

**USO DE PROTEASE DE *Bacillus* spp. NA HIDRÓLISE
PROTÉICA DE FARINHA DE FEIJÃO (*Phaseolus
vulgaris* L.)**

DISNEY RIBEIRO DIAS

2007

DISNEY RIBEIRO DIAS

**USO DE PROTEASE DE *Bacillus* spp. NA HIDRÓLISE PROTÉICA DE
FARINHA DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Curso de Doutorado
em Ciência dos Alimentos, área de concentração
em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do
título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Dias, Disney Ribeiro.

Uso de protease de *Bacillus spp.* na hidrólise proteica de farinha de feijão
(*Phaseolus vulgaris* L.) / Disney Ribeiro Dias. -- Lavras : UFLA, 2007.

131 p. : il.

Doutorado (Tese) – Universidade Federal de Lavras.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Feijão. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. Protease de *Bacillus spp.* 4. Enzimas
proteolíticas. 5. Soro de leite. 6. Digestibilidade protéica *in vitro*.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD- 664.805652

DISNEY RIBEIRO DIAS

**USO DE PROTEASE DE *Bacillus spp* NA HIDRÓLISE PROTÉICA DE
FARINHA DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris L.*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Curso de Doutorado
em Ciência dos Alimentos, área de concentração
em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do
título de “Doutor”.

APROVADA em 17 de dezembro de 2007

Profª. Dra. Celeste Maria Patto de Abreu	UFLA
Profª. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada	UEM
Profª. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dra. Cristina Ferreira Silva	UFLA

Profª. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICATÓRIA

A Deus,

A minha esposa, Rosane, e filhos, Eric e Felipe,

À Sra. Enice Ribeiro Dias e ao Sr. João Dias de Lera, meus pais,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua imensa misericórdia, amor e justiça.

Àqueles a quem dediquei este trabalho.

À Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan, pela paciência, ensinamentos e conduta ética exemplares

À Profa. Dra. Celeste Maria Patto de Abreu, pelo apoio, atenção e orientação.

À Profa. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre, pela presteza nos ensinamentos e pela colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Magno Antonio Patto Ramalho, pela gentileza na cessão das cultivares de feijão utilizadas neste trabalho,

Aos professores que compuseram a banca avaliadora.

À Universidade Federal de Lavras, por meio dos Departamentos de Ciência dos Alimentos, Biologia e Química, pela oportunidade de realização do doutorado.

Aos colegas professores, coordenadores de curso e técnicos administrativos do Centro Universitário de Lavras/UNILAVRAS, pela compreensão e apoio.

À Presidência da Fundação Educacional de Lavras (FELA), Prof. Canísio Ignácio Lunkes (*in memoriam*) e Prof. João Antonio Argenta, por oportunizar-me a realização deste curso.

À colega Danielle Marques Vilela e às técnicas de laboratório Xulita (DQI), Tina e Sandra (DCA), pelo apoio na realização de algumas análises.

Ao amigo Leandro Flávio Carneiro, pelo auxílio nas análises estatísticas,

A todos os professores dos quais tive a honra de ter sido aluno.

A você, que de alguma forma me ajudou em algum momento de minha vida.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral	2
2 Referencial Teórico.....	4
2.1 Hidrólise de proteínas	4
2.1.1 Fatores interferentes	5
2.2 Enzimas em alimentos	7
2.2.1 Emprego de proteases na indústria.....	13
2.3 Hidrolisados protéicos	19
2.3.1 Aplicação de hidrolisados protéicos.....	20
2.3.2 Importância nutricional dos hidrolisados protéicos.....	22
2.4 Feijão	23
2.4.1 Aspectos nutricionais do feijão	25
2.4.1.1 Teor de minerais, vitaminas e lipídeos	27
2.4.1.2 Carboidratos.....	28
2.4.1.3 Proteínas	31
2.4.1.3.1 Digestibilidade protéica <i>in vitro</i>	33
3 Referências Bibliográficas	35
CAPÍTULO 2: Alkaline protease from <i>Bacillus</i> sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey.....	55
1 Resumo.....	56
2 Abstract	57
3 Introduction.....	60
4 Materials and Methods.....	63

4.1	Growth of microorganisms and enzyme production.....	63
4.2	Protein quantification.....	64
4.3	Protease assay	64
4.4	Enzyme precipitation	64
4.5	Effect of temperature and pH on enzymatic activity	65
5	Results and Discussion.....	67
5.1	Proteolytic activity in the crude extract	67
5.2	Enzyme assay in ammonium sulfate fractions.....	70
5.3	Effect of temperature and pH on enzyme activity and stability.....	74
	Acknowledgements.....	82
6	References.....	83
	CAPÍTULO 3: Digestibilidade protéica in vitro de farinhas de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) pré-tratadas com protease comercial e protease de <i>Bacillus</i> sp	89
1	Resumo.....	90
2	Abstract	91
3	Introdução	95
4	Material e Métodos	98
4.1	Cultivares de feijão	98
4.2	Hidrólise enzimática das farinhas de feijão	98
4.3	Análises nas farinhas de feijão.....	99
5	Resultados e Discussão	101
5.1	Composição química das farinhas de feijão.....	101
5.2	Hidrolisados protéicos obtidos das farinhas de feijão.....	103
6	Conclusões	108
7	Referências Bibliográficas	109
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
	ANEXOS	116

RESUMO

DIAS, Disney Ribeiro. **Uso de protease de *Bacillus* spp. na hidrólise protéica de farinha de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Lavras: UFLA, 2007, 131 p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos) ¹.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento básico na refeição do brasileiro, constituindo uma das principais fontes protéicas da dieta, além de fornecer outros macronutrientes e minerais. Apesar da considerável concentração de proteínas no feijão, este alimento é considerado de baixo valor biológico, quando comparado a proteínas animais e outras fontes protéicas vegetais. A aplicação de proteases, na indústria de alimentos, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, seja na fabricação de queijos, na diminuição da alergenicidade de proteínas do leite, na modificação de textura, na indústria de bebidas e, mais recentemente, na obtenção de hidrolisados protéicos. Esta classe de enzimas desempenha papel importante na ciência e na tecnologia de alimentos. A melhoria da qualidade nutricional de alimentos, em especial o aumento no valor biológico de suas proteínas, tem sido alvo de muitas pesquisas. Uma das possibilidades de se alcançar resultados satisfatórios neste contexto é o emprego de proteases para a obtenção de hidrolisados protéicos. Estes compostos têm a digestão favorecida, apresentam maiores teores de di e tripeptídeos e tendem à hipoalergenicidade. Visando melhorar as qualidades nutricionais do feijão, em especial quanto disponibilidade protéica, o objetivo deste trabalho foi a utilização de fonte enzimática microbiana de baixo custo, capaz de promover a hidrólise das proteínas do feijão e melhorar a digestibilidade protéica *in vitro* do mesmo. O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira, duas cepas de *Bacillus*, uma padrão (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) e uma selvagem (*Bacillus* sp. UFLA 817CF) isolada durante o processo fermentativo de café via seca no Sul de Minas Gerais, Brasil, foram avaliadas quanto à capacidade de secreção de proteases alcalinas. As duas cepas foram cultivadas em cinco meios de cultivo distintos, sendo caldo nutriente, caldo nutriente mais caseinato de sódio 1% e caldo nutriente adicionado de soro de leite em pó, nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%, durante 72 horas, a 28°C e 150 rpm. Amostras destes cultivos foram coletadas a cada 24 horas para avaliação de atividade proteolítica, proteínas totais e contagem de UFC/mL. O

¹ Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Orientadora), Marialice Pinto Coelho Silvestre – FAFAR/UFMG (Co-Orientadora), Celeste Maria Patto de Abreu, DQI/UFLA (Co-orientadora).

máximo de atividade proteolítica foi observado no tempo 24 horas, para ambos os microrganismos testados (839,8 U/mg para *B. subtilis* ATCC 6633 e 975,9 U/mg para *Bacillus* sp. UFLA 817CF). A saturação com 60% de sulfato de amônio foi a fração que apresentou os melhores resultados de atividade proteolítica específica para todos os meios testados, considerando a cepa *Bacillus* sp. UFLA 817CF. As melhores condições para a atividade proteolítica desta foram em pH 9,0 e 40°C, em três meios testados (NB, NBC e NBW1), os quais apresentaram melhores resultados. A protease de *Bacillus* sp. UFLA 817CF, obtida da fração 60%, apresentou estabilidade em pH 7,0 e estabilidade térmica a 40°C e 50°C, podendo ser considerada uma alternativa para utilização do efluente de soro de leite, além de poder ser empregada em diversas áreas, com a finalidade de promover hidrólise protéica. Na segunda etapa foram realizados tratamentos enzimáticos em quatro cultivares de feijão (ON; OPNS, TAL e VC3). O delineamento foi inteiramente casualizado, em fatorial 4X3 (quatro cultivares e três tratamentos: testemunha, sem protease; hidrolisado 1, adição de protease comercial; hidrolisado 2, adição de protease de *Bacillus* sp.) com 4 repetições. A concentração de proteínas totais (g/100 g de matéria seca) nas amostras variou de 16,94% a 18,06%, enquanto a concentração de fenólicos totais esteve entre 0,78% e 1,12% (g Eq. ácido tânico/100 g de matéria seca). A digestibilidade protéica *in vitro* na farinha não tratada enzimaticamente (testemunha) variou entre 47,30% e 56,17%, em relação à digestibilidade da caseína. As concentrações de P, K, Ca, Mg, S e Zn, observadas nas quatro cultivares testadas, se encontram dentro dos valores médios disponíveis na literatura. No tratamento com protease de *Bacillus* sp. houve diminuição nos teores de Cu e Mn. O teor médio de Fe aumentou nas farinhas tratadas enzimaticamente, chegando ao incremento máximo de 102% para a farinha da cultivar TAL tratada com protease de *Bacillus* sp. A digestibilidade de todas as farinhas testadas aumentou significativamente ($p < 0,05$), em função do tratamento enzimático. A maior variação foi observada na cultivar OPNS, cujos valores, respectivamente, para a testemunha e protease de *Bacillus* sp., foram 54,4% e 81,6%.

ABSTRACT

DIAS, Disney Ribeiro. **Use of *Bacillus* spp. protease to improve protein hydrolysis of bean (*Phaseolus vulgaris* L) flour.** Lavras: UFLA, 2007, 131 p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos) ².

The common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are a staple food for Brazilian diet, which represent the major source of dietary protein, and other micronutrients and minerals. Despite the considerable concentration of protein in beans, the food is considered of low biological value when compared to animal proteins and other plant protein sources. The application of proteases in the food industry has increased considerably in recent years. This class of enzymes plays an important role in Food Science and Technology, for example, in the manufacture of cheese, in decrease of the allergenicity of milk proteins, the modification of food texture, in beverage industry and, more recently, to obtain protein hydrolysates. Improving of the nutritional quality of the food, especially to increase their biological value of proteins has been the subject of many researches. One possibility to achieve satisfactory results in this regard is the use of proteases to obtaining protein hydrolysates. These compounds have the digestion favored due to higher levels of di and tripeptides and tend to hipoallergenicity. Aiming to improve the nutritional qualities of beans, especially the protein availability, the objective of this work was to use a microbial enzyme produced from a low-cost source, capable of promoting the hydrolysis of proteins from beans and improve its *in vitro* digestibility. This work was performed in two steps. Firstly, two strains of *Bacillus*, one from culture collection (*B. subtilis* ATCC 6633) and a wild type (*Bacillus* sp. UFLA 817CF) isolated from coffee beans in South of Minas Gerais, Brazil, were evaluated in relation to secretion of alkaline proteases. The strains were grown on nutrient broth, nutrient broth with sodium caseinate and nutrient broth with three different concentrations of cheese whey powder during 72 h. Samples were collected at 24 hour intervals to evaluate the proteolytic activity, protein content and cell population. Maximum protease activity was observed after 24 hours growth for both the microorganisms, a period that coincided with the end of the exponential phase. The specific activity values were, respectively, 839.8 U/mg for *B. subtilis* ATCC 6633 and 975.9 U/mg for *Bacillus* sp. UFLA 817CF. The

² Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Major Professor), Marialice Pinto Coelho Silvestre – FAFAR/UFMG, Celeste Maria Patto de Abreu, DQI/UFLA.

60% saturation presented the best results for specific protease activity in all the growth culture media tested with *Bacillus* sp. UFLA 817CF. *Bacillus* sp. UFLA 817CF showed highest enzymatic activity at pH 9.0 and 40 °C in the three culture media tested (NB, NBC e NBW1). The protease obtained from culture of the wild *Bacillus* strain presented stability at pH 7.0 and considerable heat stability at 40°C and 50°C, and could be an alternative for the industry to utilize cheese whey to produce proteolytic enzymes. The second step included improving the availability of protein in beans by enzymatic treatments were performed in four cultivars (ON, OPNS, TAL and VC3). The approach was completely randomized design with four replicates. It was used a 4 x 3 factorial arrangement (four cultivars and three treatments; treatment 1: addition of commercial protease and treatment 2: addition of protease from *Bacillus* sp., treatment 3: control without enzyme). The concentration of total protein (g/100 g of dry matter) in the samples ranged from 16.94% to 18.06%, while the concentration of total phenolics was between 0.78% and 1.12% (g Eq. tanic acid / 100 g dry matter). The *in vitro* protein digestibility in beans flour untreated enzymatically (control) ranged between 47.30% and 56.17% on the digestibility of casein. Concentrations of P, K, Ca, Mg, Zn observed in the four cultivars tested were within the average values available in the literature. Treatment 2 with protease from *Bacillus* sp. induced decrease in levels of Cu and Mn. It was observed that the average of Fe content increased in all beans flour when treated with proteases, reaching the maximum increase of 102% in the TAL flour treated with protease from *Bacillus* sp. The digestibility of all beans tested was significantly increased ($p < 0.05$) as function of enzyme treatment, being the greater variation observed in the cultivar OPNS treated with protease from *Bacillus* sp., which values were 81.6% while the control treatment was 54.4%.

CAPÍTULO 1

PROTEASES E HIDROLISADOS PROTÉICOS

1 INTRODUÇÃO GERAL

Enzimas proteolíticas são responsáveis pela clivagem de proteínas e exibem diversas funções nos mais variados sistemas biológicos. Estas enzimas estão presentes em plantas, animais e microrganismos. Neste grupo, o gênero *Bacillus* é um dos mais estudados, em função de sua habilidade de secretar elevadas concentrações de proteases. As características de ação das proteases podem variar em função de sua origem e estrutura química.

Cerca de 60% do mercado mundial de enzimas hidrolíticas corresponde à aplicação de proteases na indústria. A maioria das proteases comercializadas atua em pH alcalino e é oriunda do cultivo de *Bacillus*, microrganismo de reconhecidamente fácil cultivo e capaz de secretar grandes quantidades de proteases. Cepas deste gênero podem crescer em diversos meios de cultivo. Entretanto, a espécie deste microrganismo e a constituição do meio, bem como as condições de incubação, são determinantes no rendimento enzimático e nas características da enzima secretada. Estima-se que 40% do custo de produção das enzimas seja devido aos gastos com meio de cultivo. Isto tem motivado pesquisas empregando fontes alternativas (*e.g.* farinha de soja, pena de galinha, pó de conchas, farinha de peixe), oriundas de efluentes de indústria, como substrato para o crescimento de *Bacillus*, com o objetivo de obterem-se proteases com variadas características.

Estas enzimas têm sido amplamente empregadas em vários setores, como o farmacêutico, o químico, a pesquisa, o têxtil, o de detergentes e o de alimentos. Os hidrolisados protéicos enzimáticos têm despertado o interesse da comunidade científica e da indústria. Diferentes enzimas e condições hidrolíticas estão sendo testadas, de maneira a verificar a eficiência na obtenção de hidrolisados protéicos ricos em oligopeptídeos. Estudos têm evidenciado o valor

nutritivo dos hidrolisados enzimáticos de proteínas, relacionando-os, especialmente, ao seu teor em di e tripeptídeos. Nesse sentido, alguns trabalhos têm desenvolvido hidrolisados protéicos de alto valor biológico, a partir de alimentos de origem animal (leite e derivados).

Informações a respeito da utilização de proteína vegetal para a obtenção de hidrolisados protéicos são encontradas com relação à soja, principalmente milho e arroz. Com relação ao feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), não há relatos na literatura consultada. O feijoeiro é uma leguminosa de grande importância na alimentação do brasileiro, sendo, em algumas regiões, a principal fonte de proteína.

Assim, levando-se em conta a posição relevante que ocupa o feijão na dieta do brasileiro, é de grande interesse utilizá-lo como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos. Além disso, a obtenção de enzimas proteolíticas de fontes microbianas, com a finalidade de obter hidrolisados protéicos, é de interesse para a indústria, visando à diminuição de custos de produção e ao aumento de eficiência do processo de hidrólise na formulação de novos produtos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Hidrólise de proteínas

A hidrólise de proteínas pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas. Tanto a hidrólise ácida quanto a alcalina são inespecíficas, podem destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e também causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (Adler-Nissen, 1986).

Os processos químicos não são facilmente aceitos na produção de alimentos, principalmente devido à crescente preocupação do consumidor quanto à segurança alimentar. No tratamento enzimático, utilizando-se proteases específicas, podem-se citar algumas vantagens sobre as hidrólises alcalina e ácida, como especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, menor conteúdo de sal no hidrolisado final e formação mínima de subprodutos (Cheftel et al., 1989; Mannheim & Cheryan, 1992; Pearce, 1995). A hidrólise enzimática ainda dá origem a oligopeptídeos que, nutricionalmente, são superiores e apresentam elevado potencial para o preparo de formulações hipoalergênicas (Anantharaman & Finot, 1993). Além disso, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema da reação é freqüentemente desnecessária ou mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser utilizados em concentrações maiores (Posorske, 1984; Jung et al., 2005).

O processo de hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, tais como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (Panyam & Kilara, 2004; Jung et al., 2005). As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise de soja e de outros

vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes, hidrólise de caseína e na melhoria da textura de queijos, aumentando significativamente a qualidade e o valor dos produtos *in natura* (Cheftel et al., 1989; Morato et al., 2000; Carreira et al., 2004; Viana et al., 2004).

Além da melhoria das propriedades funcionais e de sabor e aroma, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas pelo tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois sabe-se que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (Vijayalakshimi et al., 1986). Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente di e tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres, apresentando assim maior valor nutritivo (Hara et al., 1984; Keohane et al., 1985; Silvestre et al., 1994a,b).

Uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática de proteínas é o desenvolvimento de gosto amargo no decorrer da catálise, o qual parece estar relacionado à liberação de aminoácidos hidrofóbicos que se encontravam no interior das moléculas protéicas. Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (Minagawa et al., 1989, Gallagher et al, 1994; Kanekanian et al., 2000).

2.1.1 Fatores interferentes

Por se tratar de uma reação enzimática, algumas variáveis devem ser controladas para se alcançar resultados confiáveis. Temperatura, pH, tempo de hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima/substrato (E:S) e inativação enzimática ao final do processo de obtenção do hidrolisado (seja por adição de ácido tricloroacético, aquecimento ou resfriamento) são fatores a serem cuidadosamente observados (Nielsen & Olsen, 2002).

O controle das condições hidrolíticas na digestão enzimática das proteínas constitui uma etapa importante para se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características de sabor e aroma agradáveis ao consumidor (Svenning et al., 1993).

A escolha da enzima proteolítica é de extrema importância, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos e os aminoácidos que se quer deixar na forma livre (Chataud et al., 1988; Haque & Mozaffar, 1992).

A associação de enzimas, introduzidas na reação, simultânea ou sucessivamente, pode conduzir a um grau de hidrólise superior àquele obtido com uma única enzima, demonstrando um caráter de ação sinérgica ou complementar (Chataud et al., 1988). Assim, na produção de hidrolisados, enzimas de ampla especificidade têm sido utilizadas em associações, levando a uma hidrólise extensa, com a obtenção de oligopeptídeos e aminoácidos (Reed, 1975; Clemente, 2000).

A ação do calor sobre a atividade enzimática tem sido utilizada por alguns autores, visando à interrupção da reação hidrolítica, empregando-se temperaturas na faixa de 80°C a 90°C, por 10 a 20 minutos (Minagawa et al., 1989; Nakamura et al., 1993). Segundo Kilara (1985), o tempo requerido para atingir um determinado grau de hidrólise diminui exponencialmente com o crescente aumento da temperatura da reação, até o momento em que a inativação enzimática pelo calor se torna significativa. Como as enzimas são termolábeis, o calor de desnaturação resulta em uma perda gradual de suas propriedades catalíticas, sendo crescente a taxa de inativação com o aumento da temperatura. Desse modo, se, por um lado, as temperaturas mais elevadas aumentam o rendimento das reações enzimáticas, por outro, podem provocar a inativação da enzima, dependendo do calor aplicado (Reed, 1975; Price & Stevens, 1993).

2.2 Enzimas em alimentos

Enzimas podem estar presentes, nos mais diversos tipos de alimentos, pelo menos de três formas distintas: (i) enzimas nativas ou constitutivas, (ii) enzimas adicionadas ao alimento e (iii) enzimas contaminantes de alimentos (Whitaker, 1994; Naz, 2002).

As enzimas nativas ou constitutivas são biomoléculas inerentes ao alimento como um todo ou presentes em seus componentes. Em muitos casos, este grupo de enzimas não interfere, de forma prejudicial, no alimento do qual são integrantes enquanto este se encontra intacto. Isto se deve, entre outras razões, à falta de substrato sobre o qual a enzima atua, à compartimentalização diferenciada entre enzima e substrato, à presença de inibidores enzimáticos e à variação nos parâmetros fisiológicos e físico-químicos, como pH e temperatura. Todavia, quando o tecido que compõe o alimento, seja de origem vegetal ou animal, sofre injúria ou processamento, as condições acima citadas são alteradas e as enzimas iniciam processo catalítico. O escurecimento enzimático causado por oxidoredutases (*e.g.* peroxidase, polifenoloxidase) em frutos, a rancificação oxidativa dos lipídeos presentes na soja (por ação das lipoxigenases) e o amaciamento de carnes por ação de calpaínas são alguns exemplos do contato entre enzimas e seus substratos em alimentos (Cherry & Ory, 1984; Robinson & Eskin, 1991; Goulart et al., 2003; Whitaker et al. 2003).

No processamento de determinados alimentos, a adição de enzimas comerciais ou oriundas do metabolismo desejado de microrganismos é etapa determinante. Estas enzimas têm por finalidade modificar textura, melhorar aroma e sabor, alterar a aparência e garantir o produto final desejado. Informações sobre aplicação de enzimas no processamento de alimentos encontram-se na Tabela 1.

Em determinadas situações, a ação de enzimas é indesejada. Isso ocorre em alimentos contaminados com microrganismos ou cuja população microbiana

inerente ao alimento tenha aumentado demasiadamente devido a alterações físico-químicas e bioquímicas (*e.g.* alteração na microbiota e atividade enzimática em leite) e também quando a fonte de alimento (tecido animal ou vegetal) sofreu algum processo de injúria ou doença (Whitaker, 1994; Potter & Hotchkiss, 1995).

TABELA 1 – Emprego de algumas enzimas no processamento de alimentos.

Classes/enzimas	Origem	Aplicação	Referências
Oxidoredutases			
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Penicillium</i> sp.	Produção de gliconato e δ- gliconolactona, empregados como aditivos alimentares.	Whitaker (1994), Belitz et al. (2004) e Sisak et al. (2006).
Catalase	Animal (fígado), vegetal (rábano – <i>Armoracia rusticana</i> Gaertn, syn. <i>Cochlearia armoracia</i>) e microbiana (<i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i>).	Remoção de H ₂ O ₂ residual durante a fabricação de queijos. Aplicação conjunta com a glicose oxidase para diminuir concentração de H ₂ O ₂ . Remoção de glicose da clara de ovo para emprego em panificação.	Ozyilmaz et al. (2005), Sisak et al. (2006) e Ozyilmaz & Seyhan Tukul (2007).
Peroxidase	Animal (fígado), vegetal (rábano – <i>Armoracia rusticana</i> Gaertn, syn. <i>Cochlearia armoracia</i> ; figo, tabaco, batata, brócolis) e microbiana (<i>Arthromyces ramosus</i> , <i>Coprinus cinereus</i>).	Enzima constitutiva associada ao amadurecimento de frutos.	Clemente & Pastore (1998), Forsyth et al. (1999), Lemos et al. (2001) e Kim et al. (2005).
Polifenoloxidase	Vegetais (maçã, banana, café, cogumelos, batata, folhas de chá).	Enzima constitutiva cuja ação é desejada durante o processamento de chá, chocolate, café, uva passa e outros nos quais o escurecimento enzimático e alteração no sabor favorecem a qualidade do produto final.	Vamos-Vigyazo (1981), Carvalho et al. (1994), Clemente & Pastore (1998), Goulart et al. (2003) e Zanatta et al. (2006).

...continua...

TABELA 1, Cont.

Lipoxigenase	Vegetais (legumes) e animais.	Processo de branqueamento e melhoria das propriedades reológicas de produtos de panificação.	Belitz et al. (2004), Anokwulu & Onwurah (2004) e Baysal & Demirdöven (2007).
<i>Hidrolases (Carboidrases)</i>			
α -amilase	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i> .	Hidrólise do amido (endoglucanase) liberando dextrinas na produção de cerveja e na panificação.	Whitaker (1994), Pandey et al. (2000), Jensen & Olsen (1992), Belitz et al. (2004) e Spier et al. (2006).
β -amilase	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. megatherium</i> , <i>B. cereus</i> .	Hidrólise do amido a partir de extremidades não redutoras; empregada na produção de xaropes ricos em maltose	
Glicoamilase	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Rhizopus</i> sp.	Conversão de dextrinas a monossacarídeos na produção de xaropes e na fabricação de cerveja.	Shuzheng et al. (1984) e Soccol et al. (2004)
Lactase (β -D-galactosidase)	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>K. marxianus</i> .	Como aditivo de formulações lácteas para indivíduos com deficiência na síntese desta enzima.	Mahoney et al. (1975) e Ku & Hang (1992).
Pectinases	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	Aumentar extração e melhorar a clarificação de sucos e bebidas fermentadas.	Schwan & Rose (1994), Kashyap et al. (2001), Jayani et al. (2005), Dias et al. (2003) e Dias et al. (2007).
...continua...			

TABELA 1, Cont.

