

# **Hidrólise Enzimática das Proteínas da *Dreche***

**Dissertação do 2ºCiclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em  
Controlo de Qualidade na Especialidade de Água e Alimentos**

Sandra Juliana Vieira Teixeira

Trabalho realizado sob a orientação da  
Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira

Março de 2011

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO.

# Resumo

A indústria cervejeira produz vários resíduos e subprodutos em grandes quantidades. Os dois principais subprodutos são a *dreche* e o excedente de levedura, que são potenciais fontes de produtos de valor acrescentado. Contudo, as principais aplicações destes subprodutos resumem-se à alimentação animal. Deste modo, o desenvolvimento de técnicas que permitam a sua valorização é de grande interesse, por razões económicas e ambientais.

O trabalho experimental descrito nesta dissertação teve como principal objectivo fornecer uma base científica para a valorização dos subprodutos da indústria cervejeira, produzidos em maior quantidade, em particular, a utilização da fracção proteica da *dreche* e das peptidases do excedente de levedura da cerveja, para a obtenção de hidrolisados.

O concentrado de proteínas da *dreche*, obtido por extracção alcalina e subsequente precipitação ácida, foi utilizado como substrato para as peptidases da levedura da cerveja presentes nos extractos enzimáticos, obtidos por disrupção mecânica das células de levedura.

As condições que afectam a hidrólise enzimática das proteínas da *dreche*, pelas peptidases da levedura da cerveja foram estudadas, incluindo a concentração de enzima e de substrato, o pH, a temperatura e o tempo. O pH óptimo de hidrólise foi 6 e a temperatura óptima foi 50°C.

A potencial presença de inibidores endógenos das peptidases da levedura da cerveja foi detectada. As peptidases da levedura da cerveja, que possivelmente estão envolvidas na hidrólise das proteínas da *dreche* são peptidases de serina e metalopeptidases.

A hidrólise das proteínas da *dreche* com peptidases comerciais (Alcalase® e Protamex®) e com as peptidases da levedura da cerveja foi comparada e os hidrolisados obtidos foram separados por RP-HPLC/UV, que revelou a presença de péptidos com tempos de retenção similares, o que aponta para péptidos com peso molecular e polaridade semelhantes.

**Palavras-Chave:**

Subprodutos; *Dreche*; Proteínas; Levedura; Peptidases; Hidrolisados



## Abstract

The beer industry produces various residues and by-products in large quantities. The two main by-products of brewing are spent grains and yeast surplus, which are a source of several value-added products. However, the main applications of these products are limited to animal feed. Consequently, the development of techniques that enable their valorisation are of great interest for economic and environmental reasons.

The experimental work described in this thesis aimed to provide a scientific basis for the valorisation of major brewing industry by-products, in particular, the use of the protein fraction of spent grains and brewer's yeast peptidases to obtain hydrolysates.

The spent grain protein concentrates, obtained by alkaline extraction and subsequent acid precipitation, was used as the substrate for brewer's yeast peptidases present in extracts obtained by mechanical disruption of brewer's yeast cells.

Conditions that affect the enzymatic hydrolysis of spent grain proteins by brewer's yeast peptidases were studied, including substrate and enzyme concentration, pH, temperature and time. The optimum pH of hydrolysis was 6 and the optimal temperature was 50 °C.

The potential presence of endogenous inhibitors of brewer's yeast peptidases was detected. Brewer's yeast peptidases possibly involved in the hydrolysis of spent grain proteins are serine peptidases and metallopeptidases.

Hydrolysis of proteins from spent grains with commercial peptidases (Alcalase® and Protamex®) and brewer's yeast peptidases was compared. The hydrolysates were separated by RP-HPLC/UV. Results showed the presence of peptides with identical retention times that indicate peptides with similar molecular weight and polarity.

**Keywords:**

By-products; Spent Grains; Proteins; Yeast; Peptidases; Hydrolysates



# Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Índice</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Capítulo I - Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Subprodutos da Indústria Cervejeira</b> .....	<b>5</b>
1.1. Formação de subprodutos durante o processo de fabrico de cerveja.....	5
1.2. <i>Dreche</i> .....	9
1.2.1. Composição química da <i>dreche</i> .....	9
1.2.2. Potenciais aplicações da <i>dreche</i> .....	10
1.2.3. Proteínas da <i>dreche</i> .....	13
1.2.3.1. Extracção das proteínas da <i>dreche</i> .....	14
1.3. Excedente de levedura <i>Saccharomyces</i> .....	16
1.3.1. Composição química do excedente de levedura <i>Saccharomyces</i> .....	16
1.3.2. Potenciais aplicações do excedente de levedura <i>Saccharomyces</i> .....	17
1.3.3. Peptidases da levedura da cerveja .....	18
1.3.3.1. Peptidases – Aspectos gerais.....	19
1.3.3.2. Peptidases da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21

1.3.3.3.	Extracção de peptidases de leveduras .....	24
1.3.3.4.	Inibidores de peptidases .....	26
<b>2.</b>	<b>Hidrólise enzimática de proteínas .....</b>	<b>28</b>
2.1.	Factores que afectam a hidrólise enzimática de proteínas.....	29
2.1.1.	Peptidases .....	29
2.1.2.	Substrato.....	30
2.1.3.	Condições de hidrólise .....	30
	<b>Capítulo II - Materiais e Métodos .....</b>	<b>33</b>
<b>1.</b>	<b>Materiais.....</b>	<b>33</b>
1.1.	Amostras .....	33
1.2.	Reagentes e soluções.....	33
1.3.	Equipamentos .....	34
<b>2.</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>34</b>
2.1.	Extracção das proteínas da <i>dreche</i> e obtenção do CPD .....	34
2.2.	Determinação da solubilidade das proteínas presentes no CPD .....	36
2.3.	Determinação do azoto total - Método de Kjeldahl .....	36
2.4.	Método de Bradford .....	36
2.5.	Determinação da humidade.....	37
2.6.	Extracção e concentração das peptidases da levedura da cerveja.....	37
2.7.	Determinação da actividade proteolítica – Método de hidrólise da caseína .....	38
2.8.	Hidrólise enzimática das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja e pelas peptidases comerciais, Alcalase® e Protamex®.....	39
2.9.	Efeito da concentração de peptidases da levedura da cerveja e da concentração de substrato na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> .....	40
2.10.	Efeito do pH na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> .....	40
2.11.	Efeito da temperatura na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> .....	41
2.12.	Efeito do tempo na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja.....	41
2.13.	Detecção de potenciais inibidores endógenos das peptidases da levedura da cerveja	41

---

2.14.	Efeito de Inibidores sintéticos na actividade das peptidases da levedura da cerveja	42
2.15.	Separação dos hidrolisados por RP-HPLC/UV	43
<b>Capítulo III - Resultados e Discussão</b>		<b>45</b>
<b>1.</b>	<b>Proteínas da <i>dreche</i></b>	<b>45</b>
1.1.	Extracção das proteínas da <i>dreche</i> e obtenção do CPD	45
1.2.	Determinação da solubilidade das proteínas presentes no CPD	45
<b>2.</b>	<b>Peptidases da levedura da cerveja</b>	<b>46</b>
2.1.	Verificação da actividade proteolítica do extracto enzimático	46
2.2.	Influência do pH na actividade das peptidases da levedura da cerveja	47
<b>3.</b>	<b>Hidrólise enzimática das proteínas da <i>dreche</i> com as peptidases da levedura da cerveja</b>	<b>48</b>
3.1.	Optimização das condições de hidrólise	48
3.1.1.	Efeito da concentração de peptidases e de substrato	49
3.1.2.	Efeito do pH	50
3.1.3.	Efeito da temperatura	52
3.1.4.	Efeito do tempo	53
3.2.	Detecção de potenciais inibidores endógenos das peptidases da levedura da cerveja	54
3.3.	Efeito de inibidores sintéticos na actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da <i>dreche</i>	55
<b>4.</b>	<b>Hidrólise enzimática das proteínas da <i>dreche</i> com peptidases comerciais e comparação com as peptidases da levedura da cerveja</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>Separação por RP-HPLC/UV dos péptidos resultantes da hidrólise enzimática das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja e pelas peptidases comerciais</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo IV - Conclusão</b>		<b>67</b>
<b>Referências</b>		<b>71</b>



# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Visão esquemática da obtenção de hidrolisados das proteínas da <i>dreche</i> com as peptidases da levedura da cerveja, para a valorização dos dois principais subprodutos da indústria cervejeira, a <i>dreche</i> e o excedente de levedura. ....	3
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática do processo de produção de cerveja e dos pontos onde são produzidos os três principais subprodutos da indústria cervejeira (retirado de (Mussatto, 2009)). ....	8
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática da interação peptidase-substrato de acordo com a nomenclatura de Schechter e Berger (1967) (adaptado de (Turk, 2006)). ....	21
<b>Figura 4</b> – Métodos de ruptura celular utilizados na obtenção das peptidases intracelulares de leveduras. ....	25
<b>Figura 5</b> – Procedimento para extracção das proteínas da <i>dreche</i> e obtenção do CPD. ....	35
<b>Figura 6</b> – Solubilidade das proteínas presentes no concentrado de proteínas da <i>dreche</i> (CPD) em função do pH. ....	46
<b>Figura 7</b> – Actividade das peptidases presentes no extracto enzimático, a pH 7 e a 37°C sobre a caseína 1%. ....	47
<b>Figura 8</b> – Influência do pH na actividade das peptidases da levedura da cerveja, na hidrólise da caseína 1% a 37°C. ....	48
<b>Figura 9</b> – Hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja, a pH 8 e a 37°C, na presença de diferentes volumes de extracto enzimático e com uma concentração de substrato de 5 mg/ml. ....	49
<b>Figura 10</b> – Efeito da concentração de substrato na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja, a pH 8 e a 37°C. ....	50
<b>Figura 11</b> – Influência do pH na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja. A actividade foi expressa em termos de percentagem relativa. ....	51
<b>Figura 12</b> – Influência da temperatura na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja. A actividade foi expressa em termos de percentagem relativa. ....	52
<b>Figura 13</b> – Efeito do tempo na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja, nas condições de pH e temperatura óptimos. A actividade foi expressa em unidades de actividade (U). ....	53
<b>Figura 14</b> – Influência da temperatura na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases comerciais Alcalase® e Protamex® e comparação com os resultados obtidos para as peptidases LC. Os resultados foram expressos em termos de actividade relativa em percentagem. ....	60
<b>Figura 15</b> – Influência da temperatura na hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases comerciais Alcalase® e Protamex® e comparação com os resultados obtidos para as peptidases LC. Os resultados foram expressos em termos de actividade relativa em percentagem. ....	61
<b>Figura 16</b> – Hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja, Protamex® e Alcalase® em diferentes condições de pH e temperatura. A actividade foi expressa em unidades de actividade (U). ....	62
<b>Figura 17</b> – Perfis cromatográficos dos hidrolisados obtidos após hidrólise enzimática das proteínas da <i>dreche</i> com as peptidases da levedura da cerveja, Protamex® e Alcalase®. A hidrólise enzimática foi realizada nas condições de pH e temperatura óptimos para cada tipo de peptidase. A absorvência (215 nm) foi expressa em unidades arbitrárias (UA). ....	66



# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Composição química da <i>dreche</i> .....	10
<b>Tabela 2</b> – Principais aplicações da <i>dreche</i> como matéria-prima (Aliyu e Bala, 2011; Gupta <i>et al.</i> , 2010; Mussatto, 2009; Mussatto <i>et al.</i> , 2006).....	12
<b>Tabela 3</b> – Composição química do excedente de levedura <i>Saccharomyces</i> .....	17
<b>Tabela 4</b> – Principais aplicações do excedente de levedura <i>Saccharomyces</i> (Chae <i>et al.</i> , 2001; Ferreira <i>et al.</i> , 2010; Mussatto, 2009; Priest e Stewart, 2006).....	18
<b>Tabela 5</b> – Peptidases da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
<b>Tabela 6</b> – Inibidores utilizados na determinação dos quatro principais tipos catalíticos de peptidases encontrados na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Beynon e Bond, 2001; Rawlings e Barrett, 2010).....	27
<b>Tabela 7</b> – Ensaio para determinação da actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da <i>dreche</i> , na presença e na ausência de inibidores sintéticos específicos.....	43
<b>Tabela 8</b> – Hidrólise das proteínas da <i>dreche</i> pelas peptidases da levedura da cerveja em diferentes concentrações para detectar a potenciais inibidores endógenos. A actividade foi expressa em percentagem da actividade mais alta verificada, que foi considerada 100%.....	55
<b>Tabela 9</b> – Efeito de inibidores sintéticos na actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da <i>dreche</i> .....	56
<b>Tabela 10</b> – Actividade das peptidases da levedura da cerveja e das peptidases comerciais (Protamex® e Alcalase®) sobre a caseína e sobre as proteínas da <i>dreche</i> , a pH 7 e a 37°C. A actividade foi expressa em unidades de actividade (U).....	58



## Lista de Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CPD	Concentrado de proteínas da dreche´
C-terminal	Carboxi-terminal
DCI	Dicloroisocoumarina
DFP	Diisopropilfluorofosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E-64	L-trans-epoxisuccinil-leucilamido(4-guanidino)butano
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FD	Factor de diluição.
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
min	Minutos
MWCO	Molecular weight cut-off
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
nr	Não referido
N-terminal	Amino-terminal
p	Peso
Peptidases LC	Peptidases da levedura da cerveja
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
RNA	Ácido ribonucleico
RP-HPLC/UV	Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa com detecção UV
SDS	Dodecilsulfato de sódio
T	Tempo de ensaio
TCA	Ácido tricloroacético

TFA	Ácido trifluoracético
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidades de actividade enzimática
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
v	Volume
Ve	Volume de preparação enzimática
Vt	Volume total

# Introdução

A valorização de subprodutos é um conceito inovador no domínio da gestão dos resíduos contribuindo para um desenvolvimento sustentável. A indústria cervejeira produz anualmente vários subprodutos, sendo a *dreche* e o excedente de levedura os subprodutos produzidos em maior quantidade (Mussatto, 2009). As suas principais aplicações são limitadas à alimentação animal e muitas vezes o aterro é um dos destinos destes subprodutos. No entanto, várias aplicações agro-industriais têm sido estudadas, em particular na alimentação humana e a utilização a nível biotecnológico (Ferreira *et al.*, 2010; Mussatto, 2009; Mussatto *et al.*, 2006).

A *dreche* é um subproduto rico em proteínas, mas a sua reduzida solubilidade constitui uma das principais limitações para a utilização a nível alimentar. A potencial aplicação das proteínas insolúveis da *dreche* requer a utilização de métodos de extracção dessas proteínas, que pode ser realizada por métodos químicos, físicos e bioquímicos, ou pela combinação de vários métodos (Celus *et al.*, 2007; Treimo *et al.*, 2008).

A levedura da cerveja, que é recolhida no final da fermentação como excedente de levedura, contém várias peptidases intracelulares dos principais tipos catalíticos (serina, cisteína, metalo e ácido aspártico), que podem ser isoladas e purificadas (Ferreira *et al.*, 2010).

As peptidases têm inúmeras funções fisiológicas importantes e são um dos grupos de enzimas com mais interesse a nível industrial. As peptidases têm inúmeras aplicações na indústria alimentar, de detergentes, têxtil, bem como a nível médico e biotecnológico (Rawlings e Barrett, 2010; Whitaker, 2003).

As leveduras são um dos organismos mais importantes nas indústrias de fermentação, por exemplo na indústria cervejeira, e poderiam ser utilizadas como uma boa fonte de peptidases (Roy *et al.*, 2000). Contudo, a maioria dos estudos sobre as peptidases de leveduras estão relacionados com procedimentos de extracção e

purificação, bem como, conhecer as suas funções fisiológicas a nível celular, mas os estudos sobre possíveis aplicações das peptidases de leveduras são raros.

As peptidases de leveduras são essencialmente de natureza intracelular, o que justifica não terem ganho interesse comercial significativo (Kamini *et al.*, 1999). A obtenção de peptidases intracelulares requer a utilização de métodos de extracção eficientes (Shynkaryk *et al.*, 2009). Vários métodos mecânicos e não mecânicos têm sido utilizados para a disrupção celular e obtenção das peptidases intracelulares de leveduras.

A hidrólise enzimática de proteínas, pela acção de peptidases para a obtenção de péptidos e aminoácidos é muito importante na indústria alimentar, bem como, a nível biotecnológico devido às suas propriedades funcionais e nutricionais (Kunst, 2003; Pericin *et al.*, 2009).

A hidrólise enzimática das proteínas da *dreche* com peptidases comerciais tem sido referida na literatura (Celus *et al.*, 2007; Treimo *et al.*, 2008). Celus e colaboradores estudam as propriedades tecno-funcionais dos hidrolisados obtidos (Celus *et al.*, 2007).

Roy e colaboradores (Roy *et al.*, 2000) estudaram a obtenção de hidrolisados a partir das proteínas do leite com peptidases presentes em extractos enzimáticos de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Neklyudov e colaboradores (Neklyudov *et al.*, 1996; Neklyudov *et al.*, 1998) utilizaram a levedura da cerveja, em particular a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* como fonte de peptidases para obtenção de hidrolisados a partir de proteínas de sangue animal. Contudo, a hidrólise das proteínas da *dreche* com peptidases da levedura da cerveja, aparentemente, ainda não foi descrita na literatura.

O trabalho experimental descrito nesta dissertação teve como principal objectivo fornecer uma base científica para a valorização dos subprodutos da indústria cervejeira produzidos em maior quantidade, em particular a utilização da fracção proteica da *dreche* e das peptidases da levedura da cerveja para a obtenção de hidrolisados, como se apresenta esquematizado na Figura 1.

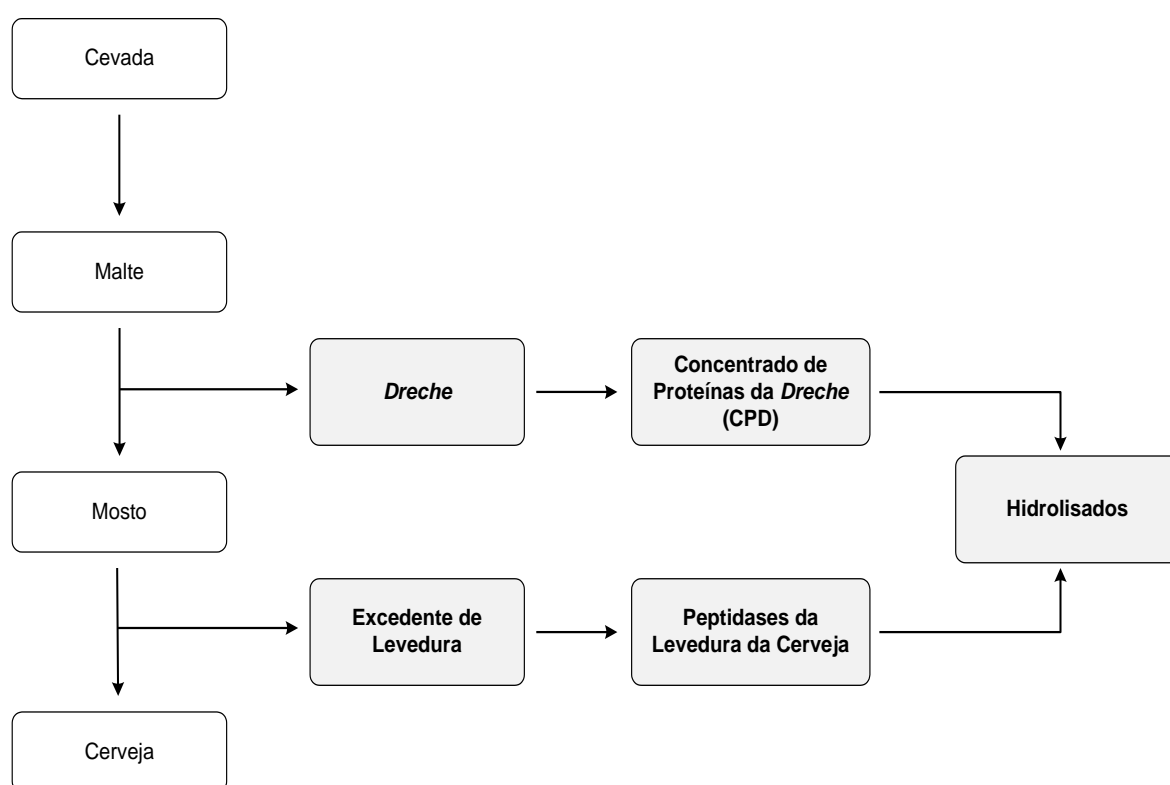
O trabalho experimental foi dividido em quatro etapas principais. A primeira etapa correspondeu à extracção das proteínas da *dreche* e obtenção do concentrado de proteínas da *dreche* (CPD).

Na segunda etapa, o extracto enzimático, que contém as peptidases da levedura da cerveja, foi obtido por disrupção mecânica das células de levedura excedente da cerveja.

Na terceira etapa, foi realizada a hidrólise enzimática das proteínas da *dreche*, com as peptidases da levedura da cerveja. As condições de hidrólise, incluindo a concentração de enzima e substrato, o pH, a temperatura e o tempo, que afectam a hidrólise enzimática foram estudadas. A potencial presença de inibidores endógenos das

peptidases da levedura da cerveja, em particular das peptidases vacuolares que possam estar presentes nos extractos enzimáticos. Também foi alvo de estudo, o tipo catalítico das peptidases da levedura envolvidas na hidrólise das proteínas da *dreche*.

Na quarta e última etapa, foi realizada a hidrólise das proteínas da *dreche* com peptidases comerciais (Alcalase® e Protamex®). Os resultados foram comparados com a hidrólise das proteínas da *dreche* com as peptidases da levedura da cerveja. Posteriormente, os hidrolisados obtidos foram separados por RP-HPLC/UV para avaliar o peso molecular e polaridade dos péptidos obtidos.



**Figura 1** – Visão esquemática da obtenção de hidrolisados das proteínas da *dreche* com as peptidases da levedura da cerveja, para a valorização dos dois principais subprodutos da indústria cervejeira, a *dreche* e o excedente de levedura.



# Capítulo I - Revisão Bibliográfica

## 1. SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA

A cerveja é a quinta bebida mais consumida no mundo, depois do chá, bebidas gaseificadas, leite e café (Aliyu e Bala, 2011). Em 2008, foram produzidos  $1,811 \times 10^6$  hectolitros de cerveja em todo o mundo (Robertson *et al.*, 2010) e em média por ano, são consumidos cerca 23 litros de cerveja por pessoa (Fillaudeau *et al.*, 2006). A indústria cervejeira produz, inevitavelmente, quantidades relativamente grandes de subprodutos, tais como a *dreche*, o excedente de levedura *Saccharomyces* e os resíduos de lúpulo (Gupta *et al.*, 2010; Mussatto, 2009). A utilização destes subprodutos ainda é limitada, sendo principalmente comercializados para utilização na alimentação animal. No entanto, estes subprodutos são recursos de elevado potencial para utilização em processos biotecnológicos, uma vez que são ricos em carbono, azoto e sais minerais (Mussatto, 2009).

Em termos ambientais, a utilização de subprodutos industriais representa uma solução para os problemas de poluição, portanto o desenvolvimento de novas técnicas para aproveitamento e melhoramento de subprodutos agro-industriais é de grande interesse (Mussatto, 2009; Mussatto *et al.*, 2006).

### 1.1. FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS DURANTE O PROCESSO DE FABRICO DE CERVEJA

No processo de fabrico da cerveja, os principais ingredientes utilizados são o malte, água, levedura e lúpulo (Lopez *et al.*, 2010). Alguns cereais não maltados, tais como o milho, o trigo, o arroz e a aveia, designados de adjuntos, podem ser utilizados no

fabrico da cerveja, como fontes de hidratos de carbono mais económicas do que o malte (Priest e Stewart, 2006).

A primeira fase do processo de produção de cerveja é a maltagem, onde o malte é obtido a partir da cevada (Lopez *et al.*, 2010). A maltagem engloba três etapas, a maceração, a germinação e a secagem. Durante a maceração, os grãos de cevada limpos são colocados em contacto com a água, de forma a promover a sua hidratação, iniciando-se o processo de germinação e a activação dos processos metabólicos. A germinação promove a síntese e activação de enzimas, tais como, amilases, peptidases e  $\beta$ -glucanases. É na etapa de germinação que os grãos de cevada passam a ser designados por malte. A germinação termina com a etapa de secagem do malte, para evitar a contaminação com microrganismos e para produzir componentes do *flavour* (Mussatto *et al.*, 2006).

