UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE ISOLADOS PROTÉICOS DE SOJA E DE SEUS HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS

CRISTINA YOSHIE TAKEITI
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. FLÁVIA MARIA NETTO
Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Cristina Yoshie Takeiti,** aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de maio de 2002.

Campinas, 27 de maio de 2002

Profa. Dra. Flávia Maria Netto
Presidente da Banca

Dissertação de tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Campinas/SP

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
T139i
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 49732
PROC 16.837/02
C ____ DX ____
PREÇO R$ 11,00
DATA 18/06/02
Nº CPD ____

CM00169254-0

BIB ID 244871

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

Takeiti, Cristina Yoshie
T139i Influência do tratamento térmico nas propriedades funcionais de isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados enzimáticos / Cristina Yoshie Takeiti.—Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Flávia Maria Netto
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1.Proteína. 2.Soja. 3.Hidrólise. I.Netto, Flavia Maria. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em _____ de _____de 2002, pela banca examinadora constituída pelos membros:

Profa. Dra. Flávia Maria Netto

(orientadora)

Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco

(membro)

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante

(membro)

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

(suplente)

Há quatro tipos de aprendizes:

Os que podem ser comparados à esponja,

ao funil, ao filtro e à peneira.

A esponja tudo absorve; o funil tudo concentra, mas nada retém;

o filtro retém as impurezas, mas perde o vinho;

já a peneira retém o que é preciso e libera o refugo.

(Ética dos Ancestrais, 5:19)

Aos meus pais pelo incentivo e apoio
às atividades intelectuais

dedico

As coisas que não tem imperfeições são perigosas.

(do filme *Razão e Sensibilidade* – Ang Lee)

AGRADECIMENTOS

À Flávia pela orientação do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela bolsa de estudo concedida.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pelo financiamento concedido para a execução deste projeto (Processo n° 00/04842-6).

À Ceval Alimentos S/A pelo fornecimento da amostra de Farinha Desengordurada de Soja.

Aos funcionários do DEPAN, especialmente à Eliana e à Yara, pela inestimável colaboração e valiosa amizade.

Ao Adilson do CPQBA-UNICAMP pelas análises de densitometria realizadas nos géis de eletroforese.

Aos meus irmãos, pelo apoio e compreensão.

Aos amigos, em especial à Fara, Helê, Fauler, Yarinha, Rose, Sônia, Kity e Bob, pelas inúmeras horas de risadas, pelo incentivo nas horas difíceis e pelas "celebrações da gula".

ÍNDICE

INDICE vii

INDICE DE FIGURAS x

INDICE DE TABELAS xi

RESUMO xii

SUMMARY xiv

1. INTRODUÇÃO 01

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 03

2. 1. O isolado protéico de soja 03

2. 2. Características estruturais e mudanças conformacionais das proteínas da soja 04

2. 3. Propriedades funcionais dos isolados protéicos de soja 07

2. 4. A modificação enzimática das proteínas e propriedades funcionais dos hidrolisados protéicos 11

3. MATERIAIS E MÉTODOS 19

3.1. Material 19

3. 2. Métodos 20

3. 2.1. Composição centesimal da farinha de soja 20

3. 2.1. 1. Conteúdo Protéico 20

3. 2.1. 2. Lipídeos totais 20

3. 2.1. 3. Umidade 20

3. 2.1. 4. Cinzas 20

3. 2. 2. Obtenção do isolado protéico de soja 20

3. 2. 3. Tratamentos térmicos do isolado protéico de soja 22

3. 2. 4. Caracterização dos isolados protéicos de soja..... 22
3. 2. 4. 1. Composição centesimal..... 22
3. 2. 4. 2. Fitato..... 22
3. 2. 4. 3. Atividade de inibidor de tripsina..... 23
3.2. 4. 4. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV)..... 23
3. 2. 4. 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas totais e solúveis em água destilada..... 23
3. 2. 4. 6. Determinação do conteúdo de sulfidrila livre..... 24
3. 2. 5. Produção dos hidrolisados enzimáticos..... 25
3. 2. 6. Caracterização dos hidrolisados..... 27
3. 2. 6. 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida..... 27
3. 2. 6. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)..... 27
3. 2. 7. Propriedades funcionais..... 27
3. 2. 7. 1. Solubilidade..... 27
3. 2. 7. 2. Propriedades emulsificantes..... 28
3. 2. 7. 3. Propriedades de geleificação..... 29
3. 2. 8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... 30
3. 2. 9. Análise Estatística..... 30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 31

4.1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS) e dos isolados protéicos de soja (IPSs)..... 31
4. 1. 1. Composição centesimal da farinha desengordurada de soja (FDS) e dos isolados protéicos de soja (IPSs)..... 31
4. 1. 2. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV)..... 32
4. 1. 3. Teor de fitato..... 36

4. 1. 4. Teor de inibidor de tripsina..... 37
4. 1. 5. Conteúdo de sulfidrila livre..... 39
4. 1. 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas totais e solúveis em água destilada dos IPSs..... 41
4. 1. 7. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa dos IPSs (CLAE-FR)..... 45
4. 2. Produção dos hidrolisados enzimáticos..... 48
4. 2. 1. Caracterização dos hidrolisados..... 49
4. 2. 1. 1. Composição centesimal dos hidrolisados obtidos a partir dos isolados protéicos de soja (HIPSs)..... 49
4. 2. 1. 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida dos hidrolisados obtidos a partir dos IPSs..... 51
4. 2. 1. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência dos HIPSs (CLAE-FR)..... 56
4. 3. Propriedades funcionais dos isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados..... 59
4. 3. 1. Solubilidade protéica..... 59
4. 3. 2. Propriedades emulsificantes..... 63
4. 3. 3. Propriedades geleificantes..... 68
4. 4. Aparência macroscópica dos géis obtidos a partir de IPSs e de HIPSs... 71
4. 5. Microestrutura dos géis obtidos a partir de IPSs e de HIPSs..... 72

5. CONCLUSÕES..... 79

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 81

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de obtenção do isolado protéico de soja nativo (IPSn), dos isolados tratados termicamente (IPS70, IPS80 e IPS90) e de seus hidrolisados enzimáticos (HIIPSs)..... 19

Figura 2. Fluxograma para produção do isolado protéico de soja..... 21

Figura 3. Fluxograma para produção do hidrolisado protéico de soja..... 26

Figura 4. Termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das dispersões protéicas a 20% (p/p) dos IPSs..... 35

Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas totais dos IPSs. 42

Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas solúveis em água dos IPSs. 43

Figura 7. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S presentes nas proteínas totais e solúveis em água destilada dos IPSs..... 44

Figura 8. Cromatogramas de CLAE-FR dos IPSs..... 47

Figura 9. Curvas de hidrólise do IPS nativo a diferentes proporções de [E/S]. 50

Figura 10. Curvas de hidrólise do IPS tratados termicamente..... 50

Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida (*High Density*) na presença de SDS dos HIPSs com 2% de GH..... 53

Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida (*High Density*) na presença de SDS dos HIPSs com 4% de GH. 54

Figura 13. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S presentes nas proteínas dos IPSs e HIPSs..... 55

Figura 14. Cromatogramas de CLAE-FR dos HIPSs com 2% GH..... 57

Figura 15. Cromatogramas de CLAE-FR dos HIPSs com 4% GH..... 58

Figura 16. Percentual das solubilidades protéicas dos isolados protéicos de soja (IPSs) e de seus hidrolisados enzimáticos (HIPSs)..... 62

Figura 17. Índice atividade emulsificante (EAI) e índice de estabilidade de emulsão (ESI) dos IPSs e de seus hidrolisados a 2 e 4% GH. 67
Figura 18. Perfil de dureza dos géis obtidos a partir dos isolados protéicos de soja (IPSs) e de seus hidrolisado (HIPSs)..... 70
Figura 19. Aparência dos géis obtidos a partir dos IPSs nativo e tratados termicamente..... 74
Figura 20. Aparência dos géis obtidos a partir dos HIPSs com 2 e 4% de GH..... 75
Figura 21. Micrografias obtidas por MEV dos géis obtidos a partir dos IPSs.. 76
Figura 22. Micrografias obtidas por MEV dos géis obtidos a partir dos HIPSs com 2% de GH..... 77
Figura 23. Micrografias obtidas por MEV dos géis obtidos a partir dos HIPSs com 4% de GH..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal média da farinha desengordurada de soja e dos isolados protéicos de soja (IPSs) 32
Tabela 2. Temperaturas (Td) e entalpias (ΔH) de desnaturação das frações 7S e 11S do isolado protéico de soja nativo e dos tratados termicamente 34
Tabela 3. Conteúdo de fitato dos isolados protéicos de soja nativo e dos tratados termicamente..... 37
Tabela 4. Conteúdo de inibidor de tripsina do isolado protéico de soja nativo e dos tratados termicamente..... 39
Tabela 5. Conteúdo de sulfidrila livre do isolado protéico de soja nativo e dos tratados termicamente. 40
Tabela 6. Composição centesimal média da hidrolisados protéicos de soja..... 49

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do tratamento térmico sofrido pelos isolados protéicos de soja nas suas propriedades funcionais de seus hidrolisados. O isolado protéico de soja (IPS) foi produzido a partir da farinha desengordurada de soja (FDS) e posteriormente submetido à diferentes tratamentos térmicos (70, 80 e 90°C/30'), apresentando diferentes graus de desnaturação, determinado por calorimetria diferencial de varredura (CDV). O comportamento eletroforético das proteínas dos IPSs foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e não apresentou diferenças quanto à composição relativa das frações 7S e 11S. O perfil de hidrofilicidade/hidrofobicidade dos IPSs foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) e demonstrou caráter hidrofóbico. Os teores de fitato dos isolados tratados termicamente não diminuíram devido aos tratamentos térmicos empregados, mas a atividade dos inibidores de tripsina reduziu significativamente ($p< 0,05$). Os isolados nativo (IPSn) e tratados termicamente (IPS70, IPS80 E IPS90) foram submetidos à hidrólise enzimática com α-quimotripisina monitorada pelo método *pH-stat* e interrompida após atingir o grau de hidrólise (GH) desejado (2 e 4%). Os hidrolisados obtidos (HIPSs) a partir de IPSs com diferentes graus de desnaturação, embora com igual GH, apresentaram distribuição de peso molecular (SDS-PAGE) e características de hidrofobicidade (CLAE-FR) diferenciados, que resultaram em produtos com propriedades funcionais distintas. Embora os HIPSs apresentassem caráter hidrofílico, determinado por CLAE-FR, a hidrólise resultou em aumento significativo da solubilidade apenas em pH5 (pI), de até 20 vezes. A presença de peptídeos de baixo peso molecular originados a partir da hidrólise, influenciou grandemente a capacidade de formação e de estabilização da emulsão, onde a capacidade emulsificante diminuiu com a hidrólise a 2 %GH quando comparado aos IPSs (256,3 m^2/g para IPS70 e 107,8 m^2/g para HIPS70), porém aumentou com a progressão da reação enzimática (280,3 m^2/g para HIPS70/4% GH). Os HIPSs obtidos a partir dos IPSs tratados termicamente apresentaram uma diminuição da estabilidade da emulsão em ambos os graus de hidrólise. O tratamento térmico prévio do IPS provocou uma significativa diminuição da dureza dos géis com a redução marcante a

partir de 80°C (4,1N para IPSn e 1,6N para IPS80), onde também se verificou uma redução significativa do conteúdo de sulfidrila livre. Os géis obtidos a partir de isolados com baixo grau de desnaturação, IPSn e IPS70, mostraram-se translúcidos e homogêneos, enquanto os géis obtidos a partir de isolados com maior grau de desnaturação, IPS80 e IPS90, apresentaram-se opacos, esponjosos e com a presença de grânulos. Os géis obtidos a partir dos HIPSs (HIPS70/4% e HIPS80/4%) apresentaram estrutura extremamente frágil, apresentando grande exsudação. A análise do gel através de MEV permitiu visualizar diferenças marcantes nas características dos géis obtidos a partir dos IPSs e do HIPSs. Os géis dos isolados obtidos a partir do IPSn e do IPS80 apresentaram microestruturas semelhantes, na forma de conglomerados distribuídos de forma homogênea. A estrutura dos géis obtidos a partir dos HIPSs com 2 e 4% de GH mostraram-se muito diferentes das estruturas observadas para os géis obtidos com os isolados, com grandes poros e baixa coesividade, justificando a baixa capacidade de retenção de água. Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que o IPSn e os IPSs tratados termicamente apresentaram propriedades funcionais distintas e os hidrolisados obtidos, com mesmo GH, também demonstraram propriedades funcionais diferenciadas, dependendo do tratamento térmico prévio sofrido pelos IPSs.

SUMMARY

The objective of this work was to study the influence of the heat treatment on the functional properties of soy protein isolates (SPIs) and their α-chymotrypsin hydrolysates. The soy protein isolates (SPI) was produced from defatted soy flour (DSF) and submitted to the different heat treatments (70, 80 and 90°C/30 minutes) in order to obtain isolates with different degrees of denaturation determined by Differential Scanning Calorimetric (DSC). The electrophoretic profile (SDS-PAGE) showed no differences in relative composition of 7S and 11S fractions of the SPIs. The hydrophilic/lipophilic characteristics, determined by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), showed hydrophobic characteristics. The heat treatment had no effect on the phytate content, but the trypsin inhibitor activity significantly decreased ($p< 0.05$). The native soy isolated protein (SPIn) and the treated SPIs (SPI70, SPI80 and SPI90) were submitted to enzymatic hydrolysis with α-chimotrypsin, monitored by pH-stat and the hydrolysis reaction was interrupted when the appropriate degree of hydrolysis (DH) was reached (2 and 4%). Hydrolysates (HSPIs) obtained from SPIs with different degrees of denaturation, although with the same DH, presented different molecular weight distribution and hydrophobic characteristics, resulting in products with different functional properties. Although the hydrolysates presented hydrophilic characteristics, the hydrolysis resulted in significant increase of solubility only at pH5, up to 20 times. The presence of small peptides, originated from hydrolysis, influenced the emulsion capacity and stability. The Emulsion Activity Index (EAI) decresead with hydrolysis up to 2 %DH (107,8 m^2/g for HSPI70) when compared with the SPIs (256,3 m^2/g for SPI70); however, the EAI increased with the progression of the enzymatic reaction up to 4% DH (280,3 m^2/g for HSPI70/4% GH). The hydrolysates originated from the heat treatment SPIs had a reduction of the emulsion stability in both degrees hydrolysis. Previous heat treatment on the SPIn caused a significant reduction of the gel hardness, mainly when treated at temperatures above 80°C (4,1N for SPIn and 1,6N for SPI80). The gel obtained from isolates with low degree of denaturation, SPIn and SPI70, were translucent and homogeneous while the gel obtained from denatured isolates, SPI80 and SPI90, were

opaque and with coarse granulation. Gels obtained from HSPIs (HSPI70/4% and HSPI80/4%) showed fragile structure and low water-holding capacity. The Scanning Electron Microscopy (SEM) allowed visualizing great differences in the gel appearance from isolates and hydrolysates. The gels of SPIn and SPI80 presented similar microstructures with homogeneous conglomerates. The structure of the gel from the HSPIs with 2 and 4% of DH showed difference on the structures observed from SPI gels, with large pores justifying their low water-holding capacity. These results allowed to conclude that the SPIn and the heat treated SPIs presented distinct functional properties and the hydrolysates, with the same DH, had also demonstrated different functional properties, depending on the previous thermal treatment of SPIs.

1. INTRODUÇÃO

As propriedades funcionais das proteínas são propriedades físico-químicas que determinam seu desempenho e comportamento em sistemas alimentícios durante o processamento, estocagem e consumo do produto. A maior parte das propriedades funcionais afeta as características sensoriais dos alimentos e podem desempenhar um papel fundamental no comportamento do ingrediente alimentício, bem como do produto final. Os benefícios potenciais da adição de proteína, nas mais variadas formas, a um sistema alimentício incluem a emulsificação, formação de espuma, poder de geleificação, aumento da viscosidade, além de melhorar a aparência, o *flavour*, a textura e a capacidade de retenção de água ou óleo, contribuindo também para aumentar o valor nutritivo do produto.

As propriedades funcionais das proteínas são devido às suas características físico-químicas tais como tamanho, composição e sequência aminoacídica, distribuição de cargas e hidrofobicidade superficial. Qualquer modificação capaz de alterar uma ou mais destas características, podendo também mudar uma ou a maioria das propriedades funcionais (Kester *et al.*, 1984). Durante a obtenção comercial, os isolados sofrem diferentes tratamentos, os quais causam alterações físico-químicas nas proteínas, conferindo-lhes propriedades funcionais distintas (Kinsella, 1976; Ohren, 1981; Gonzáles, 1995; Mutilangi *et al.*, 1995). A desnaturação é o efeito mais significativo e, de acordo com a sua extensão, pode haver o fenômeno de agregação das cadeias polipeptídicas desnaturadas (Arrese *et al.*, 1991; Petrucelli & Añon, 1994 a,b; Petrucelli & Añon, 1995 a,b).

Considerações sobre a estrutura da proteína também são importantes no processo de hidrólise, pois as mudanças na composição molecular de um hidrolisado protéico obtido a partir de um substrato parcialmente ou totalmente desnaturado são importantes na sua utilização para diversos fins alimentícios (Adler-Nissen, 1993).

Modificações das propriedades funcionais das proteínas através da ação de enzimas requerem que a hidrólise seja pequena e controlada, com somente 3 a 10 % das ligações peptídicas clivadas (Kinsella *et al.*, 1985). Deve-se considerar, no entanto, que grau de hidrólise semelhante obtido pela utilização da mesma enzima, porém para diferentes substratos, não garante que os produtos apresentem as mesmas características (Adler-Nissen, 1986).

Poucos estudos consideram a importância das características do isolado quanto às modificações estruturais ocorridas devido ao tratamento e sua influência nas características dos hidrolisados obtidos. Mudanças conformacionais, associadas à presença de fatores como fitato e inibidor de tripsina, levam os isolados a se comportar como substratos distintos quando submetidos à hidrólise, implicando em diferenças no padrão de reação enzimática, bem como nos produtos obtidos (Lapveteläinen *et al.*, 1991). Henn & Netto (1998) observaram que o processo de hidrólise e o perfil dos peptídeos obtidos com diferentes isolados de soja comerciais diferiram entre si, ainda que, os hidrolisados apresentassem o mesmo grau de hidrólise. Segundo as autoras, as diferenças observadas estavam mais relacionadas à conformação das proteínas do que a outros fatores, tais como, presença de fitato e inibidor de tripsina.

Souza (2000) observou que a partir de um isolado protéico de soja com diferentes graus de desnaturação foram obtidos hidrolisados de mesmo grau de hidrólise, mas com perfis diferenciados. É de se supor, então, que estes hidrolisados também apresentem diferenças em suas propriedades funcionais.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a influência dos tratamentos térmicos realizados nos isolados protéicos de soja nas propriedades funcionais de seus hidrolisados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1. O isolado protéico de soja

As globulinas são os principais constituintes protéicos da soja, sendo insolúveis em faixa de pH 3,7 a 5,2 e apresentando ponto isoelétrico (pI) entre 4,2 e 4,6. Entretanto, elas podem se solubilizar nesta faixa, por aumento da força iônica, através da adição de NaCl. Em função desta propriedade, pode-se preparar isolados protéicos de soja, através de precipitação isoelétrica.

Depois da dissolução em água, a um pH ligeiramente alcalino, as proteínas da soja podem ser separadas em várias frações. Quando se utiliza a ultracentrifugação, são separadas quatro frações cujos coeficientes de sedimentação S (unidades Svedberg, a 20 °C em água), são 2, 7, 11 e 15. A fração 2 S é composta por proteínas biologicamente ativas, inibidores de protease e várias outras enzimas. As globulinas 7S e 11S representam aproximadamente 70 % das proteínas contidas no grão da soja. A fração 7 S é composta pelas enzimas β-amilase e lipoxigenase e globulinas que são conhecidas como β-conglicinina. A β-conglicinina é uma glicoproteína de reserva e representa 91% da fração 7S. A fração 11 S, comumente conhecida como glicinina é também uma proteína de reserva e constitui grande parte da fração protéica da soja, correspondendo a 40% (Badley *et al.*, 1975). A fração 15 S (urease, globulina 15 S) compõe 5 - 10% do total de proteínas (Shurtleff & Aoyagi, 1992).

O isolado protéico de soja (IPS) contém pelo menos 90 % de proteína (N x 6,25) apresentando como principais componentes, as frações glicinina e β-conglicinina, sendo virtualmente livres de lipídios e carboidratos. Os IPSs são produzidos a partir de flocos ou farinha desengordurada de soja, com mínimo tratamento térmico utilizado para inativar fatores antinutricionais. O tratamento térmico causa variado grau de desnaturação, resultando na dissociação e desenrolamento parcial ou total das moléculas protéicas, bem como na formação de agregados, o que pode alterar sua solubilidade (Wolf, 1970; Kinsella, 1979).

Segundo Wolf (1970), no aquecimento da farinha de soja, pode haver formação de agregados protéicos através de ligações dissulfeto. Durante a etapa de extração aquosa estes agregados são extraídos, ocorrendo mais agregação na etapa de precipitação isoelétrica, insolubilizando as proteínas. A composição dos agregados pode variar, sendo alguns deles constituídos basicamente por subunidades da β-conglicinina unidas por ligações hidrofóbicas e dissulfeto, além de outros compostos ligados a estas subunidades mais o polipeptídio ácido da glicinina (Petrucceli & Añon, 1994 a,b; 1995a).

Além das diferenças no processamento determinarem as características finais dos IPS, as condições da matéria-prima também podem influenciar as propriedades físico-químicas e estruturais destes produtos. Genovese & Lajolo (1992; 1993) obtiveram isolados distintos quanto à hidrofobicidade de superfície, conteúdo de sulfidrila livre e total e composição em subunidades, quando usaram grãos de soja normais, quebrados e fungados para extração das proteínas.

2. 2. Características estruturais e mudanças conformacionais das proteínas da soja

A β-conglicinina (7S) é uma glicoproteína trimérica que apresenta peso molecular entre 140-180 kDa, consistindo de três subunidades: α' (57-83 kDa), α (57-76 kDa) e β (42-53 kDa), que interagem para formar 6 isômeros (B1 a B6) (Arrese *et al.*, 1991). Sua estrutura quaternária é constituída de nove resíduos amino terminais, portanto, possui nove subunidades cada uma formada por um polipeptídio (Koshiyama, 1972). Essas subunidades são associadas através de ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (Than & Shibasaki, 1976). A fração 7S possui menor quantidade de cisteína, metionina, triptofano e treonina do que a globulina glicinina (Peng *et al.*, 1984). As ligações cruzadas dissulfídicas são limitadas pela presença de apenas 2 a 3 grupos de cisteína por mole de proteína (Wolf, 1978).

A glicinina (11S) que é o maior constituinte das proteínas da soja, apresenta estrutura hexamérica (AB_6) com peso molecular aproximado de 360 kDa na sua forma nativa. Sua estrutura quaternária é estabilizada por interações eletrostáticas, hidrofóbicas e por ponte dissulfídica entre os seus polipeptídios A (ácido) e B (básico), formando a subunidade AB (Wolf, 1970; Badley, 1975, Peng *et al.*, 1984). Logo, as propriedades de superfície (formação de espuma e emulsificação) da glicinina nativa apresentam limitações por sua conformação globular muito compacta, baixa hidrofobicidade superficial e pequena flexibilidade molecular (Kinsella, 1979; Wagner & Guéguen, 1995).

A glicinina e a β-conglicinina são proteínas oligoméricas muito complexas, onde o estado de associação–dissociação e estabilidade térmica são altamente dependentes do pH e da força iônica (Badley *et al.*, 1975; Kitamura *et al.*, 1976; Utsumi *et al.*, 1981; Iawabuchi *et al.*, 1987; Thanh & Shibasaki, 1991; Petrucelli & Añón, 1996), tornando-se difícil predizer as mudanças estruturais e funcionais que podem ocorrer quando os isolados são submetidos a diferentes tratamentos (Petrucelli & Añón, 1994a).

A desnaturação térmica conduz à dissociação da proteína em subunidades, ao desdobramento de sua estrutura e à exposição de seus grupos hidrofóbicos. A desnaturação de suas frações depende de diversas condições, tais como, pH, força iônica (μ), presença de grupamentos sulfidrílicos ou dissulfídicos, tempo de aquecimento e taxa de aquecimento e resfriamento (Petrucelli & Añón, 1995b).

Quando a glicinina é aquecida a 100°C, aproximadamente 50% é convertido rapidamente num agregado solúvel e com a manutenção do aquecimento, este agregado solúvel aumenta de tamanho e se precipita. O precipitado é formado pelo polipeptídio básico (poliB), enquanto que o polipeptídio ácido (poliA) permanece solúvel (Mori *et al.*, 1982; German *et al.*, 1982).

Iawabuchi *et al.*(1991) relataram que o aquecimento promove a dissociação da fração 7S em subunidades, assim permanecendo a menos que sejam adicionados sais ao sistema. Este comportamento também foi observado para a fração 11S, onde o tratamento térmico conduzido na presença da fração 7S, inibiu a formação de agregados do polipeptídio B-11S, como conseqüência da associação preferencial entre a subunidade β-7S e o polipeptídio B-11S (German *et al.*, 1982).

Segundo Petrucelli & Añón (1994a), tratamentos térmicos intensos (98°C/30') e alta concentração de proteína (10%) em pH 7 ou 9 resultaram em agregação e perda da solubilidade. Segundo as autoras, nestes isolados as globulinas 7S e 11S foram completamente desnaturadas, formando agregados da subunidade AB-11S ligados por pontes dissulfídicas e formação de agregados entre β-7S e B-11S. Todavia, tratamentos térmicos menos intensos (80°C/6') em pH 7 e 4% de concentração protéica, resultaram em aumento da solubilidade e da hidrofobicidade superficial, o que foi atribuído à desnaturação total da 7S e parcial da fração11S.

O aumento de pH de 9 para 10 ou a presença do agente redutor Na_2SO_3 também favoreceram a agregação entre a subunidade β da fração 7S e o polipeptídio B da glicinina. A interação entre a subunidade β-7S e o poli B-11S requer um aumento de sulfidrilas livres, que pode ser obtido através da adição de agentes redutores durante o tratamento térmico ou por aumento de pH. Inicialmente, este agregado é estabilizado por interações hidrofóbicas e posteriormente por pontes dissulfeto (Petrucceli & Añon, 1995b).

O estado de associação-dissociação das frações protéicas da soja é fortemente influenciado pela força iônica e por variações de pH. Em pH 7,6 e força iônica 0,5, a estrutura das frações 7S e 11S são muito compactas apresentando-se nas formas trimérica e hexamérica, respectivamente (Badley *et al.*,1975). A subunidade β-7S em valores de força iônica acima de 0,5 possui a forma trimérica da fração 7S, enquanto que, abaixo de 0,2 ela exibe a forma hexamérica (9S e 10S). Entretanto, entre a faixa de 0,2-0,5, ambas as formas coexistem em equilíbrio numa ampla faixa de

pH (4,8-11,0). Com valor de força iônica extremamente baixo (μ = 0,001) e pH ácido, a subunidade α dissocia-se do trímero, configurando-se nas formas 2S e 5S (Than & Shibasaki, 1979). Do mesmo modo, com força iônica acima de 0,5, a glicinina apresenta a forma hexamérica [11S $(AB)_6$], que é convertida na forma dodecamérica quando a força iônica é abaixo de 0,1 (Kinsella, 1979).

2. 3. Propriedades funcionais dos isolados protéicos de soja

As principais utilizações da proteína da soja são em produtos de panificação, fórmulas infantis, formulações para nutrição clínica, suplementos protéicos, produtos à base de peixe e como substituto em alimentos lácteos e cárneos (Geise, 1994; Lusas & Riaz, 1995). A presença de fatores antinutricionais pode afetar a qualidade nutricional de produtos à base de proteína de soja. Alguns destes fatores são parcial ou totalmente inativados pelo calor durante o processamento. Dentro deste grupo estão os inibidores de tripsina, as hemaglutininas e os fatores antivitamínicos. Outros não são destruídos pelo calor como as saponinas, fitatos e fatores de flatulência, que também podem comprometer a qualidade nutricional da proteína de soja (Liener, 1981; Lusas & Riaz, 1995).

A maior parte da proteína de soja utilizada na indústria alimentícia está na forma de isolados. Estes têm sido amplamente utilizados na formulação de produtos, devido a certas propriedades funcionais características, que incluem a solubilidade, geleificação e coagulação, poder de espuma, capacidade de retenção de água e óleo e propriedades de superfície, além, de enriquecer nutricionalmente alimentos e bebidas (Kinsella, 1976; Voutsinas *et al.*, 1983; Achouri *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000).