<i>Hidrolases (Lipases)</i>			
Lipases	<i>Candida lipolytica, Geotrichum, Rhizopus, Lypomyces, Thermomyces, Bacillus.</i>	Melhoria do aroma e diminuição do tempo de amadurecimento de queijos.	Arpigny & Jaeger (1999), Pandey et al. (1999) e Jaeger & Eggert (2002).
<i>Hidrolases (Peptidases)</i>			
Papaína	Mamão (<i>Carica papaya</i>).	Amaciamento de carnes. Prevenção de “chill haze” em cervejas. Obtenção de peptídeos de sabor e aroma agradáveis.	Hänsler et al. (1995), Wong (1995) e Lee & Chen (2002).
Bromelina	Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>).	Amaciamento de carnes. Obtenção de peptídeos de sabor e aroma agradáveis.	Rowan et al. (1990), Harrach et al. (1995) e Pinterits & Arntfield (2007).
Ficina	Figo (<i>Ficus carica</i>).	Amaciamento de carnes. Prevenção de “chill haze” em cervejas.	Hänsler et al. (1995), Akar & Fadiloglu (1999) e Ramezani et al. (2003).
Calpaína	Animal (baço e pulmão).	Enzima constitutiva. Amaciamento de carnes.	Potter & Hotchkiss (1995), Hughes et al. (2000) e Chéret et al. (2007).
Subtilisina	<i>Bacillus licheniformis, B. subtilis</i> e outros <i>Bacillus</i> .	Indústria cervejeira e laticínios (fabricação de queijo). Hidrolisados protéicos de soja.	Rao et al. (1998), Kirk et al. (2002) e Carreira et al. (2004).
Pepsina	Animal (suco gástrico) e microbiana (<i>Aspergillus awamori, A. niger, A. oryzae, Penicillium</i>).	Hidrólise proteica em geral com a finalidade de aumentar a digestibilidade. Associada à renina na fabricação de queijos.	Godfrey & West (1996), Yu et al. (2006) e Sinkovits et al. (2007).
...continua...			

TABELA 1, Cont.

Tripsina	Animal e microbiana.	Ampla aplicação na indústria (hidrólise protéica). Produção de hidrolisados.	Chen et al. (1994), Carreira et al. (2004) e Mota et al. (2006).
Quimotripsina	Animal (pâncreas bovino).	Ampla aplicação na indústria. Diminui alergenicidade das proteínas do leite. Reação de plasteína.	Combes & Lozano (1992), Hassan et al. (2007) e Humiski & Aluko (2007).
Quimosina (renina)	Animal (estômago de bezerro) e microbiana (<i>Aspergillus usarii</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizomucor</i>).	Coagulação da caseína na fabricação de queijos.	Rampilli et al. (2005) e Mistry (2006).
Termolisina	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i> .	Síntese de aspartame.	Kamihira et al. (1987), Paul et al. (1988) e Martin et al. (2001).
Aminopectidase (exopeptidase)	Animal (rim suíno) e microbiana (<i>Clostridium histolyticum</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Bacillus</i>).	Hidrolisados protéicos (diminuição do sabor desagradável).	Taylor (1993), Raksakulthai & Haard (2003) e Arima et al. (2006).

2.2.1 Emprego de proteases na indústria

A utilização de enzimas pelo setor industrial movimentava bilhões de dólares anualmente. A aplicação destas biomoléculas é diversificada e elas são empregadas em indústrias têxteis, em curtumes, na fabricação de bebidas, na panificação e em alimentos em geral, além do tratamento de resíduos e efluentes industriais.

A origem destas enzimas pode variar entre diversas fontes, como microbianas, animais e vegetais. A cultura de células animais ou vegetais se torna um processo oneroso quando se pensa em produção em larga escala. Já a utilização de microrganismos é uma das mais antigas formas de produção de enzimas, sendo um processo rentável a baixo custo e corresponde a cerca de 90% do montante de enzimas produzidas comercialmente (Godfrey & West, 1996; Beynon & Bond, 2001).

A maioria dos microrganismos consegue produzir proteases durante o seu metabolismo, porém, nem todos podem atuar como fornecedores dessas enzimas para algumas indústrias, principalmente nas de alimento e medicamento. Microrganismos cujas enzimas serão empregadas nestes setores devem ser reconhecidos como GRAS, do inglês *generally recognized as safe*. Os principais gêneros de microrganismos produtores de proteases para fim industrial são *Aspergillus* sp. e *Bacillus* sp. Outros gêneros, em menor escala, aparecem como produtores de enzimas para fins industriais (Lee, 1996; Rao et al., 1998).

Cerca de 75% das enzimas utilizadas em processos industriais desempenha ação hidrolítica, sendo utilizadas na clivagem de polímeros naturais em oligômeros ou até monômeros. Destes 75%, as proteases correspondem a 40% das enzimas comercializadas, sendo principalmente empregadas na indústria de laticínios e detergentes com a finalidade de alterar a estrutura e a função do material protéico. Na indústria de alimentos são utilizadas no aumento

da solubilidade, estabilidade, digestibilidade, e alergenicidade de proteínas contidas em alguns alimentos (Cordle, 1994; Frokjaer, 1994; Godfrey, 1996; Godfrey & West, 1996). Também têm sido empregadas na produção de hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina para tratamento de fenilcetonúricos (Nakhost et al., 1982; Arai et al., 1986; Maeda et al., 1987; Watanabe et al., 1988).

A ação das proteases está condicionada à sua especificidade ou seletividade e esta a fatores físico-químicos, como pH, temperatura, concentração de sais, solventes e agentes inibidores. Este grupo de enzimas modifica a estrutura protéica por atuar em pontos específicos da cadeia polipeptídica e quebrar a ligação amídica existente entre os aminoácidos. A estrutura da cadeia polipeptídica e a seqüência de aminoácidos desta cadeia são fatores que interferem na ação da enzima, razão pela qual existem diversas proteases, de diferentes origens, que atuam em pontos distintos da cadeia protéica. As três principais fontes ou origens de proteases são a animal (*e.g.* quimosina, quimotripsina, tripsina, pancreatina e pepsina) a vegetal (*e.g.* bromelina, papaína, ficina e queratinase) e a microbiana (*e.g.* subtilisina, termolisina, protease alcalina, protease neutra e protease ácida), sendo esta uma das mais amplas e difundidas formas de obtenção (Naz, 2002; Belitz et al., 2004).

Enzimas proteolíticas podem ser classificadas como exopeptidases (atuam na extremidade carboxil ou amino da cadeia polipeptídica) e endopeptidases (atuam na parte interna da cadeia da proteína). Em função do(s) resíduo(s) de aminoácido(s) presente(s) no sítio catalítico, responsável(is) pela catálise, as peptidases podem ser, também, classificadas com cisteíno (papaína, bromelina, ficina), serino (tripsina, quimotripsina, subtilisina), aspártico (pepsina, quimosina, catepsina D) e metalo-endopeptidases (termolisina, collagenases). O mecanismo de ação proposto da papaína, subtilisina e pepsina

(Wong, 1995; Whitaker, 2003) está ilustrado nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

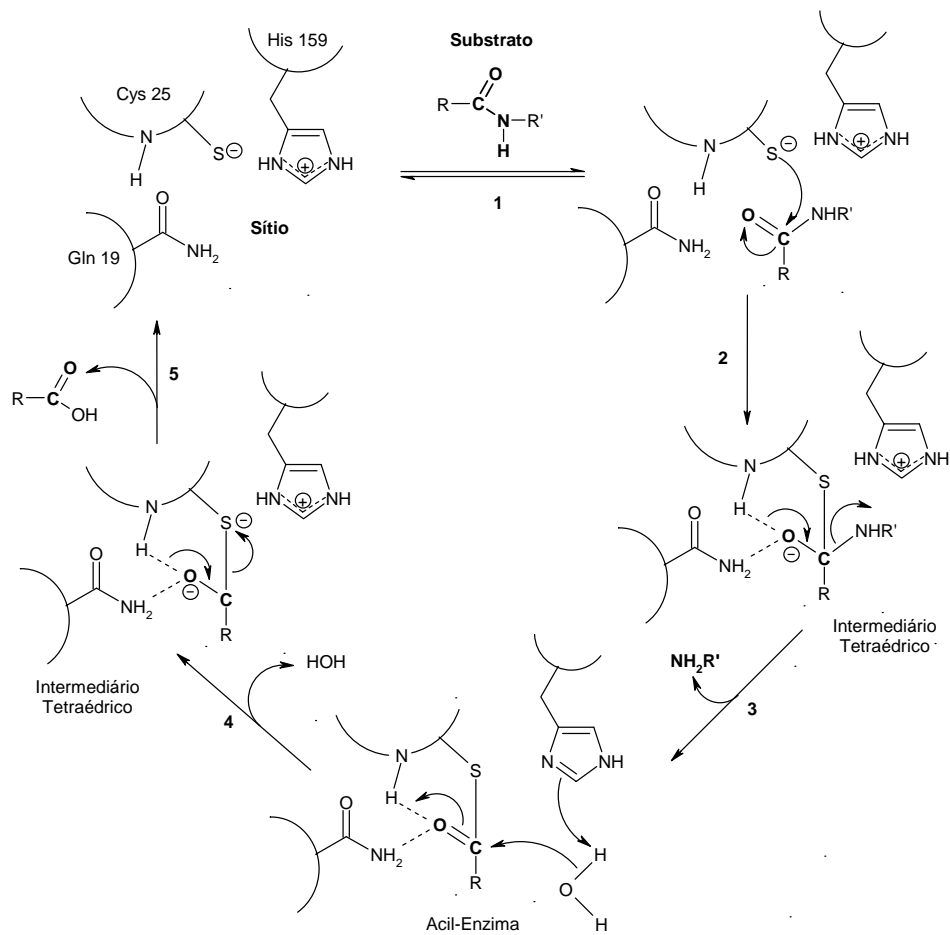


FIGURA 1 – Esquema do mecanismo de ação catalítico das cisteíno-endopeptidases (papáína), em que: 1. ligação reversível e formação do complexo enzima-substrato - [E-S]; 2. ataque nucleofílico do ânion tiol da Cys 25 ao C carbonílico da ligação peptídica a ser clivada, levando à formação de um intermediário tetraédrico; 3. colapso do intermediário em acil-enzima, via protonação do C da ligação a ser clivada por ação do grupo imidazol da His 159, com liberação do segmento polipeptídico aminado do substrato; 4. ataque nucleofílico pela água, intermediado pela His 159, promove desacilação da acil-enzima; 5. liberação do segmento polipeptídico carboxilado do substrato (Price & Stevens, 1993; Wong, 1995; Belitz et al., 2004).

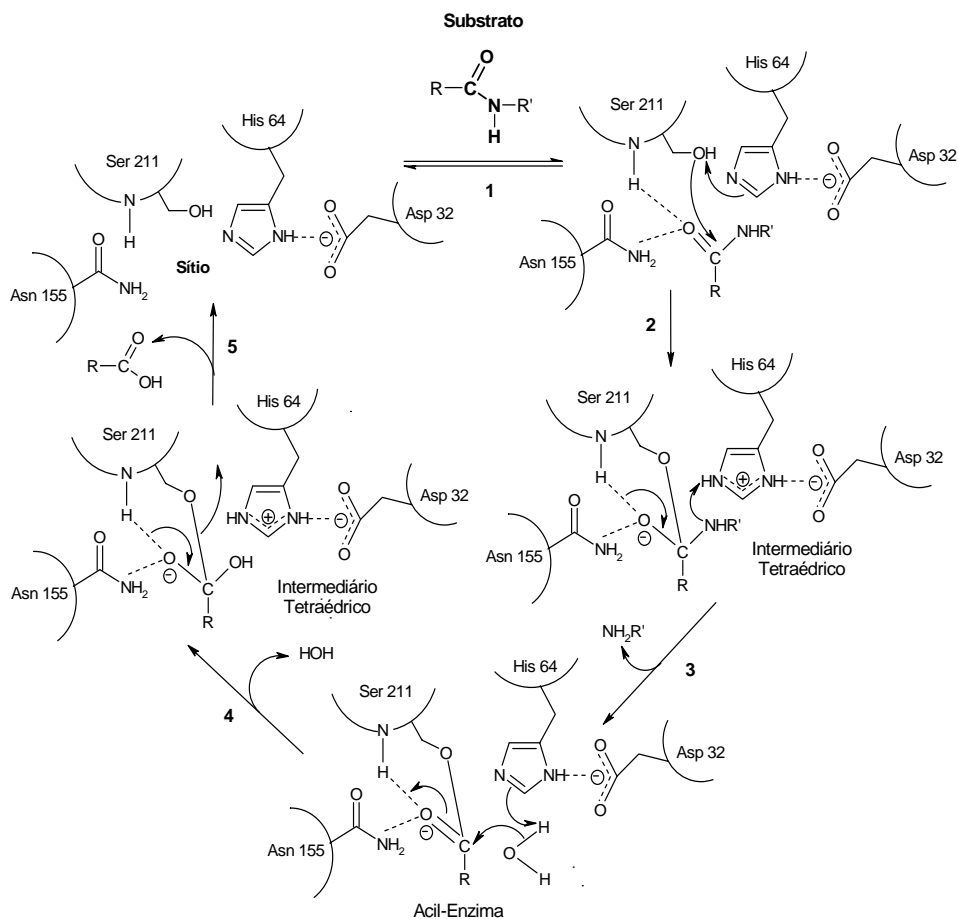


FIGURA 2 - Esquema do mecanismo de ação catalítico das serino-endopeptidases (subtilisina), em que: 1. ligação reversível e formação do [E-S]; 2. ataque nucleofílico do ânion O^- da Ser 211 ao C carbonílico da ligação peptídica a ser clivada, levando à formação de um intermediário tetraédrico. Este passo é favorecido pela catálise básica da His 64; 3. colapso do intermediário em acil-enzima, via protonação do C da ligação a ser clivada por ação do grupo imidazol da His 64, com liberação do segmento polipeptídico aminado do substrato; 4. ataque nucleofílico da água, intermediado pela His 64, formando um novo intermediário; 5. quebra deste intermediário via protonação do O^- da Ser 211 por ação da His 64, liberando o segmento polipeptídico carboxilado do substrato (Price & Stevens, 1993; Wong, 1995; Belitz et al., 2004).

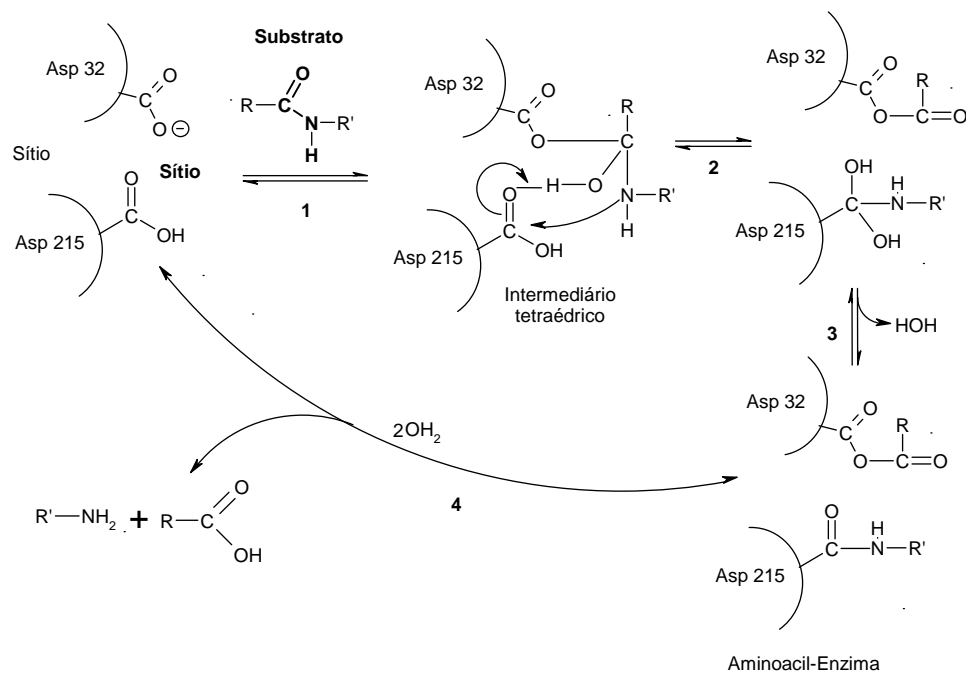


FIGURA 3 - Esquema do mecanismo de ação catalítico das aspártico-endopeptidases (pepsina), em que: 1. o oxigênio do C carbonílico do substrato é protonado por ação conjunta dos resíduos de Asp 32 e Asp 215 (díade Asp); 2. uma molécula de água atua como nucleófilo. Ataque nucleofílico ocorre no C carbonílico do substrato (auxiliado pelo carboxilato do Asp), levando à formação de um intermediário tetraédrico; 3. o nitrogênio do substrato, no intermediário, recebe um próton disponível no meio ou provindo da díade Asp; 4. a protonação do N favorece a clivagem da ligação peptídica, liberando os segmentos peptídicos (Price & Stevens, 1993; Wong, 1995; Belitz et al., 2004).

2.3 Hidrolisados protéicos

Os hidrolisados protéicos enzimáticos com cadeia polipeptídica curta e peso molecular definido são importantes complementos para a alimentação de indivíduos que apresentam dificuldade na digestão de proteínas, alergia e ou intolerância a proteínas alimentares ou outras patologias associadas ao metabolismo de aminoácidos, como nos casos de doenças crônicas do fígado (falência hepática) e fenilcetonúria (Clemente, 2000).

Podem ser utilizados como alternativa à alimentação, substituindo as misturas de aminoácidos, incorporados ou não aos alimentos, para tratamento clínico de pacientes com desordens específicas na digestão, na absorção e no metabolismo de aminoácidos. Apresentam vantagens nutricionais em relação às misturas de aminoácidos livres (sintéticos), além de menor custo e maior facilidade na administração (Clemente, 2000; Mira & Marquez, 2000). As misturas de peptídeos são empregadas como matérias-primas de patês, pães, doces, produtos alimentícios fortificados, produtos alimentícios para crianças, alimentos em geral para a saúde, nutrientes para dieta enteral e suplementos para atletas, entre outros (Rérat, 1993; Hinsberger & Sandhu, 2004).

Os oligopeptídeos, principalmente di e tripeptídeos, são melhor absorvidos pelo organismo e têm melhor balanço de aminoácidos do que as misturas de aminoácidos livres (Rérat, 1993; Hinsberger & Sandhu, 2004). Além disso, as soluções de hidrolisados protéicos contendo di e tripeptídeos têm uma osmolalidade menor do que as soluções de aminoácidos livres e, por isso, são mais bem toleradas por indivíduos com dificuldades de absorção (Furst et al., 1990; Gonzáles-Tello et al., 1994).

O valor nutricional dos hidrolisados protéicos depende da proteína de origem, do tipo de hidrólise (química ou enzimática) e do tamanho da cadeia peptídica. A qualidade da proteína é determinada por sua natureza e composição de aminoácidos, especialmente os essenciais (Mahan & Scott-Stump, 2005).

2.3.1 Aplicação de hidrolisados protéicos

Os hidrolisados protéicos são empregados em formulações infantis para crianças que apresentam alergia à proteína intacta ou algum problema causado por um erro inato do metabolismo, formulações especiais para adultos com função gastrointestinal prejudicada ou doenças em órgãos específicos e suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio (Mira & Marquez, 2000; Mahan & Scott-Stump, 2005).

Vários trabalhos avaliaram a absorção entre os aminoácidos originados de hidrólise enzimática parcial de proteínas com uma mistura equivalente de aminoácidos livres. A velocidade de absorção intestinal de aminoácidos é consideravelmente maior, para soluções contendo somente di e tripeptídeos ou proteína parcialmente hidrolisada, do que aquelas constituídas apenas de aminoácidos livres (Adibi & Morse, 1971; Adibi & Soleimanpour, 1974; Keohane et al., 1985; Sáenz de Pipaón et al., 2005). Hara et al. (1984) compararam, em ratos, a absorção intestinal de aminoácidos de um hidrolisado enzimático de clara de ovo com uma mistura equimolar de aminoácidos livres e observaram que a eficiência de absorção do hidrolisado foi de 70% a 80% superior, apresentando, assim, uma melhor qualidade nutricional.

O estudo do mecanismo de absorção intestinal sugere que a taxa de absorção de aminoácidos livres é menor do que aquela dos pequenos peptídeos porque, na absorção de di e tripeptídeos, a competição entre aminoácidos, que compartilham o mesmo sistema de transporte, é parcial ou completamente eliminada (Silk et al., 1985; Grimble & Silk, 1989; Webb Jr., 1990; Frenhani & Burini, 1999).

A baixa osmolalidade das soluções constituídas, principalmente, por di e tripeptídeos, as torna melhor toleradas pelos indivíduos com reduzida absorção em relação às soluções de aminoácidos livres. Para a produção de fórmulas dietéticas, a osmolalidade não deve ultrapassar a 300 mOsm/L, ou seja, a

osmolalidade ótima fisiológica do plasma sanguíneo (Furst et al., 1990; Gonzáles-Tello et al., 1994).

Proteínas e peptídeos de elevado peso molecular freqüentemente causam alergias. Com isso, é crescente o uso de fórmulas preventivas ou terapêuticas contendo hidrolisados parciais de proteína, já que o decréscimo no tamanho dos peptídeos tem relação direta com a diminuição da imunogenicidade (Takase et al., 1979; Ragno et al., 1993; Boza et al., 1994; Shin et al., 2007). Assim, os hidrolisados de caseína são usados na fabricação de alimentos especiais para recém-nascidos prematuros, em fórmulas para crianças que apresentam diarreia, gastroenterite, dificuldades na absorção de nutrientes e fenilcetonúria (Smithers & Bradford, 1991; Guadix et al., 2006).

O tratamento clínico e a nutrição enteral de pacientes com desordens específicas de digestão, como fibrose cística ou de absorção e metabolização de aminoácidos, utilizam proteínas pré-digeridas. Uma mistura de hidrolisados protéicos, além de ser vantajosa do ponto de vista nutricional, é menos onerosa que uma mistura de aminoácidos sintéticos (Aubes-Dufau et al., 1995). Assim, segundo Cogan et al. (1981), outra vantagem relacionada ao uso dos hidrolisados protéicos refere-se à sua produção economicamente mais viável do que as misturas sintéticas de aminoácidos.

De acordo com Gonzáles-Tello (1994), os hidrolisados protéicos, para uso em dietas especiais, devem apresentar as seguintes características: alto teor de di e tripeptídeos; massa molecular média de 500 Da, para controlar a osmolalidade e não devem conter peptídeos com massa superior a 1000 Da. Além disso, o valor nutricional dos hidrolisados protéicos depende do seu teor em pequenos peptídeos contendo determinados aminoácidos que, na forma livre, apresentam problemas com relação à estabilidade e à solubilidade. Tirosina e cistina são pouco solúveis; a glutamina e a cisteína são instáveis em solução e facilmente destruídas durante as etapas de esterilização e armazenamento.

Entretanto, sob a forma de di e tripeptídeos, estes aminoácidos apresentam boa solubilidade e estabilidade, o que mostra a importância do isolamento destes peptídeos de hidrolisados protéicos (Furst et al., 1990; Anantharamam & Finot, 1993; Hinsberger & Sandhu, 2004).

2.3.2 Importância nutricional dos hidrolisados protéicos

Desde 1940, os hidrolisados protéicos têm sido utilizados com finalidades terapêuticas para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas. Entretanto, na década de 1970, esta utilização registrou expressivo crescimento, que continuou ao longo dos últimos anos, tanto por seus aspectos nutricionais e clínicos, como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas (Neklyudov et al., 2000; Morais et al., 2002).

Os hidrolisados, geralmente, são destinados a três grandes grupos alimentares: (1) formulações infantis para crianças que apresentam alergia à proteína intacta ou algum problema causado por um erro inato do metabolismo; (2) formulações especiais para adultos com função gastrointestinal prejudicada ou doenças em órgãos específicos; (3) suplementos nutricionais para facilitar a assimilação de nitrogênio (Mira & Marquez, 2000; Mahan & Scott-Stump, 2005).

O valor nutricional dos hidrolisados está diretamente relacionado à natureza da proteína de origem, que deverá ser de alto valor nutricional e ao método de hidrólise que possibilite a obtenção de peptídeos de pesos moleculares diferentes (Grimble & Silk, 1989; Silvestre et al., 1994a,b).

Outro emprego de hidrolisados protéicos é na complementação alimentar de certas patologias, em que a alimentação por via oral não é possível. Nestas situações, a ingestão de alimentos é insuficiente, estando prejudicadas a digestão e a absorção intestinais, fazendo com que a dieta normal se torne ineficaz ou,

mesmo, inadequada (Cuthbertson, 1950; Webb Jr., 1990; Sáenz de Pipaón et al., 2005).

2.4 Feijão

O feijoeiro é uma hortaliça pertencente à família Fabacea (leguminosas), tendo grande importância sócio-econômica no território brasileiro e nas Américas. Esta família agrega várias espécies vegetais utilizadas para a nutrição humana, entre elas a ervilha (*Pisum sativum* L.), o feijão-de-corda (*Vigna umbellata* L.), o feijão-de-lima (*Phaseolus lunatus* L.), a fava italiana (*Vicia faba* L.) e o feijão-de-vagem ou feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). O feijoeiro comum pode apresentar portes variados em função da cultivar, bem como são variados as cores, o tamanho e a forma do grão de cada uma (Murayama, 1983). O gênero *Phaseolus* apresenta em torno de 55 espécies, sendo 5 delas cultivadas para o consumo humano (*P. vulgaris*, *P. lunatus*, *P. derasus* – feijão-preto e *P. nanus* – feijão-anão) (EMBRAPA, 2003). O gênero *Phaseolus* é sistematicamente classificado como eudicotiledônea (Judd et al., 2002).

A cultura do feijoeiro no Brasil tem três safras, designadas como 1^a, 2^a e 3^a safras, as quais variam de acordo com as condições edafoclimáticas e com o estado onde estão sendo cultivadas. Com base na época de colheita, a 1^a safra (ou safra das águas) é obtida de novembro a abril, estando concentrada nas regiões Sul e Sudeste, na Bahia e em Goiás. A 2^a safra (ou safra da seca) é colhida entre abril e julho, nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste e em Goiás. Já a 3^a safra (ou safra de inverno) é colhida de agosto a outubro, principalmente em Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Bahia. A 1^a e a 2^a safras são responsáveis por cerca de 90% da produção nacional, utilizando, na grande maioria, mão-de-obra familiar e tecnologia de produção restrita, o que gera baixa produtividade (cerca de 760 kg/ha). A safra de inverno responde pelos demais 10% da produção

nacional de feijão, utilizando tecnologia de ponta e irrigação, obtendo alta produtividade (cerca de 1.500 kg/ha e, em algumas fazendas, produzindo mais de 3.000 kg/ha) (CONAB, 2002; EMBRAPA, 2003). Estas três safras permitem que o feijão esteja disponível durante praticamente todo o ano ao consumidor. Isto se deve à ampla adaptação do feijoeiro às condições de cultivo, seja como monocultura ou consorciada a outras culturas, o que faz com que ele cresça em quase todo o país (EMBRAPA, 2003). A produção e a produtividade total de feijão (somando-se as três safras) nos últimos 11 anos (CONAB, 2007) estão ilustradas na Figura 4.

