

RAQUEL CAMPOS SANTOS

OBTENÇÃO DE PROTEASES DE *PENICILLIUM*  
*CANDIDUM* E SEU EMPREGO NO PREPARO DE  
HIDROLISADOS DE SORO DE LEITE COM BAIXO  
TEOR DE FENILALANINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marialice P.C. Silvestre

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2005

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	4
LISTA DE FIGURAS .....	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	6
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	12
2.1 <i>PENICILLIUM CANDIDUM</i> .....	12
2.1.1 Aspectos gerais do Reino Fungi.....	12
2.1.2 A classe Deuteromycotina – uma nova classificação.....	12
2.1.3 Características do gênero e da espécie.....	13
2.2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MICROBIANAS.....	14
2.2.1 Sistema proteolítico de <i>Penicillium candidum</i> .....	16
2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS .....	17
2.3.1 Aspectos gerais .....	17
2.3.2 Fatores interferentes.....	19
2.4 HIDROLISADOS PROTÉICOS .....	20
2.5 SORO DE LEITE .....	21
2.5.1 Aspectos gerais .....	21
2.5.2 Proteínas do soro .....	24
2.6 FENILCETONÚRIA (PKU) .....	25
2.6.1 Considerações históricas .....	25
2.6.2 Aspectos moleculares .....	25
2.6.3 Presença de fenilalanina na dieta .....	26
2.6.4 Substitutos protéicos .....	27
2.6.5 Métodos de remoção de fenilalanina.....	28
2.6.5.1 Carvão ativado.....	28
2.6.6 Método para determinação de fenilalanina – Espectrofotometria derivada segunda (EDS).....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1 MATERIAL .....	31
3.1.1 Soro de leite .....	31
3.1.2 Leite em pó.....	31
3.1.3 Microrganismo.....	31
3.1.4 Equipamentos.....	31
3.2 MÉTODOS.....	32
3.2.1 Manutenção do cultivo do fungo.....	32
3.2.2 Determinação das condições de cultivo do fungo.....	32
3.2.3 Meio semi-sólido para a produção de proteases pela cepa de <i>Penicillium candidum</i> .....	32
3.2.4 Preparo do inóculo.....	33
3.2.5 Extração do cultivo.....	33
3.2.8 Concentração das proteases.....	33
3.2.7 Determinação da atividade proteolítica.....	34
3.2.7.1 Substrato.....	35
3.2.7.2 Metodologia.....	35
3.2.8 Dosagem de proteína pelo método de Lowry.....	35
3.2.9 Preparo dos hidrolisados de soro de leite.....	36
3.2.10 Remoção da fenilalanina dos hidrolisados de soro de leite.....	37

3.2.11	Determinação da remoção de fenilalanina – uso da espectrofotometria derivada segunda.....	37
3.2.12	Conversão do teor final de Phe dos hidrolisados para uma dieta normoprotéica.....	38
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO.....	40
4.1.1	Influência do tempo de incubação sobre a atividade proteolítica.....	40
4.1.2	Influência da suplementação do meio de cultivo do fungo com soro de leite e leite em pó.....	41
4.1.3	Influência do pH sobre a determinação da atividade proteolítica.....	42
4.2	OBTENÇÃO DA PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA.....	43
4.2.1	Purificação do extrato bruto – avaliação do efeito de diferentes volumes de etanol.....	43
4.2.2	Atividade proteolítica.....	43
4.3	REMOÇÃO DA FENILALANINA DOS HIDROLISADOS DE SORO DE LEITE.....	46
4.4	EFEITO DOS PARÂMETROS HIDROLÍTICOS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA.....	48
4.4.1	Relação enzima : substrato.....	48
4.4.2	Influência da temperatura.....	49
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	50
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
	APÊNDICE A - Conversão do teor final de Phe dos hidrolisados para uma dieta normoprotéica.....	64
	APÊNDICE B - Tabelas complementares da análise estatística dos hidrolisados obtidos.....	65
	B.1 Análise da variação da concentração da preparação enzimática nas diferentes temperaturas.....	65
	B.2 Análise da variação da temperatura nas diferentes concentrações da preparação enzimática .....	66

## LISTA DE TABELAS

1	Teores de aminoácidos essenciais das proteínas do soro de leite em g de aminoácido/100g de proteína.....	23
2	Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) de alguns resíduos industriais.....	23
3	Estimativas das exigências nutricionais de aminoácidos nas diferentes faixas etárias .....	27
4	Parâmetros hidrolíticos empregados no preparo dos hidrolisados de soro de leite em pó pela ação da preparação enzimática de <i>Penicillium candidum</i> .....	36
5	Comparação entre os meios suplementados com soro de leite e leite em pó.	41
6	Comparação da precipitação por diferentes volumes de etanol.....	43
7	Efeito da precipitação com etanol sobre a atividade proteolítica.....	45
8	Teor final de Phe dos hidrolisados de soro de leite em pó após tratamento com carvão ativado.....	47

## LISTA DE FIGURAS

1	Composição do leite.....	22
2	Morfologia de <i>Penicillium spp.</i> .....	14
3	Fluxograma de precipitação das proteases pelo uso do etanol.....	34
4	Influência do tempo de incubação de <i>Penicillium candidum</i> sobre a atividade proteolítica da preparação enzimática.....	39
5	Influência do pH sobre a atividade proteolítica da preparação enzimática com soro de leite como substrato.....	42
6	Avaliação dos parâmetros de temperatura e concentração da preparação enzimática na remoção de Phe.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DBO - Demanda biológica de oxigênio

EDS - Espectrofotometria derivada segunda

E:S - Relação enzima substrato

PHE - Fenilalanina

PKU - Fenilcetonúria

TRP - Triptofano

TYR - Tirosina

## RESUMO

O soro de leite, um subproduto de alto valor nutritivo, mas subutilizado, foi empregado como substrato para obtenção de hidrolisados com baixo teor de fenilalanina, visando o desenvolvimento de suplementos alimentares para fenilcetonúricos. A preparação enzimática empregada foi obtida de uma cepa de *Penicillium candidum*, fungo já utilizado na produção de queijos. As condições de cultivo e obtenção do preparado proteolítico foram padronizadas e a purificação parcial foi obtida pela precipitação com dois volumes de etanol a 4°C. Foram testadas três relações E:S e três temperaturas de hidrólise com tratamento dos hidrolisados por coluna de carvão ativado para remoção da Phe. As maiores porcentagens de remoção, de 90% a 93,7%, foram obtidas com as temperaturas de 40°C e 50°C, não sendo observada uma relação direta com a E:S utilizada.

**Palavras - chave:** hidrolisados protéicos; soro de leite; hidrólise enzimática; *Penicillium candidum*; fenilalanina; fenilcetonúria.

## ABSTRACT

**OBTAINMENT OF PROTEASES FROM *PENICILLIUM CANDIDUM* AND ITS UTILIZATION ON PREPARATION OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATES WITH LOW PHENYLALANINE CONTENTS.** Whey, a sub product of high nutritive value, but underused, was used as a substrate to obtain hydrolysates with low phenylalanine contents, to a development of food supplements to phenylketonurians. The enzymatic preparation was achieved from a strain of *Penicillium candidum*, mould already used in cheese ripening. The cultivate conditions and obtaining of enzymatic preparation was optimized and the partial purification was carried out by precipitation with two volumes of ethanol at 4°C. Three relations enzyme: substrate and three hydrolysis temperature were tested. The hydrolysates were treated with activated carbon column to remove the Phe. The high removal percentages, of 90% to 93%, were obtained with 40°C and 50°C temperatures. No relation with the E:S used was observed.

**Key words:** Protein hydrolysates; whey; enzymes; *Penicillium candidum*; phenylalanine; phenylketonuria



# 1. INTRODUÇÃO

Os erros inatos do metabolismo constituem um grupo numeroso de enfermidades que se apresentam, principalmente, nos primeiros meses de vida. A fenilcetonúria (PKU) é um dos distúrbios metabólicos congênitos mais comuns. Caracteriza-se pela ausência ou deficiência da enzima fenilalanina-hidroxilase, sintetizada pelo fígado, que é responsável pela conversão da fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr), levando a um acúmulo de Phe no sangue e formando fenilpiruvato, uma fenilcetona que, em excesso, eleva sua concentração na urina. E foi devido a esta característica que a doença recebeu o nome de fenilcetonúria (STRAYER, 1988; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MARTINS, 1996; SHIMAMURA et al., 1999).

Um dos mais importantes problemas clínicos associados a fenilcetonúria é que os indivíduos não tratados desenvolvem grave retardamento mental, e sua expectativa de vida reduz drasticamente. Os fenilcetonúricos parecem normais ao nascer, mas tornam-se seriamente defeituosos com um ano de idade, se não tratados (LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; SHIMAMURA et al., 1999; MIRA et al., 2000).

No Brasil, a prevalência desta doença está na proporção de uma a cada 15.000 recém-nascidos testados (AGUIAR, 2002). Regionalmente, os dados não são completamente conhecidos, mas segundo SCHMIDT (1987), na cidade de São Paulo estima-se que de 1:12.000 a 1:15.000 recém-nascidos sejam portadores de PKU. Em Minas Gerais, a PKU ocorre em um a cada 20.000 recém-nascidos (AGUIAR, 2002).

O tratamento da PKU é dietético e deve ser iniciado, preferencialmente, até os primeiros 21 dias de vida. Este consiste em uma dieta restrita em proteínas, tendo como meta o fornecimento adequado de Phe para garantir o crescimento e desenvolvimento normais. Desta forma, o uso de substitutos protéicos, constituídos de misturas de L- aminoácidos ou de hidrolisados protéicos suplementados com Tyr e outros aminoácidos, além de vitaminas e minerais, torna-se indispensável (STRAYER, 1988; MILUPA, 1995; KANUFRE et al., 2001). Porém, os produtos especiais utilizados no tratamento de PKU são importados e de alto custo, o que justifica o interesse em se desenvolver produtos nacionais de qualidade e, principalmente, com custos mais reduzidos.

Desde 1940 os hidrolisados protéicos vêm sendo utilizados com finalidades terapêuticas para a manutenção do estado nutricional de pacientes impossibilitados de digerir proteínas ou que necessitem de dietas especiais. Entretanto, na década de

setenta esta utilização manifestou expressivo crescimento, que continua ao longo dos últimos anos, tanto por seus aspectos nutricionais e clínicos, como pela melhoria das propriedades funcionais das proteínas (CÂNDIDO, 1998).

Dentre as fontes protéicas que podem ser utilizadas no preparo de suplementos dietéticos para fenilcetonúricos, a caseína tem sido escolhida na maioria dos trabalhos (LOPEZ – BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999; SOARES et al., 2003; LOPES et al., 2004). Entretanto, no Brasil a aquisição desta proteína representa um alto custo por ser importada. Neste sentido, é que se tem buscado fontes protéicas alternativas e de menor custo, especialmente as subutilizadas. O soro de leite, além atender a estes quesitos, também representa uma importante fonte poluidora do meio ambiente pelo seu alto valor de demanda biológica de oxigênio (DBO) (JELEN, 1979; NICOLAU et al., 2003).

Ainda que não existam levantamentos precisos do total de soro produzido pela indústria de laticínios, estima-se que no Brasil cerca de 50% do que é obtido seja despejado diretamente nos rios, sem nenhum tipo de tratamento, causando poluição pelo seu alto teor de matéria orgânica. Para cada mil litros de leite utilizados na fabricação de queijo, são produzidos aproximadamente 820 litros de soro (PETRUS, 2000).

O soro contém os nutrientes mais valiosos do leite do ponto de vista qualitativo. Nele estão presentes a lactose, vitaminas, sais minerais e cerca de 20% das proteínas totais do leite, representadas pela  $\beta$ - lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, imunoglobulinas e albumina. Estas proteínas possuem um alto valor nutritivo e são compostas por todos os aminoácidos essenciais em quantidades adequadas para uma dieta (LORENZEN, 1987; CHIAPPINI & SANTOS, 1995). Devido a esta superioridade nutricional é que se tem buscado cada vez mais alternativas viáveis para o aproveitamento destas proteínas em detrimento de sua subutilização.

Para a obtenção dos hidrolisados de soro de leite, a hidrólise enzimática é geralmente o processo de escolha por ocorrer sob condições mais brandas retendo, assim, uma maior qualidade nutricional (FOEGEDING, 2002). O tratamento enzimático apresenta vantagens sobre a hidrólise alcalina e ácida, entre elas: especificidade, controle do grau de hidrólise, condições moderadas de ação, menor conteúdo de sal no hidrolisado final e formação mínima de subprodutos (MAHHEIM et al., 1992; PEARCE, 1995). Além disso, como as enzimas podem ser empregadas geralmente em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema de reação é freqüentemente

desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (FENNEMA, 1996).

A escolha da enzima proteolítica a ser empregada na preparação dos peptídeos é muito importante, uma vez que sua ação específica irá influenciar a composição final dos produtos de hidrólise, principalmente com relação ao tamanho médio dos peptídeos (KEOHANE et al., 1985; GALLAGHER et al., 1994).

As aplicações para estes produtos incluem: aumento da estabilidade térmica, redução de alergenicidade pela eliminação de epitopos seqüenciais, produção de peptídeos bioativos, redução de tamanho e quantidade de peptídeos para dietas especiais, tais como nutrição esportiva, formulações enterais e hipoalergênicas infantis, e alterações das propriedades funcionais de geleificação, produção de espumas e emulsificação (FOEGEDING, 2002; SIEMENSMA et al., 1993).

As enzimas obtidas de microorganismos suscitam um interesse maior devido às incontáveis possibilidades oferecidas pela flexibilidade genética dos mesmos e às facilidades de recursos para a sua manipulação, além das evidentes vantagens econômicas do seu cultivo (TREVAN et al., 1990; RAO et al., 1998). A triagem de microorganismos capazes de produzir enzimas com as qualidades adequadas para o seu emprego como ferramentas tecnológicas, é a forma tradicional de obtê-las (KUMAR & TAKAGI, 1999).

Como existe o interesse de se investigar potenciais aplicações tecnológicas na indústria de alimentos dos hidrolisados de soro de leite produzidos por proteases fúngicas, é interessante a pesquisa por proteases originadas de fungos já empregados para fins alimentícios, como os utilizados na produção de certos queijos.