Tratamentos térmicos drásticos (98°C/5' e 98°C/30') empregados nos IPSs em pH 7,0 e 9,0 resultaram em desnaturação protéica e polimerização, o que resultou na diminuição da capacidade de retenção de água (CRA) e na baixa solubilidade (Petrucelli & Añon, 1994a). Porém, estas mesmas autoras relataram que as propriedades emulsificantes dos isolados melhoraram quando sofreram tratamentos térmicos menos drásticos (80°C/6' e 92°C/12'), tanto

em pH 7,0 como em pH 9,0. Segundo Petrucelli & Añon (1994b), isolados não dialisados apresentaram melhores propriedades espumantes que os isolados dialisados. A diálise é feita contra um gradiente de água, é provável que o estado de associação e dissociação das frações 7S e 11S tenha mudado em função da diminuição da concentração de sais; além disso, alguns componentes de baixo peso molecular também podem ter sido retirados.

As características de composição e estrutura das frações protéicas solúveis e insolúveis dos IPSs apresentam uma marcante influência sobre as suas propriedades funcionais. Enquanto que, a capacidade de absorção de água (CAA) depende das frações insolúveis do IPS, outras propriedades como a geleificação e a capacidade de formação de espuma dependem principalmente das frações solúveis. O aumento de temperatura conduz ao decréscimo das frações solúveis (poliA-11S e subunidades da 7S), que são essenciais no processo de agregação. Quando o processo de agregação é avançado, conduz à perda da capacidade de geleificação uma vez que esta propriedade depende da possibilidade de novas interações proteína-proteína da fração solúvel. O enriquecimento da fração solúvel do IPS com proteínas de baixo peso molecular e de grande flexibilidade (poliA-11S /proteínas do soro de leite), levaram a um grande aumento da capacidade de formação e estabilização de espumas (Sorgentini et alii, 1996).

Propriedades de superfície e funcionalidade da fração 11S podem ser melhorados por modificações apropriadas e controladas da estrutura através de redução, succinilação ou acetilação (Kim & Kinsella, 1987a,b; Guéguen *et al.*, 1990). Em seu estudo, Wagner & Guéguen (1995) demonstraram o efeito da dissociação, deamidação e redução sobre a estrutura e as propriedades de superfície da glicinina. Os autores relataram que a glicinina dissociada exibe melhores propriedades de superfície por aumento da densidade de cargas através da deamidação em meio ácido aquecido e/ou por redução das pontes dissulfídicas entre os polipeptídios A e B, durante o tratamento térmico na presença de agentes redutores. Estas modificações estruturais das proteínas conduziram a melhores parâmetros cinéticos de adsorção na interface, resultantes do decréscimo do tamanho molecular, aumento da hidrofobicidade superficial e da densidade de cargas.

Em seu estudo sobre a capacidade de formação e estabilidade de espuma da fração glicinina, Wagner & Guéguen (1999a), observaram que a dissociação, a deamidação e a redução produziram mudanças conformacionais na fração 11S, aumentando a adsorção e a fixação da proteína na interface ar-água e, conseqüentemente, melhorando as propriedades de formação e estabilização da espuma. No estudo complementar sobre as propriedades emulsificantes da glicinina, Wagner & Guéguen (1999b), relataram que deamidação moderada proporcionou uma pequena melhora das propriedades emulsificantes em reduzida ($\mu < 0,2$) e em elevada força iônica ($\mu > 0,5$). Quando a redução das pontes dissulfídicas foi incluída, a glicinina exibiu baixa estabilidade frente ao cremeamento e floculação ($\mu > 0.5$). Entretanto, nestas mesmas condições, a fração 11S produziu emulsão com alta estabilidade à coalescência. Segundo os autores, os processos de cremeamento, floculação e coalescência são controlados por diferentes mecanismos, talvez por repulsão eletrostática inicialmente e posteriormente, por interações hidrofóbicas.

As propriedades de formação de gel das proteínas contribuem para a textura de produtos cárneos, melhorando sua mastigabilidade. Devido a esta capacidade, a indústria de produtos à base de carne, vem utilizando intensivamente proteínas vegetais em suas formulações. A maioria das proteínas globulares forma gel através de aquecimento e posterior resfriamento. A geleificação consiste no fenômeno em que ocorre a formação de uma estrutura tridimensional ou de uma matriz que se mantém unida, apresentando resistência mecânica, visco-elasticidade e capacidade de reter a água com um mínimo de sinerese (Kinsella & Whitehead, 1989).

Durante o aquecimento das proteínas globulares para a formação de gel, ocorrem as seguintes transformações moleculares: (i) desnaturação ou desdobramento da proteína nativa; (ii) agregação das moléculas desdobradas; (iii) formação dos filamentos destes agregados e (ivi) associação destes filamentos para formar uma rede tridimensional organizada (Aguilera, 1995). As condições do meio durante a geleificação variam em função do pH, conteúdo de sais, temperatura, interação de componentes e estas, conseqüentemente, afetam as propriedades do gel formado (Catsimpolas & Meyer, 1970; Utsumi & Kinsella, 1985; Puppo *et al.*, 1995; Renkema *et al.*, 2000; Lakemond *et al.*, 2000).

De acordo com o estudo sobre a geleificação de IPS em pHs ácidos elaborado por Puppo *et al.* (1995), os resultados indicaram que géis obtidos em pHs ácidos tornaram-se mais compactos quando o pH se aproximou do pI. Estes géis apresentaram-se distintamente daqueles obtidos em pH 8,0, conforme evidenciado por diferenças encontradas no perfil eletroforético das proteínas solúveis do gel em água destilada. As autoras afirmaram que algumas proteínas estão mais envolvidas na manutenção da estrutura do gel.

Para compreender qual a participação dos polipeptídios/subunidades na formação da rede, Renkema *et al.* (2000) observaram que a pH 7,6, o gel formado por IPS é caracterizado por inúmeros filamentos de contas e apresenta-se translúcido, enquanto que, os géis obtidos a pH 3,8 apresentaram um aspecto granular aleatório, esbranquiçado e de alta dureza. Segundo os autores, a fração 11S, em pH 7,6, apresenta alta solubilidade após o aquecimento à baixa concentração protéica. Entretanto, a pH 3,8 todas as proteínas se precipitam sob aquecimento. Além disto, o mecanismo de formação de gel a pH 3,8 é influenciado pela quebra das pontes SS entre o poli A e poli B da glicinina sob aquecimento. A importância da fração 7S durante a geleificação parece ser menor a pH 7,6, pois não foi observada a formação de gel durante a desnaturação por aquecimento, entretanto, a sua presença no IPS evitou a precipitação do polipeptídio básico da glicinina após o aquecimento. Em pH 3,8 o desempenho da fração 7S é mais pronunciado visto que a formação de gel foi observada imediatamente após o aquecimento.

Além das diversas modificações que ocorrem na estrutura protéica dos IPSs quando em solução, há de se considerar também que transformações ocorrem durante a estocagem de IPSs desidratados. Recentemente, alguns autores vêm relatando a influência da oxidação sobre as propriedades funcionais das proteínas (Boatright & Hettiarachchy, 1995 a, b, c; Liang, 1999; Martins, 2002).

A oxidação lipídica conduz ao desenvolvimento de *off-flavour*, gerando certos produtos de oxidação. Estes produtos da oxidação lipídica podem posteriormente reagir com outros constituintes dos alimentos, como por exemplo, as proteínas. De acordo com Boatright & Hettiarachchy (1995 a, b), os lipídios associados com as proteínas do isolado de soja contribuíram

para o decréscimo da solubilidade e para a oxidação protéica. A adição de antioxidantes ao IPS durante o processamento resultou num expressivo aumento da solubilidade. Liang (1999) estudando um sistema modelo contendo IPS e óleo de soja, observou o efeito da oxidação lipídica sobre a hidrofobicidade das proteínas solúveis. A hidrofobicidade juntamente com a solubilidade decresceram durante o período de estocagem (ausência de luz, 60°C/5h). A adição de antioxidante (BHT) ao sistema inibiu a diminuição de solubilidade, de hidrofobicidade e de conteúdo de grupamentos aminos livres do IPS.

Por outro lado, alguns autores relataram que as modificações oxidativas podem ser consideradas como uma nova possibilidade de melhoramento da funcionalidade das proteínas não musculares no processamento de carnes (Liu *et al.*, 2000; Liu & Xiong, 2000). As reações de oxidação melhoram as interações entre as proteínas musculares e não-musculares e, isto é de grande interesse, visto que as interações proteína-proteína são necessárias para produzir efeitos de textura desejáveis, além de outros atributos de palatabilidade decorrentes do processamento de carnes.

A oxidação aumentou a elasticidade do gel obtido a partir de IPS, porém não influenciou o gel formado pelas proteínas do soro de leite (WPI). Similarmente, a oxidação promoveu interações entre as proteínas miofibrilares e as proteínas do IPS, mas não ocorrendo com o WPI; estas interações resultaram num aumento (>30%) da elasticidade do gel composto por IPS/miofibrilas quando comparado com o controle não-oxidado (Liu *et al.*, 2000).

2. 4. Modificação Enzimática das Proteínas e Propriedades Funcionais de Hidrolisados Protéicos

De acordo com Kilara (1995), a modificação de uma proteína alimentar pode ser obtida química ou enzimaticamente. A modificação enzimática apresenta maiores benefícios e vantagens sobre a química, pois inclui a especificidade da enzima em relação ao substrato, havendo pouca probabilidade de ocorrer reações indesejáveis, que resultem na formação de produtos tóxicos,

além de se processar sob condições mais amenas. Além disto, a enzima apresenta efetividade a baixas concentrações e a hidrólise enzimática não diminui o valor nutricional das proteínas (Phillips & Beuchat, 1981).

Para obtenção de hidrolisados enzimáticos protéicos, a α-quimotripsina pode ser utilizada para preparar polipeptídios específicos, como os hidrolisados livres de fenilalanina recomendados para a dietoterapia de portadores de fenilcetonúria. A α-quimotripsina cliva preferencialmente as ligações peptídicas no lado carboxílico dos aminoácidos aromáticos, embora também possa clivar posteriormente, outros aminoácidos como leucina, metionina, glutamina e asparagina (Canfield & Anfinsen, 1963; Needleman, 1970; Kimball, Hsieh & Rha, 1981).

Além da obtenção de hidrolisados para fins específicos, a modificação enzimática de proteínas tem sido muito utilizada para melhorar ou alterar propriedades funcionais como solubilidade, textura, emulsificação ou melhorar o valor nutricional protéico (Lahl & Braun, 1994). Infelizmente, a hidrólise enzimática é acompanhada do aparecimento de gosto amargo, o que pode ser minimizado se o grau de hidrólise (GH) for pequeno, isto é, entre 3 a 5 % (Adler-Nissen, 1986). Este gosto amargo deve-se aos peptídeos de baixo peso molecular compostos por aminoácidos cujas cadeias laterais são hidrofóbicas, dificultando a utilização do hidrolisado na formulação de produtos.

O grau de hidrólise (GH) é a medida da extensão da degradação hidrolítica de proteínas, isto é, refere-se à porcentagem de ligações peptídicas clivadas. É considerado o meio mais prático e conveniente para controlar o processo de hidrólise (Adler-Nissen, 1986). O GH é também o melhor indicador para comparar diferentes amostras de hidrolisados protéicos, visto que é o principal determinante das propriedades dos hidrolisados. (Adler-Nissen, 1986; Mahmoud *et al.*, 1992). Existem vários métodos para medir o GH variando na sua complexidade, precisão e exatidão, sendo um deles efetuado pela manutenção do pH (pH-*stat*) (Mahmoud, 1994).

Segundo Panyam & Kilara (1996), a hidrólise enzimática da proteína resulta em: (i) diminuição do peso molecular; (ii) aumento do número de grupos ionizáveis e (iii) exposição de grupos hidrofóbicos que estavam escondidos. A mudança das propriedades funcionais de uma proteína é resultado da combinação destes efeitos. O tipo de enzima escolhida e sua especificidade pelo substrato, juntamente com as condições do meio e grau de hidrólise leva a formação de uma grande variedade de peptídeos, que apresentam tanto baixo peso molecular, como peptídeos de alto peso molecular e ainda, cadeias que não sofreram hidrólise.

A presença de produtos de hidrólise diferenciados permite avaliar os mecanismos de reação de hidrólise para uma dada enzima. O modelo de *Linderstrom-Lang* (Adler-Nissen, 1986) considera um equilíbrio entre as formas nativa e desnaturada e descreve dois diferentes mecanismos: *zipper e one-by-one*, que são definidos pela taxa de produção tanto de intermediários como de produtos finais de hidrólise. O primeiro modelo (*zipper*) propõe que as moléculas de proteína são rapidamente hidrolisadas para polipeptídios, em função da desestabilização da estrutura protéica que expõe as ligações peptídicas e que resultam em vários produtos intermediários. O segundo mecanismo (*one-by-one*) propõe que, inicialmente poucas moléculas são hidrolisadas uma a uma e o produto final da hidrólise consiste de proteínas intactas e de peptídeos de baixo peso molecular, não havendo detecção de produtos intermediários. Na maioria das proteínas existe um comportamento intermediário destes dois mecanismos de reação.

No estudo de Ortiz & Añón (2000), que relaciona conformações estruturais e mecanismos de hidrólise com propriedades funcionais, foi observado que hidrolisados produzidos por ação da enzima promiferina apresentaram um grande número de pequenos peptídeos juntamente com uma pequena proporção de estrutura nativa. Por isto, o mecanismo *zipper* foi atribuído para esta reação de hidrólise. Segundo as autoras, as moléculas remanescentes de estrutura nativa migram e se adsorvem na interface, entretanto, elas apresentam reduzida habilidade de interação, considerando que os peptídeos pequenos migram para a interface na mesma taxa em que são produzidos. Estas observações são reflexos da sua capacidade de formação de espuma, em detrimento de sua baixa estabilidade. No mesmo estudo, as autoras observaram uma combinação

dos mecanismos *one-by-one* e *zipper* para os hidrolisados produzidos com papaína e bromelina, conferindo habilidade para formar e estabilizar espumas.

Diversos trabalhos citados na literatura (Hamada & Marshall, 1989; Bernardi *et al.*, 1991; Süle *et al.*, 1997; Babiker, 2000; Ortiz & Añón, 2000) não considera a importância do histórico térmico das proteínas, seu grau de desnaturação e muitos controlam o processo de hidrólise pelo tempo de reação, e não pelo grau de hidrólise sem se preocupar com certos parâmetros, como a manutenção do pH durante a proteólise. As condições de hidrólise e a espeficidade da enzima utilizada determinam a hidrofobicidade superficial dos polipeptídeos, que pode ser mudada tanto por tratamento térmico prévio como por hidrólise e dificilmente se separam os dois efeitos. As mudanças na hidrofobicidade superficial como resultado da proteólise, influenciam as propriedades funcionais, especialmente as propriedades interfaciais dos hidrolisados. (Mutilangi *et al.*, 1995).

As propriedades funcionais de um hidrolisado são muito diferentes da proteína nativa sendo, então, governados pelo peso molecular e hidrofobicidade dos polipeptídios resultantes (Adler-Nissen, 1986). Dentre as propriedades funcionais dos IPSs que podem ser melhoradas desde que a hidrólise enzimática seja pequena e controlada, incluem a solubilidade, a capacidade de hidratação, o poder de emulsificação e a capacidade de formação de espuma. Entretanto, a proteólise causa uma redução da capacidade de geleificação, da estabilidade da espuma e da emulsão (Kim et alii, 1990; Hettiarachchy & Kalapathy, 1997; Achouri *et al.*, 1998; Babiker, 2000; Ortiz & Añón, 2000).

Investigando a solubilidade da proteína de soja tratada termicamente e hidrolisada por alcalase, Hamada & Marshall (1989) relataram que a solubilidade do hidrolisado com 2% de GH foi ligeiramente maior que a do hidrolisado a 4%, na faixa de pH estudada (2 - 9). A baixa solubilidade do hidrolisado com 4% de GH foi atribuída às mudanças na conformação protéica devido ao tratamento térmico sofrido anterior à hidrólise.

Interações água-proteína são importantes na aplicação de proteínas em sistemas alimentícios, porque afetam diretamente as características de solubilidade, considerada essencial nas propriedades físico-químicas como a dispersibilidade e viscosidade e que acabam por governar outras propriedades, tais como, propriedades de superfície e de geleificação (Kinsella & Whitehead, 1989; Kinsella, Whitehead & Phillips, 1994). Além da influência na solubilidade, as interações água-proteína são também importantes para determinar a natureza e a quantidade de água que está ligada pela proteína. Esta propriedade comumente se refere à capacidade de retenção da água (CRA), que influencia as propriedades reológicas do sistema.

Bernardi *et al.* (1991) demonstraram que concentrados de soja hidrolisados por protease fúngica e bacteriana apresentaram um grande aumento na solubilidade com o aumento do grau de hidrólise, entretanto, a CRA reduziu com o avanço da proteólise. Segundo os autores, a ação hidrolítica das proteases causou ruptura das cadeias polipeptídicas, que são responsáveis pela hidratação e retenção da água ocorrendo, portanto, a redução da CRA. Entretanto, Were *et al.* (1997) também relataram aumento na solubilidade, bem como, aumento da CRA de um isolado de soja hidrolisado com papaína quando comparado com a proteína no seu estado nativo e com uma amostra tratada com álcali. De acordo com os autores, a ação hidrolítica da papaína causou ruptura da estrutura quaternária da proteína, o que fez aumentar tanto a sua solubilidade como a sua capacidade de retenção de água. Este comportamento é importante em sistemas cárneos, onde a CRA afeta diretamente a suculência e a maciez do produto.

Devido a sua natureza anfifílica, algumas proteínas são capazes de se orientar na interface óleo-água, atuando como bons agentes emulsificantes. A redução da tensão superficial, que é essencial para a emulsificação, é governada por três processos consecutivos: (i) difusão das moléculas de proteína e adsorção na interface; (ii) espalhamento das moléculas adsorvidas ao redor da gotícula de óleo e (iii) rearranjo molecular das moléculas adsorvidas na interface (Halling, 1981). A estabilidade da emulsão descreve a habilidade da proteína em formar a emulsão e mantê-la inalterada durante um certo período de tempo a uma dada temperatura e campo gravitacional. Três diferentes processos podem estar, concomitantemente, envolvidos na ruptura da emulsão:

formação de creme, floculação e coalescência segundo relatado por Dagorn-Scaviner *et al.* (1987).

Com a hidrólise enzimática dos isolados protéicos de soja, a capacidade de emulsificação aumenta, entretanto, a estabilidade da emulsão diminui segundo relatado por diversos pesquisadores (Hamada & Marshall, 1989; Bernardi *et al.*, 1991; Süle *et al.*, 1997). Este comportamento havia sido previamente relatado por Puski (1975) e estaria relacionado com as interações proteína-proteína e superfície desnaturada na interface óleo/água. Porém, de acordo com Were *et al.* (1997) a capacidade emulsionante de um hidrolisado protéico de soja obtido através da utilização de papaína, não diferiu da proteína no seu estado nativo, assim como, a estabilidade de sua emulsão. Os autores propõem que outras propriedades moleculares como, por exemplo, a solubilidade, a flexibilidade e o tamanho da cadeia polipeptídica também influenciam a formação da emulsão e que esta, não está somente relacionada com a hidrofobicidade superficial dos peptídeos resultantes.

Entretanto, estudando o efeito combinado da hidrólise enzimática e da succinilação sobre as propriedades funcionais de IPSs, Achouri *et al.* (1998) demonstraram que a hidrólise enzimática do IPS diminuiu a capacidade de emulsificação especialmente à elevadas porcentagens de GH (8 e 10%), embora a solubilidade tivesse aumentado. Elevados níveis de succinilação dos HIPSs conduziram ao aumento (>30%) da capacidade emulsionante, o que foi atribuído ao aumento da solubilidade, a diminuição do peso molecular e a melhora da flexibilidade do HIPS succinilado, facilitando a difusão da proteína na interface óleo/água.

A utilização das proteínas como ingrediente funcional é também devida às suas propriedades térmicas como capacidade de espessamento, coagulação e geleificação. A habilidade da proteína em formar gel e fornecer uma matriz estrutural capaz de reter água, açúcares e outros ingredientes, além de contribuir para a textura de carnes processadas justifica o seu grande emprego em formulações de produtos alimentícios (Kinsella, 1976; Voutsinas *et al.*, 1983). Entretanto, a utilização das proteínas da soja como ingrediente funcional em produtos cárneos apresenta limitações. Os embutidos de carnes são submetidos a um tratamento térmico onde a

temperatura final interna raramente excede os 80°C e nesta temperatura, as proteínas musculares solúveis (miosina) estão completamente desnaturadas permitindo a exposição de seus grupos reativos para interagirem com as proteínas não musculares. Porém, as proteínas do soro de leite e da soja geralmente necessitam de temperaturas maiores para se desdobrarem como as proteínas musculares (German *et al.*, 1982; Imafidon *et al.*, 1991). Assim, esta dificuldade de interação entre as proteínas musculares e não musculares é devida à falta de mudanças estruturais sob condições normais do processamento de produtos cárneos (McCord *et al.*, 1998).

Aplicação de alta pressão, pré-aquecimento e hidrólise limitada são alguns dos meios utilizados para melhorar a funcionalidade das proteínas não musculares em produtos cárneos. Todavia, elas causam desestabilização das proteínas e, recentemente, vários autores têm relatado a utilização de modificações oxidativas para melhorar o seu desempenho funcional (Liang, 1999; Liu & Xiong, 2000; Liu *et al.*, 2000), como por exemplo, a conversão de grupamentos sulfidrílicos livres em pontes dissulfeto.

A hidrólise é considerada prejudicial para as propriedades geleificantes em função da reduzida hidrofobicidade do hidrolisado (Mahmoud, 1994). O aumento da carga efetiva das proteínas resulta num aumento da repulsão entre os peptídeos, diminuindo-se, assim, a habilidade de formar gel. A perda da capacidade de geleificação do isolado protéico de soja é utilizada como uma vantagem na fabricação de seu hidrolisado, o qual pode ser aquecido sem mudança nas suas propriedades de escoamento.

No estudo realizado por Babiker (2000), as propriedades geleificantes do IPS e de hidrolisados (HIPSs) obtidos com quimotripsina foram examinadas em diferentes concentrações de proteína, pH, temperatura e intervalos de tempo. As melhores condições para a formação de gel foram 10% de concentração protéica, pH 6,50 e aquecimento por 80°C/30'. Tanto o IPS como o HIPS apresentaram géis extremamente frágeis, o que foi atribuído à influência da desnaturação protéica e do número de grupos aminos livres no caso do IPS (Kitabake *et al.*, 1989) e à influência das forças repulsivas, que impedem as interações proteína-proteína no caso do HIPS (Hillier *et al.*, 1980).

A microestrutura de géis obtidos de IPS pode ser caracterizada por diferentes técnicas microscópicas, de diversas magnitudes. Para a análise das imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Langton *et al.* (1996) desenvolveram um painel de parâmetros microestruturais para descrever o tipo de agregação encontrado.

Parâmetros estruturais utilizados para a classificação da microestrutura de géis obtidos a partir de soro de leite.

ATRIBUTOS	*DESCRIÇÃO*
Porosidade	Quantidade de poros
Cachos	Partículas globulares agrupadas formando estruturas semelhantes a cachos de uva.
Conglomerados	Partículas dispostas sob forma irregular, não linear e não homogênea.
Cordão de contas	Partículas disposta sob forma regular e linear, formando estruturas semelhantes a um cordão de contas.
Projeções aciculares	Pequenas projeções aciculares presas à superfície das partículas.

Fonte: Langton *et al.* (1996).

Além das propriedades funcionais dos IPSs tradicionalmente conhecidas, como a solubilidade, a capacidade de retenção de água e a emulsificação, trabalhos recentes têm demonstrado a atividade antioxidante de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de IPSs. Em seu estudo, sobre o efeito da obtenção de hidrolisados em sistemas contínuos de membrana sobre as propriedades funcionais dos hidrolisados de soja, Chiang *et al.* (1999) detectaram que a atividade antioxidante do IPS foi marcadamente aumentada pela hidrólise enzimática. Os hidrolisados obtidos no sistema de ultrafiltração com membranas de *cut-off* de 30 kDa, apresentaram atividade antioxidante muito maior que aquelas obtidas por membranas de 3 kDa. De acordo com Chen *et al.* (1995), peptídeos antioxidantes de hidrolisados da fração 7S são compostos por resíduos de 5-16 aminoácidos com pesos moleculares compreendidos entre 500-2000 Da, sugerindo que hidrolisados com atividade antioxidante podem aumentar a estabilidade de lípides e de produtos que os contém.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Material

O isolado protéico de soja (IPS) foi obtido a partir da farinha desengordurada de soja (*Prosan R*), fornecida pela *Ceval Alimentos S/A* e a enzima utilizada para hidrólise foi a α-quimotripsina proveniente de pâncreas bovino (*EC 3.421.1 - Sigma Chemical, USA*). Os isolados tratados termicamente, bem como, os produtos de hidrólise obtidos estão apresentados na Figura 1. Os outros reagentes utilizados apresentavam grau analítico (p.a).

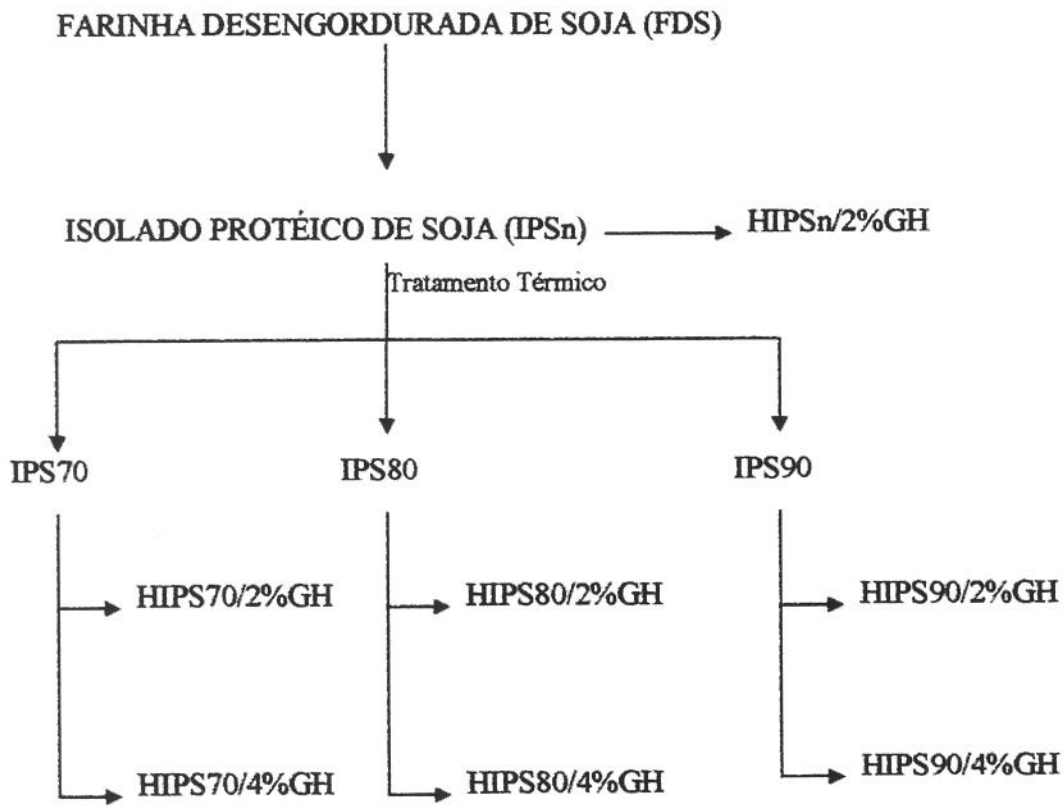


Figura 1. *Fluxograma de obtenção do isolado protéico de soja nativo (IPSn), dos isolados tratados termicamente (IPS70, IPS80, IPS90) e de seus hidrolisados enzimáticos (HIPSs)*

3. 2. Métodos

3. 2. 1. Composição centesimal da farinha de soja

3. 2. 1. 1. Conteúdo Protéico

Foi determinado em triplicata pelo método semimicro Kjeldhal segundo a A.O.A.C (1990). Para a conversão de nitrogênio em proteína, o teor de nitrogênio foi multiplicado pelo fator 6,25 (Smith & Circle, 1972).

3. 2. 1. 2. Lipídeos totais

Os lipídeos foram determinados em triplicata, segundo o método de Bligh & Dyer (1959).

3. 2. 1. 3. Umidade

Foi determinada pelo método gravimétrico em estufa a 105 °C, até peso constante, segundo procedimento da A.O.A.C. (1990). As análises foram determinadas em triplicata.

3. 2. 1. 4. Cinzas

Foram determinadas pelo método de incineração em mufla a 550°C, até peso constante (A.O.A.C., 1990). As determinações foram realizadas em triplicata.

3. 2. 2. Obtenção do isolado protéico de soja

O isolado protéico de soja foi obtido de acordo com Souza (2000), sendo apresentado no fluxograma da Figura 2.

