

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

UTILIZAÇÃO DE UM REATOR ENZIMÁTICO
CONTINUO ULTRAFILTRANTE PARA OBTEN
ÇÃO DE HIDROLIZADO PROTEICO.

VLADIMIR PEZOA GUTIÉRREZ
ENGENHEIRO DE EXECUÇÃO EM ALIMENTOS

ORIENTADOR :
PROF. DR. ROBERTO HERMÍNIO MORETTI

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

- 1975 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

COM MUITO CARINHO À

MINHA ESPOSA

MYRIAM

E FILHO

PABLO ANDRÉS.

CONTEÚDO

	página
ÍNDICE DE QUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMO	VI
SUMMARY	VIII
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1. Algumas características gerais do substrato	04
2.1.1. Isolado de proteínas de soja	04
2.1.2. Algumas propriedades físicas e químicas das proteínas da soja	04
2.1.2.1. Composição de aminoácidos	04
2.1.2.2. Solubilidade	05
2.1.2.3. Peso molecular	05
2.2. Algumas características gerais da enzima	06
2.2.1. Propriedades moleculares	07
2.2.2. Propriedades enzimáticas	07
2.2.2.1. Inibição	07
2.2.2.2. Especificidade	07
2.2.2.3. pH ótimo	08
2.2.2.4. Temperatura ótima	08
2.2.2.5. Outras propriedades da enzima	08
2.3. Alguns antecedentes sobre a reação de hidrólise enzimática	09
2.4. Alguns antecedentes sobre ultrafiltração	11
3. MATERIAIS	14
3.1. Substrato	14
3.2. Enzima	14
3.3. Reagentes	14
3.4. Equipamentos	14

4. MÉTODOS	16
4.1. Preparação do substrato	16
4.2. Análises do substrato	16
4.2.1. Umidade	16
4.2.2. Proteínas	16
4.2.3. Óleo	16
4.2.4. Fibra	17
4.2.5. Cinzas	17
4.3. Preparação da enzima	17
4.4. Determinação da atividade da enzima	17
4.5. Processo de solubilização do isolado de proteí nas da soja	18
4.6. Variáveis que afetam o processo de solubiliza- do isolado de proteínas da soja	19
4.6.1. Efeito da concentração do substrato	19
4.6.2. Efeito da concentração da enzima	19a
4.6.3. Efeito do pH	20
4.6.4. Efeito da temperatura	20
4.6.5. Efeito da pressão exercida no sistema	20
4.6.6. Efeito da desnaturação do substrato	20
4.7. Medições efetuadas durante a solubilização do isolado de proteínas da soja	21
4.7.1. Análises dos peptídeos solúveis do per meado	21
4.7.2. Medição do fluxo do permeado	21
4.8. Análises dos peptídeos solúveis contidos no permeado	21
4.8.1. Peso molecular	22
4.8.2. Cromatografia em camada fina	23
4.9. Processo de solubilização do isolado de pro_ teínas da soja em um reator enzimático tipo "batch"	23
4.10. Variação do pH do permeado obtido no processo de solubilização das proteínas da soja através do tem po de reação	24

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Análises do substrato	25
5.2. Determinação da atividade da enzima	26
5.3. Variáveis que afetam o processo de solubiliza <u>ç</u> ão do isolado de proteínas da soja	26
5.3.1. Efeito da concentração do substrato	27
5.3.2. Efeito da concentração da enzima	28
5.3.3. Efeito do pH	31
5.3.4. Efeito da temperatura	32
5.3.5. Efeito da pressão exercida no sistema	33
5.3.6. Efeito da desnaturação do substrato	35
5.4. Variação do pH do permeado obtido no processo de solubilização do isolado de proteínas da soja <u>a</u> través do tempo de reação	36
5.5. Análises dos peptídeos solúveis contidos no permeado	36
5.5.1. Peso molecular	36
5.5.2. Cromatografia em camada fina	37
5.6. Solubilização do isolado de proteínas da soja em um reator enzimático tipo "batch"	37
6. CONCLUSÕES	75
7. LITERATURA CITADA	77
AGRADECIMENTOS	82

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro Nº		página
01	Conteúdo de aminoácidos essenciais do isolado de proteínas da soja	06
02	Composição química do isolado de proteínas da soja	25
03	Atividade da enzima obtida do <u>Rhizopus chinensis</u>	26
04	Rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao substrato total alimentado ao reator enzimático através do tempo de reação, à diferentes concentrações do substrato	39
05	Rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao substrato total alimentado ao reator enzimático através do tempo de reação, à diferentes concentrações da enzima	40
06	Rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao substrato total alimentado ao reator enzimático através do tempo de reação, à diferentes pH.	41
07	Rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao substrato total alimentado ao reator enzimático através do tempo de reação, à diferentes temperaturas	42
08	Rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em	