No final da maltagem inicia-se o processamento da cerveja propriamente dito, cuja fase inicial corresponde ao fabrico do mosto. O malte é moído de forma a obter uma farinha grosseira, que é misturada com água e a temperatura aumenta lentamente de 37°C para 78°C para promover a hidrólise enzimática dos constituintes do malte. Durante este processo, o amido do malte é convertido em açúcares fermentáveis, sobretudo maltose e maltotriose, em açúcares não fermentáveis (dextrinas) e as proteínas são degradadas, por peptidases, em polipéptidos e aminoácidos. Esta etapa de conversão enzimática é designada de brassagem, na qual é obtido um líquido doce, conhecido como mosto (Gupta *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2010; Mussatto, 2009).

Após a brassagem, é realizada uma etapa de filtração para separar a parte insolúvel (a fracção sólida conhecida como *dreche*) do filtrado (mosto). O mosto contém todos os compostos solúveis necessários à fermentação (Lopez *et al.*, 2010; Mussatto, 2009).

Após a filtração, o mosto é submetido à ebulição. É nesta etapa que é adicionado o lúpulo. Durante este processo, as substâncias do lúpulo que conferem o sabor amargo e o *flavour* característicos da cerveja, são transferidas para o mosto (Mussatto, 2009; Priest e Stewart, 2006). A ebulição tem também por objectivo a eliminação de substâncias voláteis indesejáveis, a esterilização do mosto, desnaturação das enzimas e precipitação de proteínas de peso molecular elevado (Priest e Stewart, 2006).

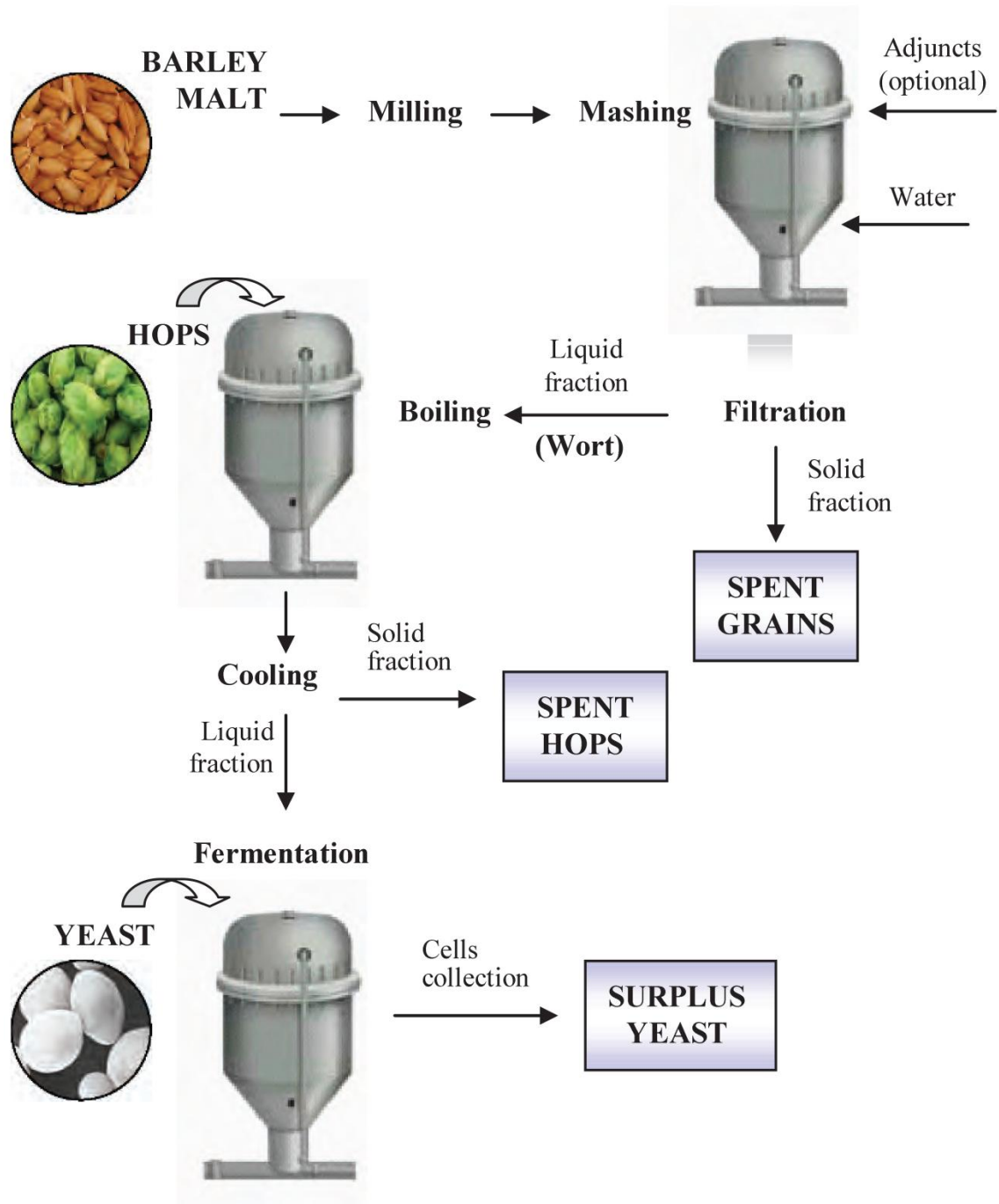
No final da ebulição, é necessário realizar a separação do precipitado proteico e dos componentes do lúpulo não solubilizados (resíduos de lúpulo) do mosto quente. A separação pode ser realizada por centrifugação, filtração ou sedimentação. O mosto quente é posteriormente arrefecido e arejado em condições estéreis (Priest e Stewart, 2006).

Após o arrefecimento do mosto, segue-se a etapa de fermentação. Nesta etapa, a levedura de cultura seleccionada para o tipo de cerveja que se pretende produzir, é adicionada ao mosto arrefecido e saturado em oxigénio. Os açúcares do mosto, pela acção da levedura são convertidos em etanol e dióxido de carbono (Mussatto, 2009; Priest e Stewart, 2006). Durante a fermentação, a massa de células de levedura aumenta cerca de 3 a 6 vezes. No final desta fase, a maioria das células são recolhidas como levedura excedente, no topo ou no fundo do tanque de fermentação (de acordo com a natureza da levedura utilizada) (Mussatto, 2009).

No final da fermentação, segue-se a fase de maturação, cujo objectivo é a libertação de compostos voláteis indesejáveis, de forma a melhorar o sabor e o aroma da cerveja. Posteriormente segue-se a estabilização coloidal, a clarificação, operação que confere à cerveja a sua limpidez, eliminando os últimos elementos de turvação ainda em suspensão (Priest e Stewart, 2006).

A etapa final do fabrico da cerveja é o enchimento. Antes ou depois do enchimento é necessário realizar a estabilização biológica da cerveja, realizada a frio por filtração esterilizante ou a quente pela pasteurização, cujo objectivo é a remoção de microrganismos presentes (Priest e Stewart, 2006).

Na Figura 2 encontra-se uma representação esquemática do processo de produção de cerveja e os pontos onde são produzidos os principais subprodutos da indústria cervejeira,



**Figura 2** – Representação esquemática do processo de produção de cerveja e dos pontos onde são produzidos os três principais subprodutos da indústria cervejeira (retirado de (Mussatto, 2009)).

## 1.2. DRECHE

A *dreche* é o subproduto mais abundante resultante do fabrico da cerveja, representando cerca de 85% do total de subprodutos produzidos. Estima-se que por cada 100 litros de cerveja fabricada, sejam produzidos cerca de 20 quilogramas de *dreche* (Gupta et al., 2010; Mussatto, 2009), e só na Europa são produzidos mais de 3 milhões de toneladas de *dreche* por ano (Faulds et al., 2009).

### 1.2.1. Composição química da *dreche*

A *dreche*, fracção sólida que resulta da filtração do mosto durante o processo de fabrico da cerveja (Ozvural et al., 2009; Stojceska e Ainsworth, 2008), contém cerca de 30% (p/p) do malte original (Robertson et al., 2010). Dependendo do tipo de cerveja produzido, a *dreche* pode ser constituída apenas pelos resíduos do malte de cevada, ou também podem estar presentes resíduos de outros cereais não maltados eventualmente utilizados durante a brassagem, tais como o milho ou o arroz (Gupta et al., 2010; Mussatto, 2009).

A composição química da *dreche* varia de acordo com a variedade de cevada, com a época de colheita, com as condições da maltagem e brassagem, e com a qualidade e o tipo de adjuntos utilizados (Gupta et al., 2010; Lopez et al., 2010; Mussatto, 2009; Robertson et al., 2010; Santos et al., 2003). De uma forma geral, a *dreche* é um material lenhinocelulósico, rico em proteínas e fibras (arabinoxilanas, lenhina e celulose), que representam cerca de 20% e 70% da sua composição, respectivamente (Gupta et al., 2010; Lopez et al., 2010). Algumas análises da composição química da *dreche* encontram-se na Tabela 1.

A celulose e a hemicelulose juntas, correspondem a cerca de 50% da composição da *dreche*, revelando a presença de grandes quantidades de açúcares, tais como a xilose, glucose e a arabinose. A lenhina contém vários componentes polifenólicos, sobretudo ácidos ferúlico, *p*-coumárico, siringico, vanílico e *p*-hidroxibenzoico (Mussatto, 2009).

Os minerais, tais como, cálcio, cobalto, cobre, ferro, magnésio, fósforo, potássio, selénio, sódio e enxofre fazem parte da composição da *dreche*. Esta também possui

vitaminas como a biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantoténico, riboflavina e tiamina (Gupta *et al.*, 2010; Mussatto, 2009).

**Tabela 1** – Composição química da *dreche*.

Componentes (% peso seco)	(Bartolome e Gomez-Cordoves, 1999)	(Carvalho <i>et al.</i> , 2004)	(Mussatto e Roberto, 2005)	(Faulds <i>et al.</i> , 2008)
<b>Celulose</b>	17	21,9	16,8	nr*
<b>Arabinosilanas</b>	39	29,6	28,4	18
<b>Lenhina</b>	4	21,7	27,8	20,1
<b>Proteínas</b>	24	24,6	15,2	17,6
<b>Lípidos</b>	6	nr	nr	5,24
<b>Cinzas</b>	nr	1,2	4,6	nr

\*nr – não referido

Os lípidos presentes na *dreche* incluem triacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos gordos, esteróis, entre outros. Os aminoácidos leucina, valina, alanina, serina, glicina, ácido glutâmico e ácido aspártico estão presentes em maiores quantidades, enquanto os aminoácidos tirosina, prolina, treonina, arginina e lisina aparecem em menores quantidades. Também estão presentes os aminoácidos cisteína, histidina, isoleucina, metionina, fenilalanina e triptofano (Mussatto, 2009).

### 1.2.2. Potenciais aplicações da *dreche*

A *dreche*, subproduto da indústria cervejeira produzido em maior quantidade, apresenta elevado valor nutricional, uma vez que é rica em proteínas e fibras. No entanto, tem sido utilizada principalmente na alimentação animal (Celus *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2010; Ozvural *et al.*, 2009). Devido ao seu elevado teor de humidade (75-80%), à sua natureza orgânica e ao elevado conteúdo em açúcares fermentáveis, a *dreche* é um material que se degrada rapidamente à temperatura ambiente (El-Shafey *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2010). A exposição prolongada ao ar favorece a proliferação de microrganismos, causando a perda de nutrientes e a formação de produtos tóxicos. A deterioração da *dreche* ocorre após um período médio de cerca de 7 a 10 dias, e em

condições de temperatura mais elevada (30-40°C) e humidade, a sua deterioração pode ocorrer em menos de uma semana (El-Shafey *et al.*, 2004).

A tendência para a proliferação de microrganismos na *dreche*, levanta problemas para a sua utilização como material a nível alimentar. Assim, têm sido propostos vários métodos para estabilizar e armazenar a *dreche*. A preservação química, pela utilização de ácidos, tais como o láctico, fórmico, acético ou benzóico pode ser utilizada para a preservação da qualidade e do valor nutricional de *dreche*. A secagem, liofilização, congelação também têm sido propostas para a preservação da *dreche* (Aliyu e Bala, 2011; El-Shafey *et al.*, 2004; Mussatto *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2010). No entanto, os métodos que têm sido propostos apresentam vantagens e desvantagens, e nenhum deles consegue conciliar três características essenciais: 1) ser economicamente viável, 2) permitir um produto estável biologicamente e que preserve as qualidades nutricionais e 3) permitir o processamento de grandes quantidades de *dreche* e de uma forma eficaz (Lopez *et al.*, 2010).

Apesar de a *dreche* ser um produto de difícil conservação à temperatura ambiente, ela apresenta um elevado valor nutricional, o que valoriza a sua utilização como matéria-prima para diversas aplicações agro-industriais e a nível biotecnológico (Mussatto, 2009; Mussatto *et al.*, 2006). Na Tabela 2 encontram-se descritas as principais aplicações da *dreche* como matéria-prima.

Em contraste com a utilização da *dreche* como um produto “tal qual”, podem ser valorizados os componentes individuais da *dreche*, em particular as fibras e as proteínas (Celus, 2008). Os componentes individuais da *dreche* podem ser extraídos selectivamente, com recurso a métodos mecânicos e/ou (bio)químicos, podendo representar produtos de valor comercial, com diferentes aplicações a nível alimentar (Jay *et al.*, 2008).

O ácido ferúlico e o ácido coumárico são os ácidos fenólicos presentes em maior quantidade na *dreche* e com inúmeras potenciais aplicações na indústria alimentar, apresentando entre outras propriedades, propriedades antioxidantes (Aliyu e Bala, 2011; Mussatto *et al.*, 2006). As proteínas da *dreche* ou os hidrolisados de proteínas da *dreche* podem ser usados como agentes emulsionantes ou para enriquecer o valor nutricional dos alimentos, bem como fonte de aminoácidos nos meios de fermentação (Forsell *et al.*, 2008). As proteínas da *dreche* são abordadas na secção 1.2.3 e a importância dos hidrolisados é abordada na secção 2.

**Tabela 2** – Principais aplicações da *dreche* como matéria-prima (Aliyu e Bala, 2011; Gupta *et al.*, 2010; Mussatto, 2009; Mussatto *et al.*, 2006).

Área de aplicação	Descrição
<b>Alimentação animal</b>	Excelente para utilização na alimentação de ruminantes, uma vez que é fonte de azoto, como a ureia, fibra e aminoácidos essenciais. Promove o aumento da produção de leite, sem afectar a fertilidade dos animais. A sua utilização também tem sido estudada para outros animais, tais como, suínos, peixes e aves.
<b>Alimentação humana</b>	Devido ao baixo custo e ao elevado valor nutricional, a <i>dreche</i> tem sido utilizada como suplemento em farinhas para o fabrico de pão, bolachas, biscoitos, bolos, <i>snacks</i> e <i>waffles</i> . No entanto, a sua incorporação em farinhas pode dar origem a produtos com cor e <i>flavour</i> desagradáveis, sendo incorporadas em pequenas quantidades.
<b>Produção de Energia</b>	A combustão directa ou a fermentação anaeróbia da <i>dreche</i> produz biogás (uma mistura de 60-70% de metano, dióxido de carbono e pequenas quantidades de hidrogénio, azoto e monóxido de carbono). A produção de bioetanol a partir da <i>dreche</i> também tem sido investigada.
<b>Produção de carvão</b>	A <i>dreche</i> é seca, prensada e carbonizada numa atmosfera com baixa percentagem de oxigénio. Contudo, os briquetes de <i>dreche</i> apresentam características de queima inferiores às de outros tipos de briquetes, uma vez que requerem uma temperatura de ignição maior.
<b>Fabrico de tijolos</b>	Devido ao baixo conteúdo em cinzas e o elevado conteúdo de materiais fibrosos, a <i>dreche</i> é adequada para o fabrico deste tipo de materiais de construção. Permite aumentar a porosidade dos tijolos e melhorar a secura, não compromete a sua qualidade e não requer alterações nas linhas de produção.
<b>Fabrico de papel</b>	Devido à natureza fibrosa da <i>dreche</i> , tem sido estudada a sua utilização no fabrico de papel para toalhas e cartões.
<b>Adsorvente</b>	Devido ao baixo custo e à elevada disponibilidade de <i>dreche</i> , esta tem sido testada como adsorvente de vários tipos de compostos, tais como metais pesados como o cádmio, crómio e chumbo, bem como corantes utilizados da indústria têxtil.
<b>Biotecnologia</b>	A <i>dreche</i> pode ser utilizada como substrato para o crescimento de microrganismos e para a produção de enzimas. Também pode ser reutilizada no processo de fabrico da cerveja, para reduzir a espuma durante o processo fermentativo.

### 1.2.3. Proteínas da *dreche*

A *dreche* é um subproduto rico em proteínas (aproximadamente 20%) e cerca de 30 % do material que constitui o malte original está presente na *dreche* (Robertson et al., 2010). Contudo existe pouca informação sobre as proteínas do malte original que estão presentes na *dreche* (Celus et al., 2006). De acordo com Celus e colaboradores (Celus et al., 2006), a *dreche* contém o mesmo tipo de proteínas que o material de partida (cevada e malte). Cerca de 65% das proteínas do malte estão presentes na *dreche* e os restantes 35% estão presentes no mosto.

As proteínas da cevada podem ser classificadas em quatro grupos, com base na solubilidade: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em sais diluídos), prolaminas (solúveis em misturas álcool-água) e glutelinas (solúveis em meio alcalino) (Steiner et al., 2011).

As albuminas e as globulinas são as principais proteínas metabólicas dos grãos de cereais. As albuminas correspondem a cerca de 11% das proteínas da cevada e as globulinas correspondem a cerca de 15%. As glutelinas correspondem a cerca de 30% das proteínas da cevada e correspondem à fracção proteica menos estudada, devido ao facto de necessitarem de condições de extracção extremas (com uso de solventes muito agressivos), o que dificulta o seu estudo por electroforese. As prolaminas, que na cevada designam-se por hordeínas, correspondem a cerca de 37% das proteínas totais presentes na cevada (Steiner et al., 2011). As hordeínas podem ser divididas em quatro fracções diferentes (A, B, C e D), em função do tamanho e da composição em aminoácidos. As hordeínas B são a fracção de hordeínas mais abundante na cevada (cerca de 80% do total de hordeínas) e são ricas em enxofre. As hordeínas B representam cerca de 10-12% da fracção total de hordeínas. As hordeínas A e C são minoritárias (representam cerca de 5%) do total de hordeínas) (Celus et al., 2006; Salplachta e Bobalova, 2009; Steiner et al., 2011).

Durante a maltagem, uma parte das proteínas da cevada são degradadas em aminoácidos e pequenos péptidos por acção de várias peptidases que estão presentes na cevada (Celus et al., 2006). Algumas dessas peptidases são as responsáveis pelo aparecimento de proteínas solúveis e aminoácidos durante a brassagem. As albuminas e as globulinas são relativamente resistentes à proteólise, enquanto as hordeínas são bastante degradadas durante a maltagem, deste modo, o malte contém menos de metade das hordeínas presentes inicialmente na cevada (Celus et al., 2006; Jones, 2005). Das proteínas presentes na *dreche*, as hordeínas são as proteínas em maior

quantidade, sendo as principais responsáveis pela composição rica em glutamina e ácido glutâmico da *dreche* (Robertson *et al.*, 2010).

Durante a brassagem, ocorre desnaturação e reorganização das proteínas, formando-se agregados de proteínas compostos por hordeínas do tipo B e do tipo D e glutelinas. A formação de agregados de proteínas e a sua reduzida solubilidade estão associados à oxidação de grupos tiol das proteínas e consequente formação de ligações dissulfeto. Os agregados de proteínas podem ainda estar associados com material celulósico, o que dificulta a acessibilidade de enzimas hidrolíticas e limita a exploração em aplicações como a produção de bioenergia (Celus *et al.*, 2006; Faulds *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2010).

### **1.2.3.1.Extracção das proteínas da *dreche***

A extracção das proteínas da *dreche* pode ser realizada com recurso a diferentes tratamentos, incluindo químicos, físicos, mecânicos e bioquímicos (Jay *et al.*, 2008; Treimo *et al.*, 2008).

As proteínas da *dreche* podem ser solubilizadas por extracção alcalina, seguida de precipitação por adição de sulfato de amónio ou por acidificação a pH 4 com ácido clorídrico ou ácido cítrico (Celus *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2009). A precipitação também pode ser realizada com etanol (Celus, 2008). As proteínas da *dreche* são pouco solúveis em água devido à formação de ligações dissulfeto (Celus *et al.*, 2006; Faulds *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2010). A utilização de soluções alcalinas promove quebra das ligações dissulfeto e um aumento da carga à superfície das proteínas, conduzindo a aumento da solubilidade (Shen *et al.*, 2008).

As proteínas da *dreche* também podem ser extraídas com soluções de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e precipitação com etanol. A extracção é feita a temperaturas elevadas de 90°C, durante 95 minutos, conduzindo a rendimentos de extracção de cerca de 60% (Diptee *et al.*, 1989). No entanto, este procedimento apresenta algumas limitações, uma vez que a utilização de temperaturas muito elevadas conduz a uma excessiva desnaturação e alguns sais podem permanecer na solução, uma vez que podem não ser eficientemente removidos por diálise (Tang *et al.*, 2009).

A utilização de detergentes como SDS para a solubilização das proteínas da *dreche*, permite uma solubilização de mais de 80% do azoto total presente na *dreche* (Celus *et al.*, 2006).

O isolamento das proteínas da *dreche* também pode ser feito com recurso a membranas, utilizando a técnica de ultrafiltração. Esta técnica tem a vantagem de ser de baixo custo energético e de não ser necessário utilizar temperaturas elevadas, não comprometendo a qualidade das proteínas. Mais de 92% das proteínas podem ser retidas por membranas de ultrafiltração de 5 e 30 MWCO, sendo que a membrana de 5 consegue reter maior quantidade de proteínas do que a de 30. O principal problema da ultrafiltração é a possibilidade de ocorrer o fenómeno designado por polarização da concentração, que pode reduzir o fluxo do permeado muito abaixo da capacidade teórica e conduzir a alterações na selectividade das membranas (Tang *et al.*, 2009).

Tang e colaboradores utilizaram a técnica de ultrassons para extrair as proteínas da *dreche*, cujas vantagens incluem o facto de poder ser utilizada à temperatura ambiente e apresentar elevada eficiência. No entanto, a aplicação desta técnica a larga escala para obtenção das proteínas da *dreche* ainda necessita de ser testada. (Tang *et al.*, 2010).

A solubilização de proteínas da *dreche* com peptidases comerciais foi estudada por Treimo e colaboradores. Cerca de 77% das proteínas totais presentes na *dreche* foram solubilizadas com a Alcalase® (Treimo *et al.*, 2008). A hidrólise enzimática possibilita a obtenção das proteínas de forma suave, não havendo destruição dos aminoácidos. As enzimas são específicas, o que permite um processo mais controlado de obtenção das proteínas da *dreche* (Celus *et al.*, 2007). Celus e colaboradores descreveram a hidrólise enzimática das proteínas da *dreche* obtidas após extracção alcalina e subsequente precipitação ácida (Celus *et al.*, 2007). A hidrólise enzimática de proteínas é abordada na secção 2.

### 1.3. EXCEDENTE DE LEVEDURA *SACCHAROMYCES*

O excedente de levedura é outro dos principais subprodutos resultantes do processo de fabrico da cerveja. As aplicações deste subproduto têm sido investigadas, uma vez que é produzido em grandes quantidades e apresenta valor energético e nutricional (Mussatto, 2009; Pauen *et al.*, 2010).

As leveduras são utilizadas na indústria cervejeira durante o processo fermentativo. Estas têm um impacto significativo na qualidade da cerveja, uma vez que do processo de fermentação não resulta apenas etanol e dióxido de carbono, pois outros compostos, tais como, ácidos orgânicos, esterres, aldeídos e cetonas são produzidos, os quais desempenham um papel fundamental no perfil sensorial da cerveja (Pinho *et al.*, 2006). As leveduras utilizadas na indústria cervejeira pertencem ao género *Saccharomyces* e são convencionalmente divididas em duas classes principais: leveduras de fermentação alta e leveduras de fermentação baixa. As cervejas podem ser também divididas em dois tipos, em função do tipo de levedura utilizada, em *Ale* e *Lager*. As cervejas do tipo *Ale* são produzidas com leveduras de fermentação alta (*Saccharomyces cerevisiae*) e o processo de produção ocorre a temperaturas de 16-25°C. As cervejas do tipo *Lager* são produzidas com leveduras de fermentação baixa (*Saccharomyces pastorianus* ou *Saccharomyces carlsbergensis*), a temperaturas de 8-15°C, sendo conhecidas por leveduras de fermentação baixa por flocularem no fundo do tanque de fermentação (Ferreira *et al.*, 2010).

A levedura é geralmente reutilizada cerca de 4 a 6 vezes na etapa de fermentação. Contudo, o excedente de levedura é o segundo subproduto produzido em maior quantidade (Ferreira *et al.*, 2010). Após a fermentação, a maioria da levedura é recolhida como excedente de levedura (Priest e Stewart, 2006). Tipicamente, a quantidade total de excedente de levedura produzida na fermentação *Lager* é aproximadamente 1,7 kg/m<sup>3</sup> – 2,3 kg/m<sup>3</sup> do produto final (Ferreira *et al.*, 2010).