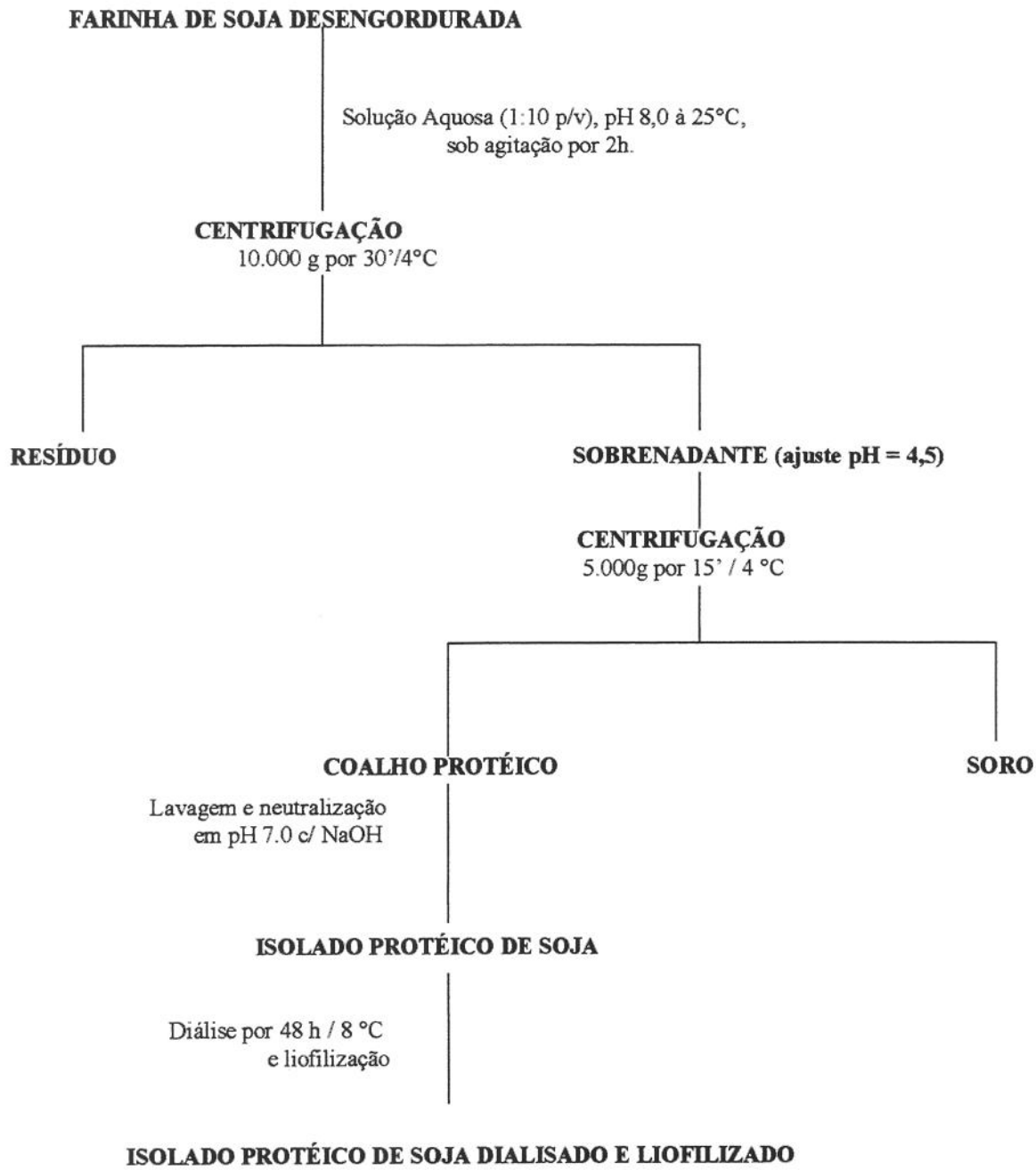


Figura 2. *Fluxograma de produção do isolado protéico de soja*

3. 2. 3. Tratamentos térmicos do isolado protéico de soja

O tratamento térmico foi realizado com o isolado protéico de soja nativo (IPSn) disperso em água a uma concentração de 8% (p/p) e acondicionado em frascos que foram vedados e colocados em banho-maria sob agitação. Para a obtenção dos IPSs parcial e totalmente desnaturados foram empregados os seguintes tratamentos térmicos: 70, 80 e 90°C por 30 minutos. Após o tratamento térmico as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente em banho de gelo, imediatamente congeladas e posteriormente liofilizadas. Foram obtidas diversas bateladas de cada um dos IPSs que ao final foram misturados e triturados em almofariz, resultando em: isolado protéico de soja tratado a 70°C/30′ (IPS70), isolado protéico de soja tratado a 80°C/30′ (IPS80) e isolado protéico de soja tratado a 90°C/30′ (IPS90).

3. 2. 4 Caracterização dos isolados protéicos de soja

3. 2. 4. 1. Composição centesimal

A composição centesimal dos isolados protéicos (nativo e desnaturados) foi determinada conforme descrito no item 3.2.1. para a farinha desengordura de soja.

3. 2. 4. 2. Fitato

Os teores foram determinados segundo o método de Latta & Eskin (1980) que se baseia na propriedade do fitato quelar minerais. Primeiramente, o fitato foi extraído em solução de HCl 0,65N e centrifugado (15000g/15'). A solução foi filtrada em papel filtro Whatman n ° 3 e alíquotas do sobrenadante foram diluídas e passadas através de coluna de troca iônica, AG1-X4 da *BIO RAD*, para a separação do fitato. Alíquotas do eluato foram retiradas, o reagente de Wade foi adicionado e realizou-se a leitura da absorbância a 500nm. Para se determinação da concentração de fitato nas amostras, foi feita uma curva padrão com fitato de sódio da *SIGMA* (n° P3168), na concentração de 10 a 60 µg/ml, observando-se as mesmas condições de análise. Foram realizadas duas extrações e as análises feitas em triplicata.

3. 2. 4. 3. Atividade de inibidor de tripsina

Foi determinado pelo método de Kakade *et al.* (1974), utilizando-se BAPNA (benzoil-DL-arginina-p-nitro-anilida) como substrato para a enzima tripsina de pâncreas suíno (T 7409 E.C. 3.4.21.4 - SIGMA). Uma unidade de tripsina foi definida, como o aumento de 0,01 unidades de absorbância a 410nm em 10 ml da mistura de reação, sob as condições usadas para a análise. A atividade do inibidor de tripsina foi expressa em termos de unidades de tripsina inibida por miligrama de proteína (UTI/mg prot) e foram realizadas duas extrações de cada amostra e cada extração foi analisada em triplicata.

3. 2. 4. 4. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV)

Os IPSs foram suspensos em água destilada (20%) e colocados em cápsulas de alumínio hermeticamente seladas contendo aproximadamente 10mg da amostra. As amostras foram aquecidas de 20 a 120°C na velocidade de 10° C/minuto, sendo uma cápsula vazia utilizada como referência. A entalpia (ΔH) e a temperatura de desnaturação (Td) foram calculadas integrando-se a área sob o pico, através do programa computacional do equipamento *Universal V2.3C TA Instruments.* Após a realização das análises, as cápsulas foram perfuradas e mantidas em estufa a 105°C até peso constante para a determinação da proteína em base seca. O grau de desnaturação foi avaliado pela relação entre a entalpia de desnaturação do IPS nativo e tratamentos térmicos anteriormente citados.

3. 2. 4. 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas totais e solúveis em água destilada

A determinação do perfil eletroforético das proteínas totais foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando gel de poliacrilamida com gradiente entre 8-25% (*PhastGel, Amersham Pharmacia Biotech, cód. 17054201*) e realizada no equipamento *Phast System*. As amostras foram dispersas (0,4% de proteína) em 1 ml de tampão contendo 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol e 0,1% azul de bromofenol, aquecidas à 95°C por 5 minutos e após resfriadas, alíquotas de 4 µl de cada amostra foram aplicadas no gel. Após a corrida, os géis foram mantidos por 2:30 horas em solução aquosa a 0,2% (p/v) de azul coomasie R-250 e descorados em solução aquosa contendo 30% metanol e 10% ácido acético.

Para a eletroforese das proteínas solúveis, utilizou-se o método descrito por Arrese *et al.* (1991), com modificações: 5 mg de cada IPS foi dissolvido em 5 ml de água destilada e agitado por 1 hora à temperatura ambiente e imediatamente centrifugado (12000g /20') à 21°C. O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman n° 1 e diluído em tampão conforme descrito para a eletroferese das proteínas totais.

Os pesos moleculares da proteína foram determinados utilizando-se o padrão *LMW Calibration Kit (Pharmacia)*: fosforilase B (94,0 kDa); albumina bovina (67,0 kDa); ovalbumina (43,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa).

A densitometria dos géis foi efetuada em densitômetro Sharp JX 330, empregando o *software* Image Master (*Pharmacia*), que calculou os pesos moleculares aparentes de cada banda comparando às proteínas-padrão. A área da fração 7S resultou da soma das áreas parciais das suas subunidades e para a fração 11S, a área total correspondeu à soma das áreas dos polipeptídios A e B. Logo, a composição relativa das subunidades/polipeptídios foi calculada como a porcentagem da área das subunidades em relação à área total da globulina 7S e a porcentagem da área dos polipeptídios em relação à área da fração 11S.

3. 2. 4. 6. Determinação do conteúdo de sulfidrila livre

Os teores de sulfidrila livre dos isolados protéicos nativo e tratados termicamente foram determinados segundo Beveridge (1974), com modificações de Hardham (1981). Aproximadamente 10 mg de amostra de cada isolado, foram dissolvidas em 10 ml de tampão TRIS-Glicina (pH 8.00), contendo 8M de uréia. À dispersão foi adicionado 100µl do Reagente de Ellman, o qual contém 4 mg de ácido 2,2' dinitro-5,5' ditiodibenzoico (DTNB) dissolvido em 1 ml de tampão TRIS-Glicina. Após 30 minutos, as dispersões foram filtradas em membrana Millipore 0,45µm e realizada a leitura da absorbância a 412nm contra o branco, contendo 10 ml do tampão Tris-Glicina (8M de uréia) e 100µl do Reagente de Ellman. Para a determinação da quantidade de sulfidrila livre contida nas amostras, utilizou-se a relação:

$$\mu\text{moles/g amostra} = \frac{735{,}3 \times \text{Abs (412nm)}}{\text{Peso (mg)}}$$

3. 2. 5. Produção dos hidrolisados enzimáticos

Os hidrolisados foram preparados a partir dos isolados protéicos na sua forma nativa e desnaturada através da ação da enzima α-quimotripsina, de acordo com Souza (2000). A concentração de substrato utilizada foi de 8% em proteína (peso/volume), sendo a relação enzima-substrato de 1:30 (peso/peso). Quando a reação atingiu o grau de hidrólise preestabelecido (2 e 4% de GH), as amostras foram transferidas para frascos, sendo vedados e a temperatura foi elevada para 75°C por 5 minutos, para inativar a enzima. Os hidrolisados obtidos foram imediatamente congelados e posteriormente liofilizados. O fluxograma de produção dos hidrolisados é apresentado na Figura 3.

A reação de hidrólise foi monitorada utilizando o método *pH-stat*, realizado em titulador automático *METTLER TOLEDO GRAFIX 50*. O grau de hidrólise é definido pela seguinte equação (ADLER-NISSEN, 1986):

$$GH(\%) = \frac{1 \times B \times N_b \times 100}{\alpha \times h_{tot} \times M_p}$$

onde:

B= consumo de base (mL ou l)
N_b= normalidade da base
M_p= massa de proteína (N x fator de Kjeldahl) em g ou Kg
α= grau de dissociação dos grupos amino (para pH = 8.0 e t = 40°C, o valor é 1.20)
h *tot*= número total de ligações peptídicas em equivalente por Kg de proteína
(para a proteína da soja o valor aproximado será 7.8 eqv/Kg (N x 6.25).

O α é expresso como:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}}$$

onde:

pH é o valor em que a hidrólise foi conduzida e
pK é a constante de dissociação dos grupos amino.

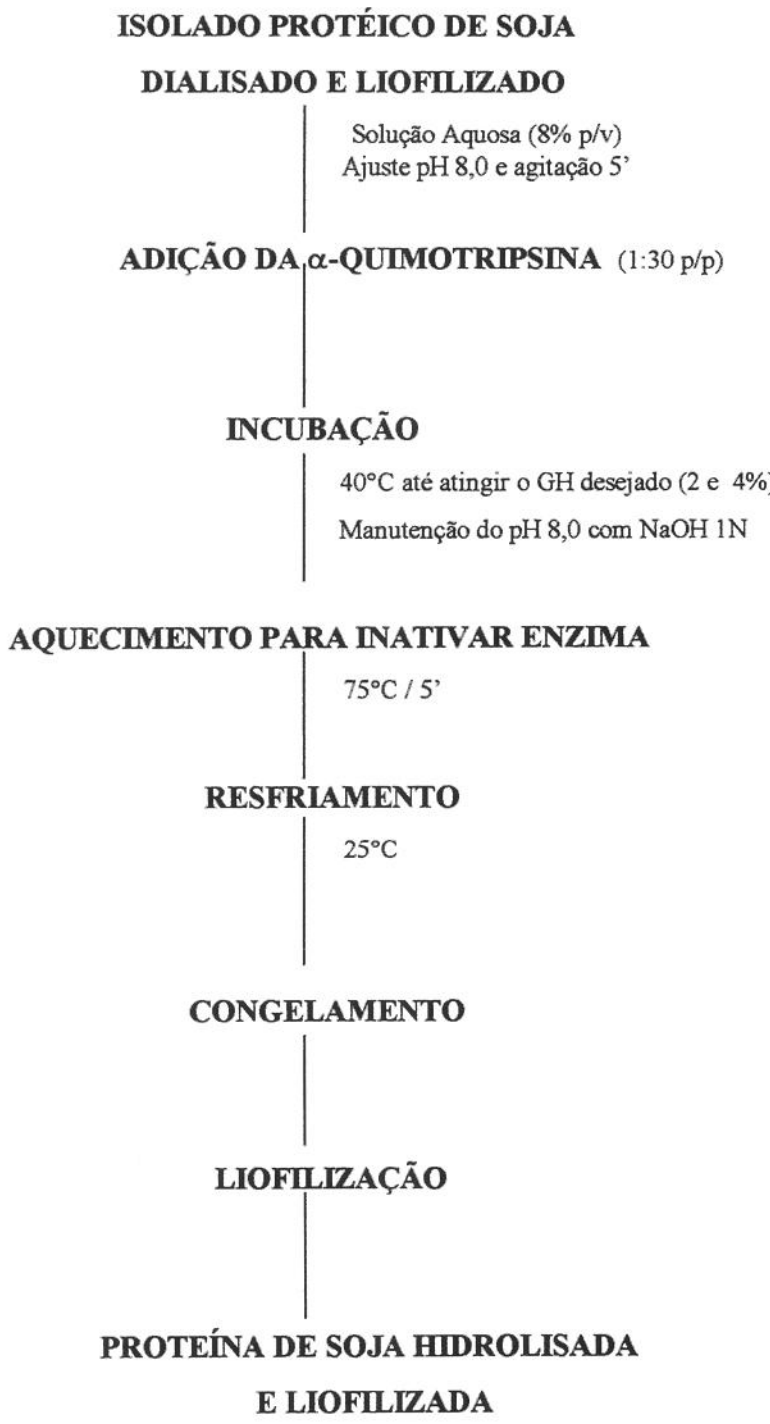


Figura 3. *Fluxograma para produção do hidrolisado protéico de soja.*

3. 2. 6. Caracterização dos hidrolisados

3. 2. 6. 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O perfil do peso molecular dos hidrolisados foi determinado como descrito anteriormente em 3.2.4.5. utilizando um gradiente de gel de alta densidade (*High Density PhastGel, Amersham Pharmacia Biotech, cód. 57-6781-02).*

3. 2. 6. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

O perfil dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos dos isolados e hidrolisados protéicos foi determinado utilizando-se a técnica de CLAE-FR, de acordo com Oomah *et al.* (1994), utilizando-se água Milli Q-ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% como o solvente A e acetonitrila (60:40) -TFA 0,1% como solvente B.

Primeiramente, a amostra foi dissolvida na proporção 40:1(v/p em proteína), em tampão Tris-HCl 35 mM (pH 7,6), na presença de NaCl 0,4 M e agitada por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as amostras filtradas em membrana Millipore Acrodisc 0,45μm e injetados 20μl no cromatógrafo *Varian 9012,* com detector de UV e coluna C-18. As condições de corrida obedeceram a um gradiente linear de 45 minutos do solvente A para o solvente B para eluir as proteínas da coluna. O fluxo foi de 1 ml/min, com detecção a 280 nm. Após cada análise, a coluna foi retornada às condições iniciais através de um gradiente linear (0 a 100% solvente A) por 15 minutos para equilibrar a mesma. Foram feitas duas dispersões de cada amostra que foram analisadas em triplicata.

3. 2. 7. Propriedades funcionais

3. 2. 7. 1. Solubilidade

A porcentagem da solubilidade protéica foi determinada de acordo com o descrito por Morr *et al.* (1985) com modificações. Foram pesados aproximadamente 500 mg de amostra em um béquer de 50 ml e um pequeno volume da solução de NaCl 0,1M gelado foi adicionado, obtendo-se uma pasta homogênea. Em seguida, foi adicionado NaCl 0,1M até o volume de 40 ml do béquer e colocado em banho de gelo (1°C), com ajuste de pH a 3; 5 e 7,0 com NaOH ou HCl

0,1N. As dispersões foram mantidas sob agitação constante durante 1 hora, monitorando-se o pH estabelecido. A dispersão foi transferida para um balão volumétrico de 50 ml, completando-se o volume com NaCl 0,1M. Uma alíquota da solução foi centrifugada (20000g/30') a 4 °C. Após filtração em papel Whatman n°1, alíquotas foram tomadas para dosar o conteúdo de proteína solúvel pelo método micro-Kjeldahl (AOAC, 1990). A porcentagem de solubilidade protéica foi determinada por:

$$\% SP = \frac{A \times 50}{[W \times S/100] \times 100}$$

onde:

A = Concentração de proteína no sobrenadante (mg/ml)

W = Peso da amostra (mg)

S = Concentração de proteína na amostra (%)

3. 2. 7. 2. Propriedades emulsificantes

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) foi determinado segundo o método espectrofotométrico de Pearce & Kinsella (1978) e a estabilidade da emulsão formada foi avaliada pelo método de Were *et al.* (1997), com modificações. Dispersões da proteína (0,5% p/v) foram preparadas com NaCl 0,1M e mantidas sob agitação durante 10 minutos, monitorando-se o pH em 7,0 pela adição de NaOH 0,1N. A emulsão foi preparada através da homogeinização da dispersão protéica, com o gotejamento de óleo de soja (3:1) em um agitador mecânico a 2.600 rpm à temperatura ambiente. Alíquotas de 1,0 ml da emulsão foram diluídas (1/500) em uma solução de SDS 0,1% e a absorbância foi determinada a 500nm. O índice de atividade emulsionante fornece a unidade de área da interface estabilizada por unidade de peso de proteína.

Para a determinação da estabilidade, uma nova emulsão foi preparada conforme citado anteriormente e uma alíquota de 1,0 ml da emulsão foi retirada imediatamente após a sua formação (A_0), sendo diluída (1/100) em uma solução de SDS 0,1% e outra alíquota foi retirada após 20 minutos (A_{20}) e também diluída com SDS 0,1% (1/100); as absorbâncias foram determinadas a 500nm. Para o cálculo do Índice de Estabilidade da Emulsão (IEE) foi utilizada a seguinte relação:

$$IEE = \frac{(A_0 \times t)}{\Delta A}$$

onde:

A_0 = Absorbância em t_0

t = tempo transcorrido (20 min)

$\Delta A = (A_0 - A_{20})$

3. 2. 7. 3. Propriedades de geleificação

A preparação do gel foi realizada segundo Voutsinas *et al.* (1983) com modificações. No estudo do Perfil de Textura (TPA-*Texture Profile Analysis*), foi determinado o parâmetro de dureza do gel em texturômetro $TAXT_2$ Stable Micro Systems (SMS).

O gel foi preparado a partir de uma dispersão protéica em NaCl 0,1M (14% p/p) e homogeneizado por agitação contínua durante 5 minutos. O pH foi ajustado a 7,0 e posteriormente, as dispersões foram desaeradas em sistema de bomba à vácuo. Alíquotas de 10 ml da dispersão foram transferidas para tubos vedados de formato cilíndrico com 20mm de diâmetro, aquecidos a 95° C por 30 minutos e resfriados até atingir a temperatura ambiente em banho de água. Após armazenamento de um dia para outro em geladeira, as amostras foram cortadas a partir do centro do tubo e com 10 mm de altura, sendo submetidas ao teste no texturômetro, adotando-se as seguintes condições:

Probe: SM70	Velocidade no gel e pós-teste: 1 mm/s
Calibração do Probe: 15 mm	Compressão: 5 mm
Velocidade pré-teste: 3 mm/s	Força Aplicada: 5g

3. 2. 8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a observação ao MEV, os géis dos IPSs e dos HIPSs foram preparados como descrito em 3.2.7.4. e a preparação dos *stubs* seguiu o procedimento descrito por Olsson *et al.* (2000). As amostras foram cortadas (2,5 x 2,5 x 5,0mm) e colocadas em fixador glutaraldeído 2,0% e vermelho de rutênio 0,1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,3) onde permaneceram por 72 horas. A seguir, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1M pH 7,3) por 2 vezes, 15 minutos cada. A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio (OsO_4) 0,1M por 2 horas e as amostras foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,3) por 2 vezes, 15 minutos cada. O processo de desidratação foi iniciado em série etanólica (30, 50, 70, 90, 95, 100%) por 2 vezes de 15 minutos e finalizado em Ponto Crítico de Desidratação (*Critical Point Dehydration*-CPD). As amostras secas foram fraturadas e os fragmentos foram fixados nos *stubs* com cola de prata coloidal e levados à estufa a 30°C por uma noite. A metalização das amostras foi realizada com ouro em *Sputter* (180s/40mA) e realizou-se a observação ao MEV (JEOL JSM – T330) em 15 kV.

3. 2. 9. Análise estatística

Nos resultados experimentais, as médias foram comparadas com o uso de análise de variância e quando diferentes pelo Método de Tukey (Cockran & Cox, 1957), utilizando-se o programa computacional *Statistica 5.0*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. Caracterização da farinha desengordurada de soja (FDS) e dos isolados protéicos de soja (IPSs)

4. 1. 1. Composição centesimal da farinha desengordurada de soja (FDS) e dos isolados protéicos de soja (IPSs)

A composição centesimal da Farinha Desengordurada de Soja (FDS) e dos Isolados Protéicos de Soja (IPSs), está apresentada na Tabela 1. Os valores encontrados para a FDS estão ligeiramente superiores aos encontrados por Souza (2000) e que apresentaram 57,9% de proteína, 7,5% de umidade, 6,0% de cinzas e 1,8% de lipídios. Garcia *et al.* (1998) encontraram 46,5% de proteína, 6,7% de umidade e 0,9% para lipídios.

Para isolados protéicos de soja comerciais, Henn & Netto (1998) encontraram valores de proteína na faixa de 87,9 a 94,1%. Souza (2000) em seu estudo com isolados obtidos em laboratório, obteve o valor de 96,9%, muito semelhante aos valores encontrados neste estudo. Os teores de umidade e cinzas encontrados neste estudo para o isolado protéico de soja nativo (IPSn) foram comparáveis aos encontrados por Souza (2000) que utilizou processo semelhante de obtenção, correspondendo a 4,3% e 2,7%, respectivamente. Garcia *et al.* (1998) relataram valores superiores: 5,8% de umidade e 9,9% de cinzas. Este alto teor de cinzas pode ser devido à não utilização de diálise no processo de obtenção do IPS. As diferenças entre os teores de umidade dos IPSs podem ser devidas ao processo de liofilização da proteína.

O conteúdo de lípides encontrado para o IPSn está abaixo dos valores para isolados comerciais observado por Henn & Netto (1998), 3,0– 4,7%, embora muito próximo ao citado por Souza (2000), 2,1 %. Os valores da composição centesimal dependem, entre outros fatores, da espécie da soja, condições dos cultivares como temperatura, umidade, acidez, níveis de fósforo do solo e do processamento utilizado (Petrucelli & Añón, 1994a).

Tabela 1. ***Composição Centesimal Média da Farinha Desengordurada de Soja (FDS) e dos Isolados Protéicos de Soja (IPSs)***

Amostras	*% Proteína*[1,2,3]	*% Lipídios*[1,3]	*% Umidade*[1]	*% Cinzas*[1,3]
FDS	68,74 ± 0,11	1,59 ± 0,02	8,56 ± 0,06	6,29 ± 0,01
IPSn	96,88 ± 0,35	2,39 ± 0,19	4,15 ± 0,07	3,22 ± 0,01
IPS70	93,71± 0,43	0,94 ± 0,01	4,33 ± 0,05	3,27 ± 0,02
IPS80	94,02 ± 0,78	0,86 ± 0,03	2,05 ± 0,08	3,15 ± 0,03
IPS90	98,00 ± 0,42	0,91 ± 0,02	5,51 ± 0,03	3,21 ± 0,01

[1] Valores Médios de 3 Determinações
[2] N x 6,25
[3] Valores Expressos em Base Seca
IPSn – Isolado protéico de soja nativo
IPS70 – Isolado protéico de soja tratado a 70°C/30′
IPS80 – Isolado protéico de soja tratado a 80°C/30′
IPS90 – Isolado protéico de soja tratado a 90°C/30′

4. 1. 2. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (CDV)

A calorimetria diferencial de varredura (CDV) é uma técnica em que a diferença de energia imposta a uma substância e ao material utilizado como referência é medida em função de temperatura programada. Algumas mudanças termicamente induzidas, como a desnaturação da proteína, são registradas como um fluxo de diferencial térmico na forma de um pico em um termograma (Ma & Harwalkar, 1991).

Os termogramas característicos das dispersões protéicas dos IPSs estão apresentados na Figura 4. O termograma do IPSn apresentou dois picos, correspondentes a fração 7S em 75,4°C e para a fração 11S em 93,2°C. Ambos, IPS70 e IPS80 apresentaram somente um pico correspondente a fração 11S, correspondentes à temperatura de desnaturação (Td) de 94,1 e 95,8°C, respectivamente. O IPS90 não apresentou pico, indicando a total desnaturação da

proteína. A maior estabilidade térmica da globulina 11S é devido à presença de 21 pontes dissulfeto, das quais, 15 são intramoleculares. A globulina 7S não possui estas ligações e como conseqüência, sua temperatura de desnaturação é menor (Damodaran, 1989; Scilingo & Añón, 1996). As temperaturas de desnaturação para as frações 7S e 11S foram semelhantes aos resultados encontrados por Puppo & Añón (1999) e Souza (2000).

A temperatura de desnaturação (Td), entalpia *(ΔH)* e grau de desnaturação (%D) encontrado na análise de Calorimetria Diferencial de Varredura encontram-se dispostos na Tabela 2. Observa-se diminuição dos valores de entalpia com o aumento de temperatura do tratamento térmico, o que está associado às mudanças estruturais e conformacionais devido ao desdobramento das moléculas da proteína devido ao tratamento térmico. As mudanças que ocorrem na molécula são uma combinação de reações endotérmicas, onde ocorre o rompimento de pontes de hidrogênio e de reações exotérmicas, resultantes da agregação de cadeias polipeptídicas e do rompimento de interações hidrofóbicas (Privalov & Klechinashvile, 1974). Valores mais altos de entalpia estão associados com um maior conteúdo de proteína nativa ou pouca desnaturada (Wagner & Añón, 1990). Para este estudo, a entalpia observada para o IPSn foi de 7,6 J/g, superior ao encontrado por Souza (2000), 3,7 J/g; entretanto, foi inferior ao relatado por Puppo & Añón (1999) e Sorgentini *et al.* (1996) e que corresponderam respectivamente a 18,3 J/g e 17,6 J/g para isolados nativos obtidos laboratorialmente em pH 8,0. Os tratamentos térmicos levaram a obtenção de isolados com diferentes graus de desnaturação: o IPS90 com 100% de desnaturação, enquanto que o IPS80 e o IPS70 apresentaram 58 e 40 %, respectivamente.

Uma possível explicação para as diferenças encontradas para a entalpia pode ser o tratamento térmico e/ou químico sofrido pela farinha durante o processo de sua obtenção. Outra possibilidade advém do processo de diálise, pois de acordo com Yamauchi *et al.* (1991), o sal promove um efeito protetor favorecendo as interações proteína-proteína, aumentando o estado de agregação da proteína e decrescendo o efeito da desnaturação. Scilingo & Añón (1996) combinando diferentes temperaturas e várias concentrações de sais, demonstraram que os valores de entalpia dos isolados aumentaram naqueles tratados com altas concentrações de sal e

temperatura de 90°C/15'; observaram também que o uso da mesma temperatura sem o uso de sal resultou em entalpia igual a zero, para o mesmo isolado.