	relação ao substrato total alimentado ao reator enzimático através do tempo de reação, à diferentes pressões exercidas no sistema	43
09	Rendimento (porcentagem em peso) dos peptídeos solúveis do permeado acumulado em relação ao substrato total alimentado ao reator enzimático através do tempo de reação para substrato desnaturado e não desnaturado	44
10	Variação do pH do permeado obtido no processo de solubilização do isolado de proteínas da soja através do tempo de reação à diferentes pH iniciais	45
11	Rendimento (porcentagem em peso) dos peptídeos solúveis formados ou liberados por hidrólise enzimática das proteínas do isolado de soja em um reator enzimático tipo "batch" através do tempo de reação	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nº		página
01	Fluxograma para a <u>isolação</u> comercial das proteínas da soja	05
02	Passagem de uma solução pressurizada através de uma membrana	12
03	Esquema do processo de solubilização enzimática de um isolado de proteínas da soja em um sistema contínuo por meio de ultrafiltração	47
04	Efeito da concentração do substrato sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado através do tempo de reação	48
05	Efeito da concentração do substrato sobre a quantidade de permeado acumulado através do tempo de reação	49
06	Efeito da concentração do substrato sobre a quantidade de peptídios solúveis acumulados através do tempo de reação	50
07	Efeito da concentração do substrato sobre o fluxo de permeado total através do tempo de reação	51
08	Efeito da concentração da enzima sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado através do tempo de reação	52
09	Efeito da concentração da enzima sobre a quantidade de permeado acumulado através do tempo de reação	53
10	Efeito da concentração da enzima sobre a	

	quantidade de peptídios solúveis acumulados através do tempo de reação	54
11	Efeito da concentração da enzima sobre o fluxo de permeado total através do tempo de reação	55
12	Efeito do pH sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado através do tempo de reação	56
13	Efeito do pH sobre a quantidade de permeado acumulado a través do tempo de reação	57
14	Efeito do pH sobre a quantidade de peptídios solúveis acumulados através do tempo de reação	58
15	Efeito do pH sobre o fluxo de permeado total através do tempo de reação	59
16	Efeito da temperatura sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado através do tempo de reação	60
17	Efeito da temperatura sobre a quantidade de permeado acumulado através do tempo de reação	61
18	Efeito da temperatura sobre a quantidade de peptídios solúveis acumulados através do tempo de reação	62
19	Efeito da temperatura sobre o fluxo de permeado total através do tempo de reação	63
20	Efeito da pressão exercida no sistema sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado através do tempo de reação	64
21	Efeito da pressão exercida no sistema sobre	

	a quantidade de permeado acumulado através do tempo de reação	54
22	Efeito da pressão exercida no sistema sobre a quantidade de peptídios solúveis acumulados através do tempo de reação	55
23	Efeito da pressão exercida no sistema sobre o fluxo de permeado total através do tempo de reação	56
24	Efeito da desnaturação do substrato sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado através do tempo de reação	57
25	Efeito da desnaturação do substrato sobre a quantidade de permeado acumulado através do tempo de reação	58
26	Efeito da desnaturação do substrato sobre a quantidade de peptídios solúveis acumulados através do tempo de reação	59
27	Efeito da desnaturação do substrato sobre o fluxo de permeado total através do tempo de reação	60
28	Concentração dos peptídios solúveis através do tempo de reação enzimática, em um reator enzimático tipo "batch"	61
29	Cromatografia em camada fina para a identificação das frações dos peptídios solúveis do permeado	62
30	Curva padrão. μg de albumina de bovino versus absorvância a 750 m μ . (tratada pelo método de Lowry, 1951)	63

RESUMO.

Foi estudada a solubilização de um isolado de proteínas por hidrólise enzimática, em um sistema contínuo, empregando-se um reator enzimático com membrana ultrafiltrante. Correlacionou-se o comportamento de diferentes variáveis, tais como concentração de substrato, substrato desnaturado e não desnaturado, concentração de enzima, pH, pressão e temperatura.

Para este sistema foi usado como substrato uma solução de um isolado de proteínas de soja; e como enzima, uma enzima proteolítica de reação ácida obtida de Rhizopus chinensis.

Os efeitos das diferentes variáveis foram estimados analisando-se a concentração de peptídios solúveis no permeado e o fluxo do permeado através do tempo de reação.

Também foram efetuadas as análises de composição química do substrato, da atividade da enzima sobre o mesmo, e também a determinação do peso molecular dos peptídios solúveis no permeado resultante.

Verificou-se que quanto menor é a concentração de peptídios solúveis no permeado, maior é o fluxo do mesmo através da membrana; observou-se também que a concentração de peptídios solúveis no permeado é diretamente proporcional à concentração do substrato e da enzima no reator.

Também se determinou que o fluxo de permeado através da membrana varia com a pressão exercida no sistema quando se trabalha no intervalo de 1,0 a 2,0 kg/cm². Ao empregar um vácuo de 0,3 kg/cm² os resultados foram similares aos ob

tidos com a pressão de $1,0 \text{ kg/cm}^2$.

Demonstrou-se que um incremento de temperatura faz com que aumente a concentração de peptídios solúveis no permeado.

Encontrou-se que o pH ótimo para a atividade da enzima esta no intervalo 2,5 a 3,0; e quando o pH se torna menor que 2,5 ou maior que 3,0, a atividade enzimática decai significativamente.

Determinou-se ainda que o rendimento em proteínas solubilizadas estava entre 6,77% e 35,54%, para as diversas condições estudadas.

Finalmente, determinou-se que o peso molecular dos peptídios ultrafiltrados é inferior a 10 000.

SUMMARY.

Solubilization of an isolated protein by enzymatic hidrolysis in a continuous reactor using ultrafiltration was studied. The following variables were investigated: substrate concentration, denatured and undenatured substrate, enzyme concentration, pH, pressure and temperature.