A necessidade de se remover a Phe dos hidrolisados protéicos está associada ao fato de que estas preparações podem ser incorporadas à dieta de pacientes com PKU. Vários métodos de remoção de Phe, aminoácido presente em todas as proteínas de origem animal e vegetal, vêm sendo pesquisados (OUTINEN et al., 1996). Os mais utilizados envolvem o preparo de hidrolisados protéicos, com a conseqüente exposição de Phe pela ação de enzimas, e posterior remoção deste aminoácido por filtração em gel, cromatografia de troca iônica, carvão ativado ou resina de adsorção (LOPEZ – BAJONERO et al., 1991; OUTINEN et al., 1996; SHIMAMURA et al., 1999).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram a obtenção de uma preparação proteolítica de *Penicillium candidum*; a padronização das condições de cultivo do fungo; a obtenção de hidrolisados protéicos de soro em pó utilizando a preparação obtida e a remoção da Phe dos hidrolisados pelo tratamento com carvão ativado.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *PENICILLIUM CANDIDUM*

#### 2.1.1. Aspectos gerais do Reino Fungi

Os fungos são organismos muito diversificados e, em muitos casos, pouco relacionados. Apresentam algumas características comuns aos vegetais e outras aos animais, sendo que sua posição entre os seres vivos foi polêmica durante muito tempo. Somente no sistema de classificação em cinco reinos propostos por WITTAKER em 1969, que o grupo adquiriu identidade própria sendo denominado *Reino Fungi* (grego: *sphongos* = esponja; latim = *fungus*).

Os fungos apresentam um conjunto de características morfofisiológicas que permitiram sua diferenciação das plantas. Estes microrganismos possuem pigmentos responsáveis pelas cores variadas que apresentam, porém, nenhum capaz de absorver energia para síntese de carboidratos através da fotossíntese, não apresentam celulose na constituição da parede celular e utilizam glicogênio, ao invés de amido, como substância de reserva (FRAZIER, 1991; JAY, 1994;).

Os representantes do Reino Fungi são eucarióticos podendo ser unicelulares como as leveduras ou multicelulares como os fungos filamentosos ou bolores. Nas leveduras a própria unidade celular desempenha as funções de nutrição e reprodução. Já os bolores são constituídos por elementos multicelulares em forma de tubo, denominados hifas, que podem ser contínuos ou septados. Ao conjunto dessas hifas dá-se o nome de micélio que desenvolve-se no substrato funcionando como elemento de sustentação e absorção de nutrientes. Sendo assim, bolores e leveduras, são heterotróficos nutrindo-se por absorção (GOMPertz et al., 1999).

Em relação às características fisiológicas, os fungos dependem de água líquida para seu crescimento e desenvolvimento. A maioria também depende do oxigênio para a respiração sendo, portanto, aeróbicos. Muitos, entretanto, são anaeróbios facultativos respirando na presença de oxigênio e fermentando na sua ausência, algumas leveduras são exemplos deste comportamento. Conforme a nutrição, os fungos são classificados em duas categorias: saprófitas, que se alimentam de matéria orgânica animal ou vegetal morta e parasitas, que vivem dentro ou sobre organismos vivos deles retirando seus alimentos (FRAZIER, 1991; PELCZAR, 1994; GOMPertz et al., 1999).

### **2.1.2. A classe Deuteromycotina – uma nova classificação**

Na sistemática dos fungos incluídos na classe Deuteromycotina, ou fungos imperfeitos, era aplicado uma metodologia denominada artificial porque os dados morfológicos (formas) ou fisiológicos (coloração, tipo de metabolismo) utilizados para a separação respectiva não correspondiam com a filogenia. O parâmetro utilizado para a inclusão de determinada espécie nesta classe era a ausência ou a não elucidação de um ciclo sexual (TRABULSI et al., 1999).

Nas classificações mais modernas, em substituição à classe Deuteromycete foi introduzido o termo fungo mitospórico aos fungos onde não foi possível uma correlação com qualquer estado meiótico ou teleómorfo e que se reproduzem somaticamente por simples mitoses. Assim, fungos mitospóricos que já tiveram essa relação estabelecida com os ascomicetos ou basidiomicetos (teleomorfos) podem ser denominados anamorfos ou estados anamórficos desses grupos. De uma forma geral, para a maioria dos ascomicetos e basidiomicetos, os estados anamórficos são desconhecidos. Para vários deles os estados anamórficos não foram ainda reconhecidos e em outros, provavelmente antigos anamorfos, parecem ter perdido sexualidade e a fonte de variabilidade, substituída por outros mecanismos como a mutação e o ciclo parassexual (FIGUEIREDO, 2001).

A meta fundamental dessas mudanças teve por objetivo eliminar qualquer possibilidade de que a existência de uma categoria taxonômica formal para fungos cujos ciclos sexuais sejam desconhecidos, pudesse sugerir ou incutir a idéia incorreta de que esse grupo taxonômico pudesse abrigar formas com alguma afinidade de parentesco (FIGUEIREDO, 2001).

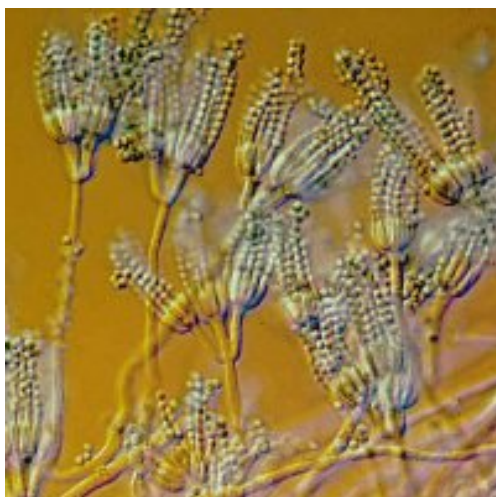
### **2.1.3. Características do gênero e da espécie**

Como características principais, o gênero *Penicillium* apresenta micélios septados, dos quais emergem conidióforos ramificados em forma de leque ou pincel (FIG. 2) e de onde vem a denominação do gênero (do latim *penicillus* = pincel). A morfologia dos conidióforos pode ser simples ou monoverticilada, dupla ou biverticilada e complexa ou poliverticilada, podendo esta última ser simétrica ou assimétrica. A maior parte das espécies de importância para os alimentos é poliverticilada e assimétrica (FRAZIER, 1991; JAY, 1994;).

As espécies do gênero são uns dos principais contaminantes do ar espalhando-se abundantemente na poeira em suspensão, no solo e em vários alimentos como pães e folhados, além de deteriorarem cereais, grãos e causarem a podridão mole de frutas (EVANGELISTA, 1994).

O gênero *Penicillium* é extenso agrupando cerca de 150 espécies. Na fabricação de queijos as espécies *P. roqueforti* e *P. camemberti* são as mais utilizadas (FURTADO, 1990).

A espécie *P. candidum*, de interesse neste trabalho, é o mofo da casca de certos queijos, nos quais, durante a produção, é semeada uma suspensão de esporos deste fungo. O *P. candidum*, também denominado *P. caseicolum*, é considerado um mutante do *P. camemberti* tendo como característica permanecer branco mesmo após a maturação dos esporos. É utilizado na produção dos queijos tipo Camembert e Brie (EVANGELISTA, 1994; FURTADO, 1990).



**FIGURA 2. Morfologia de *Penicillium spp.***

## **2.2. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS MICROBIANAS**

Entre as várias espécies de fungos conhecidamente produtoras de enzimas proteolíticas, ou proteases, as mais estudadas são as pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, e *Penicillium*. O gênero *Penicillium* é rico principalmente em proteases ácidas e pobre nas alcalinas e neutras. Contudo, somente algumas

espécies de *Penicillium* têm sido caracterizadas em relação ao seu sistema proteolítico (CHRZANOWSKA & KOLACZKOWSKA, 1993).

Em seu trabalho CHRZANOWSKA & KOLACZKOWSKA (1993), avaliaram a produção de enzimas proteolíticas de dez espécies de fungos do gênero *Penicillium*, entre elas a espécie *P. candidum*, em cinco diferentes meios de cultura e verificaram que as maiores atividades proteolíticas foram para as espécies *P. candidum*, *P.cyclopium* e *P.piscaricum*, observando que a síntese enzimática é dependente da composição do meio de cultura. NAESSENS & VANDAMME (2003) também observaram que a síntese das enzimas microbianas é dependente de características do meio de cultura como composição, parâmetros físicos-químicos, idade da cultura e presença de agentes indutores ou inibidores. Os autores verificaram, ainda, que múltiplas formas de uma mesma enzima podem ocorrer em uma ampla variedade de microrganismos, e que estas multiformas aumentam a capacidade do microrganismo produtor de se adaptar a alterações ambientais, o que representa uma grande vantagem fisiológica apesar de um aparente gasto desnecessário com a hiperprodução de multiformas de uma enzima.

BENITO et al. (2002), buscando novas utilizações para as enzimas microbianas, purificaram e caracterizaram uma protease extracelular de *Penicillium chrysogenum* ativa contra proteínas de carne para uma possível utilização no processo de cura de produtos cárnicos acelerando o processo de maturação.

Uma das grandes preocupações na utilização destas enzimas é a possível formação de toxinas pelo microrganismo. Entretanto, TEUBER & ENGEL (1983) realizaram um trabalho com 62 cepas de *P. candidum* e *P. camemberti* na maturação de queijos, em condições ótimas para a produção de toxinas, demonstrando que não foram detectadas nenhuma das 16 micotoxinas pesquisadas.

As enzimas de origem microbiana têm demonstrado vantagens em relação à outros tipos de enzimas. MATSUOKA et al. (1991) purificaram uma aminopeptidase extracelular de *P. candidum* observando uma sensível diminuição no amargor de peptídeos hidrolisados de caseína. Além destas enzimas apresentarem um custo menor de produção, por serem produzidas por microrganismos de relativa facilidade de cultivo, e, principalmente, quando são obtidas por fungos já utilizados na produção de alimentos, estas proteases não representariam riscos à saúde.

### 2.2.1 Sistema proteolítico de *Penicillium candidum*

A natureza complexa do sistema proteolítico de *P. candidum* é reconhecida por diversos autores (TSUGO & CHANG, 1970; KIKUCHI & TAKAFUJI, 1971; LENOIR & AUBERGER, 1977; LENOIR et al., 1979; MATSUOKA et al., 1991; CHRZANOWSKA et al., 1995; MECHARKRA et al., 1999;).

TSUGO & CHANG (1970) e KIKUCHI et al. (1971) identificaram a presença de três enzimas apresentando dois valores ótimos de pH. LENOIR & AUBERGER (1977) e LENOIR et al. (1979), caracterizaram o sistema proteolítico do fungo *P. candidum* identificando a presença de dois tipos de proteases, uma ácida e uma neutra. A protease neutra é o principal componente do sistema proteolítico exocelular do fungo. Apresenta massa molecular de cerca de 20.000 Da, pH ótimo entre 5,0 e 6,0, pH ótimo secundário entre 8,5 e 9,5 e temperatura ótima de atividade próxima de 50 °C. Esta enzima foi classificada como sendo uma endopeptidase do grupo das metaloproteases. O segundo componente do sistema proteolítico é uma protease ácida com massa molecular de 35.000 Da. A faixa ótima de pH é entre 3,5 e 5,0 e a temperatura ótima de atividade é próxima de 45 °C.

MATSUOKA et al. (1991) purificaram uma aminopeptidase extracelular de *P. candidum*. A enzima apresentou grande afinidade por vários substratos e foi capaz de clivar resíduos amino-terminais de leucina e Phe de di- e oligopeptídeos.

Em seu trabalho, CHRZANOWSKA et al. (1995) isolaram uma protease de *P. camemberti* identificando-a como sendo uma protease aspártica, de massa molecular de 33.500 Da e com alta especificidade para aminoácidos aromáticos e resíduos hidrofóbicos de aminoácidos. Os autores verificaram que a atividade hidrolítica da enzima é estável em uma faixa de pH de 2,5 a 6,5 e apresenta um máximo de atividade a 50°C.

Segundo MECHAKRA et al. (1999), duas proteases ácidas são produzidas por *P. camemberti* quando cultivado em meios com soro de leite, uma aspartato protease e uma carboxipeptidase ácida. Os autores verificaram um favorável crescimento e, conseqüente produção da protease, quando o fungo é cultivado em meios contendo soro de leite industrial. Observaram, também, que a presença de lactose e de minerais no meio influenciam positivamente no desenvolvimento e na produção das enzimas.

Um outro interesse em se estudar o sistema proteolítico do gênero *Penicillium*, se deve à ampla utilização de certas espécies deste grupo, incluindo o *P. camemberti* e seu mutante *P. candidum*, na maturação de queijos. Por isso o conhecimento das



condições ideais de atividade do seu sistema proteolítico vem contribuindo para uma otimização do processo de obtenção destes queijos (LECLERCQ-PERLAT et al., 2004b).

Em 1996, IWASAWA et al. investigaram a proteólise do queijo Camembert durante sua maturação com *P. candidum*. A degradação das proteínas do leite foi monitorada pela distribuição de nitrogênio e análise de peptídeos. Os resultados mostraram que nos primeiros dez dias de maturação foi observada a maior liberação de aminoácidos livres, em decorrência do aumento da produção da protease pelo fungo. Glutamato, serina e prolina foram os aminoácidos livres mais encontrados, o que sugere, segundo os autores, que a caseína no queijo é degradada a pequenos peptídeos e a aminoácidos livres. Foi observado, também, que a proteólise do queijo Camembert ocorre principalmente na fase inicial da maturação, nos primeiros dez dias, e que o processo ocorre da superfície para o centro do queijo.

Com o objetivo de relacionar a ação de diferentes tipos de fungos com as alterações bioquímicas em queijos maturados, LECLERCQ-PERLAT, et al. (2004a) inocularam queijos fabricados com leite pasteurizado com culturas de diferentes espécies de fungos, entre eles *P. camemberti*. Os autores observaram que os maiores efeitos proteolíticos ocorreram nas amostras inoculadas com *P. camemberti* e *Geotrichum candidum*.

## **2.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS**

### **2.3.1. Aspectos gerais**

O processo de hidrólise enzimática vem se destacando na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, tais como solubilidade, poder emulsificante e textura, apresentando grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios (ABERT & KNEIFEL, 1993; DUARTE et al., 1998).

As proteínas podem ser modificadas por: (1) ataque nucleofílico de outros compostos, como os carboidratos; (2) ligações covalentes e não covalentes entre proteínas produzindo agregados ou polímeros; ou (3) hidrólise em vários graus e por vários agentes, como enzimas, álcalis e ácidos (CHEVALIER et al., 2001; LOSSO & NAKAI, 2002).

Segundo CLEMENTE (2000), o uso de enzimas permite um melhor controle da hidrólise e, com isso, dos produtos resultantes. Enzimas proteolíticas hidrolisam a

ligação peptídica, formando uma mistura de peptídeos de diferentes pesos moleculares e aminoácidos livres. A habilidade da enzima em hidrolisar seu substrato protéico é altamente variável, assim a escolha da enzima mais apropriada para produzir compostos com determinadas características físico-químicas e nutricionais é essencial.

As enzimas proteolíticas são classificadas por seus mecanismos de hidrólise em endopeptidases ou exopeptidases. As primeiras quebram as ligações peptídicas no interior da molécula de proteína, formando peptídeos relativamente grandes. As segundas removem sistematicamente aminoácidos tanto da porção N- quanto C-terminal, hidrolisando as ligações peptídicas terminais (CLEMENTE, 2000).