Tabela 2. ***Temperatura (Td) e entalpia (H) de desnaturação das frações 7S e 11S dos isolados protéicos de soja nativo e tratados termicamente***

Amostras	Td (°C)/7S [1]	Td (°C)/11S [1,3]	ΔH [1,2,3] (J/g)	%D [4]
IPSn	75,39 ± 0,64	93,17 ± 0,44 [a]	7,62 ± 0,07 [a]	0,0
IPS 70	ND	94,10 ± 0,23 [a, c]	4,60 ± 0,10 [b]	39,63
IPS 80	ND	95,77 ± 0,67 [b, c]	3,17 ± 0,09 [c]	58,40
IPS 90	ND	ND	0,0	100,00

[1] Valores determinados em 3 repetições.
[2] Valores expressos por grama de proteína em base seca.
[3] Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).
[4] % D Porcentagem de Desnaturação Protéica =100 – [(ΔH IPS x 100) / ΔH IPSn]
ND Não Detectado.
IPSn – Isolado protéico de soja nativo
IPS70 – Isolado protéico de soja tratado a 70°C/30'
IPS80 – Isolado protéico de soja tratado a 80°C/30'
IPS90 – Isolado protéico de soja tratado a 90°C/30'

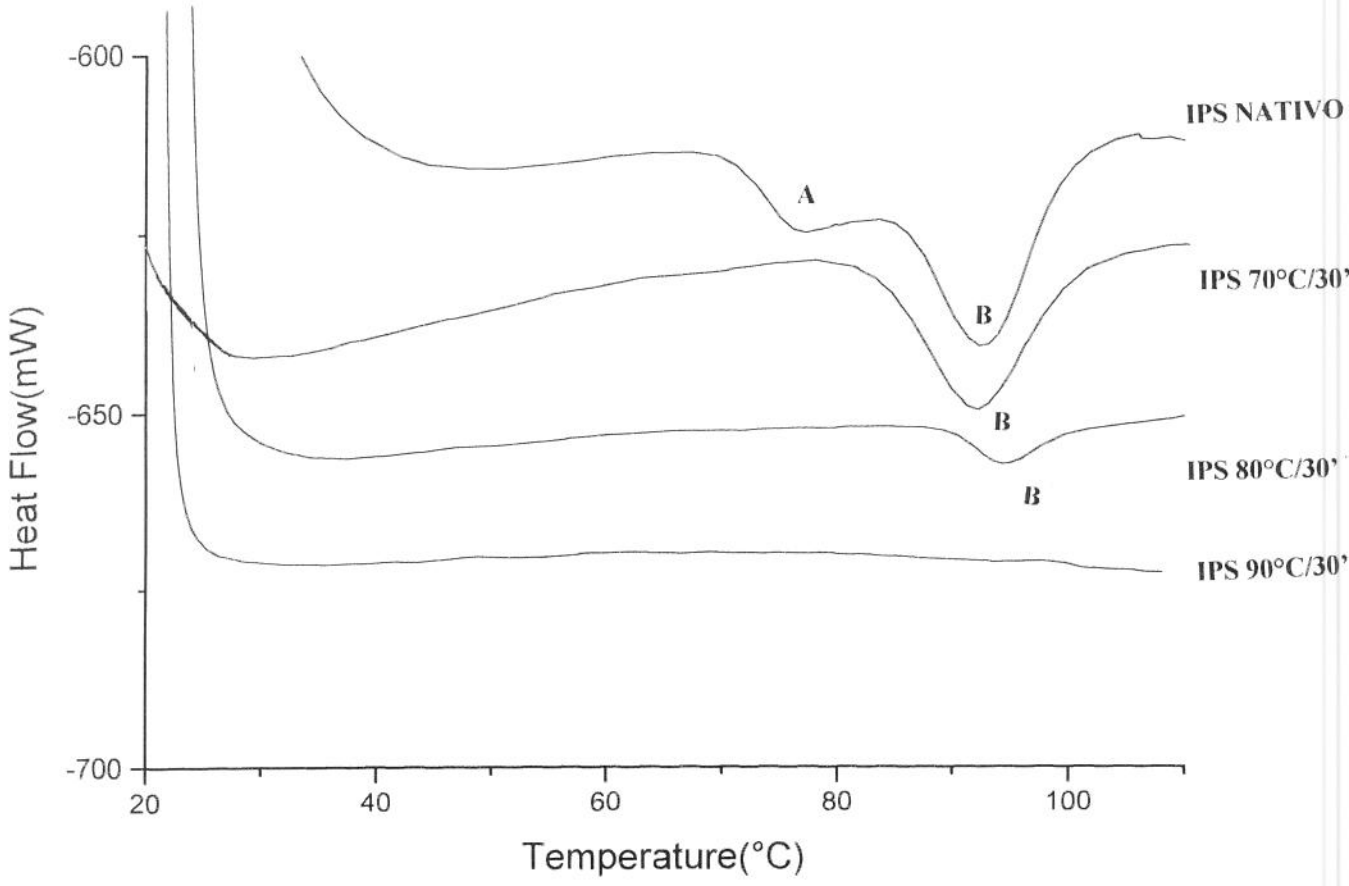


Figura 4. Termogramas de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das dispersões protéicas a 20% (p/p) dos IPSs. O grau endotérmico foi de 10°C/min e os picos A e B correspondem, respectivamente, à desnaturação protéica das frações 7 e 11S.

4. 1. 3. Teor de fitato

A maior parte dos grãos de cereais e de leguminosas contém de 0,5 a 5,0% de fitato ou ácido fítico, constituindo a principal fonte de fósforo. Entretanto, nutricionalmente, o fitato é desfavorável por formar complexos insolúveis com minerais e proteínas, diminuindo a biodisponibilidade destes nutrientes (Maga, 1982; Knuckles *et al.*, 1985). Diversos autores sugeriram que o ácido fítico tem potencial benéfico relacionado a doenças do coração, câncer de cólon e cálculo renal (Torre *et al.*, 1991; Liener, 1994; Anderson & Wolf, 1995).

Os teores de fitato dos IPSs encontram-se dispostos na Tabela 3. O IPS nativo diferiu estatisticamente ($p<0,05$) quando comparado aos IPSs tratados termicamente; entretanto, o aumento da severidade do tratamento não provocou redução significativa ($p<0,05$) dos teores de fitato. Este comportamento foi anteriormente relatado por Souza (2000), porém o valor citado pela autora para o IPS nativo é muito inferior, 5,44 mg/g proteína. Todavia, os valores encontrados neste estudo não diferem grandemente dos relatados por outros autores: 7,4 – 15,6 mg/g de proteína para IPS comerciais (Henn & Netto, 1998); 11,6 mg/g proteína (Netto, 1992) e 10, 7 mg/ g proteína (Honing *et al.*, 1984).

O fitato pode ser eliminado utilizando métodos físicos ou químicos, porém estes tratamentos podem resultar em mudanças de propriedades físico-químicas das proteínas (De Ham & Jost, 1979 e Brooks & Morr, 1985). Recentemente, métodos enzimáticos têm sido empregados para eliminar o fitato sob condições amenas. Lapveteläinen *et al.* (1991) relataram que a hidrólise do ácido fítico diminuiu mais efetivamente o conteúdo de fitato do IPS que o método de troca iônica realizado por Rodriguez *et al.* (1985) e por Chen & Morr (1985). A hidrólise enzimática eliminou totalmente o fitato, enquanto que, a troca iônica removeu aproximadamente 75% do seu teor no IPS. No mesmo estudo, os autores afirmam que a hidrólise enzimática foi efetiva em reduzir o conteúdo de fitato, sendo que o impacto sobre as propriedades funcionais, como a solubilidade e capacidade de emulsificação, foi muito reduzido.

No presente estudo, vale ressaltar que a pequena redução dos teores de fitato dos IPSs tratados termicamente deveu-se exclusivamente ao aquecimento, uma vez que todos eles foram obtidos a partir do mesmo IPS nativo dialisado.

Tabela 3. ***Conteúdo de fitato(mg/g de proteína) dos isolados protéicos de soja nativo e tratados termicamente.***

Amostras	*Fitato*[1,2,3]
IPSn	18,81 ± 0,10 [a]
IPS70	15,70± 0,35 [b]
IPS80	16,38 ± 0,17 [b]
IPS90	16,40 ± 0,22 [b]

[1] Valores médios de 2 extrações analisadas em triplicata.
[2] Valores expressos em base seca
[3] Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).
IPSn – Isolado protéico de soja nativo
IPS70 – Isolado protéico de soja tratado a 70°C/30′
IPS80 – Isolado protéico de soja tratado a 80°C/30′
IPS90 – Isolado protéico de soja tratado a 90°C/30′

4. 1. 4. Teor de inibidor de tripsina

Os inibidores de proteases presentes na soja provocam inibição do crescimento, hipertrofia e hiperplasia pancreática. A inibição da proteólise intestinal resulta em aumento de secreção de enzimas digestivas como a tripsina, a quimotripsina e elastase, que são eliminadas nas fezes, representando uma perda endógena importante de aminoácidos sulfurados (Liener, 1994). Além disto, devido às proteínas de leguminosas serem deficientes nestes aminoácidos, aumenta-se o impacto nutricional destes inibidores. No entanto, efeitos fisiológicos positivos como a supressão da carcinogênese, foi associado à presença de produtos de soja na dieta, sendo os inibidores do tipo Bowman-Birk o principal implicado (Kennedy, 1995). Ao contrário do fitato, os inibidores de tripsina podem ser destruídos por tratamento térmico e isto dependerá da temperatura, duração do

tratamento, tamanho de partículas e estado físico do produto, assim, como das condições de umidade e da presença de ácidos e álcalis (Cuevas & Cheryan, 1983).

Os resultados encontrados nas determinações dos teores de inibidor de tripsina dos IPSs encontram-se dispostos na Tabela 4. Os teores de todos os IPSs diferiram significativamente ($p<0,05$) com o avanço do tratamento térmico. Os valores obtidos foram superiores aos citados por diversos autores: Souza (2000) encontraram 81,4 UIT/mg proteína para o IPS nativo; Henn & Netto (1998) determinaram para IPSs comerciais uma faixa de 5,2-94,7 UIT /mg proteína e Netto (1992) analisando a atividade antitríptica de 3 IPSs comerciais, encontrou os valores de 72,2; 114,7 e 211,4 UIT/mg proteína. Os teores encontrados foram inversamente proporcionais ao aumento do tratamento térmico empregado e comparando-se o valor do IPS nativo com o IPS 90, obteve-se uma redução de 80% do conteúdo de inibidor de tripsina.

A literatura registra para soja crua valores compreendidos entre 152,9 a 307,5 UIT/mg proteína (Prado *et al.*, 1980) e 129,0 UIT/mg proteína (Cabral *et al.*, 1995). Em geral, os produtos comerciais de soja recebem tratamento térmico de forma a apresentar menos de 20% da atividade inibitória de tripsina que a soja crua (Liener, 1994). Dessa forma, é necessário quantificar as atividades residuais nesses produtos, de modo a permitir uma avaliação dos efeitos fisiológicos que poderiam estar sendo exercidos (Genovese & Lajolo, 1998).

Como estas atividades resultam tanto do inibidor do tipo Kunitz como do Bowman-Birk e são determinadas contra a tripsina bovina, certas precauções devem ser tomadas quando se tenta extrapolar esses valores para prever seu efeito fisiológico. Os inibidores do tipo Kunitz são facilmente inativados pelo suco gástrico humano, enquanto os Bowman-Birk permanecem estáveis (Liener,1994). Esta maior resistência ao calor e atividade superior, é explicada pelo maior número de ligações dissulfídicas presentes no inibidor do tipo Bowman-Birk (Nordal & Fossum, 1974).

Tabela 4. ***Conteúdo de Inibidor de Tripsina (UIT/mg de proteína) dos isolados protéicos de soja nativo e tratados termicamente.***

Amostras	*Inibidor de Tripsina*[1,2,3]
IPSn	145,70 ± 1,58 [a]
IPS70	95,20 ± 1,29 [b]
IPS80	39,65 ± 0,43 [c]
IPS90	29,74 ± 1,40 [d]

[1] Valores Médios de 2 extrações em triplicata.
[2] Valores Expressos em Base Seca
[3] Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).
IPSn – Isolado protéico de soja nativo
IPS70 – Isolado protéico de soja tratado a 70°C/30´
IPS80 – Isolado protéico de soja tratado a 80°C/30´
IPS90 – Isolado protéico de soja tratado a 90°C/30´

4. 1. 5. Conteúdo de Sulfidrila Livre

A fração 7S possui um conteúdo baixo de grupos sulfidrílicos (SH) e dissulfídicos (SS) (Thanh & Shibasaki, 1978; Coates *et al.*, 1985), enquanto que, a fração 11S apresenta 48 mols de resíduos de cisteína por mol de proteína (Catsimpoolas *et al.*, 1969), contribuindo pela maioria das transformações destes grupos.

Diversos autores relatam a importância dos grupamentos SH e SS para as propriedades funcionais das proteínas, identificando as ligações importantes para o processo de geleificação e de coagulação protéica (Circle *et al.*, 1964; Furukawa *et al.*, 1979; Voutsinas *et al.*, 1983).

O conteúdo de sulfidrila livre dos IPSs encontram-se dispostos na Tabela 5. O valor encontrado neste estudo para o IPSn, 3,8 μmoles /g de proteína, foi muito inferior ao relatado por Liu *et al.* (2000): 10 μmoles /g de proteína; porém, foi superior ao citado por Petrucelli & Añón

(1994a; 1995 a,b) correspondendo a 1,7; 1,3 e 1, 6 μmoles /g de proteína, estando somente similar ao relatado por Voutsinas *et al.* (1983).

O conteúdo de sulfidrila livre diminuiu com o aumento da severidade do tratamento térmico, apresentando diferença significativa ($p<0,05$) a partir do tratamento a 80°C, onde a fração 11S está parcialmente e a 7S totalmente desnaturada, como determinado pela análise de DSC. A redução mais marcante ocorre aos 90°C, onde a quantidade encontrada representa apenas a um terço do valor inicial. Este comportamento também foi relatado por Petrucelli & Añón (1994a). Parâmetros cinéticos correspondentes à desnaturação térmica de IPS obtidos por DSC, demonstram que um tratamento a 85°C por 5 minutos é capaz de desnaturar 69% da glicinina, a fração que contém a maior quantidade de grupos sulfidrílicos (Arrese,1991).

Tabela 5. ***Conteúdo de Sulfidrila Livre (μmoles /g de proteína) do isolado protéico de soja nativo e dos tratados termicamente.***

Amostras	*Sulfidrila Livre* [1,2]
IPSn	3,82 ± 0,05 [a]
IPS70	3,79 ± 0,05 [a]
IPS80	3,35 ± 0,10 [b]
IPS90	1,09 ± 0,03 [b]

[1] Valores Médios em triplicata.
[2] Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).
IPSn – Isolado protéico de soja nativo
IPS70 – Isolado protéico de soja tratado a 70°C/30′
IPS80 – Isolado protéico de soja tratado a 80°C/30′
IPS90 – Isolado protéico de soja tratado a 90°C/30′

4. 1 .6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas totais e solúveis em água destilada dos IPSs

Os perfis eletroforéticos das proteínas totais e das proteínas solúveis em água destilada dos IPSs estão apresentados nas Figuras 5 e 6. Os isolados protéicos totais são formados pela lipoxigenase, β-amilase, β-conglicinina (globulina 7S) e glicinina (globulina 11S). A banda A corresponde às subunidades α' e α (≃ 70kDa) e a banda B corresponde à subunidade β (≃ 51kDa) da fração 7S. As bandas C e D correspondem, respectivamente, às subunidades ácida (≃ 37kDa) e básica (≃ 23kDa) da fração 11S.

A composição relativa de cada fração protéica total e solúvel em água determinada pela densitometria encontra-se na Figura 7. Quanto às proteínas totais, a composição relativa de suas subunidades/polipeptídios manteve-se praticamente inalterada em função do tratamento térmico empregado, sugerindo que o aquecimento não foi capaz de provocar uma agregação que acarretasse em alteração de peso molecular e de composição relativa de suas frações. As proteínas solúveis em água destilada apresentaram composição relativa das frações semelhantes aos IPSs, sugerindo que não houve formação de agregados insolúveis, estando em concordância com o observado por outros autores Yamagishi *et al.*, (1980) e Souza (2000).

Outros autores (Arrese *et al.*, 1991; Henn & Netto, 1998) relataram que apesar das porcentagens de cada fração protéica serem similares para todos os IPSs comerciais analisados, as porcentagens de cada fração das proteínas solúveis mostraram diferenças significativas, tendo observado um decréscimo na proporção da subunidade β-7S e do polipeptídio B-11S da fração hidrossolúvel quando comparada à composição relativa dos IPSs totais; os autores sugeriram que as subunidades/polipeptídios das frações 7S e 11S de isolados desnaturados formaram agregados insolúveis.

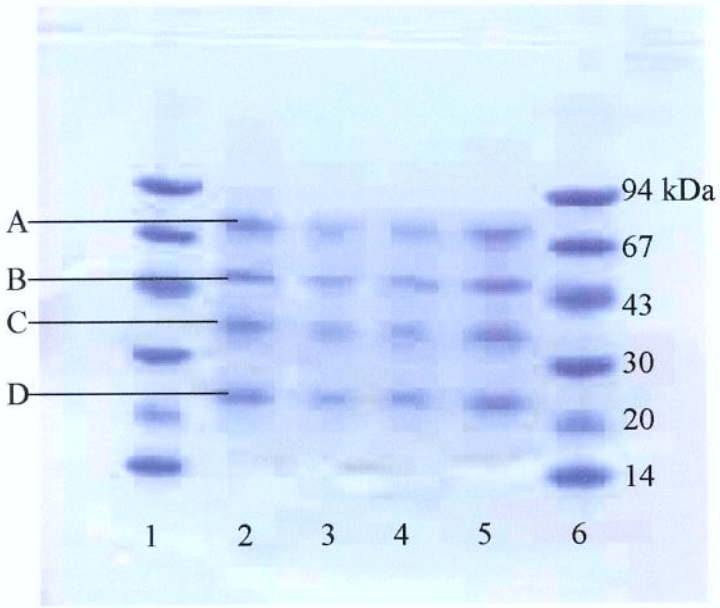


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas totais dos IPSs. Colunas 1 e 6: Padrão; Coluna 2: IPSn; Coluna 3: IPS70; Coluna 4: IPS80 e Coluna5: IPS90.

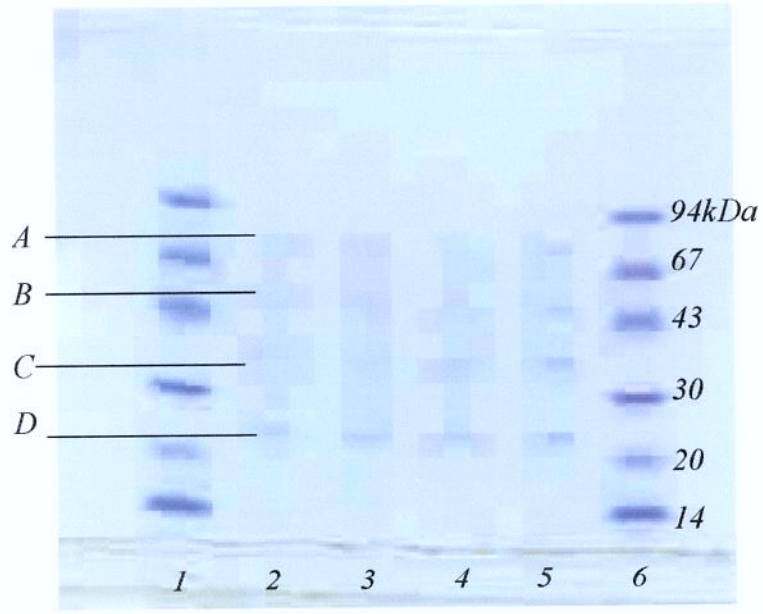
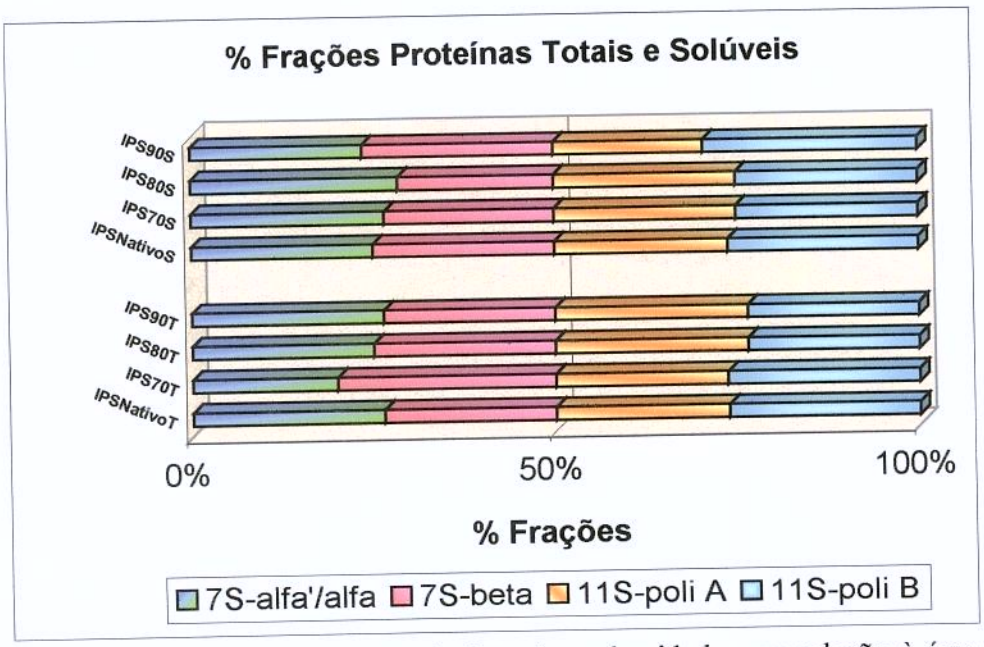


Figura 6. *Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas solúveis em água destilada dos IPSs. Colunas 1 e 6: Padrão; Coluna 2: IPSn; Coluna 3: IPS70; Coluna 4: IPS80 e Coluna 5: IPS90.*



Os valores representam a porcentagem da área das subunidades em relação à área total da globulina 7S e a porcentagem dos polipeptídios em relação à área total da globulina 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis.

Figura 7. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S presentes nas proteínas totais (T) e solúveis (S) em água destilada dos IPSs.

4. 1. 7. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa dos IPSs (CLAE-FR)

Diferentes tipos de sistemas cromatográficos têm sido desenvolvidos para separar as proteínas e seus hidrolisados. Técnicas para produzir sistemas microparticulados uniformes têm permitido o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dentre os vários tipos de CLAE, estão incluídos o de exclusão molecular, o de fase reversa e o de troca iônica. A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) é utilizada para separar compostos iônicos, não iônicos e ionizáveis, através de uma simples coluna e de uma fase móvel adicionada ou não de sais.

Devido a grande variedade de produtos obtidos a partir da soja - farinha desengordura de soja, soja texturizada, extrato de soja, fórmulas infantis - sua caracterização pode ser muito útil para predizer sobre a sua origem e controle de seu processamento (García *et al.*, 2000b). Muitos autores têm utilizado CLAE-FR para identificar os cultivares da soja (Oomah *et al.*, 1994), quantificar o seu conteúdo protéico em produtos comerciais à base de soja (García *et al.*, 2000a) ou detectar a presença das proteínas da soja, do soro bovino e de caseinato adicionados à formulações de produtos cárneos (García *et al.*, 1998).

A cromatografia CLAE-FR foi utilizada para caracterizar e comparar os IPSs e seus hidrolisados. A comparação foi baseada nos perfis cromatográficos, considerando os tempos de eluição e as áreas sob os picos detectados. A Figura 8 representa o perfil cromatográfico dos IPSs nativo (a) e tratados termicamente (b, c, d).

Observou-se uma similaridade entre eles, com a presença de cinco picos bem definidos com tempos de eluição aproximadamente iguais a 6; 16; 24; 28 e 31 minutos. Entretanto, com o aumento da temperatura do tratamento térmico, nota-se que ocorreu uma diminuição da definição dos picos compreendidos entre 23 e 36 minutos, principalmente a partir de 80°C. Quanto à altura dos picos, observa-se uma similaridade entre o IPS nativo e o IPS 70°C/30'; porém, com o aumento do tratamento térmico ocorreu uma diminuição da altura dos mesmos (IPS 80 e 90°C/

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

30'). Perda de definição e aumento de área sob os picos situados a partir da metade do cromatograma também foi citado por Oomah *et al.* (1994) e García *et al.* (2000b).

García *et al.* (2000b), assim como, outros autores (Peterson & Wolf, 1988; Yasumoto *et al.*, 1990) obtiveram separadamente os perfis cromatográficos das frações 7S, 11S e do IPS total e por comparação observaram que os picos que apareceram no início do cromatograma correspondem à fração 7S, enquanto que, os picos presentes no final, apresentavam um maior conteúdo da globulina 11S, parecendo estar associada à subunidade β da fração 7S.

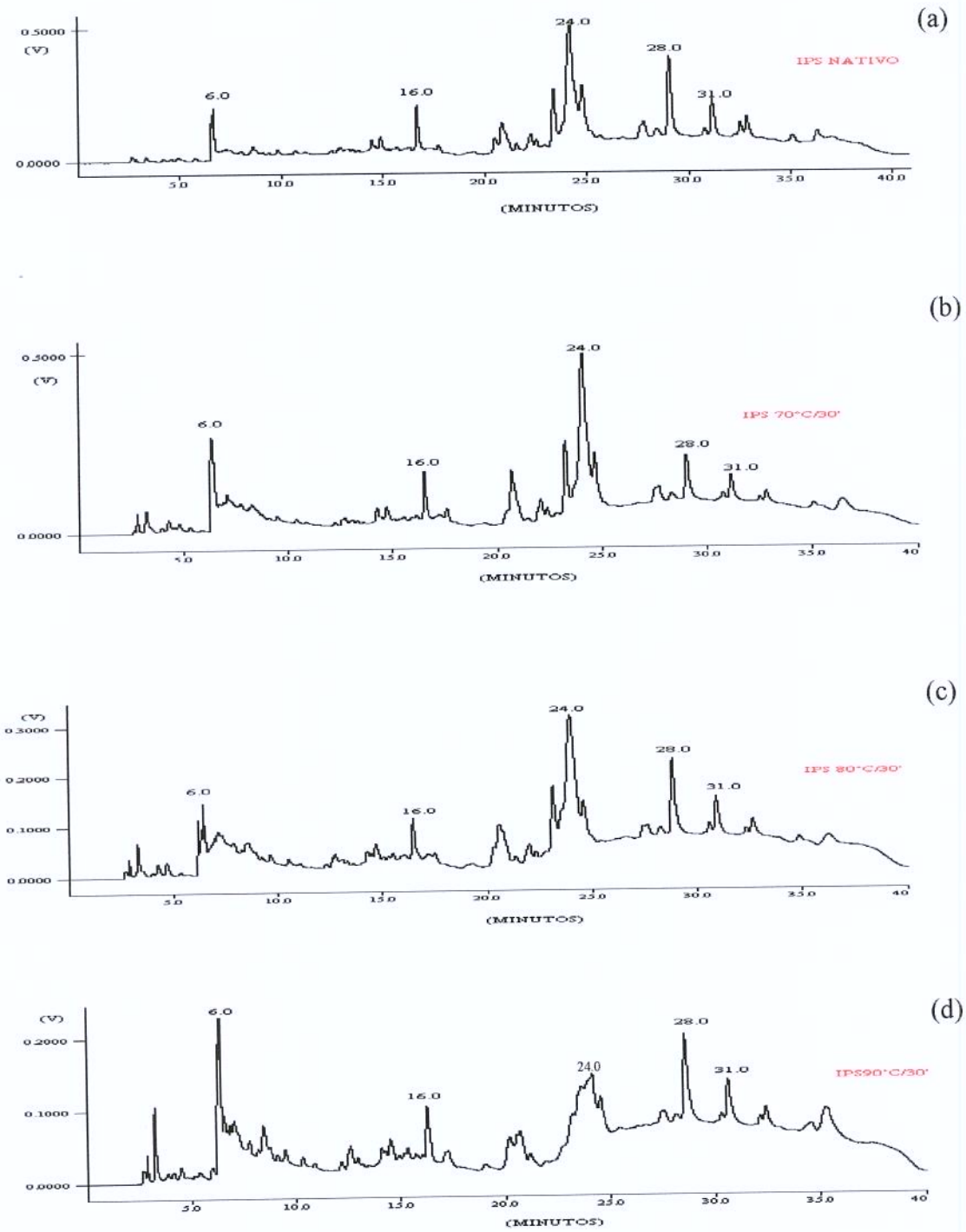


Figura 8. Cromatogramas de CLAE-FR dos IPSs: (a) IPS nativo, (b) IPS 70, (c) IPS80, (d) IPS90.