#### 1.3.1. Composição química do excedente de levedura *Saccharomyces*

O excedente de levedura *Saccharomyces* é rico em proteínas e hidratos de carbono. Na Tabela 3 encontra-se a composição química do excedente de levedura. As proteínas presentes neste subproduto contêm inúmeros aminoácidos, tais como, arginina,

cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e tirosina (Mussatto, 2009).

A biomassa de levedura é uma excelente fonte de vitaminas, tais como biotina, niacina, tiamina, vitamina B6, riboflavina entre outras (Mussatto, 2009).

O conteúdo total de minerais presentes no excedente de levedura é de cerca de 5-10% do peso seco celular. A fracção mineral inclui vários elementos, sendo o potássio e fósforo os que estão presentes em maior quantidade (Mussatto, 2009).

**Tabela 3** – Composição química do excedente de levedura *Saccharomyces*.

<b>Componentes (% peso seco)</b>	<b>(Priest e Stewart, 2006)</b>	<b>(Lamoolphak et al., 2006)</b>
<b>Proteínas</b>	45	48
<b>Lípidos</b>	nr*	1
<b>Cinzas</b>	<8	8
<b>Hidratos de carbono</b>	nr	36

\*nr – não referido

### 1.3.2. Potenciais aplicações do excedente de levedura *Saccharomyces*

O excedente de levedura *Saccharomyces*, segundo subproduto em maior quantidade que resulta do fabrico de cerveja, é geralmente vendido para alimentação animal, após inactivação pelo calor, mas grande parte deste subproduto é considerado como resíduo orgânico industrial (Lamoolphak et al., 2006). Este subproduto apresenta maior quantidade de proteínas, vitaminas e aminoácidos, quando comparado com a *dreche* (Mussatto, 2009). Devido às suas características nutricionais, o excedente de levedura tem sido actualmente utilizada como suplemento nutricional. Contudo, a sua utilização na alimentação humana é limitada, uma vez que a biomassa de levedura apresenta elevada quantidade ácidos nucleicos, principalmente RNA, que em humanos é metabolizado a ácido úrico, o que pode originar a gota (Ferreira et al., 2010; Mussatto, 2009; Priest e Stewart, 2006). As principais aplicações do excedente de levedura encontram-se na Tabela 4.

As células de levedura da cerveja contêm inúmeros compostos de interesse industrial que podem ser extraídos e isolados, tais como, proteínas, vitaminas,

aminoácidos, DNA, RNA e várias enzimas, em particular peptidases. A produção industrial destas enzimas é um campo a explorar (Ferreira *et al.*, 2010; Mussatto, 2009).

**Tabela 4** – Principais aplicações do excedente de levedura *Saccharomyces* (Chae *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2010; Mussatto, 2009; Priest e Stewart, 2006).

Área de aplicação	Descrição
<b>Alimentação animal</b>	Excelente para utilização na alimentação de ruminantes, suínos e aves (após inactivação) devido ao seu elevado valor nutricional, sendo fonte de proteínas e vitaminas e uma vez que constitui uma excelente fonte de azoto de baixo custo. Também tem sido estudada a sua utilização na alimentação de animais de estimação, por exemplo cães, como fonte de aminoácidos essenciais e na alimentação de peixes de aquacultura.
<b>Alimentação humana</b>	Tem sido usado como fonte de antioxidantes naturais em alimentos com elevado conteúdo em gorduras animais, bem como no fabrico de pães, bolos e certos produtos cárneos para aumentar a retenção de humidade e prolongar a frescura. Também pode ser utilizado em alimentos para crianças (até 3%) devido às suas propriedades nutricionais e na alimentação vegetariana como fonte de aminoácidos essenciais e vitaminas. Pode ainda ser utilizado como fonte de intensificadores de sabor em diversos alimentos tais como carnes, queijos e sopas.
<b>Adsorvente</b>	A biomassa de levedura pode ser usada como adsorvente de iões metálicos (chumbo, zinco, cobre e níquel), sendo utilizada na remoção de metais de águas residuais.
<b>Biotecnologia</b>	O excedente de levedura pode ser usado como substrato para o crescimento de microrganismos e para a produção de enzimas. Algumas fracções do excedente de levedura apresentam actividade antitumoral.

### 1.3.3. Peptidases da levedura da cerveja

A levedura da cerveja, que é recolhida no final da fermentação como excedente de levedura, contém várias peptidases intracelulares que podem ser isoladas e purificadas. As leveduras utilizadas na indústria cervejeira pertencem ao género *Saccharomyces*. Nesta secção, são abordadas as peptidases da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que são as peptidases de leveduras mais estudadas.

### **1.3.3.1. Peptidases – Aspectos gerais**

As peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e estão presentes em todos os organismos vivos, desempenhando diversas funções a nível fisiológico (Rawlings e Barrett, 2010; Whitaker, 2003). A clivagem enzimática de ligações peptídicas em proteínas ou péptidos é designada de hidrólise enzimática, sendo também frequentemente chamada de proteólise (Whitaker, 2003).

As peptidases têm inúmeras aplicações a nível industrial, principalmente na indústria alimentar, detergentes, na indústria têxtil, a nível médico e biotecnológico. A nível industrial as peptidases representam cerca de 60% do mercado total de enzimas (Charles *et al.*, 2008; Whitaker, 2003).

As peptidases são normalmente classificadas com base em três critérios principais: (1) tipo de reacção catalisada, (2) tipo catalítico e (3) estrutura molecular e homologia (Rawlings e Barrett, 2010).

Actualmente, são conhecidos seis tipos catalíticos de peptidases: as peptidases de cisteína, serina, treonina, ácido aspártico, ácido glutâmico e metalopeptidases. O tipo catalítico de uma peptidase diz respeito aos grupos químicos presentes no local activo e que são responsáveis pela catálise da hidrólise de ligações peptídicas. Assim, as peptidases de serina possuem um resíduo aminoácido de serina no local activo, que actua como nucleófilo, nas peptidases de cisteína o nucleófilo é um resíduo aminoácido de cisteína e nas peptidases de treonina o nucleófilo é um resíduo de treonina N-terminal. Nas peptidases de ácido aspártico, ácido glutâmico e metalopeptidases, o ataque nucleófilo é mediado por uma molécula de água, activada por dois resíduos de ácido aspártico, um resíduo de ácido glutâmico e por um ião metálico, respectivamente (Rawlings e Barrett, 2010).

Existem dois sistemas principais de classificação das peptidases: o sistema EC do NC-IUBMB e o sistema MEROPS. O sistema EC do NC-IUBMB classifica as peptidases com base no tipo de reacção catalisada, mas também tem em conta o critério adicional, tipo catalítico. De acordo com sistema EC do NC-IUBMB, as peptidases estão incluídas na subclasse 3.4, estando distribuídas por 14 sub-subclasses e podem ser classificadas em dois grandes grupos, dependendo do seu local de acção no substrato: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases actuam apenas nas regiões terminais das cadeias polipeptídicas, isto é, nos N-terminais e nos C-terminais. As exopeptidases são classificadas com base na reacção catalisada em:

- Aminopeptidases (EC 3.4.11) - Hidrólise de um único aminoácido a partir da região N-terminal da cadeia peptídica;

- Dipeptidases (EC 3.4.13) - Hidrólise de dipéptidos em aminoácidos;
- Dipeptidil peptidases e tripeptidil peptidases (EC 3.4.14) - Hidrólise de um dipéptido ou tripéptido a partir da região N-terminal da cadeia peptídica;
- Peptidil dipeptidases (EC 3.4.15) - Hidrólise de um dipéptido a partir da região C-terminal da cadeia peptídica;
- Carboxipeptidases (EC 3.4.16-18) - Hidrólise de um único aminoácido a partir da região C-terminal;
- Omega peptidases (EC 3.4.19) - Remoção de resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou ligados por ligações isopeptídicas.

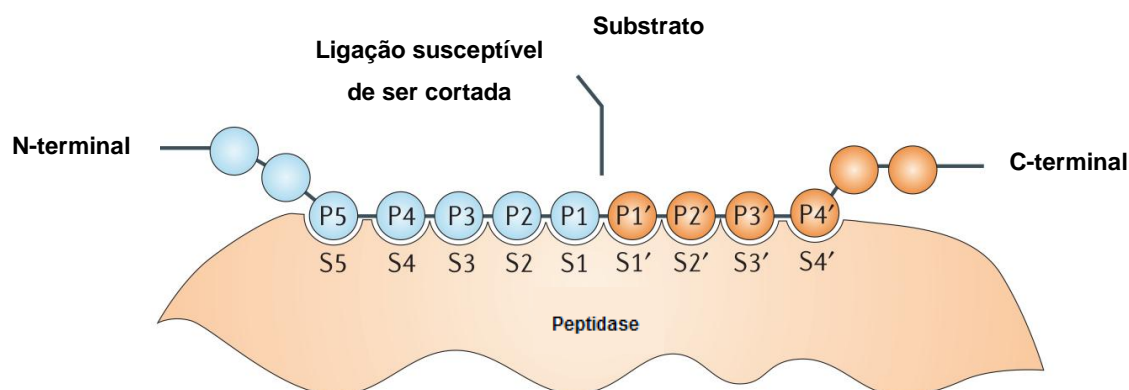
As carboxipeptidases por sua vez podem ser divididas em três grupos, de acordo com o grupo catalítico presente no local activo em: carboxipeptidases de serina (EC 3.4.16), metalocarboxipeptidases (EC 3.4.17) e carboxipeptidases de cisteína (EC 3.4.18) (NC-IUBMB, 2010).

As endopeptidases hidrolisam ligações peptídicas no interior das cadeias polipeptídicas e são classificadas de acordo com o mecanismo catalítico em: endopeptidases de serina (EC 3.4.21), endopeptidases de cisteína (EC 3.4.22), endopeptidases de ácido aspártico (EC 3.4.23), metaloendopeptidases (EC 3.4.24) e endopeptidases de treonina (EC 3.4.25). As endopeptidases cujo mecanismo catalítico ainda é desconhecido são incluídas na sub-succlasse EC 3.4.99 (NC-IUBMB, 2010).

O sistema de classificação MEROPS tem em conta o mecanismo catalítico, mas também as relações evolutivas, a sequência de aminoácidos e as características estruturais essenciais. Neste novo sistema de classificação, as peptidases que apresentam sequências de aminoácidos estatisticamente semelhantes são agrupadas em famílias. As famílias que tiveram uma origem evolucionária comum e apresentam semelhanças nas estruturas tridimensionais são agrupadas em clãs. Cada família e clã tem um identificador que mostra o tipo catalítico das peptidases do grupo: A (ácido aspártico), C (cisteína), M (metalo), S (serina), T (treonina), G (ácido glutâmico) e U (tipo catalítico desconhecido). Os clãs que incluem famílias de mais do que um tipo catalítico têm como identificador a letra P (Rawlings e Barrett, 2010). As peptidases de ácido glutâmico não são reconhecidas pelo sistema EC, sendo apenas consideradas no sistema MEROPS.

A especificidade das peptidases é normalmente difícil de definir, dependendo da natureza dos vários resíduos aminoácidos em torno da ligação peptídica a ser hidrolisada e da conformação das cadeias polipeptídicas do substrato (NC-IUBMB, 2010). Em 1967, Schechter e Berger introduziram um sistema de nomenclatura para descrever a

interacção das peptidases com os seus substratos, facilitando a descrição da especificidade de uma determinada peptidase (Ng *et al.*, 2009)(Figura 3).



**Figura 3** – Representação esquemática da interacção peptidase-substrato de acordo com a nomenclatura de Schechter e Berger (1967) (adaptado de (Turk, 2006)).

O sistema de nomenclatura de Schechter e Berger considera que os resíduos aminoácidos do substrato proteico ligam-se aos sublocais da enzima no local activo. Cada sublocal interage com apenas um resíduo aminoácido do substrato. Por convenção, os resíduos aminoácidos do substrato são designados por P e os sublocais da protease que interagem com o substrato são designados por S. Os resíduos aminoácidos do lado N-terminal da ligação peptídica a ser quebrada são numerados de  $P_n, \dots, P4, P3, P2, P1$  e os resíduos do lado C-terminal são numerados de  $P1', P2', P3', P4', \dots, P'_n$ . Os sublocais da peptidase são numerados de  $S_n, \dots, S4, S3, S2, S1, S1', S2', S3', S4', \dots, S'_n$ , para complementar cada local P (Ng *et al.*, 2009).

As peptidases não diferem apenas na sua especificidade para o substrato, mas também nos seus mecanismos de catálise. Os seis tipos catalíticos de peptidases utilizam fundamentalmente dois mecanismos de reacção diferentes para hidrólise das ligações peptídicas e estabilização do intermediário tetraédrico. Nas peptidases de serina, cisteína e treonina o nucleófilo do local catalítico é parte de um aminoácido (catálise covalente), enquanto que, nas peptidases de ácido aspártico, ácido glutâmico e metalopeptidases o nucleófilo é uma molécula de água activada (catálise ácido-base) (Turk, 2006).

### 1.3.3.2. Peptidases da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

O sistema proteolítico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido bastante estudado e inúmeras peptidases têm sido caracterizadas, uma vez que este organismo

eucariótico unicelular pode ser facilmente estudado com recurso a diversas técnicas experimentais. Além disso, têm sido encontradas relações evolutivas entre peptidases de leveduras e peptidases de organismos eucarióticos superiores, bem como, tem sido reconhecida a importância da proteólise na regulação do metabolismo celular (Jajcanin-Jozic *et al.*, 2010).

As peptidases da levedura estão envolvidas em inúmeros processos biológicos essenciais para a célula, tais como a renovação de proteínas, degradação de proteínas aberrantes, processamento de proteínas, adaptação a condições ambientais com pouca disponibilidade de azoto (Bolumar *et al.*, 2008).

As peptidases da levedura *Saccharomyces cerevisiae* podem ser incluídas em quatro grupos, dependendo do compartimento celular em que se encontram: peptidases dos vacúolos, peptidases citoplasmáticas, peptidases mitocondriais e peptidases envolvidas nas vias de secreção (Jajcanin-Jozic *et al.*, 2010). Na Tabela 5 encontram-se algumas peptidases localizadas nos diferentes compartimentos celulares, bem como o seu tipo catalítico e referências bibliográficas que descrevem as diferentes peptidases.

Os vacúolos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* contêm inúmeras peptidases: duas endopeptidases, a peptidase A e a peptidase B; duas carboxipeptidases, a carboxipeptidase C e a carboxipeptidase S; aminopeptidases, tais como a aminopeptidase I e a aminopeptidase Y e dipeptidil aminopeptidases, tais como a dipeptidil aminopeptidase B (Flores *et al.*, 1999; Hutter *et al.*, 2005; Jones, 1991; Jones, 2002; Schlee *et al.*, 2006). As endopeptidases, carboxipeptidases e aminopeptidases são solúveis (Jones, 2002) e a dipeptidil aminopeptidase B encontra-se integrada na membrana vacuolar (Li e Kane, 2009).

As peptidases vacuolares constituem o grupo de peptidases mais numeroso e desempenham diversas funções essenciais a nível fisiológico (Bolumar *et al.*, 2008). As peptidases A e B, mas principalmente, a peptidase A catalisa clivagens que resultam na maturação de precursores e activação de zimogénios de peptidases vacuolares (Flores *et al.*, 1999; Hutter *et al.*, 2005; Jones, 1991). As peptidases vacuolares estão também envolvidas na degradação de proteínas, particularmente em condições de stress nutricional (Flores *et al.*, 1999; Jones, 1991; Van Den Hazel *et al.*, 1996; Wolf, 2004). A proteólise vacuolar é essencial para a degradação de proteínas para obtenção de aminoácidos, azoto e carbono em condições de stress nutricional (Wolf, 2004). Na ausência de peptidases vacuolares, as células de levedura não sobreviriam em más condições nutricionais (Yasuhara *et al.*, 1994).

**Tabela 5** – Peptidases da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Localização celular	Peptidases	Tipo catalítico	Referências
Vacúolos	Peptidase A	Ácido aspártico	(Jones, 1991; Parr <i>et al.</i> , 2007; Rawlings e Barrett, 2010)
	Peptidase B	Serina	(Hutter <i>et al.</i> , 2005; Jones, 1991; Rawlings e Barrett, 2010; Van Den Hazel <i>et al.</i> , 1996)
	Carboxipeptidase Y	Serina	(Jones, 1991; Rawlings e Barrett, 2010; Van Den Hazel <i>et al.</i> , 1996)
	Carboxipeptidase S	Metalopeptidase	(Jones, 1991; Rawlings e Barrett, 2010; Spormann <i>et al.</i> , 1991)
	Amino-peptidase I	Metalopeptidase	(Jones, 1991; Rawlings e Barrett, 2010)
	Amino-peptidase Y	Metalopeptidase	(Jones, 1991; Rawlings e Barrett, 2010; Yasuhara <i>et al.</i> , 1994)
	Dipeptidil amino-peptidase B	Serina	(Jones, 1991; Rawlings e Barrett, 2010)
Citoplasma	Peptidases do Proteossoma	Treonina	(Rawlings e Barrett, 2010)
	Dipeptidil peptidase III	Metalopeptidase	(Jajcanin-Jozic <i>et al.</i> , 2010; Rawlings e Barrett, 2010)
	Peptidase D	Metalopeptidase	(NC-IUBMB, 2010; Rawlings e Barrett, 2010)
	Aspartil amino-peptidase	Metalopeptidase	(Sarry <i>et al.</i> , 2007; Yokoyama <i>et al.</i> , 2006)
Mitocôndria	MPP	Metalopeptidase	(Koppen e Langer, 2007; Rawlings e Barrett, 2010)
	Pim1	Serina	
	Lap3	Cisteína	
	Oma1	Metalopeptidase	
Vias de secreção	Kex carboxipeptidase	Serina	(Hauptmann e Lehle, 2008)
	Yapsin-1	Ácido aspártico	(Gagnon-Arsenault <i>et al.</i> , 2008; Sievi <i>et al.</i> , 2001)

Em geral, as peptidases vacuolares são relativamente inespecíficas e são responsáveis pela degradação de vários tipos de proteínas (Hutter *et al.*, 2005; Li e Kane, 2009). O controlo da actividade proteolítica vacuolar é essencial para prevenir a proteólise descontrolada, que pode por em causa as funções essenciais à vida da célula. Portanto, a maioria das peptidases são sintetizadas na forma de precursores inactivos

(zimogénios) e transportadas até ao vacúolo, onde são posteriormente activadas por clivagem proteolítica (Hutter *et al.*, 2005; Li e Kane, 2009; Rupp e Wolf, 1995; Wolff *et al.*, 1996).

As peptidases do proteossoma encontram-se no citoplasma das células de levedura (Flores *et al.*, 1999; Jajcanin-Jozic *et al.*, 2010). O proteossoma é um complexo multicatalítico que contém várias peptidases, sendo responsável pela renovação de proteínas intracelulares, incluindo proteínas marcadas para a degradação por poliubiquitinação (Rawlings e Barrett, 2010). O proteossoma é responsável pela clivagem específica de proteínas e está envolvido na degradação específica de proteínas em condições de stress (Flores *et al.*, 1999; Hilt e Wolf, 1992; Hutter *et al.*, 2005).

As peptidases mitocondriais estão presentes em vários subcompartimentos da mitocôndria, tais como a matriz mitocondrial (MPP e Pim1), membrana interna (Oma1) e espaço intermembranar (Lap3) e desempenham várias funções essenciais, em particular, na regulação da biogénese mitocondrial e no controlo de qualidade de proteínas mitocondriais (Koppen e Langer, 2007).

Existem inúmeras proteínas e péptidos, essenciais para a regulação da actividade biológica, que são inicialmente secretados como precursores inactivos e que são posteriormente convertidos em formas activas, nas vias de secreção pela acção de peptidases (Henrich *et al.*, 2005). As peptidases envolvidas nas vias de secreção estão localizadas principalmente no complexo de Golgi e na membrana plasmática (Flores *et al.*, 1999). A kex carboxipetidase é uma peptidase que se localiza na membrana do complexo de Golgi e está envolvida na morte celular (Hauptmann e Lehle, 2008). A yapsin-1 é uma peptidase localizada na membrana plasmática, que pode estar envolvida na activação de enzimas periplasmáticas e de proteínas implicadas na construção da parede celular (Gagnon-Arsenault *et al.*, 2008).

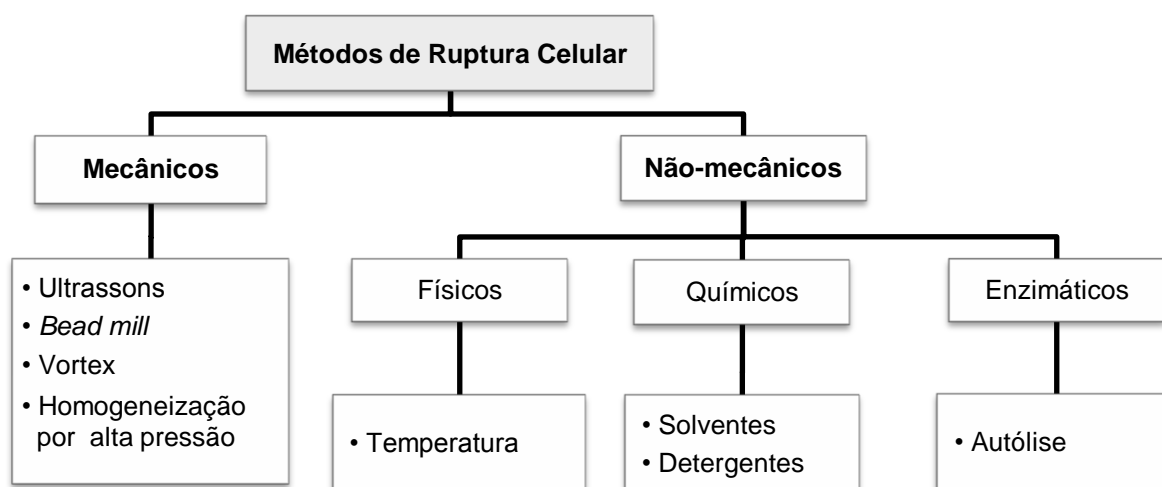
### **1.3.3.3.Extracção de peptidases de leveduras**

A disrupção das células de leveduras é uma etapa importante para a extracção de bioprodutos de interesse industrial, em particular de peptidases, que estão presentes no interior das células (Shynkaryk *et al.*, 2009), uma vez que as células de levedura apresentam paredes celulares, o que constitui uma barreira natural à libertação de macromoléculas para o meio de cultura (Ricci-Silva *et al.*, 2000).

Os métodos de ruptura celular podem ser classificados de uma forma geral em mecânicos e não mecânicos (Figura 4) (Balasundaram *et al.*, 2009).

Os métodos mecânicos frequentemente utilizados na ruptura de células de leveduras, para obtenção de enzimas intracelulares incluem técnicas como, *Bead mill* (Ricci-Silva *et al.*, 2000; Vangaver e Huyghebaert, 1991), ultrassons (Balasundaram e Pandit, 2001; Okungbowa *et al.*, 2007), agitação em vortex utilizando esferas de vidro (Bolumar *et al.*, 2005; Bolumar *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2006; Okungbowa *et al.*, 2007; Tanimizu e Hayashi, 1996; Yokoyama *et al.*, 2006) e homogeneização por alta pressão (Balasundaram e Harrison, 2006; Balasundaram e Pandit, 2001; Meussdoerffer *et al.*, 1980). Os métodos não mecânicos incluem físicos (temperatura), métodos químicos (com utilização de solventes e detergentes) e enzimáticos (autólise) (Apar e Ozbek, 2008; Geciova *et al.*, 2002).

Os diferentes métodos químicos (solventes, temperatura e autólise) são muitas vezes combinados para melhorar a eficiência (Breddam e Beenfeldt, 1991; Yokoi *et al.*, 1996). Autólise é o termo que descreve a ruptura dos constituintes celulares por acção de enzimas endógenas. Este processo ocorre naturalmente nas leveduras, quando completam o seu ciclo de crescimento e entram em fase de morte, ou em condições de stress nutricional. No entanto, este processo pode ser induzido pela exposição das células a solventes orgânicos e a temperaturas altas. O controlo da temperatura é essencial para impedir a desnaturação das enzimas (Hernawan e Fleet, 1995).