Dados da Faostat/ONU (2007) mostram o Brasil como maior produtor mundial de feijão, em 2006, com produção acima de 3,4 milhões de toneladas. A produção anual média no países do Mercosul, no período de 1998 a 2001, foi de 3,0 milhões de toneladas, tendo o Brasil sido responsável por cerca de 93% deste total. No Mercosul, o Brasil se destaca tanto como maior produtor quanto como maior consumidor, participando, em ambos, com percentuais acima de 85 (CONAB, 2002). Entretanto, segundo esta mesma fonte, o consumo *per capita* de feijão no Brasil tem diminuído em função do êxodo rural e da conseqüente urbanização e das alterações no hábito alimentar do brasileiro.

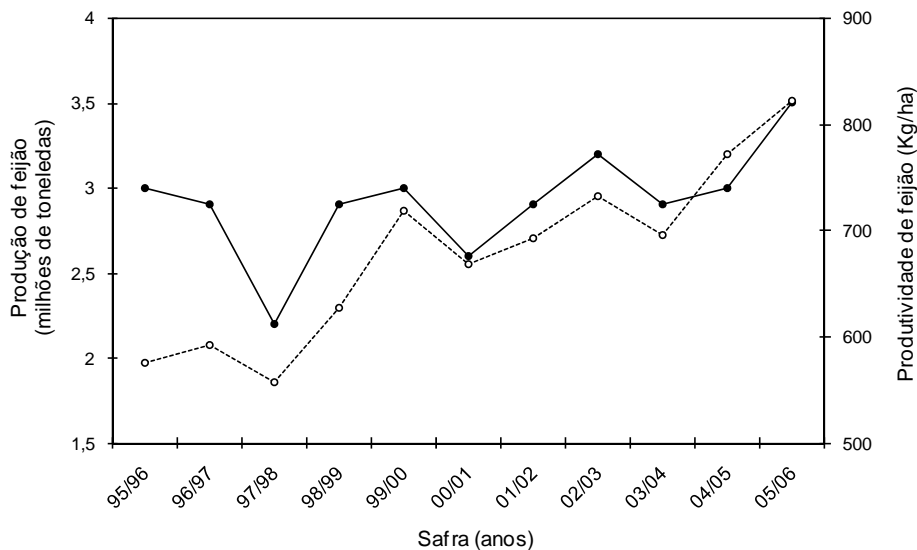


FIGURA 4 Produção (linha contínua) e produtividade (linha descontínua) brasileiras de feijão, entre as safras 1995/1996 e 2005/2006, levando-se em conta o total das três safras anuais (CONAB, 2007).

2.4.1 Aspectos nutricionais do feijão

O feijão é um alimento básico na refeição do brasileiro, sendo uma das principais fontes protéicas da dieta, principalmente das classes economicamente menos favorecidas (EMBRAPA, 2003). Apesar da grande importância nutritiva deste alimento, seu consumo *per capita* tem declinado nos últimos anos, tendo passado de 19 kg/habitante/ano, em meados da década de 1990, para atuais 16 kg/habitante/ano (CONAB, 2002; Broughton et al., 2003).

Além de rica fonte protéica, o feijão também tem na sua constituição outros nutrientes de fundamental importância para o desenvolvimento do organismo. Dados sobre a composição nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2 Composição nutricional do feijão (*P. vulgaris*) por 100 g de porção comestível.

Composição centesimal			Lipídeos		
Umidade	g	11,75	Ácidos graxos saturados (total)	g	0,154
Calorias	kcal	337	16:0	g	0,136
Calorias	kJ	1408	18:0	g	0,018
Proteínas	g	22,53	Ácidos graxos monoinsaturados (total)	g	0,082
Lipídeos	g	1,06	18:1	g	0,082
Cinzas	g	3,37	Ácidos graxos polinsaturados (total)	g	0,586
ENN	g	61,29	18:2	g	0,228
Fibras totais	g	15,2	18:3	g	0,358
Açúcares redutores	g	2,23	Colesterol	mg	0
Minerais			Aminoácidos		
Ca	mg	83	Triptofano	g	0,267
Fe	mg	6,69	Treonina	g	0,948
Mg	mg	138	Isoleucina	g	0,995
P	mg	406	Leucina	g	1,799
K	mg	1359	Lisina	g	1,547
Na	mg	12	Metionina	g	0,339
Zn	mg	2,79	Cistina	g	0,245
Cu	mg	0,699	Fenilalanina	g	1,218
Mn	mg	1,111	Tirosina	g	0,634
F	mcg	2,2	Valina	g	1,179
Se	mcg	3,2	Arginina	g	1,395
Vitaminas			Histidina	g	0,627
Vitamina C	mg	4,5	Alanina	g	0,945
Tiamina (B ₁)	mg	0,608	Aspartato	g	2,725
Riboflavina (B ₂)	mg	0,215	Glutamato	g	3,436
Niacina (B ₃)	mg	2,110	Glicina	g	0,880
Ácido pantotênico (B ₅)	mg	0,780	Prolina	g	0,955
Piridoxal e derivados (B ₆)	mg	0,397	Serina	g	1,226
Folato (total)	mcg	394			
Folato (alimentar)	mcg	394			
Vitamina E (α -tocoferol)	mg	0,22			
Vitamina K (fitoquinona)	mcg	5,9			

Fonte: USDA (2007).

Em função de sua composição química, o feijão comum é empregado, em muitos países, como uma das principais fontes de proteínas, carboidratos (incluindo-se fibras e amido), vitaminas e sais minerais da dieta. Além de nutricionalmente importante, a ingestão de feijão está associada a benefícios para a saúde humana, diminuindo o índice glicêmico, favorecendo a motilidade intestinal e reduzindo o risco de cardiopatias (Geil & Anderson, 1994).

2.4.1.1 Teor de minerais, vitaminas e lipídeos

A quantidade de ferro presente nos grãos de feijão cru e seco é considerada elevada quando comparada com a de outros vegetais. Em média, há cerca de 5mg de Fe em 100 g de feijão. A disponibilidade do Fe para absorção intestinal é comprometida em função da interação do mesmo com outros componentes presentes no feijão, como fitatos, compostos fenólicos e fibras. Além disso, há diminuição na quantidade de ferro disponível quando o feijão é processado termicamente ou quando é utilizado como substrato para a produção de alimento fermentado (Lombardi-Boccia et al., 1995; Moura & Canniati-Brazaca, 2006). Além do Fe, o feijão também é fonte satisfatória de outros minerais, como Mg, P, K e Zn (Guzmán-Maldonado et al., 2000; Wu et al., 2005).

Com relação às vitaminas, o feijão é fonte razoável de vitaminas do complexo B e ácido fólico, mas apresenta baixa concentração de vitaminas lipossolúveis e de ácido ascórbico (Tabela 2). A disponibilidade de vitaminas no feijão cozido tende a diminuir em função da termolabilidade das mesmas (Augustin et al., 1981; Geil & Anderson, 1994).

Os lipídeos são o grupo de biomoléculas presentes em menor quantidade, quando comparados aos carboidratos e proteínas, em leguminosas como feijão, ervilha e lentilha, sendo o inverso observado nas oleaginosas, como a soja (Salunkhe et al., 1983). A concentração de lipídeos, assim como a de outras

moléculas, varia, dependendo da cultivar de feijão e da região de cultivo das mesmas. Diversas cultivares têm sido desenvolvidas com vistas à melhoria de resistência a doenças e, principalmente, à melhoria na qualidade nutricional (Salunkhe et al., 1993; Ramalho et al., 2005).

O conteúdo médio de lipídeos em *Phaseolus vulgaris* L. é de 1,6% (m/m), considerando-se 100 gramas da matéria integral e apresenta grande proporção de ácidos graxos insaturados (Stanley & Aguilera, 1985; Geil & Anderson, 1994; Mabaleha & Yeboah 2004). Dentre estes ácidos graxos, os ácidos linoléico (18:2, $\Delta^{9,12}$, ω -6) e linolênico (18:3, $\Delta^{9,12,15}$, ω -3) correspondem a cerca de 80%. Isso confere ao feijão importante propriedade nutricional, visto que estes ácidos são essenciais ao metabolismo humano e estão envolvidos na biossíntese de outros lipídeos, como ácido araquidônico (20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$, ω -6) e prostaglandinas.

Além disso, há estudos que correlacionam a ingestão destes ácidos com a redução no risco de doenças cardiovasculares (Sinclair et al, 2002; Astorg et al., 2006; Sacks & Campos, 2006). Os lipídeos presentes no feijão podem contribuir de forma negativa com a qualidade do grão submetido ao armazenamento por longos períodos. Os lipídeos podem sofrer rancificação enzimática e rancificação oxidativa, ou uma delas, gerando sabor e odor desagradáveis (Reyes-Moreno & Paredes-López, 1993).

2.4.1.2 Carboidratos

A concentração de carboidratos totais em feijões varia de 40% a 60%, sendo o amido o principal componente (até 45% da concentração de carboidratos). Outros polissacarídeos (celulose, hemiceluloses e pectinas, que compõem as fibras) e, em menor proporção, oligossacarídeos (estaquiose, rafinose e verbascose, principalmente) compõem o percentual restante (Geil & Anderson, 1994; Sathe, 2002, Osorio-Díaz et al., 2002; Fialho et al., 2006).

Tem sido observado que o amido presente em legumes apresenta menor digestibilidade do que amidos presentes em cereais e na mandioca, segundo Hoover & Zhou (2003). A classificação de amidos presentes nas mais diversas fontes vegetais foi proposta por Englyst et al. (1992), que levaram em conta a cinética de digestibilidade e a completa digestão do amido. Estes autores propuseram o agrupamento do amido em três frações: amido rapidamente digerível, amido lentamente digerível e amido indigerível ou amido resistente (AR). O amido resistente (AR) foi subclassificado em AR1 (amido indisponível por estar associado à matriz celular de sementes), AR2 (amido presente em alguns vegetais, como banana e batata, na forma cristalina, o que dificulta o ataque enzimático) e AR3 (formado pela retrogradação do amido em alimentos aquecidos e armazenados).

Asp (1992) definiu o amido resistente como o amido e suas dextrinas parcialmente formadas, porém, não passíveis de absorção no intestino delgado de indivíduos saudáveis. O amido resistente (AR) é considerado como fibra dietética e, juntamente com as demais, está associado, em parte, ao baixo índice glicêmico de leguminosas, como o feijão, por dificultar a absorção de glicose e sua consequente disponibilidade na corrente sanguínea (Tovar et al., 1992; DeVries et al., 1999; Hoover & Zhou, 2003; Carmona-Garcia et al., 2007).

As fibras alimentares ou fibras dietéticas têm por característica a resistência à hidrólise enzimática no trato gastrointestinal humano, o que é devido ao tipo de ligação entre os monossacarídeos que compõem o polímero e ao arranjo estrutural do mesmo. A lignina, polímero de derivados fenólicos, é considerada fibra alimentar, apesar de não apresentar estrutura polissacarídica (Sathé et al., 1984a). As fibras localizam-se, principalmente, no tegumento do feijão e podem ser classificadas como solúveis (*e.g.* pectinas, algumas hemiceluloses e β -glucanas) e insolúveis, entre as quais estão incluídas a celulose, a maioria das hemiceluloses e a lignina (Olson et al., 1987; DeVries et

al., 1999). Ambas as classes de fibras são importantes para a fisiologia humana e sua ingestão pode auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares, promover a diminuição da pressão arterial e reduzir o risco de câncer intestinal (Vanderhoof, 1998; Mozaffarian et al., 2003, Lairon et al., 2005).

Entretanto, segundo Baron (2005), ainda são necessários estudos conclusivos quanto ao efeito das fibras como preventivas ou estimuladoras do surgimento de câncer no intestino grosso ou, até mesmo, para verificar se elas têm algum efeito, conforme estudos conduzidos por Trock et al. (1990) e Michels et al. (2006).

Com relação às fibras insolúveis, há informações de que elas estão associadas à retenção de água e ao favorecimento do peristaltismo intestinal, o que pode reduzir os riscos de patologias neste órgão (Messina, 1999; Finley et al., 2007). As fibras solúveis estão correlacionadas com a menor absorção intestinal de colesterol e glicose, favorecem a ação do hormônio colecistocinina e auxiliam na prevenção de algumas doenças crônicas (Topping, 1991; Bourdon et al., 2001; Lairon et al., 2005). As concentrações de fibras solúveis e insolúveis variam de acordo com a fonte vegetal, sendo o feijão uma fonte que apresenta equilíbrio no teor das frações (Hughes, 1991; Bressani, 1993).

Os oligossacarídeos rafinose, estaquiase e verbascose, encontrados em feijões em baixas concentrações, estão relacionados à flatulência em humanos. Para a hidrólise desses carboidratos é necessária a ação de α -galactosidases específicas, ausentes no metabolismo humano. Conseqüentemente, não são degradados e ficam disponíveis no trato gastrintestinal, sofrendo ação da microbiota presente no intestino grosso, que os utiliza em processos fermentativos, transformando parte da estrutura em moléculas menores, que compõem os gases responsáveis pela flatulência (Kigel, 1999; Fialho et al., 2006). A diminuição na concentração destes polissacarídeos pode ser conseguida pelo processamento térmico (Olson et al, 1982), pelo tratamento enzimático

(Fialho et al., 2006) ou pelo melhoramento genético de cultivares de *Phaseolus vulgaris* (Broughton et al., 2003).

2.4.1.3 Proteínas

Este grupo de biomoléculas é um dos mais importantes nutricionalmente, presentes em leguminosas. As proteínas do feijão formam, em muitos países emergentes, a base protéica da alimentação. O feijão apresenta, em média, 22,5% (m/m de porção comestível) de proteínas, o que pode ser equiparado ao conteúdo protéico de outras fontes, como carne (32%), peixe (23%) e amendoim (24%), sendo superior à quantidade de proteínas presentes em trigo (17,5%), arroz (7%), ervilha (6%) e milho (3,2%) (Sathe et al., 1984b; Bressani, 1993; USDA, 2007).

As principais frações protéicas presentes no feijão, quanto à solubilidade, são globulinas, albuminas, prolaminas e glutelinas. Globulinas (solúveis em solução salina e pH neutro) e albuminas (solúveis em água) compõem a maior parte das proteínas do feijão e apresentam carboidratos em sua estrutura, sendo consideradas glicoproteínas. A maioria das proteínas de reserva do grão, entretanto, pertence à classe das globulinas e está localizada em corpos protéicos presentes no cotilédone. Por esta razão, as globulinas são as mais abundantes no feijão, correspondendo a até 80%, em massa, das proteínas totais.

Proteínas com função enzimática e outras funções metabólicas são, em grande parte, albuminas, que representam até 50% do total de proteínas na semente. Elas apresentam maior valor biológico que aquelas, por conterem maior concentração dos aminoácidos cisteína (Cys), metionina (Met), ambos sulfurados, e lisina (Lys), um aminoácido básico; estes dois últimos são considerados essenciais ao metabolismo humano, por não serem sintetizados pelo mesmo. Ainda assim, as proteínas do feijão são consideradas pobres em aminoácidos sulfurados e têm a metionina como limitante. Glutelinas e

prolaminas do feijão estão fortemente ligadas a organelas e correspondem a menos de 10% das proteínas totais encontradas em feijões (Sgarbieri & Whitaker, 1982; Bressani, 1993; Sathe, 2002).

Osborne (1894a,b,c) descreveu a estrutura das proteínas do feijão agrupando-as em duas frações: faseolina e faselina, também com base na solubilidade das macromoléculas. Segundo este autor, a faseolina corresponde a 85% das proteínas totais. Pesquisas posteriores realizadas por Waterman & Johns (1921) e Waterman et al. (1923) evidenciaram a presença de uma terceira fração protéica, então nomeada confaseolina. A faseolina é a principal globulina de reserva do feijão e uma das mais estudadas. As denominações globulina G1, glicoproteína 2, eufaseolina, α -globulina e globulina 7S são termos também utilizados para designar esta proteína. Apresenta estrutura quaternária composta de três subunidades glicosiladas (Sathe, 2002). Esta estrutura, no estado nativo, é compacta e resistente à ação de proteases, o que pode ser modificado em função do aquecimento, que favorece a modificação das estruturas quaternária e terciária da faseolina, tornando-a mais suscetível ao ataque enzimático. Esta resistência à hidrólise pode estar associada, também, à presença de monossacarídeos ligados às cadeias polipeptídicas da globulina G1 (Nielsen, 1991; Yeboah et al., 1999; Venkatachalam & Sathe, 2003).

O feijão também apresenta, em sua composição protéica, estruturas consideradas como fatores antinutricionais. Entre elas estão as lectinas, os inibidores de proteases e os inibidores de amilases. As lectinas, ou fito-hemaglutininas, são glicoproteínas solúveis tanto em água (albuminas) quanto em soluções salinas (globulinas) que compõem o mecanismo de defesa vegetal contra insetos e microrganismos (Peumans & van Damme, 1995). Têm a capacidade de induzir a agregação de eritrócitos e estão associadas a alterações nos mecanismos de absorção intestinal de mamíferos (Figuroa et al., 1984).

Com relação aos inibidores de proteases, também conhecidos como inibidores de tripsina, existem dois tipos principais: Bowman-Birk e Kunitz. Ambos apresentam elevado número de aminoácidos sulfurados em suas cadeias polipeptídicas, quando comparados às demais estruturas protéicas presentes no feijão. Os inibidores do tipo Bowman-Birk apresentam diversas pontes dissulfeto em sua estrutura, o que lhes confere estabilidade térmica maior que os demais inibidores. Por esta razão, são necessários maior temperatura e ou maior tempo de aquecimento, para que sejam inativados. Estes inibidores possuem dois sítios de ligação à enzima, podendo inibir até duas moléculas simultaneamente (Bowman, 1971; Birk, 1985; Deshpande, 1992).

Os inibidores do tipo Kunitz são raros em *Phaseolus* sp., são mais sensíveis ao aquecimento, por apresentarem menor concentração de Cys em sua estrutura e têm a capacidade de inibir uma molécula de protease, por apresentarem apenas um sítio de ligação, sendo, portanto, menos prejudiciais, do ponto de vista nutricional (Kunitz, 1947; Sathe, 2002). Os inibidores de amilases presentes no feijão são extremamente sensíveis ao calor e a outros processos desnaturantes. Apresentam especificidade elevada sobre amilases de insetos e baixa capacidade inibitória sobre amilases animais (Kasahara et al., 1996; Sawada et al., 2002).

2.4.1.3.1 Digestibilidade protéica *in vitro*

A digestibilidade das proteínas do feijão é considerada baixa quando comparada com a de outras proteínas vegetais e animais. A dificuldade na digestão das proteínas do feijão pode estar associada a diversos fatores, entre eles a estrutura compacta e glicoprotéica da faseolina e demais polipeptídeos; a presença de inibidores de proteases e amilases, a presença de hemaglutininas, compostos fenólicos, fitatos e oxalatos (em especial quando considerado o grão cru), o tempo e as condições de armazenamento e o processamento do grão

(Bressani et al., 1988; Reyes-Moreno & Paredez-López, 1993; Messina, 1999; Sathe, 2002). A digestibilidade em *Phaseolus vulgaris* varia em função da cultivar, com tendência a ser maior nos grãos claros em relação aos coloridos (Aw & Swanson, 1985). A presença de compostos fenólicos, localizados principalmente no tegumento, está associada a baixos valores de digestibilidade em humanos, cerca de 50% (Goycoolea et al., 1990; Bressani, 1983; Bressani, 1993).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIBI, S. A.; MORSE, E. L. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 50, p. 2266-2275, 1971.

ADIBI, S. A.; SOLEIMANPOUR, M. R. Functional characterization of dipeptide transport system in human jejunum. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 53, p. 1368-1374, 1974.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science, 1986. 427 p.

AKAR, B.; FADILUĞLU, S. Teleme production by purified ficin. **Journal of Food Quality**, Malden, v. 22, n. 6, p. 671-680, 1999.

ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P. A. Nutritional aspects of food proteins in relation to technology. **Food Research International**, Barking, v. 9, p. 629-655, 1993.

ANOKWULU, M. N.; ONWURAH, I. N. E. Application of soybean lipoxygenase in bleaching browned white yam. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 41, n. 6, p. 700-703, 2004.

ARAI, S.; MAEDA, A.; MATSUMURA, M.; HIRAO, N.; WATANABE, M. Enlarged sacale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 50, p. 2929-2931, 1986.

ARIMA, J.; UESUGI, Y.; IWABUCHI, M.; HATANAKA, T. Study on peptide hydrolysis by aminopeptidases from *Streptomyces griseus*, *Streptomyces septatus* and *Aeromonas proteolytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 70, p. 541-547, 2006.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, London, v. 343, n. 1, p. 177-183, 1999.

ASP, N. G. Resistant starch - proceedings from the 2nd plenary meeting of EURESTA - european flour concerted action 11 on physiological implications of

the consumption of resistant starch in man. **European Journal of Clinical Nutrition**, Basingstoke, v. 46, p. S1-S1, suppl. 2, Oct. 1992.

ASTORG, P.; GUESNET, P.; ALESSANDRI, J. M.; GALAN, P.; LAVIALLE, M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and health: a mini-review of current knowledge. **Sciences des Aliments**, Cachan, v. 26, n. 1, p. 8-28, jan-fév 2006.

AUBES-DUFAU, I.; SERIS, J. L.; COMBES, D. Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration and characterization. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 1982-1988, 1995.

AUGUSTIN, J.; BECK, C. B.; KALBFLEISH, G.; KAGEL, L. C.; MATTHEWS, R. H. Variation in the vitamin and mineral-content of raw and cooked commercial *Phaseolus vulgaris* classes. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 6, p. 1701-1706, 1981.

AW, T. L.; SWANSON, B. G. Influence of tannins on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, n.1, p. 67-71, Jan.-Feb. 1985.

BARON, J. A: Dietary fiber and colorectal cancer: an ongoing saga. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 294, n. 22, p. 2904-2906, Dec. 2005.

BAYSAL, T.; DEMIRDÖVEN, A. Lipoxygenase in fruits and vegetables: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 4, p. 491-496, 2007.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 3. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2004. 1070 p.

BEYNON, R.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. 2. ed. Oxford: Oxford University, 2001. 340 p.

BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor - trypsin-inhibitor and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 113-131, 1985.

BOURDON, I.; OLSON, B.; BACKUS, R.; RICHTER, B. D.; DAVIS, P. A.; SCHNEEMAN, B. O. Beans, as a source of dietary fiber, increase

cholecystokinin and apolipoprotein B48 response to test meals in men. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 5, p. 1485-1490, May 2001.

BOWMAN, D. E. Isolation and properties of a proteinase inhibitor of navy beans. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 144, n. 2, p. 541-548, Feb. 1971.

BOZA, J. J.; JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ, O.; SUÁREZ, M. D.; GIL, A. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and guinea pigs. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 124, p. 1978-1986, 1994.

BRESSANI, R. Grain quality of common beans. **Food Reviews International**, New York, v. 9, n. 2, p. 237-97, 1993.

_____. Research needs to up-grade the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 32, p. 101-110, 1983.

BRESSANI, R.; HERNANDEZ, E.; BRAHAM, E. Relationship between content and intake of bean polyphenolics and protein digestibility in humans. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 38, p. 5-21, 1988.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 252, n.1, p. 55–128, May 2003.

CARMONA-GARCÍA, R.; OSORIO-DÍAZ, P.; AGAMA-ACEVEDO, E.; TOVAR, J.; BELLO-PÉREZ, L. A. Composition and effect of soaking on starch digestibility of *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. ‘Mayocoba’. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 296-302, Mar. 2007.

CARREIRA, R. L.; DE MARCO, L. M.; DIAS, D. R.; MORAIS, H. A.; SILVESTRE, M. P. C. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, p.17-25, 2004.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; CHALFOUN, S. M.; BOTREL, N.; JUSTE JR., E. S. G. Relação entre a composição físico-química e química do grão de café beneficiado e a qualidade de bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 449-454, 1994.

CHATAUD, J.; DESREUMEUX, S.; CARTWRIGHT, T. **Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique.** Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988. 1988.

CHEFTEL, J. D.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias-bioquímica-propiedades funcionales-valor nutricional-modificaciones químicas.** Zaragoza: Acribia, 1989. 345 p.

CHEN, S. X.; SWAISGOOD, H. E.; FOEGEDING, E. A. Gelation of β -lactoglobulin treated with limited proteolysis by immobilized trypsin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 234-239, 1994.

CHÉRET, R.; DELBARRE-LADRAT, C.; LAMBALLERIE-ANTON, M.; VERREZ-BAGNIS, V. Calpain and cathepsin activities in *post mortem* fish and meat muscles. **Food Chemistry**, Oxford, v. 101, n. 4, p. 1474-1479, 2007.

CHERRY, J. P.; ORY, P. L. Characterization of peroxidase in plant cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 75, p. 956-958, 1984.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 11, p. 254-262, 2000.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 167-171, 1998.

COGAN, U.; MOSHE, M.; MOKADY, M. Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 32, p. 459-466, 1981.

COMBES, D.; LOZANO, P. α -Chymotrypsin in plastein synthesis influence of water activity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 672, n. 1, p. 409-414, 1992.

CONAB. **Análise conjuntural de 2002:** feijão. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/acms/clientes/conab/09_diversos/arq_menu_principal/conjuntura_anual_20_2002.doc>. 2002. Acesso em: 25 jun. 2003.

CONAB. **Central de informações agropecuárias/safras**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/FeijaoTotalSerieHist.xls>>. Acesso em: 20 abr. 2007.

CORDLE, C. T. Control of food allergies using protein hydrolysates. **Food Technology**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 72-76, 1994.

CUTHBERTSON, D. P. Amino acids and protein hydrolysates in human and animal nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 1, p. 35-41, 1950.

DESHPANDE, S. S. Food legumes in human-nutrition - a personal perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 32, n. 4, p. 333-363, 1992.

DEVRIES, J. W.; PROSKY, L.; LI, B.; CHO, S.. A historical perspective on defining dietary fiber. **Cereal Foods World**, St. Paul, v. 44, n. 10, p. 367-369, Oct. 1999.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; FREIRE, E. S.; SERÔDIO, R. S. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 319–329, Mar 2007.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 342-350, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Centro nacional de pesquisas em arroz e feijão**. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/pesquisa/feijao/feijao.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2003.

ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S. M.; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, Basingstoke, v. 46, suppl. 2, p. S33–S50, Oct. 1992.

FAOSTAT/ONU. **Production/ProdSTAT/Crops/countries/years**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em: 17 dez. 2007.

FIALHO, L. S.; GUIMARAES, V. M.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; DIAS, L. A. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; JOSÉ, I. C.; REZENDE, S. T. Biochemical composition and indigestible oligosaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 61, n. 2, p. 87-89, June 2006.

FIGUEROA, M. O; MANCINI FILHO, J; LAJOLO, F. M. Ação anti-nutricional das fito-hemaglutininas de *Phaseolus vulgaris*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 34, n. 3, p. 488-499, 1984.