4. 2. Produção dos hidrolisados enzimáticos

Foram realizados ensaios preliminares para determinação das curvas de hidrólise dos isolados com α-quimotripsina. Para o IPS nativo, verificou-se que o grau máximo atingido foi de aproximadamente 2,8%, utilizando a relação de enzima para substrato de 1:30 e dispersão a 8% de proteína (Figura 9). Para os isolados termicamente tratados, nas mesmas condições, obteve-se grau máximo de hidrólise igual a 7,7; 8,7 e 5,5% para IPS 70, IPS 80 e IPS 90, respectivamente.

As diferenças encontradas quanto ao %GH máximo podem estar relacionadas ao desdobramento das cadeias polipeptídicas resultante do tratamento térmico, que facilitaria a ação da enzima por exposição de sítios específicos para a clivagem, no caso do IPS70 e do IPS80. Entretanto, o baixo GH obtido para o IPS90 pode ter sido devido à severidade do tratamento térmico, que promoveu a formação de agregados, via ligações dissulfeto, o que possivelmente dificultou a ação enzimática (Figura 10).

O tempo de hidrólise diminuiu consideravelmente, de duas horas (IPSn) para quinze minutos (IPS90), em função do aumento do grau de desnaturação térmica, confirmando que as proteínas são mais facilmente hidrolisadas na sua forma desnaturada que na forma nativa (Adler-Nissen, 1986; Achouri *et al.*, 1998 e Souza, 2000). Os teores de fitato pouco devem ter contribuído para a redução do tempo de hidrólise, uma vez que se mantiveram constantes com o aumento do tratamento térmico. Os altos valores de inibidores de tripsina encontrados para este isolado podem ter contribuído para a diminuição de atividade da enzima α-quimotripsina.

Utilizando-se as condições experimentais previamente estabelecidas obtiveram-se hidrolisados com 2 e 4% de GH (HIPSn/2%; HIPS70/2%; HIPS80/2%; HIPS90/2%; HIPS70/4%; HIPS80/4%; HIPS90/4%), não sendo possível obter HIPS nativo com 4% de GH. Souza (2000) obteve grau de hidrólise máximo de 4,5% para IPSn utilizando as mesmas condições de hidrólise.

4. 2. 1. Caracterização dos hidrolisados

4. 2. 1. 1 Composição centesimal dos hidrolisados (HIPSs) obtidos a partir dos isolados protéicos de soja

Nas determinações da composição centesimal dos HIPSs (Tabela 6), observou-se um aumento médio de 50% nos teores de cinzas dos hidrolisados em relação ao IPS nativo; isto deveu-se ao processo de hidrólise enzimática onde o pH é mantido constante com a adição de NaOH 1N até obter-se o grau de hidrólise desejado.

Tabela 6. *Composição centesimal média dos hidrolisados protéicos de soja a diferentes graus de hidrólise (HIPSs)*

Amostras	*% Proteína*[1,2,3]	*% Umidade*[1]	*% Cinzas*[1,3]
HIPSn/2%GH	95,41 ± 0,13	3,43 ± 0,11	4,78 ± 0,01
HIPS70/2%GH	95,38 ± 0,59	4,40 ± 0,11	4,79 ± 0,01
HIPS80/2%GH	94,88 ± 0,28	4,17 ± 0,10	4,57 ± 0,01
HIPS90/2%GH	95,64 ± 0,33	3,71 ± 0,01	4,50 ± 0,02
HIPS70/4%GH	97,00 ± 0,13	4,77 ± 0,02	5,12 ± 0,05
HIPS80/4%GH	98,57 ± 0,52	4,38 ± 0,02	5,17 ± 0,13
HIPS90/4%GH	96,33 ± 0,40	3,24 ± 0,15	5,11 ± 0,07

[1] Valores médios de 3 determinações
[2] N x 6,25
[3] Valores expressos em base seca

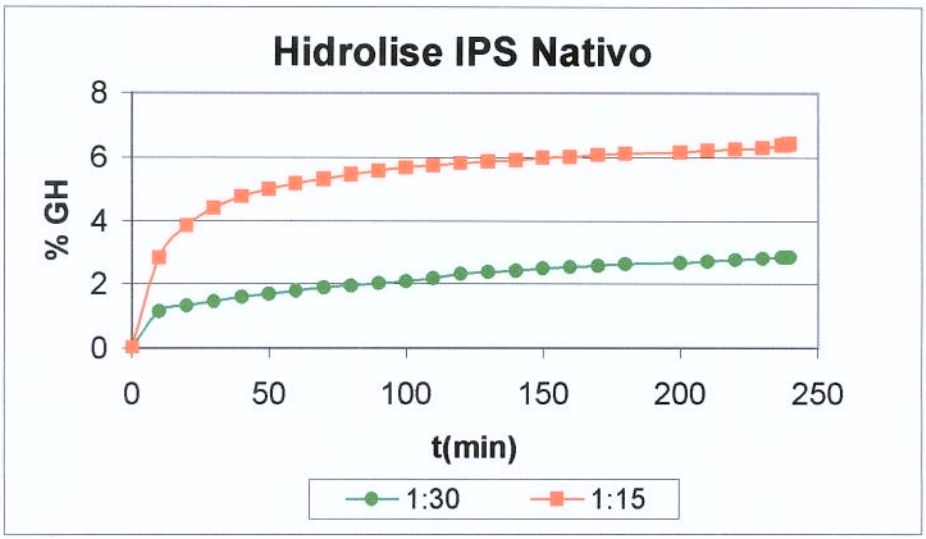


Figura 9. Curvas de Hidrólise do IPS nativo a diferentes proporções [E/S] (Dispersão protéica a 8%; T=40°C e pH=8,0)

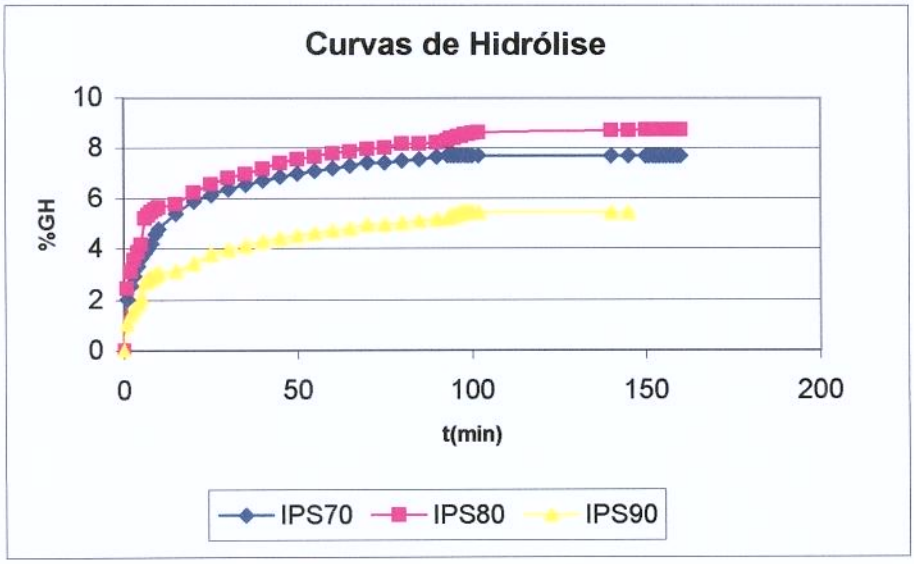


Figura 10. Curvas de Hidrólise dos IPSs tratados termicamente (Dispersão protéica a 8%; T=40°C; [E/S]=1:30 e pH=8,0)

4. 2 .1. 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida dos hidrolisados obtidos a partir dos IPSs

As Figuras 11 e 12 mostram o perfil eletroforético dos hidrolisados com grau de hidrólise (GH) igual a 2 e 4 %, obtidos a partir dos IPSs nativo e tratados termicamente. Observou-se que os HIPSs de mesmo grau de hidrólise apresentaram diferenças na proporção das frações 7S e 11S remanescentes. Na hidrólise do IPS nativo a 2%GH, as subunidades α e α' foram mais fortemente hidrolisadas que a β-7S, enquanto que a fração 11S permaneceu praticamente intacta. O aumento da severidade do tratamento térmico resultou no desaparecimento da fração 7S, enquanto que a globulina 11S permaneceu presente após a hidrólise. Possivelmente, a fração 7S foi mais susceptível à hidrólise, por estar desnaturada pelo aquecimento, conforme demonstrado por análise térmica de CDV (item 4.1.2); este comportamento também foi observado por Souza (2000). A maior estabilidade térmica da fração 11S, pode ter contribuído para uma maior resistência ao desdobramento das cadeias polipeptídicas e, conseqüentemente, ao ataque enzimático o que poderia explicar a permanência desta fração em todos os HIPSs (Figura 13).

Resultados semelhantes também foram relatados por Campbell *et al.* (1996), que investigaram a extensão do desaparecimento das subunidades da fração 7S e dos polipeptídios ácidos e básicos da fração 11S quando submetidas à hidrólise na presença da α-quimotripsina. Estes autores relataram que houve o desaparecimento da fração 7S e dos polipeptídios ácidos da fração 11S em GH maior que 0,3%, enquanto que, os polipeptídios básicos-11S foram mais resistentes a esta enzima por apresentarem menores quantidades de aminoácidos aromáticos.

Quanto aos hidrolisados com 4% de GH, notou-se o total desaparecimento da fração 7S e o gradual desaparecimento da subunidade ácida (poli A) da fração 11S com o aumento do tratamento térmico (Figura 12). A subunidade básica (poli B) permaneceu em todos os hidrolisados e o aparecimento de peptídeos de PM inferior a 14 kDa foi mais intenso do que o observado quando os IPSs foram hidrolisados até 2% de GH (Figura 11).

Estes resultados sugerem que o mecanismo de reação de hidrólise do IPS nativo seguiu o modelo *one-by-one*, onde foi observada tanto a presença de proteínas intactas como de peptídeos de baixo peso molecular; entretanto, a proteólise dos isolados tratados termicamente seguiu o modelo *zipper* devido à presença de peptídeos de baixo peso molecular. Este comportamento também foi relatado por Souza (2000), que utilizou iguais condições de hidrólise.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

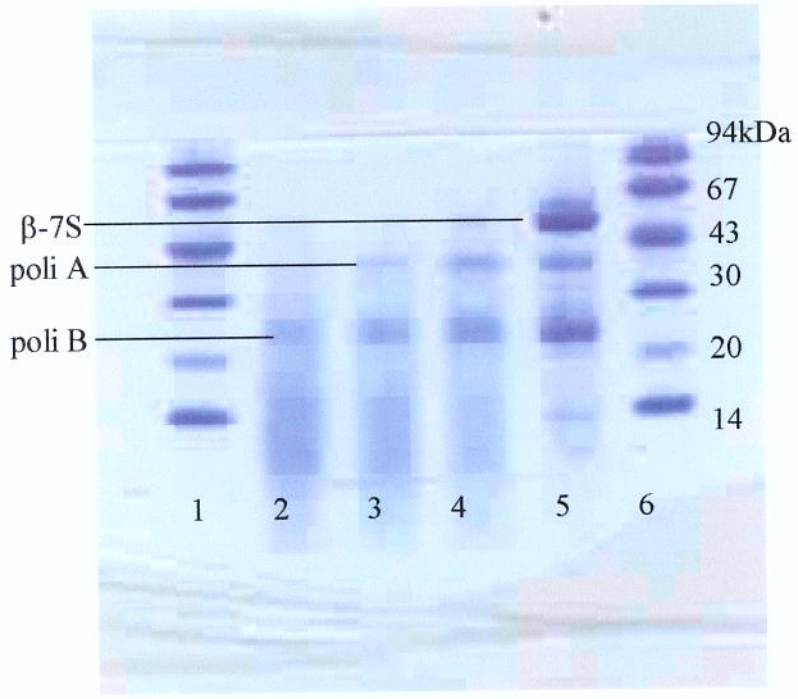


Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida de alta densidade, na presença de SDS, dos HIPSs com 2% de GH. Colunas 1 e 6: Padrão; Coluna 2: HIPS90; Coluna 3: HIPS80; Coluna 4: HIPS70 e Coluna 5: HIPS nativo.

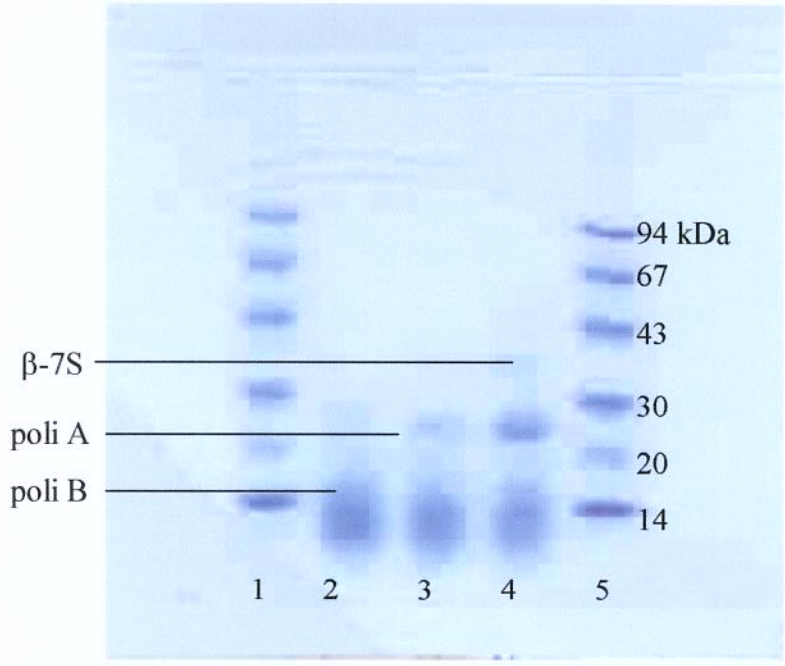
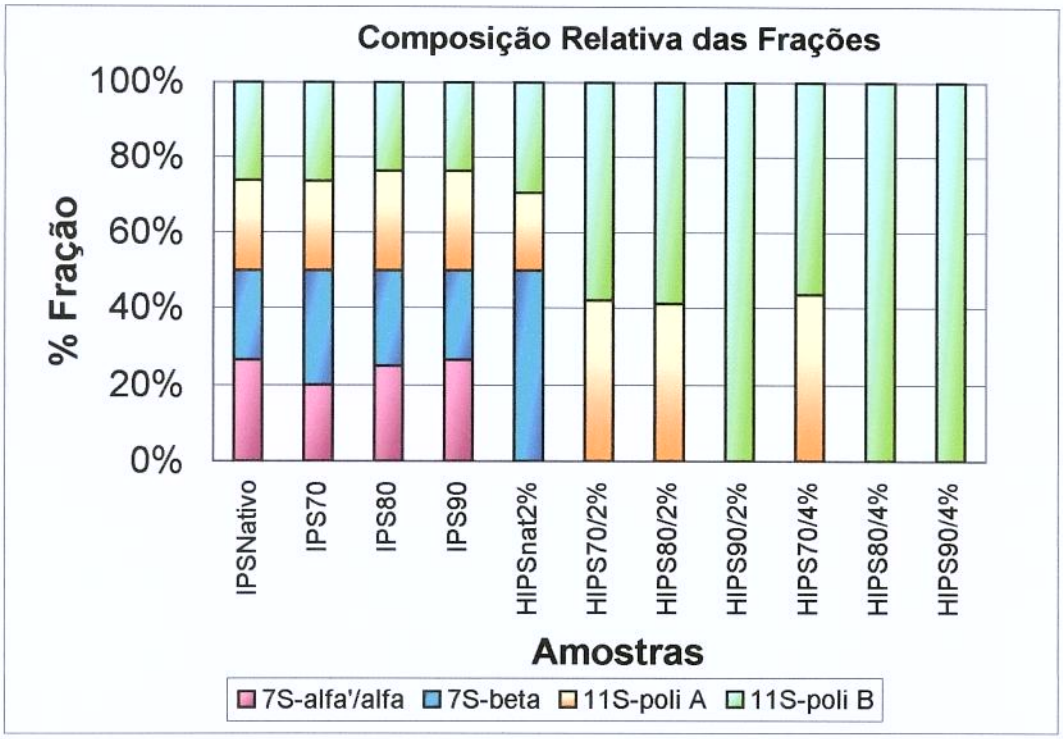


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida de alta densidade, na presença de SDS, dos HIPSs com 4% de GH. Colunas 1 e 5: Padrão; Coluna 2: HIPS90; Coluna 3: HIPS80 e Coluna 4: HIPS70.



Os valores representam a porcentagem da área das subunidades em relação à área total da globulina 7S e a porcentagem dos polipeptídios em relação à área total da globulina 11S, calculadas a partir da densitometria dos géis.

Figura 13. Composição relativa das subunidades/polipeptídeos das subunidades das frações 7 e 11S presentes nas proteínas dos IPSs e HIPSs.

4. 2. 1. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência dos HIPSs (CLAE-FR)

A cromatografia líquida de alta eficiência, especialmente a de fase reversa (CLAE-FR), tem se mostrado muito eficiente na separação de peptídeos de hidrolisados protéicos além de fornecer algumas características sobre o seu caráter hidrofílico/hidrofóbico (Lemieux *et al.*, 1990). O CLAE-FR tem sido utilizado no monitoramento da produção de peptídeos obtidos a partir das proteínas de soro de leite, na separação dos peptídeos obtidos na hidrólise de κ-caseína importantes na identificação de adulteração do leite com proteínas do soro e na separação de peptídeos biologicamente ativos de hidrolisados protéicos (Silvestre, 1997).

As Figuras 14 e 15 apresentam os cromatogramas dos HIPSs com 2 e 4 % GH. Diversamente dos cromatogramas dos IPSs (Figura 8), os hidrolisados apresentaram grande concentração de pequenos picos na zona I (0 – 24 min tempo retenção) e diminuição da concentração e da amplitude dos picos da zona II (a partir 24 min de eluição).

O aumento da concentração de picos dos HIPSs na zona I (Figura 14) sugere seu caráter hidrofílico. Comportamento semelhante foi relatado por Ortiz & Añón (2000), que sugeriram sua possível contribuição para o aumento da solubilidade e na mesma extensão, para outras propriedades de superfície como a emulsificação e formação de espuma. Os picos da zona II, com tempos de eluição de 28; 32 e 34 minutos, correspondem aos picos existentes no IPS representando, possivelmente, a fração não hidrolisada; além disto, ocorreu uma diminuição acentuada da quantidade do número de picos. Poucas mudanças foram observadas no perfil cromatográfico dos HIPSs com 4%GH (Figura 15) quando comparados aos HIPSs com 2%GH (Figura 14), notando-se o gradual desaparecimento do pico detectado aos 24 min de eluição com o aumento do tratamento térmico.

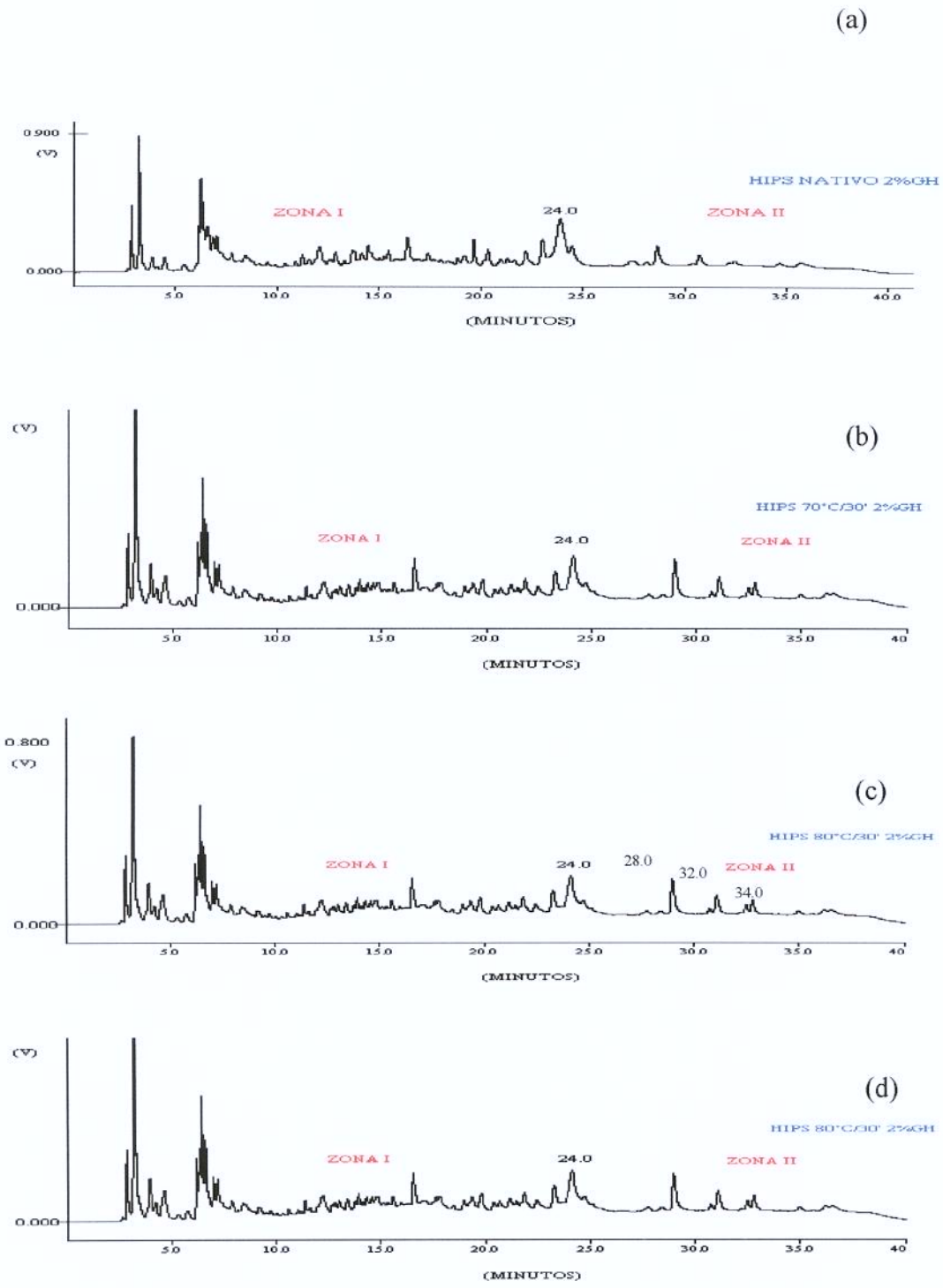


Figura 14. Cromatogramas de CLAE-FR dos HIPSs com 2% GH.
(a) HIPSnativo; (b) HIPS 70; (c) HIPS 80; (d) HIPS 90.

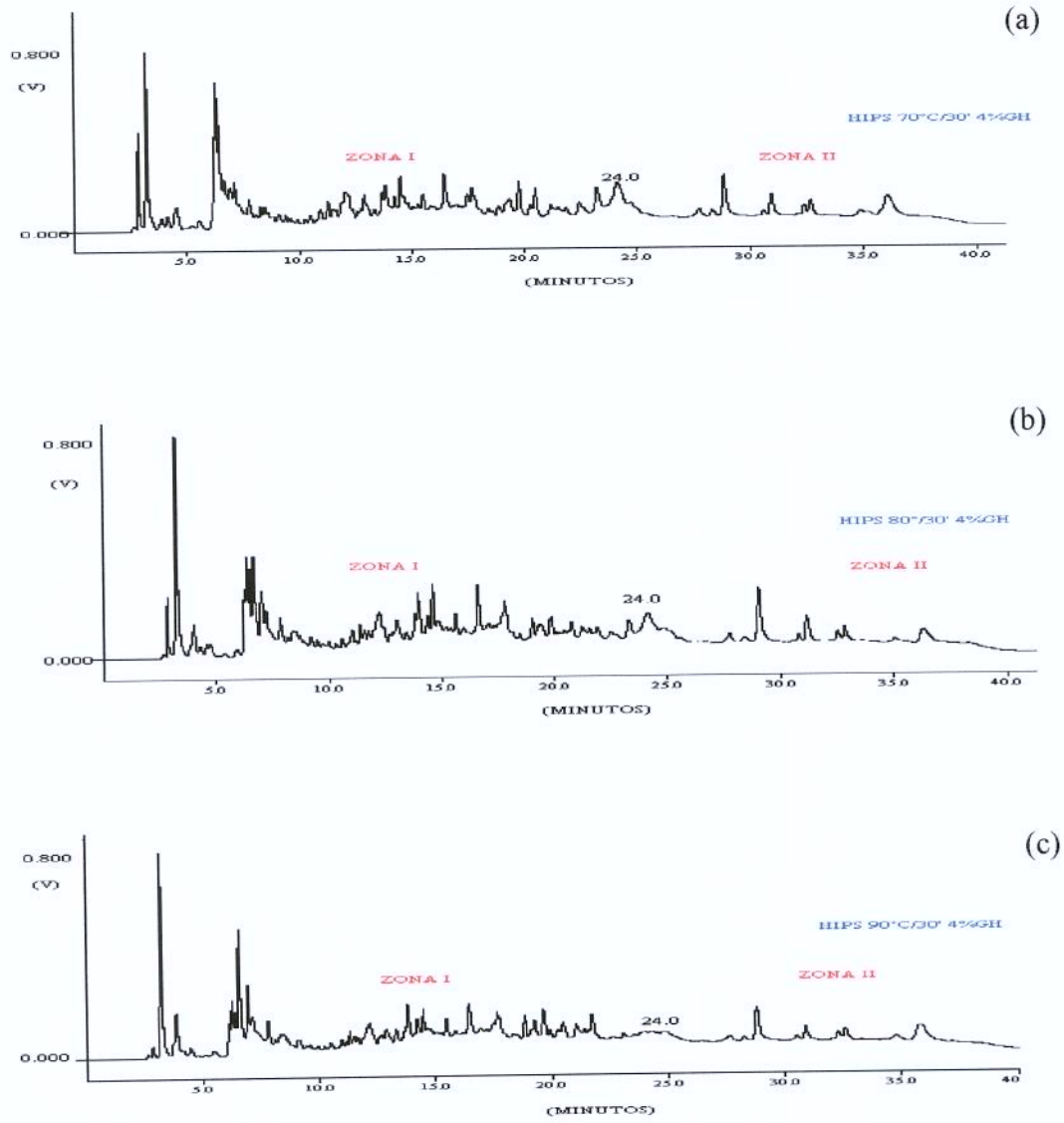


Figura 15. Cromatogramas de CLAE-FR dos HIPSs com 4% GH.
(a) HIPS 70; (b) HIPS 80; (c) HIPS 90.

4. 3. Propriedades funcionais dos isolados protéicos de soja e de seus hidrolisados

4. 3. 1. Solubilidade protéica

A conformação das proteínas da soja pode ser afetada por vários fatores, tais como, pH, força iônica, detergentes, temperatura (Peng *et al.*, 1984) e a formação de cadeias protéicas é o resultado do balanço entre as interações proteína-proteína, proteína-água e forças de atração e repulsão (Cheftel *et al.*, 1993). A concentração de sais é um parâmetro importante, pois afeta a conformação das proteínas, podendo também influenciar suas propriedades funcionais.

Desta forma, o controle de força iônica é de grande importância na avaliação das propriedades funcionais de proteínas. Na determinação da solubilidade pelo método de Morr *et al.* (1985), utilizou-se solução salina de NaCl 0,1M. Como no processo de obtenção dos hidrolisados protéicos foi adicionado NaOH 1N para controle do pH durante o processo de hidrólise, considerou-se importante avaliar a contribuição desta adição, que resultou em um aumento de 40 e 60% no teor de cinzas dos hidrolisados com 2 e 4 % de GH, respectivamente. Verificou-se então, que esta adição de NaOH 1N resultou em um pequeno acréscimo da força iônica da solução protéica, na ordem de 2,2 a 3,5%, o que não foi considerado importante na determinação das propriedades funcionais, visto que todos os experimentos foram realizados com solução de NaCl 0,1M.

Observa-se na Figura 16 (a, b, c) que os IPSs apresentaram um comportamento típico, com baixa solubilidade em pH 5, região do pI, aumentando nos pHs acima e abaixo deste valor. Este comportamento também foi citado por diversos autores (Bernardi *et al.*, 1991; Elizalde *et al.*, 1996; Were *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 1999; Babiker, 2000).

O pH afeta a densidade de cargas e o balanço eletrostático intra e intermolecular, modificando a habilidade da proteína em participar das interações hidro e lipofílicas. O aumento da densidade de cargas da proteína em pHs afastados da região do ponto isoelétrico favorece as interações proteína-água, resultando num aumento das propriedades de hidratação (Elizalde *et al.*,

1996). A ocorrência de baixa solubilidade próxima a região do pI é devido principalmente à falta de repulsão eletrostática, que promoveu agregação e precipitação via interações hidrofóbicas (Damodaran, 1996).

