930, 1956.
75. LINDBLOM, M. - Properties of intracellular ribonuclease utilized for RNA reduction in disintegrated cells of *S. cerevisiae*. Biotech. Bioeng. 19: 199 - 210, 1977.
76. LOFFLER, A. - Proteolytic enzymes: Sources and application. Food Technol. 40(1): 63-70, 1986.
77. LOOZE, Y.; GILLET, L.; DECOMINCK, M.; COUTEUAUX, B.; POLASTRO, E.; LEOMIS, L. - Protease B from *S. cerevisiae*. Purification and characterization. Int. J. Pept. Protein Res. 13: 253-259, 1979.
78. LYONS, T. P. - Proteinase enzymes relevant to the baking industry. Biochem. Soc. Trans. 10 (4): 287-290, 1982.

Referências Bibliográficas

79. MADDOX, I. S. & HOUGH, J. S. - Proteolytic enzymes of *S. carlsbergensis*. *Biochem. J.* 117: 843-852.1970.
80. MAIER, K., MULLER, H. R., TESCH, R., TROLP, R. WITT, J. and HOLZER, H. - Primary structure of yeast proteinase B inhibitor 2. *J. Biol. Chem.* 254: 12555-12561, 1979.
81. MANGINI, G.; DREWNIK, M.; SANTARELLI, J. and HUANG, L. - Reexamination of the activation of yeast proteinase inhibitors. *Biochem. Int.* 12: 557, 1986.
82. MARFFY, F. & KULA, M. G. - Enzymes yields from cell of Brewer's yeast disrupted by treatment in a horizontal disintegrator. *Biochem. Bioeng.* 16: 623-634, 1974.
83. MASUDA, T.; HAYASHI, R. and HATA, T. -Aminopeptidase in the acidic fraction of the yeast autolysate. *Agricultural and Biological Chemistry* 39(2): 499-505, 1975.
84. MATELES, R. I. and TANNEMBAUM, S. R. - Single-cell protein. MIT Press., Cambridge, MA., 1968.
85. MATERN, H.; HOFFMANN, M.; HOLZER, H. - Isolation and characterization of the carboxipeptidase Y inhibitor from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 4874- 4878, 1974.
86. MATILE, P.; WIENKEN, A.; GUYER, W. - A lysosomal aminopeptidases isozymes in differentiating yeast cells and protoplasts. *Planta* 96: 43-53, 1970.
87. MATILE, Ph. & WIENKEN, A. - The vacuole as the lysosome of the cell. *Arch. Microbiol.* 56: 148-155.1967.
88. MECHLER, B.; MÜLLER, M.; MEUSSDOEFFER, F.; WOLF, D. - In vivo biosynthesis of the vacuolar proteinase A and B in yeast *S. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 257:11203-11206.1982.

Referências Bibliográficas

89. METZ, G. and RÖHN, K. H. -Yeast aminopeptidase I. Chemical composition and catalytic properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 429: 933-949, 1976.
90. MOLANO, J. and GRANCEDO, C. -Specific inactivation of fructose 1,6 biphosphatase from *S. cerevisiae* by yeast protease. *European Journal of Biochemistry* 44(1): 213-217, 1974.
91. MONNIER, B. & GORDON, B. - Utilization des protéases dans les industries de cuisson. *Ind. Alim. et Agric.* 92(5): 521-529, 1975.
92. NORTH, M. - Comparative Biochemistry of proteinase of eucariotic microorganism. *Microbiol. Rev.* 45:308, 1982.
93. NOWAK, J. & TSAI, H. - Purification and properties of three endopeptidases from baker's yeast *Can J. Microbiol* 35: 295 - 303, 1989.
94. NOWAK, J. & TSAI, H. - The yeast aminopeptidase Y. *Can. J. Microbiol.* 34: 118 - 124.1988.
95. NOWAK, J. - System proteolityezny drozdzy *S. cerevisiae* aktualny stan wiedzy oraz badania wlasne. *Zesz Nauk. Akad. Roln. Tech. Olsztynie, Roln.* 28: 3 - 92, 1979.
96. OHMIJA, K. & SATO, Y. - Promotion of autolysis in *Lactobaccilli* . *Agric Biol. Chem.* 39: 585, 1975a.
97. OMIJA, K. & SATO, Y. - Promotion of autolysis in *Lactobacilli*. *Agric. Biol. Chem.* 39, 585, 1975b.
98. PETIT, L. & AUDIER, Y. - Action des protéinases das les industries de cuisson. *Ann. Nutr. Alim.* 21(6): 341-360, 1967.
99. POMERANZ, Y.; RUBENTHALER, G. L.; FINNEY, K. F. - Evaluation of the effects of proteolytic enzymes on bread flour properties. *Food Technol.* 20(3): 95-98, 1966.