FINLEY, J. W.; BURRELL, J. B.; REEVES, P. G. Pinto bean consumption changes SCFA profiles in fecal fermentations, bacterial populations of the lower bowel, and lipid profiles in blood of humans. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, n. 11, p. 2391-2398, Nov. 2007.

FORSYTH, J. L.; OWUSU-APENTEN, R. K.; ROBINSON, D. S. The thermostability of purified isoperoxidases from *Brassica oleracea* var. gemmifera. **Food Chemistry**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 99-109, 1999.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios: controle e implicações na dietoterapia humana. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.

FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 86-88, Oct. 1994.

FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 49, p. 343-359, 1990.

GALLAGHER, J.; KANEKANIAN, A. D.; EVANS, E. P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 279-285, 1994.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 13, n. 6, p. 549-558, Dec. 1994.

GODFREY, T. Protein modification. In: GODFREY, T.; WEST, S. (Eds.). **Industrial enzymology**. 2. ed. Great Britain: Macmillan, 1996. cap. 2.18.

GODFREY, T.; WEST, S. Introduction to industrial enzymology. In: _____. **Industrial enzymology**. 2. ed. Great Britain: Macmillan, 1996. cap. 1.

GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: II. molecular - weight range. **Biothecnology and Bioengineering**, New York, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.

GOULART, P. F. P.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; LIMA, L. C. O.; MEYER, L. E. Purification of polyphenoloxidase from coffee fruits. **Food Chemistry**, Oxford, v. 83, n. 1, p. 7-11, 2003.

GOYCOOLEA, F.; GONZÁLEZ, E.; BARRON, J. M. Efecto de los tratamientos caseros en las preparaciones de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris*) sobre el contenido de taninos y valor nutritivo de las proteínas. **Archivos Latino-Americanos de Nutrición**, Caracas, v. 15, n. 2, p. 263-273, 1990.

GRIMBLE, G. K.; SILK, D. B. A. Peptides in human nutrition. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 2, p. 87-108, 1989.

GUADIX, A.; CAMACHO, F.; GUADIX, E. M. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 72, n. 4, p. 398-405, 2006.

GUZMÁN-MALDONADO, S. H.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; PAREDES-LÓPEZ, O. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 80, p. 1874-1881, Oct. 2000.

HÄNSLER, M.; ULLMANN, G.; JAKUBKE, H. D. The application of papain, ficin and clostripain in kinetically controlled peptide synthesis in frozen aqueous solutions. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v. 1, n. 5, p. 283-287, 1995.

HAQUE, Z. U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate: II. Functional properties of peptides. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 5, p. 559-571, 1992.

HARA, H.; FUNABIKI, R.; IWATA, M.; YAMAZAKI, K. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 114, p. 1122-1129, 1984.

HARRACH, T.; ECKERT, K.; SCHULZE-FORSTER, K.; NUCK, R.; GRUNOW, D.; MAURER, H. R. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 14, p. 41-52, Jan. 1995.

HASSAN, A. B.; OSMAN, G. A.; BABIKER, E. E. Effect of chymotrypsin digestion followed by polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on functional properties of millet proteins. **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 257-262, 2007.

HINSBERGER, A.; SANDHU, B. K. Digestion and absorption. **Current Paediatrics**, v. 14, p. 605-611, 2004.

HOOVER, R.; ZHOU, Y. *In vitro* and *in vivo* hydrolysis of legume starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes – a review. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 401–417, Dec. 2003.

HUGHES, J. S. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. **Food Technology**, Chicago, v.45, n. 9, p.122-126, 1991.

HUGHES, M. C.; HEALY, Á.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'NEILL, E. E. Proteolytic specificity of cathepsin D on bovine F-actin. **Meat Science**, Barking, v. 56, n. 2, p. 165-172, 2000.

HUMISKI, L. M.; ALUKO, R. E. Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 8, p. S605-S611, 2007.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JENSEN, B.; OLSEN, J. Physicochemical properties of a purified α -amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 14, n. 2, p. 112-116, Feb. 1992.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. 2. ed. Massachusetts: Sinauer, 2002. 576 p.

JUNG, S.; MURPHY, P. A.; JOHNSON, L. A. Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 2, p. C180-C187, 2005.

KAMIHIRA, M.; TANIGUCHI, M.; KOBAYASHI, T. Synthesis of aspartame precursors by enzymatic reaction in supercritical carbon dioxide. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 51, n. 12, p. 3427-3428, 1987.

KANEKANIAN, A.; GALLAGHER, J.; EVANS, E. P. Casein hydrolysis and peptide mapping. **International Journal of Dairy Technology**, Ermine, v. 53, n. 1, p. 1-5, Feb. 2000.

KASAHARA, K.; HAYASHI, K.; ARAKAWA, T.; PHILO, J. S.; WEN, J.; HARA, S.; YAMAGUCHI, H. Complete sequence, subunit structure, and complexes with pancreatic alpha-amylase of an alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 120, n. 1, p. 177-183, July 1996.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, p. 215-227, 2001.

KEOHANE, P. P.; GRIMBLE, G. K.; BROWN, B.; SPILLER, R. C. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. **Gut**, London, v. 26, p. 907-913, 1985.

KIGEL, J. Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, Gembloux, v. 3, p. 205-209, 1999.

KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. **Process Biochemistry**, Oxford, p. 149-157, 1985.

KIM, Y. H.; WON, K.; KWON, J. M.; JEONG, H. S.; PARK, S. Y.; AN, E. S.; SONG, B. K. Synthesis of polycardanol from a renewable resource using a fungal peroxidase from *Coprinus cinereus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 34, n. 1/6, p. 33-38, July 2005.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KU, M. A.; HANG, Y. D. Production of yeast lactase from sauerkraut brine. **Biotechnology Letters**, Amsterdam, v. 14, n. 10, p. 925-928, 1992.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. 2. General properties. **Journal of General Physiology**, New York, v. 30, n. 4, p. 291-310, 1947.

LAIRON, D.; ARNAULT, N.; BERTRAI, S.; PLANELLS, R.; CLERO, E.; HERCBERG, S.; BOUTRON-RUAULT, M.-C.. Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 82, n. 6, p. 1185-1194, Dec. 2005.

LEE, B. H. **Fundamentals of food biotechnology**. New York: VCH, 1996. 431 p. (Food Science and Technology Series).

LEE, W. C.; CHEN, T. C. Functional characteristics of egg white solids obtained from papain treated albumen. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 51, n. 4, p. 263-266, 2002.

LEMOS, M. A.; OLIVEIRA, J. C.; SARAIVA, J. A. Effect of water content on the thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase freeze-dried from alkaline pH. **Food Science and Technology International**, Barcelona, v. 7, n. 5, p. 393-398, 2001.

LOMBARDI-BOCCIA, G.; SANTIS, N.; LULLO, G. Impact of processing on Fe dialysability from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, Oxford, v. 53, p. 191-195, 1995.

MABALEHA, M. B.; YEBOAH, S. O. Characterization and compositional studies of the oils from some legume cultivars, *Phaseolus vulgaris*, grown in southern Africa. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 81, n. 4, p. 361-364, Apr. 2004.

MAEDA, A.; ABE, K.; WATANABE, M.; ARAI, S. Peptic hydrolysis of bovine β -lactoglobulin to produce a low-phenylalanine peptide foodstuff for phenylketonuria. **Agriculture and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 51, p. 1501-1507, 1987.

MAHAN, L. K.; SCOTT-STUMP, S. **Krause – alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11. ed. São Paulo: Roca, 2005. 1242 p.

MAHONEY, R. R.; NICKERSON, T. A.; WHITAKER, J. R. Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 11, p. 1620-1629, 1975.

MANHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, Chicago, v. 69, p. 1163-1169, 1992.

MARTIN, L.; EBERT, C.; GARDOSSE, L.; LINDA, P. High isolated yields in thermolysin-catalysed synthesis of Z-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester in toluene at controlled water activity. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 42, n. 19, p. 3395-3397, May 2001.

MESSINA, M. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, n. 3, p. 439S-450S, Sept. 1999.

MICHELS, K. B.; FUCHS, C. S.; GIOVANNUCCI, E.; COLDITZ, G. A.; HUNTER, D. J.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Fiber intake and incidence of colorectal cancer among 76,947 women and 47,279 men. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 14, n. 4, p. 842-849, Apr. 2005.

MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F.; YAMAUCHI, K. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, p. 1225-1229, Sept.-Oct. 1989.

MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 86-96, 2000.

MISTRY, V. V. Chymosin in cheese making. In: HUI, Y. H. (Ed.). **Food biochemistry and food processing**. Oxford: Blackwell, 2006. p. 241-252.

MORAIS, H. A.; BARBOSA, C. M. S.; LOPES, D. C. F.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína. **Arquivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 52, n. 1, 2002.

MORATO, A. F.; CARREIRA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 13, p. 843-857, 2000.

MOTA, M. V. T.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P.; ROCHA, C.; TEIXEIRA, J. A.; TORRES, D.; GONÇALVES, M. P. Trypsin hydrolysis of whey protein concentrates: characterization using multivariate data analysis. **Food Chemistry**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 278-286, 2006.

MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p. 270-276, 2006.

MOZAFFARIAN, D.; KUMANYIKA, S. K.; LEMAITRE, R. N.; OLSON, J. L.; BURKE, G. L.; SISCOVICK, D. S. Cereal, fruit, and vegetable fiber intake and the risk of cardiovascular disease in elderly individuals. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 289, n. 13, p. 1659-1666, Apr. 2003.

MURAYAMA, S. **Horticultura**. 2. ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1983. 318 p.

NAKAMURA, T.; SYUKUNOBE, Y.; SAKURAI, T.; IDOTA, T. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. **Milchwissenschaft - Milk Science International**, Munich, v. 48, p. 11-14, 1993.

NAKHOST, Z.; HSIEH, D. S. T.; SHIH, V.; RHA, C. K. Synthesis of low-phenylalanine polypeptides. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v. 20, n. 3, p. 267-275, 1982.

NAZ, S. **Enzymes and food**. Pakistan: Oxford University, 2002. 145 p.

NEKLYUDOV, A. D.; IVANKIN, A. N.; BERDUTINA, A. V. Properties and uses of protein hydrolysates: review. **Applied Microbiology and Biochemistry**, New York, v. 36, n. 5, p. 452-459, 2000.

NIELSEN, P. M.; OLSEN, H. S. Enzymic modification of food protein. In: WHITEHURST, R. J.; LAW, B. A. (Eds.). **Enzymes in food technology**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2002. cap. 6, p. 109-143.

NIELSEN, S. S. Digestibility of legume protein. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 6, p. 112-114, 1991.

OLSON, A. C.; GRAY, G. M.; GUMBMANN, M. R.; WAGNER, J. R. Nutrient composition of and digestive response to whole and extracted dry beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, n. 1, p. 26-32, Jan. 1982.

OLSON, A.; GRAY, M. G.; CHIU, M. C. Chemistry and analysis of soluble dietary fiber. **Food Technology**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 71-82, 1987.

OSBORNE, T. B. The proteids of the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 16, n. 9, p. 633-643, Sept. 1894.

_____. The proteids of the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 16, n. 10, p. 703-712, Oct. 1894.

_____. The proteids of the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 16, n. 11, p. 757-764, Nov. 1894.

OSORIO-DÍAS, P.; BELLO-PÉREZ, L. A.; AGAMA-ACEVEDO, E.; VARGAS-TORRES, A.; TOVAR, J.; PAREDES-LÓPEZ, O. *In vitro* digestibility and resistant starch content of some industrialized commercial beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, Oxford, v. 78, n. 3, p.333-337, Aug. 2002.

OZYILMAZ, G.; SEYHAN TUKEL, S. Simultaneous and sequential co-immobilization of glucose oxidase and catalase onto florisol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Korea, v. 17, n. 6, p. 960-967, 2007.

OZYILMAZ, G.; SEYHAN TUKEL, S.; ALPTEKIN, Ö. Kinetic properties and storage stabilities of CAT immobilized onto florisol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 35, p. 154-160, 2005.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 29, n. 2, p. 119-131, Apr. 1999.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Applied Microbiology and Biochemistry**, New York, v. 31, p. 135-152, 2000.

PANYAM, D.; KILARA, A. Emulsifying peptides from the tryptic hydrolysis of casein. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, n. 3, p. FCT154–FCT163, 2004.

PAUL, F.; AURIOL, D.; MONSAN, P. Direct enzymatic synthesis of aspartame. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 542, n. 1, p. 351-355, 1988.

PEARCE, R. J. Food functionaliy ucces or failure for dairy based ingredients. **Australian Journal Dairy Technology**, Victoria, v. 50, p. 15-23, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v.109, n. 2, p. 347–352, Oct. 1995.

PINTERITS, A.; ARNTFIELD, S. D. The effect of limited proteolysis on canola protein gelation. **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, n. 4, p. 1337-1343, 2007.

POSORSKE, L. H. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 61, n. 11, p. 1758-1760, 1984.

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. **Food Science**. 5. ed. New York: Kluwer Academic, 1995. 608 p.

PRICE, N. C.; STEVENS, L. **Fundamentals of enzymology**. 3. ed. Bath: Oxford University, 1993. 486 p.

RAGNO, V.; GIAMPIETRO, P. G.; BRUNO, G.; BUSINCO, L. Allergenicity of milk protein hydrolysate formulae in children with cow's milk allergy. **European Journal of Pediatrics**, New York, v. 152, n. 9, p. 760-762, Sept. 1993.

RAKSAKULTHAI, R.; HAARD, N. F. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 43, n. 4, p. 401-445, 2003.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. D. B.; DOS SANTOS, J. B. Genetic progress after four cycles of recurrent selection for yield and grain traits in common bean. **Euphytica**, Dordrecht, v. 144, n. 1-2, p. 23-29, July 2005.

RAMEZANI, R.; AMINLARI, M.; FALLAHI, H. Effect of chemically modified soy proteins and ficin-tenderized meat on the quality attributes of sausage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 1, p. 85-88, 2003.

RAMPILLI, M.; LARSEN, R.; HARBOE, M. Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. **International Dairy Journal**, London, v. 15, n. 11, p. 1130-1137, 2005.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. P.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sept. 1988.

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. London: Academic Press, 1975. 573 p.

RÉRAT, A. A. Nutritional supply of proteins and absorption of their hydrolysis products: consequences on metabolism **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 52, p. 335-344, 1993.

REYES-MORENO, C.; PAREDEZ-LÓPEZ, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 4, p. 227-286, 1993.

ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. **Oxidative enzymes in foods**. London: Elsevier Applied Science, 1991. 314 p.

ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochemical Journal**, London, v. 266, p. 869-875, 1990.

SACKS, F. M.; CAMPOS, H. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and cardiovascular disease: time to widen our view of the mechanisms. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Chevy Chase, v. 91, n. 2, p. 398-400, Feb. 2006.

SÁENS DE PIPAÓN, M.; QUERO, J.; WATTIMENA, D. J. L.; SAUER, P. J. J. Effect of two amino acid solutions on leucine turnover in preterm infants. **Biology of the Neonate**, Basel, v. 87, n. 4, p. 236-241, 2005.

SALUNKHE, D. K.; SATHE, S. K.; REDDY, N. R. Legume lipids. In ARORA, S. K. (ed.) **Chemistry and biochemistry of legumes**. London: Edward Arnold, 1983. p. 51-97.

SATHE, S. K. Dry bean protein functionality. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 175-223, 2002.

SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 1. Proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 20, p. 1-46, 1984.

_____. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part 2. Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 21, p. 41-91, 1984.

SAWADA, S.; TAKEDA, Y.; TASHIRO, M. Primary structures of alpha- and beta-subunits of alpha-amylase inhibitors from seeds of three cultivars of *Phaseolus* beans. **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 21, n.1, p. 9-17, Jan. 2002.

SCHWAN, R. F.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, p. 62-67, 1994.

SGARBIERI, V. C.; WHITAKER, J. R. Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, San Diego, v. 28, p. 93-166, 1982.

SHIN, H. S.; KIM, S. B.; KANG, S. C.; KHAN, M. A.; KIM, H. S.; SHIN, H. J.; CHANG, C. H. Production of low antigenic cheese whey protein hydrolysates using mixed proteolytic enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 87, n. 11, p. 2055-2060, 2007.

SHUZHENG, Z.; SUGUO, G.; SHOUJUN, Y. Microbial glycosidases: research and application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 434, n. 1, p. 282-284, 1984.

SILK, D. B. A.; GRIMBLE, G. K.; REES, R. G. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. **Proceedings of the Nutrition Society**, Wallingford, v. 44, p. 63-72, 1985.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates: I. use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, p. 2778-2782, 1994a.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates: II. characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, p. 2783-2789, 1994b.

SINCLAIR A. J.; ATTAR-BASHI N. M.; LI, D. What is the role of α -linolenic acid for mammals? **Lipids**, Champaign, v. 37, n. 12, p. 1113-1123, Dec. 2002.

SINKOVITS, A. F.; BRYKSA, B. C.; TANAKA, T.; YADA, R. Y. Understanding the structure–function role of specific catalytic residues in a model food related enzyme: pepsin. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 5, p. 1175-1180, Apr. 2007.

SISAK, C.; CSANÁDI, Z.; RÓNAY, E.; SZAJÁNI, B. Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 5, p. 1002-1007, 2006.

SMITHERS, G. W.; BRADFORD, R. S. New casein products: fresh opportunities for the dairy industry. **Food Research Quarterly**, Sidney, v. 51, p. 92-98, 1991.

SOCCOL, C. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S.; TAGLIARI, C. V.; PANDEY, A. Glucoamylase production and applications. In: WEBB, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. (Orgs.). **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech, 2004. v. 1, p. 214-230.

SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation using agroindustrial products. **International Journal of Food Engineering**, Essex, v. 2, p. 1-19, 2006.

STANLEY, D. W.; AGUILERA; J. M. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes - the influence of structure and composition. **Journal of Food Biochemistry**, Trumbull, v. 9, n. 4, p. 277-323, Dec. 1985.

SVENNING, C.; MOLLAND, T.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G. E. A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION SEMINAR ON PROTEIN & FAT GLOBULE MODIFICATIONS, 1993. **Proceedings...** [S.l.: s.n.], 1993. p. 96-106.

TAKASE, M.; KAWASE, K.; DIYOSOWA, I.; OGASA, K.; SUSUKI, S.; KUROUME, T. Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 62, p. 1570-1576, 1979.

TAYLOR, A. Aminopeptidases: structure and function. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 7, n. 2, p. 290-298, Feb. 1993.

TOPPING, D. L. Soluble fiber polysaccharides: effects on plasma cholesterol and colonic fermentation. **Nutrition Reviews**, Lawrence, v.49, n. 7, p.195-203, July 1991.

TOVAR, J.; GRANFELDT, Y.; BJÖRCK, I. M. Effect of processing on blood glucose and insulin responses to starch in legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 1846-1851, 1992.

TROCK, B.; LANZA, E.; GREENWALD, P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 82, n. 8, p. 650-661, Apr. 1990.

USDA. **National nutrient database for standard reference**. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>. Acesso em: 23 nov. 2007.

VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 49, p. 127, 1981.

VANDERHOOF, J. A. Immunonutrition: the role of carbohydrates. **Nutrition Research**, New York, v.14, n. 7-8, p.595-598, July-Aug. 1998.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Phaseolin *in vitro* pepsin digestibility: Role of acids and phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 11, p. 3466-3472, May 2003.

VIANA, F. R.; BIZZOTTO, C. S.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, A. L.; SILVESTRE, M. P. C. Bovine blood constituents as fat replacers in ham patê. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 42, n. 1, p. 5-10, Jan-Mar 2004.

VIJAYALAKSHMI, M. A.; LEMIEUX, L.; AMIOT, J. High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 9, p. 3559-3576, 1986.

WATANABE, M.; MATSUMURA, M.; YABUKI, S.; AIZAWA, M.; ARAI, S. Construction of a bioreactor with immobilized yeast cells for production of a low-phenylalanine peptide mixture as a phenylketonuria foodstuff. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 52, p. 2989-2994, 1988.

WATERMAN, H. C.; JOHNS, C. O. Studies on the digestibility of proteins *in vitro*. I. The effect of cooking on the digestibility of phaseolin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 46, p. 9-17, Mar 1921.

WATERMAN, H. C.; JOHNS, C. O.; JONES, D. B. Conphaseolin. A new globulin from the navy bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 55, p. 93-104, Feb. 1923.

WEBB JUNIOR, K. E. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 3011-3022, 1990.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2. ed. California: Marcel Dekker, 1994. 648 p.

WHITAKER, J. R. Proteolytic enzymes. In: WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of Food Enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. Chap. 78, p. 993-1018.

WHITAKER, J. R.; VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. **Handbook of food enzymology**. New York: Marcel Dekker, 2003. 1128 p.

WONG, D. W. S. **Food enzymes: structures and mechanism**. New York: Chapman & Hall, 1995. 390 p.

WU, X. J.; JAMES, R.; ANDERSON, A. K. Mineral contents in seed coat and canning quality of selected cultivars of dark red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Processing and Preservation**, Malden, v.29, n. 1, p. 63-74, Feb. 2005.

YEBOAH, F. K.; ALLI, I.; SIMPSON, B. K.; KONISHI, Y.; GIBBS, B. F. Tryptic fragments of phaseolin from protein isolates of *Phaseolus* beans. **Food Chemistry**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 105-112, Nov. 1999.

YOSHIDA, H.; TOMIYAMA, Y.; MIZUSHINA, Y. Characterization in the fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Lipids**, Malden, v. 12, n. 2, p. 169-180, Jun. 2005.

YU, Y.; HU, J.; BAI, X.; DU, Y.; LIN, B. Preparation and function of oligopeptide-enriched hydrolysate from globin by pepsin. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 1589-1593, July 2006.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 705-708, 2006.

CAPÍTULO 2

ALKALINE PROTEASE FROM *Bacillus* sp. ISOLATED FROM COFFEE BEAN GROWN ON CHEESE WHEY

1 RESUMO

DIAS, Disney Ribeiro. **Protease alcalina obtida de *Bacillus* sp. isolado de grãos de café, cultivado em meio com soro de leite em pó.** Lavras: UFLA, 2007, 131 p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos)³.

Duas cepas de *Bacillus*, uma padrão (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) e uma selvagem (*Bacillus* sp. UFLA 817CF) isolada durante o processo fermentativo de café via seca no Sul de Minas Gerais, Brasil, foram avaliadas quanto à capacidade de secreção de proteases alcalinas. As duas cepas foram cultivadas em cinco meios de cultivo distintos, sendo caldo nutriente, caldo nutriente mais caseinato de sódio 1% e caldo nutriente adicionado de soro de leite em pó, nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%, durante 72 horas, a 28°C e 150 rpm. Amostras destes cultivos foram coletadas a cada 24 horas para avaliação de atividade proteolítica, proteínas totais e contagem de UFC/mL. O máximo de atividade proteolítica foi observado no tempo 24 horas, para ambos os microrganismos testados (839,8 U/mg para *B. subtilis* ATCC 6633 e 975,9 U/mg para *Bacillus* sp. UFLA 817CF). A saturação com 60% de sulfato de amônio foi a fração que apresentou os melhores resultados de atividade proteolítica específica para todos os meios testados, considerando a cepa *Bacillus* sp. UFLA 817CF. As melhores condições para a atividade proteolítica desta foram em pH 9,0 e 40°C, em três meios testados (NB, NBC e NBW₁), os quais apresentaram melhores resultados. A protease de *Bacillus* sp. UFLA 817CF, obtida da fração 60%, apresentou estabilidade em pH 7,0 e estabilidade térmica a 40°C e 50°C, podendo ser considerada uma alternativa para utilização do efluente de soro de leite, além de poder ser empregada em diversas áreas, com a finalidade de promover hidrólise protéica.

³ Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Orientadora), Marialice Pinto Coelho Silvestre – FAFAR/UFMG (Co-Orientadora)

2 ABSTRACT

DIAS, Disney Ribeiro. **Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey**. Lavras: UFLA, 2007, 131 p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos)⁴.

Two strains of *Bacillus*, one from culture collection (*B. subtilis* ATCC 6633) and a wild type (*Bacillus* sp. UFLA 817CF) isolated during coffee fermentation in South of Minas Gerais, Brazil, were evaluated in relation to secretion of alkaline proteases. The strains were grown on nutrient broth, nutrient broth with sodium caseinate and nutrient broth with three different concentrations of cheese whey powder during 72 h. Samples were collected at 24 hour intervals to evaluate the proteolytic activity, protein content and cell population. Maximum protease activity was observed after 24 hours growth for both the microorganisms, a period that coincided with the end of the exponential phase. The specific activity values were, respectively, 839.8 U/mg for *B. subtilis* ATCC 6633 and 975.9 U/mg for *Bacillus* sp. UFLA 817CF. The 60% saturation presented the best results for specific protease activity in all the growth culture media tested with *Bacillus* sp. UFLA 817CF. *Bacillus* sp. UFLA 817CF showed highest enzymatic activity at pH 9.0 and 40 °C in the three culture media tested (NB, NBC e NBW₁). The protease obtained from culture of the wild *Bacillus* strain presented stability at pH 7.0 and considerable heat stability at 40°C and 50°C, and could be an alternative for the industry to utilize cheese whey to produce proteolytic enzymes.

⁴ Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Major Professor), Marialice Pinto Coelho Silvestre – FAFAR/UFMG

**ALKALINE PROTEASE FROM *Bacillus* sp. ISOLATED FROM COFFEE
BEAN GROWN ON CHEESE WHEY**

(Preparado de acordo com as normas da revista *World Journal of Microbiology and Biotechnology* – artigo aceito para publicação – DOI 10.1007/s11274-008-9706-6)

Disney Ribeiro Dias ^{1,2}, Danielle Marques Vilela ³, Marialice Pinto Coelho
Silvestre ⁴, Rosane Freitas Schwan ^{3*}

¹ *Department of Food Science and* ³ *Department of Biology, Federal University of Lavras (UFLA);* ² *Unilavras; Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.* ⁴ *Department of Food Science, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.*

* *Author to whom correspondence should be addressed. Tel.: + 55-35-3829-1614, Fax: + 55-35-3829-1100, e-mail: rschwan@ufla.br*

Running head: Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean

Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey

Abstract

Two strains of *Bacillus*, one from culture collection (*B. subtilis* ATCC 6633) and a wild type (*Bacillus* sp. UFLA 817CF) isolated during coffee fermentation in South of Minas Gerais, Brazil, were evaluated in relation to secretion of alkaline proteases. The strains were grown on nutrient broth, nutrient broth with sodium caseinate and nutrient broth with three different concentrations of cheese whey powder during 72 h. Samples were collected at 24 hour intervals to evaluate the proteolytic activity, protein content and cell population. Maximum protease activity was observed after 24 hours growth for both the microorganisms, a period that coincided with the end of the exponential phase. The specific activity values were, respectively, 839.8 U/mg for *B. subtilis* ATCC 6633 and 975.9 U/mg for *Bacillus* sp. UFLA 817CF. The 60% saturation presented the best results for specific protease activity in all the growth culture media tested with *Bacillus* sp. UFLA 817CF. *Bacillus* sp. UFLA 817CF showed highest enzymatic activity at pH 9.0 and 40 °C in the three culture media tested. The protease obtained from culture of the wild *Bacillus* strain presented stability at pH 7.0 and considerable heat stability at 40°C and 50°C, and could be an alternative for the industry to utilize cheese whey to produce proteolytic enzymes.