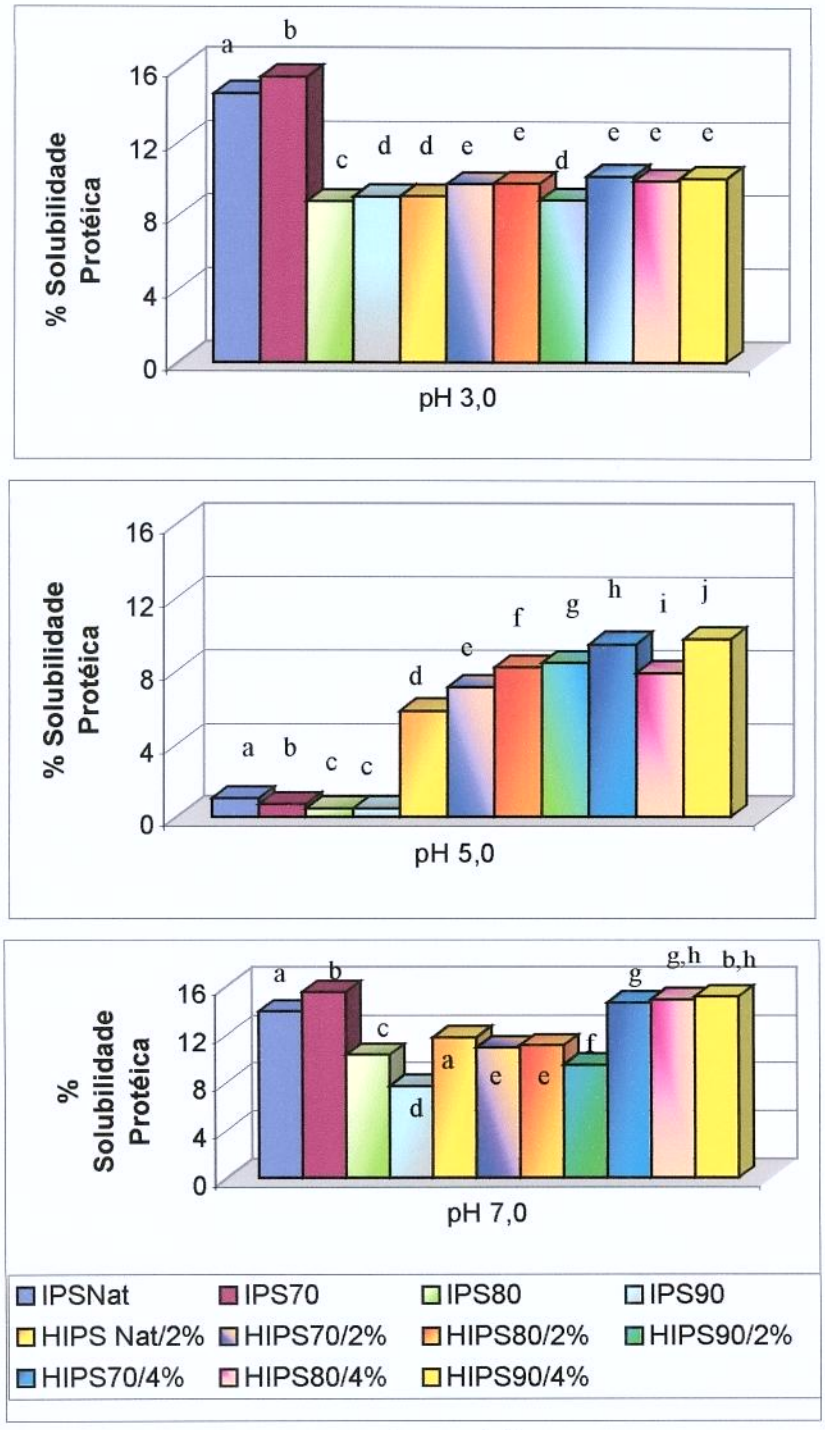
Os tratamentos térmicos com temperaturas de 80 e 90°C resultaram na diminuição significativa da solubilidade ($p<0,05$). O IPSn e o IPS70 apresentaram a maior solubilidade em todos os pHs estudados variando de 0,7% (pH 5) a 15,6% (pH 3), enquanto que o IPS 80 e IPS90 apresentaram solubilidade entre 0,5% (pH 5) e 10,3% (pH 7). O decréscimo da solubilidade apresentado pelos IPSs tratados com temperaturas acima de 80°C pode ser devido à formação de agregados insolúveis, com a participação de ligações dissulfídicas, fato constatado pelo decréscimo dos grupos de sulfidrilas livres observado após o tratamento térmico (Tabela 5).

O mecanismo de desnaturação térmica é altamente complexo e envolve, principalmente, desestabilização de um grande número de interações não covalentes. Pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e forças de van der Waals são exotérmicas, sendo desestabilizadas por altas temperaturas. Porém, como as pontes de hidrogênio estão localizadas no interior da molécula, elas permanecem estáveis numa ampla faixa de temperatura. Por outro lado, interações hidrofóbicas são endotérmicas, sendo estabilizadas em altas temperaturas e desestabilizadas em baixas temperaturas. As moléculas de água ligam-se a diversos grupos, incluindo resíduos não polares, via hidratação hidrofóbica (Damodaran, 1996).

A efetividade da hidrólise enzimática no aumento da solubilidade foi dependente do tratamento térmico sofrido pelo IPS e do pH da solução. Para todos os IPSs, a hidrólise resultou em aumento significativo da solubilidade apenas em pH5, onde houve um aumento de até 20 vezes em relação aos valores obtidos para a proteína intacta. Segundo Damodaran (1996), proteínas solúveis no pI apresentam uma alta relação entre os resíduos hidrofílicos e os não polares presentes na superfície. Se as forças de repulsão devido aos grupos carregados dos resíduos de aminoácidos forem maiores que as interações hidrofóbicas proteína-proteína, a proteína permanecerá solúvel no pI.

A solubilidade em pH 3 (Figura 16a) dos hidrolisados com 2% de GH obtidos a partir de proteínas com baixo grau de desnaturação, IPSn e IPS70, não atingiu os valores obtidos pela proteína intacta (14%), enquanto que para os hidrolisados obtidos a partir dos isolados com maior grau de desnaturação, IPS80 e IPS90, os valores foram próximos aos obtidos pelo substrato inicial (8% para IPS80 e 9% para IPS90). Apenas os HIPS com 4% de GH, em pH 7, apresentaram solubilidade superior aos isolados de origem. Diversos trabalhos relataram o aumento da solubilidade de hidrolisados protéicos em larga faixa de pH (Bernardi *et al.*, 1991; Elizalde *et al.*, 1996; Were *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 1999; Babiker, 2000).

Interessante notar que a solubilidade dos hidrolisados com 2% de GH obtidos a partir do IPS 90 foi o único a não apresentar diminuição da solubilidade em pH 5, apresentando solubilidade de 8% em todos os pHs estudados. Este aumento da solubilidade em pH 5,0 das amostras que sofreram tratamento térmico prévio e posterior hidrólise (Figura 16b), confere um potencial de aplicação na fortificação de bebidas.



(a)

(b)

(c)

Valores médios de 2 dispersões em NaCl 0,1M, analisadas em triplicata.
Barras com letras diferentes no mesmo pH diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Figura 16. Percentual das solubilidades protéicas dos isolados protéicos de soja (IPSs) e de seus hidrolisados enzimáticos (HIPSs).

4. 3. 2. Propriedades emulsificantes

As proteínas são consideradas bons agentes emulsificantes, devido à sua capacidade de adsorção à interface, o que proporciona estabilidade contra a separação de fases de vários sistemas alimentícios como produtos lácteos, de panificação e confeitaria, sorvetes, embutidos de carnes e maioneses. Propriedades emulsificantes e de superfície exercem um papel importante na utilização das proteínas da soja em formulações de produtos. A capacidade de emulsificação das proteínas deve-se as suas características físico-químicas tais como tamanho molecular, composição e seqüência de aminoácidos, conformação espacial, densidade de cargas e hidrofobicidade superficial (Kester & Richardson, 1984). Qualquer modificação capaz de alterar uma ou mais destas características, também pode modificar as propriedades de emulsificação.

As propriedades emulsificantes das proteínas dependem basicamente de dois efeitos: (a) um decréscimo substancial da tensão superficial devido à adsorção da proteína na interface água – óleo e (b) uma formação de uma barreira estrutural, eletrostática e mecânica capaz de se opor à desestabilização das gotículas emulsionadas (Wagner & Guéguen, 1999b).

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) e do Índice de Estabilidade da Emulsão (IEE) dos IPSs e de seus HIPSs estão apresentados na Figura 17. Quanto ao IAE do IPS nativo e dos IPSs tratados termicamente, observou-se que o aumento do tratamento térmico resultou num aumento das propriedades emulsificantes até a temperatura de 80°C (290 m^2/g). A 90°C observou-se uma redução do IAE, praticamente igualando-se ao valor encontrado para o IPSn (200 m^2/g). Comportamento semelhante foi relatado no estudo sobre a relação entre o método de obtenção, a estrutura e a funcionalidade de IPSs, realizado por Petruccelli & Añón (1994b), onde os autores relataram que o isolado dialisado e tratado termicamente a 80°C (pH 7,0) apresentou maior capacidade de emulsificação que o IPS nativo e o IPS90, o que foi atribuído à desnaturação da fração 7S e à elevação da taxa de adsorção na interface como resultado do aumento da hidrofobicidade superficial.

Ainda no mesmo estudo, Petruccelli & Añón (1994b) através de análise eletroforética das proteínas remanescentes na fase aquosa após a coalescência, observaram um alto conteúdo do polipeptídio A em relação aos outros componentes (α, α', β-7S e B-11S), indicando que este polipeptídio não migra para a interface. Em elevada força iônica, o polipeptídio A encontra-se parcialmente associado em agregados de alto peso molecular e este estado de associação somado à sua baixa hidrofobicidade superficial retardam a sua adsorção na interface (Wagner & Guéguen; 1995, 1999 a,b).

Os tratamentos térmicos prévios sofridos pelos IPSs resultaram em HIPSs com propriedades emulsificantes diferentes. Quanto ao IAE dos HIPSs (Figura 17), observou-se que as propriedades emulsificantes diminuíram com a hidrólise a 2 %GH (107,8 para HIPS70) quando comparado aos IPSs (256,3 para o IPS70), aumentando com a progressão da reação enzimática (280,3 para HIPS70/4%GH), mas não diferindo significativamente ($p<0,05$) dos IPSs. Os HIPSs com 2%GH apresentaram uma maior heterogeneidade de peso molecular, com a presença tanto de proteína intacta como de pequenos peptídios, que podem ter deslocado as cadeias intactas da interface, diminuindo a capacidade emulsificante. Todavia, com a progressão da hidrólise diminuiu-se a proporção de proteína intacta, obtendo-se um maior número de pequenos peptídeos, os quais puderam migrar e se orientar mais facilmente na interface óleo/água (Halling 1981; Wagner & Guéguen; 1995, 1999b).

A grande variedade de condições experimentais, enzimas utilizadas, tipo de matéria prima e tratamentos químicos e físicos empregados, dificultam a comparação da literatura com os resultados obtidos no presente trabalho. Vários autores relataram não ter observado mudanças na capacidade de emulsificação dos hidrolisados quando comparados ao IPS intacto (Bernardi *et al.*, 1991; Were *et al.*, 1997). No entanto, outros pesquisadores observaram uma diminuição das propriedades emulsificantes de hidrolisados com α-quimotripsina (Süle *et al.*, 1997; Babiker, 2000) e aumento do IAE de IPS tratado termicamente (Nir *et al.*, 1994) quando comparado ao IPS não tratado. Achouri *et al.* (1998) relataram aumento da capacidade de emulsificação do IPS até 5% GH, com diminuição das propriedades emulsificantes a elevados GH (8 e 10%).

A hipótese mais aceita é que a hidrofobicidade superficial é a característica da proteína mais importante que define o seu comportamento na superfície e conseqüentemente determina as propriedades emulsionantes (Graham & Phillips, 1979; Nakai, 1983; Nakai *et al.*, 1980; 1986). Estes autores correlacionam hidrofobicidade, tensão superficial e IAE, enquanto que outros autores concluem que para prevenir a floculação e aumentar a resistência à coalescência, a camada interfacial deve ser a mais densa possível, altamente hidratada e carregada para promover elevada repulsão eletrostática (Graham & Phillips, 1979; Dagorn-Scaviner *et al.*, 1987; Guéguen *et al.*, 1990; Petruccelli & Añón, 1994b).

Enquanto a formação da emulsão depende de uma rápida adsorção, desdobramento na interface e reorientação, a estabilidade é determinada pelo decréscimo da energia livre interfacial e também pelas propriedades reológicas do filme protéico formado (Damodaran, 1989). Três diferentes processos podem estar concomitantemente envolvidos na quebra da emulsão: cremeamento, floculação e coalescência (Dagorn-Scaviner *et al.*, 1987).

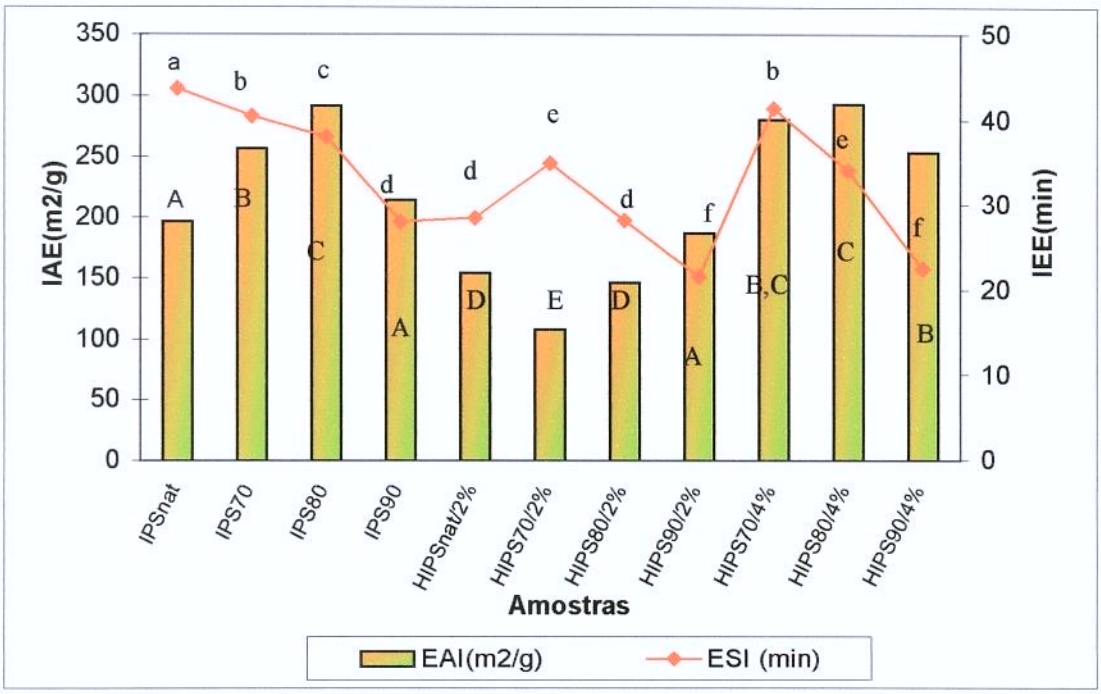
Os resultados da estabilidade da emulsão para os IPSs e HIPSs estão apresentados na Figura 17. Observou-se que a estabilidade diminuiu significativamente ($p<0,05$) com o aumento do tratamento térmico dos IPSs: 43,7min para IPSn e 28,1min para IPS90. Petruccelli & Añón (1994b) também relataram que IPSs tratados a 98°C por 5 e 30 minutos apresentaram baixa estabilidade com mais de 60% de coalescência, o que foi atribuído à diminuição da solubilidade. No mesmo estudo, as autoras observaram que o IPS dialisado e tratado a 80°C (pH 7,0) apresentou baixa liberação de óleo *(% oiling off)* e menor volume de fase aquosa, sendo atribuído à rigidez do filme formado. A mesma tendência de comportamento foi observada em nosso estudo, onde o IPS80 foi dentre todos os isolados, aquele que demonstrou conjuntamente os melhores valores do IEE (38,1 min) e IAE (291,2 m^2/g prot) (Figura 17).

A hidrólise promoveu maior estabilidade da emulsão apenas do HIPS 70°C/30' (2 e 4%GH). O aumento de temperatura do tratamento térmico e a hidrólise enzimática resultaram na diminuição do IEE dos HIPS80 e HIPS90 em ambos os graus de hidrólise (Figura 17). Entretanto, o valor do IEE encontrado para o IPSn (43,7min) foi o maior dentre todas as amostras e diferiu

significativamente ($p<0,05$) dos demais. Estes resultados sugerem que com o processo de hidrólise, houve a formação de peptídeos de baixo peso molecular, que foram rapidamente adsorvidos na interface, mas foram incapazes de estabilizar-se devido a não formação de um filme rígido nem de uma rede estrutural capaz de resistir às forças de deformação. De acordo com Halling (1981), a presença de pequenas moléculas surfactantes, como os peptídeos de baixo peso molecular, pode modificar a reologia superficial do filme protéico formado. Estes agentes tendem a penetrar ou mesmo a deslocar a proteína da interface, reduzindo a rigidez da superfície do filme protéico.

Os valores do IEE dos hidrolisados com 4%GH foram ligeiramente superiores (41,4min para HIPS70) àqueles dos hidrolisados com 2%GH (34,9min para HIPS70) e diferiram significativamente ($p<0,05$), exceto o HIPS90 (Figura 17). Isto pode estar relacionado a uma maior homogeneidade de peso molecular dos hidrolisados com 4% GH (Figura 12) que com 2%GH (Figura 11). Peptídeos de baixo peso possivelmente deslocaram as proteínas intactas da interface, diminuindo a estabilidade da emulsão dos HIPSs com 2%GH. Entretanto, o HIPS70/4% apresentou IEE semelhante ao da proteína intacta IPS70 (41min), não havendo diferença significativa entre eles ($p<0,05$). Os hidrolisados com 2% e 4% de GH (HIPS70, HIPS80 e HIPS90) apresentaram valores de IEE decrescentes em função do aumento de temperatura do tratamento prévio (Figura 17), demonstrando o impacto do tratamento térmico sobre as propriedades de emulsificação dos hidrolisados.

Os resultados sugerem que tratamento térmico prévio das proteínas da soja associado à baixo grau de hidrólise prejudicam as propriedades emulsificantes. Para sua melhor aplicação na formulação de produtos é conveniente empregar temperaturas que não excedam 80°C e/ou associado a grau de hidrólise superior a 2%.



Valores médios de 2 dispersões, em NaCl 0,1M, analisadas em triplicata.
Os resultados foram determinados em pH 7,0.
IEE = $(A_{20} - A_0)$ x t_{20} / A_0 , onde: An = absorbância no tempo t_n .
Barras com letras maiúsculas diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).
Pontos com letras minúsculas diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Figura 17. Índice Atividade Emulsificante (IAE) e Índice de Estabilidade de Emulsão (IEE) dos IPSs e de seus hidrolisados a 2 e 4% GH.

4. 3. 3. Propriedades Geleificantes

A etapa inicial importante no processo de geleificação das proteínas globulares consiste no aquecimento da solução protéica acima de sua temperatura de desnaturação. Após o resfriamento, os grupamentos expostos do polipeptídio desnaturado interagem-se, conduzindo a formação de uma complexa rede que atua como uma matriz capaz de reter água e outros componentes (Damodaran, 1988).

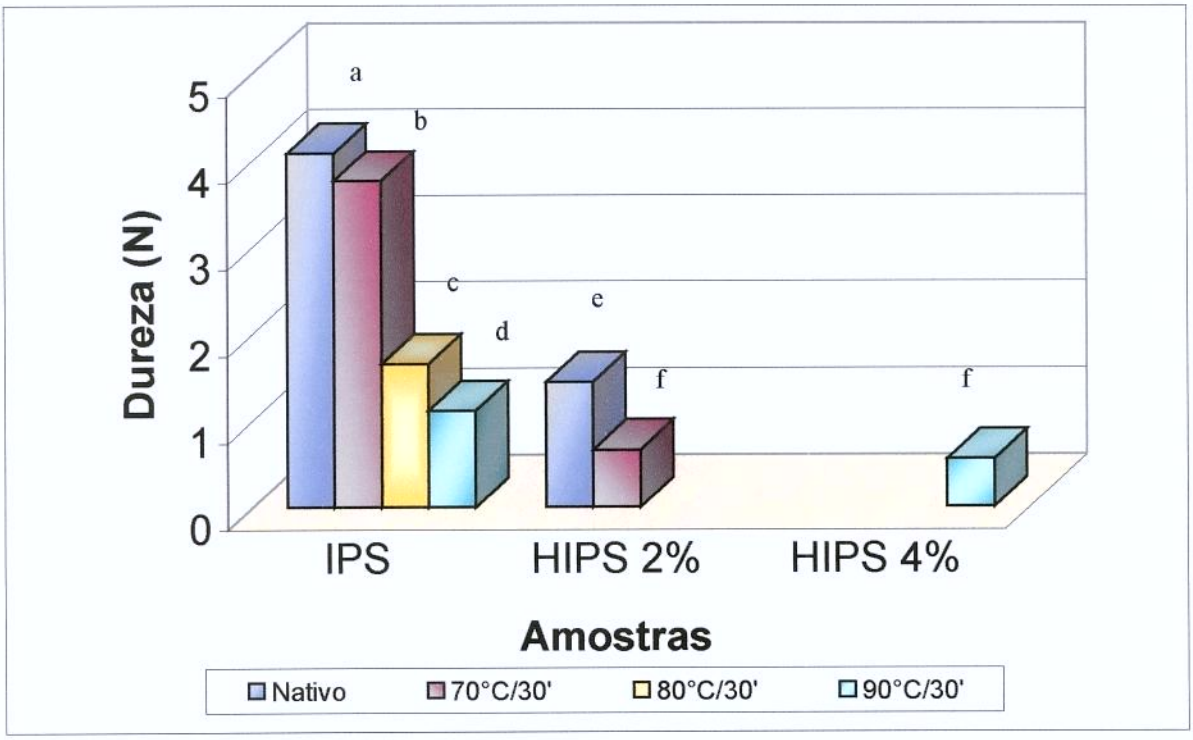
A desnaturação térmica e a formação de géis a partir de IPSs têm sido intensivamente estudadas. Segundo Renkema *et al.* (2000), a desnaturação térmica é um pré-requisito para a formação de gel obtido a partir de IPS e da fração glicinina, pois a temperatura de desnaturação térmica coincidia com a temperatura de geleificação. Para o IPS, a formação de gel coincidiu com a desnaturação térmica da β-conglicinina no pH 3,8 e 5,2 enquanto que, no pH 7,6 a formação de gel iniciou simultaneamente com a desnaturação da glicinina. Além disto, os autores relataram que a geleificação da glicinina sempre inicia a uma temperatura acima (92°C) de sua temperatura de desnaturação (88°C; pH 7,60), indicando que a fração 7S não forma gel na mesma concentração (10%).

Os resultados encontrados nas determinações da dureza dos IPSs e dos HIPSs estão apresentados na Figura 18. O tratamento térmico afetou significativamente ($p<0,05$) a dureza dos géis obtidos a partir dos IPSs, com redução marcante a partir de 80°C (4,1±0,18 N para IPSn e 1,6±0,06 N para IPS80). Embora o perfil eletroforético das proteínas totais dos IPSs (Figura 5) não apresentasse diferenças de composição de suas frações devido ao tratamento térmico, a partir de 80°C houve uma redução significativa do conteúdo de sulfidrila livre (Tabela 5), reduzindo a possibilidade de formação de ligações dissulfeto durante o processo de geleificação e, assim, diminuindo a dureza do gel obtido.

De acordo com Schmidt (1981), as interações hidrofóbicas são importantes nas reações de dissociação e associação, as quais iniciam o processo de geleificação e também estão envolvidas na reorientação dos filamentos do gel sob resfriamento resultando num aumento da dureza e da estabilidade. Utsumi & Kinsella (1985a,b) demonstraram que as forças envolvidas na formação da rede de géis obtidos a partir de IPSs eram devidas às pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, enquanto que, a manutenção da rede formada é devida às ligações dissulfídicas e pontes de hidrogênio. Segundo Kang et al. (1991) e Furukawa & Otha (1982), a dureza e a elasticidade dos géis de IPS dependem da formação de ligações dissulfeto.

A hidrólise enzimática das proteínas promoveu a formação de géis extremamente frágeis. A hidrólise do IPS nativo a 2%GH, diminuiu a dureza em aproximadamente 3 vezes de 4,1N para IPSn e de 1,4N para HIPSn/2%GH. Não foi possível a medida da dureza dos géis obtidos a partir do HIPS80 e HIPS90 com 2% de GH devido a sua fragmentação. A medida da dureza dos géis obtidos a partir dos HIPSs com 4% GH, foi possível apenas para o HIPS90 (Figura 18), cujo valor (0,6±0,02N) não diferiu significativamente ($p<0,05$) da dureza do gel obtido a partir do HIPS70/2% GH.

O tratamento prévio do IPS a 80°C resultou na desnaturação total da fração 7S e parcial da fração 11S, bem como, o aparecimento de peptídeos de baixo peso molecular após a hidrólise enzimática (Figuras 11 e 12). Nos HIPSn/2% e HIPS70/2% observou-se ainda a presença das frações 7S e 11S intactas, enquanto que, nos demais hidrolisados estas frações foram quase ou totalmente hidrolisadas. A permanência das frações intactas pode ter permitido a formação do gel, enquanto que, nos demais hidrolisados, a formação da rede foi dificultada pela presença de peptídeos de baixo peso molecular, que possivelmente propiciaram um aumento da carga efetiva e uma diminuição das interações proteína – proteína (Hillier *et al.*, 1980).



Valores médios de 9 repetições.
Dispersões preparadas com solução de NaCl 0,1M; pH 7,0 e 14% de proteína (p/p).
Os resultados estão expressos em Newtons (N).
Valores com letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Figura 18. Perfil de dureza *dos géis obtidos a partir dos isolados protéicos de soja (IPSs) e de seus hidrolisados (HIPSs).*

4. 4. Aparência macroscópica dos géis obtidos a partir de IPSs e de HIPSs

Segundo Damodaran (1996) as proteínas formam géis translúcidos ou do tipo coágulo, que são opacos. O tipo de gel depende das propriedades moleculares da proteína e das características da solução utilizada. Géis opacos são resultado de interações hidrofóbicas que ocorrem antes da desnaturação. Os agregados insolúveis formados associam-se ao acaso, formando géis tipo coágulo ainda durante o aquecimento da solução protéica. No entanto, géis translúcidos são resultado de redes ordenadas formadas por agregados solúveis, cuja associação predominantemente através de pontes de hidrogênio, ocorre mais lentamente durante o resfriamento da solução.

O pH exerce uma forte influência nas propriedades de retenção de água de géis devido às mudanças na densidade de cargas que determinam o grau de agregação ao acaso. A densidade de cargas na proteína é de grande importância no tipo de estrutura do gel formado. A pH 7,6 os géis formados apresentam-se translúcidos e sem a presença de grânulos, enquanto que, géis obtidos em pH 3,8 são opacos e granulares (Puppo *et al.*, 1995; Renkema *et al.*, 2000).

As Figuras 19 e 20 mostram, respectivamente, a aparência dos géis obtidos a partir dos IPSs e de seus hidrolisados. Os géis obtidos com os isolados com baixo grau de desnaturação, IPSn e IPS70, mostraram-se translúcidos e homogêneos, enquanto os géis obtidos com isolados com maior grau de desnaturação, IPS80 e IPS90, apresentaram-se opacos, esponjosos e com a presença de grânulos. Nenhum dos géis obtidos a partir dos isolados apresentaram perda de água ou exsudação após o resfriamento e corte. Os géis obtidos de hidrolisados com 2% de GH apresentaram diferentes características. Enquanto os géis dos hidrolisados obtidos de proteínas pouco desnaturadas (HIPSn e HIPS70) mostraram-se opacos e com exsudação (Figura 20 a;b), aqueles obtidos de hidrolisados obtidos de proteínas com maior grau de desnaturação, apresentaram maior translucidez, sem exsudação aparente e apresentando uma textura esponjosa (Figura 20 c;d). Os géis obtidos de hidrolisados com 4% de GH eram extremamente frágeis, fragmentando-se ao serem manuseados e apresentando grande exsudação (Figura 20 e; f).

Em relação aos IPSs, os resultados sugerem que nos géis formados por proteínas previamente desnaturadas, as interações hidrofóbicas foram favorecidas, ocorrendo a formação de géis opacos, enquanto que nos géis obtidos com proteínas nativas ou pouco desnaturadas, houve a formação de agregados solúveis com a formação de rede ordenada.