Referências Bibliográficas

100. PRINGLE, J. R. - Methods for avoiding proteolytic artifacts in studies of enzymes and other proteins from yeast. *Methods in Cell Biology*. 12: 149-184, 1975.
101. PYLER, E. J. - Baking science & technology. 2 ed. Chicago; Siebel Publishing Company; vol 1., cap 4, pp 143-163; cap 6, pp 253-269; cap 7, pp 286-366; vol 2, cap 21, pp 834-897, 1973.
102. REED, G. - Enzyme supplementation in baking. *Baking Dig.* 41(5): 84-123, 1967.
103. RICHARD, H. Enzimologia e biocatalise. In: SCRIBAN, R. *Biocologia*, Cap I, pp179-207, 1985.
104. ROEHM, K. H. - Properties of a highly purified dipeptidase (EC. 3.4.13.?) from Brewer's yeast. *Hoopee Zeylers Z. Physiol. Chem.* 355: 675-686, 1974.
105. SAHEKI, T.; MATSUDA, Y.; HOLZER, H. - Purification and characterization of macromolecular inhibitors of proteinase A from yeast. *J. Biochem.* 47: 325 - 332, 1974.
106. SAHEKI, T. & HOLZER, H. - Comparisons of tryptophan synthase inactivating enzymes with proteinase from yeast. *Eur. J. Biochem.* 42: 621-626, 1974.
107. SAHEKI, T. & HOLZER, H. - Proteolytic actives in yeast. *Biochem. Biophys. acta* 384: 203-214, 1975.
108. SCHÖTT, E. H. and HOLZER, H. - Purification and some properties of tryptophan synthase inactivase II from yeast. *EUR. J. Biochem.* 42: 61-66, 1974.
109. SEDMAK, J.J. and GROSSBERG, S.E. - A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochem.* 79, 544-552, 1977.

Referências Bibliográficas

110. SHELLENBERGER, J. A. - Historical development of the application of fungal and bacterial enzymes to the baking industry. *Cereal Science Today* 16(4): 114-117, 1971.
111. SHETTY, H. & KINSELLA, J. E. - Effect of thiol reagents on extratibility of protein from yeast. *Biotech. Bioeng.* 20: 755-766, 1978.
112. SHETTY, H. & KINSELLA, J. E. - Preparation of yeast protein isolate with low nucleic acid by succinilation. *J. Food. Sci.* 44: 633-638, 1979.
113. SHIIBA, K.; NEGISHI, Y.; OKADA, K. and NAGAO, S. - Chemical changes during sponge-dough fermentation. *Cereal Chem.* 67(4): 350-355, 1990.
114. SPANDE, T. F. & WITKOP, B. - Tryptophan involvement in the function of enzymes and protein hormones as determined by selective oxidation with N- Bromosuccinimide. *Methods in Enzymology.* 11: 506-522, 1967.
115. SPROBLER, B. - Von proteinasen beim zusatz zum Mehl. *Getreid, Mehl, und Brot.* 35 (3): 60-62, 1981.
116. TSAI, H.; TSAI, J. H. J.; YU, P. H. - Effects of yeast proteinase and its inhibitor and on the inactivation of tryptophan syntetase from *S. cerevisiae* and *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 40: 225-232, 1973.
117. UHLIG, H. & SPRÖBLER, B. - Die natürlichen enzyme des getreides und ihrer ergänzung durch mikrobiologische enzympräparate. *Die Mühle und Mischfüttertechnik.* 109 (15): 221-223, 1972.
118. ULANE, R. F. & CABIB, E. - The activating system of chitin synthetase from *S. cerevisiae*. Purification and properties of activating factor. *J. Biol. Chem.* 251: 3367-3374, 1976a.