Key Words: Alkaline protease, *Bacillus*, proteolytic enzymes, cheese whey powder, microbial enzyme.

3 Introduction

Proteolytic enzymes can be secreted across cytoplasmic membrane and cell wall. These extracellular enzymes are synthesized by diverse groups of microorganisms, including fungi, yeasts and bacteria. Among extracellular alkaline proteases, those from *Bacillus* species have wide use and importance in several industrial sectors, such as the food (dairy, Razak *et al.* 1994; obtaining of protein hydrolysates, Carreira *et al.* 2004 and Soares *et al.* 2007), leather (Takami *et al.* 1992; Giongo *et al.* 2007), detergent (Ito *et al.* 1998; Hadj-Ali *et al.* 2007) and synthesis of biologically active peptides (Kumar & Bhalla 1995). The genus *Bacillus* is one of the most important extracellular protease producers (Harwood 1992; Sarvas *et al.* 2004).

About 75% of world sales for industrial enzymes application are hydrolytic enzymes, of which proteolytic enzymes correspond to 60%. Alkaline proteases account for approximately 25% of the world enzyme market. The majority of the commercially available alkaline proteases are derived from *Bacillus* strains, which are recognized as important sources of this enzyme because their ability to secrete large amounts of proteinases showing high activity and stability. These proteases secreted by *Bacillus* sp. presented activity at a wide range of pH (7.0 to 11.0) and temperature (30 to 60 °C) (Horikoshi 1999; Joo *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2002a).

Natural and spontaneous fermentation is a rich source for new microorganisms with potential industrial or commercial value. The genus *Bacillus* is a taxon with broad distribution on diverse environments and has been the subject of attention for their application in biotechnology. These bacteria are relative ease of isolation and they are also able to grow in both complex and synthetic media (Johnvesly & Naik 2001). It is known that the amount of

enzyme produced varies greatly with strain and growth conditions, in which the cultivation media is an important parameter. In order to obtain high yields of protease it is necessary to plan and test media and cultivation conditions for wild strains (Anwar & Saleemuddin 1998).

Due to the potential uses of proteases, there is a need for the search of new strains of bacteria that produce proteolytic enzymes with novel properties and the development of low cost media. According to Hinman (1994), almost 40% of costs for the enzyme production are due to the cost of growth substrate. The use of complex medium for protease production by *Bacillus* has been reported in many scientific works. In this way there were a special attention to use industrial effluents or alternative sources as substrate for growth of *Bacillus*, including nug meal (Gessesse 1997), shrimp and crab shell powder (Yang *et al.* 2000), fish flour (Ellouz *et al.* 2001), amaranth seed meal (Pastor *et al.* 2001), soybean meal (Joo *et al.* 2002; Joo & Chang 2005), chicken feather (Gessesse *et al.* 2003) and arrowroot (Kumar & Parrack 2003).

Cheese whey is a byproduct obtained from cheese manufacture, as supernatant from the precipitation of the casein in milk. It is a complex substrate, rich in proteins and carbohydrates (lactose) and contains considerable concentrations of vitamins and minerals. Cheese whey corresponds to about 90% of the milk volume, containing 20% of the soluble proteins and 50% of the other nutrients (Siso 1996). In Brazil cheese whey is still an effluent of concern. It is estimated that only 15% of the cheese whey produced annually, about 70.000 tons, is used in other industrial sectors (Capitani *et al.* 2005). Cheese whey has been used for several purposes, mainly in the food industry (Wit 1998). Some researchers have used cheese whey as substrate for microorganism growth for biotechnology purposes to obtain yeast cells, enzymes and polysaccharides (Champagne *et al.* 1990; Kawahara & Obata 1998; Kumar *et al.* 1999; Ghaly *et al.* 2003), and this is an alternative for its use.

The objective of this study was to investigate the production of extracellular alkaline protease from *Bacillus* sp. UFLA 817CF isolated from coffee beans with significant protease activity, grown in culture medium with different amounts of cheese whey powder added as enzymatic inducer and the partial characterization of the enzyme.

4 Materials and Methods

4.1 Growth of microorganisms and enzyme production

The two strains of bacilli tested were *Bacillus subtilis* ATCC 6633, acquired from the Tropical Culture Collection at the André Tosello Foundation, Campinas, Brasil, and *Bacillus* sp. UFLA 817CF, isolated from coffee beans (Silva *et al.* 2000) that is part of the microorganism collection at the Microbial Physiology Laboratory of the Biology Department at the Federal University of Lavras, Minas Gerais, Brazil. The pure cultures were kept in nutrient agar at 4 °C. For inoculation in the media to be tested, the microorganisms were previously incubated in nutrient broth for 24 hours at 28 °C. Then 3 ml of this culture with 10^8 c.f.u./ml population were inoculated in 500 ml Erlenmeyer flask containing 300 ml of the culture medium to produce proteolytic enzymes. The flasks were incubated in an orbital incubator at 28 °C and 150 rpm. The culture media used were NB (nutrient broth, Difco), NBC (NB plus 0.01% w/v sodium caseinate, Sigma-Aldrich), NBW₁ (NB plus 0.01% w/v cheese whey powder, Prolacteos Dairy Industry, Contagem, MG, Brasil), NBW₂ (NB plus 0.1% w/v cheese whey powder) and NBW₃ (NB plus 1% w/v cheese whey powder), with initial pH 7.0. Samples of 10 ml were collected at 24 h, 48 h and 72 h to determine the total proteins and proteolytic activity (supernatant obtained from centrifuging the sample at 6000 ×g a 4°C for 15 minutes). The determinations were made in triplicate, and the results presented as the mean obtained. The Scott-Knott test was used with 5% significance to assess statistical differences in the protease production in the different culture media tested.

4.2 Protein quantification

Protein concentrations in the supernatant previously cited were measured spectrophotometrically at 595 nm by a dye binding method according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (BSA, Merck, Germany) as a standard and Bradford reagent from Sigma-Aldrich.

4.3 Protease assay

The alkaline proteolytic activity was determined by hydrolysis of casein. The culture broth was harvested by centrifugation (Sigma AK-15) at 6000 $\times g$ and 4 °C for 15 min. Aliquots of 500 μl of 0.5% (w/v) casein solution (Sigma-Aldrich) in Tris-HCl buffer (50 mM, pH 9.0) was mixed with 250 μl of diluted supernatant and hydrolysed under 37 °C, pH 9.0 during 30 min. The reaction was stopped by adding 500 μl of 10 % (w/v) trichloroacetic acid solution (Merck) and the mixture was centrifuged at 15000 $\times g$ for 15 min at 4 °C, and absorbance of the supernatant was measured at 275 nm with a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-1601 PC). One unit protease (U/ml) activity was defined as the activity that liberates 1 μg of tyrosine per minute (μg Tyr \times ml⁻¹min⁻¹) under described conditions (Çalik *et al.* 2002; Kumar 2002).

4.4 Enzyme precipitation

The supernatant from the crude extracts obtained from the different culture media tested were precipitated with ammonium sulfate at concentrations of 40, 60 and 80% saturation (Scopes 1994). The tests were carried out in quadruplicate. After adding ammonium sulfate, the sample was carefully homogenized and chilled at 4°C for two hours, before centrifuging at 6000 $\times g$

for 15 minutes at 4 °C. The precipitate was resuspended in a four volumes of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0, supplemented with 5 mM CaCl₂ and transferred to dialysis membranes (cut off 18 kDa). The membranes were immersed in 50 volumes of the same buffer and dialysis occurred for 24 hours at 4°C, with buffer solution renovation every eight hours. Enzymatic activity, stability at different pH values and temperature and electrophoresis in polyacrylamide gel tests were carried out on the recovered precipitates.

4.5 Effect of temperature and pH on enzymatic activity

The enzymatic fractions obtained from saturation with ammonium sulfate at 60%, in the NB, NBC, NBW₁ culture media, were incubated as different temperatures (30, 40, 50, 60 and 70 °C) and pH, using the citrate 100 mM (3.0 and 5.0), phosphate 50 mM (7.0), Tris-HCl 50 mM (9.0) and Glycine-NaOH 100 mM (11.0) buffers to assess the enzymatic activity. The optimum temperature was determined by verifying the protease activity on casein at pH 9.0.

To assess the ideal pH, a 0.5% (w/v) casein solution was prepared in the buffers and pH values above and incubated at 37°C to later quantify the enzymatic activity. The heat stability at different pH was verified in the 60% saturation fraction of the NB culture medium in both the bacilli. In the heat stability study, the enzyme was pre-incubated, without adding substrate, at 40, 50 and 60 °C for 120 minutes. Samples were removed to at 30, 60, 90 and 120 minutes to determine the residual proteolytic activity on casein at pH 9.0. The stability of the enzyme at different pH values was verified by incubating the enzyme, without substrate, at the pH values reported above, for 24 hours at 40 °C, before determining the residual proteolytic activity at 37 °C, pH 9.0 (Kumar 2002; Tremacoldi & Carmona 2005). The electrophoretic profile of the

enzymatic fractions precipitated in ammonium sulfate was verified by SDS-PAGE, using methodology according to Laemmli (1970). Separation gel at 12.5% (SDS 10%) was used in Tris-HCl pH 8.8 and 5% gel concentration. The crude extract was previously freeze dried and 25 μ l of the treated sample were added to the gel. The electrophoretic run occurred for four hours with a 20 mA current. Coomassie Brilliant Blue R-250 0.1% (w/v) was used for staining diluted in a solution of methanol/acetic acid/water (5:1:5, by vol.).

5 Results and discussion

5.1 Proteolytic activity in the crude extract

Two *Bacillus* strains were compared regarding protease production when submitted to growth in five culture media: nutritional broth, as base culture medium, and four different supplementations, using, as protease synthesis inducers, 0.01% sodium caseinate (w/v) and cheese whey powder at concentrations of 0.01%, 0.1% and 1.0% (w/v). The two *Bacillus* strains tested maintained populations varying between 1.1 and 7.2×10^7 c.f.u./ml for *Bacillus* sp. UFLA 817CF and between 8.8 and 25.0×10^7 c.f.u./ml for the *B. subtilis* ATCC 6633 culture (Fig. 1) during the 72 hours that the experiment was carried out in the culture media tested.

The *Bacillus* sp. UFLA 817CF populations decreased in function of time in the NB and NBC medium while in the NBW₁, NBW₂ and NBW₃ media the population increased after 72 hours, reaching the maximum growth value of 7.2×10^7 c.f.u./ml for the NBW₃ medium (Fig. 1a). Decrease in population in function of time was also observed in the *B. subtilis* ATCC 6633 in most of the culture media, except for the NBC culture medium, where the maximum population, 17.6×10^7 c.f.u./ml, was observed at 48 hours (Fig. 1b).

Alkaline protease activity varied with incubation time and the type of culture media in which the *Bacillus* isolates were cultivated (Fig. 1a and 1b). Within the culture media tested, NB was shown to be the best producing source of alkaline protease. This culture medium was reported by Hanson *et al.* (1964) for enzyme production by *B. subtilis*.

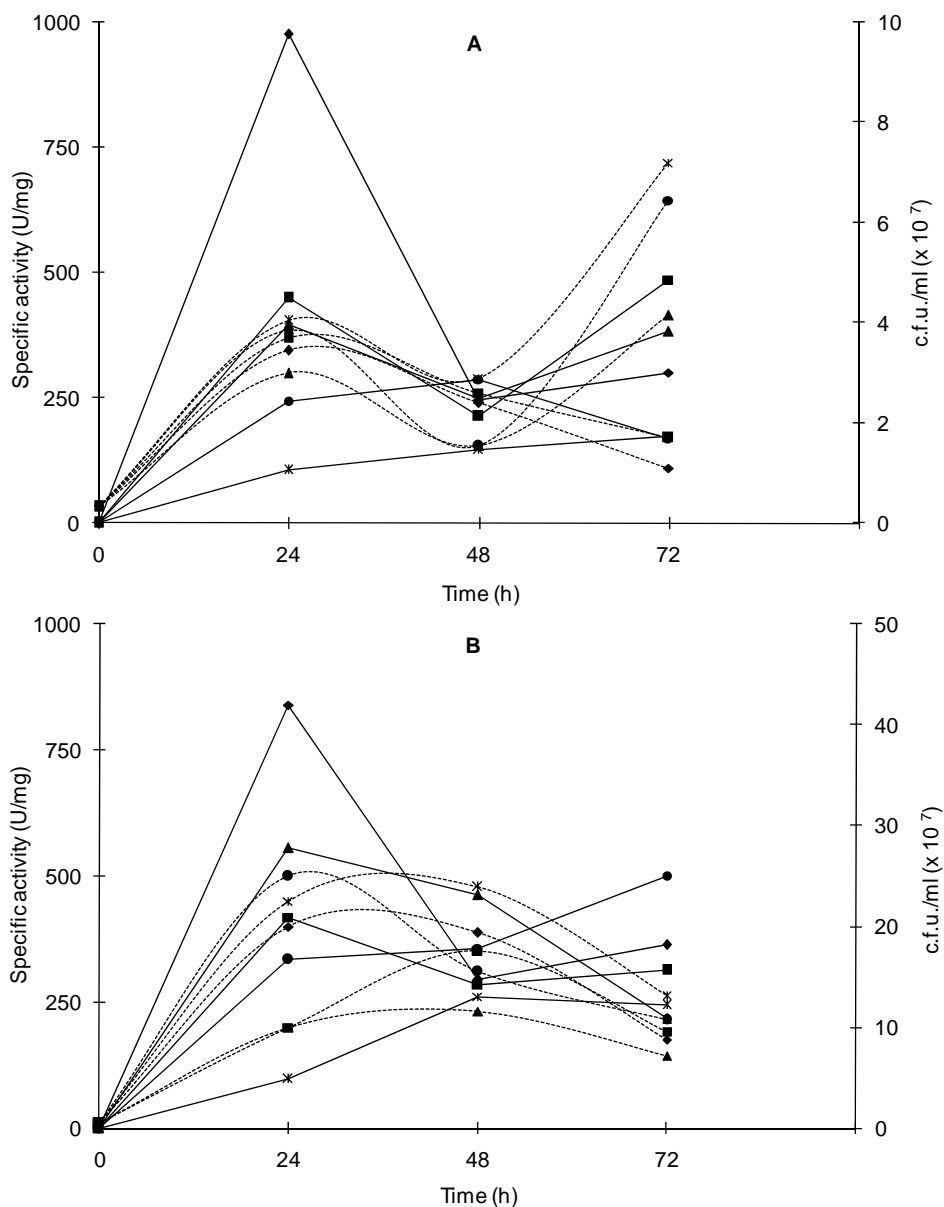


FIGURE 1 - Specific proteolytic activity (continuous line) and growth (discontinuous line) by *Bacillus* sp. UFLA 817CF (A) and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (B) cultivated during 72 h in nutrient broth (NB ◆), nutrient broth plus 0.01% (w/v) sodium caseinate (NBC ■), nutrient broth plus 0.01% (w/v) cheese whey powder (NBW₁ ▲), nutrient broth plus 0.1% (w/v) cheese whey powder (NBW₂ ●) and nutrient broth plus 1% (w/v) cheese whey powder (NBW₃ *).

Maximum protease activity was observed after 24 hours growth for both the microorganisms (Fig. 1a and 1b), a period that coincided with the end of the exponential phase (data not shown). The specific activity values were, respectively, 839.8 U/mg for *B. subtilis* ATCC 6633 and 975.9 U/mg for *Bacillus* sp. UFLA 817CF. Mehrotra *et al.* (1999) and Patel *et al.* (2006) studied alkaline protease production by *Bacillus* species isolated from soil and seawater respectively also obtained best results after 24 hours of cultivation.

The enzymatic activity observed in the NB, NBC and NBW₁ media decreased after 48 hours for the two isolates assessed in this study. However, an increase in the enzyme activity was observed when the microorganisms were cultivated in the NBW₂ and NBW₃ culture media. The increase in the activity in these two culture media after 48 hours may be associated to the catabolic repression in the first 24 hours of culture, because the culture media contained a higher concentration of cheese whey powder, which is a material rich in carbohydrates (75% w/w lactose) and proteins (13% w/w).

Excess protein may stimulate protein synthesis regulators of the GlnR (global nitrogen regulatory protein) type that repress the metabolic activity of *B. subtilis* (Fisher 1999). Regarding lactose, data in the literature states that *B. subtilis* cannot use it as a single carbon source, due to the deficiency in the transport and degradation systems. However, it has a *lacA* gene that can codify β -galactosidase in function of stress conditions (Stülke & Hillen 2000). This nutritional stress may justify the low enzymatic activity observed in the NBW₃ medium, containing 1% cheese whey powder (Fig. 1a and 1b). The proteolytic activity of the standard strain was less than that of the wild strain, 97.2 U/mg and 105.6 U/mg, respectively.

The growth pattern of the *Bacillus* sp. UFLA 817CF strain in the NBW₁, NBW₂ and NBW₃ culture media showed that the adaptation phase to the conditions of the culture medium also interfered in the population. Kumar *et al.*

(1999) observed that a concentration of 1% of cheese whey powder supplemented with organic and inorganic carbon sources and organic nitrogen sources presented a better response regarding alkaline protease activity. The presence of sodium caseinate and the cheese whey proteins used in this study did not stimulate an increase in the proteolytic activity. This result was also reported by Patel *et al.* (2006), when they used 0.5% (w/v) casein (partially hydrolyzed casein) and by Joo & Chang (2005) who added 1% casein as supplement in a chemically defined culture medium in *Bacillus* sp. culture. In a previous study these authors reported that the addition of 1% casein to supplement TSB medium, favored alkaline protease activity of a new *Bacillus* species by 30%, called *B. horikoshii* (Joo *et al.* 2002).

For the standard *B. subtilis* ATCC 6633 strain, the NBW₁ culture medium (Fig. 1b) induced greater enzymatic activity than the NBC culture medium (used as standard inducer) in 24 hours, respectively, 555.1 U/mg and 417.7 U/mg. There were no significant differences for the wild strain (Fig. 1a), in the same time, in the proteolytic activity between the NBW₁ and NBC culture media.

5.2 Enzyme assay in ammonium sulfate fractions

The supernatants obtained in the five media tested, from both the cultured microorganisms, were precipitated with ammonium sulfate at 40%, 60% and 80% saturation. To culture *Bacillus* sp. UFLA 817CF, the 60% saturation presented the best results from protease specific activity in all the growth culture media tested. Kim & Kim (2005) and Zvidzai & Zvauya (2001) also reported a greater enzymatic activity in the 60% ammonium sulfate fraction when they purified *B. subtilis* protease. The maximum enzymatic activity for *Bacillus* sp. UFLA 817CF was observed in the precipitation obtained from the

culture in NB culture medium (926.4 U/mg), while the lowest activity (437.4 U/mg) was reported in the NBW₃ medium (Table 1). This result, nevertheless, exceeded the best results obtained for *B. subtilis* ATCC 6633 culture at the three saturations tested (Table 1). It was also observed for *Bacillus* sp. UFLA 817CF, that the NB culture medium also presented greater proteolytic activity at the 40% and 80% fractions compared to the other culture media tested, 692.7 and 557.7 U/mg, respectively. in the NBW₂ (300.5 U/mg) and NBW₃ (296.0 U/mg) culture media. All samples from 80% saturation presented the lowest proteolytic activity values for both the microorganisms.

TABLE 1 - Partial purification of alkaline protease from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and from *Bacillus* sp. UFLA 817CF

<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633										
(NH ₄) ₂ SO ₄ saturation		40%			60%			80%		
Media	Total enzyme activity (U/ml)	Total proteins (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Total enzyme activity (U/ml)	Total proteins (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Total enzyme activity (U/ml)	Total proteins (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	
NB	59.03	0.258	228.7	111.15	0.414	268.7	78.25	0.552	141.7	
NBC	55.21	0.281	196.5	93.12	0.440	211.7	76.76	0.629	122.0	
NBW ₁	73.32	0.315	232.5	93.96	0.562	167.1	85.58	0.661	129.6	
NBW ₂	91.98	0.406	226.8	88.40	0.294	300.5	90.27	0.713	126.7	
NBW ₃	105.46	0.608	173.6	93.08	0.314	296.0	99.94	0.758	131.9	

To be continued...

TABLE 1 *Continue*

<i>Bacillus</i> sp. UFLA 817CF (wild type)										
(NH ₄) ₂ SO ₄ saturation		40%			60%			80%		
Media	Total enzyme activity (U/ml)	Total proteins (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Total enzyme activity (U/ml)	Total proteins (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Total enzyme activity (U/ml)	Total proteins (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	
NB	80.71	0.087	692.7	89.18	0.096	926.4	95.53	0.128	557.7	
NBC	84.27	0.152	415.3	87.98	0.159	553.4	99.19	0.162	459.4	
NBW ₁	90.34	0.170	398.6	92.10	0.185	497.2	102.85	0.211	365.4	
NBW ₂	94.00	0.188	374.6	93.08	0.200	465.2	106.51	0.239	333.6	
NBW ₃	91.59	0.206	334.2	96.78	0.221	437.4	113.74	0.289	295.6	

Data presents average of four replicates.

The fraction obtained with 60% saturation also presented best activity for the *Bacillus subtilis* ATCC6633 strain in most of the culture media tested (Table 1), except for the NBW₁ medium, where the highest proteolytic activity value, 232.5 U/mg, was observed in the 40% fraction. In the 60% saturation fractions, the greatest enzymatic activity values were observed

5.3 Effect of temperature and pH on enzyme activity and stability

The 60% saturation fractions with ammonium sulfate in the NB, NBC and NBW₁ culture media of both the microorganisms were tested for ideal pH and temperature for enzymatic activity. Relative activity was used to compare the cultures, regarding the best pH and temperature, taking as 100% the activity of *Bacillus* sp. UFLA 817CF in the NB culture medium (Table 1).

Figure 2a shows the results of the enzymatic activity in function of variation in pH, for both the microorganisms, in the three culture media that best represented specific activity. *Bacillus* sp. UFLA 817CF presented greater enzymatic activity at pH 9.0 in the three culture media tested.

In the fraction obtained from the NB culture medium, with greater activity, this strain maintained about 80% activity at pH 7.0 and over 60% at pH 11.0. This optimum activity at values close to 9.0 is characteristic of alkaline proteases (Rao *et al.* 1998; Kumar & Takagi 1999). Similar values were reported by Gessesse *et al.* (2003) and Giongo *et al.* (2007), when culturing *Bacillus* isolates and by Tremacoldi *et al.* (2007) when culturing *Aspergillus clavatus*. The highest proteolytic activity at pH 9.0 was observed when the fractions precipitated with ammonium sulfate were incubated at 40 °C for both the microorganisms in the three culture media tested (Fig. 2b).

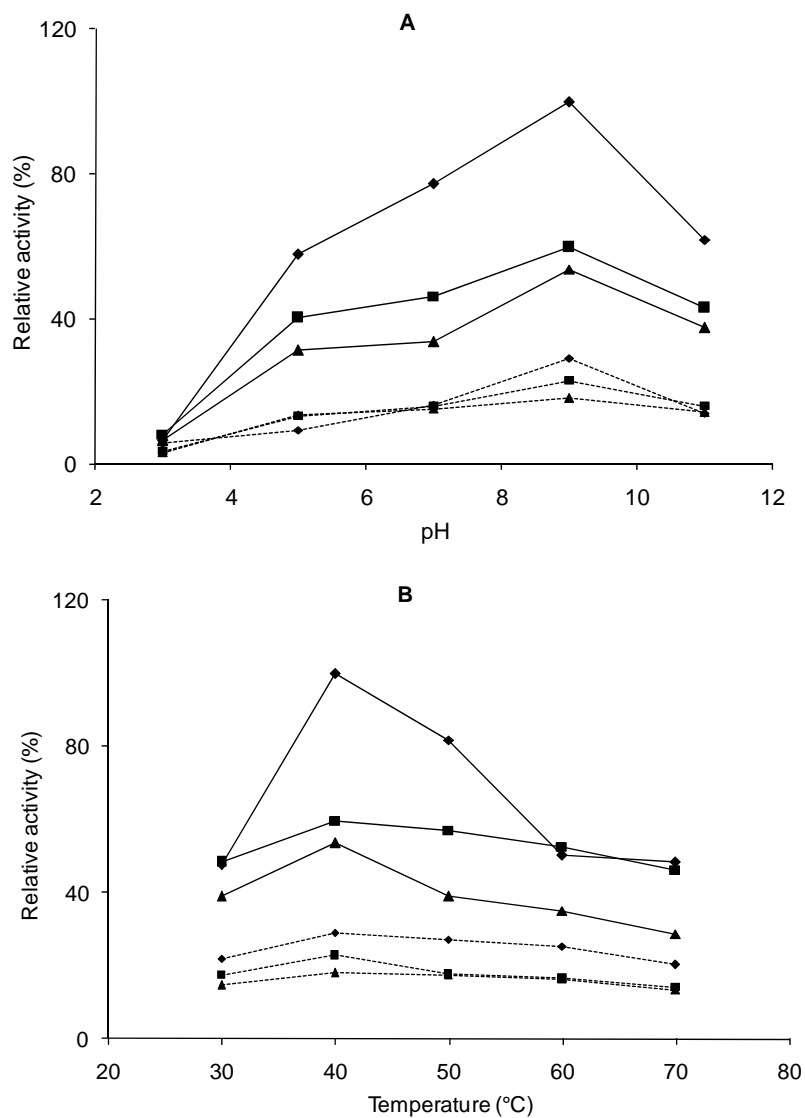


FIGURE 2 - Effect of pH (A) and temperature (B) on relative proteolytic activity in ammonium sulphate precipitate (60%) obtained from *Bacillus* sp. UFLA 817CF (continuous line) and *B. subtilis* ATCC 6633 (discontinuous line) growing on nutrient broth (NB ◆), nutrient broth plus 0.01% (w/v) sodium caseinate (NBC ■) and nutrient broth plus 0.01% (w/v) cheese whey powder (NBW₁ ▲).

Optimum alkaline protease activity at 40 °C was also detected by other authors when using *Bacillus* sp. strains (Singh *et al.* 2001; Joo *et al.* 2002). Stability was observed in the proteolytic activity in both the bacilli at the different pH values, and the best results were observed in *Bacillus* sp. UFLA 817CF culture. The residual activity of this strain, in the three culture media tested was close to 50% of the maximum at pH 5.0. At the values of pH 7.0 and 11.0, about 70% of residual activity was detected after incubation for 30 minutes at 37 °C (Fig. 3a).