Quando proteínas de alimentos são hidrolisadas enzimaticamente, mudanças nas propriedades sensoriais podem ocorrer. Estas alterações incluem o desenvolvimento de amargor e outros *off flavors*. O amargor surge da clivagem proteolítica que resulta na formação de peptídeos de sabor desagradável, limitando o uso dos hidrolisados, já que podem ocorrer alterações de *flavor* aos alimentos a que forem adicionados (PEDERSEN, 1994).

Quando as exopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, os produtos podem ter um sabor menos amargo e os aminoácidos livres ou pequenos peptídeos formados podem funcionar como compostos de sabor agradável ou precursores de *flavor* (RAKSAKULTHAI & HAARD, 2003).

Desta forma, fica evidente que o controle dos parâmetros hidrolíticos nas modificações enzimáticas das proteínas constitui uma etapa importante para se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis, e características organolépticas agradáveis ao consumidor (SVENNING et al., 1993; SILVESTRE et al., 1994a; MORATO et al., 2000).

Como resultado da clivagem das ligações peptídicas, as proteínas são quebradas em peptídeos de diferentes tamanhos e em aminoácidos livres. O processo de hidrólise pode ser conduzido por enzimas, ácidos ou álcalis. As hidrólises ácida e básica tendem a ser processos de difícil controle, originando produtos de reduzidas qualidades nutricionais. A hidrólise química pode, ainda, destruir os L-aminoácidos produzindo formas D- e formar substâncias tóxicas como a lisino-alanina (LAHL & GRINDSTAFF, 1989).

A hidrólise enzimática, entretanto, é desenvolvida sob condições mais brandas de pH (6–8) e temperatura (40–60°C), evitando os extremos geralmente requeridos nos tratamentos químicos e físicos minimizando, assim, reações paralelas. Além disso, a

composição total de aminoácidos dos hidrolisados enzimáticos é similar à do material de origem (CLEMENTE et al., 1999).

A hidrólise enzimática é particularmente interessante em relação aos alimentos já que, as condições que se utilizam, reduzem a formação de subprodutos tóxicos. (MADSEN et al., 1997).

Uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática 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 (ADLER-NISSEN, 1981; MINAGAWA et al., 1989). Entretanto, MATSUOKA et al. em 1991 purificaram uma aminopeptidase extracelular de *P. candidum* e observaram que o amargor da fração de peptídeo da caseína péptica, usada como substrato, diminuiu significativamente, desaparecendo após 3 horas da hidrólise.

### **2.3.2. Fatores interferentes**

Vários fatores interferem na hidrólise enzimática refletindo na qualidade e nas características finais do hidrolisado protéico, entre eles encontram-se a natureza e a associação de enzimas, a relação enzima: substrato (E: S), o pH e temperatura da reação, a presença de íons e o tratamento térmico do substrato (ADLER-NISSEN, 1981; CHOBERT et al., 1988).

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 em relação ao tamanho médio dos peptídeos e ao teor de aminoácidos livres (GAUTHIER et al., 1986; 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. Assim, na produção de hidrolisados, enzimas de ampla especificidade têm sido utilizadas em associações, levando a uma hidrólise extensa, com a obtenção de pequenos peptídeos e aminoácidos livres (CHATAUD et al., 1988; SILVESTRE et al., 1993a,b; SILVESTRE et al., 1994 a; MORATO et al., 2000).

A relação E:S exerce influência na velocidade da reação e no tamanho dos peptídeos produzidos ao final da hidrólise (GAUTHIER et al., 1986). Porém, apesar de

se esperar uma relação direta entre o aumento da E:S e o grau de hidrólise, alguns autores têm demonstrado que não há, de forma geral, tal relação. Ocorrendo, em alguns casos, um efeito prejudicial no grau de hidrólise quando a E:S foi aumentada (DELVIVO et al., 2004; SILVA et al., 2005).

A influência da temperatura na hidrólise enzimática pode ser observada em três etapas distintas, a saber: no pré-tratamento do substrato, durante a reação hidrolítica e na interrupção da reação (CARREIRA, 2000). 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. Deste 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).

## **2.4. HIDROLISADOS PROTÉICOS**

O interesse pelo uso de hidrolisados de proteína para propósitos dietéticos tem aumentado desde que foi demonstrado que preparações ricas em pequenos peptídeos obtidos da hidrólise parcial de proteínas são utilizados mais eficientemente que misturas equivalentes de aminoácidos livres (HARA et al., 1984; KEOHANE et al., 1985; GRIMBLE et al., 1986). Vários trabalhos, comparando a absorção de aminoácidos originados da hidrólise enzimática de proteínas com uma mistura equivalente de aminoácidos livres, mostraram que a velocidade de absorção intestinal de aminoácidos é consideravelmente maior para soluções contendo somente di- e tri-peptídeos ou proteína parcialmente hidrolisada do que aquelas contendo apenas aminoácidos livres (ADIBI & MORSE., 1971; ADIBI & SOLEIMAMPOUR., 1974; KEOHANE et al., 1985).

Além disso, o uso destes hidrolisados é especialmente indicado em situações nas quais há intolerância à proteína ou é evidente a deficiência enzimática (BERESTEIJN et al., 1994; GONZÁLEZ-TELLO et al., 1994).

Formulações com hidrolisados são, em geral, bem toleradas por crianças alérgicas a leite de vaca, apesar de já terem sido reportados alguns casos de reações alérgicas a estes compostos (TERRACCIANO, 2002).

Os hidrolisados protéicos apresentam vantagens tecnológicas como melhor solubilidade, estabilidade térmica e uma resistência relativamente alta a precipitação por vários agentes como pH e íons metálicos (FOX et al., 1982). Além de terem diversas aplicações na indústria de alimentos relacionadas às suas propriedades funcionais, uma vez que a hidrólise pode promover melhorias na solubilidade, no poder emulsificante, na textura e em características de aeração e gelificação das proteínas (ABERT & KNEIFEL, 1993; FRØKJAER, 1994).

Os hidrolisados protéicos usados em formulações especiais são compostos de aminoácidos livres, pequenos peptídeos (di- e tripeptídeos) e normalmente não contêm nenhum peptídeo maior que 12 resíduos de aminoácidos (massa molecular próxima de 1500 Da). Para obter tais hidrolisados uma reação seqüencial de endopeptidases e exopeptidases é preferida (CLEMENTE, 2000).

Outras utilizações para os hidrolisados também vêm sendo estudadas. LUCAS et al. (2003) avaliaram os efeitos da adição de três diferentes hidrolisados de caseína e de proteínas do soro na acidificação de leites fermentados e na contagem de células probióticas, já que seu crescimento e sobrevivência são dificultados, principalmente sob refrigeração e estocagem. Os autores verificaram uma redução no crescimento das células probióticas, mas um aumento na sobrevivência destas nos leites suplementados, concluindo que um balanço dos efeitos positivos e negativos observados podem resultar em efeitos benéficos nestes produtos.

MIHATSCH et al. (2002), avaliaram se formulações infantis com hidrolisados protéicos poderiam aumentar a tolerância inicial na alimentação de prematuros quando comparada à formulação padrão sem hidrolisados e se estes poderiam acelerar o progresso na alimentação enteral. Os autores verificaram que os hidrolisados melhoraram a tolerância à alimentação e permitiram um estabelecimento mais rápido da alimentação enteral completa para os prematuros.

## **2.5. SORO DO LEITE**

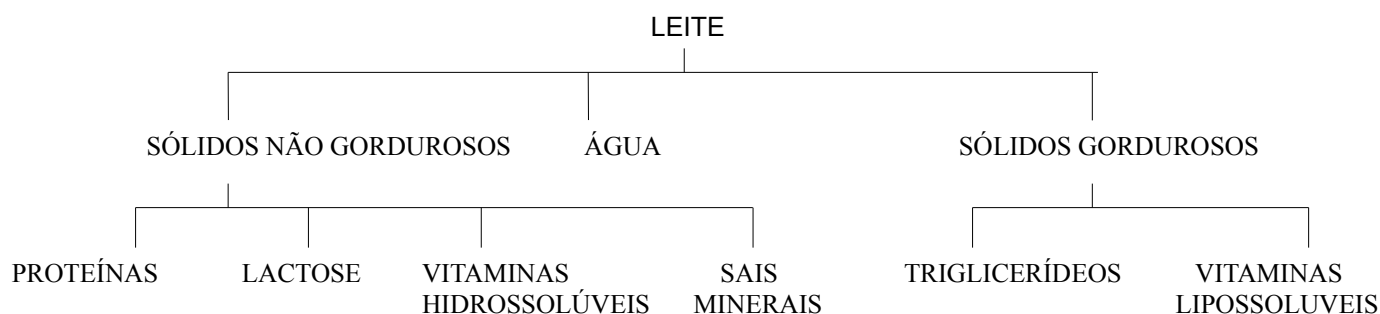
### **2.5.1. Aspectos gerais**

O leite animal se compõe principalmente de água, cerca de 80 a 90%, onde estão dissolvidas ou em suspensão as proteínas, a lactose, os minerais e as vitaminas hidrossolúveis (FIG. 1). A gordura está presente como uma emulsão, distribuída em

minúsculos glóbulos. O aspecto “leitoso” característico se deve, principalmente, às proteínas e sais de cálcio dissolvidos (PORTER, 1981).

O leite é conhecido por ser uma mistura complexa de compostos apresentando bioatividade, a qual confere propriedades especiais para o suporte do desenvolvimento infantil e crescimento. Contém ainda moduladores das funções digestivas e gastrointestinais, fatores hormonais e de crescimento potencialmente capazes de influenciar o desenvolvimento e crescimento do trato gastrointestinal, imunorregulação e modulação da microflora intestinal (TOME & DEHABBI, 1998).

Muitas dessas bioatividades do leite são atribuídas às proteínas e peptídeos secretados no leite pela glândula mamária. As bioatividades de várias dessas proteínas são latentes, estando ausentes ou incompletas na proteína nativa. Somente durante a digestão proteolítica as frações ativas do peptídeo são liberadas do complexo nativo proteína/peptídeo. Estes peptídeos ativos também podem ser formados durante o processamento do alimento (PIHLANTO-LEPPALA, 2000).



Fonte: PORTER (1981).

### FIGURA 1. Composição do leite

A produção de queijos no Brasil tem aumentado progressivamente e vem sendo acompanhada de um aumento no volume de soro. Este subproduto que, embora possuindo considerável valor nutritivo por conter cerca de 20% das proteínas totais do leite, quase todo o teor de açúcar e cerca de 50% dos nutrientes do leite, é subutilizado sendo muitas vezes descartado em fluxos de água ocasionando sérios problemas ambientais (TEIXEIRA, 2002).

Entre os soros naturalmente produzidos, há o soro doce, com maior teor de lactose e pH entre 5 e 7, e o soro ácido, com teor de lactose mais reduzido e pH entre

4 e 5 (BERTOL et al., 1996). A TAB. 1 compara a composição de aminoácidos destes dois tipos de soro.

**TABELA 1. Teores de aminoácidos essenciais das proteínas do soro de leite em g de aminoácidos/100g de proteína**

Aminoácidos	Soro de leite	Soro de leite
	doce	ácido
Lisina	8,8	10,3
Metionina +Cisteína	4,1	4,0
Triptofano	2,4	2,4
Treonina	6,8	4,9
Arginina	2,6	2,8
Fenilalanina+Tirosina	6,2	6,8
Isoleucina	5,9	5,4
Leucina	10,9	10,5
Valina	5,9	5,2

Fonte: Bertol et al. (1996).

Segundo JELEN (1979), entre os resíduos da indústria de alimentos, o soro é considerado um dos mais poluentes e o mais potente dos dejetos lácteos. Isto se deve ao seu alto valor de demanda biológica de oxigênio (DBO), principalmente pelo alto teor de lactose presente. A TAB. 2 apresenta a DBO de alguns resíduos em comparação com a do soro de leite.

**TABELA 2. Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) de alguns resíduos industriais**

Fonte	DBO (mg/L)
<b>Resíduos do processamento de laticínios</b>	
Processamento de leite	1000
Processamento de sorvete	25000
<b>Resíduos brutos</b>	
Soro de leite	80000
Esgoto doméstico	300

Fonte: JELEN (1979).

Entretanto, se visto como uma fonte nutritiva, o soro de leite pode tornar um produto comercial de aplicações alimentícias e farmacêuticas. Um processamento adequado deste efluente pode, assim, transformar um resíduo poluente em produto

comercializável. Por exemplo, o soro em pó hidrolisado com baixas concentrações de gordura e lactose pode ser utilizado na alimentação de atletas. Mas, se a concentração de aminoácidos com resíduos de Phe for consideravelmente reduzida, em geral inferior a 7 mg Phe/g proteína, o hidrolisado resultante pode ser a base da dieta de pacientes fenilcetonúricos (CORSI et al., 2003).

### **2.5.2. Proteínas do soro**

As proteínas são constituintes essenciais do leite e podem ser classificadas em caseína, representando 80%, nas frações  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ -,  $\kappa$ -caseína e em proteínas do soro, representando 20% do total. Deste valor, 50% correspondem à  $\beta$ - lactoglobulina, 22% à  $\alpha$ -lactoalbumina, 12% às imunoglobulinas e 5% à albumina. As estruturas de  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina são típicas das proteínas globulares. Elas apresentam carga negativa no pH do leite (6,6) e têm a seqüência de distribuição dos resíduos hidrofóbicos, polares e carregados mais uniformes que os da caseína. Conseqüentemente estas proteínas dobram-se intramolecularmente internalizando seus grupos hidrofóbicos, reduzindo a interação intra e intermolecular (CONDAK, 1993; FENNEMA, 1996).

As proteínas desempenham várias funções na qualidade e estabilidade dos alimentos. Elas formam filmes interfaciais que estabilizam emulsões e espumas; podem interagir para formar redes associadas a géis, por exemplo, em queijos e carnes; e produzem sóis para bebidas nutricionais. A habilidade das proteínas em desempenhar tais propriedades é chamada de funcionalidade protéica e é dependente não só da composição da proteína, mas também de outros ingredientes e do tipo de processamento (FOEGEDING et al., 2002).

As proteínas do soro podem ser utilizadas na reposição de outras proteínas e para melhoria das propriedades funcionais de alimentos infantis, produtos de panificação, sorvetes, entre outros. A  $\beta$ -lactoglobulina, a principal proteína da fração heterogênea do soro, é considerada a responsável pela maior parte das propriedades funcionais destes produtos (MADSEN & AHMT, 1997).

## **2.6. FENILCETONÚRIA**

### **2.6.1. Considerações históricas**



Em 1934, Folling, médico e bioquímico norueguês, descreveu pela primeira vez uma doença identificando o fenilpiruvato como a substância responsável pelo odor desagradável no corpo e na urina de dois irmãos com retardo mental e que, posteriormente, também foi encontrada em vários pacientes internados com retardo mental. Em 1935, Penrose a caracterizou como uma doença geneticamente transmissível de natureza autossômica recessiva, nomeando-a Fenilcetonúria ou PKU (MARTINS et al., 1993).