Referências Bibliográficas

119. ULANE, R. E. and CABIB, E. -The activating system of chitin-synthetase from *S. cerevisiae*. Purification and properties of the activation factor. *Journal of Biological Chemistry* 251(11): 3367-3376, 1976b.
120. VOSTI, D. C. and JOSLYN, M. A. - Autolysis of baker's yeast. *Appl. Microbiol.* 2: 70, 1954a.
121. VOSTI, D. C. and JOSLYN, M. A. - Autolysis of several pure culture yeast. *Appl. Microbiol.* 2: 79, 1954b.
122. WELSCH, M. J. - Lysine agents of microbial origin. *J. Gen. Microbiol.* 18: 491, 1958.
123. WOLF, D. H. & EHMANN, C. - Carboxipeptidase S from yeast: Regulation of its activity during vegetative growth and differentiation. *FEBS Letters.* 91 : 59- 62, 1978.
124. WOLF, D. - Proteinases, proteolysis and regulation in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 13: 279, 1984.
125. WOLF, D. H. - Control of metabolism in yeast and other lower eukariotes through action of proteinase. In: "Advances in microbial physiology" ROSE, A. H. and GARRETH, M. J. Academic Press, vol. 21, pp. 267, 1980.
126. WOLF, D. H. and FINK, G. R. -Proteinase C (carboxipeptidase Y) mutant of yeast. *Journal of Bacteriology* 123(3): 1150-1156, 1975.
127. WOLF, D. H. and WEISER, U. -Studies on a carboxipeptidase Y mutant of yeast and evidence for a second carboxipeptidase activating. *European Journal of Biochemistry* 73(2): 553-556, 1977.
128. WOODS, F. C. & KINSELLA, J. E. - Protease from *S. carlbergensis*. Activity on food proteins. *J. Food Sci.* 45: 1200-1202, 1980a.

Referências Bibliográficas

129. WOODS, F. C.; BRUINSMA, B. L.; KINSELLA, J. E. - Note on the effects of protease from *S. carlsbergensis* on dough strength. *Cereal Chemistry* 57 (4): 290 - 292, 1980.
130. WOODS, F. C. & KINSELLA, J. E. - Isolation and properties of protease from *S. carlsbergensis*. *J. Food Biochem.* 4: 79-98, 1980b.

ANEXO I

Anexo I

Tabela 16. Atividade proteolítica das enzimas de levedura (extrato líquido e liofilizado) e das proteases bacteriana e fúngica.

amostra	proteína mg	Unidades de atividade (U)	u/100mg	mg/1U	equiv. enz. bact.
Extrato dialisado (líquido)	900	0,404	0,045	2.227,0	41,24
enzima	81	0,591	0,73	137	2,54
liofilizada (pó)					
enzima	37	0,683	1,85	54	1,00
bacteriana (pó)					
enzima	75	0,283	0,38	265	4,91
fúngica (pó)					

ANEXO II

Anexo II

Tabela 17. Efeito do extrato líquido de proteases de levedura nas propriedades extensográficas da massa. Parâmetros avaliados: resistência a extensão (RE), resistência máxima (RM), extensibilidade (E), número proporcional (RE/E) e energia (A) das mesmas.