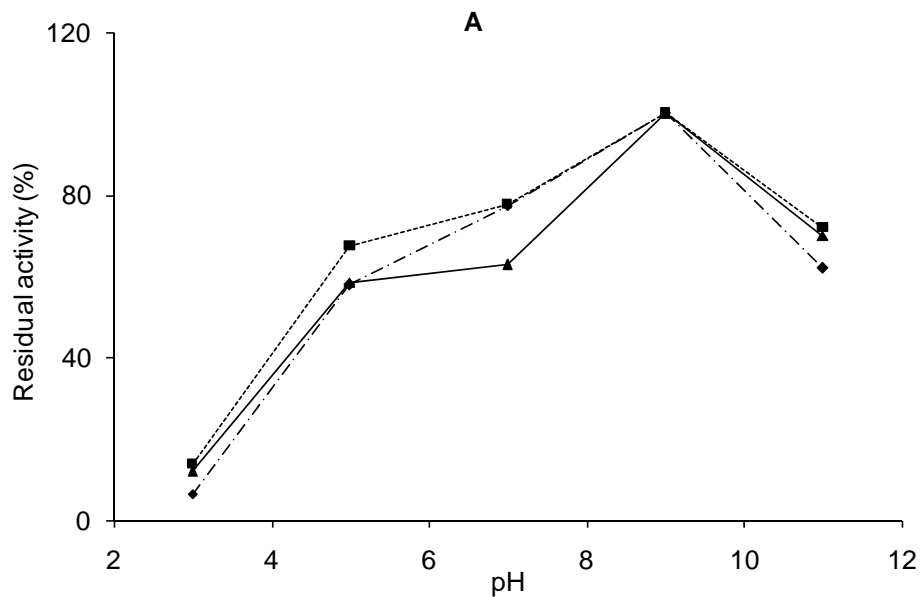


FIGURE 3A - Effect of pH on residual proteolytic activity in ammonium sulphate precipitates (60%) obtained from *Bacillus* sp. UFLA 817CF growing on nutrient broth (NB ◆), nutrient broth plus 0.01% (w/v) sodium caseinate (NBC ■) and nutrient broth plus 0.01% (w/v) cheese whey powder (NBW₁ ▲).

Greater variation in the culture of *B. subtilis* ATCC6633 was observed in the proteolytic activity in the culture media assessed. In this case the best performance was observed in the NBW₁ culture medium, where about 75%, 83% and 78% of the activity was maintained at pH 5.0, 7.0 and 11.0, respectively (Fig. 3b).

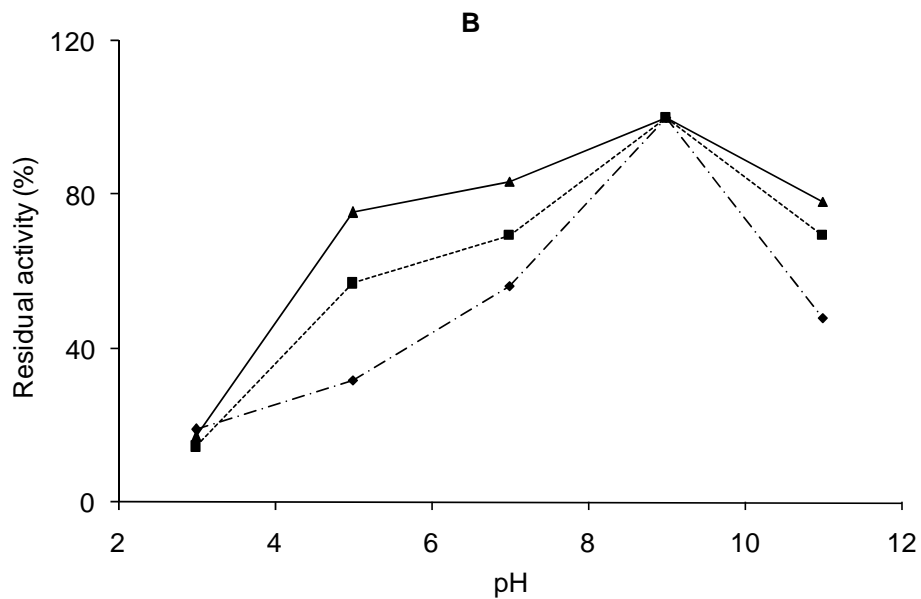


FIGURE 3B - Effect of pH on residual proteolytic activity in ammonium sulphate precipitates (60%) obtained from *B. subtilis* ATCC 6633 growing on nutrient broth (NB ♦), nutrient broth plus 0.01% (w/v) sodium caseinate (NBC ■) and nutrient broth plus 0.01% (w/v) cheese whey powder (NBW₁ ▲).

The temperature of 40 °C was observed as optimum for both the microorganisms in the three culture media (Fig. 4a and 4b). The residual proteolytic activity of *Bacillus* sp. UFLA 817CF cultivated in NBC culture

medium was maintained at temperatures of 50, 60 and 70 °C at values 95%, 88% and 77%, respectively, compared to the maximum activity at 40 °C (503.4U/mg) (Fig. 4a). Similar performance was detected in the enzymatic activity of the *B. subtilis* ATCC 6633 strain in the NB and NBW₁ culture media (Fig. 4b), where about 95%, 80% and 70% were maintained at the respective temperatures of 50, 60 and 70 °C of the maximum activity at 40 °C (268.7 U/mg for NB and 167.1 for NBW₁).

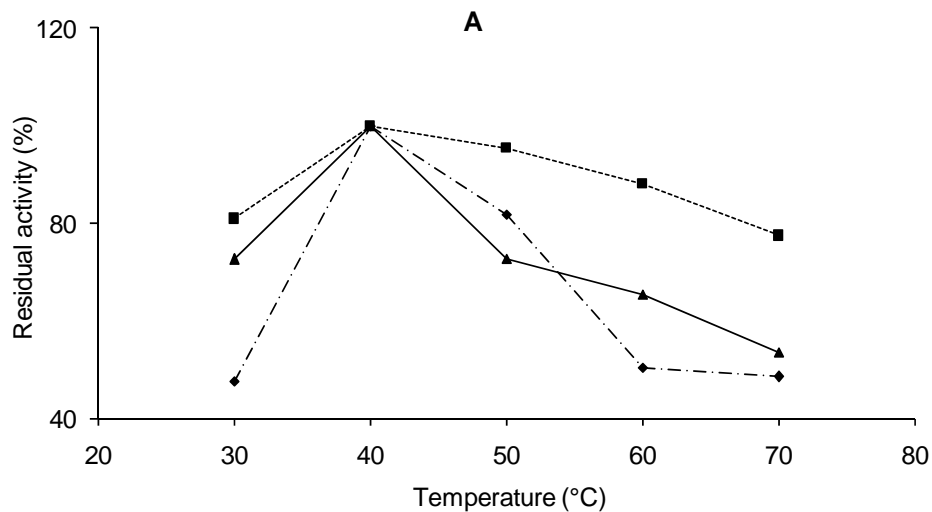


FIGURA 4A - Effect of temperature on residual proteolytic activity in ammonium sulphate precipitates (60%) obtained from *Bacillus* sp. UFLA 817CF growing on nutrient broth (NB ◆), nutrient broth plus 0.01% (w/v) sodium caseinate (NBC ■) and nutrient broth plus 0.01% (w/v) cheese whey powder (NBW₁ ▲).

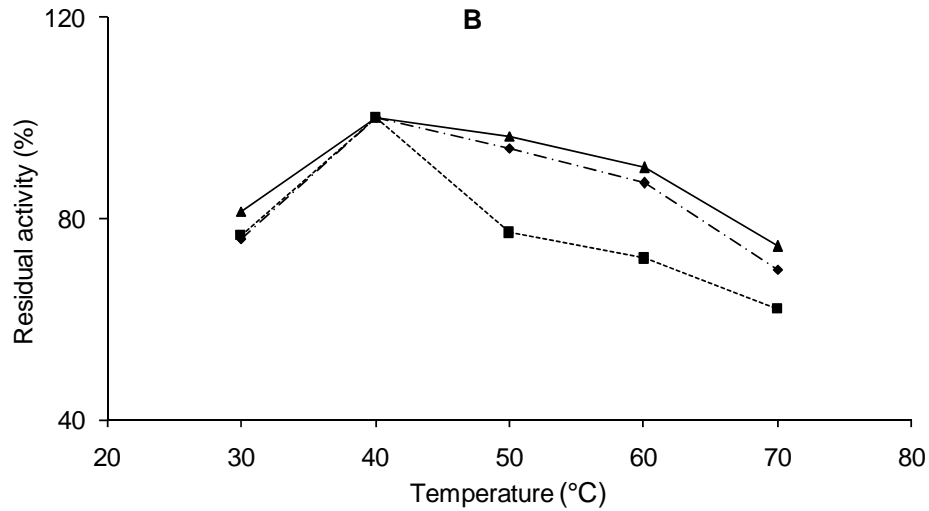


FIGURA 4B - Effect of temperature on residual proteolytic activity in ammonium sulphate precipitates (60%) obtained from *B. subtilis* ATCC 6633 (B) growing on nutrient broth (NB ◆), nutrient broth plus 0.01% (w/v) sodium caseinate (NBC ■) and nutrient broth plus 0.01% (w/v) cheese whey powder (NBW₁ ▲).

Stability at different temperatures and pH was verified in the NB medium for both the organisms, at the 60% saturation fraction with ammonium sulfate. The samples were incubated for 24 hours at the pH tested before proteolytic activity was determined at pH 9.0. There was stability at pH 7.0 for both the microorganisms and more than 90% of the activity was maintained (Fig. 5) at the optimum pH (9.0).

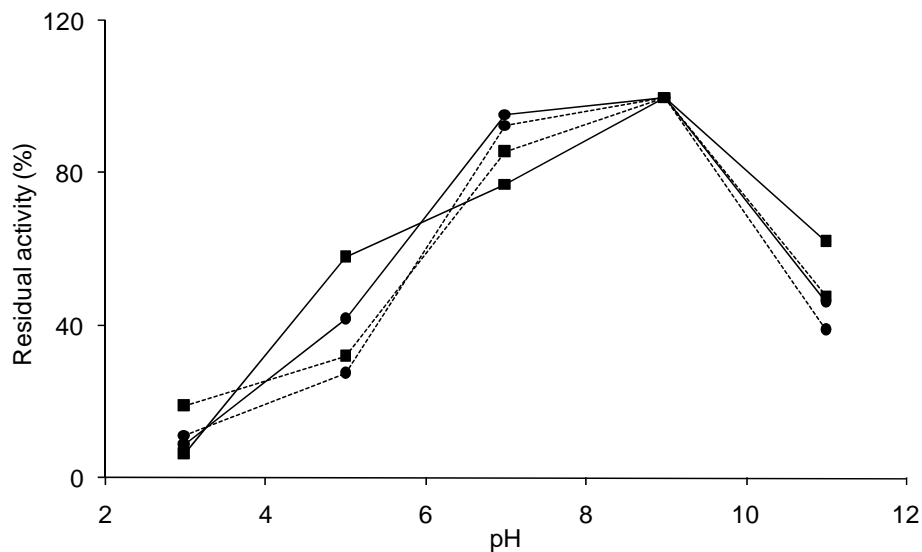


FIGURE 5 - Effect of pH on residual proteolytic activity (■) and stability (●) in ammonium sulphate precipitate (60%) obtained from *Bacillus* sp. UFLA 817CF (continuous line) and *B. subtilis* ATCC 6633 (discontinuous line) growing on nutrient broth.

The temperature stability of the enzyme was verified by incubating the samples at the tested temperatures for up to 120 minutes before assaying the proteolytic activity at 37 °C (Fig. 6). At the incubation temperature of 40°C, the proteolytic activity of the enzyme obtained from the *Bacillus* sp. UFLA 817CF culture presented 62% activity after a 120 minute incubation period in the same conditions that the *B. subtilis* ATCC 6633 enzyme presented 53% residual activity. At 50 °C the enzymes from the *Bacillus* sp. UFLA 817CF culture were more stable than those from the *B. subtilis* ATCC 6633 culture. At 60 °C it was observed that the *B. subtilis* ATCC 6633 culture presented greater enzymatic activity than the wild strain, but with a sharp loss in activity in the first 30 minutes of incubation for both the microorganisms (Fig. 6).

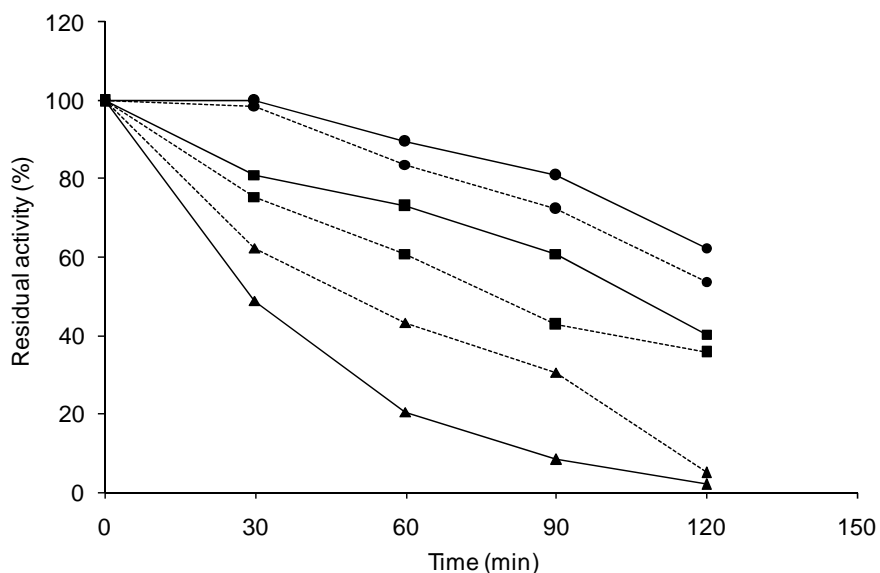


FIGURE 6 - Effect of temperature on residual proteolytic activity in ammonium sulphate precipitate (60%) obtained from *Bacillus* sp. UFLA 817CF (continuous line) and *B. subtilis* ATCC 6633 (discontinuous line), growing on nutrient broth, at 40 °C (●), at 50 °C (■) and at 60 °C (▲).

The precipitates obtained from saturation with 60% ammonium sulfate in the NB media for both the bacilli were characterized in polyacrylamide gel. Bands were detected between the 30 kDa and 45 kDa standards in both the cultures, approximately 36 kDa for the protease of the wild strain and 40 kDa for the standard *B. subtilis* ATCC 6633 strain. The bands observed were close to the band of protease molecular mass that in general, ranged between 15 and 45 kDa (Kumar & Takagi 1999; Gupta *et al.* 2002b). Zvidzai & Zvauya (2001) detected a similar band in a precipitated sample derived from saturation with 60% ammonium sulfate when they cultured a new species of *Bacillus*.

Based on the results in this study, the wild *Bacillus* sp. UFLA 817CF strain isolated in coffee beans was a potential producer of alkaline protease when cultivated either in nutrient broth or in other culture media tested. The NBW₁ culture presented good alkaline protease production, and was superior or equivalent to the culture medium with addition of sodium caseinate. This opens perspectives for use of cheese whey powder, an effluent of the dairy industry and therefore an inexpensive source, as protease synthesis inducer, and for new research to optimize growth culture media based on cheese whey powder. The protease obtained from culture of wild strain *Bacillus* sp. UFLA 817CF presented stability at pH 7.0 and considerable heat stability at 40 °C and 50°C, and could be an alternative for the various industrial sectors to produce proteolytic enzymes using cheese whey.

Acknowledgements

The authors are grateful to ProLacteos Dairy Industry, Contagem, MG, for financial support and for providing cheese whey powder.

6 References

Anwar A, Saleemuddin M (1998) Alkaline proteases: a review. *Bioresour Technol* 64:175-183

Bradford 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

Çalik P, Bilir E, Çalik G, Özdamar TH (2002) Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb Technol* 31:685-697

Capitani CD, Pacheco MTB, Gumerato HF, Vitali A, Schmidt FL (2005) Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo (Milk whey protein recuperation by coacervation with polysaccharide). *Braz J Agric Res* 40:1123-1128

Carreira RL, de Marco LM, Dias DR, Morais HA, Silvestre MPC (2004) Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm Bonaer* 23:17-25

Champagne CP, Goulet J, Lachance RA (1990) Production of bakers' yeast in cheese whey ultrafiltrate. *Appl Environ Microbiol* 56:425-430

Ellouz Y, Bayouh A, Kammoun S, Gharsallah N, Nasri M (2001) Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. *Bioresour Technol* 80:49-51

Fisher SH (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence. *Mol Microbiol* 32:223-232

Gessesse A (1997) The use of nug meal as a low-cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresour Technol* 62:59-61

Gessesse A, Hatti-Kaul R, Gashe BA, Mattiasson B (2003) Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microb Technol* 32:519-524

Ghaly AE, Kamal M, Avery A (2003) Influence of temperature rise on kinetic parameters during batch propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey under ambient conditions. *World J Microbiol Biotechnol* 19 (7):741-749

Giongo JL, Lucas FS, Casarin F, Heeb F, Brandelli A (2007) Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J Microbiol Biotechnol* 23:375-382

Gupta R, Beg QK, Lorenz, P (2002a) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:15-32

Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B (2002b) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:381-395

Hadj-Ali NE, Agrebi R, Ghorbel-Frikha B, Sellami-Kamoun A, Kanoun S, Nasri M (2007) Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme Microb Technol* 40:515-523

Hanson RS, Blicharska J, Szulmajster J. (1964) Relationship between the tricarboxylic acid cycle enzymes and sporulation of *Bacillus subtilis*. *Biochem Biophys Res Commun* 17:1-7

Harwood CR (1992) *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol* 10:247-256

Hinman RL (1994) The changing face of the fermentation industry. *Chemtech* 24(6):45-48.

Horikoshi K (1999) Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:735-750

Ito S, Kobayashi T, Ara K, Ozaki K, Kawai S, Hatada Y (1998) Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles* 2:185-190

Johnvesly B, Naik GR (2001) Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochem* 37:139-144.

Joo HS, Chang CS (2005) Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochem* 40:1263-1270

Joo HS, Kumar CG, Park GC, Kim TK, Paik SR, Chang CS (2002) Optimization of the production of an extra cellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem* 38:155-159

Joo HS, Kumar CG, Park GC, Paik SR, Chang CS (2003) Oxidant and SDS stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. *J Appl Microbiol* 95:267-72

Kalisz HM (1988) Microbial proteinases. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 36:1-65

Kawahara H, Obata H (1998) Production of xanthan gum and ice-nucleating material from whey by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49 :353-358

Kim WJ, Kim SM (2005) Purification and characterization of *Bacillus subtilis* JM-3 protease from anchovy sauce. *J Food Biochem* 29:591-610

Kumar CG, Parrack P (2003) Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World J Microbiol Biotechnol* 19:757-762

Kumar CG, Takagi H (1999) Microbial alkaline proteases: from a bio-industrial viewpoint. *Biotechnol Adv* 17:561-594

Kumar CG (2002) Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett Appl Microbiol* 34:13-17

Kumar CG, Malik RK, Tiwari MP, Jany KD (1999) Optimal production of *Bacillus* alkaline protease using a cheese whey medium. *Microbiol Alim Nutrit* 17:39-48

Kumar D, Bhalla, TC (2005) Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Appl Microbiol Technol* 68:726-736

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

Mehrotra S, Pandey PK, Gaur R, Darmwal NS (1999) The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresour Technol* 67:201-203

Pastor MD, Lorda GS, Balatti A (2001) Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Braz J Microbiol* 32:6-9

Patel RK, Dodia MS, Joshi RH, Singh SP (2006) Production of extracellular halo-alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from seawater in Western India. *World J Microbiol Biotechnol* 22:375-382

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:597-635

Razak NA, Samad MYA, Barsi M, (1994) Thermostable extracellular protease of *Bacillus stearothermophilus* – factors affecting its production. *World J Microbiol Biotechnol* 10:260-263

Sarvas M, Harwood CR, Bron S, van Dijl JM (2004) Post-translational folding of secretory protein in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694:311-327

Scopes R (1994) *Protein purification: principles and practice*, 3rd edn. New York: Springer-Verlag

Silva CF, Schwan RF, Dias ES, Wheals AE (2000) Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *Int J Food Microbiol* 60:251-260

Singh J, Batra N, Sobti RC (2001) Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem* 36:781-785

Siso MIG (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour Technol* 57:1-11

Soares RL, Capobiango M, Biasutti EAR, Silvestre MPC (2007) Enzyme-catalyzed production of oligopeptides from skim milk. *Food Biotechnol* 21:45-56

Stülke J, Hillen W (2000) Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu Rev Microbiol* 54:849-880

Takami H, Kobayashi T, Aono R, Horikoshi K (1992) Molecular cloning, nucleotide-sequence and expression of the structural gene for a thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:101-108

Tremacoldi CR, Carmona EC (2005) Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. *World J Microbiol Biotechnol* 21:169-172

Tremacoldi CR, Monti R, Selistre-de-Araujo HS, Carmona EC (2007) Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*. *World J Microbiol Biotechnol* 23:295-299

Wit JN (1998) Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J Dairy Sci* 81:597-608

Yang JK, Shih IL, Tzeng YM, Wang SL (2000) Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme Microb Technol* 26:406-413

Zvidzai CJ, Zvauya R (2001) Purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus subtilis* CHZ1 isolated from a zimbabwean hot spring. *J Food Biochem* 25:1-13

CAPÍTULO 3

DIGESTIBILIDADE PROTÉICA *IN VITRO* DE FARINHAS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) PRÉ-TRATADAS COM PROTEASE COMERCIAL E PROTEASE DE *Bacillus* sp.

1 RESUMO

DIAS, Disney Ribeiro. **Digestibilidade protéica *in vitro* de farinhas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pré-tratadas com protease comercial e protease de *Bacillus* sp.** Lavras: UFLA, 2007, 131 p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos) ⁵.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento básico na refeição do brasileiro, constituindo uma das principais fontes protéicas da dieta, além de fornecer outros macronutrientes e minerais. Apesar da considerável concentração de proteínas no feijão, este alimento é considerado de baixo valor biológico, quando comparado a proteínas animais e outras fontes protéicas vegetais. Visando melhorar a disponibilidade protéica do feijão, foram realizados tratamentos enzimáticos em quatro cultivares de feijão (ON; OPNS, TAL e VC3). O delineamento foi inteiramente casualizado, em fatorial 4X3 (quatro cultivares e três tratamentos: testemunha, sem protease; hidrolisado 1, adição de protease comercial; hidrolisado 2, adição de protease de *Bacillus* sp.) com 4 repetições. A concentração de proteínas totais (g/100 g de matéria seca) nas amostras variou de 16,94% a 18,06%, enquanto a concentração de fenólicos totais esteve entre 0,78% e 1,12% (g Eq. ácido tânico/100 g de matéria seca). A digestibilidade protéica *in vitro* na farinha não tratada enzimaticamente (testemunha) variou entre 47,30% e 56,17%, em relação à digestibilidade da caseína. As concentrações de P, K, Ca, Mg, S e Zn, observadas nas quatro cultivares testadas, se encontram dentro dos valores médios disponíveis na literatura. No tratamento com protease de *Bacillus* sp. houve diminuição nos teores de Cu e Mn. O teor médio de Fe aumentou nas farinhas tratadas enzimaticamente, chegando ao incremento máximo de 102% para a farinha da cultivar TAL tratada com protease de *Bacillus* sp. A digestibilidade de todas as farinhas testadas aumentou significativamente ($p < 0,05$), em função do tratamento enzimático. A maior variação foi observada na cultivar OPNS, cujos valores, respectivamente, para a testemunha e protease de *Bacillus* sp., foram 54,4% e 81,6%.

⁵ Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Orientadora), Celeste Maria Patto de Abreu – DQI/UFLA (Co-Orientadora)

2 ABSTRACT

DIAS, Disney Ribeiro. ***In vitro* protein digestibility of enzymatically pre-treated bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour using commercial protease and *Bacillus* sp. protease.** Lavras: UFLA, 2007, 131 p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos) ⁶.

The common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are a staple food for Brazilian diet, which represent the major source of dietary protein, and other micronutrients and minerals. Despite the considerable concentration of protein in beans, the food is considered of low biological value when compared to animal proteins and other plant protein sources. To improve the availability of protein in beans, enzymatic treatments were performed in four cultivars (ON, OPNS, TAL and VC3). The approach was completely randomized design with four replicates. It was used a 4 x 3 factorial arrangement (four cultivars and three treatments; treatment 1: addition of commercial protease and treatment 2: addition of protease from *Bacillus* sp., treatment 3: control without enzyme). The concentration of total protein (g/100 g of dry matter) in the samples ranged from 16.94% to 18.06%, while the concentration of total phenolics was between 0.78% and 1.12% (g Eq. tanic acid / 100 g dry matter). The *in vitro* protein digestibility in beans flour untreated enzymatically (control) ranged between 47.30% and 56.17% on the digestibility of casein. Concentrations of P, K, Ca, Mg, Zn observed in the four cultivars tested were within the average values available in the literature. Treatment 2 with protease from *Bacillus* sp. induced decrease in levels of Cu and Mn. It was observed that the average of Fe content increased in all beans flour when treated with proteases, reaching the maximum increase of 102% in the TAL flour treated with protease from *Bacillus* sp. The digestibility of all beans tested was significantly increased ($p < 0.05$) as function of enzyme treatment, being the greater variation observed in the cultivar OPNS treated with protease from *Bacillus* sp., which values were 81.6% while the control treatment was 54.4%.

⁶ Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Major Professor), Celeste Maria Patto de Abreu – DQI/UFLA

**DIGESTIBILIDADE PROTÉICA *IN VITRO* DE FARINHAS DE FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris* L.) PRÉ-TRATADAS COM PROTEASE
COMERCIAL E PROTEASE DE *Bacillus* sp.**

***In vitro* protein digestibility of enzymatically pre-treated bean (*Phaseolus vulgaris*) flour using commercial protease and *Bacillus* sp. protease**

(Preparado de acordo com as normas da revista *Ciência e Tecnologia de Alimentos* – artigo submetido)

Disney Ribeiro DIAS ^{1,2}, Celeste Maria Patto de ABREU ³, Rosane Freitas
SCHWAN ^{4*}

Recebido para publicação em

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (Doutorado), Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras/UFLA.