Isolated soybean protein was employed as substrate and proteolytic enzyme from Rhizopus chinensis was used.

Besides the above mentioned variables, soluble pep tide concentration in permeate and permeate flow rate during reaction time was measured.

The chemical composition of the substrate, enzyme activity and the molecular weights of soluble peptides of the permeate were determined.

During the test, it was observed that a lower concentration of soluble peptides in the permeate corresponds to a higher flow rate of permeate and that the concentration of soluble peptides in the permeate is directly related to the concentration of substrate and enzyme in the reactor.

Permeate flow rate was found to be proportional to the pressure on the system in the range $1,0 - 2,0 \text{ kg/cm}^2$ and at a low pressures such as $0,3 \text{ kg/cm}^2$.

The main results obtained during this study were the following:

- temperature affects soluble peptide concentra

tion in the permeate, encreasing proportionally.

- enzyme activity is best in the 2,5 - 3,0 pH range and declines when the pH is lower than 2,5 or or larger than 3,0.

- the soluble protein yield obtained at different conditions varied from 6,77 to 35,54 %.

- the molecular weight of soluble peptides of permeate is less than 10 000.

1. INTRODUÇÃO

A quantidade de proteína de soja produzida atualmente no mundo é aproximadamente igual à de origem animal (COPPOCK, 1970). Pode-se afirmar que, tanto os concentrados protéicos como os isolados protéicos da soja, ainda que sejam de um alto valor nutritivo, não são solúveis e não se homogeneizam facilmente com os alimentos, o que faz com que estas proteínas vegetais sejam muito pouco utilizadas como componente de um alimento, restringindo-se seu emprego a suplementar ou a servir de aditivo para melhorar alguma propriedade funcional de um alimento tradicional. Um melhoramento das propriedades das proteínas da soja, por exemplo, sua solubilização, lhes possibilitaria uma aplicação mais útil e proveitosa, o que levaria a aumentar consideravelmente sua utilização como fonte de proteínas de um alto valor nutritivo (WOLF, 1970), e que poderiam ser empregadas em uma grande variedade de alimentos, que incluiriam sopas, alimentos para infantes e refrigerantes.

Em muitos casos, o hidrolisado de proteína de soja vem acompanhado por um sabor amargo, o qual inibiria sua possível utilização na elaboração de alimentos formulados; e sabe-se que este sabor amargo, que é produzido durante a hidrólise enzimática das proteínas, se deve a alguns tipos de peptídios de pequenos tamanho e/ou peso molecular e a aminoácidos livres (FUJIMAKI et al., 1970); ainda que, pela hidrólise enzimática, seja possível remover os sabores desagradáveis típicos do feijão soja (FUJIMAKI et al., 1968a).

Recentemente, muitos autores, tais como FUJIMAKI et al. (1968a), ARAI et al. (1970b) e NOGUCHI et al. (1970) sugerem que estes compostos de sabores amargos podem ser evitados pelo tratamento dos isolados de proteína de soja com enzimas ácidas de origem microbiana. De acordo com os traba

lhos de MURRAY e BAKER (1952), FUJIMAKI et al. (1968a, 1970), YAMASHITA et al. (1969) e ARAI et al. (1970a), os sabores in desejáveis, principalmente o amargo, que normalmente apare cem nos hidrolisados de proteínas de soja obtidos por meio de outras enzimas proteolíticas, não seriam encontrados nos hidrolisados tratados com proteases ácidas.

Na hidrólise de uma solução de proteínas de soja são obtidos muitos componentes de propriedades diversas, principalmente, entre os peptídios formados, a diferença de tamanho e/ou peso molecular, e uma técnica para retirar, ou isolar, estes compostos é a ultrafiltração.

Entende-se por ultrafiltração a separação de solu ções em seus componentes, moderada por uma membrana semiper meável e ativada por uma pressão (FORBES, 1970).

As membranas semipermeáveis têm a capacidade sele tiva de reter todas as macromoléculas de soluções e colói des, que têm normalmente grandes tamanho e/ou peso molecular e que são retiradas como concentrado, e permitem a passagem do solvente e de certos solutos de menores tamanho e/ou pe so molecular e que são coletados como permeado.

O tamanho dos peptídios no ultrafiltrado é deter minado pelas propriedades da membrana e pela especificidade da enzima (ROOZEN e PILNIK, 1973), especialmente pela espe cificidade e grau de especificidade da enzima.

A presente investigação apresenta aproximação pa ra a solubilização de um isolado de proteínas de soja por meio de uma enzima proteolítica obtida de Rhizopus chinen sis, e que têm a capacidade de ação ótima em um intervalo de pH ácido. Com a implementação de uma membrana ultrafil trante ao reator enzimático, torna-se possível separar con tinuamente os peptídios conforme alcancem um tamanho molecu lar suficientemente baixo para garantir sua solubilidade , mas não demasiadamente baixo que lhes dê sabores indesejá

veis, especialmente o amargo. Desta maneira pode-se obter um processo contínuo, o que torna o método economicamente viável, já que, em primeiro lugar, é retida a enzima proteolítica pela membrana ultrafiltrante, por possuir um peso molecular maior, e é possível que, sob condições ideais, a enzima possa ser utilizada indefinidamente; em segundo lugar, é factível o emprego de altas concentrações de enzima, de onde resultaria uma alta eficiência de conversão (CHEFTEL et al., 1971); e, finalmente, como permite a remoção dos produtos da proteólise, é possível aumentar a velocidade de hidrólise (PORTER e MICHAELS, 1971).