Extrato líquido de protease de levedura			parâmetros Extensográficos				
mL/ kg de massa	mg de enzima	mg equiv. enz. bact.	RE (UE)	RM (UE)	E (mm)	RE/E (UE/cm)	A (dm ²)
0,0	0,0	0,0	260	260	78	3.33	0.25
1,0	0,66	0,016	220	220	81	2.72	0.23
3,0	1,98	0,048	240	240	84	2.85	0.25
4,0	2,64	0,064	210	210	81	2.59	0.23
8,0	5,28	0,128	200	200	88	2.27	0.24
11,0	7,26	0,176	210	210	85	2.47	0.23

Média de 2 repetições.

Tabela 18 Efeito da protease de levedura liofilizada nas propriedades extensográficas da massa. Parâmetros avaliados: resistência a extensão (RE), resistência máxima (RM), extensibilidade (E), número proporcional (RE/E) e energia (A) das mesmas.

Enzima liofilizada de protease de levedura		Parâmetros extensográficos				
mg/kg de massa	mg equiv. enz. bact.	RE (UE)	RM (UE)	E (cm)	RE/E (UE/cm)	A (dm ²)
0,0	0,0	250	250	80	3.12	0.26
0,1	0,04	200	200	69	2.90	0.20
0,3	0,12	180	180	83	2.17	0.21
0,4	0,16	180	180	75	2.40	0.23
0,8	0,32	140	140	99	1.41	0.23
1,10	0,43	130	130	89	1.46	0.18

Médias de 2 repetições.

ANEXO II

Tabela 19. Efeito da protease bacteriana nas propriedades extensográficas da massa. Parâmetros avaliados: resistência a extensão (RE), resistência máxima (RM), extensibilidade (E), número proporcional (RE/E) e energia (A) das mesmas.

Enzima bacteriana mg/ kg de massa	parâmetros extensográficos				
	RE (UE)	RM (UE)	E (cm)	RE/E (UE/cm)	A (dm ²)
0,0	300	310	77	3.90	0.31
0,06	260	270	77	3.38	0.30
0,12	235	235	84	2.80	0.24
0,25	220	225	84	2.62	0.24
0,50	130	140	76	1.71	0.13

Médias de 2 repetições.

Tabela 20 Efeito da protease fúngica nas propriedades extensográficas da massa. Parâmetros: resistência a extensão (RE), resistência máxima (RM), extensibilidade (E), número proporcional (RE/E) e energia (A) das mesmas.

Enzima fúngica		parâmetros extensográficos				
mg/kg de massa	mg equiv. enz. bact.	RE (UE)	RM (UE)	E (cm)	RE/E (UE/cm)	A (dm ²)
0,0	0,0	245	280	69	3.55	0.25
0,25	0,05	240	265	64	3.75	0.25
0,50	0,10	225	230	72	3.12	0.22
1,00	0,20	190	210	65	2.92	0.20