² Centro Universitário de Lavras/UNILAVRAS. Rua Padre José Poggel, 506, Centenário. Lavras, MG, Brasil. 37200-000

³ Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras/UFLA. C.P. 3037; Lavras, MG, Brasil. 37200-000

⁴ Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/UFLA. C.P. 3037; Lavras, MG, Brasil. 37200-000. E-mail: rschwan@ufla.br

* A quem a correspondência deve ser enviada

RESUMO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um alimento básico na refeição do brasileiro, constituindo uma das principais fontes protéicas da dieta, além de fornecer outros macronutrientes e minerais. Apesar da considerável concentração de proteínas no feijão, este alimento é considerado de baixo valor biológico, quando comparado a proteínas animais e a outras fontes protéicas vegetais. Visando melhorar a disponibilidade protéica do feijão, foram realizados tratamentos enzimáticos em quatro cultivares de feijão (ON; OPNS, TAL e VC3). O delineamento foi inteiramente casualizado, em fatorial 4X3 (quatro cultivares e três tratamentos: testemunha, sem protease; hidrolisado 1, adição de protease comercial; hidrolisado 2, adição de protease de *Bacillus* sp.) com 4 repetições. A concentração de proteínas totais (g/100 g de matéria seca) nas amostras variou de 16,94% a 18,06%, enquanto a concentração de fenólicos totais esteve entre 0,78% e 1,12% (g Eq. ácido tânico/100 g de matéria seca). A digestibilidade protéica *in vitro* na farinha não tratada enzimaticamente (testemunha) variou entre 47,30% e 56,17%, em relação à digestibilidade da caseína. As concentrações de P, K, Ca, Mg, S e Zn observadas nas quatro cultivares testadas se encontram dentro dos valores médios disponíveis na literatura. No tratamento com protease de *Bacillus* sp. houve diminuição nos teores de Cu e Mn. O teor médio de Fe aumentou nas farinhas tratadas enzimaticamente, chegando ao incremento máximo de 102% para a farinha da TAL tratada com protease de *Bacillus* sp. A digestibilidade de todas as farinhas testadas aumentou significativamente ($p < 0,05$) em função do tratamento enzimático. A maior variação foi observada na cultivar OPNS, cujos valores, respectivamente, para a testemunha e protease de *Bacillus* sp., foram 54,4% e 81,6%.

Palavras-chave: farinha de feijão; hidrólise enzimática; protease alcalina.

IN VITRO PROTEIN DIGESTIBILITY OF ENZYMATICALLY PRE-TREATED BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) FLOUR USING COMMERCIAL PROTEASE AND *Bacillus* sp. PROTEASE

ABSTRACT

The common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are a staple food for Brazilian diet, which represent the major source of dietary protein, and other micronutrients and minerals. Despite the considerable concentration of protein in beans, the food is considered of low biological value when compared to animal proteins and other plant protein sources. To improve the availability of protein in beans, enzymatic treatments were performed in four cultivars (ON, OPNS, TAL and VC3). The approach was completely randomized design with four replicates. It was used a 4 x 3 factorial arrangement (four cultivars and three treatments; treatment 1: addition of commercial protease and treatment 2: addition of protease from *Bacillus* sp., treatment 3: control without enzyme). The concentration of total protein (g/100 g of dry matter) in the samples ranged from 16.94% to 18.06%, while the concentration of total phenolics was between 0.78% and 1.12% (g Eq. tanic acid / 100 g dry matter). The *in vitro* protein digestibility in beans flour untreated enzymatically (control) ranged between 47.30% and 56.17% on the digestibility of casein. Concentrations of P, K, Ca, Mg, Zn observed in the four cultivars tested were within the average values available in the literature. Treatment 2 with protease from *Bacillus* sp. induced decrease in levels of Cu and Mn. It was observed that the average of Fe content increased in all beans flour when treated with proteases, reaching the maximum increase of 102% in the TAL flour treated with protease from *Bacillus* sp. The digestibility of all beans tested was significantly increased ($p < 0.05$) as function of enzyme treatment, being the greater variation observed in the cultivar OPNS treated with protease from *Bacillus* sp., which values were 81.6% while the control treatment was 54.4%.

Key words: bean flour; enzymatic hydrolysis; alkaline protease.

3 INTRODUÇÃO

As leguminosas são ricas em macro e micronutrientes e têm sido utilizadas, por vários povos, como fonte de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes legumes, sendo considerada a principal fonte protéica na dieta de muitos países latino-americanos, em especial o Brasil^{16,29}.

A concentração de proteínas no feijão comum varia entre 15% a 25%, podendo, algumas cultivares apresentarem até 36% deste macronutriente. O teor de carboidratos varia de 40% a 60%, predominando amido (até 45% do total de carboidratos), outros polissacarídeos (fibras) e, em menor proporção, oligossacarídeos^{30,39,41}.

O feijão é boa fonte de minerais, com destaque para o ferro (Fe). Este metal participa de diversas e fundamentais atividades metabólicas. Está associado ao grupamento porfirina para compor o heme, o qual está presente na hemoglobina, na mioglobina, na catalase e em outras enzimas oxidorreduções, responsáveis, entre outras funções, pelo processo de respiração aeróbica³. O Fe ligado ao grupo heme e presente em complexos ferro-enxofre é abundante nas proteínas de origem animal, enquanto o Fe não ligado ao grupo heme, Fe inorgânico, está presente em tecidos animais e vegetais. Com relação à absorção, o ferro hêmico é melhor absorvido, comparado ao ferro não hêmico^{5,6,8}.

A quantidade de Fe requerida diariamente, considerando a absorção intestinal, pelo organismo humano, é baixa. Varia de 1,0 mg/kg, para homens, a 1,3 mg/kg, em média, para mulheres e adolescentes^{5,8}. Entretanto, de acordo com informações da Organização Mundial de Saúde, a anemia por deficiência de Fe (anemia ferropriva) acomete cerca de 25% da população mundial, prevalecendo na população feminina e infantil⁴².

A absorção de Fe presente em leguminosas é baixa em relação ao ferro hêmico e parece estar comprometida pelo tipo de interação do metal com a matriz protéica e polissacarídica presente nos feijões. Além disso, a interação de Fe com outras moléculas, como fitatos, oxalatos e compostos fenólicos, considerados fatores antinutricionais, também promove a diminuição da disponibilidade e da conseqüente absorção de Fe^{20,25,31}. Estas moléculas estão correlacionadas, por meio de um mecanismo reacional ainda não muito claro, com a baixa digestibilidade das proteínas do feijão e sua baixa disponibilidade de Fe. Isso faz com que o feijão seja considerado um alimento protéico de baixo valor biológico, comparado com proteínas animais e outras proteínas vegetais^{11,23,36}.

A melhoria do valor biológico das proteínas do feijão tem sido alvo de estudos de diversos pesquisadores. O melhoramento genético de cultivares que apresentem maior digestibilidade protéica e menor teor de fatores antinutricionais, e o pré-tratamento das sementes de feijão por cocção e embebição, entre outros, têm sido empregados^{30,40,46}.

A hidrólise enzimática de proteínas é uma alternativa ao processo de melhoria de qualidade e propriedades funcionais destas moléculas e tem sido empregada com diversas finalidades na indústria de alimentos^{1,10,33}. As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise de soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes, hidrólise de caseína e na melhoria da textura de queijos, aumentando, assim, a qualidade e o valor nutricional dos produtos^{19,33,35}.

Com a finalidade de promover melhoria da digestibilidade protéica *in vitro* das farinhas de feijão, as mesmas foram submetidas a dois tratamentos: (i) pré-hidrólise com protease comercial (Trypsin DIFCO), codificado como hidrolisado 1 e (ii) pré-hidrólise com protease obtida¹³ do cultivo de *Bacillus* sp. UFLA 817CF a 60% de saturação com (NH₄)₂SO₄, codificado como hidrolisado

2. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos na farinha bruta, sem hidrólise prévia com protease (testemunha).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivares de feijão

As cultivares de feijão Ouro Negro (preto), OP-NS-331 (bege com rajadas marrons), Talismã (bege com rajadas marrons) e VC-3 (bege-claro com poucas rajadas marrons) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Magno Antonio Patto Ramalho (Banco de Germoplasmas do Setor de Genética e Melhoramento de Plantas – Departamento de Biologia/Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais). As farinhas foram codificadas como ON (Ouro Negro), OPNS (OP-NS-331), TAL (Talismã) e VC3 (VC-3).

Os feijões foram previamente selecionados, limpos, secos em estufa, a 40°C, por 24 horas e moídos em moinho tipo Willye, em peneira mesh 30. Da moagem foram obtidas duas frações: farinha (praticamente constituída de cotilédone) e farelo (fração retida na moagem e constituída, principalmente, do tegumento dos feijões e não utilizada neste experimento). As farinhas de feijão obtidas foram embaladas e armazenadas sob resfriamento, a -20°C, para análises posteriores.

4.2 Hidrólise enzimática das farinhas de feijão

Para a obtenção dos hidrolisados protéicos a partir das farinhas de feijão, etapa de pré-hidrólise, 20 g das amostras foram solubilizadas em 80 mL de água destilada para favorecer o contato enzima-substrato. As condições de hidrólise, tanto para a protease comercial quanto para a protease de *Bacillus* sp., foram as seguintes: 150 rpm, durante 5 horas, a 28°C e relação enzima-substrato de 5% (referente à quantidade de proteína em cada amostra de farinha). O pH da solução de farinha variou de acordo com a especificidade de cada enzima. Foi corrigido para 7,0, no tratamento com protease comercial, ou 9,0, quando

utilizada protease de *Bacillus* sp., utilizando-se NaOH 0,01N. Decorrido o tempo de hidrólise, as amostras de farinha foram congeladas e liofilizadas.

4.3 Análises nas farinhas de feijão

Os hidrolisados protéicos liofilizados das quatro cultivares de feijão, obtidos no item anterior utilizando-se protease comercial e protease de *Bacillus* sp., bem como o grupo testemunha (farinhas não hidrolisadas), foram tomados para análises de proteínas, umidade, minerais, cinzas, digestibilidade protéica *in vitro* e fenólicos totais.

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método microkjeldahl, conforme AOAC⁴. Os teores de cinzas foram determinados pelo método gravimétrico, baseado na determinação da perda de peso do material submetido a aquecimento a 550 °C e a determinação da umidade das farinhas foi conduzida em estufa a 105 °C⁴. A quantificação dos minerais foi feita segundo MALAVOLTA, VITTI e OLIVEIRA²⁷. Os extratos das amostras foram obtidos por digestão nitroperclórica. Foram determinados P e S por colorimetria; Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrofotometria de absorção atômica e K por fotometria de chama.

A determinação de fenólicos totais foi realizada conforme metodologia descrita por SWAIN e HILLIS⁴³. Para o preparo do reagente de Folin-Denis e da solução saturada de Na₂CO₃, foi utilizado protocolo da AOAC⁴. Para a extração dos compostos fenólicos foi empregada metodologia proposta por HAGERMAN e BUTLER²², sendo as amostras de farinha e dos hidrolisados colocadas em solução de metanol 80% (v/v), em banho-maria, a 80 °C, com refluxo, por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e evaporado em banho-maria, diluído em água e filtrado para a quantificação. O ácido tânico foi utilizado como padrão e os resultados expressos em % de equivalentes de ácido tânico (g Eq. ác. tânico/100 g de amostra).

A digestibilidade protéica *in vitro* foi determinada segundo AKESSON e STAHMANN². As amostras (farinhas e hidrolisados, com teor de nitrogênio conhecido) foram digeridas com pepsina e pancreatina, em seus pH ótimos de ação. A reação foi interrompida adicionando-se ácido tricloroacético a 10%. Após centrifugação, o nitrogênio no sobrenadante foi dosado. A digestibilidade encontrada para caseína foi tomada como padrão e seu valor considerado como 100%. Os valores de digestibilidade protéica *in vitro* das farinhas e dos hidrolisados foram corrigidos em relação à digestibilidade da caseína e os resultados expressos em porcentagem em base seca.

Para a comparação entre farinhas e hidrolisados foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, em esquema fatorial 4x3 (quatro cultivares de feijão, três tratamentos – testemunha e duas enzimas). Foi realizada ANAVA com os dados obtidos e teste de Tukey ($p < 0,05$) nos parâmetros significativos, empregando-se o software Sisvar 5.0¹⁵.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química das farinhas de feijão

O percentual de proteína total das farinhas não tratadas enzimaticamente, obtidas das cultivares testadas (ON, OPNS, TAL e VC3), variou de 16,94 g/100g a 18,06 g/100g, com base na matéria seca (Tabela 1). Estes valores são compatíveis com os descritos na literatura^{40,41} para feijões comuns.

A cultivar ON apresentou os maiores percentuais de proteínas (18,06%) e cinzas (4,47%). Nesta cultivar também foram observados os menores valores de fenólicos totais (0,78) e umidade (6,08). Não houve diferenças estatísticas, a 5% de significância, no teor de cinzas entre as cultivares OPNS, TAL e VC3. Com relação às proteínas totais, ON e TAL não apresentaram diferenças significativas entre si e foram superiores aos valores encontrados para as cultivares VC3 e OPNS. A umidade das amostras variou de 6,1% a 9,5% (Tabela 1).

O teor de fenólicos totais encontrado esteve entre 0,78% e 1,12% de equivalentes de ácido tânico (g/100g). ESPINOSA-ALONSO et al.¹⁴, estudando cultivares de feijões comuns mexicanos e MESQUITA et al.³⁰, ao estudarem feijões cultivados no Sul de Minas Gerais, encontraram valores de fenólicos totais semelhantes aos observados neste trabalho e que se encontram entre os valores descritos previamente na literatura^{26,29}. A quantidade de fenólicos totais na cultivar TAL (1,10%) não diferiu estatisticamente do maior valor encontrado para este parâmetro, observado na cultivar OPNS (1,12%). Esta cultivar apresentou o menor valor de proteínas totais (16,94%), estatisticamente equiparado ao valor encontrado na cultivar VC3 (17,00%).

A digestibilidade protéica *in vitro* das farinhas não tratadas enzimaticamente variou em função da cultivar, sendo observado menor valor

para a cultivar VC3 (47,30%) e maior valor para a cultivar TAL (56,17%). A digestibilidade pode variar entre 40% e 80%, dependendo da cultivar, das condições de cultivo e do pré-tratamento do feijão (cocção, branqueamento, hidratação, irradiação, adição de sais)^{20,28,40,46}.

Vários trabalhos descrevem o efeito antinutricional de compostos fenólicos sobre a qualidade biológica das proteínas de feijão por prejudicarem a digestibilidade das mesmas^{9,21,23,34}. A partir dos resultados observados nos valores de digestibilidade e fenólicos totais das farinhas testadas no presente trabalho, verificou-se que não houve correlação negativa entre os dois parâmetros. Isso porque a cultivar VC3 apresentou o menor valor de digestibilidade protéica *in vitro* e também a menor concentração de fenólicos totais. Resultados semelhantes foram observados por MESQUITA et al.³⁰, o que pode ser justificado pela baixa relação fenólicos/proteína (m/m), como observado por PINO e LAJOLO³⁶. De acordo com estes autores, a diminuição da digestibilidade ocorre a partir de relações fenólicos/proteínas totais da ordem de 5/20 (m/m), ou seja, 5 g de fenólicos para cada 20 g de proteínas.

A relação máxima de fenólicos/proteínas observada nos resultados das quatro cultivares avaliadas foi de, aproximadamente, 1/17, para a cultivar OPNS (Tabela 1), o que pode justificar a não interferência de fenólicos totais nos valores de digestibilidade protéica *in vitro* encontrados neste trabalho.

TABELA 1 Características químicas e bioquímicas das farinhas das quatro cultivares de feijão (testemunha) *

Farinha	Proteínas (%)	Digestibilidade ¹ (%)	Fenólicos totais (%) ²	Umidade (%)	Cinzas (%)
ON	18,06 a	51,62 ab	0,78 b	6,08 c	4,47 a
OPNS	16,94 b	54,36 ab	1,12 a	8,70 b	3,77 b
TAL	18,04 a	56,17 a	1,10 a	9,35 a	3,82 b
VC3	17,00 b	47,30 b	0,80 b	9,45 a	3,80 b

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05). ¹Valores corrigidos em relação à digestibilidade da caseína, considerada como 100% digerível. ² Em g de Eq. de ácido tânico/100 g de matéria seca. Obs.: ON (Ouro Negro), OPNS (OP-NS-331), TAL (Talismã) e VC3 (VC-3).

5.2 Hidrolisados protéicos obtidos das farinhas de feijão

A análise de variância dos dados obtidos para os parâmetros proteínas totais e fenólicos totais mostrou não haver interação significativa, a 5% de significância, do tratamento enzimático, seja com protease comercial ou com protease de *Bacillus* sp., com as farinhas de feijão obtidas das diferentes cultivares.

Para as quatro cultivares avaliadas (ON, OPNS, TAL e VC3), quando observados os dados de minerais (Tabela 2), nos três tratamentos (testemunha, sem protease; hidrolisado 1, protease comercial e hidrolisado 2, protease de *Bacillus* sp.), notou-se a tendência de estabilidade nos valores de P, K, Ca, Mg, S e Zn. Os valores encontrados para estes minerais, nas farinhas das quatro cultivares avaliadas, estão entre os valores médios disponíveis na literatura^{17,30,44}. As concentrações de Cu e Mn mantiveram-se com valores próximos aos da testemunha, quando tratadas com protease comercial (hidrolisado 1) e tenderam à diminuição quando as farinhas foram tratadas com protease de *Bacillus* sp. (hidrolisado 2). Esta diminuição pode ter sido em decorrência da estrutura de a

protease de *Bacillus* sp. requerer estes metais como cofatores enzimáticos durante a catálise^{38,45}.

A disponibilidade de Fe também variou de acordo com a cultivar e o tratamento enzimático aplicado. Os resultados mais expressivos foram observados na cultivar TAL. Quando comparado à testemunha, o hidrolisado 1 apresentou aumento médio de 66% e o hidrolisado 2 aumentou, em média, 102% a quantidade de Fe na amostra. Para as demais cultivares, houve aumento médio de 19% e 30%, respectivamente, nos hidrolisados 1 e 2 da cultivar OPNS e 6% e 21%, respectivamente, nos hidrolisados 1 e 2 da cultivar VC3. Este incremento no teor de Fe pode estar relacionado à alteração na interação proteína-Fe, uma vez que as proteases geram modificações conformacionais e diminuem, devido à sua ação hidrolítica, o tamanho da cadeia polipeptídica. Isto levaria à diminuição das interações proteína-Fe³² nas farinhas, devido à quebra de ligações peptídicas, algo semelhante ao observado por LOMBARDI-BOCCIA, SANTIS e LULLO²⁴ em amostras de feijão submetidas à cocção, e aumentaria a disponibilidade de Fe. Observou-se tendência de estabilidade na disponibilidade de Fe nos tratamentos utilizando a cultivar ON.

TABELA 2 – Teores médios de minerais das farinhas das quatro cultivares avaliadas nos diferentes tratamentos *

		Testemunha (sem adição de protease)				Hidrolisado 1 (protease comercial)				Hidrolisado 2 (protease de <i>Bacillus</i> sp.)			
		ON	OPNS	TAL	VC3	ON	OPNS	TAL	VC3	ON	OPNS	TAL	VC3
N	g/100g	2,74	2,49	2,65	2,47	2,71	2,45	2,61	2,42	2,70	2,47	2,59	2,50
P		0,41	0,33	0,35	0,38	0,41	0,40	0,35	0,34	0,34	0,43	0,40	0,37
K		1,54	1,43	1,38	1,29	1,46	1,45	1,38	1,31	1,25	1,42	1,38	1,32
Ca		0,03	0,01	0,03	0,05	0,02	0,03	0,05	0,05	0,02	0,05	0,04	0,04
Mg		0,16	0,19	0,19	0,17	0,18	0,20	0,19	0,20	0,13	0,19	0,18	0,17
S		0,23	0,22	0,25	0,21	0,26	0,24	0,25	0,23	0,16	0,20	0,20	0,19
Cu	mg/100g	1,25	0,90	1,30	1,23	1,31	1,01	1,27	1,26	0,82	0,74	1,03	0,84
Mn		1,48	1,30	1,61	1,24	1,60	1,33	1,61	1,33	0,51	0,74	1,04	0,64
Zn		4,00	3,71	3,71	3,44	3,95	3,91	3,71	3,49	3,70	3,80	3,72	3,52
Fe		2,04	0,95	1,04	0,92	2,10	1,13	1,73	0,98	2,08	1,24	2,10	1,12

* Valores expressos com base na matéria seca. Obs.: ON (Ouro Negro), OPNS (OP-NS-331), TAL (Talismã) e VC3 (VC-3).

A digestibilidade protéica *in vitro* das farinhas de feijão variou significativamente ($p < 0,05$) em função dos tratamentos (Figura 1). Os hidrolisados 1 e 2 apresentaram valores de digestibilidade superiores àqueles encontrados na farinha não tratada (testemunha).

O tratamento com enzima comercial (hidrolisado 1) apresentou o melhor resultado para a cultivar ON (74,38%), ou seja, aumentou em cerca de 44% a digestibilidade, em comparação com a testemunha (51,6%). Para esta cultivar, a protease de *Bacillus* sp. (hidrolisado 2) aumentou a digestibilidade em 27,3%, quando comparada com a testemunha (65,7% e 51,6%, respectivamente).

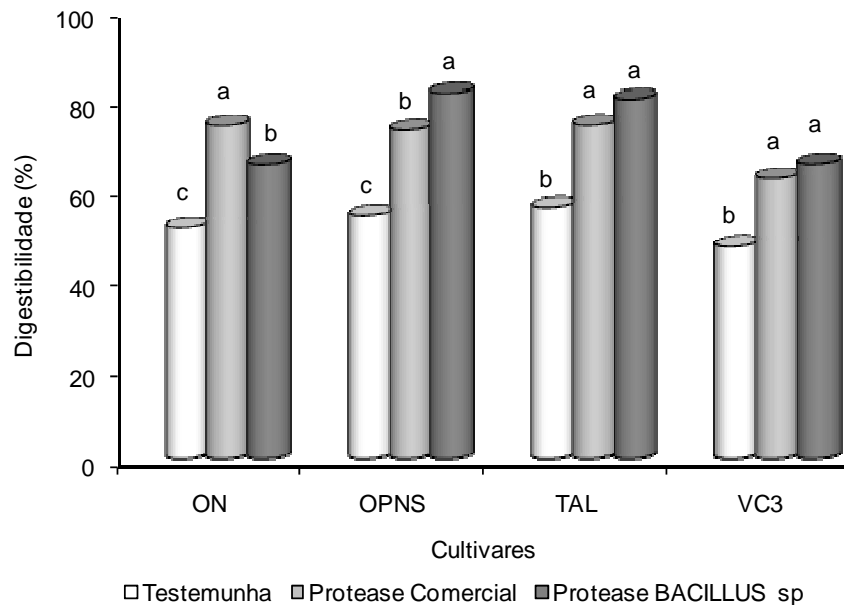


FIGURA 1 Digestibilidade proteica *in vitro* das farinhas de feijão submetidas a tratamento enzimático. Letras diferentes representam diferenças significativas, pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Obs.: ON (Ouro Negro), OPNS (OP-NS-331), TAL (Talismã) e VC3 (VC-3).

Os dados da farinha obtida da cultivar OPNS mostraram que o tratamento com protease de *Bacillus* sp. alcançou o maior valor de digestibilidade (81,6%), um aumento de cerca de 50% em relação à digestibilidade da farinha não tratada (54,4%) da mesma cultivar, o maior observado neste experimento.

Para as farinhas das cultivares TAL e VC3 não houve diferenças significativas entre os tratamentos com protease comercial e protease de *Bacillus* sp., apesar de ela ter promovido o maior valor para ambas as farinhas (80,3% e 65,8%, respectivamente) (Figura 1).

O aumento do valor na digestibilidade melhora a qualidade nutricional das proteínas do feijão por favorecer a hidrólise e a absorção de aminoácidos e peptídeos de cadeia curta^{7,37}, essenciais ao metabolismo animal. Estes resultados podem ser utilizados para o emprego de farinha de feijão na suplementação alimentar como hidrolisado protéico em dietas especiais para humanos ou no intuito de diminuir dificuldades na digestão de proteínas^{10,12,18}.

A digestibilidade protéica *in vitro* das farinhas, considerando os hidrolisados 1 (tratamento com protease comercial) e o hidrolisado 2 (tratamento com protease de *Bacillus* sp.), não diferiu estatisticamente em duas cultivares testadas (TAL e VC3). Para a cultivar ON, a enzima comercial apresentou melhor resultado, enquanto que, para a cultivar OPNS, a maior digestibilidade foi conseguida com o emprego da protease de *Bacillus* sp. Em todas as cultivares testadas, o emprego de protease melhorou a digestibilidade em relação à testemunha (farinha não hidrolisada).

6 CONCLUSÕES

Nas condições do experimento, e em relação aos parâmetros testados, chegou-se às seguintes conclusões:

. a adição de protease comercial e protease de *Bacillus* sp. não interferiu nos teores de proteínas totais e fenólicos totais das farinhas obtidas das cultivares avaliadas;

. a digestibilidade protéica *in vitro* das farinhas de feijão aumentou, em média, 36% no hidrolisado 1 (adição de protease comercial) e 39% no hidrolisado 2 (adição de protease de *Bacillus* sp.), quando comparada com a digestibilidade do grupo testemunha (farinha não tratada com protease);

. o hidrolisado 2 apresentou melhor disponibilidade de Fe, quando comparado com a testemunha.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. London: Elsevier Applied Science, 1986. 427 p.
2. AKESSON, W. R.; STAHMANN, M. A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 83, p. 257-261, 1964.
3. ANDREWS, N. C. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 341, n. 26, p. 1986-1995, 1999.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16th. ed. Arlington, 1995. 2 v.
5. BEARD, J. L.; DAWSON, H.; PIÑERO, D. J. Iron metabolism: a comprehensive review. **Nutrition Reviews**, Boston, v. 54, n. 0, p. 295-317, 1996.
6. BIANCHI, M. L. P.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, J. E. D. de. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro dos alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 42, n. 2, p. 94-100, 1992.
7. BLANCO, A.; BRESSANI, R. Biodisponibilidade de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 41, n. 1, p. 38-51, 1991.
8. CARPENTER, C. E.; MAHONEY, A. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 31, p. 333-367, 1992.
9. CARVALHO, M. R.; SGARBIERI, V. C. Relative importance of phytohemagglutinin (lectin) and trypsin-chymotrypsin inhibitor on bean (*Phaseolus vulgaris* L) protein absorption and utilization by the rat. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 44, p. 685-696, 1998.
10. CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 11, p. 254-262, 2000.