Com o desenvolvimento desta nova tecnologia seria factível um melhor e mais nobre aproveitamento desta abundante e barata matéria prima nacional, que é o feijão soja; já que obter-se-iam benefícios significativos, tanto para combater a desnutrição, ao contar com um novo e versátil tipo de proteína, como também, por outra parte, resultados economicamente positivos para o país, ao poupar divisas, pois seriam consumidos seus próprios recursos de proteínas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Algumas características gerais do substrato

2.1.1. Isolado de proteínas de soja

De acordo com WOLF (1970), as proteínas de soja são aproveitáveis para a indústria alimentícia nas formas de farinhas e sêmolas, concentrados e isolados, com um teor de proteínas de 40 - 50%, 70% e 90% ou mais, respectivamente; sendo, desse modo, os isolados as formas mais refinadas de proteínas de soja.

CIRCLE e SMITH (1972) definem o isolado de proteína de soja como " a melhor fração proteínica preparada do feijão soja de alta qualidade, sadio, limpo, puro e descortado, por remoção dos componentes não protéicos, que conterá não menos que 90% de proteínas ($\%N \times 6,25$) em base seca "; e encontraram os seguintes intervalos de variação para diferentes amostras de isolado de proteínas de soja: umidade = 5,0 a 10,3%; proteínas = 85,4 a 94,5%; fibras = 0,1 a 0,2% e cinzas = 1,2 a 7,6%.

O fluxograma para a preparação comercial do isolado de proteínas de soja está ilustrado pela figura Nº 01.

2.1.2. Algumas propriedades físicas e químicas das proteínas de soja

2.1.2.1. Composição de aminoácidos

Uma importante propriedade química das proteínas de soja é sua composição de aminoácidos (quadro Nº 01).

Inserindo-se que as proteínas de soja têm uma alta porcentagem em Lisina, nota-se também que apresentam uma deficiência na quantidade de aminoácidos sulfurados (Metionina

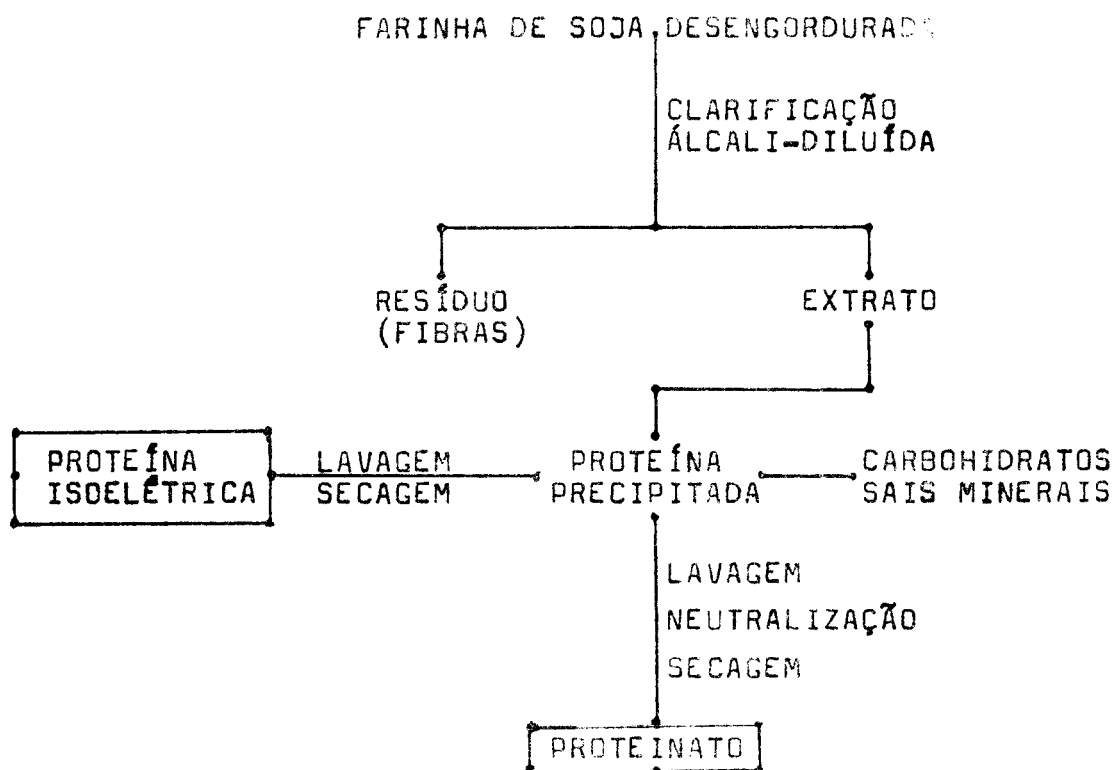


FIG. Nº 01. FLUXOGRAMA PARA O ISOLAMENTO COMERCIAL DE PROTEÍNA DE SOJA (EXTRAÍDO DE WOLF, 1969)

e Cisteína), comparados aos padrões normais (WOLF, 1970).