Médias de 2 repetições

ANEXO II

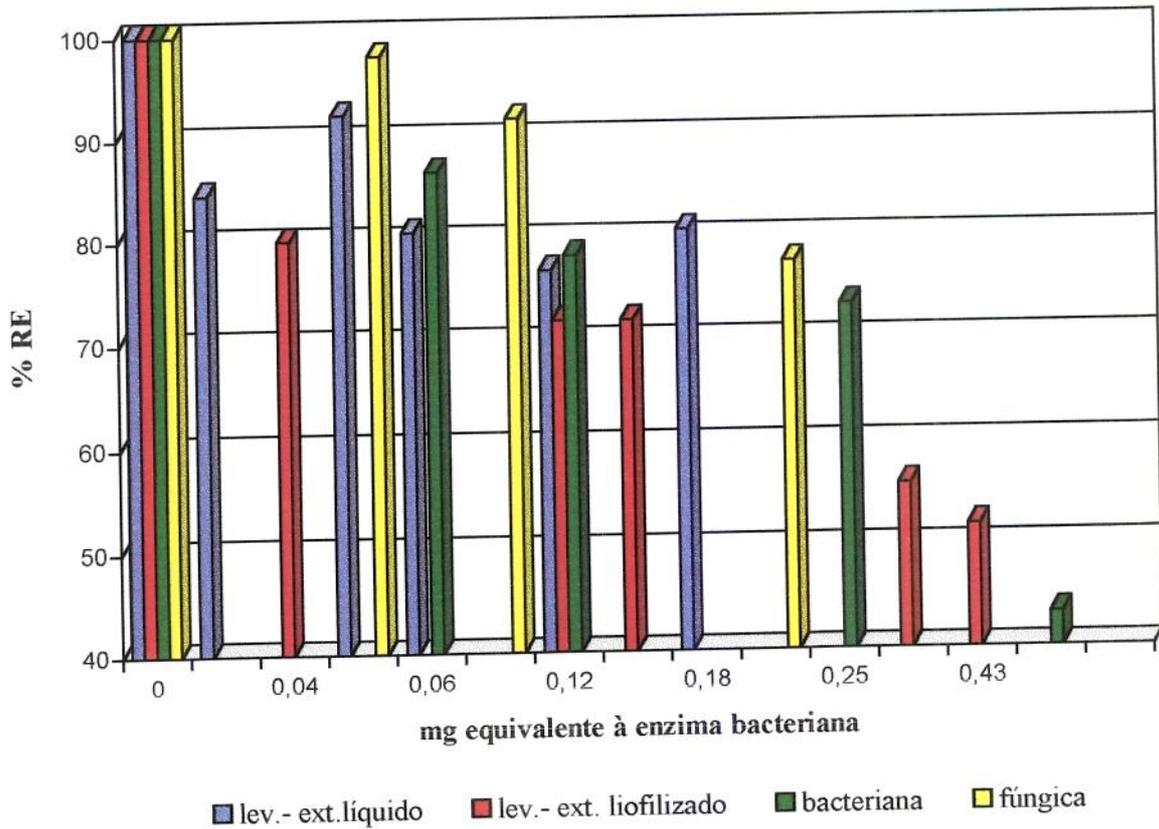


Figura 15 - Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, na resistência à extensão (RE) da massa, expresso em % de unidades extensográficas (% UE).