Nos géis obtidos a partir dos HIPSs com 2% de GH , os resultados sugerem que foram formadas redes diferentes daquelas dos géis com a proteínas intactas. Nos hidrolisados HIPSn/2% e HIPS70/2%, grande parte das frações protéicas permaneceram intactas após a hidrólise (Figura 11) e foram desnaturadas devido ao tratamento térmico para inativação da enzima, favorecendo a formação de géis opacos. Os hidrolisados HIPS80/2% e HIPS90/2% apresentaram menor proporção de proteínas intactas, possibilitando, possivelmente outras interações, que não a hidrofóbica na formação de rede mais ordenada e de menor opacidade do que os anteriores.

4. 5. Microestrutura dos Géis Obtidos a partir dos IPSs e dos HIPSs

O conhecimento da relação entre a microestrutura e a textura pode ser utilizada tanto para otimizar o processamento de alimentos como para o desenvolvimento de novos produtos com as qualidades sensoriais desejadas.

As micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos géis obtidos a partir dos IPSs e de seus hidrolisados protéicos (HIPSs) são mostradas nas Figuras 21, 22 e 23. Os géis dos isolados IPSn e IPS80 (Figura 21a,c) apresentaram microestruturas semelhantes, na forma de conglomerados distribuídos de forma homogênea. O IPS70 (Figura 21b) apresentou gel onde as partículas se associaram na forma de cordão de contas, enquanto que, o IPS90 (Figura 21d) apresentou estrutura com filamentos, na forma de um cordão de contas, mas dispostos linearmente. Interessante notar que embora macroscopicamente os géis do IPSn e do IPS80 apresentassem aparência e dureza diferenciadas (Figura 19), não foi possível observar diferenças em sua microestrutura (Figura 21a,c).

A estrutura dos géis obtidos a partir dos HIPSs com 2 % de GH, quando observadas sob aumento de 3500 vezes (Figuras 22a, b, c), não se mostrou diferente das estruturas observadas para os géis obtidos a partir dos isolados. Na Figura 22d, obtida com aumento de 150 vezes, observou-se uma estrutura esponjosa do gel, que havia sido observada a "olho nu". As imagens apresentadas nas Figuras 22a,b,c foram obtidas das paredes dos géis que apresentaram estruturas semelhantes às apresentadas na Figura 22d (HIPS80/2%GH).

As amostras dos géis obtidos a partir dos HIPSs com 4%GH foram as que apresentaram a maior perda de água após o resfriamento. Este comportamento pode ser, em parte, explicado pelas imagens das suas micrografias obtidas. O HIPS70/4%GH (Figura 23a) apresentou uma estrutura muito diferenciada das demais e caracterizada por formações estratificadas. As Figuras 23 b,d mostram a estrutura dos géis obtidos a partir do HIPS80/4% e do HIPS90/4%, que apresentaram partículas associadas na forma de conglomerados.Quando observados com menor aumento (150 vezes), os géis dos hidrolisados com 4%GH também mostraram uma estrutura pouco coesa, formada por blocos sobrepostos (Figura 23c, e), que podem ter contribuído para a sua baixa capacidade de retenção de água.

Os géis obtidos a partir dos HIPSs com 2 ou 4% de GH apresentaram grande perda de água, que pode estar associada ao tipo de estrutura formada, com grandes poros e/ou pouco coesas. Segundo Hermansson (1983; 1986), a perda de água pelos géis pode ocorrer de 2 formas: (1) Se houver uma tendência de aumentar as interações proteína-proteína e se estas tiverem um caráter homogêneo, o gel tenderá a encolher, perdendo água devido à diminuição de volume; (2) Se houver interações fortes localizadas, poderá ocorrer uma separação de fases e a formação de uma estrutura grosseira onde grandes capilares são formados entre os agregados, e a água fica presa menos firmemente, podendo ser expelida facilmente. Nos géis obtidos de HIPSs, possivelmente, ocorreu a segunda forma de perda de água. A presença de peptídeos de baixo peso molecular e de proteínas intactas ou de peptídeos de maior peso molecular podem ter gerado zonas de fortes interações, formadas pelas proteínas intactas e/ou de alto peso molecular e de zonas onde as interações eram mais dificeis, formadas pelos peptídeos de baixo peso molecular.

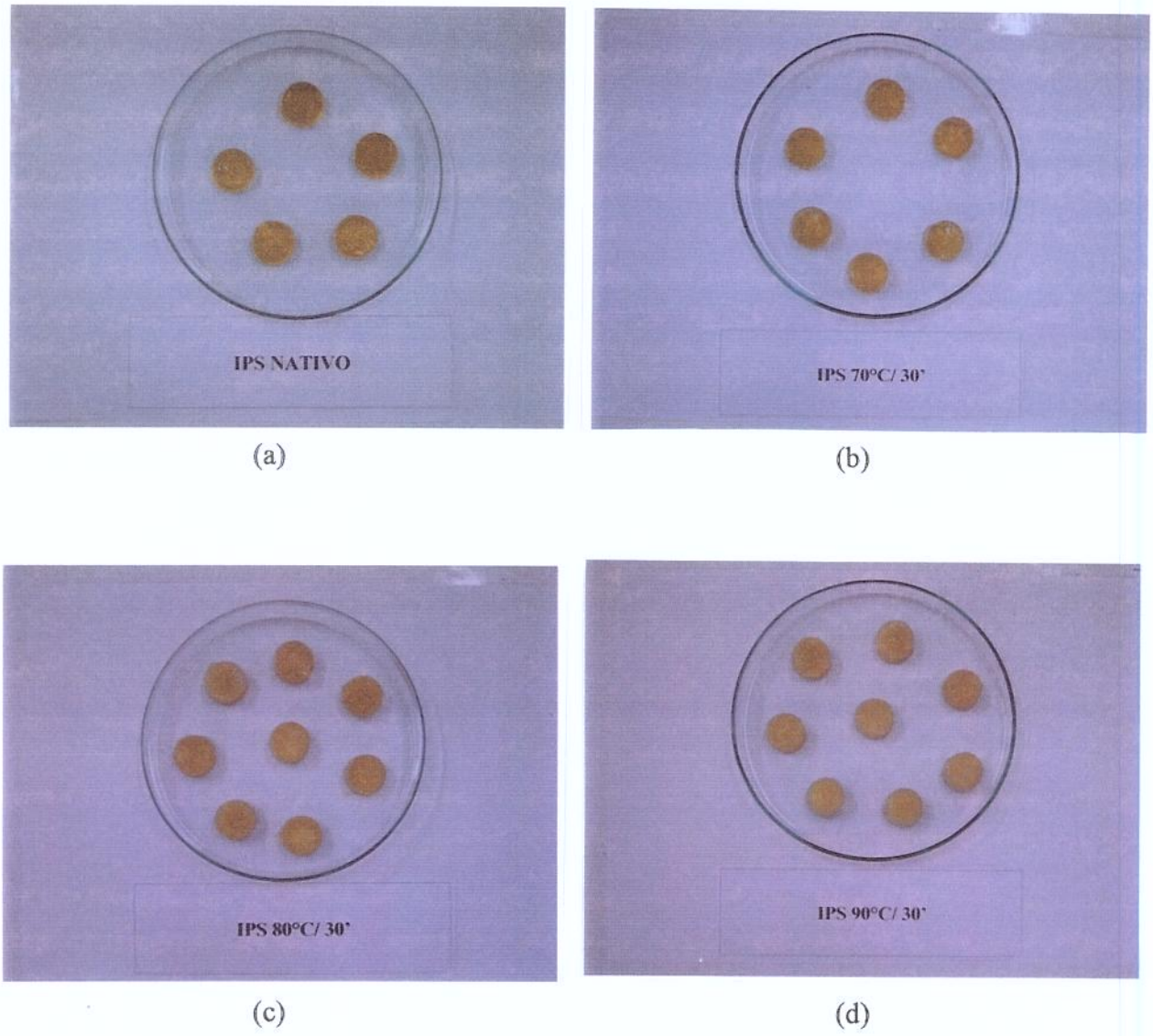


Figura 19. Aparência dos géis obtidos a partir dos IPS nativo e tratados termicamente, na concentração de 14% de proteína (p/p) em solução de NaCl 0,1M, pH 7,0 e aquecido a 95°C/30´.

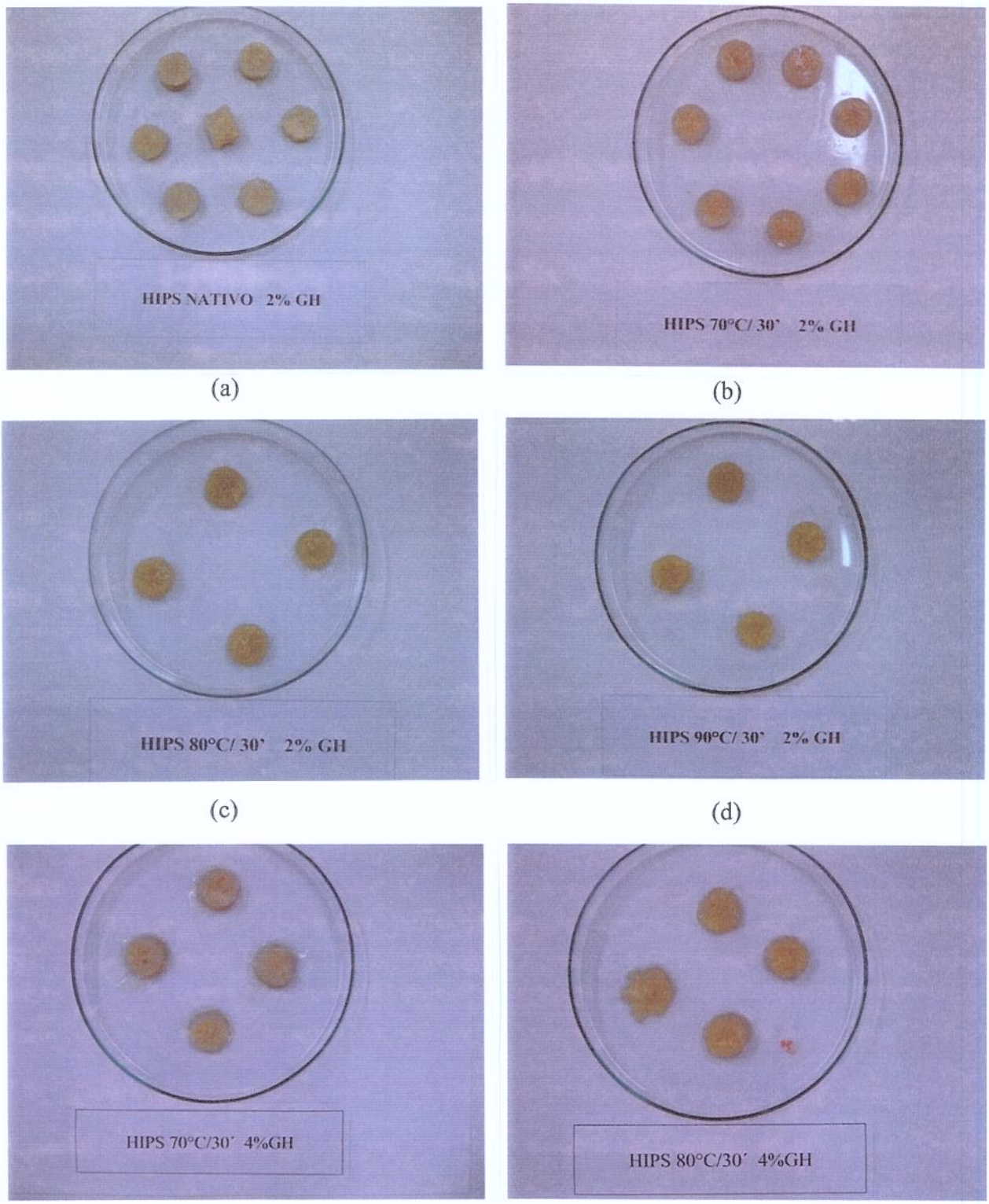
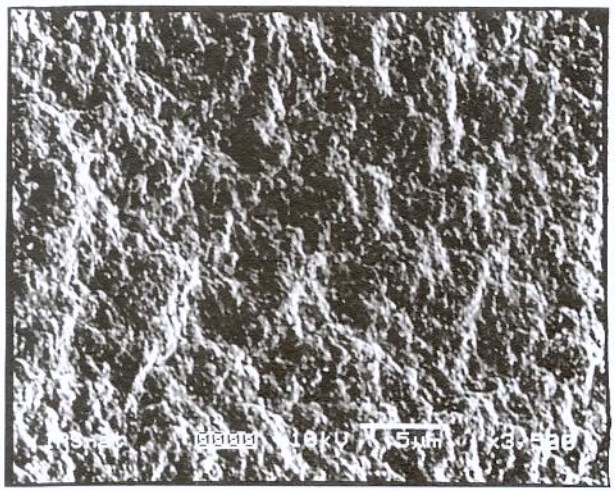
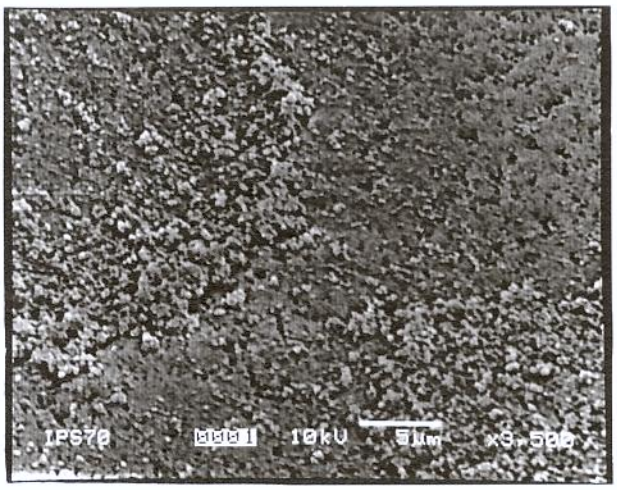


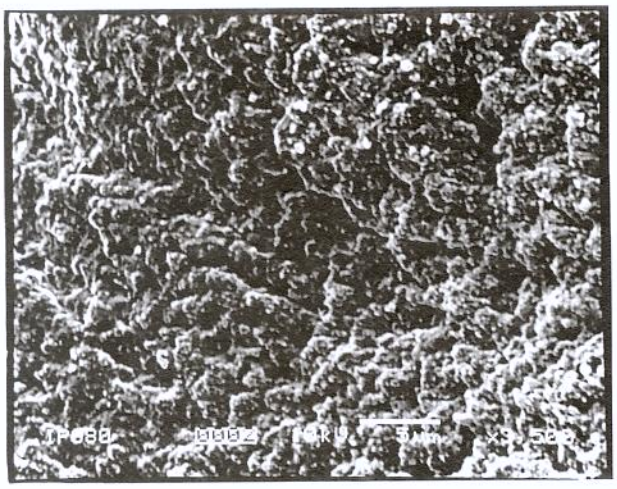
Figura 20. Aparência dos géis obtidos a partir dos HIPSs com 2 e 4% de GH, na concentração de 14% de proteína (p/p) em solução de NaCl 0,1M, pH 7,0 e aquecido a 95°C/30'.



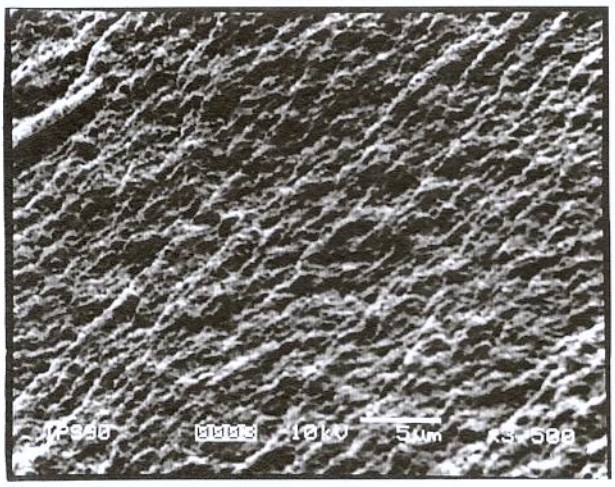
(a)



(b)

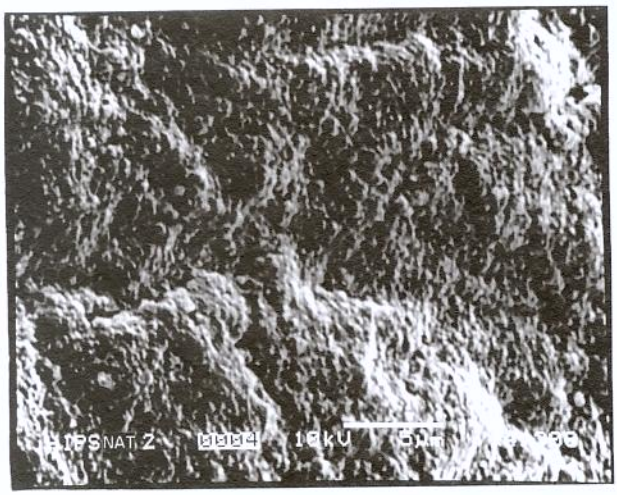


(c)

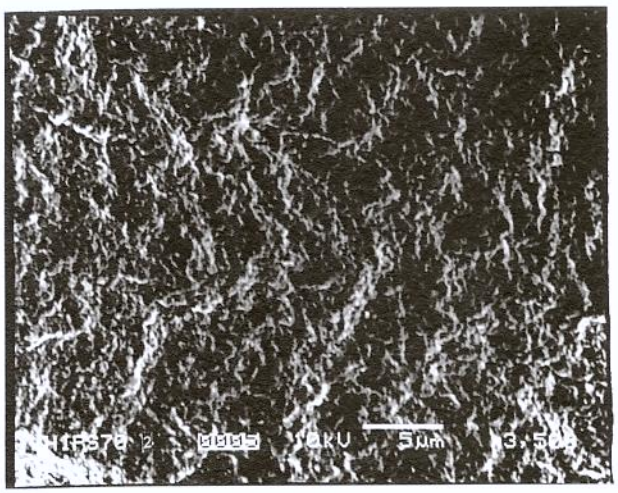


(d)

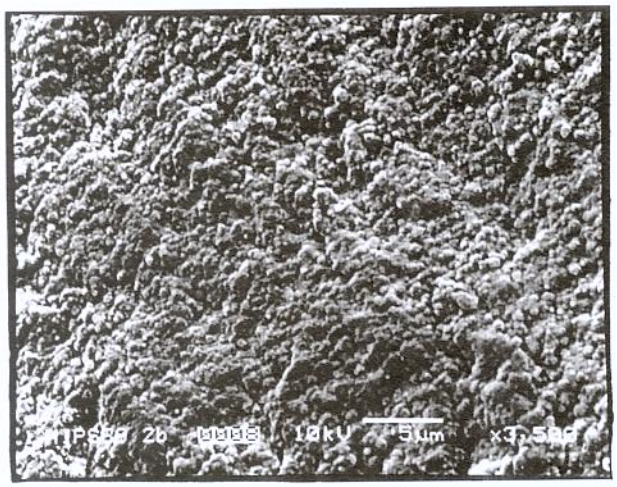
Figura 21. Micrografias obtidas por MEV dos géis obtidos a partir dos IPSs: (a) IPSn, aumento de 3500 vezes; (b) IPS70, aumento de 3500 vezes; (c) IPS80, aumento de 3500 vezes; (d)IPS90, aumento de 3500 vezes.



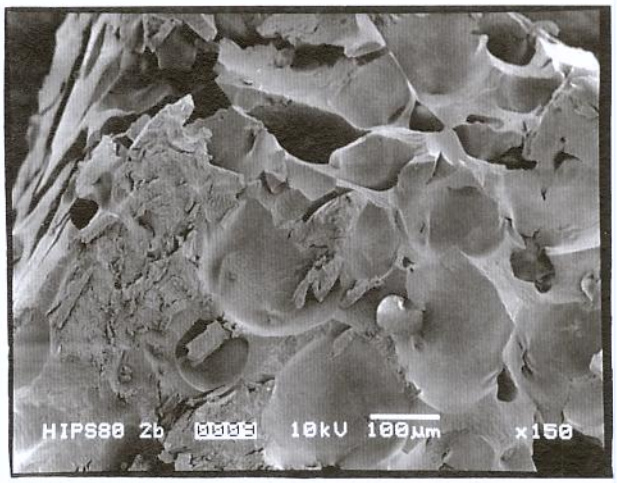
(a)



(b)

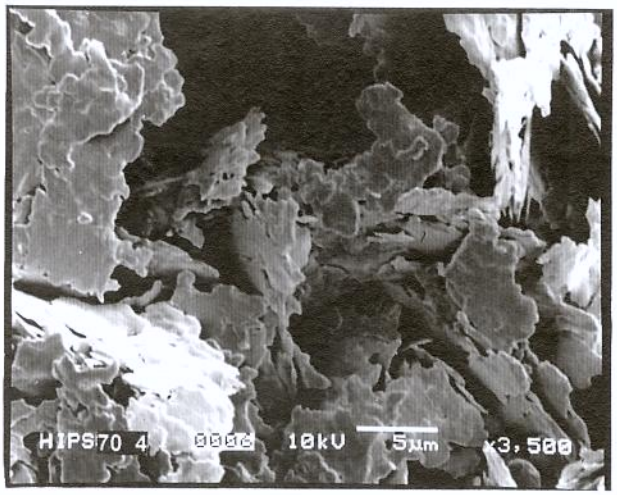


(c)

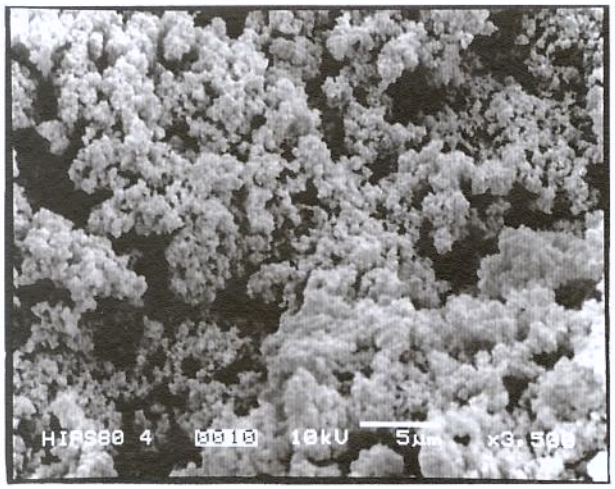


(d)

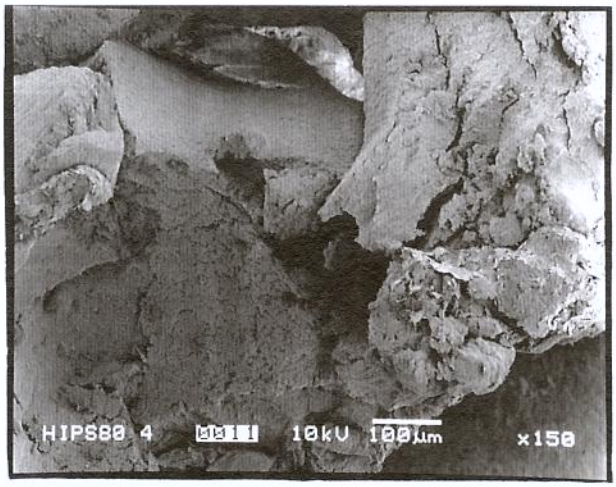
Figura 22. Micrografias obtidas por MEV dos géis obtidos a partir dos HIPSs: (a) HIPSn/2%GH, aumento de 3500 vezes; (b) HIPS70/2%GH, aumento de 3500 vezes; (c) HIPS80/2%GH, aumento de 3500 vezes; (d) HIPS80/2%GH, aumento de 150 vezes;



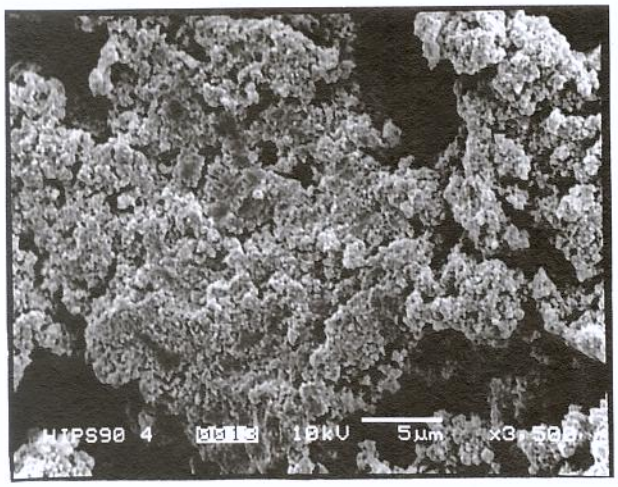
(a)



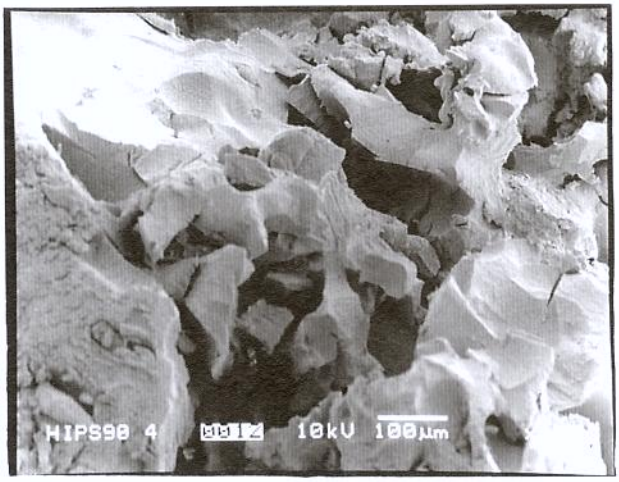
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 23. Micrografias obtidas por MEV dos géis obtidos a partir dos HIPSs: (a) HIPS70/4%GH, aumento de 3500 vezes; (b) HIPS80/4%GH, aumento de 3500 vezes; (c) HIPS80/4%GH, aumento de 150 vezes; (d) HIPS90/4%GH, aumento de 3500 vezes; (e) HIPS90/4%GH, aumento de 150 vezes.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

1. Os tratamentos térmicos empregados permitiram obtenção de isolados com diferentes graus de desnaturação, porém não acarretaram em mudanças do perfil eletroforético (SDS-PAGE) das proteínas totais e das proteínas solúveis.

2. O isolado protéico de soja nativo e os isolados tratados termicamente apresentaram propriedades funcionais diferentes:

(a) o tratamento térmico diminuiu significativamente ($p<0,05$) a solubilidade dos IPSs à temperatura acima de 80°C, devido possivelmente à formação de agregados insolúveis, com a participação de ligações dissulfeto;

(b) a atividade emulsionante aumentou nos IPSs tratados termicamente, com exceção do IPS90, que apresentou resultados iguais ao IPSn, enquanto que, a estabilidade da emulsão decresceu com o aumento da temperatura do tratamento térmico;

(c) o aumento da temperatura do tratamento térmico das proteínas diminuiu significativamente ($p<0,05$) a dureza dos géis.

3. A hidrólise enzimática dos IPSs com diferentes graus de desnaturação levou à obtenção de hidrolisados com diferentes características de distribuição de peso molecular e de caráter hidrofílico. Estas diferenças foram, possivelmente, devidas aos diferentes graus de desnaturação das frações 7 e 11S dos IPSs em função dos tratamentos térmicos empregados.

4. Os hidrolisados obtidos, com mesmo GH, apresentaram propriedades funcionais distintas, dependendo do tratamento térmico prévio sofrido pelos IPSs:

(a) hidrolisados oriundos de IPSs com maior grau de desnaturação apresentaram maior solubilidade. Nenhum hidrolisado, no entanto, apresentou solubilidade superior ao IPSn ou IPS70. A hidrólise a 2 e 4%GH resultou em aumento significativo da solubilidade apenas em pH5 (pI) e a efetividade da proteólise no aumento da solubilidade foi dependente do tratamento térmico sofrido pelo IPS e do pH da solução;

(b) a atividade emulsionante dos hidrolisados com 4%GH foi maior que a atividade apresentada pelos hidrolisados com 2%GH e os HIPSs com 4%GH não apresentaram diferenças entre si. A estabilidade da emulsão dos HIPSs com 4%GH foi, em geral, superior ao dos HIPSs com 2%GH. O aumento da temperatura do tratamento térmico previamente empregado nos IPSs resultou em diminuição da estabilidade da emulsão dos HIPSs;

(c) a hidrólise resultou em géis frágeis e com menor dureza que os géis obtidos com o IPS. A estrutura dos géis dos hidrolisados, ao contrário da formada pelo IPS, mostrou-se esponjosa, com grandes poros e baixa capacidade de retenção de água.

6. CONSIDERACÕES GERAIS

A hidrólise enzimática controlada vem sendo amplamente estudada com o objetivo de modificar ou melhorar propriedades funcionais de proteínas de diversas fontes. É atualmente utilizada na produção de alguns tipos de isolados protéicos de soja, mas tem grande potencial na modificação de proteínas que, devido à ausência de propriedades funcionais desejáveis, não são incorporadas a sistemas alimentares.