2.1.2.2. Solubilidade

As proteínas que se encontram em maior quantidade no feijão soja são as globulinas, as quais são insolúveis nos seus pontos isoelétricos (WOLF, 1970).

Estudos realizados no "Northern Laboratory" têm demonstrado que depois da precipitação isoelétrica, os isolados não são completamente solúveis em tampão pH 7,6; 0,5 de força iônica (WOLF et al., 1964; NASH e WOLF, 1967).

2.1.2.3. Peso molecular

As proteínas de soja constituem um discreto grupo de proteínas, as quais cobrem um extenso intervalo de pesos moleculares.

QUADRO Nº 01. CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS
DO ISOLADO DE PROTEÍNAS DE SOJA
(EXTRAÍDO DE WOLF,1970).

AMINOÁCIDO	GRAMAS DE AMINOÁCIDO POR 16 GRAMAS DE NI TROGÊNIO DO ISOLADO.
LISINA	5,7
METIONINA	1,3
CISTINA	1,0
TRIPTOFANO	1,0
TREONINA	3,8
ISOLEUCINA	5,0
LEUCINA	7,9
FENILALANINA	5,9
VALINA	5,2

Estes intervalos são determinados simplesmente pe
lo uso de ultracentrifugação (WOLF e BRIGGS, 1959) ou por
filtração em gel (HASEGAWA et al., 1963).

WOLF (1970) descobriu que as proteínas de soja es
tão formadas principalmente por globulinas de uma solubilida
de mínima e são constituídas por uma mistura de frações cu
jos pesos moleculares encontram-se no intervalo de 8 000 a
600 000, sendo a maioria das proteínas, aproximadamente 80%
delas, de um peso molecular de 100 000 ou maior.

2.2. Algumas características gerais da enzima

A protease ácida têm sido purificada por FUJIMAKI
et al., (1967) a partir de um meio de cultura de Rhizopus
chinensis. Comercialmente é encontrada como uma preparação
tricristalizada, de Miles Laboratories, Elkhar, Ind., de Sei
kagaku-Kogyo Ltd., Tokyo, e de Nagase & Co. Ltd., Osaka.

2.2.1. Propriedades moleculares

De acordo com COLOWICH e KAPLAN (1972), a enzima têm as seguintes constantes físicas: peso molecular= 35 000; constante de sedimentação, $S_{20,w} = 2,83 \times 10^{-3}$ segundos; volume específico parcial, $\bar{V} = 0,73$ (calculado da composição de aminoácidos); ponto isoelétrico= 5,2; extinção específica, $E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}} = 1,29$.

2.2.2. Propriedades enzimáticas

2.2.2.1. Inibição

Concentrações milimolares de EDTA, O-fenantrolina, Pb-acetato, CuSO_4 , HgCl_2 , FeSO_4 , ácido monoiodoacético, p-cloromercuriobenzoato e ácido ascórbico não afetam apreciavelmente a atividade da enzima (FUKUMOTO et al., 1967).

O inibidor de pepsina, diazocetil norleucina metil éster, na presença de Cu^{++} , inibe completamente a atividade da enzima, experimentada tanto com soro albumina como com tripsinogênio como substratos (COLOWICH e KAPLAN, 1970).

2.2.2.2. Especificidade

A digestão da cadeia-B de insulina oxidada de bovino pela proteinase ácida do Rhizopus chinensis é similar à obtida pela pepsina (TSURU et al., 1969).

Durante a digestão de caseína, aproximadamente 15% das ligações peptídicas são hidrolisadas (COLOWICH e KAPLAN 1972).

De acordo com TSURU et al. (1969), a enzima atua sobre o ácido poliglutâmico e polilisina.

TSURU et al. (1969), encontraram que os seguintes di e tri-peptídeos são hidrolisados pela enzima (depois de uma incubação de 18 horas a 37°C) : lisil-tirosil-ácido glutâmico, carbobenzoxiglutamil-tirosina, carbobenzoxiglutamil-

fenilalanina, carbobenzoxifenilalanil-tirosina, carbobenzoxi-glicil-fenilalanina, glicil-leucil-tirosina, glicil-glutamil-tirosina, glutamil-tirosina e leucil-fenilalanina. Em todos os casos se libera um aminoácido aromático com um C-terminal, com exceção para os primeiros substratos, onde depois da hidrólise das ligações peptídicas ocorre a transpeptidação. Outros di e tri-peptídeos que não possuem um aminoácido aromático com um C-terminal não são hidrolisados.

Segundo COLOWICH e KAPLAN (1972), a enzima também apresenta uma atividade para precipitar as proteínas do leite.

2.2.2.3. pH ótimo

FUKUMOTO et al. (1967), determinaram que o pH ótimo para a digestão da caseína é entre 2,9 e 3,3.

Segundo os fabricantes da enzima (Nagase Enzymes) esta pode ser utilizada no intervalo de pH de 2,5 a 5,5, pela sua estabilidade; sendo 3,0 seu pH ótimo.

2.2.2.4. Temperatura ótima

De acordo com os fabricantes da enzima (Nagase Enzymes), o intervalo de temperaturas ótimas é entre 30° e 55 °C; encontrando-se cerca de 40°C a temperatura ótima.