**Figura 4** – Métodos de ruptura celular utilizados na obtenção das peptidases intracelulares de leveduras.

Os métodos mecânicos apresentam uma elevada eficiência comparativamente com os métodos não mecânicos. A homogeneização por alta pressão e *Bead mill* são técnicas utilizadas a nível industrial (Balasundaram *et al.*, 2009). A técnica *Bead mill* é semelhante à técnica de agitação em vortex com esferas de vidro, mas a agitação com esferas de vidro em vortex apenas é aplicável à escala laboratorial, tal como a técnica de ultrassons (Balasundaram *et al.*, 2009; Geciova *et al.*, 2002). Os métodos mecânicos apesar de eficientes apresentam alguns inconvenientes, uma vez que são pouco selectivos e conduzem a um aumento de temperatura, o que requer um sistema de refrigeração adequado, para evitar a desnaturação das enzimas pelo calor. Algumas técnicas, tais como *Bead mill* e homogeneização requerem equipamentos específicos (Balasundaram *et al.*, 2009).

Os métodos não mecânicos apesar de apresentarem menor eficiência relativamente aos métodos mecânicos, não requerem equipamentos específicos. Os métodos químicos e enzimáticos são aplicáveis apenas à escala laboratorial, devido a limitações económicas associadas ao elevado custo dos reagentes necessários para a ruptura a larga escala, bem como, devido à dificuldade em remover esses reagentes do produto de interesse. A exposição das enzimas a agentes químicos pode conduzir à desnaturação (Balasundaram *et al.*, 2009).

#### **1.3.3.4. Inibidores de peptidases**

Os inibidores são moléculas que se ligam às enzimas e interferem com a catálise, reduzindo ou eliminando a actividade enzimática. Os inibidores de peptidases podem ser naturais (endógenos) ou sintéticos (Beynon e Bond, 2001).

Os inibidores naturais são encontrados naturalmente nos organismos vivos, sendo responsáveis pela regulação da proteólise *in vivo* (Beynon e Bond, 2001; García-Carreño, 1996). Os inibidores naturais são maioritariamente inibidores reversíveis. As peptidases A e B e a carboxipeptidase Y, localizadas nos vacúolos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, têm inibidores específicos localizados no citoplasma. A diferente localização destas peptidases activas e dos seus inibidores sugere, que os inibidores são responsáveis pela regulação da actividade das peptidases na levedura (Tanimizu e Hayashi, 1996)

Os inibidores sintéticos, que são produzidos no laboratório e podem ser utilizados na caracterização de peptidases e administrados como fármacos, (Rawlings *et al.*, 2004),

por exemplo a inibição da retropepsina do vírus HIV (García-Carreño, 1996; Rawlings e Barrett, 2010). Os inibidores sintéticos são maioritariamente irreversíveis e são utilizados na determinação do tipo catalítico das peptidases (García-Carreño, 1996). Os principais inibidores utilizados nos ensaios de determinação do tipo catalítico das peptidases encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6** – Inibidores utilizados na determinação dos quatro principais tipos catalíticos de peptidases encontrados na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Beynon e Bond, 2001; Rawlings e Barrett, 2010).

Tipo catalítico	Exemplo(s) de Peptidase(s)	Principal(is) Inibidor(es)
Peptidases de Serina	Kex carboxipeptidase Carboxipeptidase Y Peptidase B	PMSF DFP 3,4-DCI
Peptidases de Cisteína	Lap3 ATG4 peptidase calpain-7	E-64
Peptidases de Ácido Aspártico	Peptidase A Yapsin-1 barrierpepsina	Pepstatina A
Metalopeptidases	Aspartil aminopeptidase Carboxipeptidase S Aminopeptidase Y	EDTA 1,10-fenantrolina

PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonilo); DFP (Diisopropilfluorofosfato), 3,4-DCI (3,4- Dicloroisocoumarina); E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucilamido(4-guanidino)butano); EDTA (Ácido etilenodiaminotetraacético).

## 2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

A hidrólise enzimática de proteínas pela acção de peptidases, para obtenção de péptidos de vários tamanhos e aminoácidos é muito importante na indústria alimentar e a nível biotecnológico (Kunst, 2003; Pericin *et al.*, 2009). A hidrólise enzimática apresenta vantagens em relação à hidrólise química, pois é muito mais suave, não causa destruição de aminoácidos e é muito mais específica, uma vez que é possível escolher as peptidases que clivam ligações peptídicas específicas (Kunst, 2003).

A hidrólise enzimática produz alterações das propriedades moleculares das proteínas, conduzindo à diminuição do peso molecular, ao aumento do número de grupos ionizáveis e à exposição de grupos hidrofóbicos e dos aminoácidos das cadeias laterais (Benitez *et al.*, 2008; Kunst, 2003). Assim, as propriedades dos hidrolisados diferem muito das propriedades da(s) proteína(s) original(is) (Kunst, 2003).

Os hidrolisados de proteínas têm inúmeras aplicações a nível alimentar e terapêutico devido às suas propriedades nutricionais e funcionais (Kunst, 2003; Rutherford, 2010). A hidrólise enzimática pode produzir péptidos bioactivos com efeitos anti-hipertensivos, antioxidantes, hipocolesterolémicos, antitrombóticos, imunomodulatórios e antimicrobianos (Rutherford, 2010). Os hidrolisados podem ser usados em suplementos alimentares como fonte de azoto e aminoácidos essenciais. A hidrólise enzimática melhora a digestibilidade das proteínas e permite obter hidrolisados com uma determinada composição em aminoácidos, por exemplo, hidrolisados com elevado conteúdo em glutamina, necessária em períodos de stress físico (Kunst, 2003; Rutherford, 2010). A hidrólise enzimática também produz alterações de propriedades funcionais, tais como, a solubilidade, viscosidade, emulsificação, formação de espuma e propriedades organolépticas (Kunst, 2003; van der Ven *et al.*, 2001).

Os subprodutos da indústria cervejeira, em particular, a *dreche* e o excedente de levedura, podem ser utilizados na obtenção de hidrolisados. As proteínas da *dreche* podem ser utilizadas como substrato para peptidases, na obtenção de hidrolisados. As proteínas da *dreche* são na sua maioria insolúveis. A hidrólise enzimática de proteínas insolúveis é importante para aumentar as suas potenciais aplicações (Celus *et al.*, 2007). Celus e colaboradores (Celus *et al.*, 2007; Celus *et al.*, 2009) descreveram a hidrólise enzimática das proteínas da *dreche* com peptidases comerciais. A hidrólise enzimática das proteínas da *dreche* melhorou as propriedades funcionais, tais como a emulsificação e formação de espuma. Treimo e colaboradores (Treimo *et al.*, 2008) também utilizaram

peptidases comerciais para solubilizar as proteínas da *dreche*. Os hidrolisados obtidos apresentaram elevado conteúdo em proteínas (mais de 60% de proteínas).

O excedente de levedura pode ser utilizado como fonte de peptidases, para obtenção de hidrolisados de proteínas. Roy e colaboradores (Roy *et al.*, 2000) estudaram a obtenção de hidrolisados a partir das proteínas do leite com peptidases presentes em extractos enzimáticos de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A peptidase B, presente nos extractos enzimáticos, permitiu a obtenção de hidrolisados com actividade inibidora da enzima de conversão da angiotensina I. Neklyudov e colaboradores (Neklyudov *et al.*, 1996; Neklyudov *et al.*, 1998) utilizaram a levedura da cerveja, em particular, a levedura *Saccharomyces carlsbergensis*, como fonte de peptidases para obtenção de hidrolisados a partir de proteínas de sangue animal. Os hidrolisados obtidos são ricos em aminoácidos essenciais, como por exemplo, a isoleucina. As peptidases das leveduras podem ser utilizadas na hidrólise de proteínas intracelulares das leveduras, por um processo designado de autólise (Neklyudov *et al.*, 2000).

Existem várias técnicas que permitem determinar a hidrólise enzimática de proteínas, tais como, a quantificação espectrofotométrica dos péptidos e aminoácidos solúveis em ácido tricloroacético, a quantificação dos grupos amina libertados durante a hidrólise, com a utilização de reagentes, como o TNBS e a quantificação de protões libertados durante a hidrólise pela técnica *pH-stat*. Essas técnicas foram revistas por Silvestre, Benítez e colaboradores e por Rutherford (Benitez *et al.*, 2008; Rutherford, 2010; Silvestre, 1997).

## **2.1. FACTORES QUE AFECTAM A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS**

A hidrólise enzimática de proteínas depende de vários factores, tais como, o tipo de peptidase, as características físicas e químicas das proteínas utilizadas como substrato e as condições de hidrólise (Benitez *et al.*, 2008; Kunst, 2003; Pericin *et al.*, 2009).

### **2.1.1. Peptidases**

O tipo de peptidase que se utiliza na hidrólise das proteínas é importante, uma vez que as peptidases apresentam especificidades diferentes, influenciando não só a

extensão da hidrólise, mas também o tipo de péptidos produzidos (Benitez *et al.*, 2008). As peptidases com uma especificidade mais ampla em geral hidrolisam em maior extensão as proteínas utilizadas como substrato (Kunst, 2003).

### **2.1.2. Substrato**

As sequências de aminoácidos e a estrutura tridimensional das proteínas utilizadas como substrato determinam as propriedades funcionais dos hidrolisados, bem como a facilidade e extensão em que são hidrolisadas. As proteínas com elevado conteúdo em aminoácidos hidrofóbicos são mais facilmente hidrolisadas por peptidases que clivam ligações peptídicas após aminoácidos hidrofóbicos. A estrutura das proteínas no estado nativo, a sua solubilidade e o estado de desnaturação também afectam a hidrólise. As proteínas globulares no estado nativo geralmente são geralmente mais difíceis de hidrolisar, uma vez que a estrutura terciária compacta protege a maioria das ligações peptídicas. Na forma desnaturada, as ligações peptídicas estão mais expostas, o que faz com que as proteínas desnaturadas sejam mais facilmente hidrolisadas. Muitas vezes as proteínas são sujeitas a tratamentos prévios pelo calor para aumentar a sua degradação (Benitez *et al.*, 2008; Kunst, 2003). Contudo a excessiva desnaturação, diminui a solubilidade das proteínas devido à agregação molecular, conduzindo a uma ligeira diminuição da extensão da hidrólise (Kunst, 2003).

### **2.1.3. Condições de hidrólise**

As condições de hidrólise tais como o pH, temperatura, concentração de enzima, concentração de substrato e o tempo são muito importantes na obtenção de hidrolisados (Benitez *et al.*, 2008; Kunst, 2003; Pericin *et al.*, 2009). Os quatro primeiros factores determinam a velocidade da reacção e podem influenciar a especificidade da enzima, mas o tempo de reacção apenas determina o grau final da hidrólise (Benitez *et al.*, 2008).

As peptidases apresentam um pH óptimo de actividade (ou um intervalo de pH) no qual a sua actividade é máxima. Para valores de pH superiores ou inferiores ao pH

ótimo, a velocidade de reacção diminui, podendo para valores extremamente altos ou baixos de pH ocorrer desnaturação enzimática (Copeland, 2000).

O pH ótimo de uma peptidase normalmente reflecte o pH do local onde ela se encontra (Fox, 2003). Assim, normalmente o pH ótimo de actuação das peptidases das leveduras indica o compartimento celular onde elas actuam, por exemplo, as peptidases intracelulares com actividade ótima a pH ácido devem estar localizadas nos vacúolos. Contudo, quando são utilizados substratos “não-fisiológicos”, como por exemplo a caseína, podem ser verificadas diferenças significativas no valor de pH ótimo (North, 1982).

As peptidases de ácido aspártico geralmente apresentam actividade ótima a valores de pH ácido (2-5), as peptidases de cisteína apresentam actividade ótima a valores de pH entre 4-7, as de serina a pH 7-9 e as metalopeptidases são geralmente activas a pH 7-9, apresentando actividade ótima geralmente a pH neutro (Wilhite *et al.*, 2000). A maioria das peptidases de serina é activa na zona de pH alcalino, sendo frequentemente designadas de peptidases alcalinas. Contudo, existem peptidases de serina, como é o caso da carboxipeptidase y e a kex carboxipeptidase presentes na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, são activas a pH ácido, apresentando pH ótimo de actuação a pH 4,5-6 (NC-IUBMB, 2010; Rawlings e Barrett, 2010).

As temperaturas baixas tornam as enzimas praticamente inactivas devido à compactação das moléculas enzimáticas. A partir de uma temperatura mínima, abaixo da qual a actividade é nula, a velocidade da reacção aumenta com a temperatura até um valor ótimo. A elevação da temperatura aumenta a energia cinética das moléculas e consequentemente a frequência de colisões entre as moléculas, mais moléculas adquirem energia suficiente para atingir o estado de transição, aumentando assim a velocidade de reacção. A partir do valor de temperatura ótima verifica-se um declínio da velocidade de reacção, portanto uma diminuição da actividade enzimática, até se anular completamente, uma vez que as temperaturas elevadas provocam a desnaturação das enzimas. Esta diminuição é devida à alteração da estrutura terciária das enzimas a temperaturas elevadas. O intervalo de temperaturas em que uma enzima se mantém estável e com actividade catalítica depende da temperatura das células onde se encontra (Fox, 2003; Murray, 2003).



# Capítulo II - Materiais e Métodos

## 1. MATERIAIS

### 1.1. Amostras

Os dois subprodutos resultantes do fabrico da cerveja, *dreche* e excedente de levedura utilizados neste trabalho, foram fornecidos pela indústria cervejeira UNICER, sediada em Leça do Balio, Portugal.

As amostras (*dreche* e levedura) foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , imediatamente após a sua receção. A descongelação foi feita no próprio dia da sua utilização, no frigorífico a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 1.2. Reagentes e soluções

Os reagentes, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, ácido cítrico, caseína, ácido tricloroacético, glicina, fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de sódio dibásico dihidratado, BSA e inibidores sintéticos das peptidases (EDTA, Bestatina, E-64, PMSF e Pepstatina A) foram adquiridos à Sigma. O sulfato de amónio, L-tirosina, Tris, ácido clorídrico, acetonitrilo e ácido trifluoroacético foram adquiridos à Merck.

O reagente de Bradford foi adquirido à Bio-Rad e as esferas de vidro de 5 mm de diâmetro (Lenz) foram adquiridas à VWR. As membranas de ultrafiltração Amicon® Ultra - 15 de MWCO 10 kDa foram adquiridas à Milipore.

As peptidases comerciais utilizadas no trabalho foram a Alcalase® e a Protamex®. A Alcalase® (Calbiochem®) foi adquirida pela Merck. A Alcalase® é uma endopeptidase de serina (EC 3.4.21.62), produzida por *Bacillus licheniformis*, com

actividade óptima a pH 6-10 e a temperaturas entre 50 e 70°C (Santos *et al.*, 2009a). A actividade enzimática desta preparação é de 3,03 U/ml.

A Protamex® é produzida pela Novozymes e foi adquirida pela Sigma. Protamex® é uma mistura de Alcalase® e Neutrase® (Treimo *et al.*, 2008). A Neutrase® é uma metalopeptidase (EC 3.4.24.28) produzida por espécies de *Bacillus*. A actividade óptima da Protamex® é a pH 5,5-7,5 e a temperatura de 35-60°C (Liaset *et al.*, 2002). A sua actividade enzimática é de 1,5 U/g.

### 1.3. Equipamentos

Foi utilizada uma balança de humidade (SCALTEC SMO 01, Scaltec Instruments), um eléctrodo de pH (pH-Meter Basic 20+, Crison Instruments), uma centrífuga refrigerada (5810R, eppendorf®), um espectrofotómetro (UV-16A, UV-Vis, Shimadzu Corporation), um banho (1083GFL, Labolan) e um vortex mixer (ZX3, Velp Scientifica).

O equipamento de HPLC utilizado era da marca Gilson (Gilson Medical Electronics) e estava equipado com uma bomba do tipo 302, uma bomba do tipo 305, um injectador Rheodyne 7125, com um loop de 20 µL e com um detector UV Gilson 118. A coluna utilizada, foi uma coluna de fase reversa *Chrompack P 300 RP* com um revestimento de polistireno-divinilbenzeno (8 µm, 300 Å, 150 x 4.6 I.D.). O equipamento foi controlado por um software Gilson 712.

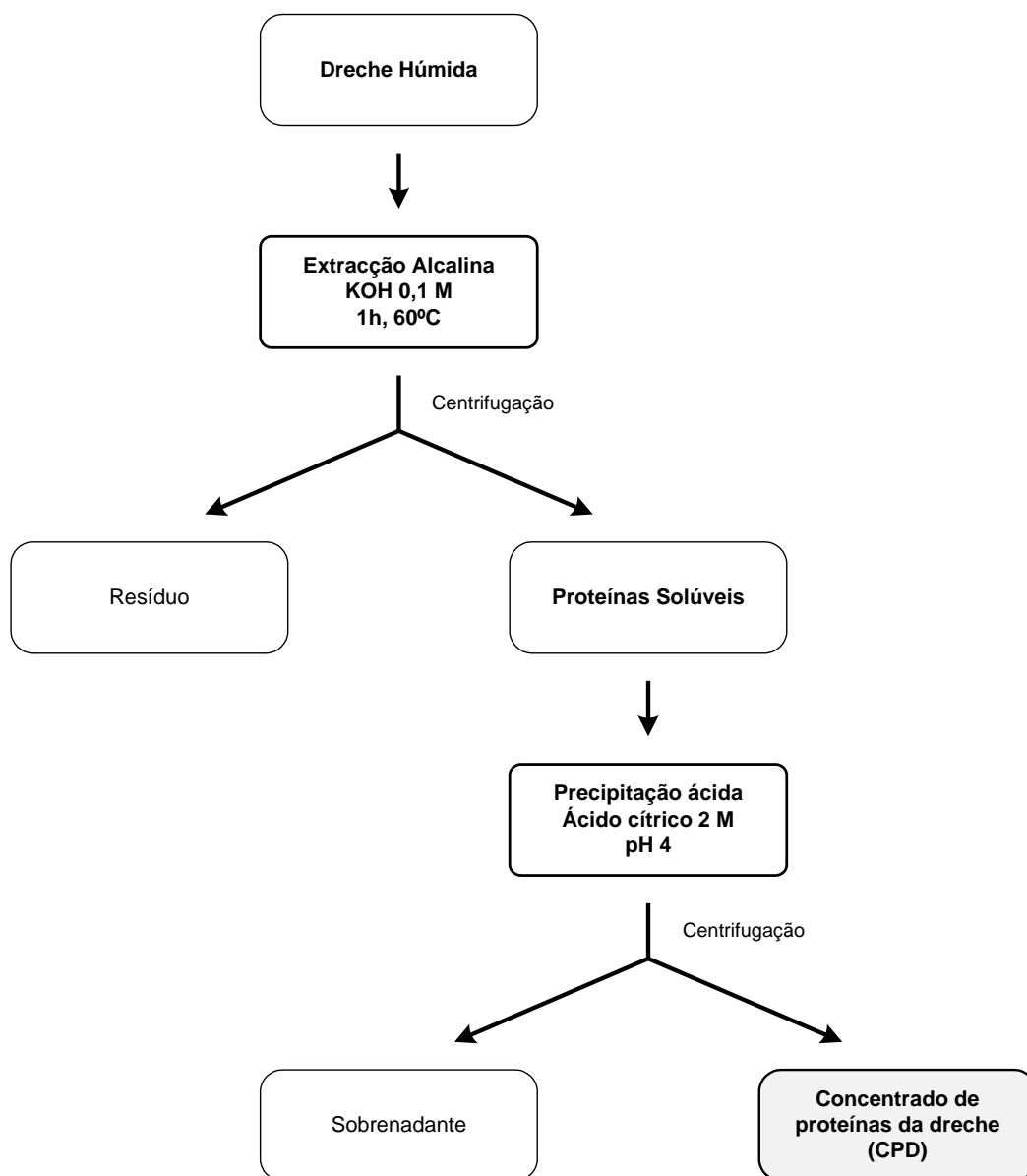
## 2. MÉTODOS

### 2.1. Extracção das proteínas da *dreche* e obtenção do CPD

O método utilizado para a extracção das proteínas da *dreche* foi uma adaptação do método descrito por Celus e colaboradores (Celus *et al.*, 2007). O procedimento de extracção das proteínas da *dreche* e obtenção do CPD está ilustrado na Figura 5.

O CPD foi preparado por extracção alcalina da *dreche* húmida com KOH 0,1 M (43% (p/v)), durante 60 minutos, a 60°C e com agitação. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 15000xg, durante 15 minutos a 4°C. As proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas por acidificação a pH 4, com ácido cítrico 2 M.

Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 15000xg, durante 15 minutos a 4°C. O precipitado rico em proteínas foi recolhido e liofilizado, sendo designado de concentrado de proteínas da *dreche* (CPD). A quantidade de azoto total presente no precipitado foi determinada pelo método de Kjeldahl e o teor de humidade também foi determinado.



**Figura 5** – Procedimento para extração das proteínas da *dreche* e obtenção do CPD.

## 2.2. Determinação da solubilidade das proteínas presentes no CPD

A solubilidade das proteínas presentes no CPD foi determinada de acordo com o método descrito por Celus e colaboradores (Celus *et al.*, 2007), com algumas modificações. Na avaliação da solubilidade das proteínas do CPD em função do pH, 0,6 g de CPD foram dispersas em 20 ml de soluções tampão de concentração 100 mM (tampão acetato de sódio para pH 5, tampão fosfato de sódio para pH 6 e 7, tampão Tris-HCl para pH 8 e tampão glicina-NaOH para pH 9 e 10). O pH das diferentes suspensões foi ajustado, se necessário, e em seguida as suspensões foram agitadas durante 60 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 15000xg, durante 15 minutos a 4°C. A quantidade de proteína presente no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford. A solubilidade foi expressa como a percentagem (%) de proteína no sobrenadante relativa à quantidade de proteína presente no CPD, sendo calculada da seguinte forma:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Proteína presente no sobrenadante}}{\text{Proteína presente na amostra de CPD}} \times 100$$

## 2.3. Determinação do azoto total - Método de Kjeldahl

O teor total em azoto presente nas amostras sólidas foi determinado pelo método de Kjeldahl de acordo com o método oficial da AOAC 945.39. O conteúdo em proteína foi determinado pelo teor em azoto, utilizando o factor de conversão de 6.25 (Treimo *et al.*, 2008). As determinações foram realizadas em duplicado.

## 2.4. Método de Bradford

A quantificação da proteína solúvel foi realizada pelo método descrito por Bradford (Bradford, 1976). A BSA (1mg/ml) foi utilizada como padrão. As determinações foram realizadas em triplicado.

## 2.5. Determinação da humidade

A humidade das amostras de *dreche* e do CPD foi determinada com auxílio de uma balança de humidade, a uma temperatura de 100°C. As análises foram feitas em duplicado.

## 2.6. Extracção e concentração das peptidases da levedura da cerveja

Efectuou-se a pesagem de 15 – 17 g de suspensão de células de levedura para um tubo de Falcon e em seguida foi realizada uma centrifugação a 5000xg, durante 5 minutos, para remover restos de cerveja. O *pellet* de células foi pesado e lavado duas vezes em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7 na proporção de 1:1 (células:tampão, p/v) por centrifugação a 5000xg durante 5 minutos.

O método para extracção das peptidases foi realizado com base no procedimento descrito por Kato e colaboradores (Kato et al., 2006), com algumas modificações. O *pellet* de células lavado foi novamente pesado, ressuspendido em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7 e foram adicionadas esferas de vidro à suspensão celular, na proporção de 1:1:1 (células:tampão:esferas, p/v/p). A disrupção celular foi realizada por agitação no vortex 10 vezes (1 minuto cada) com intervalos de 1 minuto no gelo. Após a remoção das esferas de vidro, foi realizada uma centrifugação a 15000xg durante 40 minutos. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi diluído em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7, na proporção (1:2). Em seguida, foi adicionado sulfato de amónio de forma a obter 90% (p/v) de saturação e a mistura foi mantida sobre agitação suave durante 2 horas. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 10000xg, durante 30 min, a 4°C, e em seguida foi redissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7. Em seguida, a fracção enzimática presente foi dessalinizada e concentrada por ultrafiltração, utilizando membranas Amicon® (MWCO = 10 kDa). O extracto enzimático concentrado foi guardado a -20°C até à sua utilização. Todas as operações foram realizadas a 4°C. A actividade proteolítica foi determinada pelo método de hidrólise da caseína.

## 2.7. Determinação da actividade proteolítica – Método de hidrólise da caseína

O método de hidrólise da caseína foi utilizado para a determinação da actividade proteolítica do extracto enzimático obtido, bem como, para a verificação da influência do pH na actividade das peptidases da levedura da cerveja.

O método de hidrólise da caseína foi também utilizado para determinação da actividade proteolítica das preparações enzimáticas comerciais Alcalase® e Protamex®, uma vez que é difícil saber a quantidade de peptidases presentes nas preparações comerciais, pois não são preparações totalmente puras.