ANEXO II

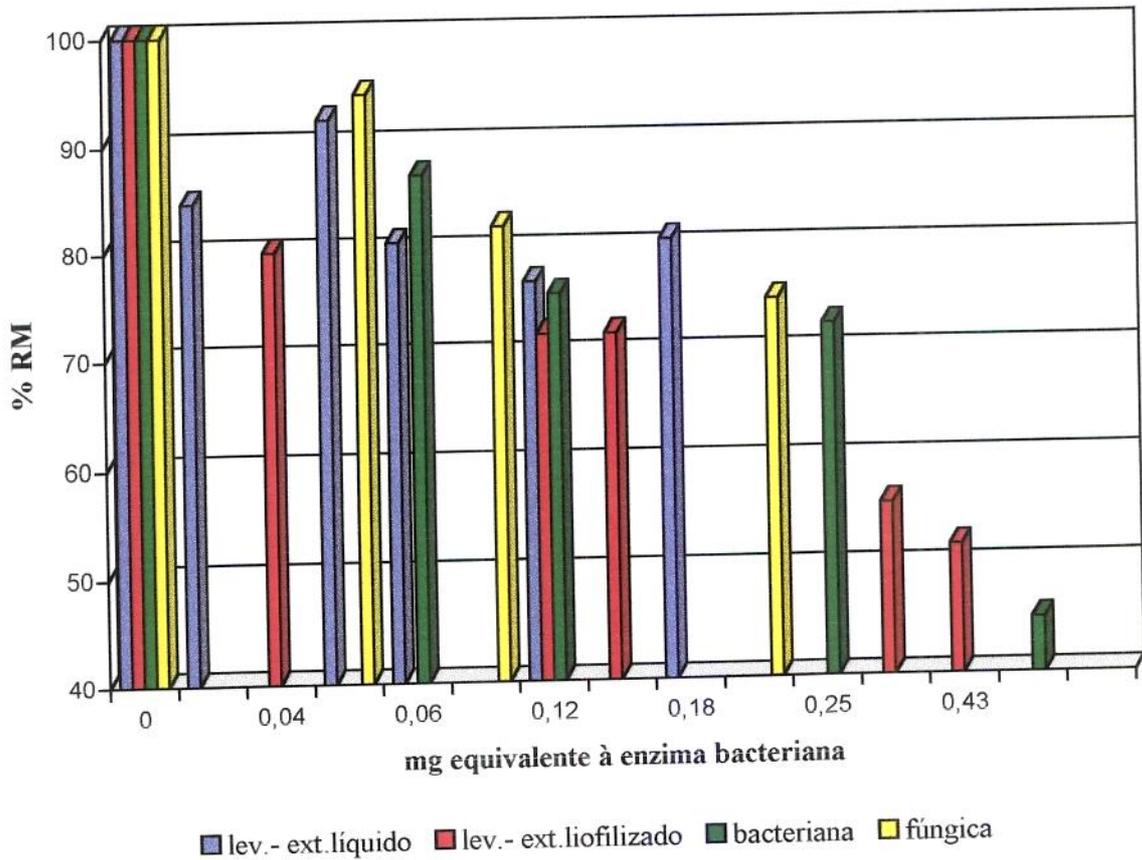


Figura 16 - Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, na resistência máxima (RM) da massa, expresso em % de unidades extensográficas (%UE).