### **2.6.2. Aspectos moleculares**

Podem ser encontrados diferentes tipos de hiperfenilalaninemias, de acordo com o erro metabólico envolvido, formando um grupo heterogêneo de doenças.

A PKU clássica é a mais comum das hiperfenilalaninemias e caracteriza-se pela deficiência ou inatividade da enzima fenilalanina-hidroxilase que converte a Phe em Tyr. Acredita-se que esta enzima seja constituída de duas cadeias de polipeptídeos com massa molecular de 54.000 Da cada, sendo que formas multiméricas da enzima foram identificadas, com massas moleculares entre 200.000 e 250.000 Da, sugerindo a existência de uma forma tetramérica (SCRIVER et al., 1997).

O gene que codifica a fenilalanina-hidroxilase está localizado no braço longo do cromossomo 12, sendo composto por 13 exons. Já foram descritas 420 mutações, incluindo polimorfismos, neste gene. Algumas delas causam ausência total da função enzimática, outras estão associadas a uma atividade residual *in vitro* que varia de 2% a 70%. Este espectro contínuo da relação mutação/atividade enzimática, associado às inúmeras possibilidades de combinações (genótipos), pode explicar a variabilidade fenotípica observada (SCRIVER et al., 1997; DA SILVA et al., 2003).

O nível sanguíneo de Phe em fenilcetonúricos pode ser maior que 20 mg/dl e há, também, altas concentrações de fenilcetonas na urina. Quase todos os indivíduos com PKU não tratados desenvolvem um grave retardamento mental progressivo, mas podendo ser prevenido por tratamento precoce. Este consiste na redução de Phe na dieta para manter o seu nível sérico entre 2 mg/dl a 10 mg/dl (MAHAN & ARLIN, 1994).

### **2.6.3. Presença de fenilalanina na dieta**

As proteínas são formadas pela composição de vinte aminoácidos em diversas proporções e cumprem funções estruturais, reguladoras, de defesa e de transporte nos fluidos biológicos (MAHAN & ARLIN, 1994; DUTRA-DE-OLIVEIRA, 1998).

Os aminoácidos considerados essenciais para o homem são aqueles sintetizados no organismo em quantidades inadequadas para satisfazerem as necessidades metabólicas. A Phe é um dos aminoácidos essenciais além da treonina, triptofano, lisina, leucina, isoleucina, metionina, valina e histidina. A ausência na dieta ou a ingestão inadequada de algum destes aminoácidos resulta em um balanço nitrogenado negativo com perda de peso, crescimento menor em crianças e pré-escolares e variada sintomatologia clínica (DUTRA-DE-OLIVEIRA, 1998). Por isso, a Phe também deve estar presente na dieta para PKU em concentrações adequadas a cada indivíduo, o que depende da tolerância individual de acordo com a faixa etária (OUTINEN et al., 1996).

A TAB. 3 mostra a estimativa das exigências nutricionais de aminoácidos nas diferentes faixas etárias.

A Phe é precursora da Tyr, aminoácido responsável pela formação da tiroxina, dos neurotransmissores epinefrina e norepinefrina e também da melanina que é o pigmento responsável pela cor dos cabelos e da pele (MAHAN & ARLIN, 1994; DUTRA-DE-OLIVEIRA, 1998).

Portanto, a terapia nutricional na PKU consiste na restrição da ingestão de proteína, limitando o fornecimento da Phe ao mínimo requerido, entretanto, fornecendo energia e nutrientes adequados para promoverem o crescimento e o desenvolvimento normal (MAHAN & ARLIN, 1994; DUTRA-DE-OLIVEIRA, 1998).

**TABELA 3. Estimativas das exigências nutricionais de aminoácidos nas diferentes faixas etárias**

Aminoácido	Exigências em mg / kg / dia por grupo de idade			
	Lactentes,	Crianças,	Crianças,	Adultos <sup>d</sup>
	Idade 3 - 4 meses <sup>a</sup>	Idade ~ 2 anos <sup>b</sup>	Idade 10 - 12 anos <sup>c</sup>	
Histidina	28	?	?	8 - 12
Isoleucina	70	31	28	10
Leucina	161	73	44	14
Lisina	103	64	44	12
Metionina + Cistina	58	27	22	13
Fenilalanina + Tirosina	125	69	22	14
Treonina	87	37	28	7
Triptofano	17	12,5	3,3	3,5
Valina	93	38	25	10
Total sem histidina	714	352	216	84

Fonte: MAHAN & ARLIN (1994).

<sup>a</sup> Baseado em quantidades de aminoácidos do leite materno, leite de vaca, leite em pó, em níveis necessários ao crescimento.

<sup>b</sup> Baseado no balanço nitrogenado, em níveis suficientes para ganho adequado de tecido (16 mg N / Kg / dia).

<sup>c</sup> Baseado no limite superior das exigências para um balanço nitrogenado positivo.

<sup>d</sup> Baseado no limite superior estimado para atingir o balanço nitrogenado.

#### 2.6.4. Substitutos protéicos

Em pacientes com PKU é necessário o uso de substitutos protéicos sintéticos para o controle dos níveis séricos de Phe. Estes substitutos podem ser divididos em: misturas de L-aminoácidos e hidrolisados protéicos (MILUPA, 1995), sendo os primeiros os mais disponíveis no mercado (SOARES, 2003).

As misturas de aminoácidos apresentam, pelo menos, três limitações à sua utilização, a saber: (1) o gosto e o odor desagradáveis característicos de aminoácidos livres; (2) a alta osmolaridade, o que acarreta um aumento da pressão osmótica intestinal causando diarreia; (3) absorção reduzida, uma vez que, os aminoácidos livres não são tão rápida e completamente absorvidos pelo organismo quanto os hidrolisados protéicos (KITAGAWA et al., 1987; SHIMAMURA et al., 1999).

Ao contrário, as formulações com hidrolisados protéicos contendo di- e tripeptídeos têm uma osmolaridade menor do que as soluções de aminoácidos livres e, por isto, são mais bem toleradas por indivíduos com dificuldade de absorção (FURST et al., 1990; GONZALES-TELLO et al., 1994).

### **2.6.5. Métodos de remoção de fenilalanina**

A escolha de uma fonte protéica isenta de Phe não é possível, uma vez que este aminoácido está presente em todas as proteínas, de origem animal ou vegetal, em proporções que variam de 3% a 6% (OUTINEN et al., 1996). Portanto, é necessário empregar uma metodologia capaz de remover este aminoácido das proteínas e de seus hidrolisados. Os métodos de redução da concentração de Phe são baseados no princípio da liberação deste aminoácido pela hidrólise da proteína alvo e sua remoção por tratamentos específicos (SHIMAMURA et al., 1999).

Com este objetivo, muitos estudos têm sido realizados para definir qual o melhor método para a remoção da Phe de um hidrolisado protéico. Para satisfazer à produção industrial, o método para remover a Phe de uma proteína ou de seu hidrolisado protéico deve ser prático e ter uma adequada relação custo - benefício. Além disso, o produto obtido, deve ser fácil de ser reconstituído e apresentar gosto agradável (OUTINEN et al., 1996).

Diversos laboratórios têm obtido peptídeos com baixo teor de Phe em escala laboratorial e, alguns, em escala piloto. A metodologia empregada para este fim inclui procedimentos diferenciados, tais como o uso de carvão ativado e cromatografia de troca iônica (ARAI et al., 1986; WATANABE et al., 1988; ADACHI et al., 1991; LOPEZ-BAJONERO et al., 1991; MOSZCZYNSKI & IDZIAC, 1993; SOARES, 2003; DELVIVO et al., 2004).

#### **2.6.5.1 Carvão ativado**

O carvão ativado é um carvão moído ou granular, poroso, caracterizado por uma grande superfície de contato (maior que 500 m<sup>2</sup>/g) e com alta capacidade de absorção. Este material pode ser obtido de diferentes fontes, como madeira, lignina e casca de coco (CUNO, 2002). Atualmente o carvão ativado é utilizado em vários processos industriais incluindo tratamento de água, recuperação de solventes, óleos e bebidas alcoólicas (DELVIVO et al., 2004).

O processo de ativação do carvão se dá por duas vias: (1) pirólise, também denominada carbonização, consistindo na queima com temperatura controlada variando de 900 °C a 1100 °C e com baixo teor de oxigênio; (2) ativação química, que combina a carbonização a temperaturas mais baixas variando de 500 °C a 600 °C e a ação de agentes químicos, como ácido fosfórico, cloreto de zinco e carbonato de potássio. Na prática, a ativação por pirólise oferece mais vantagens por produzir um

carvão com poros menores e mais uniformes e por não necessitar de lavagem (CUNO, 2002, citado por DELVIVO, 2003).

#### **2.6.6. Método para determinação de fenilalanina - Espectrofotometria derivada segunda (EDS)**

A EDS é uma técnica analítica de grande utilidade que permite extrair informações qualitativas e quantitativas de várias substâncias (O'HARVER, 1979; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; ROJAS et al., 1998).

ROJAS et al. (1998) apresentaram uma revisão geral dos aspectos da espectrofotometria derivada e o seu uso em análise clínica, química analítica e outras áreas de aplicação.

A EDS tem sido utilizada para determinar resíduos de aminoácidos aromáticos em proteínas. Desta forma, pode-se determinar com rapidez e precisão, os teores de tirosina e triptofano e fenilalanina. Além disto, os custos associados a esta técnica são bem inferiores aos da cromatografia líquida ou CLAE (BRANDTS & KAPLAN, 1973; MATSUSHIMA et al., 1975; CAHILL & PADERA, 1980).

MATSUSHIMA et al. (1975) analisaram resíduos de aminoácidos aromáticos em proteínas utilizando espectrofotometria derivada segunda. Os resultados obtidos mostraram que a EDS é uma técnica muito útil e confiável para medir resíduos de Phe em proteínas.

ICHIKAWA & TERADA (1977, 1979, 1981a,b) realizaram vários estudos demonstrando a eficiência da EDS para medir Phe em proteínas ou em hidrolisados protéicos. Primeiramente, examinaram resíduos de Phe em proteínas e demonstraram que entre 245 nm e 270 nm os resíduos dos aminoácidos tirosina e triptofano não causam interferência significativa nas propriedades absorptivas da Phe. Posteriormente, determinaram a Phe em proteínas desnaturadas por EDS, entre 245 nm e 270 nm. O valor encontrado concordava com os reportados na literatura. Depois, publicaram um trabalho demonstrando a influência do pH na determinação dos aminoácidos Phe, tirosina e triptofano por EDS. Para tanto, usaram ésteres N-acetil etil destes aminoácidos, e foram medidos em vários valores de EDS, em pH 7 e 13. Em seguida, mostraram o efeito do dodecil sulfato de sódio (DSS) nas propriedades espectrais de resíduos de Phe detectados por EDS, deixando claro as mudanças que ocorreram nas propriedades da Phe em soro de albumina bovina.

Vários autores reportam a grande confiabilidade do uso de EDS, entre 245 nm e 270 nm para quantificar resíduos de Phe em proteínas, controlando variáveis como, por exemplo, o pH (BRANDTS & KAPLAN, 1973; MATSUSHIMA et al., 1975; O'HARVER, 1979; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a,b; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; CAHILL & PADERA, 1980; ROJAS et al., 1998).

Outras aplicações qualitativas e quantitativas para a EDS foram desenvolvidas por SILVESTRE et al. (1993 b), que empregaram esta técnica para a determinação do grau de hidrólise de hidrolisado de caseína, como também para a análise das alterações da cadeia protéica, em torno dos resíduos aromáticos que normalmente ocorrem ao se romper a estrutura nativa durante a hidrólise enzimática.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. MATERIAL**

#### **3.1.1. Soro de leite**

Foi utilizado o soro de leite em pó fornecido pela empresa Prolácteos Indústria e Comércio Ltda, localizada em Contagem, Minas Gerais.

### **3.1.2. Leite em pó**

Foi utilizado leite em pó desnatado e suplementado com vitaminas da marca Itambé, Sete Lagoas, Minas Gerais.

### **3.1.3. Microrganismo**

A cultura de *P. candidum* utilizada neste projeto foi previamente isolada de um queijo Camembert comercial, sendo mantida no banco de cepas do Laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia da Faculdade de Farmácia da UFMG.

### **3.1.4 Equipamentos**

Foram utilizados os seguintes equipamentos do Laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia da UFMG: Incubadora com agitação MARCONI, Banho Maria HM 1003 (Hemoquímica, Contagem), Centrífuga T23 (Janetzki, Engelsdorf), Centrífuga refrigerada 2K15 (Sigma, Alemanha), Autoclave vertical 415 (Fanem, São Paulo) e pH/metro (Quimis, São Paulo). E os aparelhos do Laboratório de Bromatologia da UFMG Centrífuga refrigerada (Jouan, França), Banho Maria (Fanem, São Paulo), espectrofotômetro (CECIL modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra) acoplado ao computador com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA) e Centrivap (Labconco, EUA).

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1 Manutenção do cultivo do fungo**

A cultura do fungo foi mantida em Ágar Batata Dextrosado inclinado (Acumedia), suplementado com extrato de malte a 1% e extrato de levedura a 0,5%, em tubos de

cultura de 18 mm x 180 mm, fechados com rolhas de algodão. Após incubação em temperatura ambiente por sete dias, os cultivos eram mantidos em geladeira a 4°C.

### **3.2.2 Determinação das condições de cultivo do fungo**

Com o objetivo de determinar as condições ideais de cultivo do fungo *P. candidum* para uma melhor produção das enzimas proteolíticas, foram testados diferentes períodos de incubação, variando de 1 dia a 11 dias, e a suplementação do meio com soro de leite e leite em pó desnatado e enriquecido com vitamina A e cálcio.

O efeito do tempo de incubação e da suplementação do meio foram avaliados pela determinação da atividade proteolítica nos extratos obtidos pelo cultivo do fungo no meio semi-sólido à temperatura ambiente.

### **3.2.3 Meio semi-sólido para a produção de proteases pela cepa de *Penicillium candidum***

O meio de cultivo semi-sólido para a produção de proteases pela cepa de *P. candidum* foi constituído de 20 ml de solução de sais (SALLEH et al., 1993), composta de 0,1% de NaNO<sub>3</sub>, 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,05% MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, suplementada com 5% de leite integral desnatado em pó ou 5% de solução de soro de leite, adicionada a 14g de casca de arroz lavada e seca e 7g de farelo de trigo. A composição do meio de cultivo foi previamente otimizada no laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise (GOMES et al., 2002). O meio semi-sólido foi preparado em frascos de vidro de boca larga com capacidade para 300 ml que, depois de fechado com gaze, algodão e coberto com coifa de papel Kraft, eram agitados para a adequada homogeneização do conteúdo. Os meios eram autoclavados a 121°C por 20 min.