A solução de caseína foi preparada segundo o método descrito por Whitaker (Whitaker, 2003). A solução *stock* de caseína foi preparada por suspensão de 5 g de caseína em 100 ml de água destilada e foram adicionados 0,5 ml de uma solução de NaOH 5 M e em seguida, foi aquecida a 90°C durante 15 minutos, com agitação. Após arrefecimento, a solução de caseína foi armazenada no frigorífico durante cerca de uma semana. Imediatamente antes da sua utilização, foi preparada uma solução de caseína de concentração 1% (p/v) a partir da solução *stock*, no tampão adequado de concentração 100 mM (tampão acetato de sódio para pH 5, tampão fosfato de sódio para pH 6 e 7, tampão Tris-HCl para pH 8 e tampão glicina-NaOH para pH 9 e 10).

O ensaio de hidrólise da caseína foi realizado por modificação dos métodos descritos por Treimo e colaboradores (Treimo et al., 2008) e por Whitaker (Whitaker, 2003). Para o ensaio de determinação da actividade proteolítica, 1 ml de substrato e tampão (800 µl nos tubos para o extracto enzimático e 980 µl nos tubos para as peptidases comerciais) foram adicionados em cada tubo de ensaio e incubados durante 5 minutos à temperatura de 37°C. A reacção foi iniciada após a adição de 200 µl de extracto enzimático. No caso das preparações comerciais, foram adicionados 20 µl de uma preparação com 0,006 U. O volume de extracto enzimático adicionado foi maior, uma vez que a preparação das peptidases da levedura da cerveja não é tão concentrada como as preparações comerciais. Após 30 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados 3 ml de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) gelado [100 mM TCA, 1,9% (v/v) ácido acético e 220 mM de acetato de sódio]. Os tubos foram mantidos em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente, para completar a precipitação dos produtos insolúveis em TCA (substrato não digerido e polipéptidos de peso molecular elevado). Em seguida, o precipitado foi removido por centrifugação a 10000xg, durante 10 minutos. A quantidade de péptidos solúveis em TCA foi medida espectrofotometricamente a 280 nm. Os ensaios foram realizados em duplicado e os

brancos foram preparados pela adição de 3 ml da solução de TCA antes da adição das enzimas. Também foram realizados controlos, com a adição de enzimas e sem adição de substrato, assim como, controlos em que foi adicionado substrato e sem adição de enzima.

A actividade proteolítica foi expressa em termos de variação de absorvência ou foi convertida em unidades de actividade (U) pela seguinte fórmula:

$$U = \frac{\mu\text{mol de L-tirosina equivalente} \times V_t}{V_e \times T} \times \text{FD}$$

onde,  $\mu\text{mol de L-tirosina equivalente}$  é calculado a partir da recta padrão de L-tirosina ( $\mu\text{mol de L-tirosina} = 1,340 \text{ Abs } 280 \text{ nm} - 0,00415$ );  $V_t$  = Volume total do ensaio (ml);  $V_e$  = Volume de preparação enzimática (ml);  $T$  = Tempo de ensaio (min); e  $\text{FD}$  = Factor de diluição.

Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar o equivalente a 1  $\mu\text{mol}$  de L-tirosina por minuto nas condições do ensaio. A quantidade de tirosina foi determinada a partir de uma recta padrão de L-tirosina, utilizando uma solução de L-tirosina 1,1 mM.

## 2.8. Hidrólise enzimática das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja e pelas peptidases comerciais, Alcalase® e Protamex®

Para obtenção dos hidrolisados das proteínas da *dreche*, a amostra de CPD foi solubilizada em tampão Tris-HCl, a pH 8 [3% (p/v)], durante 60 minutos, à temperatura ambiente, para solubilizar todas as proteínas presentes no CPD. Após a solubilização, foi realizada uma centrifugação (15000xg durante 15 minutos a 4°C). O sobrenadante foi recolhido e foi determinada a concentração de proteína pelo método de Bradford. Em seguida, o sobrenadante foi diluído de forma a ter uma solução de CPD, com uma concentração de proteína de 2 mg/ml, a qual foi utilizada como substrato para as peptidases.

A hidrólise das proteínas da *dreche* foi realizada pelo mesmo procedimento descrito para a hidrólise da caseína (em 2.7). O método utilizado para a determinação da

hidrólise das proteínas da *dreche* é baseado na determinação dos péptidos e aminoácidos solúveis em TCA, que resultaram da hidrólise das proteínas da *dreche* e foram quantificados a 280 nm. Nota: a actividade para a caseína não corresponde necessariamente à actividade para as proteínas da *dreche*, nas condições de hidrólise utilizadas neste estudo.

### **2.9. Efeito da concentração de peptidases da levedura da cerveja e da concentração de substrato na hidrólise das proteínas da dreche**

Para verificar o efeito da concentração de peptidases da levedura da cerveja, na hidrólise das proteínas da *dreche*, foram utilizados dois volumes diferentes de extracto enzimático, 200 µl e 500 µl, e uma concentração de substrato de 5 mg/ml. Para verificar o efeito da concentração de substrato (proteínas da *dreche*) na hidrólise das proteínas da *dreche*, foram utilizadas duas concentrações diferentes de substrato, 2 mg/ml e 5 mg/ml, e um volume de extracto enzimático de 200 µl. A hidrólise foi realizada a pH 8 e a 37°C, utilizando o procedimento descrito em 2.8. A actividade foi expressa em termos de variação de absorvência a 280 nm.

### **2.10. Efeito do pH na hidrólise das proteínas da dreche**

Para determinar o efeito do pH, bem como, o pH óptimo de hidrólise, a hidrólise das proteínas da *dreche* foi realizada a 37°C e a diferentes valores de pH (5-10), utilizando as seguintes soluções tampão na concentração de 100 mM: tampão acetato de sódio (pH 5), fosfato de sódio (pH 6-7), Tris-HCl (pH 8) e glicina-NaOH (pH 9-10). A hidrólise enzimática foi realizada segundo o procedimento descrito em 2.8. A actividade máxima verificada foi considerada 100% e as actividades relativas foram calculadas.

### **2.11. Efeito da temperatura na hidrólise das proteínas da *dreche***

O efeito da temperatura na hidrólise das proteínas da *dreche* foi avaliado a diferentes temperaturas, 25, 37, 45, 50, 60 e 70°C, ao pH óptimo determinado. A hidrólise enzimática foi realizada segundo o procedimento descrito em 2.8. Os resultados foram expressos em percentagem da actividade máxima verificada (considerada como 100%).

### **2.12. Efeito do tempo na hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja**

As peptidases da levedura da cerveja foram incubadas com as proteínas da *dreche*, nas condições de pH e temperatura óptimos, em diferentes períodos de incubação 0, 10, 20, 30, 40 e 60 minutos. Após o período de incubação, foi determinada a actividade sobre as proteínas da *dreche* pelo procedimento descrito em 2.8. A actividade foi expressa em unidades de actividade (U).

### **2.13. Detecção de potenciais inibidores endógenos das peptidases da levedura da cerveja**

A detecção de potenciais inibidores endógenos das peptidases da levedura da cerveja, que hidrolisam as proteínas da *dreche*, foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Bolumar e colaboradores (Bolumar et al., 2005; Bolumar et al., 2006), com algumas modificações. O extracto enzimático foi dividido em duas aliquotas. Uma aliquota foi diluída a metade, em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7 e a outra foi diluída a metade, em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5. Ambas foram incubadas durante 20 horas a 25°C. Os extractos enzimáticos após 0 horas de incubação e 20 horas de incubação a 25°C, foram utilizados para hidrolisar as proteínas da *dreche*, nas condições de pH e temperatura óptimos, pelo procedimento descrito em 2.8. Um aumento da absorvência a 280 nm, e conseqüentemente, o aumento da hidrólise das proteínas da *dreche*, reflecte a destruição dos inibidores endógenos, devido à incubação prolongada a 25°C e/ou a pH ácido. A actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as

proteínas da *dreche* foi expressa como percentagem da actividade mais alta verificada, que foi considerada como 100%.

#### **2.14. Efeito de Inibidores sintéticos na actividade das peptidases da levedura da cerveja**

O efeito de inibidores sintéticos na actividade das peptidases da levedura da cerveja, sobre as proteínas da *dreche* foi estudado, de forma a identificar o tipo catalítico das peptidases responsáveis pela hidrólise das proteínas da *dreche*, nas condições óptimas de temperatura e pH. Foram utilizados os seguintes inibidores: PMSF para as peptidases de serina, EDTA para as metalopeptidases, bestatina para as aminopeptidases (metalopeptidases), pepstatina A para as peptidases de ácido aspártico e E-64 para as peptidases de cisteína. O procedimento utilizado encontra-se esquematizado na Tabela 7.

Foram preparadas soluções concentradas de cada inibidor, de acordo com as instruções do fabricante: PMSF 100 mM e pepstatina A 1 mM em metanol; EDTA 100 mM, bestatina 1mM e E-64 1mM em H<sub>2</sub>O. As soluções dos inibidores foram diluídas adequadamente em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6 e incubadas com extracto de peptidases da levedura da cerveja durante uma hora a 25°C. No caso de inibidor das peptidases de serina (PMSF), o período de incubação foi de 3 horas, uma vez que está descrito na literatura, que este inibidor reage lentamente com as peptidases (García-Carreño, 1992). Cada inibidor foi adicionado de modo a que a concentração final efectiva fosse de 0,01 e 0,05 mM de pepstatina A, E-64 e Bestatina; 1 e 2 mM de PMSF e 10 e 20 mM de EDTA. As concentrações efectivas de cada inibidor foram escolhidas de acordo com as instruções do fabricante.

A actividade das peptidases da levedura na ausência de inibidores foi determinada, pela adição de tampão em vez de inibidor. Também foi preparado um controlo, no qual foi adicionado metanol, de forma a verificar o potencial efeito inibitório do solvente na actividade das peptidases. Também foram preparados dois brancos (branco inibição e branco actividade), um para eliminar o efeito da absorção do inibidor e da absorção do extracto enzimático, ao mesmo comprimento de onda que os produtos resultantes da hidrólise.

Após o período de incubação, foi adicionado 1 ml de *dreche* em cada tubo e a mistura foi incubada durante 30 minutos, à temperatura de 50°C e a pH 6. A

determinação da actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche*, na presença e na ausência de inibidores, foi realizada como descrita anteriormente, no procedimento 2.8.

**Tabela 7** – Ensaio para determinação da actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche*, na presença e na ausência de inibidores sintéticos específicos.

	Inibição	Branco Inibição	Actividade	Branco actividade	Controlo Solvente
Tampão	+	+	+	+	+
Inibidor	+	+	-	-	-
Extracto enzimático	+	+	+	+	+
Solvente (metanol)	-	-	-	-	+
Incubação	25°C, 1h				
TCA	-	+	-	+	-
Substrato ( <i>dreche</i> )	+	+	+	+	+
Incubação	50°C, 30 min				
TCA	+	-	+	-	-
Incubação	Temperatura ambiente, 30 min				
Centrifugação	10000xg, 10 min				
Absorvência	Leitura a 280 nm				

### 2.15. Separação dos hidrolisados por RP-HPLC/UV

Os péptidos resultantes da hidrólise enzimática com as peptidases da levedura da cerveja, com a Alcalase® e Protamex® foram separados por RP-HPLC/UV. A eluição em gradiente foi realizada com uma mistura de dois solventes (solvente A: 0,1% de TFA em água (v/v) e o solvente B: 0,1% TFA em 80% de uma solução aquosa de acetonitrilo (v/v)). Os péptidos foram eluídos da seguinte forma: 0–1 min, 90% A; 1–10 min, 90–80% A; 10–15 min, 80–75% A; 15–20 min, 75–60% A; 20–30 min, 60–50% A; 30–33 min, 50–40% A; 33–36 min, 40–30% A; 36–39 min, 30–20% A; 39–41 min, 20–0% A. Foi utilizado um fluxo de 0,5 ml/min. A coluna foi usada à temperatura ambiente e a detecção foi realizada a 215 nm. O tempo total da corrida foi de 50 min. A absorvência foi expressa em unidades arbitrárias (UA).



## Capítulo III - Resultados e Discussão

### 1. PROTEÍNAS DA *DRECHE*

#### 1.1. Extracção das proteínas da *dreche* e obtenção do CPD

A fracção proteica da *dreche* foi obtida após extracção alcalina e subsequente precipitação ácida. O precipitado obtido foi designado de concentrado de proteínas da *dreche* (CPD). O CPD contém 60% (p/p) de proteínas, percentagem em termos de peso seco. Cerca de 38% das proteínas da *dreche* estão presentes no CPD, que contém cerca de 80% de humidade.

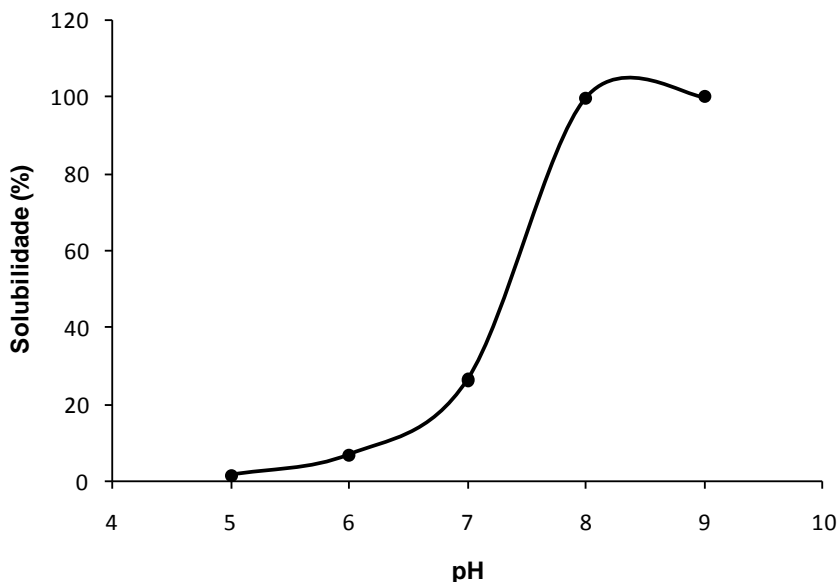
Celus e colaboradores (Celus *et al.*, 2007) utilizaram um procedimento semelhante para a extracção das proteínas da *dreche*. Os resultados obtidos neste trabalho experimental foram relativamente semelhantes dos resultados referidos na literatura (Celus *et al.*, 2007).

#### 1.2. Determinação da solubilidade das proteínas presentes no CPD

A solubilidade da fracção proteica da *dreche* obtida por extracção alcalina, seguida de precipitação ácida a pH 4, foi avaliada no intervalo de pH 5-10. Os resultados encontram-se na Figura 6.

Como seria de esperar, a solubilidade das proteínas do CPD foi elevada a pH alcalino e baixa a valores de pH 5, valores de pH próximos do ponto isoeléctrico. Para valores de pH 8-10, as proteínas presentes no CPD foram totalmente solúveis, resultados concordantes com os referidos na literatura por Celus e colaboradores (Celus *et al.*, 2007). A pH 6 a solubilidade das proteínas foi de apenas cerca de 10% e a pH 7 de cerca

de 30%, contrariamente ao referenciado na literatura, que foi cerca de 40% a pH 6 e 80-90% a pH 7. Estas diferenças de solubilidade poderão estar relacionadas com as diferenças entre as condições de extracção das proteínas da *dreche* e no processo de solubilização.



**Figura 6** – Solubilidade das proteínas presentes no concentrado de proteínas da *dreche* (CPD) em função do pH.

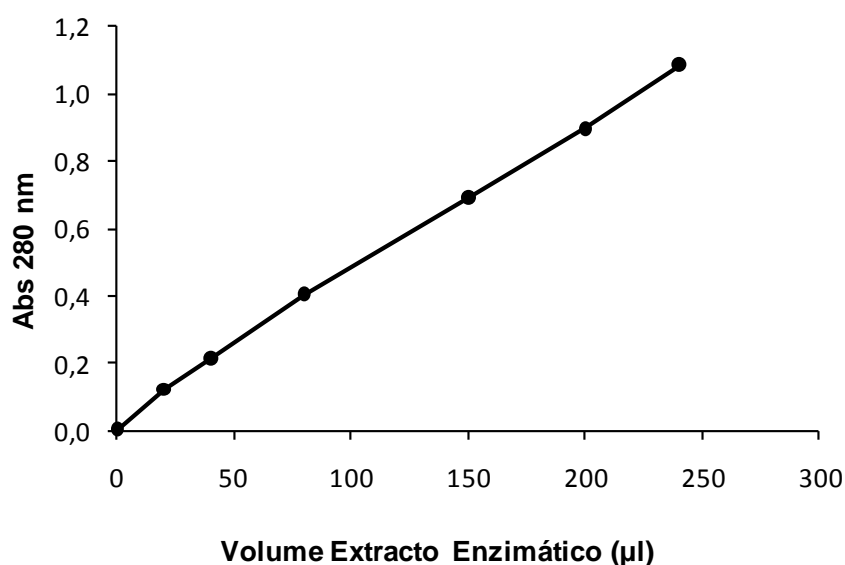
## 2. PEPTIDASES DA LEVEDURA DA CERVEJA

### 2.1. Verificação da actividade proteolítica do extracto enzimático

As peptidases da levedura da cerveja foram extraídas por disrupção mecânica (agitação em vortex com esferas de vidro) das células da levedura. A actividade proteolítica do extracto enzimático obtido foi avaliada pelo método de hidrólise da caseína 1% (p/v), a pH 7 e à temperatura de 37°C. Foram utilizados volumes crescentes de extracto enzimático para avaliar a influência do aumento da concentração de peptidases na hidrólise da caseína.

Após a análise dos resultados da Figura 7, foi possível verificar, que a absorvência a 280 nm aumentou linearmente com o aumento do volume de extracto

enzimático adicionado, o que se traduziu num aumento da quantidade de péptidos e aminoácidos solúveis em TCA, resultantes da actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre a caseína.



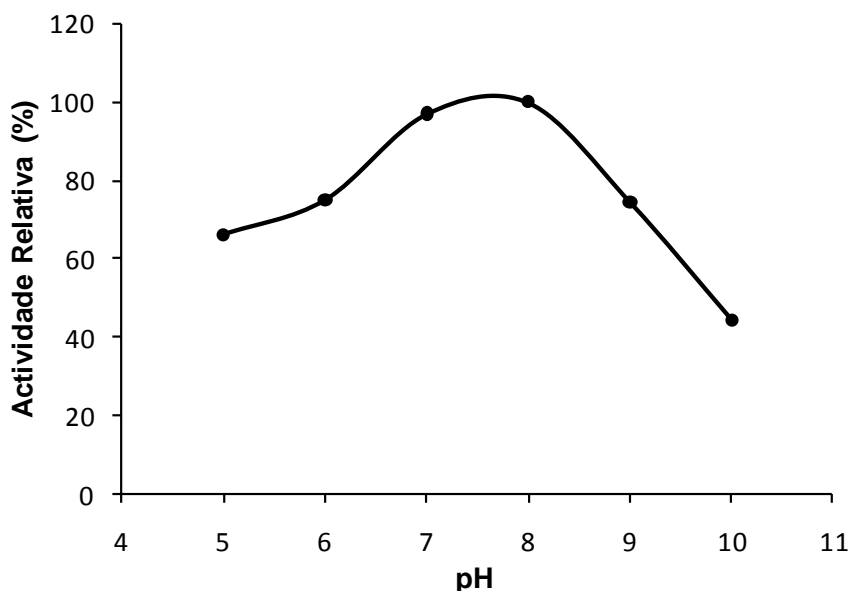
**Figura 7** – Actividade das peptidases presentes no extracto enzimático, a pH 7 e a 37°C sobre a caseína 1%.

## 2.2. Influência do pH na actividade das peptidases da levedura da cerveja

A influência do pH na actividade das peptidases da levedura da foi avaliada pelo método de hidrólise da caseína, à temperatura de 37°C e variando o pH de 5 a 10. Os resultados são apresentados na Figura 8. Da análise dos resultados, foi possível concluir que as peptidases da levedura da cerveja apresentaram actividade proteolítica sobre a caseína na zona de pH 5-10. A actividade óptima das peptidases da levedura da cerveja situou-se na zona de pH 7-8.

Os resultados obtidos em relação ao pH óptimo estão concordantes com os dados na base de dados Brenda para as peptidases presentes nas leveduras do género *Saccharomyces* (Brenda, 2011).

A pH 5 verificou-se uma redução de cerca de 34% da actividade das peptidases e a pH 10 verificou-se uma redução de cerca de 56% da actividade, em relação à actividade máxima verificada.



**Figura 8** – Influência do pH na actividade das peptidases da levedura da cerveja, na hidrólise da caseína 1% a 37°C.

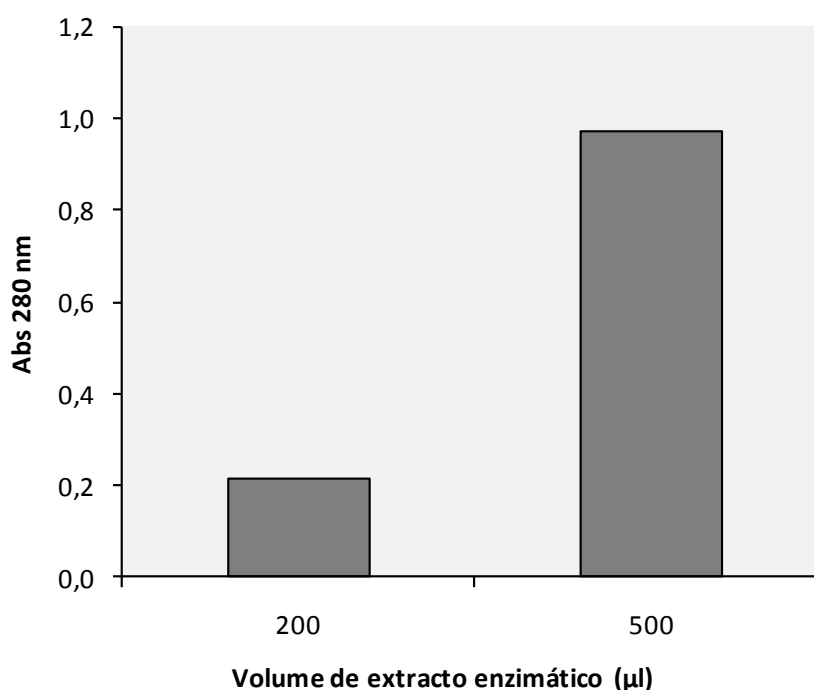
### 3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA *DRECHE* COM AS PEPTIDASES DA LEVEDURA DA CERVEJA

#### 3.1. Optimização das condições de hidrólise

As condições de hidrólise, tais como, o pH, a temperatura, a concentração de enzima, a concentração de substrato e o tempo são muito importantes na obtenção de hidrolisados (Santos *et al.*, 2009a). Neste trabalho experimental, foram testadas diferentes concentrações de substrato e enzima, assim como, a influência do pH, da temperatura e do tempo na hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja.

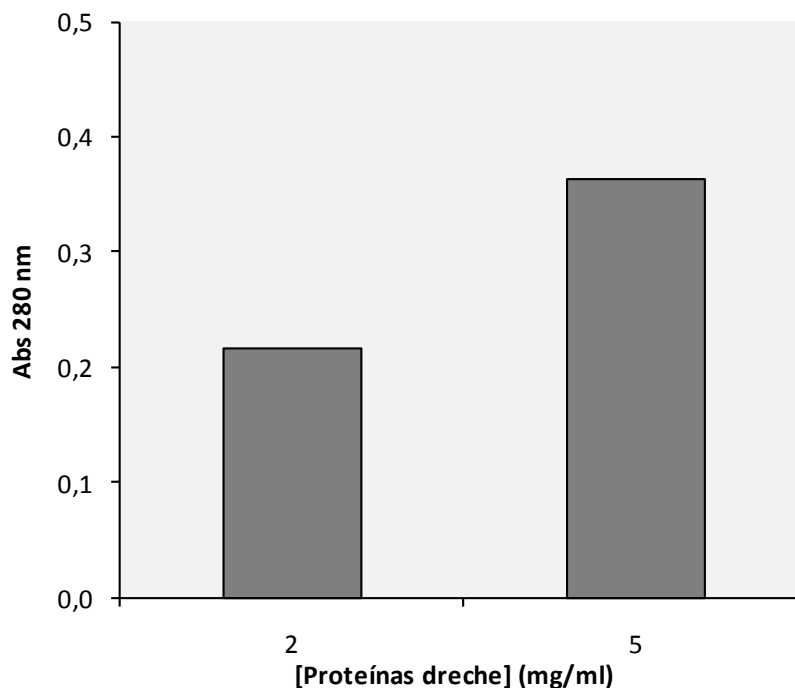
### 3.1.1. Efeito da concentração de peptidases e de substrato

As proteínas do CPD, solubilizadas a pH 8, foram utilizadas como substrato para as peptidases da levedura da cerveja, na concentração de 5 mg/ml. Utilizaram-se dois volumes diferentes (200 e 500  $\mu$ l) de extracto de peptidases da levedura da cerveja. A hidrólise enzimática das proteínas da *dreche* foi realizada a pH 8 e a 37°C, durante 30 min. Os resultados encontram-se na Figura 9. Verificou-se que aumentando a concentração de extracto enzimático, a absorvência a 280 nm também aumenta, o que significa um aumento da hidrólise das proteínas da *dreche*.