2.2.2.5. Outras propriedades da enzima

Segundo os fabricantes da enzima (Nagase Enzymes) esta é, absolutamente, não tóxica, já que, tendo sido experimentada em ratos, não foi observado nenhum distúrbio depois de terem sido administrados 3 mg de enzima por cada 10 gramas de peso do animal.

A perda por secagem é menor que 15% (1 grama, 105 °C, 1 hora); a quantidade de arsênico é menor de 10 ppm, e a quantidade de metais pesados menor de 30 ppm, de acordo

com J. P., 7th Ed. General Test; artigos 23 e 11, respectivamente.

2.3. Alguns antecedentes sobre a reação de hidrólise enzimática

SEN et al. (1962), determinaram que as peptonas produzidas pela hidrólise enzimática das proteínas de peixe são um dos principais produtos de proteólise. Analizando o efeito da concentração da enzima na hidrólise de proteína de peixe, determinaram que, tanto a recuperação de sólidos totais, como a de Nitrogênio, é maior à concentração de 0,25% de enzima que à de 0,1%.

SEN et al. (1962), ao estudarem o efeito da duração da hidrólise enzimática de proteínas de peixe, encontraram que a velocidade de recuperação dos sólidos e do Nitrogênio é geralmente máxima durante as primeiras horas, por exemplo, entre 2 e 4 horas de hidrólise, com a continuidade da hidrólise a velocidade passa a decair; observaram ainda que após a vigésima quarta hora os resultados tornam-se incorretos, sendo por tanto dificultoso, senão errôneo, chegar a uma conclusão.

SRIPATHY et al. (1962) determinaram que pode-se esperar um hidrolizado rico em peptonas e/ou peptídeos com um determinado comprimento de cadeia quando a digestão enzimática das proteínas de peixe é interrompida nas primeiras etapas (aproximadamente duas horas de reação).

FUJIMAKI et al. (1968) informaram que os sabores indesejáveis do feijão soja foram efetivamente removidos de uma preparação de proteínas de soja por meio de uma hidrólise com enzimas proteolíticas.

HALE (1969) determinou que existe uma correlação entre o comprimento médio das cadeias dos hidrolizados e as

características de cada produto, tais como sabor amargo e higroscopicidade.

NOGUCHI et al. (1970) demonstraram, com testes químicos e organolépticos, que a digestão parcial do feijão soja coagulado e da farinha de soja desengordurada através de uma preparação de aspergilloseptidase-A remove os compostos que possuem sabor e os materiais relacionados com compostos graxos.

FUJIMAKI et al. (1970) isolaram e caracterizaram 7 tipos de peptídios amargos de um hidrolisado de proteínas de soja, encontrando como características comuns a todos os peptídios analisados ser a Leucina o aminoácido terminal e que, se estes peptídios fossem tratados com carboxi-peptidase-A, o sabor amargo decresceria consideravelmente.

FUJIMAKI et al. (1970), analisando por diálise e filtração por gel o sabor amargo nos hidrolisados peptídicos de proteínas de soja, determinaram que este deve ser atribuído, principalmente, ao baixo peso molecular dos peptídios, presumivelmente de um peso molecular menor que 1 500.

CHEFTEL et al. (1971), ao estudarem o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de solubilização de um concentrado de proteínas de pescado por pronase, encontraram que o grau de solubilização obtido foi de 76, 73 e 63% para concentrações de 5, 10 e 15%, respectivamente; observaram também que a reduzida velocidade de solubilização a altas concentrações do substrato de proteínas de pescado pode chegar a ser interrompida por uma transferência menos eficiente entre o substrato e a enzima, ou à inibição da pronase pelo concentrado de proteínas de pescado.

CHEFTEL et al. (1971), analisando o efeito da concentração de enzima sobre a velocidade de proteólise e solulização de proteínas de pescado, encontraram que a velocidade de proteólise e solulização de proteínas de pescado é diretamente proporcional à concentração de enzima.

bilização de um concentrado de proteínas de pescado, por pronase, para um tempo de reação de 2 horas, encontraram que a quantidade de proteína solubilizada, devidi apenas à ação enzimática, é diretamente proporcional à concentração de enzima.

SUGIMOTO et al. (1971) obtiveram uma proteína de soja solúvel, com sabor agradável, em meio ácido, ao tratar um isolado de soja comercial com uma preparação de uma protease ácida, a partir de um cultivo de um fungo, Trametes sanguinea; e encontraram, por meio de filtração em gel, que as frações solúveis consistem principalmente de peptídios de um tamanho relativamente grande junto a uma pequena quantidade de peptídios menores. Desta maneira obtiveram uma fração solúvel, livre de sabores desagradáveis, que incluem amargura e sabor de feijão.

2.4. Alguns antecedentes sobre ultrafiltração

CHIAN e SELLDORF (1969), definem o processo de ultrafiltração como sendo a passagem, sob pressão, por uma membrana semipermeável devidamente selecionada, onde o solvente, juntamente com certos solutos de pequeno tamanho e/ou peso molecular, passa e pode ser coletado como permeado. Os solutos retidos, que são de tamanho e/ou peso molecular relativamente grandes, são coletados como concentrado, conforme a figura Nº 02 procura ilustrar.