### **3.2.4 Preparo do inóculo**

Cultivos de sete dias da cepa de *P. candidum* em ágar batata dextrosado inclinado foram usados para o preparo de uma suspensão concentrada de esporos em água destilada estéril. Eram selecionados três tubos com cultivos de maior crescimento e, em condições estéreis, vertia-se 10 ml de água destilada



estéril no tubo 1 agitando manualmente, o conteúdo deste tubo era vertido no tubo 2, agitado e transferido ao tubo 3, vertendo a suspensão em béquer estéril. O processo era repetido com mais 10 ml de água destilada estéril. Eram inoculados 2 ml da suspensão de esporos, recolhida em béquer, no meio semi-sólido utilizando pipeta estéril de vidro.

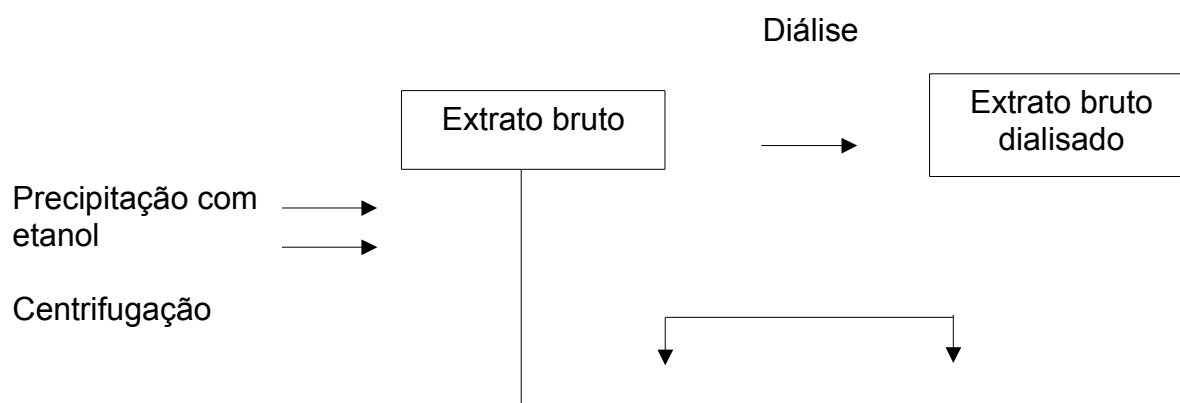
### 3.2.5 Extração do cultivo

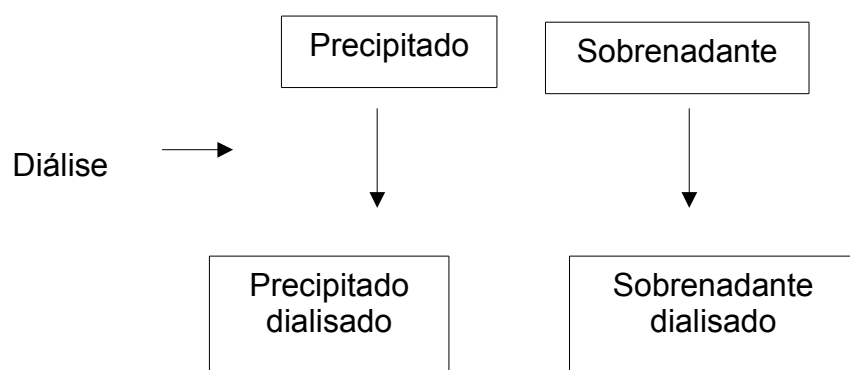
Os frascos com os cultivos incubados por cinco dias eram submetidos a uma extração com 100 ml de água destilada, por agitação recíproca em incubadora MARCONI por 30 min. A seguir, a mistura era filtrada por gravidade em papel de filtro qualitativo adaptado a funil de vidro, para a obtenção do extrato aquoso límpido contendo a preparação enzimática. O resíduo retido no filtro era esterilizado e descartado.

### 3.2.6 Concentração das proteases

As enzimas proteolíticas foram concentradas por precipitação com etanol, segundo metodologia adaptada de RÚA (1993).

No filtrado obtido, denominado extrato bruto, foi medido seu volume e adicionou-se dois volumes equivalentes de etanol a 4°C. A adição foi feita sob agitação constante em banho de gelo mantendo a temperatura próxima de 4°C, por 40 min. Após a agitação, a mistura foi submetida à centrifugação a 2.660 x g por 35 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspenso em água destilada. A FIG 3 representa o fluxograma de precipitação.





**FIGURA 3. Fluxograma de precipitação das proteases pelo uso do etanol**

As diálises do extrato bruto, precipitado e sobrenadante foram feitas através de membrana de diálise contra água destilada, por 24 horas, em geladeira.

Os produtos obtidos da precipitação, depois de testados, eram estocados em freezer.

### **3.2.7 Determinação da atividade proteolítica**

Foram testados diferentes valores de pH em uma faixa de 3,6 a 7,6 na metodologia de determinação da atividade proteolítica da preparação enzimática obtida do cultivo de *P. candidum*.

#### **3.2.7.1 Substrato**

O soro de leite em pó, utilizado como substrato para a determinação da atividade proteolítica, foi dissolvido em tampão acetato pH 5,0 e dialisado por 24 horas contra água destilada.

#### **3.2.7.2 Metodologia**

A determinação da atividade proteolítica foi feita pelo método espectrofotométrico descrito por KAKADE et al. (1969), adaptado, empregando solução de soro de leite como substrato. Adicionou-se em diferentes tubos de ensaio 1,0 ml do

extrato bruto, do precipitado e do sobrenadante, completando o volume para 2,0 ml com as soluções de tampão fosfato ou acetato de acordo com o valor de pH testado. Ao branco da reação era adicionado 6,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. A reação enzima-substrato foi conduzida em banho-maria a 30°C por 20 min, após este período foi feita a precipitação da proteína residual, no meio de reação enzimática, com 6 ml de TCA a 5% por 1 hora a temperatura ambiente. A absorbância do produto hidrolisado foi lida a 280 nm nos sobrenadantes límpidos, previamente centrifugados a 2.660 x g por 15 min e filtrados em papel de filtro.

Os valores de atividade proteolítica foram dados em Unidade de Enzima Proteolítica (UE), por unidade de volume do extrato, sendo definida pela equação (1):

$$UE = (A_{280}^{3/2}) \times 100 \quad (1)$$

### **3.2.8 Dosagem de proteína pelo método de Lowry**

As dosagens de proteínas foram feitas segundo o método de LOWRY et al. (1951) conforme descrito por PETERSON (1983) utilizando albumina de soro bovina como proteína padrão.

### **3.2.9 Preparo dos hidrolisados de soro de leite**

A preparação enzimática utilizada na hidrólise foi preparada por secagem do precipitado dialisado em Centrivap por 3 horas.

Foram testadas três relações enzima: substrato, variando a concentração da preparação enzimática em 1%, 2% e 4%. O substrato foi uma solução de 2,65% (p/v) de soro de leite em pó. E três temperaturas de hidrólise de 30°C, 40°C e 50°C.

Foram preparados nove hidrolisados enzimáticos. A solução de soro de leite em pó a 2,65% (p/v), com concentração protéica de 0,125%, foi preparada em água destilada. A preparação enzimática seca foi pesada e adicionada às soluções de soro

de leite em quantidades suficientes para se obter as relações E:S desejadas de 1%, 2% e 4%.

O tempo total de hidrólise foi de 5 h para todas as amostras, segundo a metodologia já empregada no Laboratório de Bromatologia/ Setor de Pesquisa da UFMG (DELVIVO et al., 2004; SILVA et al., 2005). A temperatura da hidrólise de cada hidrolisado foi controlada em banho-maria. Após este período, a reação foi interrompida pela redução do pH para 2,0 pela adição de ácido fosfórico.

As condições de hidrólise empregadas estão apresentadas na TAB. 4 onde, na designação dos hidrolisados, os dois primeiros números correspondem à temperatura e o último número indica a concentração da preparação proteolítica utilizada no processo de hidrólise

**TABELA 4. Parâmetros hidrolíticos empregados no preparo dos hidrolisados de soro de leite em pó pela ação da preparação enzimática de *P. candidum***

Hidrolisado	Temperatura (°C)	E:S (%)
H301	30	1
H302	30	2
H304	30	4
H401	40	1
H402	40	2
H404	40	4
H501	50	1
H502	50	2
H504	50	4

### 3.2.10 Remoção da fenilalanina dos hidrolisados de soro de leite

A remoção de Phe foi feita pelo tratamento dos hidrolisados protéicos em colunas de carvão ativado. O carvão foi hidratado, na relação de 0,8 g de carvão em 25 ml de água purificada, sob agitação por 10 min e colocado em seringa descartável de 20 ml contendo filtro de nylon com lã de vidro. A solução de hidrolisado foi preparada com 3,02 ml do hidrolisado em 10 ml de água filtrada e aplicada à coluna recolhendo-se o eluato e filtrando-o em papel de filtro qualitativo (Whatman, número 1, Maidstone, Inglaterra). Os procedimentos foram realizados empregando-se a metodologia desenvolvida no Laboratório de Bromatologia/ Setor de Pesquisa da Faculdade de Farmácia da UFMG (SOARES, 2003).

### 3.2.11 Determinação da remoção de fenilalanina – uso da espectrofotometria derivada segunda

A avaliação da eficiência de remoção de Phe pelo carvão ativado nos hidrolisados foi feita pela medida do teor de Phe livre, utilizando a técnica desenvolvida no Laboratório de Bromatologia/Setor de Pesquisa da UFMG, baseada na Espectrofotometria Derivada Segunda (EDS) (O'HARVER, 1979; ICHIKAWA & TERADA, 1977, 1979, 1981a,b; GRANT & BHATTACHARYYA, 1985; SILVESTRE et al., 1993; ROJAS et al., 1998).

O teor de Phe livre corresponde à Phe que foi liberada pela hidrólise ácida dos hidrolisados enzimáticos. Foram adicionados 800 µl da solução de cada hidrolisado de soro tratada pelo carvão ativado em tubos de borossilicato, e evaporadas em Centrivap até obtenção de um resíduo. A hidrólise ácida foi conduzida pela adição de 300 µl de solução de HCL 5,7 mol/L a tubos de penicilina contendo os tubos de borossilicato de cada hidrolisado evaporado, feito vácuo por 30 min e incubados a 110°C por 24 h. Após este período, os resíduos dos hidrolisados foram reconstituídos em água purificada para 10 ml, filtrados em papel de filtro qualitativo e ajustado o pH para 6,0 com solução de fosfato de sódio bibásico.

A determinação da Phe pela EDS foi conduzida pela preparação de uma curva-padrão de Phe na presença de Tyr e Trp. Soluções estoque desses aminoácidos aromáticos foram preparadas em tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L (pH 6,0), nas concentrações de  $6,05 \times 10^{-4}$  mol/L (Phe),  $5,52 \times 10^{-4}$  mol/L (Tyr) e  $4,90 \times 10^{-4}$  mol/L (Trp). Em seguida pipetou-se 10 ml de cada uma destas soluções adicionando-as em um béquer de 50 ml homogeneizando por agitação. Foram preparadas, por diluições sucessivas, soluções contendo diferentes concentrações de Phe (variando de 0,067 mol/L a  $2,018 \times 10^{-4}$  mol/L) a partir da solução inicial. Essas soluções foram lidas por absorbância na faixa de 250 nm a 280 nm. Os espectros de derivada segunda foram traçados em computador com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA), acoplado ao espectrofotômetro. Dos quatro picos negativos obtidos, foram utilizados os valores de área e altura do 3° e 4° picos para traçar a curva-padrão em função da concentração de Phe.

Para determinar o teor de Phe livre nas amostras de hidrolisados, traçaram-se os espectros das soluções obtidas após a hidrólise ácida na mesma faixa de comprimento de onda da curva-padrão. Posteriormente, traçaram-se os espectros de

derivada segunda levando os valores de área e altura dos 3° e 4° picos à curva-padrão para determinação da concentração de Phe.

A eficiência da remoção de Phe foi calculada pela equação (2):

$$\% \text{ Remoção de Phe} = \frac{\text{Teor de Phe inicial} - \text{Teor de Phe final}}{\text{Teor de Phe inicial}} \times 100 \quad (2)$$

sendo,

Teor de Phe inicial = teor de Phe no soro de leite em pó

Teor de Phe final = teor de Phe no hidrolisado após tratamento com carvão ativado.

### 3.2.12 Conversão do teor final de Phe dos hidrolisados para uma dieta normoprotéica

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2002) o limite máximo do teor de Phe nos produtos para fenilcetonúricos é de 100 mg de Phe por 100 g de produto final. Para uma adequação à esta norma, os hidrolisados obtidos que apresentaram o teor final de Phe acima desses valores estabelecidos pela legislação foram convertidos para uma dieta normoprotéica constituída de 10% de proteína, conforme a equação (3). Na equação foi considerado o teor de proteína do soro de leite de 12%.

12g de proteína (100g de produto)		teor final de Phe em mg do hidrolisado
10g de proteína		<b>X (teor de Phe, em mg)</b>

(3)

### 3.3 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para a avaliação das condições de cultivo, avaliação da remoção e teor de Phe e demais parâmetros estudados, realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Duncan a 5% de probabilidade e as curvas-padrão foram obtidas por análise de regressão (PIMENTEL-GOMES, 2000).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

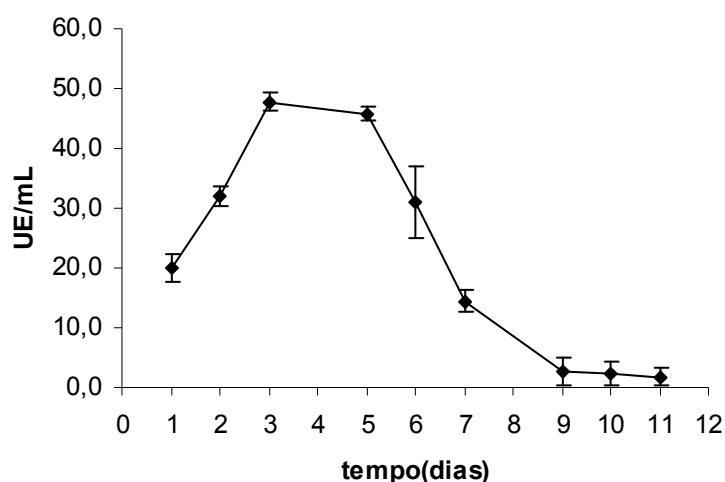
### **4.1 Determinação das condições de cultivo do fungo**

#### **4.1.1 Influência do tempo de incubação sobre a atividade proteolítica**

Os cultivos em meio semi-sólido foram incubados a temperatura ambiente e os extratos, denominados extratos brutos, foram obtidos com 1 a 11 dias de incubação. Foi determinada a atividade proteolítica de cada extrato bruto e os resultados estão representados na FIG.4.