**Figura 9** – Hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja, a pH 8 e a 37°C, na presença de diferentes volumes de extracto enzimático e com uma concentração de substrato de 5 mg/ml.

O efeito da concentração de substrato na hidrólise das proteínas da *dreche*, pelas peptidases da levedura da cerveja, foi avaliado e os resultados encontram-se na Figura 10. Foram utilizadas duas concentrações de substrato, 2 e 5 mg/ml e 200  $\mu$ l de extracto enzimático. A hidrólise enzimática foi realizada a 37°C e a pH 8. Após a análise dos resultados foi possível verificar, que a hidrólise das proteínas da *dreche* é maior na presença de concentrações de substrato mais elevadas (5 mg/ml).



**Figura 10** – Efeito da concentração de substrato na hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja, a pH 8 e a 37°C.

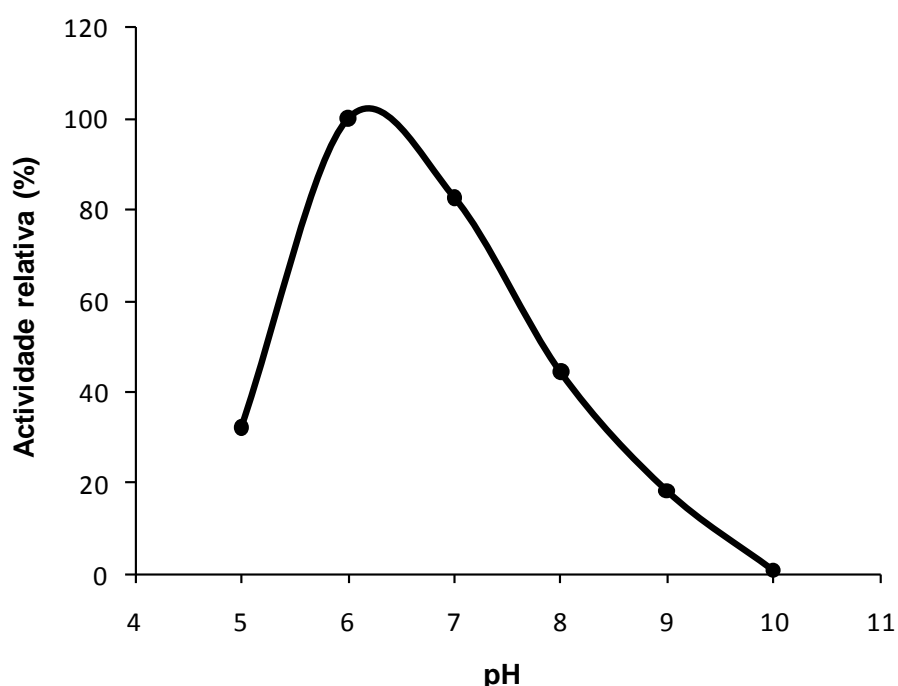
Os resultados obtidos permitiram concluir, que foi possível verificar maior hidrólise das proteínas da *dreche*, utilizando a concentração de 5 mg/ml de substrato e 500  $\mu$ l de extracto enzimático. Contudo, nestas condições, a absorvência a 280 nm é bastante elevada (>1). Assim, para os restantes ensaios foi utilizada uma concentração de substrato de 2 mg/ml e um volume de extracto enzimático de 200  $\mu$ l.

### 3.1.2. Efeito do pH

O efeito do pH na hidrólise das proteínas da *dreche*, pelas peptidases da levedura da cerveja foi determinado num intervalo de pH de 5-10 e à temperatura de 37°C. Não foram realizados ensaios a valores de pH inferiores a 5, uma vez que na literatura foi referido que peptidases com actividade óptima na zona de pH baixos (pH 3-5), por exemplo, a pepsina e a actinidina, apresentam baixa actividade sobre as proteínas da *dreche* (Celus et al., 2007; Treimo et al., 2008).

Os resultados obtidos no estudo do efeito do pH, na hidrólise das proteínas da *dreche* encontram-se na Figura 11. Após a análise dos resultados foi possível concluir, que as peptidases da levedura da cerveja actuaram sobre as proteínas da *dreche* num intervalo de pH 5-9. Na zona de pH 6-7, as peptidases da levedura da cerveja apresentaram maior actividade sobre as proteínas da *dreche*, sendo pH 6, o pH óptimo para a hidrólise.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui inúmeras peptidases, que são activas na zona de pH 6-7, tais como a aspartil aminopeptidase, peptidase B, carboxipeptidase y, kex carboxipeptidase, aminopeptidase I, carboxipeptidase S, entre outras peptidases (Brenda, 2011).



**Figura 11** – Influência do pH na hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja. A actividade foi expressa em termos de percentagem relativa.

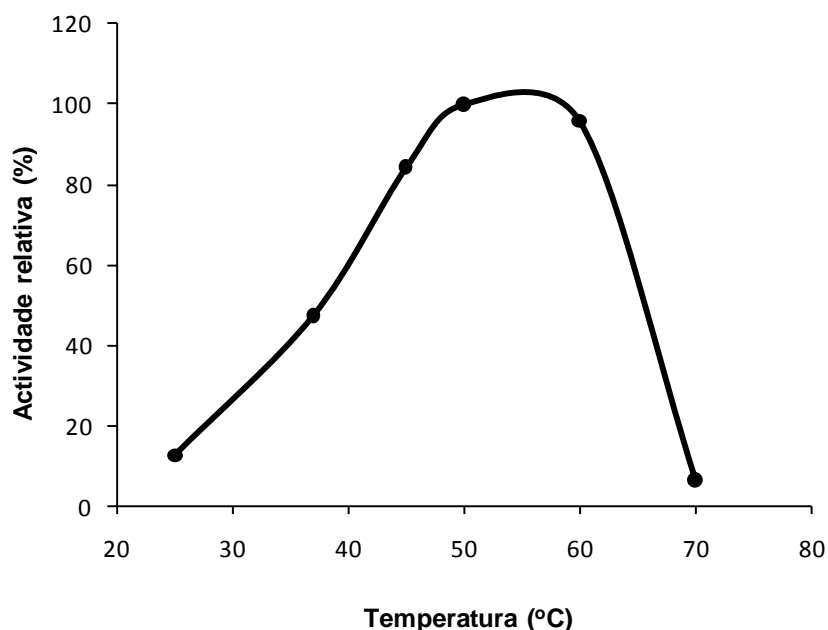
A pH 5 e a pH 9, a actividade das peptidases da levedura sobre as proteínas da *dreche* foi de apenas cerca de 32% e 18%, respectivamente, em relação à actividade máxima verificada. A pH 10, as peptidases da levedura da cerveja praticamente não hidrolisaram as proteínas da *dreche* (apenas cerca de 1% de actividade foi observada).

Os resultados obtidos para determinação do pH óptimo de actividade das peptidases da levedura da cerveja, pelo método de hidrólise da caseína, mostraram a actividade óptima das peptidases da levedura da cerveja na zona de pH 7-8. Contudo, os

resultados obtidos para a hidrólise das proteínas da *dreche* revelaram que o pH ótimo de hidrólise foi 6. A pH 8 verificou-se uma redução significativa na actividade das peptidases da levedura da cerveja, sobre as proteínas da *dreche*. Estas diferenças estão provavelmente relacionadas com o tipo de substrato utilizado. Segundo North (North, 1982), quando são utilizados substratos diferentes para avaliar a influência do pH na hidrólise de proteínas, são observadas diferenças significativas no pH ótimo de hidrólise, pela mesma enzima. Por exemplo, quando se utiliza a caseína como substrato, normalmente o pH ótimo é maior do que quando se utiliza a hemoglobina como substrato. Assim, o pH ótimo pode ser uma característica do substrato, assim como, das peptidases (North, 1982).

### 3.1.3. Efeito da temperatura

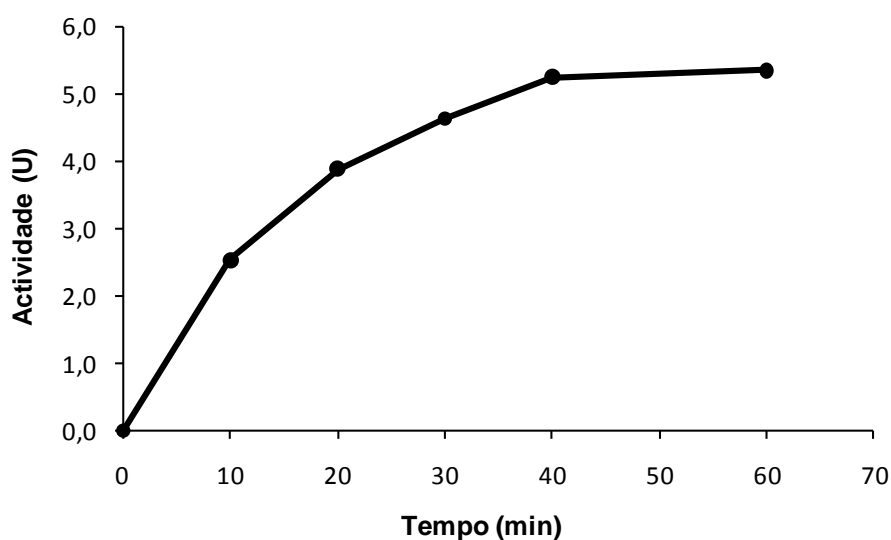
Os resultados do efeito da temperatura na actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche*, encontram-se na Figura 12. A actividade das peptidases da levedura da cerveja foi máxima a temperaturas de 50-60°C. A 37°C verificou-se cerca de 47% da actividade máxima e a 25°C apenas cerca de 13%. Para temperaturas superiores a 60°C, a actividade foi drasticamente reduzida, verificando-se apenas cerca de 6% de actividade relativa após a incubação a 70°C.



**Figura 12** – Influência da temperatura na hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja. A actividade foi expressa em termos de percentagem relativa.

### 3.1.4. Efeito do tempo

A actividade das peptidases da levedura da cerveja, utilizando as proteínas da *dreche* como substrato, foi avaliada ao longo do tempo (até 60 minutos de incubação), nas condições de pH e temperatura óptimas, isto é, à temperatura de 50°C e a pH 6. Após a análise da Figura 13, verificou-se que a actividade das peptidases aumentou com o tempo, até um período de incubação de 40 minutos. Ao fim de 30 minutos, a actividade foi aproximadamente o dobro da actividade ao fim de 10 minutos. No entanto, a partir de 40 minutos, a actividade das peptidases não aumentou, talvez devido à pouca disponibilidade de substrato. Estes resultados permitiram concluir, que ao fim de uma hora de incubação a 50°C e a pH6, as peptidases da levedura da cerveja hidrolisaram as proteínas da *dreche*, sem perda de actividade.



**Figura 13** – Efeito do tempo na hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja, nas condições de pH e temperatura óptimas. A actividade foi expressa em unidades de actividade (U).

### 3.2. Detecção de potenciais inibidores endógenos das peptidases da levedura da cerveja

As peptidases vacuolares da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em particular, a peptidase B e carboxipeptidase Y, têm inibidores endógenos localizados no citoplasma. Após a disrupção das células da levedura, formam-se complexos entre os inibidores e as peptidases vacuolares (Bolumar *et al.*, 2005; Lenney, 1975; Tanimizu e Hayashi, 1996). A presença de inibidores endógenos das peptidases vacuolares, também foi detectada em outras leveduras que não pertencem ao género *Saccharomyces*, tais como, *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces lactis* (Bolumar *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 1999).

As peptidases vacuolares, normalmente, apresentam actividade óptima a pH 6 (Sorensen *et al.*, 1994). Uma vez que as peptidases da levedura da cerveja apresentaram maior actividade sobre as proteínas da *dreche* a pH 6, foi avaliada a potencial presença desses inibidores, que podem inibir as peptidases vacuolares, e conseqüentemente, podem reduzir a actividade destas peptidases.

Para inactivar os inibidores endógenos das peptidases vacuolares, têm sido utilizadas diferentes estratégias, tais como, longos períodos de incubação a 25°C e/ou a pH 5 (Bolumar *et al.*, 2005). Hayashi e colaboradores (Hayashi *et al.*, 1968) descreveram a activação das peptidases vacuolares (peptidase B e carboxipeptidase y) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, após a incubação a pH 5. A possível destruição ou inactivação de inibidores endógenos, promoveu a dissociação do complexo enzima-inibidor, resultando na activação das peptidases vacuolares (Hayashi *et al.*, 1968).

A actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche* foi avaliada a 50°C e a pH 6, após a incubação do extracto enzimático, durante 20 horas a 25°C, a pH 5 e 7.

Os resultados obtidos (Tabela 8) indicaram, que após 20 horas de incubação a pH 7 e a 25°C, a actividade das peptidases da levedura da cerveja diminui cerca de 31%, em relação à actividade verificada em 0 horas de incubação, o que significou, que longos períodos de incubação a pH 7 e a 25°C reduziram a hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja. Após a incubação a 25°C e a pH 5 durante 20 horas, verificou-se que a actividade das peptidases duplicou, em relação a actividade verificada em 0 horas de incubação, a pH 5 e 25°C. Estes resultados permitiram concluir, que a actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche* aumentou após longos períodos de incubação a pH ácido.

**Tabela 8** – Hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja em diferentes concentrações para detectar a potenciais inibidores endógenos. A actividade foi expressa em percentagem da actividade mais alta verificada, que foi considerada 100%.

Tempo (horas)	Extracto enzimático pH=7	Extracto enzimático pH=5
0	89,7	41,6
20	58,4	100,0

O aumento da actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche*, após 20 horas de incubação a pH 5, indicou a potencial presença de inibidores das peptidases vacuolares. Assim, peptidases vacuolares, como a peptidase B e a carboxipeptidase y, podem estar envolvidas na hidrólise das proteínas da *dreche*. Contudo, para confirmar que as peptidases vacuolares hidrolisam as proteínas da *dreche*, seria necessário isolar e purificar cada uma destas peptidases, e na presença de inibidores sintéticos específicos, verificar se realmente essas peptidases vacuolares hidrolisam as proteínas da *dreche*.

### 3.3. Efeito de inibidores sintéticos na actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche*

O efeito de inibidores sintéticos, na actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche* foi avaliado, com o objectivo de verificar qual o tipo catalítico das peptidases que são responsáveis pela hidrólise das proteínas da *dreche*, nas condições óptimas de temperatura e pH, isto é, à temperatura de 50°C e a pH 6. Para tal, foram utilizados inibidores dos quatro principais tipos catalíticos de peptidases (peptidases de serina, cisteína, ácido aspártico e metalopeptidases). Os resultados encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9** – Efeito de inibidores sintéticos na actividade das peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche*.

Inibidores	Tipo catalítico	Concentração (mM)	Actividade relativa (%)
Pepstatina A	Ácido Aspártico	0,01	105
		0,05	103
E-64	Cisteína	0,01	107
		0,05	91
PMSF	Serina	1	95
		2	69
EDTA	Metalo	10	71
		20	50
Bestatina	Metalo (aminopeptidases)	0,01	102
		0,05	93

Após análise dos resultados, verificou-se que nenhum dos inibidores reduziu mais de 50% a actividade das peptidases da levedura sobre as proteínas da *dreche*. A pepstatina A, nas concentrações de 0,01 mM e 0,05 mM, não apresentou efeito inibitório na actividade peptidases da levedura da cerveja. O EDTA, na concentração de 20 mM, reduziu a actividade das peptidases em cerca de 50% e o PMSF na concentração de 2 mM reduziu a actividade em cerca de 31% a actividade das peptidases da levedura sobre as proteínas da *dreche*. Estes resultados sugerem, que poderão ser peptidases de serina e metalopeptidases, as principais responsáveis pela hidrólise das proteínas da *dreche*, nas condições de pH e temperatura óptimos.

As metalopeptidases e as peptidases de serina são geralmente activas a pH 7-9 (Wilhite *et al.*, 2000). Contudo, as leveduras do género *Saccharomyces*, em particular a *Saccharomyces cerevisiae*, contêm várias peptidases activas a pH 6-7, incluindo peptidases de serina, como a peptidase B, carboxipeptidase Y e Kex carboxipeptidase, bem como, metalopeptidases, como a aspartil metalopeptidase, peptidase D e a carboxipeptidase S (Brenda, 2011). Em particular, as peptidases de serina, como é o caso da carboxipeptidase y e a kex carboxipeptidase, são activas a pH ácido, apresentando pH óptimo de actuação na zona pH 4,5-6 (NC-IUBMB, 2010; Rawlings e Barrett, 2010).

A fraca inibição causada pelos inibidores E-64 e Bestatina, nas concentrações mais elevadas, poderá significar que não serão peptidases de cisteína e aminopeptidases

(do tipo catalítico metalopeptidases), as responsáveis pela hidrólise da maioria das proteínas da *dreche*, nas condições do ensaio. Contudo, Yokoyama e colaboradores, referem que a aspartil aminopeptidase, presente no citoplasma das leveduras, ao contrário da maioria das aminopeptidases, não é inibida por Bestatina, mas apenas por EDTA (Yokoyama *et al.*, 2006).

Os resultados da utilização de inibidores sintéticos, para a classificação das peptidases da levedura da cerveja, devem ser analisados com bastante cuidado, uma vez que, não é garantido o efeito dos inibidores na actividade das peptidases, sobretudo quando não se utiliza um substrato natural (como a caseína) e quando não se utilizam preparações enzimáticas puras (Osman, 2003; Storey e Wagner, 1986).

A utilização de preparações enzimáticas pouco purificadas, e a utilização de extractos que contêm vários tipos de peptidases, pode conduzir a resultados erróneos, pois os componentes do extracto podem influenciar a ligação enzima-inibidor. Por outro lado, o local activo das peptidases pode não estar realmente acessível à ligação do inibidor (Storey e Wagner, 1986). Assim, seria necessário purificar o extracto de peptidases da levedura da cerveja para obter várias fracções com actividade proteolítica sobre as proteínas da *dreche*, de forma a confirmar o tipo catalítico da(s) peptidase(s) da levedura da cerveja, que é(são) responsável(is) pela hidrólise das proteínas da *dreche*.

Algumas complicações na determinação do tipo catalítico podem surgir, devido ao facto de alguns inibidores utilizados na determinação do tipo catalítico das peptidases, não serem absolutamente específicos apenas para um único tipo catalítico de peptidases (Storey e Wagner, 1986). Assim, o PMSF é um inibidor irreversível das peptidases de serina. No entanto, pode também inibir algumas peptidases de cisteína. O EDTA é um inibidor reversível das metalopeptidases, mas pode também inibir outras peptidases dependentes de iões metálicos, tais como, algumas peptidases de cisteína que são dependentes de iões cálcio (Beynon e Bond, 2001; Storey e Wagner, 1986). Também é de salientar, que algumas aminopeptidases do tipo catalítico metalo, como é o caso da aspartil aminopeptidase presente em leveduras, não são inibidas por Bestatina, um inibidor da maioria das aminopeptidases do tipo catalítico metalo (Yokoyama *et al.*, 2006).

#### 4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA *DRECHE* COM PEPTIDASES COMERCIAIS E COMPARAÇÃO COM AS PEPTIDASES DA LEVEDURA DA CERVEJA

A hidrólise enzimática das proteínas da *dreche* por peptidases comerciais, utilizando proteínas da *dreche*, obtidas após extracção alcalina seguida da precipitação por ácido, foi descrita por Celus e colaboradores (Celus *et al.*, 2007; Celus *et al.*, 2009). Os resultados obtidos mostraram que a Alcalase® foi a enzima que apresentou maior actividade sobre as proteínas da *dreche* (Celus *et al.*, 2007). Treimo e colaboradores (Treimo *et al.*, 2008) estudaram o efeito de várias peptidases comerciais na solubilização directa das proteínas da *dreche*, sem a utilização de qualquer processo prévio de extracção das proteínas. Os resultados obtidos, mostraram que a Alcalase® e a Protamex® foram as peptidases que apresentaram maior actividade proteolítica sobre as proteínas da *dreche*, sendo a Alcalase®, a mais eficaz de todas (Treimo *et al.*, 2008).

A actividade das peptidases Alcalase® e Protamex®, sobre as proteínas da *dreche* foi estudada, dado que estas peptidases são referidas na literatura, por apresentarem elevada actividade sobre a *dreche* (Celus *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 1999; Treimo *et al.*, 2008). A actividade das peptidases da levedura da cerveja foi comparada com a actividade das peptidases comerciais. Uma vez que é difícil saber a quantidade de peptidases presentes nas preparações comerciais utilizadas, bem como no extracto enzimático das peptidases da levedura da cerveja, pois as preparações utilizadas não são puras, a actividade proteolítica foi determinada, utilizando a caseína como substrato, a pH 7 e a 37°C (Tabela 10). A actividade sobre as proteínas da *dreche*, nas mesmas condições de pH e temperatura (pH 7 e 37°C) foi também determinada. De salientar, que a actividade para a caseína não corresponde necessariamente à actividade para as proteínas da *dreche*, nas condições de hidrólise utilizadas neste estudo.

**Tabela 10** – Actividade das peptidases da levedura da cerveja e das peptidases comerciais (Protamex® e Alcalase®) sobre a caseína e sobre as proteínas da *dreche*, a pH 7 e a 37°C. A actividade foi expressa em unidades de actividade (U).

Enzimas	Substrato	
	Caseína	<i>Dreche</i>
Peptidases LC	3,57	1,91
Protamex®	7,95	2,10
Alcalase®	5,98	2,93

Os resultados obtidos no ensaio de determinação da actividade proteolítica, utilizando a caseína como substrato, revelaram que a preparação Protamex® foi a que apresentou maior actividade, e conseqüentemente foi a preparação com maior quantidade de peptidases. O extracto enzimático da levedura da cerveja foi o que apresentou menor actividade sobre a caseína, cerca de metade da actividade verificada na preparação Protamex®, o que pode significar que o extracto enzimático da levedura da cerveja tinha menor concentração de peptidases, do que as preparações enzimáticas comerciais utilizadas no ensaio.

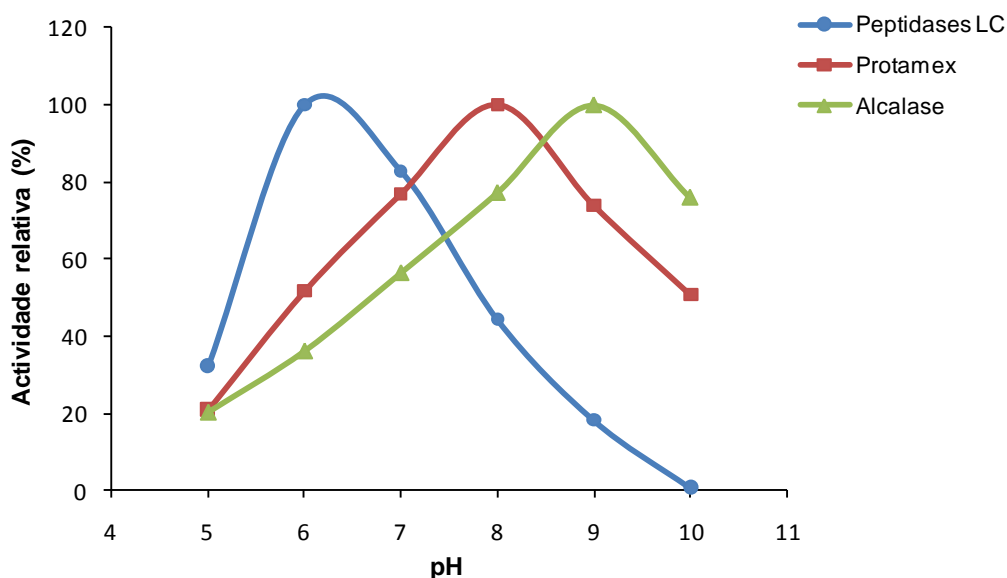
Os resultados obtidos na hidrólise das proteínas da *dreche*, revelaram que apesar de a Alcalase® apresentar menor actividade sobre a caseína do que a Protamex®, a actividade da Alcalase® sobre as proteínas da *dreche* foi maior, o que significou que a Alcalase® foi mais eficiente na hidrólise das proteínas da *dreche*. Estes resultados estão concordantes com os obtidos por Treimo e colaboradores (Treimo *et al.*, 2008). A preparação Protamex® contém uma mistura das peptidases Alcalase® e Neutrase®. Apesar de a actividade da Neutrase® não ter sido testada neste estudo, os resultados obtidos por Treimo e colaboradores (Treimo *et al.*, 2008), para a actividade da Neutrase®, mostraram que esta peptidase apresenta baixa actividade nas proteínas da *dreche*, o que pode justificar a menor actividade da Protamex® em relação à Alcalase®.