CHIAN e SELLDORF (1969), caraterizaram a seletividade de um sistema de ultrafiltração pela expressão "corte de peso molecular", referindo-se ao peso molecular substancialmente retido por la membrana, e que geralmente é determinado pelas características relativas das moléculas solúveis, peso molecular e/ou tamanho, carga elétrica, forma, etc.; pelas características da membrana em relação à dimensão dos poros e sua distribuição na superfície da membrana; e as condi

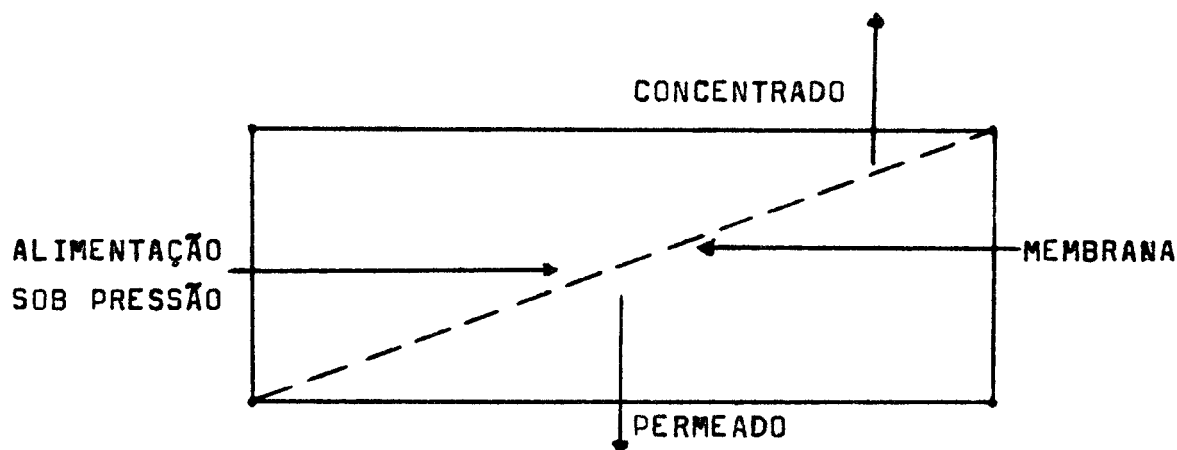


FIG. Nº 02. PASSAGEM DE UMA SOLUÇÃO PRESSURIZADA ATRÁS DE UMA MEMBRANA
(EXTRAÍDO DE CHIAN ET AL., 1972)

ções do sistema, no tocante à pressão efetiva de ultrafiltração, concentração de moléculas solúveis na alimentação e à hidrodinâmica do fluido ao passar pela membrana.

FORBES (1970), assinala que os sistemas de ultrafiltração à baixa pressão estão se tornando reconhecidos como uma medida viável economicamente para a separação de colóides e soluções de macromoléculas, que podem ser aplicadas num campo imenso de separações, particularmente no tratamento de esgotos e outros produtos que normalmente são desperdiçados, de alimentos e produtos lácteos e produtos da indústria farmacêutica.

MORETTI (1973) estudando a influência da configuração do sistema de ultrafiltração no processamento de soro de queijo não fermentado, encontrou que, quanto menor a pressão de alimentação do soro, menor é o rendimento em proteína recuperada.

ROOZEN e PILNIK (1973) obtiveram um hidrolisado de proteínas de soja solúvel, sem sabores desagradáveis, como

os de feijão soja e/ou amargo, realizando a despolimerização enzimática em uma célula de ultrafiltração, em meio ácido, separando continuamente peptídios de um peso molecular apropriado o suficiente para ser solúvel em sucos de frutas, mas não tão baixos que cheguem a produzir sabores desagradáveis.

VAN ALTENA (1973) assinalou que com o desenvolvimento de novas membranas para ultrafiltração, comprovadamente mais resistentes à altas temperaturas e aos compostos químicos, torna-se cada vez mais factível o desenvolvimento da ultrafiltração na indústria bioquímica.

Assim, podemos verificar que a ultrafiltração apresenta uma série de vantagens, como : operar a temperaturas pré-determinadas; não envolve mudança de estado; mantém constantes o pH e a força iônica no concentrado; e outras. Finalmente, como consequência de todas estas vantagens, a ultrafiltração pode ser utilizada para os processos de produtos delicados (enzimas, proteínas) tais como : concentração, separação, purificação e isolamento.

3. MATERIAIS

3.1. Substrato

Como substrato foi empregada uma preparação de iso lado de proteínas de soja, cujo nome comercial é PROTEIMAX 90, do lote 340 235, de 02/01/74, produzido pela SANBRA, e que, de acordo com os produtores, deveria ter a seguinte composição química : proteína (em base seca), mínimo 90%; umidade, máximo 5,0%; pH (solução a 5,0%) $7,0 \pm 0,2$; fibra 0,8%, e sais minerais 6,0%.

3.2. Enzima

Como enzima foi utilizada uma preparação, desenvolvida por um fungo, de enzima proteolítica, estável em pH ácido, cujo nome comercial é DENAPSIN 10P, produzida por NAGASE ENZYMES, obtida a partir de um meio de cultura de Rhizopus chinensis.

3.3. Reagentes

Todos os reagentes utilizados forem do tipo analítico, das marcas : MERCK, BAKER, SIGMA, ECIBRA, TEAGEM e CARLO ERBA.