Os maiores valores de atividade (entre 45 EU/ml e 50 EU/ml) foram obtidos entre o 3º e o 5º dia de incubação. Porém, o tempo de 5 dias foi o escolhido por

associar valores significativos de atividade com um crescimento expressivo do micélio. Não foram encontrados dados da literatura avaliando a influência do tempo de incubação com a atividade proteolítica das enzimas de *P. candidum*. Um trabalho relacionando a produção de proteases ao longo do tempo foi descrito por TRIEU-CUOT & GRIPON (1982). Entretanto, os autores avaliaram a proteólise de um queijo Camembert durante a maturação, identificando a presença da metaloprotease de *P. candidum* após 7 dias de maturação.



**FIGURA 4.** Influência do tempo de incubação de *P. candidum* sobre a atividade proteolítica da preparação enzimática

#### **4.1. 2 Influência da suplementação do meio de cultivo de *P. candidum* com soro de leite e leite em pó**

O efeito da suplementação da solução de sais, utilizada na preparação do meio semi-sólido, com soro de leite em pó e leite em pó desnatado e enriquecido com vitamina A e cálcio está apresentado na TAB. 5

Apesar do leite ser um meio nutricionalmente mais completo, pelos dados apresentados na tabela não foi possível comprovar diferenças significativas nas atividades proteolíticas dos extratos suplementados com os dois substratos ( $p > 0,05$ ). Optou-se, portanto, pelo leite por ser uma matéria prima de mais fácil aquisição.



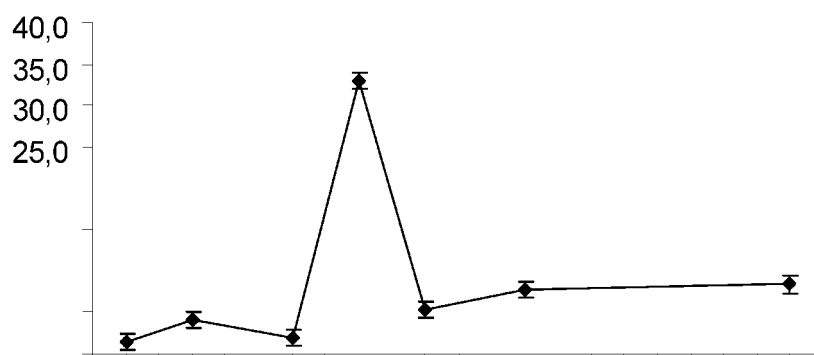
**TABELA 5. Comparação entre os meios suplementados com soro de leite e leite em pó**

<b>EXTRATO</b>	<b>SORO UE/mL</b>	<b>EXTRATO</b>	<b>LEITE UE/mL</b>
<b>1</b>	21,09	<b>6</b>	14,44
<b>2</b>	10,32	<b>7</b>	12,09
<b>3</b>	34,07	<b>8</b>	32,36
<b>4</b>	32,59	<b>9</b>	24,56
<b>5</b>	24,65	<b>10</b>	20,34
<b>MÉDIA ± DP</b>	24,54 ± 9,61		20,76 ± 8,13

DP: Desvio padrão

### 4.1.3 Influência do pH sobre a determinação da atividade proteolítica

A influência do pH sobre a atividade enzimática está representada na FIG. 5. Foram estudados diferentes valores de pH na metodologia de determinação de atividade proteolítica. O pH ótimo de ação ficou próximo de 5,0. Resultado semelhante aos encontrados por LENOIR & AUBERGER (1977) que avaliaram a influência de diferentes substratos sobre a atividade proteolítica das enzimas de *P. candidum*. Os autores encontraram valores ótimos de pH entre 4,6 e 6,0 conforme o tipo de substrato utilizado concluindo que os valores ótimos de pH variam de acordo com a natureza do substrato, sendo sempre observados dois máximos em diferentes valores de pH. Este padrão é explicado pela presença, no sistema proteolítico do fungo, de dois grupos de proteases, um ácido e um neutro, tendo esse último uma atividade maior em meio neutro e fracamente alcalino.



**FIGURA 5.** Influência do pH sobre a atividade proteolítica da preparação enzimática com o soro de leite como substrato

## 4.2 OBTENÇÃO DA PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA

### 4.2.1 Purificação do extrato bruto – avaliação do efeito de diferentes volumes de etanol

Foi testada a precipitação da preparação enzimática com dois, três e quatro volumes de etanol a 4°C. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de atividade proteolítica ( $p > 0,05$ ) sendo, portanto, escolhida a precipitação com dois volumes de etanol por representar um menor custo no processo. Os resultados obtidos, comparando os três volumes de etanol, estão apresentados na TAB. 6. Os valores foram dados em unidade enzimática específica, UE/mg proteína, dada pela razão entre a UE proteolítica e o teor de proteína da preparação proteolítica.

**TABELA 6. Comparação da precipitação por diferentes volumes de etanol**

Volume de etanol	Preparação proteolítica	
	Precipitado (EU/mg prot)	Sobrenadante (EU/mg prot)
2	25,99	12,96
3	24,93	11,53
4	24,87	11,57

Os resultados representam a média das triplicatas.

### 4.2.2 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica e a concentração de proteína foram determinadas no extrato bruto, no precipitado e sobrenadante dialisados por 24 horas. A fim de obter um padrão de purificação, foi montado a TAB. 7, onde os resultados estão apresentados.

Os resultados mostram que a precipitação com etanol possibilitou uma recuperação de cerca de 70% da atividade proteolítica presente no extrato bruto. Valor menor que o encontrado por RÚA et al. (1993) que, utilizando dois volumes de etanol para purificação parcial de lípase de *Candida cylindracea*, conseguiram uma recuperação de 84% de atividade em relação ao extrato bruto. A diferença entre estes dois dados pode ser explicada por se tratarem de enzimas diferentes, uma protease e uma lípase, que podem ter comportamentos bioquímicos diferentes durante a precipitação com etanol.

Os dados da tabela permitem verificar que houve uma perda de cerca de 23% na recuperação provavelmente associada a perdas que podem ter ocorrido durante a diálise. A ação desnaturante do etanol também poderia explicar tal diferença na recuperação. Os dados demonstram, também, que a atividade específica foi concentrada no precipitado em cerca de duas vezes (de 30,6 EU/mg para 62,1 EU/mg) na purificação do extrato bruto. Resultado semelhante aos descritos por RÚA et al. (1993) que observaram um aumento de 65 UL/mg prot para 120 UL/mg prot na atividade da enzima pela precipitação com etanol.

**TABELA 7. Efeito da precipitação com etanol sobre a atividade proteolítica**

<b>Preparado Proteolítico</b>	<b>Volume (ml)</b>	<b>Proteína por ml (mg/ml)</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Atividade por ml</b>	<b>Atividade Total (UL)</b>	<b>Atividade específica (UL/mg prot)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Extrato bruto</b>	100	2,9	292,0	89,4	8939	30,6	100
<b>Precipitado</b>	50	2,0	101,5	126,1	6304,5	62,1	70,5
<b>Sobrenadante</b>	50	0,4	19,5	10,6	531	27,2	5,9

### 4.3 REMOÇÃO DA FENILALANINA DOS HIDROLISADOS DE SORO DE LEITE

Pelos dados apresentados na TAB. 8 e FIG. 6 observa-se que o uso do carvão ativado foi eficiente para remoção de Phe das soluções de soro de leite em pó hidrolisadas pela preparação enzimática de *P. candidum*. O percentual de remoção variou de 70,8% a 93,7% e o teor final de Phe de 311 mg a 71,2 mg Phe/100g de hidrolisado. Os maiores valores de remoção foram obtidos nos hidrolisados H404 e H501, com 92,7% e 93,7% respectivamente. Entretanto, esses valores não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), indicando que a escolha da condição ideal de hidrólise dependerá da conveniência no processo utilizado, ou seja, se um menor custo estaria na utilização de uma temperatura mais baixa, no caso 40° C, ou na utilização de uma menor concentração da preparação enzimática (1%).

Vários autores têm demonstrado a eficiência do uso do carvão ativado na remoção de Phe dos hidrolisados protéicos. LOPES et al. (2004) e SOARES et al. (2003), relataram níveis de remoção de 93,6% a 99% empregando as mesmas condições de tratamento com carvão ativado. DEL VIVO et al. (2004) utilizando solução de soro de leite em pó como substrato atingiram porcentagens de remoção de 75% a 99%, utilizando pancreatina e o tratamento com carvão ativado. LOPEZ-BAJONERO et al. (1991) conseguiram remover 92% da Phe de hidrolisados protéicos de leite em pó desnatado e caseinato de sódio obtidos pela ação da papaína e de uma protease de *Aspergillus oryzae* e tratados com carvão ativado.

Os resultados foram apresentados em termos de porcentagem de remoção de Phe e de teor final de Phe em 100 g do hidrolisado. A legislação brasileira, através da regulamentação técnica que normatiza a rotulagem nutricional de alimentos (ANVISA, 2003), recomenda a descrição das prescrições dietéticas de substitutos protéicos para fenilcetonúricos em termos de teor final de Phe em 100 g do hidrolisado, sendo, portanto, a forma de escolha para a apresentação neste trabalho.

**TABELA 8. Teor final de Phe dos hidrolisados de soro de leite em pó após tratamento com carvão ativado**

<b>Hidrolisados</b>	<b>Teor final de Phe (mgPhe/100g de hidrolisado)</b>
H301	301,6
H302	311,0
H304	282,2
H401	138,2
H402	127,6
H404	82,9
H501	71,2
H502	106,9
H504	110,1

Os resultados representam a média das triplicatas.

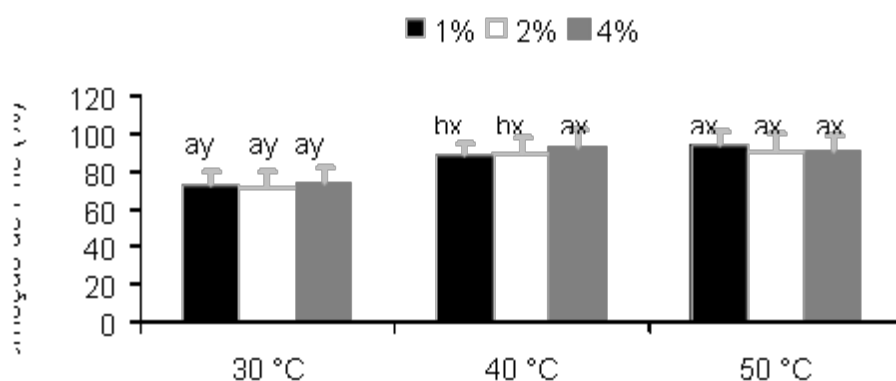
Considerando uma formulação dietética para fenilcetonúricos contendo apenas o hidrolisado do soro de leite, o teor de Phe por 100 g de produto variaria de 71,2 mg a 311,0 mg. A legislação brasileira (BRASIL, 2002) estabelece que o limite máximo do teor de Phe é de 100 mg de Phe por 100 g de produto, portanto, apenas os hidrolisados H404 e H501 estariam de acordo com a legislação. Porém, de maneira geral, as formulações dietéticas normoprotéicas contêm de 10% a 15% de proteína (WAITZBERG, 2000) que, nesse caso, sendo fornecidas pelo hidrolisado do soro de leite, que apresenta cerca de 12% de proteína, o teor de Phe por 100 g de produto cairia para 69,1 mg, 59,3 mg, 89,1mg e 91,7 mg nos hidrolisados H404, H501, H502 e H504, respectivamente, conforme exemplificado na equação (3) e no apêndice A. Estes valores, portanto, se adequariam aos limites estabelecidos pela legislação.

## 4.4 EFEITO DOS PARÂMETROS HIDROLÍTICOS SOBRE A REMOÇÃO DE FENILALANINA

### 4.4.1 Relação E:S

Observa-se na FIG. 6 que a 30°C as três E:S não apresentaram diferenças significativas quanto à remoção de Phe ( $p > 0,05$ ). Também não foram verificadas diferenças para as amostras hidrolisadas à 50°C. Somente à 40°C as três concentrações da enzima forneceram resultados diferentes de remoção ( $p < 0,05$ ) sendo que a E:S de 4% forneceu média maior que as das E:S de 1% e 2% que não diferiram entre si. Em seu trabalho, DELVIVO et al. (2004) avaliaram o efeito do aumento da E:S sobre a remoção de Phe de hidrolisados de soro de leite. Os autores observaram que a elevação em dez vezes da E:S foi benéfica em três dos quatro grupos avaliados. Enquanto em um grupo houve queda no teor de remoção.

Quando o parâmetro da relação E:S é analisado, o esperado é que um aumento nessa relação seja acompanhado por um aumento no grau de hidrólise. Contudo, trabalhos vêm demonstrando que, na prática, esse procedimento é mais complexo do que o teoricamente esperado e que o efeito da E:S sobre a remoção de Phe depende de diversos fatores, como o tipo de enzima, de substrato e da temperatura de hidrólise (DEL VIVO et al., 2004; BIZZOTO, 2005).



a, b: correspondem a comparação das médias para o parâmetro concentração da preparação enzimática  
x,y: correspondem a comparação das médias para o parâmetro temperatura de hidrólise

**FIGURA 6. Avaliação dos parâmetros de temperatura e concentração da preparação enzimática na remoção de Phe**



#### 4.4.2 Influência da temperatura

A avaliação da influência da temperatura demonstrou que a hidrólise à 30°C forneceu as menores porcentagens de remoção, sendo que a melhor faixa ficou entre os valores de 40°C e 50°C. Alguns autores relataram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. LENOIR & AUBERGER (1977) e LENOIR et al. (1979), avaliaram a influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica das proteases ácida e neutra de *P. candidum*, concluindo que à medida que se eleva a temperatura a atividade proteolítica tende a aumentar até um valor máximo próximo de 50°C, para os dois grupos de proteases. BENITO et al. (2002) também avaliaram a atividade proteolítica de uma enzima purificada de *Penicillium chrysogenum* sob diversas condições de temperatura, demonstrando que a faixa de maior atividade foi entre 40°C e 55°C.

Para o parâmetro temperatura, foi verificado que seu aumento foi acompanhado por uma elevação no grau de hidrólise e por uma conseqüente maior exposição dos aminoácidos permitindo uma maior remoção da Phe. Porém, segundo (KILARA, 1985), o aumento da temperatura reduz gradativamente o tempo requerido para atingir um determinado grau de hidrólise até o momento em que a inativação enzimática pelo calor torna-se significativa. Desse modo, se por um lado as temperaturas mais elevadas aumentam o rendimento das reações enzimáticas, por outro podem provocar a inativação da enzima, comprometendo o processo de hidrólise (FENNEMA, 1996).

DELVIVO et al. (2004), avaliaram o efeito da temperatura sobre a remoção de Phe dos hidrolisados de soro de leite observando que este parâmetro influenciou na remoção de Phe, sendo que um aumento de 25°C para 50°C foi benéfico para a maioria dos grupos estudados.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A preparação enzimática obtida do fungo *P. candidum* foi eficiente no processo de hidrólise da solução do soro de leite. O cultivo de cinco dias, suplementado com uma solução de leite em pó desnatado e enriquecido com vitamina A e cálcio foi o mais eficaz para a obtenção da preparação proteolítica. O valor ótimo de pH foi de 5,0 e as temperaturas ótimas de atividade do preparado enzimático foram de 40°C e 50°C.