As peptidases da levedura da cerveja apresentaram menor actividade sobre proteínas da *dreche*, em relação às peptidases comerciais. A preparação enzimática da levedura da cerveja utilizada estava pouco purificada, portanto peptidases diferentes podem estar presentes, não se conhecendo qual(is) a(s) peptidase(s) da levedura da cerveja que de facto é/são responsável(is) pela hidrólise das proteínas da *dreche*. Além disso, o extracto enzimático que contém as peptidases da levedura da cerveja apresenta menor actividade sobre a caseína do que as peptidases comerciais, o que pode também justificar a menor hidrólise das proteínas da *dreche*.

A influência do pH e da temperatura na actividade das preparações enzimáticas comerciais (Alcalase® e Protamex®) na hidrólise das proteínas da *dreche* foi investigada (Figura 14 e Figura 15). Os resultados obtidos para as preparações comerciais foram comparados com os resultados obtidos para as peptidases da levedura da cerveja.

A actividade da Alcalase® e Protamex® foi maior na zona de pH alcalino e a actividade das peptidases da levedura da cerveja foi maior na zona de pH ácido-neutro. O pH óptimo de hidrólise das proteínas da *dreche* pela Alcalase® foi 9 e o pH óptimo do Protamex® foi 8. O pH óptimo determinado para a hidrólise das proteínas da *dreche* pela Alcalase está de acordo com a literatura (Celus *et al.*, 2007). A pH 5, todas as peptidases

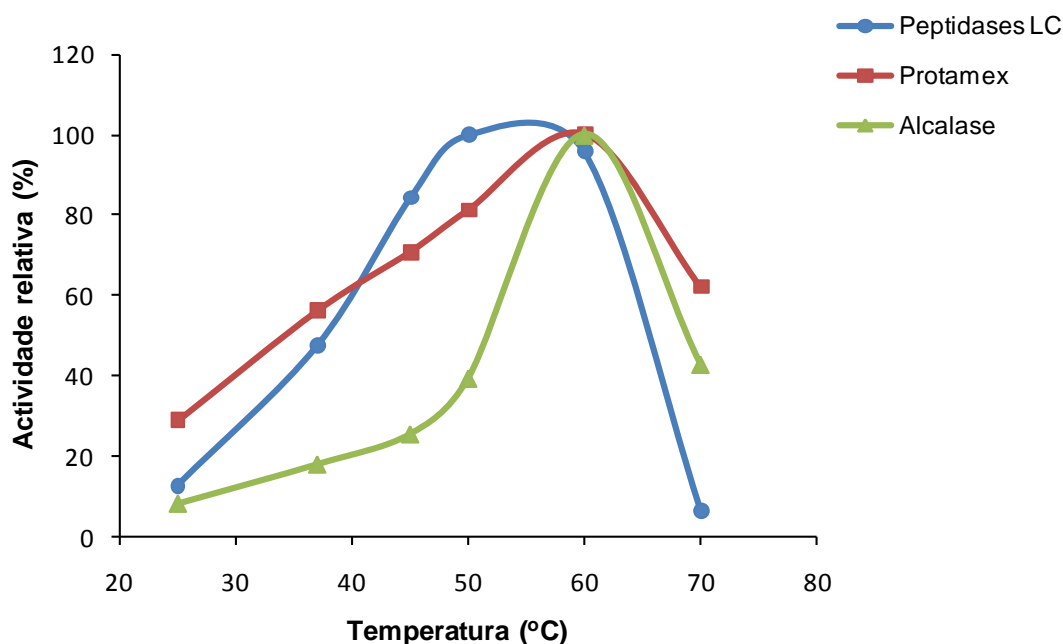
utilizadas apresentaram baixa actividade. A pH 6, pH óptimo para as peptidases da levedura da cerveja, a actividade da Alcalase® foi cerca de 80% menor do que a pH 9 (pH óptimo) e a actividade do Protamex® foi cerca de 50% mais baixa do que a pH 8.



**Figura 14** – Influência da temperatura na hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases comerciais Alcalase® e Protamex® e comparação com os resultados obtidos para as peptidases LC. Os resultados foram expressos em termos de actividade relativa em percentagem.

A influência da temperatura na actividade das peptidases comerciais na hidrólise das proteínas da *dreche* foi avaliada e os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos para as peptidase da levedura da cerveja (Figura 15). A actividade das peptidases Alcalase® e Protamex® aumentou, com o aumento da temperatura até uma temperatura de 60°C, na qual foi verificado o máximo de actividade. A actividade das peptidases da levedura da cerveja foi máxima a temperaturas de 50-60°C

Para temperaturas superiores a 60°C, a actividade das peptidases diminuiu, sendo as peptidases da levedura da cerveja as mais afectadas, pois a sua actividade foi drasticamente reduzida, como referido anteriormente em 3.1.2. Também foi possível verificar, que a actividade da Alcalase® para temperaturas de entre 25-45°C não foi superior a 20% da actividade máxima e a partir de 50°C, a actividade aumenta consideravelmente, sendo a 60°C cerca de 60% superior à actividade verificada a 50°C.



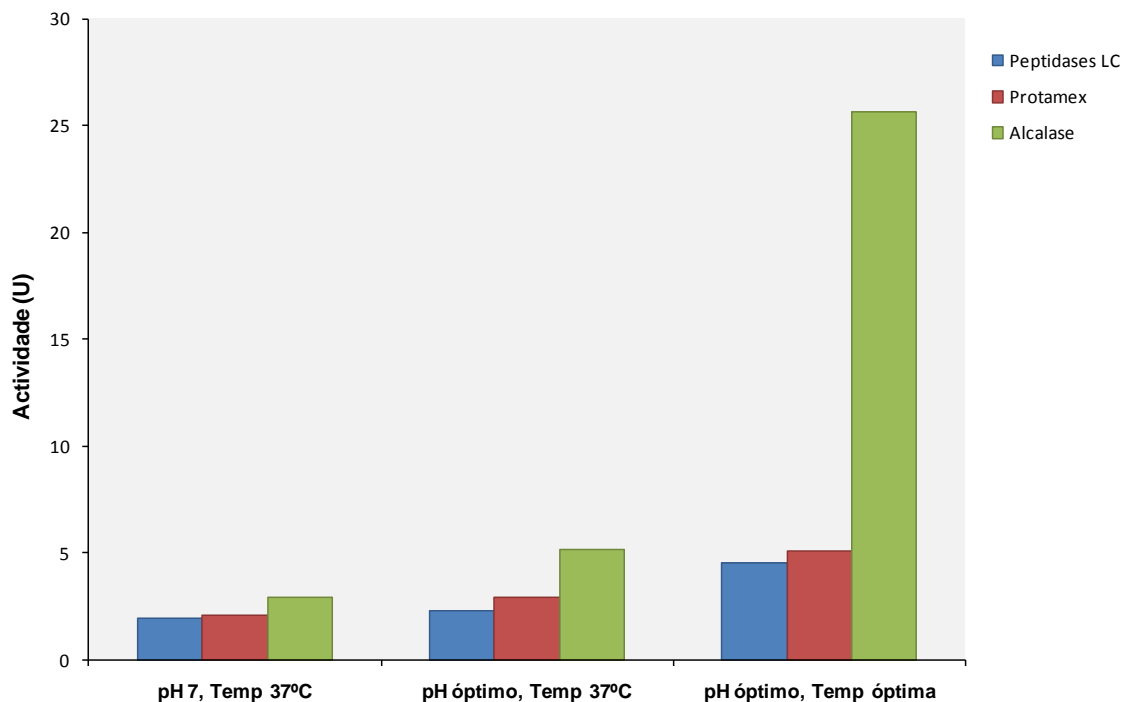
**Figura 15** – Influência da temperatura na hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases comerciais Alcalase® e Protamex® e comparação com os resultados obtidos para as peptidases LC. Os resultados foram expressos em termos de actividade relativa em percentagem.

A actividade das preparações comerciais Alcalase® e Protamex® e a actividade do extracto de peptidases da levedura da cerveja sobre as proteínas da *dreche* foram comparadas em diferentes condições de pH e temperatura (Figura 16), isto é, nas condições de pH 7 e 37°C, no pH óptimo de actividade (pH 6 para as peptidases da levedura, pH 8 para a Protamex® e pH 9 para a Alcalase®) e 37°C e nas condições óptimas de pH e temperatura (pH 6 e 50°C para as peptidases da levedura, pH 8 e 60°C para a Protamex® e pH 9 e 60°C para a Alcalase®).

Da análise da Figura 16 foi possível verificar, que a actividade de todas as peptidases foi maior nas condições de pH e temperatura óptimas, como seria de esperar. A temperatura foi um factor determinante na hidrólise das proteínas da *dreche* pela Alcalase®, uma vez que a actividade da Alcalase®, nas condições óptimas de pH e temperatura, foi bastante maior do que nas restantes condições de pH e temperatura. No caso da Protamex® e das peptidases da levedura da cerveja, a temperatura tem menor impacto na actividade.

Nas condições óptimas de pH e temperatura, a actividade da preparação Protamex® não foi muito superior à actividade das peptidases da levedura da cerveja, ao passo que a actividade da Alcalase®, nas mesmas condições foi bastante superior,

sendo a preparação enzimática que apresentou maior actividade sobre as proteínas da *dreche*.



**Figura 16** – Hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja, Protamex® e Alcalase® em diferentes condições de pH e temperatura. A actividade foi expressa em unidades de actividade (U).

A menor hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja, pode estar associada ao facto de a preparação utilizada ser menos concentrada em peptidases do que as preparações comerciais. A optimização do processo de extracção das peptidases da levedura da cerveja é importante, de forma a conseguir aumentar a quantidade de peptidases presentes no extracto enzimático, e consequentemente aumentar a hidrólise das proteínas da *dreche*.

A disrupção por agitação da suspensão celular com esferas de vidro é uma técnica eficaz para obtenção das peptidases intracelulares. Este procedimento é particularmente eficiente na disrupção de leveduras e fungos filamentosos, uma vez que possuem paredes celulares rígidas constituídas principalmente por polissacararídeos (80-90%). Além disso, este procedimento pode ser operado em modo contínuo, podendo ser aplicado à escala laboratorial e industrial. Vários factores afectam a performance desta técnica, incluindo a velocidade de agitação, a concentração inicial de células e a quantidade e o tamanho das esferas de vidro (Ricci-Silva *et al.*, 2000). A optimização

destes parâmetros é fundamental para aumentar o rendimento da extracção do conteúdo intracelular, em particular das peptidases. Neste trabalho experimental, a técnica de extracção das peptidases intracelulares não foi otimizada, uma vez que o procedimento utilizado não é de aplicação à escala laboratorial e o principal objectivo deste trabalho, era demonstrar que as peptidases da levedura da cerveja hidrolisam as proteínas da *dreche*, o que aparentemente, ainda não foi estudado. De salientar, que o procedimento utilizado neste trabalho para a extracção das peptidases pode ser adaptado para a escala industrial, pela utilização do equipamento *bead mill*.

Como referido anteriormente, a preparação Alcalase® apresentou maior actividade sobre as proteínas da *dreche* do que a preparação Protamex (mistura da Alcalase com a Neutrase®), pois a actividade da Neutrase® sobre as proteínas da *dreche* é baixa. Uma situação idêntica pode ter acontecido com a preparação das peptidases da levedura da cerveja, pois é uma mistura de várias peptidases. A purificação do extracto enzimático, de forma a conhecer qual(is) a(s) peptidase(s) da levedura da cerveja que é/são responsável(is) pela hidrólise das proteínas da *dreche* também é importante. Conhecendo quais as peptidases da levedura da cerveja que são responsáveis pela hidrólise das proteínas da *dreche*, é possível obter preparações enzimáticas enriquecidas com essas peptidases. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* contém peptidases da família da subtilisina (família S8), conhecida como Alcalase®, como a carboxipeptidase Y e a kex carboxipeptidase (Rawlings e Barrett, 2010), que podem ser isoladas.

O tipo de peptidases utilizadas influencia as propriedades tecno-funcionais dos hidrolisados, tais como o sabor, emulsão e espuma (Celus *et al.*, 2007).

Um dos problemas da obtenção de hidrolisados a partir de proteínas é a produção de péptidos com sabor amargo. O amargor resulta da exposição dos resíduos aminoácidos hidrofóbicos devido à hidrólise das proteínas (Villanueva *et al.*, 1999). O sabor amargo dos péptidos, apesar de depender da fonte de proteína e da especificidade da enzima, está também relacionado com a presença e a posição dos aminoácidos hidrofóbicos nos péptidos do hidrolisado (Benitez *et al.*, 2008). Os aminoácidos livres são menos amargos do que os respectivos péptidos e há um aumento do amargor quando os resíduos aminoácidos hidrofóbicos são não-terminais, isto é, quando estão localizados no interior das cadeias peptídicas. Assim, a utilização de exopeptidases origina hidrolisados com menor amargor (Villanueva *et al.*, 1999). A Alcalase® é uma endopeptidase que apresenta elevada actividade sobre várias proteínas. Contudo, a Alcalase® produz hidrolisados com sabor amargo, e portanto mais desagradáveis. Por exemplo a Flavourzyme®, é uma exopeptidase, que permite obter hidrolisados com menor amargor (Candido e Sgarbieri, 2003; Santos *et al.*, 2009b).

Celus e colaboradores (Celus *et al.*, 2007) referiram que os hidrolisados das proteínas da *dreche* obtidos após elevada hidrólise com a Alcalase® apresentam menor capacidade de emulsificação e formação de espuma, ao passo os hidrolisados obtidos com a Flavourzyme® apresentam boas propriedades tecno-funcionais independentemente do grau de hidrólise. Estes dados permitem concluir, que nem sempre os hidrolisados obtidos com peptidases que hidrolisam em maior extensão as proteínas da *dreche*, podem apresentar boas propriedades funcionais. Assim, seria interessantes estudar as propriedades funcionais dos hidrolisados obtidos com as peptidases da levedura da cerveja.

A utilização das peptidases da levedura da cerveja para obter hidrolisados pode ser vantajosa, uma vez que o seu pH óptimo de actuação é mais baixo do que as peptidases comerciais utilizadas e porque as peptidases da levedura da cerveja são mais facilmente inactivadas a temperaturas altas (70°C) do que as peptidases Alcalase® e Protamex®, o que segundo Candido e Sgarbieri (Candido e Sgarbieri, 2003) favorece a inactivação das peptidases no final do processo de hidrólise.

Seria interessante comparar a actividade da peptidases da levedura da cerveja com as peptidases comerciais, utilizando outras técnicas de determinação da actividade proteolítica, tais como a técnica *pH stat* ou técnicas que se baseiam na quantificação dos grupos amina libertados durante a hidrólise de ligações peptídicas do substrato, com a utilização de reagentes como o TNBS ou a ninidrina. Estas técnicas apresentam a vantagem de serem mais informativas, relativamente às técnicas de quantificação dos resíduos aminoácidos, pois permitem determinar o número de ligações peptídicas que foram clivadas no substrato. A técnica utilizada neste estudo, para quantificação da actividade proteolítica tem a vantagem de ser barata e de fácil execução, no entanto, está dependente do conteúdo em aminoácidos aromáticos do substrato (Bhaskar *et al.*, 2002; Rutherford, 2010).

## 5. SEPARAÇÃO POR RP-HPLC/UV DOS PÉPTIDOS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DA *DRECHE* PELAS PEPTIDASES DA LEVEDURA DA CERVEJA E PELAS PEPTIDASES COMERCIAIS

A separação dos hidrolisados, obtidos após hidrólise enzimática das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja e pelas peptidases comerciais, Alcalase® e Protamex®, foi realizada por cromatografia de fase reversa, com detecção UV. Na Figura 17 encontram-se os perfis cromatográficos obtidos após hidrólise enzimática com as peptidases da levedura da cerveja, Protamex® e Alcalase®.

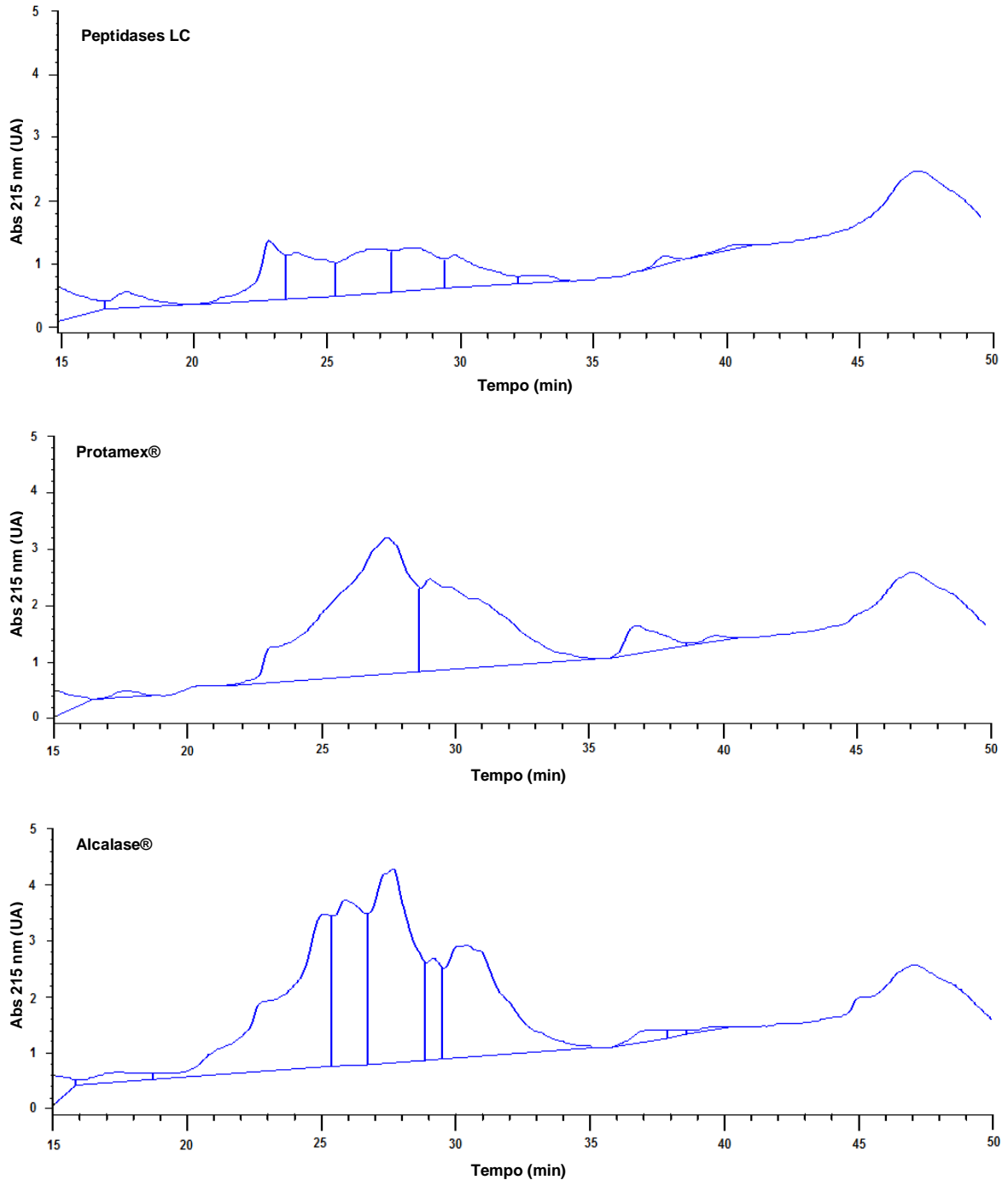
Os três tipos de hidrolisados apresentaram péptidos com peso molecular e polaridade semelhante, como se pode verificar nos cromatogramas da Figura 17. As fracções com menor tempo de retenção correspondem a péptidos com peso molecular menor e as fracções com maior tempo de retenção correspondem a péptidos com maior peso molecular e maior afinidade para a coluna cromatográfica.

A separação cromatográfica por RP-HPLC é principalmente baseada nas diferenças de hidrofobicidade, mas o tamanho dos péptidos também influencia os tempos de retenção. Existe uma relação entre o peso molecular dos péptidos e o tempo de retenção na cromatografia de fase reversa. Em geral, as amostras com péptidos maiores são eluídas mais tarde do que as amostras com péptidos mais pequenos, o que significa que o tempo de retenção é maior para péptidos de maior tamanho (van der Ven *et al.*, 2001).

O tempo de retenção dos péptidos mais pequenos (com menos de 15 resíduos) apenas depende da composição em aminoácidos. No caso dos péptidos maiores, o tempo de retenção é também influenciado pelo peso molecular dos péptidos e pela conformação (Celus *et al.*, 2007; van der Ven *et al.*, 2001).

A análise dos cromatogramas da Figura 17 também permitiu verificar, que a Alcalase® foi a peptidase que apresentou maior actividade sobre as proteínas da *dreche*, uma vez que foi detectada maior quantidade de péptidos, o que confirma os resultados obtidos anteriormente.

A monitorização da absorvência foi realizada a 215 nm, que corresponde à absorvência das ligações peptídicas, o que implica que o nível de péptidos pequenos é subestimado (Celus *et al.*, 2007; van der Ven *et al.*, 2001).



**Figura 17** – Perfis cromatográficos dos hidrolisados obtidos após hidrólise enzimática das proteínas da *dreche* com as peptidases da levedura da cerveja, Protamex® e Alcalase®. A hidrólise enzimática foi realizada nas condições de pH e temperatura ótimos para cada tipo de peptidase. A absorvência (215 nm) foi expressa em unidades arbitrárias (UA).

## Capítulo IV - Conclusão

O fabrico de cerveja envolve, inevitavelmente, a produção de vários resíduos e subprodutos, sendo a *dreche* e o excedente de levedura, os dois subprodutos produzidos em maior quantidade. No entanto, estes subprodutos podem ser reciclados e reutilizados, uma vez que apresentam valor nutricional, podendo ser utilizados na alimentação animal e humana. Além disso, têm elevado potencial biotecnológico e são fonte de vários produtos de valor acrescentado, incluindo as proteínas.

O trabalho experimental descrito nesta dissertação teve como principal objectivo fornecer uma base científica para a valorização de dois dos principais subprodutos da indústria cervejeira, a *dreche* e o excedente de levedura, em particular, a valorização da fracção proteica da *dreche* e das peptidases da levedura da cerveja para a obtenção de hidrolisados.

A *dreche* é um subproduto rico em proteínas que são maioritariamente insolúveis. A potencial aplicação das proteínas insolúveis da *dreche* requer a utilização de métodos de obtenção dessas proteínas. A extracção das proteínas da *dreche* pode ser realizada por métodos químicos, físicos e bioquímicos, ou pela combinação de vários métodos. Neste trabalho experimental, as proteínas da *dreche* foram obtidas por extracção alcalina seguida de precipitação ácida. O concentrado de proteínas obtido continha cerca de 60% de proteínas, solúveis a pH alcalino.

O excedente de levedura da cerveja pode ser utilizado como fonte de várias peptidases intracelulares, que podem ser isoladas e purificadas. As peptidases têm inúmeras funções a nível fisiológico e aplicações a nível industrial. Contudo, os estudos sobre a aplicação industrial das peptidases de leveduras do género *Saccharomyces*, em particular da levedura da cerveja são raros. A obtenção das peptidases intracelulares da levedura da cerveja requer a utilização de métodos mecânicos e/ou não mecânicos. Neste trabalho experimental, as peptidases da levedura da cerveja foram extraídas por agitação em vortex com esferas de vidro. As peptidases extraídas apresentaram

actividade na zona de pH 5-10, com actividade óptima na zona de pH neutro-alcalino (pH 7-8).

O concentrado de proteínas da *dreche*, após solubilização a pH 8, foi utilizado como substrato na obtenção de hidrolisados, utilizando as peptidases da levedura da cerveja. Os resultados obtidos permitiram verificar que as peptidases da levedura da cerveja hidrolisam as proteínas da *dreche*.

As condições para obtenção dos hidrolisados das proteínas da *dreche* com as peptidases da levedura da cerveja foram estudadas. Os resultados obtidos demonstraram que o aumento da concentração de peptidases da levedura da cerveja e o aumento da concentração de proteínas da *dreche* resultaram num aumento da hidrólise. De uma forma geral, a hidrólise enzimática aumentou com o aumento do tempo da reacção (até 40 min). O pH e temperatura óptimos para a hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja foram de 6 e 50°C, respectivamente.

A potencial presença de inibidores endógenos das peptidases vacuolares nos extractos enzimáticos foi detectada, devido a um aumento da hidrólise das proteínas da *dreche* após longos períodos de incubação dos extractos enzimáticos a pH ácido. Estes resultados também indicaram a possibilidade de as peptidases vacuolares, tais como a peptidases B e a carboxipeptidase Y, estarem envolvidas na hidrólise das proteínas da *dreche*. Os resultados da utilização de inibidores sintéticos demonstraram, que possivelmente são peptidases de serina e metalopeptidases as principais responsáveis pela hidrólise das proteínas da *dreche*.