ANEXO II

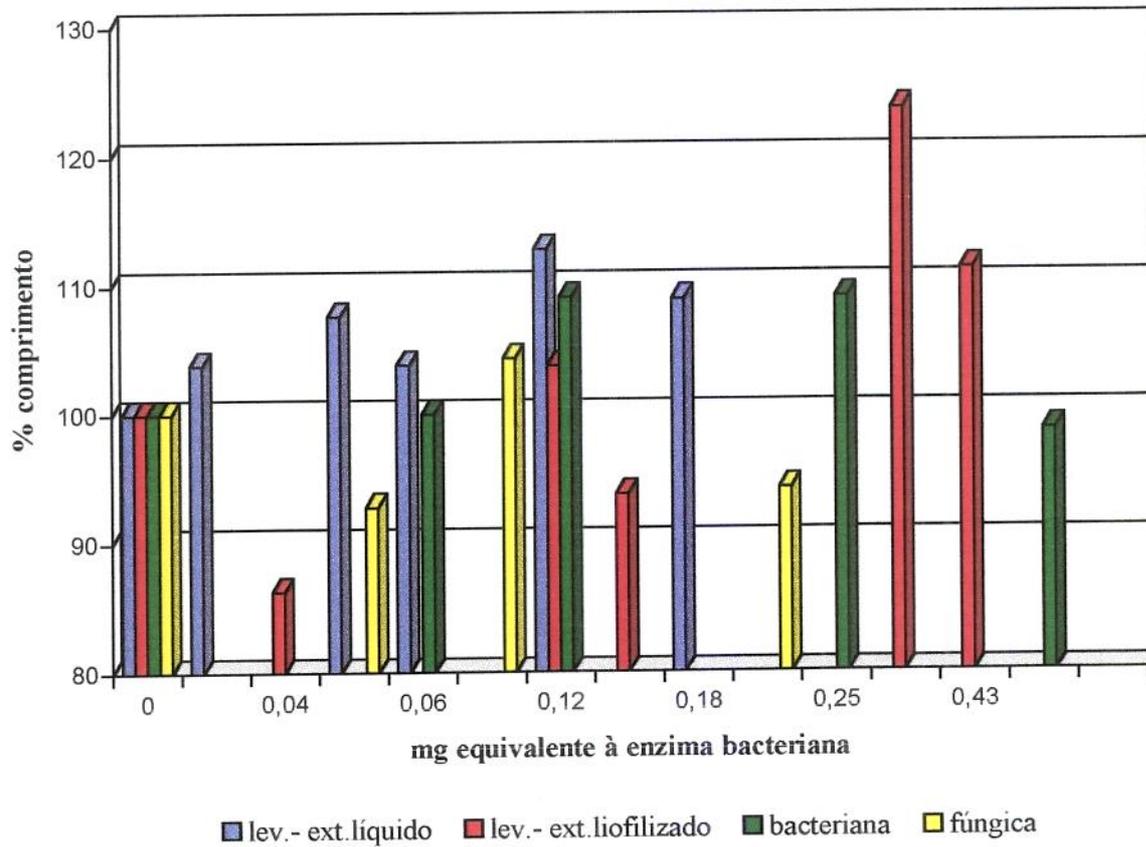


Figura 17 - Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, na extensibilidade (E) da massa, expresso em % do comprimento (% cm).