11. COELHO, R. G.; SGARBIERI, V. C. Nutritional evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) protein: *In vivo* versus *in vitro* procedure. **Journal of Food Biochemistry**, Malden, v. 18, p. 297-309, 1995.
12. CORDLE, C. T. Control of food allergies using protein hydrolysates. **Food Technology**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 72-76, 1994.
13. DIAS, D. R. **Uso de protease de *Bacillus* spp na hidrólise proteica de farinha de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
14. ESPINOSA-ALONSO, L. G.; LYGIN, A.; WIDHOLM, J. M.; VALVERDE, M. E.; PAREDES-LOPEZ, O. Polyphenols in wild and weedy mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 4436-4444, 2006.
15. FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
16. FIALHO, L. S.; GUIMARAES, V. M.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; DIAS, L. A. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; JOSÉ, I. C.; REZENDE, S. T. Biochemical composition and indigestible oligosaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 61, p. 87-89, 2006.
17. FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 324 p.
18. FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food Technology**, Oxford, v. 48, n. 10, p. 86-88, 1994.
19. GODFREY, T. Protein modification. In: GODFREY, T.; WEST, S. (Eds.). **Industrial enzymology**. 2th. ed. Great Britain: Macmillan, 1996. cap. 2.18.
20. GUZMÁN-MALDONADO, S. H.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; PAREDES-LÓPEZ, O. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 80, p. 1874-1881, 2000.
21. GUZMAN-MALDONADO, S. H.; PAREDES-LOPEZ, O. Biotechnology for the improvement of nutritional quality of food crop

- plants. In: PAREDES-LOPEZ, O. (Ed.). **Molecular biotechnology for plant food production**. Lancaster: Technomic, 1999. p. 590-591.
22. HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Condensed tannin purification and characterization of tannin associated proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 4, p. 947-952, 1980.
 23. HUGHES, J. S.; ACEVEDO, E.; BRESSANI, R.; SWANSON, B. G. Effects of dietary fiber and tannins on protein utilization in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, Amsterdam, v. 29, n. 3-4, p. 331-338, Apr.-May 1996.
 24. LOMBARDI-BOCCIA, G.; SANTIS, N.; LULLO, G. Impact of processing on Fe dialysability from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, Oxford, v. 53, p. 191-195, 1995.
 25. LYNCH, S. R. Interacion of iron with other nutrients. **Nutrition Reviews**, Boston, v. 55, n. 4, p. 102-110, 1997.
 26. MA, Y.; BLISS, F. A. Tannin content and inheritance in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 18, p. 201-204, 1978.
 27. MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação de estado nutricional das plantas**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1989. 201 p.
 28. MECCHI, R.; CANIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 109-114, 2005.
 29. MEJIA, E. G.; VALADEZ-VEJA, M. del C.; REYNOSO-CAMACHO, R.; LOARCA-PINA, G. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 60, p. 137-145, 2005.
 30. MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.
 31. MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 270-276, 2006.

32. NELSON, K. J.; POTTER, N. N. Iron availability from wheat gluten, soy isolate, and casein complexes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 45, p. 52-56, 1980.
33. NIELSEN, P. M.; OLSEN, H. S. Enzymic modification of food protein. In: WHITEHURST, R. J. & LAW, B. A.(eds.). **Enzymes in food technology**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2002. Cap. 6, p. 109-143.
34. OH, H. I.; HOFF, J. E.; ARMSTRONG, G. S.; HAFF, L. A. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, p. 394-398, 1980.
35. PEARCE, R. J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. **Australian Journal of Dairy Technology**, Sidney, v. 50, p. 15-23, 1995.
36. PINO, V. H. del; LAJOLO, F. M. Efecto inhibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre la digestibilidad de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 49-53, 2003.
37. PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 179-187, 2006.
38. RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology Molecular Biology Review**, Washington, v. 62, p. 597-635, 1998.
39. REHMAN, Z.; SALARIYA, A. M.; ZAFAR, S. I. Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, p. 351-355, 2001.
40. RIOS, A. O.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D. Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 39-45, 2003.
41. SATHE, A. K. Dry bean protein functionality. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 175-223, 2002.

42. STOLTZFUS, R. J.; MULLANY, L.; BLACK, R. E. Iron deficiency anaemia. In: EZZATI, M.; LOPEZ, A. D.; RODGERS, A.; MURRAY, C. J. L. (Eds.). **Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attribution to selected major risk factors**. Geneve: WHO, 2004. p. 163-210. Disponível em: <<http://www.who.int/publications/cra/chapters/volume1/0163-0210.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2007.
43. SWAIN, T.; HILLIS, W. T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 10, p. 135-144, 1959.
44. USDA. **National nutrient database for standard reference**. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>. Acesso em: 23 nov. 2007.
45. WANG, S. L.; KAO, T. Y.; WANG, C. L.; YEN, Y. H.; CHERN, M. K.; CHEN, Y. H. A solvent stable metalloprotease produced by *Bacillus* sp. TKU004 and its application in the deproteinization of squid pen for β -chitin preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 39, n. 4, p. 724-731, 2006.
46. WU, W.; WILLIAMS, W. P.; KUNKEL, M. E.; ACTON, J. C.; WARDLAW, F. B.; HUANG, Y.; GRIMES, L. W. Thermal effects on *in vitro* protein quality of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 6, p. 1187-1191, 1994.

AGRADECIMENTOS

O primeiro autor agradece à Ufla e ao Unilavras a oportunidade de realização do doutoramento. Os autores são gratos ao Prof. Dr. Magno A. P. Ramalho pela doação das cultivares.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolado *Bacillus* sp. UFLA 817CF, isolado de grãos de café, foi capaz de produzir enzimas com atividade proteolítica em pH alcalino. Esta atividade superou, em todas as condições de cultivo, os valores encontrados para as proteases originadas do cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, cepa padrão utilizada neste trabalho.

Com relação aos meios de cultivo alternativos testados, aquele contendo 0,01% (m/v) de soro de leite em pó apresentou bons resultados para o cultivo da cepa selvagem de *Bacillus*. A protease oriunda desta cepa apresentou atividade ótima em pH 9,0 e 40 °C, após 24 h de crescimento e saturação com 605 de sulfato de amônio. Além disso, apresentou estabilidade térmica de ação em pH 7,0 entre 40 e 50 °C. Por estas características, esta fração pré-purificada foi utilizada na comparação com tripsina comercial para avaliar as possíveis alterações na digestibilidade proteica *in vitro* de farinhas obtidas de quatro cultivares de feijão.

As cultivares testadas apresentaram variação significativa nos teores de proteínas, digestibilidade, fenólicos totais, umidade e cinzas, quando consideradas as farinhas não tratadas enzimaticamente. Ainda nestas condições, a maior digestibilidade foi observada para a cultivar TAL, na qual também se observaram maiores teores de proteínas totais e fenólicos totais. A cultivar VC3 apresentou, estatisticamente, os menores valores de digestibilidade e fenólicos totais, indicando não haver correlação linear entre a quantidade desses compostos e a digestibilidade, para as cultivares testadas nas condições do experimento.

Observou-se tendência de diminuição dos valores médios de Cu e Mn em todas as farinhas tratadas com protease de *Bacillus* sp. (hidrolisado 2) e

aumento médio da disponibilidade de Fe nos hidrolisados 1 (protease comercial) e 2 (protease de *Bacillus* sp.) das cultivares OPNS, TAL e VC3. O maior aumento médio (102%) foi observado no hidrolisado 2 (protease de *Bacillus* sp.) da cultivar TAL. Na cultivar ON, não foi observada tendência na variação média da disponibilidade de Fe.

O tratamento enzimático não interferiu, estatisticamente, na concentração de fenólicos totais dos hidrolisados obtidos das quatro cultivares testadas.

A digestibilidade protéica *in vitro* foi sensivelmente melhorada com o tratamento enzimático. Para a cultivar ON, o melhor resultado (aumento de 44%) foi obtido no hidrolisado 1, empregando-se protease comercial. O maior aumento na digestibilidade, entretanto, foi observado na farinha da cultivar OPNS tratada com protease de *Bacillus* sp. (hidrolisado 2), com incremento de 50% em relação à digestibilidade da respectiva testemunha.

O tratamento enzimático, independente da origem da enzima, melhorou a digestibilidade proteica *in vitro* das farinhas das cultivares TAL e VC3.

ANEXOS

ANEXO A	Página
PROTOCOLO 1A Determinação de proteínas, pelo método de Bradford, utilizando reagente comercial Coomassie Blue G-250 Brilliant Blue G-250.....	116
PROTOCOLO 2A Determinação de proteínas, pelo método de Bradford, utilizando reagente de Bradford Sigma B6916.....	118
PROTOCOLO 3A Determinação de atividade proteolítica.....	123
PROTOCOLO 4A Caracterização da enzima (efeito do pH, da temperatura e do tempo de incubação).....	127

PROTOCOLO 1A

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD (Coomassie Blue G-250 Brilliant Blue G-250).

Nota: protocolo utilizando reagente comercial Coomassie Blue G-250 Brilliant Blue G-250.

1 Preparo do reagente Coomassie Blue G-250 Blue G-250:

Dissolvem-se 100 mg de Coomassie Blue G-250 Blue G-250 em 50 ml de etanol 95% (v/v). A esta solução adicionam-se 100 ml de ácido fosfórico 85% (m/v). A solução resultante é diluída para 1.000 ml com água destilada. As concentrações finais (m/v) desta solução são as seguintes:

0,01 % de Coomassie Blue G-250 Blue G-250; 8,5 % de H_3PO_4 e 4,7 % de etanol.

Obs.: O H_3PO_4 tem que ser adicionado ao Coomassie Blue G-250 Blue G-250 dissolvido em etanol, nunca ao contrário. A solução reagente de Coomassie Blue G-250 Blue G-250 deve ser filtrada antes de ser usada.

2 Preparo da curva padrão de proteína usando BSA:

2.1 ANÁLISE PADRÃO (20 ug a 100 ug de proteína)

(para amostras com baixo teor de proteínas, veja microanálise no item 2.2)

Preparar solução de BSA a 1mg/mL em água destilada.

Como a BSA é muito higroscópica, podem ser cometidos erros na pesagem da mesma. Para saber o seu peso real, basta preparar uma solução 0,1 % (1 mg/ml)

e medir a absorvância em 280 nm. É sabido que a solução de BSA 0,1% tem uma Ab_{280nm} de 0,600. Se, por exemplo, a BSA preparada apresentar uma Ab_{280nm} de 0,500, sua concentração real pode ser recalculada pela equação abaixo:

$$\text{Conc. Real BSA} = 0,500 \times 1 \text{ mg/ml} \div 0,600 = 0,83 \text{ mg/ml}$$

[SUGESTÃO: Antes de se determinar a concentração de proteínas em um extrato vegetal, é aconselhável fazer a precipitação das mesmas com ácido tricloroacético (TCA), numa concentração final de 5%. Este procedimento tem a finalidade de livrar as proteínas de algumas impurezas solúveis no TCA e que podem interferir na determinação de proteínas (apesar de o método de Bradford sofrer pouca ação de interferentes).

Obs.: O TCA não deve ser guardado em concentrações abaixo de 50%, pois ele se decompõe.

O TCA forma um sal insolúvel com as proteínas, precipitando-as. O precipitado é retomado com NaOH 1,0 N e está pronto para ser quantificada a sua proteína.]

PROTOCOLO 2A

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Nota: protocolo para o reagente de Bradford Sigma B6916

2.1 Macroanálise (20 ug a 100 ug)

Procedimento para a obtenção de curva padrão de proteína a partir de uma solução de BSA (1 mg/ml ou 10 µg/0,1 ml), **utilizando reagente Sigma B6916**.

Tubo n°	BSA 1 mg/mL (mL)	Água dest.* (mL)	Concentração final de proteína (BSA) em µg/0,1ml	Reag. de Coomassie Blue G-250 mL Sigma B6916
1	-	0,10	0	3,0
2	0,02	0,08	20	3,0
3	0,04	0,06	40	3,0
4	0,06	0,04	60	3,0
5	0,08	0,02	80	3,0
6	0,10	0,00	100	3,0

* Ou tampão apropriado (utilizado nas análises).

Homogeneizar os tubos por inversão ou em vortex. Aguardar 5 minutos para realizar a leitura (**em 595 nm**). A leitura pode ser realizada até 60 minutos depois da agitação.

Plotar gráfico [Abs 595 (y) versus µg proteína (x)] e calcular equação da reta. $R^2 \sim 0,994...$ (pelo menos).

Obs.: Para minimizar os erros de pipetagem, podem-se preparar soluções de 20; 40; 60; 80 e 100 µg de BSA/0,1 ml e tomar uma alíquota de 0,1 ml de cada uma e adicionar os 3,0 ml do reagente de Coomassie Blue G-250.

2.1.1 Quantificação de proteínas na amostra

a) Preparo do branco: 0,1 mL de água ou tampão + 3,0 mL do reagente de Coomassie Blue G-250 (reagente de Bradford) (ou 0,05 mL de água + 1,5 mL do reagente Sigma B6916. Neste caso, será necessária cubeta de 1,5 mL). Homogeneizar os tubos por inversão ou em vortex. Aguardar 5 minutos para realizar a leitura (**em 595 nm**). A leitura pode ser realizada até 60 minutos depois da agitação.

b) Na amostra: 0,1 mL da amostra + 3,0 mL do reagente Sigma B6916. (ou 0,05 mL de amostra + 1,5 mL do reagente de Bradford). Seguir como no item a.

c) Calcular a concentração total de proteínas na amostra a partir da equação da reta.

d) O resultado encontrado refere-se a μg de proteínas no volume de amostra utilizado (caso o volume de 0,1 mL gere uma absorvância dentro da curva, o resultado poderá ser expresso em $\mu\text{g}/0,1 \text{ mL}$). **No caso de diluições ou precipitação da amostra, considerar estes procedimentos para o cálculo.**

Caso a leitura da absorvância seja superior ao ponto máximo da curva, diluir a amostra e retornar ao item b.

OBSERVAÇÃO:

Caso a leitura da Abs da amostra seja negativa, ou seja, a amostra possui quantidade de proteína não detectada na análise padrão, preparar uma curva padrão de microanálise, descrita no item 2.2 (a seguir).

2.2 MICROANÁLISE (1 ug a 10 ug de proteína)

Esta análise é utilizada para amostras com baixas concentrações de proteínas (meios de cultivo e outras amostras líquidas, entre outras), o que pode dispensar a concentração da amostra por precipitação com TCA, por exemplo.

Preparo da solução de BSA 0,1 mg/mL (0,1 ug/uL):

Para evitar erros de pesagem, esta solução pode ser preparada a partir da diluição da solução de BSA a 1 mg/mL (item 2.1). Exemplo: pipetar 10 mL da solução de BSA a 1 mg/mL, transferir para um balão de 100 mL e completar o volume com água destilada. Homogeneizar a solução por inversão do balão, cuidadosamente, para evitar formação de espuma (o que pode indicar desnaturação protéica).

MICROANÁLISE: Procedimento para obtenção de curva padrão de proteína a partir de uma solução de BSA (0,1 mg/ml ou 0,1 µg/ul) **utilizando-se reagente Sigma B6916.**

Tubo N°	BSA 0,1 mg/mL (mL)	Água dest.* (mL)	Concentração final de proteína (BSA) em µg/0,1ml	Reag. de Coomassie Blue G-250 mL Sigma B6916
1	-	1,0	0	1,0
2	0,2	0,8	2,0	1,0
3	0,4	0,6	4,0	1,0
4	0,6	0,4	6,0	1,0
5	0,8	0,2	8,0	1,0
6	1,0	-	10,0	1,0

* Ou tampão apropriado (utilizado nas análises).

Homogeneizar os tubos por inversão ou em vortex. Aguardar 5 minutos para realizar a leitura (**em 595 nm**). A leitura pode ser realizada até 60 minutos depois da agitação.

Plotar gráfico [Abs 595 (y) versus μg proteína (x)] e calcular equação da reta.

2.2.1 Quantificação de proteínas na amostra

a) Preparo do branco: 1,0 mL de água ou tampão + 1,0 mL do reagente Sigma B6916 (reagente de Bradford). Homogeneizar os tubos por inversão ou em vortex. Aguardar 5 minutos para realizar a leitura (**em 595 nm**). A leitura pode ser realizada até 60 minutos depois da agitação. **Como o volume final será de 2,0 mL, pode-se utilizar a cubeta de 3,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm.**

b) Na amostra: 1,0 mL da amostra + 1,0 mL de reagente B6916. Seguir como no item a.

c) Calcular a concentração total de proteínas na amostra a partir da equação da reta.

d) O resultado encontrado refere-se a μg de proteínas no volume de amostra utilizado (caso o volume de 1,0 mL gere uma absorvância dentro da curva, o resultado poderá ser expresso em $\mu\text{g/mL}$). **No caso de diluições ou precipitação da amostra, considerar estes procedimentos para o cálculo.**

Caso a leitura da absorvância seja superior ao ponto máximo da curva, diluir a amostra e retornar ao item b.

3 Observações

- a. A quantificação de proteína em extratos vegetais ou microbianos pode ser feita usando-se volumes iguais do extrato e de TCA a 10%, resultando numa concentração final de TCA igual a 5%. Este extrato com TCA 5% deve ser centrifugado (pelo menos 5000 $\times\text{g}$ por 15') e o precipitado ressuspendido com NaOH 0,1 N. Posteriormente, retira-se

uma alíquota de 0,1 ml da proteína ressuspensa e adicionam-se 5 ml do reagente de Coomassie Blue G-250. Agita-se e faz-se a leitura a 595 nm.

- b. Não utilizar cubetas de quartzo (pois a remoção do reagente de Coomassie é bem mais difícil). Utilizar as de vidro comum ou plástico.
- c. Limpeza das cubetas: pode ser realizada com detergente comercial comum.

4 Referências

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Stoscheck, C (1990) Quantification of Protein. *Methods in Enzymology* 182:50-68.

PROTOCOLO 3A

DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A determinação da atividade proteolítica foi avaliada em função da hidrólise da caseína.

Procedimento

I. Obtenção do extrato enzimático bruto:

1. Centrifugar as amostras a 6000 xg (8090 rpm, centrífuga SIGMA AK-15, rotor 12148), durante 15 minutos, a 4°C.
2. Recolher o sobrenadante (extrato enzimático bruto) e congelá-lo para posteriores análises (caso não seja utilizado imediatamente).

II. Preparo dos reagentes:

1. Substrato: preparar solução de caseína a 0,5% (m/v) em tampão Tris-HCl (50 mM) pH 9,0 (ou outro tampão compatível).
 - a. Preparo da solução tampão (1000 mL): pesar 6,05 g de Tris (50 mmol) e transferir para Erlenmeyer (ou béquer) de 250 mL contendo 100 mL de água destilada. Solubilizar. Completar o volume para cerca de 200 mL. Homogeneizar. Adicionar solução de HCl 0,2 M (aos poucos, cerca de 5 mL) e aferir o pH, até que o valor 9,0 seja obtido. Transferir, analiticamente, o conteúdo para balão de 1.000 mL e completar o volume.
2. Solução de TCA (parada de reação): preparar solução de ácido tricloroacético a 10% (m/v) em água destilada.

3. Construção da reta padrão de tirosina (Food Chemicals Codex, 1996, p.811-12):

a. Preparar 100 mL de solução de L-tirosina (grau analítico) a 100 ug/mL.

i. Pesar 0,0100 g (10 mg) de L-Tyr (previamente dessecada a 60°C, por 24 horas). Dissolver em 6,0 mL de HCl 0,1 M, em um béquer. Transferir, analiticamente, o conteúdo para o balão de 100 mL, lavando-se o béquer e completando-se o volume do balão com água destilada. Homogeneizar a solução por inversão do balão.

b. Pontos da reta

Tubo N°	Solução de L-Tyr 100 ug/mL (uL)	Água dest. (uL)	Concentração final de L-Tyr em µg/mL	Concentração final de L-Tyr em µmol/mL
1	-	*	0	0
2	200	800	20	0,11038 (~ 0,11)
3	400	600	40	0,22076 (~ 0,22)
4	600	400	60	0,33114 (~ 0,33)
5	800	200	80	0,44152 (~ 0,44)
6	1000	-	100	0,55190 (~ 0,55)

* Utilizar como branco, para a curva, HCl 0,006 M.

- i. Utilizar cubetas de quartzo de 1,4 mL e caminho ótico de 1,0 cm.
- ii. Ler em 275 nm..
- iii. Plotar gráfico [Abs 275 (y) versus µg Tyr/mL (x)] e calcular equação da reta. R² esperado acima de 0,9970.

III. Análise da atividade proteolítica.

1. Em tubos Eppendorf, adicionar: 500 uL de solução de caseína + 250 uL de extrato enzimático. Homogeneizar cuidadosamente.
2. Incubar os tubos em banho-maria, a 37°C, durante 30 minutos.
3. Parar a reação, transcorridos os 30 minutos, adicionando-se 500 uL de solução de TCA a 10% (m/v).

4. Centrifugar os tubos, a 20.000 xg, durante 15 minutos. a 4°C.
5. Transferir 1,0 mL do sobrenadante para a cubeta e ler a absorvância em 275 nm.
6. **Branco**: utilizar 250 uL de água em vez de extrato enzimático.
7. Cálculos:
 - a. Determinar a o equivalente em tirosina liberado a partir da equação da reta de Tyr (ug Tyr/mL x Abs)
 - b. Atividade proteolítica (*Sigma Aldrich*)
 - i. Unidade de atividade proteolítica/mL (U/mL):

$$U / mL = \frac{\mu g \text{ Tyr} \times V_f}{V_a \times t \times V_e}$$

em que:

$\mu g \text{ Tyr}$ = valor obtido no item 7.a, a partir da Abs da amostra.

V_f = volume total (em mL) da análise. Neste caso, = 1,25 mL.

V_a = volume da amostra (em mL) de extrato enzimático. Neste caso, = 0,250 mL.

t = tempo (em minutos) de incubação. Neste caso, = 30 minutos.

V_e = volume utilizado (em mL), na cubeta, para a leitura da Abs.

Neste caso = 1,0 mL (ou 0,5 mL). Ficar atento a este volume.

A unidade será expressa em ug x mL⁻¹min⁻¹ e será definida como a quantidade de enzima que produz o equivalente a 1 ug de Tyr por minuto, a pH 9,0 e 37°C, a 275 nm (ou nas condições do experimento).

Caso se queira expressar o resultado em umol x mL⁻¹min⁻¹, basta dividir o resultado em ug x mL⁻¹min⁻¹ por 181,19 (mmr da Tyr).

ii. Cálculo da atividade específica (U/mg proteína)

$$U / \text{mg proteína} = \frac{U / \text{mL}}{Pt (\text{mg} / \text{mL})}$$

em que:

U/mL = valor encontrado na equação anterior,

Pt = proteínas totais, em mg/mL, no extrato enzimático. Neste caso, determinado segundo Bradford.

Referências

FOOD CHEMICALS CODEX, 4th. USA: National Academic Press/Chapman & Hall, 1996. p. 811-812.

Kumar CG (2002) Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Letters in Applied Microbiology* 34:13-17.

Scopes R (1994) *Protein purification: principles and practice*, 3rd ed. New York: Springer-Verlag.

Singh J, Batra N, Sobti RC (2001) Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry* 36:781-785.

Tremacoldi CR, Carmona EC (2005) Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:169-172.

PROTOCOLO 4A

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

(EFEITO DO PH, DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE INCUBAÇÃO)

Realizar estas análises na enzima pré-purificada. O extrato bruto pode conter outras enzimas estáveis em diferentes valores de pH e temperatura, o que pode comprometer os resultados (isto, porém, não exclui a possibilidade de se analisar o extrato enzimático não purificado).

1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima.

a. Determinação do pH ótimo:

i. Preparar as seguintes soluções tampões (100 mL) nos respectivos valores de pH:

- Tampão fosfato 50 mM: pH 6,0 e 7,0.
- Tampão Tris-HCl 50 mM: pH 8,0 e 9,0.
- Tampão glicina-NaOH 100 mM: pH 10,0, 11,0 e 12,0.

ii. Neste caso, de determinar o pH ótimo, pode-se preparar a solução de caseína a 0,5% (m/v) nos próprios tampões. Preparar 50 mL de solução nos tampões e corrigir o pH depois de adicionar a caseína (lembrar de aquecer a solução de caseína para que haja solubilização da mesma). Seguir o protocolo para a determinação da atividade enzimática.

iii. Os outros 50 mL dos tampões serão utilizados na etapa seguinte.

- b. Estabilidade em diferentes valores de pH:
- i. Adicionar uma quantidade da amostra de enzima em um volume dos tampões acima citados.
 - Se a enzima estiver purificada, tomar uma massa e ressuspendê-la em quatro volumes do tampão (considerar que serão necessários, pelo menos, 250 uL para a análise de atividade enzimática). Incubar, a 4°C, por 24 horas. Retirar 250 uL e proceder à determinação da atividade enzimática, segundo o protocolo (utilizar caseína em tampão Tris-HCl pH 9,0, ou no pH de melhor atividade obtido no item 1.a). Considerar possíveis diluições (multiplicar o valor da atividade pela diluição).
 - No caso do extrato enzimático (obtido depois da centrifugação), pode-se proceder da seguinte forma: em um tubo eppendorf, adicionar 500 uL do extrato enzimático e 1.500 uL do tampão (a amostra foi diluída 4 vezes). Homogeneizar suavemente. Incubar, a 4°C, por 24 horas. Retirar 250 uL e proceder à determinação da atividade enzimática segundo o protocolo (utilizar caseína em tampão Tris-HCl pH 9,0, ou no pH de melhor atividade obtido no item 1.a). Considerar que a amostra foi diluída 4 vezes (multiplicar o valor da atividade por quatro).
2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da enzima.

- a. Determinação da temperatura ótima:
 - i. Proceder à análise da atividade enzimática (utilizar caseína em tampão Tris-HCl pH 9,0, ou no pH de melhor atividade obtido no item 1.a.) variando a temperatura de incubação. Neste caso, testar as temperaturas (em °C) de 30, 40, 50, 60 e 70. Realizar o experimento em duplicata. Ambientar solução de caseína e enzima nestas temperaturas antes de colocá-las em contato.
- b. Estabilidade em diferentes valores de temperatura:
 - i. Pré-incubar a amostra enzimática (purificada ou não) nas temperaturas (em °C) de 30, 50 e 70, durante 120 minutos (sem o substrato). O volume pré-incubado deverá ser suficiente para que sejam recolhidas três alíquotas (triplicata) a cada 30 minutos, para a avaliação da atividade enzimática relativa [ou seja: 3 x 250 uL x 4 tempos (30, 60, 90 e 120 minutos) = 3,0 mL. Incubar 5 mL a cada temperatura, portanto, serão necessários 15 mL da amostra]. Para esta análise, considerar o valor de atividade, a 30°C (item 2.a.i.), como 100% de atividade. Fazer a correspondência do valor encontrado com o valor de 100%.
 - ii. A determinação da atividade será a 37°C., pH 9,0 (utilizar caseína em tampão Tris-HCl pH 9,0, ou no pH de melhor atividade obtido no item 1.a.)

BRANCO: colocar, nesta ordem: 500 uL de TCA + 250 uL de enzima. Agitar. Adicionar 500 uL de caseína. Agitar. Centrifugar.

Referências:

Çalik P, Bilir E, Çalik G, Özdamar TH (2002) Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31:685-697.

Kumar CG (2002) Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Letters in Applied Microbiology* 34:13-17.

Scopes R (1994) *Protein purification: principles and practice*, 3rd ed. New York: Springer-Verlag.

Singh J, Batra N, Sobti RC (2001) Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry* 36:781-785.

Tremacoldi CR, Carmona EC (2005) Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:169-172.