O uso do carvão ativado mostrou-se eficiente na remoção de Phe dos hidrolisados obtidos, atingindo-se valores próximos de 90% de remoção.

A variação da temperatura influenciou o processo de hidrólise, podendo ser observado um aumento da remoção de Phe com o aumento da temperatura. Entretanto, não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração da preparação enzimática e o grau de hidrólise. Sugere-se aqui um estudo mais detalhado da relação destes parâmetros com o grau de hidrólise, a fim de se estabelecer qual parâmetro apresenta maior influência para que, numa escala industrial, seja possível a escolha da melhor condição de hidrólise, tanto em termos econômicos quanto em qualidade do produto final.

Baseado nestes resultados seria interessante o desenvolvimento de um estudo para a purificação da protease específica envolvida na hidrólise do soro de leite, já que o fungo produz diversas enzimas proteolíticas.

Um outro interesse seria a utilização de outros substratos para a produção de hidrolisados com a mesma preparação enzimática, ou a protease purificada, utilizada neste trabalho. Já que a utilização de fontes protéicas alternativas, como soja, milho ou feijão poderiam contribuir para diversificar a oferta de alimentos para fenilcetonúricos. Sugere-se, também, um estudo com outras espécies de fungos produtores de proteases já utilizados na indústria de alimentos.

Apesar do carvão ativado ter sido eficiente na remoção de Phe, seria importante a avaliação da perda de Tyr e Trp dos hidrolisados, já que o carvão ativado remove aminoácidos hidrofóbicos por adsorção. Para esta avaliação, sugere-se o uso da EDS por ser um método simples, rápido e de baixo custo. Um aminograma dos hidrolisados também poderia ser empregado para verificar possíveis perdas destes e de outros aminoácidos, além de fornecer informações mais detalhadas do valor nutricional destes produtos.

Finalmente, espera-se que os dados obtidos neste trabalho possam contribuir para o desenvolvimento de novos produtos de qualidade e de baixo custo para que se possa, futuramente, atender às demandas de fenilcetonúricos do estado de Minas Gerais e das outras regiões do Brasil.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. In: *IDF (Inter. Dairy Fed.) Seminar on Protein & Fat globule modifications*, p.97-105, 1993.
- ADACHI, S.; KIMURA, S.; MURAKAMI, K.; MATSUNO, R.; YOKOGOSHI. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, v. 45, p. 925 - 932, 1991.
- ADLER-NISSEN, J. Processamento enzimático de las proteínas alimenticias. *Alimentos*, v. 6, p. 29-33, 1981.
- ADIBI, S.A.; MORSE, E.L. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J. Clin. Invest.*, v.50, p.2266-2275, 1971.
- ADIBI, S.A.; SOLEIMANPOUR, M.R. Functional characterization of dipeptide transport system in human jejunum. *J. Clin. Invest.*, v.53, p.1368-1374, 1974.
- AGUIAR, M.J.B. Experiências dos programas de triagem neonatal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA CLÍNICA, 14, 2002, Ribeirão Preto. *Anais ...* Ribeirão Preto: SBGC, 2002, p.16.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RCD n. 360. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial*, Brasília, 26 dez. 2003, p. 33.
- 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. *Agric. Biol. Chem.*, v. 50, p. 2929 - 2931, 1986.
- BENITO, M.J.; RODRIGUEZ, M.; NUNEZ, F.; ASENSIO, M.A, BERMUDEZ, M.E.; CORDOBA, J.J. Purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 active against meat proteins. *Appl Environ Microbiol.*, v. 68, n. 7, p. 3532-3536, 2002
- BERESTEIJN, E.C.H.V., PEETERS, R.A., KAPER, J. MEIJER, R.J.G.M., ROBBEN, A. J. P. M., SCHMIDT, D. G. Molecular mass distribution, imunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. *J. Food Prot.*, v. 57, p. 619-625, 1994.
- BERTOL, T.M.; SANTOS, J.I.; BONETT, L. Soro de leite integral na alimentação de suínos. *Suinocultura dinâmica*, n. 17, 1996.

- BIZZOTO, C.S. *Obtenção de hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina: emprego da pancreatina e da corolase PP*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2005. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- BRANTDS, J. F.; KAPLAN, L. J. Derivative spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, v. 12, n. 10, 1973.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 847 de 31 de outubro de 2002. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – fenilcetonúria – fórmulas de aminoácidos isentas de fenilalanina. *Diário Oficial*, Brasília, 04 nov. 2002, p. 83.
- CAHILL, J. E.; PADERA, F. G. Derivative analysis of uv / visible spectra. *American Laboratory*, p. 101-112, 1980.
- CÂNDIDO, L.M.B. *Obtenção de concentrados e hidrolisados protéicos de tilápia do Nilo (Oreochromus niloticus): composição, propriedades nutritivas e funcionais*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1998. (Tese, Doutorado em Engenharia de Alimentos).
- CARREIRA, R.L. *Caracterização de hidrolisados enzimáticos de caseína: perfil peptídico e aminoácidos essenciais*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2000. 138 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- 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*.
- CHEVALIER, F.; CHOBERT, J.M.; POPINEAU, Y.; NICOLAS, M.G.; HAERTLE, T. Improvement of functional properties of  $\beta$ -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *Internat. Dairy J.*, n. 11, p. 145–152, 2001.
- CHIAPPINI, C.C.J.; SANTOS, N.N. Determinação de alguns parâmetros físicos e químicos do soro de queijo. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13, 1995, Juiz de Fora. *Anais ... Juiz de Fora: Centro de Ensino e Pesquisa/ Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 1995. p. 249-252.
- CHOBERT, J.M.; SITOBY, M.Z.; WHITAKER, J.R. Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. *J. Agric. Food Chem.*, v. 36, n. 5, p. 220-224, 1988.

- CHRZANOWSKA, J.; KOLACZKOWSKA, M. Production of exocelular proteolytic enzymes by various species of *Penicillium*. *Enz. Microb. Tech.*, v. 15, n. 2, p. 140-143, 1993.
- CHRZANOWSKA, J.; KOLACZKOWSKA, M.; DRYJANSKI, M; STACHOWIAK, D.; POLANOWSKI, A. Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti* : Purification, properties and substrate specificity. *Enz. Microb. Tech.*, v. 17, n. 8, p. 719-724, 1995.
- CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; MILLAN, F. Vegetable Protein Hydrolysates. *Nutricion y Obesidad*, v. 2, p. 289–296, 1999.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Sci. Tech.*, v.11, n. 7, p. 254-262, 2000.
- CONDAK, J. *Ultrafiltração do soro de queijo: parâmetros operacionais e utilização do concentrado protéico na fabricação de requeijão cremoso*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 120 p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- CORSI, M.K.; SILVA, C.R.N.; GIORDANO, R.C. Análise e simulação de processo de recuperação de soro de queijo: produção controlada de hidrolisados protéicos, out. 1999. Disponível em: <<http://www.propg.ufscar.br/publica/uiicic/tecnologia/te027.htm>>. Acesso em : 20 out. 2003.
- CUNO. Zeta Carbon: Activated carbon filter cartridges. 2002 [ mensagem pessoal] apud DELVIVO, F.M. Uso do carvão ativado e de amberlite XAD-4 no preparo de formulações dietéticas para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite obtidos pela ação da pancreatina e papaína. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. 119 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- DA SILVA, L.C.S.; CARVALHO, T.S.; DA SILVA, F.B.; MORARI, L.; FRACHEL, A.A.; PIRES, R.; REFOSCO, L.F.; DESNICK, R.J.; GIUGLIANI, R. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Molec. Genetics and Metab.*, v. 79, p. 17-24, 2003.
- DELVIVO, F.M. Uso do carvão ativado e de amberlite XAD-4 no preparo de formulações dietéticas para fenilcetonúricos à base de hidrolisados de soro de leite obtidos pela ação da pancreatina e papaína. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. 119 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

- DELVIVO, F.M.; DE MARCO, L. M.; SILVA, V. D. M.; COELHO, J. V.; SILVESTRE, M.P.C. Uso de carvão ativado e de amberlite xad-4 para remoção de fenilalanina de hidrolisados de soro de leite, obtidos pela ação da pancreatina. *Tecno-Lógica*, vol. 8, n. 2, p. 61-84, 2004.
- DUARTE, A.J.; CARREIRA, R. L.; JUNQUEIRA, R.G.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades emulsificantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados trópticos: 1. efeito do pH e do tempo de hidrólise. *Ciênc. Technol. Aliment.*, v.18, n.3, p. 295-302, 1998.
- DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E. *Ciências Nutricionais*. São Paulo: Sarvier, 1998.
- EVANGELISTA, J. *Tecnologia de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1994. 660 p.
- FENNEMA, O.R. (Ed.) *Food chemistry*. 2. ed. New York: M. Dekker. 1996.
- FIGUEIREDO, M. B. Laboratório de Micologia Fitopatológica - Centro de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico - São Paulo, SP - O Biológico, vol. 60, n.1. 2001.
- FOEGEDING, E.A.; DAVIS, J.P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY, M.K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Sci. Tech.* v. 13, n. 5, p. 151-159, 2002.
- FOX, P.F.; MORRISEY, P.A.; MULVIHILL, D.M.; Chemical and Enzymatic Modification of Food Proteins. In: B.J. Hudson (Ed.) *Developments in Food Proteins-1*. New Jersey: Appl. Sci. Pub. Inc., 1982, p. 1-60.
- FRAZIER, W.C. *Microbiologia de los alimentos*. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1991. 522 p.
- FRØKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Tech.* Oct. 1994. p. 86 – 88.
- FURST, P.; ALBERS, S.; STEHLE, P. Dipeptides in clinical nutrition. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 49, p. 343-359, 1990.
- FURTADO, M.M. *A arte e a ciência do queijo*. 2. ed. São Paulo: Globo, 1990. 297 p.
- GALLAGHER, J.; KANEKANIAN, A.D.; EVANS, E.P. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v. 29, n. 3, p. 279-285, 1994.
- GAUTHIER, S.F.; VACHON, C.; SAVOIE, L. Enzymatic conditions of an in vitro method to study protein digestion. *J. Food Sci.*, v. 51, p. 960-64, 1986.
- GOMES, M.N.A.; JUNQUEIRA, R. G.; COLEN, G; OLIVEIRA, D. T. M. Produção de protease de *Penicilium candidum* para obtenção de hidrolisados de caseína com alto teor de pequenos peptídios. In: 3A SEMANA DO CONHECIMENTO / XI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Belo Horizonte, MG. *Anais ...* Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. v. 1, p. 150-150.

- GOMPERTZ, O.F.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CORRÊA, B. Biologia dos fungos. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (Ed.) *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 365-386.
- GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M.. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular - weight range. *Biotech. Bioengin.*, v. 44, n. 4, p. 529-532, 1994.
- GRANT, A.; BHATTACHARYYA, P.K. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J. Chrom.*, v. 347, p. 219-235, 1985.
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI Jr., M.V.; SILK, D.B.A. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.*, v. 71, p. 65-9, 1986.
- HAQUE, Z.U.; MOZAFFAR, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocoll.*, v. 5, p. 559-71, 1992.
- HARA, H.; FUNABIKI, R.; IWATA, M.; YAMAZAKI, K. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J. Nutr.*, v. 114, p. 1122-1129, 1984.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Second derivative spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Bioch. Biophys. Acta*, v. 494, p. 267-270, 1977.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Bioch. Biophys. Acta*, v. 580, p. 120-128, 1979.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Bioch. Biophys. Acta*, v. 671, p. 33-37, 1981a.
- ICHIKAWA, T.; TERADA, H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 29, p. 438-444, 1981b.
- IWASAWA, H.; HIRATA, A.; KIMURA, T. Proteolysis in Camembert cheese during ripening. *J. Japan. Soc. Food Sci. Tech.* v. 43, n. 6, p. 703-711, 1996
- JAY, J.M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3.ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 804 p.
- JELEN, P. Industrial Whey Processing Technology: An Overview. *J. Agric. Food Chem.* v. 27, n. 4, p. 658-661, 1979.



- KAKADE, M.L.; SIMONS, N.; LIENER, E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal Chem.*, v. 46, p. 518-526, 1969.
- KANUFRE, V.C.; SANTOS, J.S.; SOARES, R.D.L.; STARLING, A.L.P.; AGUIAR, M.J.B. Abordagem dietética para fenilcetonúria. *Rev. Med. Minas Gerais*, v.11, n. 3, p.129-134, 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.*, v. 26, p. 907-913, 1985.
- KIKUCHI, T; TAKAFUJI, S. Studies on the micro-organisms of Camembert cheese. II. Proteinases of Camembert cheese moulds. *Jap. J. Zootech Sci.* v. 42, n. 5, p. 205-209, 1971.
- KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. *Proc. Biochem.*, p.149-157, 1985.
- KITAGAWA, T.; OWADA, M.; AOKI, K.; ARAI, S.; OURA, T.; MATSUDA, I.; IGARASHI, Y.; TADA, K.; KATAYAMA, S.; HASHIDA, W. Treatment of phenylketonuria with a formula consisting of low - phenylalanine peptide. *Enzyme*, v. 38, p. 321 - 327, 1987.
- KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotech. Adv.*, v. 17, p. 561-594, 1999.
- LAHL, W.J.; GRINDSTAFF, D.A. Spices and Seasonings: Hydrolyzed Proteins. In: PROCEEDINGS OF THE 6TH SIFST SYMPOSIUM ON FOOD INGREDIENTS–APPLICATIONS, STATUS AND SAFETY. Singapore: Singapore Institute of Food Science and Technology. 1989. p. 51–65.
- LECLERCQ-PERLAT, M.N; BUONO, F.; LAMBERT, D.; LATRILLE, E.; SPINNLER, H.E.; CORRIEU, G. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *J. Dairy Res.* v. 71, n. 3, p. 346-354, 2004a.
- LECLERCQ-PERLAT, M.N; BUONO, F.; LATRILLE, E.; CORRIEU, G.; SPINNLER, H.E. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part II: Changes in the concentration of the more volatile compounds. *J. Dairy Res.* v. 71, n. 3, p. 355-366, 2004b.
- LENOIR, J.; AUBERGER, B. Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum* – Caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, n. 568, p. 471 – 491, 1977.