A hidrólise enzimática do concentrado de proteínas da *dreche* com peptidases comerciais Alcalase® e Protamex® foi também estudada neste trabalho. O pH óptimo de hidrólise das proteínas da *dreche* pela Alcalase® foi 9 e pela Protamex® foi 8. A temperatura óptima para a Alcalase® e a Protamex® foi 60°C. A hidrólise das proteínas da *dreche* com as peptidases comerciais e com as peptidases da levedura da cerveja foi comparada. Nas condições óptimas de pH e temperatura, a Alcalase® foi a enzima que apresentou maior actividade sobre as proteínas da *dreche*. Estes resultados foram comprovados pela análise dos hidrolisados por RP-HPLC/UV. A separação dos hidrolisados por RP-HPLC/UV também permitiu verificar que os hidrolisados obtidos com as peptidases comerciais e com as peptidases da levedura da cerveja apresentaram tempos de retenção semelhantes.

O trabalho realizado constitui uma base para vários estudos adicionais, tais como, a optimização do processo de extracção e purificação das peptidases da levedura da cerveja, de forma a aumentar o rendimento da hidrólise das proteínas da *dreche*; a caracterização dos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise das proteínas da *dreche*

pelas peptidases da levedura da cerveja, em particular, a determinação do peso molecular dos péptidos obtidos e a determinação da composição em aminoácidos, bem como, a identificação dos péptidos e aminoácidos produzidos; o estudo das propriedades funcionais, nutricionais e bioactivas dos péptidos e aminoácidos resultantes da hidrólise das proteínas da *dreche* pelas peptidases da levedura da cerveja; o estudo de potenciais aplicações das peptidases da levedura da cerveja a nível industrial, nomeadamente na indústria alimentar, a nível médico e biotecnológico; e a aplicação das peptidases intracelulares da levedura da cerveja para obtenção de hidrolisados, a partir de outros subprodutos industriais, tais como, os subprodutos resultantes da indústria de processamento de pescado, bem como de outros substratos de natureza proteica.



## Referências

- ALIYU, S. e BALA, M. 2011. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *Afr J Biotechnol* **10(3)**, 324-331.
- APAR, D.K. e OZBEK, B. 2008. Protein releasing kinetics of bakers' yeast cells by ultrasound. *Chem Biochem Eng Q* **22(1)**, 113-118.
- BALASUNDARAM, B., HARRISON, S. e BRACEWELL, D.G. 2009. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. *Trends Biotechnol* **27(8)**, 477-485.
- BALASUNDARAM, B. e HARRISON, S.T.L. 2006. Disruption of brewers' yeast by hydrodynamic cavitation: Process variables and their influence on selective release. *Biotechnol Bioeng* **94(2)**, 303-311.
- BALASUNDARAM, B. e PANDIT, A.B. 2001. Significance of location of enzymes on their release during microbial cell disruption. *Biotechnol Bioeng* **75(5)**, 607-614.
- BARTOLOME, B. e GOMEZ-CORDOVES, C. 1999. Barley spent grain: Release of hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) by commercial enzyme preparations. *J Sci Food Agr* **79(3)**, 435-439.
- BENITEZ, R., IBARZ, A. e PAGAN, J. 2008. Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquim Clin L* **42(2)**, 227-236.
- BEYNON, R.J. e BOND, J.S. 2001. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. 2 Ed. Oxford University Press.
- BHASKAR, K., SHETTY, A.P., SHAREEF, M.M., RAMAMOHAN, Y. e SHETTY, K.T. 2002. Dinitrophenol derivatization of proteolytic products and its application in the assay of protease(s) activity. *J Neurosci Meth* **120(2)**, 155-161.
- BOLUMAR, T., SANZ, Y., ARISTOY, M.C. e TOLDRA, F. 2005. Protease B from *Debaryomyces hansenii*: purification and biochemical properties. *Int J Food Microbiol* **98(2)**, 167-177.
- BOLUMAR, T., SANZ, Y., ARISTOY, M.C. e TOLDRA, F. 2006. Protease (PrA and PrB) and prolyl and arginyl aminopeptidase activities from *Debaryomyces hansenii* as a function of growth phase and nutrient sources. *Int J Food Microbiol* **107(1)**, 20-26.

- BOLUMAR, T., SANZ, Y., ARISTOY, M.C. e TOLDRA, F. 2008. Purification and characterisation of proteases a and D from *Debaryomyces hansenii*. *Int J Food Microbiol* **124(2)**, 135-141.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- BREDDAM, K. e BEENFELDT, T. 1991. Acceleration of Yeast Autolysis by Chemical Methods for Production of Intracellular Enzymes. *Appl Microbiol Biot* **35(3)**, 323-329.
- BRENDA 2011. Brenda - Braunschweig Enzyme Database. Disponível em <http://www.brenda-enzymes.org> [acedido em 01-02-2011].
- CANDIDO, L.M.B. e SGARBIERI, V.C. 2003. Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. *J Sci Food Agr* **83(9)**, 937-944.
- CARVALHEIRO, F., ESTEVES, M.P., PARAJO, J.C., PEREIRA, H. e GIRIO, F.M. 2004. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresour Technol* **91(1)**, 93-100.
- CELUS, I. 2008. Characterisation and functionality of brewers' spent grain proteins and their enzymatic hydrolysates [dissertação], Katholieke Universiteit Leuven, Leuven.
- CELUS, I., BRIJS, K. e DELCOUR, J.A. 2006. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *J Cereal Sci* **44(2)**, 203-211.
- CELUS, I., BRIJS, K. e DELCOUR, J.A. 2007. Enzymatic hydrolysis of brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates. *J Agr Food Chem* **55(21)**, 8703-8710.
- CELUS, I., BRIJS, K. e DELCOUR, J.A. 2009. Fractionation and characterization of brewers' spent grain protein hydrolysates. *J Agric Food Chem* **57(12)**, 5563-5570.
- CHAE, H.J., JOO, H. e IN, M.J. 2001. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1. effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresour Technol* **76(3)**, 253-258.
- CHARLES, P., DEVANATHAN, V., ANBU, P., PONNUSWAMY, M.N., KALAICHELVAN, P.T. e HUR, B.K. 2008. Purification characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *J Basic Microb* **48(5)**, 347-352.
- COPELAND, R.A. 2000. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. 2 Ed. Wiley-VCH.
- DIPTEE, R., SMITH, J.P., ALLI, I. e KHANIZADEH, S. 1989. Application of Response-Surface Methodology in Protein Extraction Studies from Brewers Spent Grain. *J Food Process Pres* **13(6)**, 457-474.
- EL-SHAFFEY, E.I., GAMEIRO, M.L.F., CORREIA, P.F.M. e DE CARVALHO, J.M.R. 2004. Dewatering of brewer's spent grain using a membrane filter press: A pilot plant study. *Separ Sci Technol* **39(14)**, 3237-3261.

- FAULDS, C.B., COLLINS, S., ROBERTSON, J.A., TREIMO, J., EIJSINK, V.G.H., HINZ, S.W.A., SCHOLS, H.A., BUCHERT, J. e WALDRON, K.W. 2009. Protease-induced solubilisation of carbohydrates from brewers' spent grain. *J Cereal Sci* **50(3)**, 332-336.
- FAULDS, C.B., ROBERTSON, J.A. e WALDRON, K.W. 2008. Effect of pH on the solubilization of brewers' spent grain by microbial carbohydrases and proteases. *J Agric Food Chem* **56(16)**, 7038-7043.
- FERREIRA, I.M.P.L.V.O., PINHO, O., VIEIRA, E. e TAVARELA, J.G. 2010. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci Tech* **21(2)**, 77-84.
- FILLAUDEAU, L., BLANPAIN-AVET, P. e DAUFIN, G. 2006. Water, wastewater and waste management in brewing industries. *J Clean Prod* **14(5)**, 463-471.
- FLORES, M.V., CUELLAS, A. e VOGET, C.E. 1999. The proteolytic system of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **15(14)**, 1437-1448.
- FORSSELL, P., KONTKANEN, H., SCHOLS, H.A., HINZ, S., EIJSINK, V.G.H., TREIMO, J., ROBERTSON, J.A., WALDRON, K.W., FAULDS, C.B. e BUCHERT, J. 2008. Hydrolysis of Brewers' Spent Grain by Carbohydrate Degrading Enzymes. *J I Brewing* **114(4)**, 306-314.
- FOX, S.I. 2003. *Human Physiology*. 8 Ed. McGraw-Hil.
- GAGNON-ARSENAULT, I., PARISE, L., TREMBLAY, J. e BOURBONNAIS, Y. 2008. Activation mechanism, functional role and shedding of glycosylphosphatidylinositol-anchored Yps1p at the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface. *Mol Microbiol* **69(4)**, 982-993.
- GARCÍA-CARREÑO, F.L. 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education* **3(4)**, 145-150.
- GARCÍA-CARREÑO, F.L. 1996. Proteinase inhibitors. *Trends Food Sci Tech* **7(6)**, 197-204.
- GECIOVA, J., BURY, D. e JELEN, P. 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. *Int Dairy J* **12(6)**, 541-553.
- GUPTA, M., ABU-GHANNAM, N. e GALLAGHAR, E. 2010. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Compr Rev Food Sci F* **9(3)**, 318-328.
- HAUPTMANN, P. e LEHLE, L. 2008. Kex1 protease is involved in yeast cell death induced by defective N-glycosylation, acetic acid, and chronological aging. *J Biol Chem* **283(27)**, 19151-19163.
- HAYASHI, R., OKA, Y., DOI, E. e HATA, T. 1968. Activation of Intracellular Proteinases of Yeast .I. Occurrences of Inactive Precursors of Proteinases B and C and Their Activation. *Agr Biol Chem Tokyo* **32(3)**, 359-&.
- HENRICH, S., LINDBERG, I., BODE, W. e THAN, M.E. 2005. Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: Explanation of their specificity. *J Mol Biol* **345(2)**, 211-227.

- HERNAWAN, T. e FLEET, G. 1995. Chemical and Cytological Changes during the Autolysis of Yeasts. *J Ind Microbiol* **14(6)**, 440-450.
- HILT, W. e WOLF, D.H. 1992. Stress-Induced Proteolysis in Yeast. *Mol Microbiol* **6(17)**, 2437-2442.
- HUTTER, K.J., MIEDL, M., KUHMANN, B., NITZSCHE, F., BRYCE, J.H. e STEWART, G.G. 2005. Detection of proteinases in *Saccharomyces cerevisiae* by flow cytometry. *J / Brewing* **111(1)**, 26-32.
- JAJCANIN-JOZIC, N., DELLER, S., PAVKOV, T., MACHEROUX, P. e ABRAMIC, M. 2010. Identification of the reactive cysteine residues in yeast dipeptidyl peptidase III. *Biochimie* **92(1)**, 89-96.
- JAY, A.J., PARKER, M.L., FAULKS, R., HUSBAND, F., WILDE, P., SMITH, A.C., FAULDS, C.B. e WALDRON, K.W. 2008. A systematic micro-dissection of brewers' spent grain. *J Cereal Sci* **47(2)**, 357-364.
- JONES, B.L. 2005. Endoproteases of barley and malt. *J Cereal Sci* **42(2)**, 139-156.
- JONES, E.W. 1991. Three proteolytic systems in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266(13)**, 7963-7966.
- JONES, E.W. 2002. Vacuolar proteases and proteolytic artifacts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* **351**, 127-150.
- KAMINI, N.R., HEMACHANDER, C., MALA, J.G.S. e PUVANAKRISHNAN, R. 1999. Microbial enzyme technology as an alternative to conventional chemicals in leather industry. *Curr Sci India* **77(1)**, 80-86.
- KATO, M., KUZUHARA, Y., MAEDA, H., SHIRAGA, S. e UEDA, M. 2006. Analysis of a processing system for proteases using yeast cell surface engineering: conversion of precursor of proteinase A to active proteinase A. *Appl Microbiol Biot* **72(6)**, 1229-1237.
- KOPPEN, M. e LANGER, T. 2007. Protein degradation within mitochondria: Versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit Rev Biochem Mol* **42(3)**, 221-242.
- KUNST, T. 2003. Protein Modification to Optimize Functionality Protein Hydrolysates. In *Handbook of Food Enzymology*, (J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen and D.W.S. Wong), Marcel Dekker.
- LAMOOLPHAK, W., GOTO, M., SASAKI, M., SUPHANTHARIKA, M., WANGNAPOH, C., PROMMUAG, C. e SHOTIPRUK, A. 2006. Hydrothermal decomposition of yeast cells for production of proteins and amino acids. *J Hazard Mater* **137(3)**, 1643-1648.
- LENNEY, J.F. 1975. Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B, and C. *Journal of Bacteriology* **122(3)**, 1265-1273.
- LI, S.C. e KANE, P.M. 2009. The yeast lysosome-like vacuole: Endpoint and crossroads. *Bba-Mol Cell Res* **1793(4)**, 650-663.
- LIASET, B., NORTVEDT, R., LIED, E. e ESPE, M. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex (TM) protease. *Process Biochem* **37(11)**, 1263-1269.

- LOPEZ, B., PONTIGGIA, R.M. e FERNANDEZ, H. 2010. Process for drying brewer's spent grains. Patent US2008/084135
- MEUSSDOERFFER, F., TORTORA, P. e HOLZER, H. 1980. Purification and Properties of Proteinase-a from Yeast. *J Biol Chem* **255(24)**, 2087-2093.
- MURRAY, R.K. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26 Ed. McGraw-Hill Professional.
- MUSSATTO, S.I. 2009. Biotechnological Potential of Brewing Industry By-Products. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*, (P.S. Nigam and A. Pandey) pp. 313-326, Springer.
- MUSSATTO, S.I., DRAGONE, G. e ROBERTO, I.C. 2006. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J Cereal Sci* **43(1)**, 1-14.
- MUSSATTO, S.I. e ROBERTO, I.C. 2005. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *J Sci Food Agr* **85(14)**, 2453-2460.
- NC-IUBMB 2010. Enzyme Nomenclature. Recommendations. Disponível em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html> [acedido em 01/09/2010].
- NEKLYUDOV, A.D., ILYUKHINA, V.P., MOSINA, G.I., PETRAKOVA, A.N., FEDOROVA, N.F. e KUZNETSOV, V.D. 1996. Hydrolysis of protein substrates by yeast proteases. *Appl Biochem Micro+* **32(2)**, 213-218.
- NEKLYUDOV, A.D., IVANKIN, A.N. e BERDUTINA, A.V. 2000. Production and purification of protein hydrolysates (Review). *Appl Biochem Micro+* **36(4)**, 317-324.
- NEKLYUDOV, A.D., IVANKIN, A.N., MOSINA, G.I., PETRAKOVA, A.N. e GOROSHKO, G.P. 1998. Optimum conditions for hydrolysis of protein substrate by yeast proteases from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Appl Biochem Micro+* **34(4)**, 358-361.
- NG, N.M., PIKE, R.N. e BOYD, S.E. 2009. Subsite cooperativity in protease specificity. *Biological Chemistry* **390(5-6)**, 401-407.
- NORTH, M.J. 1982. Comparative Biochemistry of the Proteinases of Eukaryotic Microorganisms. *Microbiol Rev* **46(3)**, 308-340.
- OKUNGBOWA, F., GHOSH, A., CHOWDHURY, R., CHAUDHURI, P., BASU, A. e PAL, K. 2007. Mechanical Lysis of *Candida* Cells for Crude Protein and Enzymatic Activity Estimation: Comparison of Three Methods. *World Journal of Medical Sciences* **2(2)**, 101-104.
- OSMAN, A.M. 2003. Barley and malt proteins and proteinases: II. The purification and characterisation of five malt endoproteases, using the highly degradable barley protein fraction (HDBPF) substrate. *J I Brewing* **109(2)**, 142-149.
- OZVURAL, E.B., VURAL, H., GOKBULUT, I. e OZBOY-OZBAS, O. 2009. Utilization of brewer's spent grain in the production of Frankfurters. *Int J Food Sci Tech* **44(6)**, 1093-1099.
- PARR, C.L., KEATES, R.A.B., BRYKSA, B.C., OGAWA, M. e YADA, R.Y. 2007. The structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast* **24(6)**, 467-480.

- PAUCEN, A., VODONAR, D., MUDURA, E., JIMBOREAN, M., SOCACIU, C. e BRATFALEAN, D. 2010. Monitoring a Biotechnological Process in a Biofermentor to Obtain a Dairy Product Using Brewer's Yeasts. *Bulletin UASVM Agriculture* **67(2)**, 367-372.
- PERICIN, D., RADULOVIC-POPOVIC, L., VASTAG, Z., MADAREV-POPOVIC, S. e TRIVIC, S. 2009. Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. *Food Chem* **115(2)**, 753-757.
- PINHO, O., FERREIRA, I.M.P.L.V.O. e SANTOS, L.H.M.L.M. 2006. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of Chromatography A* **1121(2)**, 145-153.
- PRIEST, F.G. e STEWART, G.G. 2006. *Handbook of brewing*. 2 Ed., Vol 157. Taylor & Francis.
- RAWLINGS, N.D. e BARRETT, A.J. 2010. MEROPS: the peptidase database. Disponível em <http://merops.sanger.ac.uk> [acedido em 20/05/2010].
- RAWLINGS, N.D., TOLLE, D.P. e BARRETT, A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* **378(Pt 3)**, 705-716.
- RICCI-SILVA, M.E., VITOLO, M. e ABRAHAO-NETO, J. 2000. Protein and glucose 6-phosphate dehydrogenase releasing from baker's yeast cells disrupted by a vertical bead mill. *Process Biochem* **35(8)**, 831-835.
- ROBERTSON, J.A., I'ANSON, K.J., BROCKLEHURST, T.F., FAULDS, C.B. e WALDRON, K.W. 2010. Effect of storage conditions on the microbial ecology and biochemical stability of cell wall components in brewers' spent grain. *J Agric Food Chem* **58(12)**, 7266-7272.
- ROY, M.K., WATANABE, Y. e TAMAI, Y. 2000. Yeast protease B-digested skimmed milk inhibits angiotensin-I-converting-enzyme activity. *Biotechnol Appl Bioc* **31**, 95-100.
- RUPP, S. e WOLF, D.H. 1995. Biogenesis of the Yeast Vacuole (Lysosome) - the Use of Active-Site Mutants of Proteinase Ysca to Determine the Necessity of the Enzyme for Vacuolar Proteinase Maturation and Proteinase Yscb Stability. *European Journal of Biochemistry* **231(1)**, 115-125.
- RUTHERFURD, S.M. 2010. Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *J Aoac Int* **93(5)**, 1515-1522.
- SALPLACHTA, J. e BOBALOVA, J. 2009. MALDI-TOF mass spectrometry of hordeins: rapid approach for identification of malting barley varieties. *J Mass Spectrom* **44(9)**, 1287-1292.
- SANTOS, M., JIMEMEZ, J.J., BARTOLOME, B., GOMEZ-CORDOVES, C. e DEL NOZAL, M.J. 2003. Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chem* **80(1)**, 17-21.
- SANTOS, S.D., MARTINS, V., SALAS-MELLADO, M. e PRENTICE, C. 2009a. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, 1-8.

- SANTOS, S.D., MARTINS, V.G., SALAS-MELLADO, M. e PRENTICE-HERNANDEZ, C. 2009b. Optimization of the Production Parameters for Enzymatic Protein Hydrolyzed Using Low Commercial Value Fish. *Quim Nova* **32(1)**, 72-77.
- SARRY, J.E., CHEN, S., COLLUM, R.P., LIANG, S., PENG, M., LANG, A., NAUMANN, B., DZIERZINSKIL, F., YUAN, C.X., HIPPLER, M. e REA, P.A. 2007. Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs J* **274(16)**, 4287-4305.
- SCHLEE, C., MIEDL, M., LEIPER, K.A. e STEWART, G.G. 2006. The potential of confocal imaging for measuring physiological changes in brewer's yeast. *J I Brewing* **112(2)**, 134-147.
- SHEN, L., WANG, X., WANG, Z., WU, Y. e CHEN, J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chem* **107(2)**, 929-938.
- SHYNKARYK, M.V., LEOVKA, N.I., LANOISELLE, J.L., NONUS, M., BEDEL-CLOTOUR, C. e VOROBIEV, E. 2009. Electrically-assisted extraction of bio-products using high pressure disruption of yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). *J Food Eng* **92(2)**, 189-195.
- SIEVI, E., SUNTIO, T. e MAKAROW, M. 2001. Proteolytic function of GPI-anchored plasma membrane protease Yps1p in the yeast vacuole and Golgi. *Traffic* **2(12)**, 896-907.
- SILVESTRE, M.P.C. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem* **60(2)**, 263-271.
- SORENSEN, S.O., VANDENHAZEL, H.B., KIELLANDBRANDT, M.C. e WINTHER, J.R. 1994. Ph-Dependent Processing of Yeast Procarboxypeptidase-Y by Proteinase-a in-Vivo and in-Vitro. *European Journal of Biochemistry* **220(1)**, 19-27.
- SPORMANN, D.O., HEIM, J. e WOLF, D.H. 1991. Carboxypeptidase yscS: gene structure and function of the vacuolar enzyme. *Eur J Biochem* **197(2)**, 399-405.
- STEINER, E., GASTL, M. e BECKER, T. 2011. Protein changes during malting and brewing with focus on haze and foam formation: a review. *European Food Research and Technology* **232(2)**, 191-204.
- STOJCESKA, V. e AINSWORTH, P. 2008. The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads. *Food Chem* **110(4)**, 865-872.
- STOREY, R.D. e WAGNER, F.W. 1986. Plant Proteases - a Need for Uniformity. *Phytochemistry* **25(12)**, 2701-2709.
- TANG, D.S., TIAN, Y.J., HE, Y.Z., LI, L., HU, S.Q. e LI, B. 2010. Optimisation of Ultrasonic-assisted Protein Extraction from Brewer's Spent Grain. *Czech J. Food Sci.* **28(1)**, 9-17.
- TANG, D.S., YIN, G.M., HE, Y.Z., HU, S.Q., LI, B., LI, L., LIANG, H.L. e BORTHAKUR, D. 2009. Recovery of protein from brewer's spent grain by ultrafiltration. *Biochem Eng J* **48(1)**, 1-5.
- TANIMIZU, N. e HAYASHI, R. 1996. Changes in vacuolar protease activities during synchronous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotech Bioch* **60(9)**, 1526-1527.

- TREIMO, J., ASPMO, S.I., EIJSINK, V.G. e HORN, S.J. 2008. Enzymatic solubilization of proteins in brewer's spent grain. *J Agric Food Chem* **56(13)**, 5359-5365.
- TURK, B. 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **5(9)**, 785-799.
- VAN DEN HAZEL, H.B., KIELLAND-BRANDT, M.C. e WINTHER, J.R. 1996. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* **12(1)**, 1-16.
- VAN DER VEN, C., GRUPPEN, H., DE BONT, D.B.A. e VORAGEN, A.G.J. 2001. Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *J Agr Food Chem* **49(10)**, 5005-5012.
- VANGAVER, D. e HUYGHEBAERT, A. 1991. Optimization of Yeast-Cell Disruption with a Newly Designed Bead Mill. *Enzyme Microb Tech* **13(8)**, 665-671.
- VILLANUEVA, A., VIOQUE, J., SANCHEZ-VIOQUE, R., CLEMENTE, A., BAUTISTA, J. e MILLAN, F. 1999. Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas Aceites* **50(6)**, 472-476.
- WHITAKER, J.R. 2003. Proteolytic Enzymes. In *Handbook of food enzymology*, (J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen and D.W.S. Wong), Marcel Dekker.
- WILHITE, S.E., ELDEN, T.C., PUIZDAR, V., ARMSTRONG, S. e SMIGOCKI, A.C. 2000. Inhibition of aspartyl and serine proteinases in the midgut of sugarbeet root maggot with proteinase inhibitors. *Entomol Exp Appl* **97(2)**, 229-233.
- WOLF, D.H. 2004. From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal. *Cell Mol Life Sci* **61(13)**, 1601-1614.
- WOLFF, A.M., DIN, N. e PETERSEN, J.G.L. 1996. Vacuolar and extracellular maturation of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast* **12(9)**, 823-832.
- YASUHARA, T., NAKAI, T. e OHASHI, A. 1994. Aminopeptidase Y, a new aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, properties, localization, and processing by protease B. *J Biol Chem* **269(18)**, 13644-13650.
- YOKOI, S., SHIGYO, T. e TAMAKI, T. 1996. A fluorometric assay for proteinase A in beer and its application for the investigation of enzymatic effects on foam stability. *J I Brewing* **102(1)**, 33-37.
- YOKOYAMA, R., KAWASAKI, H. e HIRANO, H. 2006. Identification of yeast aspartyl aminopeptidase gene by purifying and characterizing its product from yeast cells. *Febs J* **273(1)**, 192-198.