ANEXO II

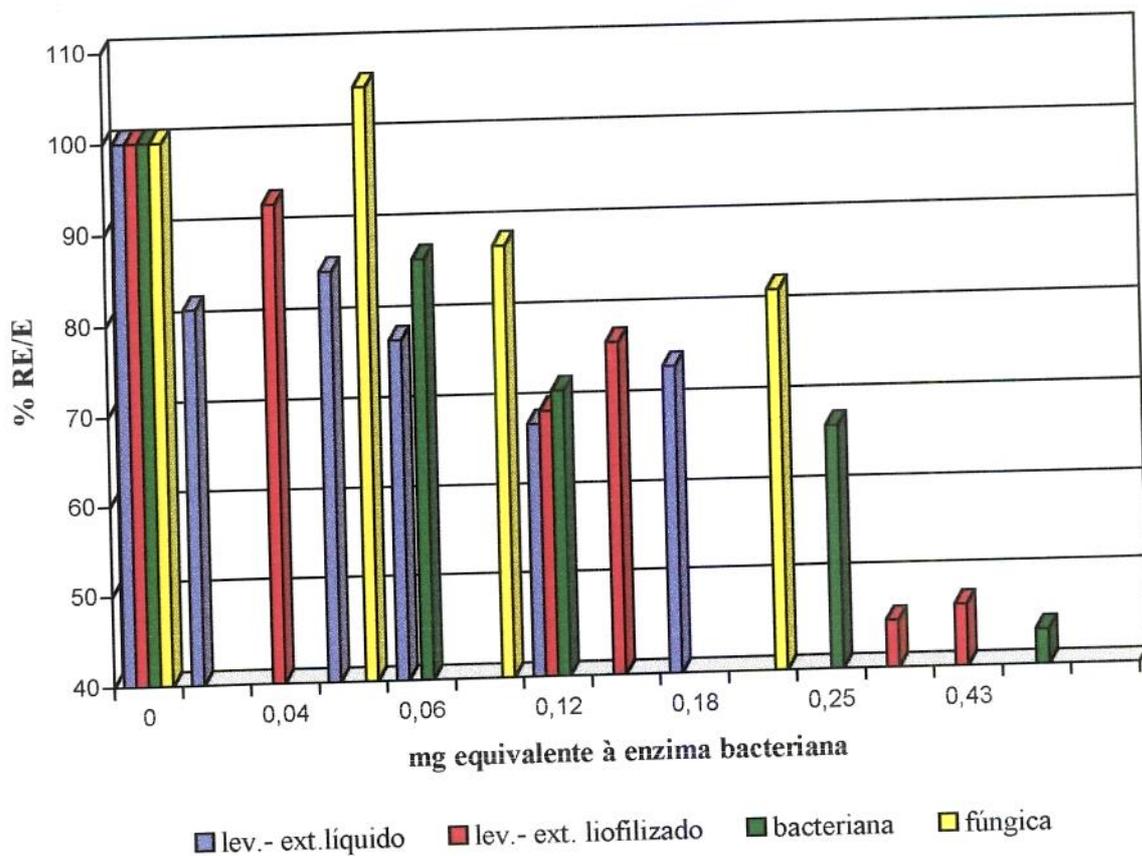


Figura 18- Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, no número proporcional (RE/E) da massa, expresso em % de unidades extensográficas (UE/cm).

ANEXO II

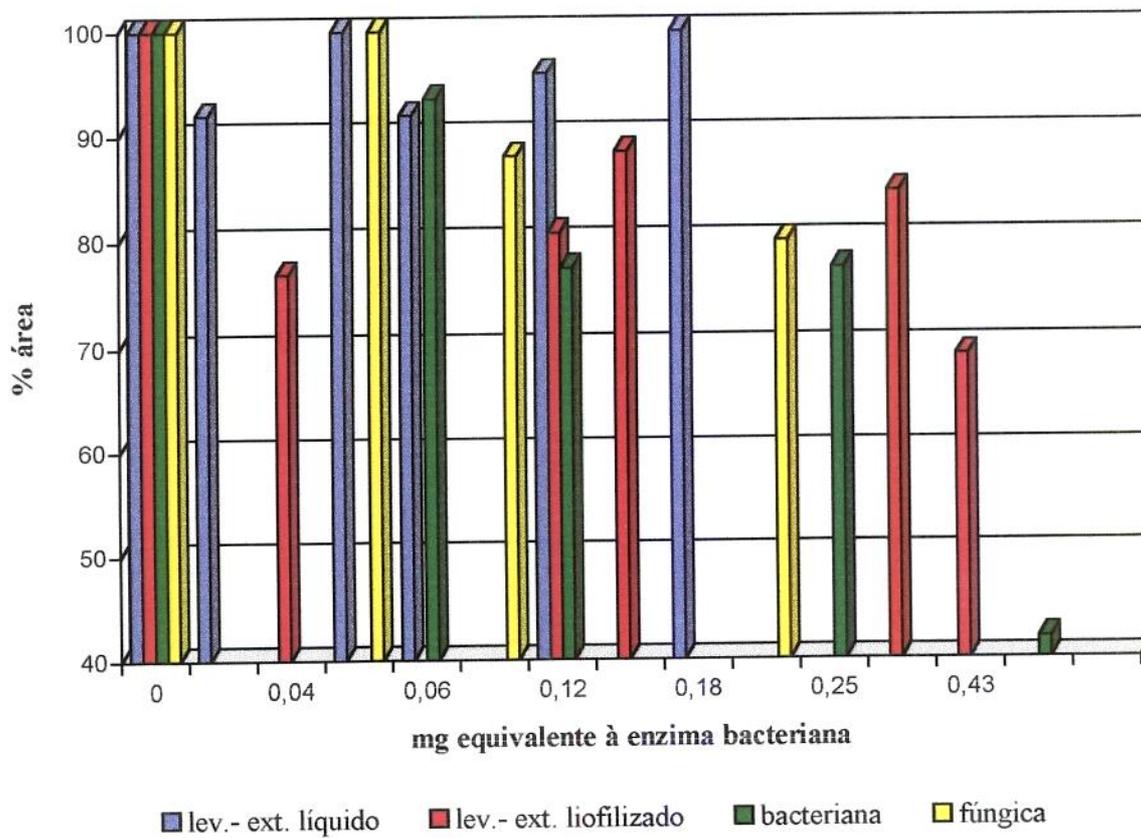


Figura 19 - Efeito das proteases de levedura (extrato líquido e enzima liofilizada), bacteriana e fúngica, na energia da massa, expresso em % da área do extensograma (% dm²).