- LENOIR, J.; AUBERGER, B.; GRIPON, J.C. Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum* – Caractérisation d'une protéase acide. *Le lait*, n. 585 – 586, p. 244 – 268, 1979.
- LOPES, D.C.F. ; DELVIVO, F.M. ; SILVESTRE, M.P.C. Use of activated carbon for removing phenylalanine from skim milk powder. *Food Sci. and Technol.*, 2004
- LOPEZ-BAJONERO, L.J.; LARA-CALDERON, P.; GALVEZ-MARISCAL, A.; VELASQUEZ-ARELLANO, A.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci*, v. 56, n. 4, 1991.
- LORENZEN, P. What's to be done with whey? *Food Eng. Int.*, v.12, p. 41-42, 1987.
- LOSSO, J.N.; NAKAI, S. Stabilization of oil-in-water emulsions by  $\beta$ -lactoglobulin-polyethylene glycol conjugates. *J.Agricult. Food Chem.*, p. 1207–1212, 2002.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. S.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *Int. Dairy J.* [s.v.] 2003.
- MADSEN, J.S.; AHMT, T.O. Hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by four different proteinases monitored by capillary. *Int. Dairy J.*, v. 7, n. 6, p. 399-409, 1997.
- MAHAN, L.K.; ARLIN, M.T. *Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. 8. ed. São Paulo: Rocca, 1994.
- MANHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 69, p.1163-1169, 1992.
- MARTINS, A..M.; FISBERG, R.; SCHIMIDT, B. Fenilcetonúria: abordagem terapêutica. NESTLÉ, São Paulo, n. 54, 1993
- MATSUSHIMA, A.; INOUE, Y.; SHIBATA, K. Derivative absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal Biochem.*, v. 65, p. 362-368, 1975.
- MATSUHIMA, K.; MAYAKOWA, M.; ITO, M.; SHIMADA, K.J. *Gen Appl. Microbiol.*, v. 27, 1981, p. 423-426 apud CHRZANOWSKA, J.; KOLACZKOWSKA, M. Production of exocellular proteolytic enzymes by various species of *Penicillium*. *Enz. Microb. Tech.*, v. 15, n. 2, p. 140-143, 1993.
- MATSUOKA, H.; FUKE, Y.; KAMINOGAWA, S.; Yamauchi, K. Purification and debittering effect of aminopeptidase II from *Penicillium caseicolum*. *J. Agric. Food Chem.* v. 39, n. 8, p. 1392-1395, 1991.

- MECHAKRA, A.; AUBERGER, B.; REMEUF, F.; LENOIR, J. Optimization of a culture medium for acid proteolytic enzyme production by *Penicillium camemberti*. *Sciences des Aliments*. v. 19, n. 6, p. 663-675, 1999.
- MIHATSCH, W.A.; FRANZ, A.R.; HOGEL, J.; POHLANDT, F.; Hydrolyzed protein accelerates feeding advancement in very low birth weight infants. *Pediatrics*. v. 110, n. 6, p. 1199-203, 2002.
- MILUPA. Protein substitutes for the dietary treatment of phenylketonuria and hyperphenylalaninemia, 1995.
- MINAGAWA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F.; YAMAUCHI, K. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. *J. Food Sci.*, v. 54, p. 1225-1229, 1989.
- MIRA, N.V.M.; MARQUEZ, U.M.L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Revista Saúde Pública*, v. 34, p. 86 - 96, 2000.
- MONTECALVO, J. R.; CONSTANTINIDES, S. M.; YANG, C. S. T. Enzymatic modification of fish frame protein isolate. *J. Food Sci.*, v. 49, p. 1305 - 1309, 1993
- 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. *J. Food. Comp. Anal.*, v. 13, p. 843-857, 2000.
- MOSZCZYNSKI, P.; IDZIAC, J. Preparation of enzymatic hidrolizates of casein depleted in phenilalanine. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 29, p. 302-306, 1993.
- NAESSENS, M.; VANDAMME, E.J.; Multiple forms of microbial enzymes. *Biotech.Lett.*, v. 25, n. 14, p. 1119-1124, 2003.
- NICOLAU, E.S.; SQUILASSI, K.M.B.S.; COTTA, M.C.; MESQUITA, A.J.; MIRA, G. Soro de queijo: importância e características nutricionais. Disponível em: [http://www.umc.br/pesquisa/nucleos\\_pesquisa/biotecnologia/pesquisadores/e\\_espoto.html](http://www.umc.br/pesquisa/nucleos_pesquisa/biotecnologia/pesquisadores/e_espoto.html) Acesso em 08 out.2003.
- O'HAVER, T.C. Potencial clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry. *Clin. Chem.*, v. 25, p. 1548-1553, 1979.
- OUTINEN, M.T.; TOSSAVAINEN, O.; HARJU, M.; LINKO, P. Method for removing phenilalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. *Valio Oy, Helsink, Finland, Patents US 5547687, A23J3/34B4; A23J3/34C; A23L1/015E2; A61K38/01B; A61K38/01D6. 12/09/1994; 20/08/1996.*
- PEARCE, R.J. Food functionality uses or failures for dairy based ingredients. *Aust. J. Dairy Technol.*, v. 50, p. 15-23, 1995.

- PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Tech.* Oct., p. 96-98, 1994.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. v. 1. São Paulo: Makron. 1994. 524 p.
- PETERSON, G. L. Determination of total protein. *Methods in Enzymology*, v. 91, p. 95-119, 1983.
- PETRUS, J.C.; Reutilização do soro de leite. Disponível em: <<http://www.ctc.ufsc.br/comunicados/releases/ago2000.htm>>. Dez. 2000. Acesso em: 20 out. 2003.
- PIHLANTO-LEPPÄLA, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Sci. Tech.* v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 14. ed. Piracicaba, 2000. 477p.
- POMERANZ, Y.; MELOAN, C.E. *Food analysis: theory and practice*. 3 ed. New York: Chapman & Hall. 1994. 778 p.
- PORTER, J.W.G. *Leches e productos lacteos*. Zaragoza: Acribia. 1981.
- RAKSAKULTHAI, R.; HAARD, N.F. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, v. 43, n. 4, p. 401-45, 2003.
- RAO, M.B., TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 597-635. 1998.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2 ed. London: Academic Press, 1975. 573 p.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta.*, v. 35, p. 753 - 761, 1998.
- RÚA, M.L.; DÍAZ-MAURINO, T.; FERNÁNDEZ, V.M.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim. and Bioph. Acta.* n.1156, p. 181-189, 1993.
- SALLEH, A.B.; MUSANI, R.; BASRI, M.; AMPON, K.; YUNUS, W.M.Z.; RAZAK, C.N.A.; Extra and intracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Can. J. Microbiol.* v. 39, p. 978-981, 1993.
- SCHIMIDT, B.J. Fenilcetonúria: aspectos clínicos e terapêuticos. *Pediatria al dia*, v. 3, p. 257 - 260, 1987.
- SCRIVER, C.R.; KAUFMAN, S.; EISENSMITH, R.C.; WOO, S.L.; The hyperphenylalaninemias. In: SCIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D.

- (Ed.). *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: Mc Graw-Hill, 1997. p. 1015-1075.
- SHIMAMURA, S.; TAMURA, Y.; MIYAKAWA, H.; SAITO, H.; KAWAGUCHI, Y.; ISOMURA, N.; AKAZOME, Y.; OCHI, H.; KAWAMOTO, M. Peptide mixture and products thereof. *Morinaga Milk Industry Co., Ltd.*, Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 14/04/1997; 14/09/1999.
- SIEMENSMA, A.D.; WEIJER, W.J.; BAK, D H.J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulas. *Trends in Food Sci. Tech.* n. 4, p. 16–21, 1993.
- SILVA, V.D.M.; DE MARCO, L.M.; DELVIVO, F.M.; AGUIAR, M.J.B.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Remoção de fenilalanina de hidrolisados de soro de leite para o preparo de formulação dietética. *Alimentos e Nutrição*, 2005 (submetido para publicação).
- SILVESTRE, M.P.C.; LATI, E.; DAUPHIN, C.; HAMON, M. Cuprimetric assay of casein hydrolysates. *J. A.O.A.C. Int.*, v. 76, p. 1295-99, 1993.
- SILVESTRE, M.P.C.; DAUPHIN, C.; HAMON, M. Application of UV absorption and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Anal. Chim. Acta.*, v. 282, p. 603-612, 1993b.
- SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hidrolisates. *J. Agric. Food Chem.*, v.42, p. 2778-2782, 1994a.
- SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2783-2789, 1994b.
- SOARES, R.D.L. *Hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado: perfil peptídico e otimização das condições de remoção de fenilalanina pelo carvão ativado*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2003. 112 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- STRAYER, L. *Bioquímica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 720 p.
- SVENNING, C.; MOLLAND, T.; LANGSRUD, T.; VEGARUD, G.E. A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: *IDF (International Dairy Federation) Seminar on Protein & Fat globule modifications*. 1993. p. 96-106.

- TERRACCIANO, L; ISOARDI, P; ARRIGONI, S; ZOJA, A; MARTELLI, A. Use of hydrolysates in the treatment of cow's milk allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* v. 89, n. 6, p. 86 – 90, 2002.
- TEUBER, M.; ENGEL, G. Low risk of mycotoxin production in cheese. *Microb. Alim. Nut.* v. 1, n. 2, p. 193-197, 1983.
- TOME, D.; DEHABBI, H. Physiological effects of milk proteins components. *Int. Dairy J.*, v. 8, p. 383-392, 1988.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (Ed.) *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 365-386.
- TREVAN, M.D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K.H.; STANBURY, P. Ventajas de los enzimas microbianos In: *Biotecnología: Principios Biologicos*. Zaragoza: Acríbia.1990. p.177-179.
- TRIEU-CUOT, P.; GRIPON, J. C. A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. *J. Dairy Res.* v. 49, n. 3, p. 501-510, 1982.
- TSUGO, T; CHANG, J.E. Studies on cheese ripened mainly with yeast: I. Selection of yeast and manufacturing experiment. *Jap.J.Zootech.Sci.* v. 41, n. 9, p. 445-52, 1970.
- WAITZBERG, D.L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- WATANABE, M.; MATSUMURA, M.; YABUKI, S; AIZAWA, M.; ARAI, S. Construction of a bioreactor with immobilized yeast cells for production of a low-phenilalanine peptide mixture as a phenylketonuria foodstuff. *Agric. Biol. Chem.*, v. 52, p. 2989 - 2994, 1988.
- WHITTAKER, R.H. *New concepts of kingdoms of organisms*. *Science* 163, 150-160, 1969.

- 131 Referências-

## 7. APÊNDICES

## APÊNDICE A

### Conversão do teor final de Phe dos hidrolisados para uma dieta normoprotéica

#### H404

12g de proteína (100g de produto) \_\_\_\_\_ 82,9 mg Phe

10g de proteína \_\_\_\_\_ **69,1 mg Phe**

#### H501

12g de proteína (100g de produto) \_\_\_\_\_ 71,2 mg Phe

10g de proteína \_\_\_\_\_ **59,3 mg Phe**

#### H502

12g de proteína (100g de produto) \_\_\_\_\_ 106,9 mg Phe

10g de proteína \_\_\_\_\_ **89,1mg Phe**

#### H504

12g de proteína (100g de produto) \_\_\_\_\_ 110,1 mg Phe

10g de proteína \_\_\_\_\_ **91,7mg Phe**

## APÊNDICE B

### Tabelas complementares da análise estatística dos hidrolisados obtidos

## B.1 Análise da variação da concentração da preparação enzimática nas diferentes temperaturas

### 30°C

Grupo	Contage		Variância	
	m	Soma	Média	a
H301	3	216,937	72,3125	44,9041
		6	4	3
H302	3	212,309	70,7698	104,301
		4	2	3
H304	3	218,255	72,7517	
		1	1	85,4309

#### ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	6,50078	2	3,25039	0,04155	0,95956	5,14324
Dentro dos grupos	469,272	6	78,2121	9	7	9
Total	475,773	8			p > 0,05	

### 40°C

Grupo	Contage		Variância	
	m	Soma	Média	a
H401	3	263,644	87,8814	0,33447
		4	8	6
H402	3	266,413	88,8044	5,33311
		4	5	4
H404	3	278,196	92,7321	3,44968
		3		

#### ANOVA

F.V.	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	39,8067	2	19,9033	6,54913	0,03100	5,14324
Dentro dos grupos	18,2345	6	3,03909		8	9
Total	58,0413	8			p < 0,05	

#### Teste de Duncan

Tratam.	média	D2	D3	Discr.
h404	92,7321	<b>3,93</b>	<b>4,85</b>	a
h402	88,80445	0,92		b
h401	87,88148			b
	Dn	3,48	3,60	
	z	3,46	3,58	

### 50°C

Grupo	Contage		Variância	
	m	Soma	Média	a



H501	3	281,207	93,7356	2,70082
		271,452	6	9
H502	3	1	90,4840	6,63914
		270,075	3	2
H504	3	1	90,0250	0,53543
			3	1

F.V.	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	24,5525	2	12,2762	3,72935	0,08860	5,14324
Dentro dos grupos	8	6	9	4	2	9
	19,7508		3,29180			
			1			
					p > 0,05	
Total	44,3033	8				
	8					

## B.2 Análise da variação da temperatura nas diferentes concentrações da preparação enzimática

### 1%

Grupo	Contage		Variânci	
	m	Soma	Média	a
H301	3	216,937	72,3125	44,9041
		6	4	3
H401	3	263,644	87,8814	0,33447
		4	8	6
H501	3	281,207	93,7356	2,70082
			6	9

### ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	735,613	2	367,806	23,0169	0,00153	5,14324
Dentro dos grupos	8	6	9	7	3	9
	95,8788		15,9798			
	7		1			
					p < 0,05	
Total	831,492	8				
	6					

### Teste de Duncan

Tratam.	média	D2	D3	Discr.
H501	93,73566	5,85	<b>21,42</b>	x
H401	87,88148	<b>15,57</b>		x
H301	72,31254			y
	Dn	7,99	8,26	
	z	3,46	3,58	

### 2%

Grupo	Contage		Variânci	
	m	Soma	Média	a
H302	3	212,309	70,7698	104,301
		4	2	3
H402	3	266,413	88,8044	5,33311
		4	5	4

		271,452	90,4840	6,63914
H502	3	1	3	2

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
	716,719		358,359	9,24612	0,01470	5,14324
Entre grupos	5	2	8	1	2	9
Dentro dos grupos	232,547	6	38,7578			
	1		5			
	949,266				p < 0,05	
Total	6	8				

Teste de Duncan

Tratam.	média	D2	D3	Discr.
H502	90,48403	1,68	<b>19,71</b>	x
H402	88,80445	<b>18,03</b>		x
H302	70,76982			y
	Dn	12,44	12,87	
	z	3,46	3,58	

4%

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
	m			a
		218,255	72,7517	
H304	3	1	1	85,4309
		278,196		
H404	3	3	92,7321	3,44968
		270,075	90,0250	0,53543
H504	3	1	3	1

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
	704,911		352,455	11,8252	0,00828	5,14324
Entre grupos	6	2	8	6	6	9
Dentro dos grupos	178,832	6	29,8053			
	4					
	883,743				p < 0,05	
Total	6	8				

Tratam.	média	D2	D3	Discr.
H404	92,7321	2,71	<b>19,98</b>	x
	90,0250			
H504	3	<b>17,27</b>		x
	72,7517			
H304	1			y
	Dn	10,91	11,28	
	z	3,46	3,58	