Embora inúmeros trabalhos sobre modificação ou melhoria de propriedades funcionais de proteínas utilizando hidrólise enzimática controlada tenham sido realizados, poucos trabalhos levaram em conta o histórico térmico das proteínas estudadas. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que alterações na conformação das proteínas levam a modificações na reação de hidrólise bem como em seus hidrolisados, resultando em produtos com diferentes características funcionais. Desta forma, quando a hidrólise controlada é utilizada como ferramenta para melhoria/modificação das propriedades funcionais, deve-se ter em conta que o apenas o controle das condições e do grau de hidrólise não garantem a obtenção de produtos com as características desejadas, o estado da proteína também é um importante fator a ser considerado.

Hidrolisados protéicos, obtidos por hidrólise extensa, são amplamente empregados na formulação de alimentos para pessoas com necessidades especiais. A inclusão destes hidrolisados em diferentes sistemas alimentares é um grande desafio. Foi possível observar no presente trabalho, que a presença de peptídeos, produto da hidrólise enzimática, pode causar impacto nas propriedades funcionais de proteínas. Pesquisas que contribuam para uma melhor compreensão do efeito da adição de hidrolisados em diferentes tipos de alimentos podem contribuir para aumentar a gama de produtos oferecidos para parcela da população que necessita consumir este tipo de produto.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzymatic hydrolysis of foods proteins**. Londres: Elsevier Applied Science Publishers, Ltd., 1986. 426p.

ADLER-NISSEN, J. Proteases. In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing: third edition.** Ed. San Diego: Academic, 1993. Cap: 7, p. 159-203.

ACHOURI, A.; ZHANG, W. & SHIYING, X. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional on the functional properties of resulting protein hydrolysates. **Food Research International**, Great Britain, v. 31, n. 196, p. 617-623, 1998.

ANDERSON, R. L. & WOLF, W. J. Composition changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, p. 581S-588S, 1995.

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis.** 12 ed. Washington, 1990.

AGUILERA, J.M. Gelation of whey protein. **Food Technology,** Chicago, v.49, n. 10, p.83-89, 1995.

AHMEDNA, M.; PRINYAWIWATKUL, W. & RAO, R. M. Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1340-1345, 1999.

ARRESE, E. L.; SORGENTINI, D.A.; WAGNER, J.R. & AÑON, M.C. Eletrophoretic, solubility and functional properties of commercial soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 39, n. 6, p. 1029-1032,1991.

BABIKER, E. E.; NAOTOSHI, M. & AKIO, K. Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 44, p. 3746-3750, 1996a.

BABIKER, E. E.; KHAN, M. & AKIO, K. Polymerization of protease digests and scid hydrolysate of soy protein by microbial transglutaminase for improvements of the functional properties. **Food Research International**, Great Britain, v. 29, p. 627-634, 1996b.

BABIKER, E. E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digest soy protein. **Food Chemistry**, Great Britain, v.70, p. 139-145, 2000.

BADLEY, R. A.; ATKINSON, D.; HAUSER, H.; OLDANI, D.; GREEN, J.P. & STUBBS, J. M. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdan, v.412, n. 2, p. 213-228, 1975.

BERNARDI, L.S.; PILOSOF, A.M.R. & BARTHOLOMAI, G.B. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. **Journal of the American Oil Chemists´Society**, Champaign, v. 68, n. 2, p. 102-105, 1991.

BEVERIDGE, T.; TOMA, S.J. & NAKAI, S. Determination of SH and SS groups in some food proteins using Ellman's reagent. **Journal of Food Science**, Chicago, n. 39, p. 49-51, 1974.

BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

BOATRIGHT, W. L. & HETTIARACHCHY, N. S. Effect of lipids on soy protein isolate solubility. **Journal of the Americam Oil Chemists' Society**. Champaign, v.72, p.1439-1444, 1995a.

BOATRIGHT, W. L. & HETTIARACHCHY, N. S. Soy protein isolate solubility abd surface hydrophobicity as affect by antioxidants. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, p.798-800, 1995b.

BOATRIGHT, W. L. & HETTIARACHCHY, N. S. Spray-dried soy protein isolate solubility, gelling characteristics, and extractable protein as affect by antioxidants. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, p.806-809, 1995c.

BROOKS, J. R. & MORR, C. V. Effect of phytate removal treatments upon the molecular weight and subunit composition of major soy protein fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 33, p. 1128-1132, 1985.

CABRAL, L. C.; SERNA-SALDIVAR, S. O. & TINSLEY, A. M. Effects of dehulling ant storage conditions on cooking requirements and chemical composition of soybeans. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion, Caracas**, v.45, p.36-40, 1995.

CAMPBELL, N. F.; SHIH, F. F.; HAMADA, J. S. & MARSHALL, W. Effect of limited proteolysis on the enzymatic phosphorylation of soy protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 759-762, 1996.

CANFIELD, R. & ANFINSEN, C. In: **Proteins** (2nd Ed.), 1963.

CATSIMPOLAS, N.; CAMPBELL, T. G.; & MEYER, E. W. Association-dissociation phenomena in glycinin. **Archives Biochemistry and Biophysical**, Saint Paul, v. 131, p. 577-586, 1969.

CATSIMPOLAS, N. & MEYER, E. W. Gelation phenomena of soybean globulins. I. Protein-Protein interactions. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 47, p. 559-569, 1970.

CIRCLE, S. J.; MEYER, E.W. & WHITNEY, R. N. Rheology of soy protein dispersions. Effects of heat and other factors on gelation. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 41, p. 157, 1964.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L. & LORIENTE, D. **Aminoacids, peptides, and protein.** In Food Chemistry; Fennema, O. R. Ed; Acribia: Zaragoza, Spain, 1993; Chapter 5, p. 275-414.

CHEN, B. H. Y. & MORR, C. V. Solubility and foaming properties of phytate-reduced soy protein isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, p.1139-1142, 1985.

CHEN, H. M.; MURAMOTO, K. & YAMAUCHI, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 574-578, 1995.

CHIANG, W. D.; SHIH, C. J. & CHU, Y. H. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. **Food Chemistry**, Great Britain, v.65, p.189-194, 1999.

COATES, J. B.; MEDEIROS, J.S.; THAN, V. H. & NIELSEN, N. C. Characterization of the subunits of beta-conglycinin. **Archives Biochemistry and Biophysical**, Saint Paul, v. 243, p. 184-194, 1985.

COCKRAN, W.G.; COX, G.M.**Experimental design.** 2 ed. New York: John Wiley, 1957, 611 p.

CUEVAS, R. & CHERYAN, M. Inhibidores de tripsina en alimentos a base de soya: revision critica de la cinetica de destruccion termica y los metodos de analisis. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Guatemala, v. 33, n. 4, p. 902-931, 1983.

DAGORN-SCAVINER, C.; GUEGUEN, J. & LEFEVRE, J. Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n. 6, p. 335-341, 1987.

DAMODARAN, S. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 2, p. 262-269, 1988.

DAMODARAN, S. **Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins.** In: Food Proteins; Kinsella, J. E. Eds.; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL, Chapter 3, pp. 21-51, 1989.

DAMODARAN, S. **Aminoacids, peptides, and protein.** In: Food Chemistry, 3rd. Ed; Fennema, O. R.; New York: Marcel Dekker Inc., 1996; Chapter 5, p. 373.

DE RHAM, O. & JOST, T. Phytate-protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy products. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, p.596-600, 1979.

ELIZALDE, B.E.; BARTHOLOMAI, G.B. & PILOSOF, A.M.R. The effect of pH on the relationship between hydrophilic/lipophilic characteristics and emulsification properties of soy proteins. **Food Science and Technology / Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie**, Zurich, v.29, p. 334-339, 1996.

FRøKJAER, S. Use of hydrolysate for protein supplementation. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 59, p. 86-88, 1994.

FURUKAWA, T.; OHTA, S. & YAMAMOTO, A. Texture-structure relationship in heat-induced soy protein gels. **Journal of Texture Studies**, Connecticut, v.10, p.333, 1979.

FURUKAWA, T. & OHTA, S. Mechanical and water-holding properties of heat-induced soy protein gels as related to their structural aspects. **Journal of Texture Studies**, Connecticut, v.13, n. 1 p.59-69, 1982.

GARCÍA, M. C.; MARINA, M. L; LABORDA, F.; TORRE, M.; Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, Great Britain, v.62, p.325-331, 1998.

GARCÍA, M. C.; MARINA, M. L; LABORDA, F.; TORRE, M.; Determination by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography of the soybean protein content of commercial soybean products prepared directly from whole soybeans. **Journal of Chromatography A**, Amsterdan, v.880, p.37-46, 2000a.

GARCÍA, M. C.; MARINA, M. L; LABORDA, F.; TORRE, M.; Characterization of commercial soybean products by conventional and perfusion reversed-phase high performance liquid chromatography and multivariate analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdan, v.881, p.47-57, 2000b.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Physicochemical properties of isolated soy proteins from broken and demaged seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 6, p. 1378-1381, 1411, 1992.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Composition and structural characteristics of isolated soy proteins from broken and demaged seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 58, n. 1, p. 148-152, 157, 1993.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Atividade inibitória de tripsina em produtos derivados de soja (Glicine max) consumidos no Brasil. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, p. 309-312, 1998.

GEISE, J. Protein as ingredientes: types, functions, applications. **Food Technology**, Chicago, n.48, n.10, p.50-60, 1994.

GERMAN, B.; DAMODARAN, S. & KINSELLA, J.E. Thermal dissociation and association behavior of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, p. 807-811, 1982.

GONZÁLEZ, R.J.; REMONDETTO, G.E.; COUTAZ, R. & SANTIAGO, L.G. Efectos de variables del proceso en planta piloto sobre algunas propiedades de aislados proteicos de soja. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 35, n. 1, p. 77-91, 1995.

GRAHAM, D. E. & PHILLIPS, M. C. Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. **Journal of Colloid Interface Sciences**, Washington, v.70, n. 6, p.415-426, 1979.

GUÉGUEN, J.; BOLLECKER, S.; SCHWENKE, K. D. & RAAB, B. Effect of succinylation on some physicochemical and functional properties of the 12S storage protein from rapeseed (*Brasica napus* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.8, p.61-69, 1990.

GUÉGUEN, J.; POPINEAU, Y.; ANISIMOVA, I. N.; FIDO, R. J.; SHEWRY, P. R. & TATHAM, A. S. Functionality of the 2S albumin seed storage proteins from sunflower (*Helianthus annus* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.6, p.1184-1189, 1996.

HALLING, P. J. Protein-stabilized foams and emulsions. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Florida, v. 10, p. 155, 1981.

HAMADA, J.S. & MARSHALL, W.E. Preparation and functional properties of enzymatically deaminated soy proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 3, p. 598-601, 1989.

HARDHAM, J. F. The determination of total and reactive sulphydryl of whey protein concentrates. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Sidney, n. 227, p. 153-155, 1981.

HENN, R. L; NETTO, F. M. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates (SPI). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p.3009-3015, 1998.

HERMANSSON, A.M. Protein functionality and its relation to food microstructure. **Qualitas Plantarum – Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 32, n. (3-4), p.369-388, 1983.

HERMANSSON, A.M. **Water and Fathholding.** In: Functional Properties of Food Macromolecules; Mitchell, J. R. & Ledward. D.A. Ed; Elsevier applied Science Publishers, 1986; Chapter 6, p. 273-314.

HETTIARACHCHY, N. S.; KALAPATHY, V. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.6, p.1110-1115, 1997.

HILLIER, R. M.; LYSTER, R. L. & CHEEMAN, G. C. Gelation of reconstituded whey powders by heat. **Journal of Science of Food and Agriculture,** London, v. 31, p. 1152-1157, 1980.

HONNING, D. H.; WOLF, J.; & RACKIS, J. J. Phytic acid phosphorous content of various soybean protein fractions. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 61, p. 655, 1984.

IMAFIDON, G. I.; KWAI, N. G.; HANG, K. T. & HARWALKAR, V.R. Differential scanning calorimetric study of different genetic variants of β-lactoglobulin. **Journal of Dairy Sciences**, Champaign, v.74, p. 2416-2422, 1991.

IWABUCHI, S. YAMAUCHI, F. Determination of Glycinin and β-Conglycinin in soybean proteins by immunological methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v.35, n.2, p.200-205, 1987.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, n. 3, p. 376-382, 1974.

KANG, J.; MATSUMURA, Y. & MORI, T. Characterization of texture and mechanical properties of heat-induced soy protein gels. **Journal of the Americam Oil Chemists' Society**. Champaign, v. 68, n.5, p.339-345, 1991.

KENNEDY, A. R. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. The **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, p. 733S-743S, 1995.

KESTER, J.J. & RICHARDSON, T. Modification of whey proteins to improve functionality. **Journal of Dairy Sciences**, Champaign, v.67, p. 2757-2774, 1984.

KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingridientes. **Process Biochemistry,** Rickmansworth, v. 23, n. 5, p. 149-157, 1995.

KIM, S. H.; KINSELLA, J. E. Surface active properties of food proteins: Effects of reduction of disulfide bonds on film properties and foam stability of glycinin. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, p.128-131, 1987a.

KIM, S. H.; KINSELLA, J. E. Surface active properties of food proteins: Effects of progressive succinylation on film properties and foam stability of glycinin. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, p.1341-1352, 1987b.

KIM, S. Y.; PARK, P. S. W. & REE, K. C. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 38, p. 651-656, 1990.

KIMBALL, M.E.; HSIEH, D.S.T. & RHA, C. Chymotrypisin hydrolysis of soybean protein . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 29, n° 4, p. 872-874, 1981.

KINSELLA, J.E. Functional properties of proteins is foods: a survey. **CRC Critical Review of Food Science and Nutrition**, Califórnia, v. 1, p. 219-281, 1976.

KINSELLA, J.E. Functional properties of soy proteins**. Journal of the Americam Oil Chemists' Society.** Champaign, v. 56, n.3, p.242-25, 1979.

KINSELLA, J.E.; GERMAN, B. & DAMODARAN, S. **Physicochemical and function properties of oilseed proteins with enphasis on soy proteins**. In: New Protein Foods. New York: Academic Press, 1985, v. 5.

KINSELLA, J.E. & WHITEHEAD, D.M. Proteins in Whey: Chemical, Physical and Functional Properties. In: **Advances in Food and Nutrition Research,** (Kinsella, J.E., ed.), pp. 343-438, Academic Press, 1989.

KINSELLA, J.E.; WHITEHEAD, D.M. & PHILLIPS L. G. In: **Structure - Function Properties of Food Proteins**, San Diego, pp. 25-69, 111-169, Academic Press, 1994.

KITABAKE, N.; TANI, Y. & DOI, E. Rheological properties of heat-induced ovalbumin gels by two-steps and one step heating methods. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, p.1632-1638, 1989.

KITAMURA, K.; TAKAGI, T.; SHIBASAKI, K. Subunit structure of soybean 11S globulin. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.40, n.9, p. 1837-1844, 1976.

KNUCKLES, B. E.; KUZMICCKY, D. D. & BETSCHART, A. A. effect of phytate ant partially hydrolyzed on *in vitro* protein digestibility**. Journal of Food Science**, Chicago, v.50, p.1080-1082, 1985.

KOSHIYAMA, I. A. A new method for isolation of the 7S globulin in soybean seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.36, p.2255-2257, 1972.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, **Nature,** London, n. 227, p.680-685, 1970.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.10, p.68-71, 1994.

LAKEMOND, C. M.M.; JONGH, H. H. J.; HESSING, M.; GRUPPEN, H. & VORAGEN, A. G. .J. Heat denaturation of soy glycinin influence of pH and ionic strength on molecular structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 1991-1995, 2000.

LANGTON, M.; ASTROM, A. & HERMANSSON, A.M. Texture as a reflection of microstructure. **Food Quality and Preference**, Great Britain, v. 7, n. 34, p. 185-191, 1996.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, 1980.

LAPVETELÄINEN, A.; KERROLA, K. & LINKO, R. Effect of Phytic Acid Hydrolysis on the Functionality of Soy Protein Isolate. **Food Science and Technology / Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie**, Zurich, v.24, p.71-75, 1991.

LEMIEUX, L. & AMIOT, J. Efficiency of five chromatographic systems for the separation of casein digest. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13 (20), p. 4023-4035, 1990.

LIANG, H. J. Fluorescence due to interactions of oxidizing soybean oil and soy proteins. **Food Chemistry,** Great Britain, v.66, p.103-108, 1999.

LIENER, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 58, n.3, p. 406- 415, 1981.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Critical Review of Food Science and Nutrition**, Califórnia, v. 34, p. 31-67, 1994.

LIU, G.; XIONG, Y. L. & BUTTERFILED, D. Chemical, Physical and Gel-forming Properties of oxidized myofibrils and whey- and Soy-protein Isolates. **Food Chemistry and Toxicology,** Washington, v. 65, n.5, p. 811-818, 2000.

LIU, G. & XIONG, Y. L. Thermal transitions and dynamic gelling properties of oxidatively modified myosin, β-lactoglobolin, soy 7S globulin and their mixtures. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture,** London, v.80, p. 1728-1734, 2000.

LUSAS, E. W.; RIAZ, M. N. Soy proteins products: processing and use. **The Journal of Nutrition,** Bethesda, v. 125, n. 3S, p. 573S-580S, 1995.

MA, C. Y. & HARWALKAR, V. R. Thermal analysis of food proteins. **Advances in Food and Nutrition Research**, Ottawa, v.35, p.317-367, 1991.

MAGA, J. A. Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutrional significance and methods of analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, p. 1-9, 1982.

MAHMOUD, M. I.; MALONE, W. T.; CORDLE, C. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.5, p.1223-1229, 1992.

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and Functional Properties of Protein Hydrolysates in Nutritional Products. **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 10, p. 89-95, 1994.

MARTINS, V. B. **Influência da estocagem nas características e na propriedade de geleificação do IPS.** Campinas, 2002. Tese (Mestrado em Alimentos & Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

McCORD, A.; SMYTH, A. B.& O'NEILL, E. E. Heat-induced gelation properties of salt – soluble muscle proteins as affected by non-meat proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, p.580-583, 1998.

MORR, C.V.; GERMAN, B; KINSELLA, J. E.; REGENSTEIN, J. M.; VAN BUREN, J. P.; KILARA, A.; LEWIS, B. A. & MANGINO, M. E. A collaborative study to develop a standartized food protein solubility procedure. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 1715-1718, 1985.

MORR, C.V. Current status of soy protein functionality in food systems. **Journal of the Americam Oil Chemists' Society**. Champaign, v. 67, n.12, p.265-271, 1990.

MORI, T.; NAKAMURA, T. UTSUMI, S. Gelation mechanism of soybean 11S globulin. Formation of soluble aggregates as transient intermediates. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, p. 26-30, 1982.

MUTILANGI, W.A.M.; PANYAM, D. & KILARA, A. Hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n.5, p. 1104-1109, 1995.

NAKAI, S.; HO, L.; HELBIG, N.; KATO, A. & TUNG, M. A. Relationship between hydrophobicity and emulsifying properties of some plant proteins. **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**, Ontario, v. 13, n. 3, p. 23-27, 1980.

NAKAI, S. Structure functional relationship of food proteins with emphasis on the importance of protein hydrophobicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 31, n° 10, p. 376-683, 1983.

NAKAI, S.; LI CAN, E. & HAYAKAWA, S. Contribuition of protein hydrophobicity to its functionality. **Narhung**, Berlin, v. 30, p. 327-336, 1986.

NEEDLEMAN, B. **Protein Sequence Determination.** *Springer-Verlag: New York*,1970.

NETTO, F. M. **Produção e caracterização de hidrolisado pancreático de isolado protéico de soja para nutrição clínica.** Campinas, 1992. 161p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

NIR, I.; FELDMAN, Y. & ASERIN A. Surface properties and emulsification behavior of denatured soy proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n.3, p. 606-610, 1994.

NORDAL, J. & FOSSUM, K. Heat-stability of some trypsin inhibitors im meat products with special reference to added soybean protein. **Zeitschrift Fur Lebensmittel Untersuchung Und Forschung**, New York, v. 154, p. 144-150, 1974.

OLSSON, C. STADING, M. & HERMANSSON, A. M. Rheological influence of non-gelling amylopections on B-lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids,** Netherlands, v.14, p. 473-483, 2000.

OOMAH, B. D. VOLDENG, H. & FREGEAU-REID, J.A. Characterization of soybean proteins by HPLC. **Plant Foods for Human Nutrition**, The Netherlands, v. 45, p. 251-263, 1994.

OTHA, N. Y.; MAEDA, H.; OKADA, M. & OTHA, H. Heat-induced gels of rice globulin: comparisions of gel properties with soybean and sesame globulins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 2, p. 366-370, 1994.

OHREN, J. A. Process and product characteristics for soya concentrates and isolates. **Journal of the Americam Oil Chemists' Society,** Champaign, v. 58, n. 3, p.333-335, 1981.

ORTIZ, S. E. M. & AÑÓN, M. C. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates. **Journal of the Americam Oil Chemists' Society**. Champaign, v. 77, n.12, p.1293-1301, 2000.

PANYAM, D. & KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, Cambrigde, v.7, p. 120-125,1996.

PEARCE, K. N. & KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.26, p.716-722, 1978.

PENG, I. C.; QUAS, D. W.; DAYTON, W.R.; ALLEN, C. E. The physicochemical and functional properties of soybean 11S globulin – A review. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 61, p. 480-490, 1984.

PETERSON, R. E. & WOLF, W. J. Scale-up from analytical to preparative reversed-phase high performance liquid chromatography of soybean glycinin. **Journal of Chromatography A**, Amsterdan, v.444, p.263-268, 1988.

PETRUCELLI, S. & AÑON, M.C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n.10, p. 2161-2169, 1994a.

PETRUCELLI, S. & AÑON, M.C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 2. Surface properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 10, p. 2170-2176, 1994b.

PETRUCELLI, S. & AÑON, M.C. Partial reduction of soy protein isolate disulfide bonds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 8, p. 2001-2006, 1995a.

PETRUCELLI, S. & AÑON, M.C. Thermal aggregation of soy protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n.12, p. 3035-3041, 1995b.

PETRUCELLI, S. & AÑON, M.C. pH-Induced modifications in the thermal stability of soybean protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.10, p.3005-3009, 1996.

PHILLIPS, R.D. & BEUCHAT, L.R. Protein Functionality in Foods. **ACS Symposium Series**, Washington D.C., 1981, pp 275.

PRADO, V. C.; ANTUNES, P. L. & SGARBIERI,V. C. Antinutritional occurrence and some physicochemical properties of the protein fractions of five soybean varieties. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Guatemala, v.30, p.551-563, 1980.

PRIVALOV, P. L. & KHECHINASHVILI, N. N. A Thermodynamic approach to problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 86, p. 665-684, 1974.

PUPPO, M. C.; LUPANO, C. E. & AÑON, M. C. Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.9, p.23-56-2361, 1995.

PUPPO, M. C. & AÑÓN, M. C. Soybean protein dispersions at acid pH. Thermal and rheological properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, p. 50-56, 1999.

PUSKI, G. Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 52, p. 655, 1975.

RENKEMA, J. M. S.; LAKEMOND, C. M. M.; JONGH, H. H. J.; GRUPPEN, H. & VLIET, T. V. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. **Journal of Biotechnology**, Washington, v.79, p.223-230, 2000.

RICHARDSON, T. **Functionality changes in proteins following action of enzymes**. In: Feeney, R. E.; Whitaker. R. Food proteins: Improvement through chemical and enzymatic modification, Washington, D.C.: Ed. Advances Chemistry Series, 1977, v. 160, 185p.

RODRIGUEZ, C. J.; MORR, C. V. & KUNKEL, M. E. Effect of partial phytate removal and heat upon iron bioavailability from soy protein-based diets. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, p.1072-1075, 1985.

SCHIMDT, R. H. **Gelation and Coagulation**. In: Protein Functionality in Foods. J. P. Cherry Eds.; American Chemical Society : Washington, D. C., pp. 131, 1981.

SCILINGO, A.A. & AÑÓN, M. C. Calorimetric study of soybean protein isolates: Effects of calcium and thermal treatments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 3751-3756, 1996.

SILVESTRE, M. P. C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. **Food Research International**, Great Britain, v. 31, p. 263-275, 1997.

SHURTLEFF, W., AOYAGI, A. Early uses of soy protein in Far East, US. Inform International New on Fats, **Oils and Related Materials**, Champaign, p.282-290, v. 3, n.3, 1992.

SNYDER, H. E. & KWON, T. W. (Ed.) **Functional properties of soy proteins**. Soybean Utilization, New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1987, p. 163-186.

SOUZA, A.S. **Estudo do comportamento de isolados protéicos de soja submetidos à diferentes tratamentos térmicos e hidrolisados enzimaticamente com α-quimotripsina**. Campinas, 2000. Tese (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SORGENTINI, D. A.; WAGNER, J. R. & AÑÓN, M. C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationships of soluble and insoluble fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 2471-2479, 1996.

SÜLE, E; HAJÓS, GY. & TÖMÖSKÖZI, S. Functional properties of the enzymatically modified soya protein isolate. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 26, n. 3, p. 279-285, 1997.

SMITH, A. K. & CIRCLE, S. J. **Soybeans: Chemistry and Technology**. Connecticut: The Avi Publishing Co., INC., 1972. 470p.

THAN, V. H. & SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds straightforward fractionation and their characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.24, n.6, p.1117-1121, 1976.

THAN, V. H. & SHIBASAKI, K Major protein of soybean seeds. Subunit structure of β-conglycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, p. 692-695, 1978.

THAN, V. H. & SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds. Reversible and irreversible dissociation of β-conglicinin into subunits by heat treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.39, n.1, p.34-40, 1991.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; CALIXTO, F. S. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **CRC Critical Review of Food Science and Nutrition**, Califórnia, v. 1, p. 1-22, 1991.

TURGEON, S. L.; GAUTHIER, S. F. & PAQUIN, P. Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 57, p. 601-604, 1992.

UTSUMI, S.; INABA, H.; MORI, T. Heterogeneity of soybean glycinin. **Phytichemistry**, Oxford, v. 20, n.4, p. 585-589, 1981.

UTSUMI, S. & KINSELLA, J. E. Forces involved in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation hardness and solubility of heat induced gels from 7S, 11S and soy isolate. **Journal of Food Science**, Chicago, v.50, p.1278-1282, 1985a.

UTSUMI, S. & KINSELLA, J. E. Structure-function relationship in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S and soy isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.33, p.297-303, 1985b.

VOUTSINAS, L.P.; NAKAI, S. & HARWALKAR, V.R. Relationships between protein hydrophobicity and thermal functional properties of food proteins. **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**, Ontario, v. 16, n. 3, p. 185-190, 1983.

VISSER, S.; SLANGEN, K.J. & ROLLEMA, H. S. Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography, **Journal Chromatography A**, Amsterdan, v. 548, p. 361-370, 1991.

WAGNER, J. R. & AÑÓN, M. C. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulphydryl content on solubility ant water absorbing capacity of soy protein isolates. **Journal of Food Science,** Chicago, v. 55, p. 765-770, 1990.

WAGNER, J. R. & GUÉGUEN, J. Effects of dissociation, deamidation, and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.6, p.1993-2000, 1995.

WAGNER, J. R. & GUÉGUEN, J. Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glicinin. 1. Foaming Properties **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, n.6, p.2173-2180, 1999a.

WAGNER, J. R. & GUÉGUEN, J. Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glicinin. 1. Emulsifying Properties **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, n.6, p.2181-2187, 1999b.

WANG, C.R. & ZAYAS, J.F. Emulsifying capacity and emulsion stability of soy protein compared with corn germ protein flour. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 3, p. 726-731, 1992.

WERE, L.; HETTIARACHCHY, N. S. & KALAPATHY, U. Modified Soy proteins with improved foaming and water hydration properties. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, n. 4, p. 821-824, 1997.

WOLF, W. J. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.18, n.6, p.969-976, 1970.

WOLF, W. J. & COWAN, J. C. **Soybean as food source food uses of soybean proteins**. Ed. Revisada, Cleveland: CRC Press, INC, 1975. 101p.

WOLF, W. J. **Soybean Chemistry and Technology**. Vol. 1, Proteins. AIV Publishing. Co., Westport, CT, p. 93, 1978.

YAMAGISHI, T; YAMAUCHI, F. & SHIBASAKI, K. Isolation and partial characterization of heat-denatured products of soybean 11S globulin and their analysis by electrophoresis. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 44, p. 1575-1582, 1980.

YAMAUCHI, F; YAMAGISHI, T. & IAWABUCHI, S. Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. **Food Review International**, Califórnia, v. 7 (3), p. 283-322, 1991.

YASUMOTO, K.; SUDO, M. & SUZUKI, T. Quantitation of soya protein by enzyme linked inmunosorbent assey of its characteristic peptide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.50, p.377-389, 1990.