As soluções foram preparadas pelas formas usuais, utilizando-se para tanto os materiais de vidro tradicionais em laboratório, tais como : funis, tubos de ensaio, beakers, buretas, pipetas, erlenmeyers, etc.

3.4. Equipamentos

Potenciômetro H-5 HORIBA

Espectrofotômetro BECKMAN

Banho maria, Soc. FABRE Ltd., modelo L69 com temperatura controlada

Estufa a vacuo

Cilindro de Nitrôgeno com seus respectivos manôme
tros

Agitador, ROTARY SHAKER

Evaporador instantâneo, BUCHLER INSTRUMENT

Reator enzimático, projetado por MORETTI R. H. e
PEZDA V., conforme a figura Nº 03.

Demais equipamentos de uso comum em laboratório ,
tais como : balança analítica, estufa, dessecador, etc.

4. MÉTODOS

4.1. Preparação do substrato

Com o isolado de proteínas de soja foi preparada uma solução de concentração pré-determinada e, através de ácido clorídrico concentrado conseguiu-se o pH desejado.

4.2. Análise do substrato

Em amostras do isolado de proteínas foram efetuadas as seguintes análises : umidade, proteínas, cinzas, óleo e fibras.

Todas as análises foram realizadas em duplicatas ou triplicatas, cujos valores médios serão apresentados.

4.2.1. Umidade

A umidade foi feita segundo o método A.O.A.C. (1965). As amostras foram pesadas em cápsulas de porcelana e levadas à estufa à 110°C até obtenção de peso constante ; transferidas para um dessecador até alcançar a temperatura ambiente e , em seguida, pesadas. Por diferença de peso calculou-se a porcentagem de umidade.

4.2.2. Proteínas

Utilizou-se o método micro-KJELDAHL, A.O.A.C. (1965). Nos cálculos utilizou-se o fator 6,25 para a conversão de Nitrogênio total à proteína.

4.2.3. Óleo

Determinou-se segundo método descrito em A.O.A.C. (1965); empregando-se o aparelho de GOLDFISH de extração contínua. A extração com éter foi de refluxo contínuo através da amostra e por um tempo de 6 horas.

4.2.4. Fibra

Determinou-se segundo o método pesquisado por VAN DE KAMER e VAN FUIKEL (1952); que consiste em tarar um cadinho, colocar uma amostra previamente pesada em um balão esmerilhado e tratá-la com uma mistura de ácido acético a 70%, ácido tricloroacético e ácido nítrico concentrado durante 30 minutos, à ebulição e refluxo constantes; filtrá-la no cadinho, lavá-la com água quente, colocá-la na estufa por 3 ou 4 horas, esfriá-la e pesá-la.

Tomando por base o peso da amostra e a diferença de peso do cadinho, calcula-se a porcentagem de fibra.

4.2.5. Cinzas

A determinação foi feita segundo A.O.A.C. (1965). Após pesagem, as amostras foram levadas em cápsulas de platina, previamente taradas, a uma mufla a 200°C para uma carbonização uniforme; após a carbonização elevou-se a temperatura da mufla a 550°C.

As cápsulas com material incinerado foram levadas a um dessecador até chegar à temperatura ambiente, pesadas e, por diferença, calculou-se a porcentagem de cinzas da amostra original.

4.3. Preparação da enzima

Foram preparadas várias soluções da enzima em água destilada, de forma que, num volume fixo e constante (20 ml), dispunha-se de todas as concentrações desejadas.

4.4. Determinação da atividade da enzima

A determinação foi realizada segundo WHITAKER (1971), a qual consiste em deixar o isolado de proteínas de soja ser hidrolisado pela enzima.

O efeito medido foi a velocidade inicial de forma

ção ou liberação de peptídios e aminoácidos solúveis em TCA 12% (ácido tricloroacético), os quais foram posteriormente analizados pelo método de LOWRY et al. (1951), empregando-se o reagente de FOLIN para a determinação da porcentagem de proteínas.

A concentração da enzima sobre o substrato era menor que a de saturação.

A 5 ml de solução de isolado de proteínas de soja (PROTEIMAX 90, SANBRA) a 1%, em um tampão ácido cítrico/citrato de sódio 0,1M de pH 3,0, juntou-se 1 ml da solução de enzima á concentração pré-determinada. A reação ocorreu a 40°C e, depois do tempo necessário, precipitou-se a proteína juntando-se 4 ml de TCA a 30% e filtrou-se. Ao filtrado se fez a determinação de proteínas pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se como referência um alvo de solução de isolado de proteínas de soja, na qual a solução de enzima foi substituída por água e tratada sob as mesmas condições.

A unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima (em mg) que, por hidrólise, provoca a formação ou liberação do equivalente a um micrograma de albumina de bovino a 40°C e pH 3,0 em um minuto de reação

Ao definir a unidade enzimática tomando por base a liberação de microgramas de albumina de bovino tornou-se necessário o uso de uma curva padrão desta, a 750 mu, para assim expressar os valores de absorvância obtidos em microgramas de albumina de bovino liberados.

4.5. Processo de solubilização do isolado de proteínas de soja

O processo, esquematizado na figura Nº 03, consiste basicamente no seguinte : coloca-se 200 de substrato, com concentração e pH pré-determinados, no reator enzimáti

co, ligando-se em seguida o agitador magnético e o reostato, para que a temperatura se mantenha constante. Uma vez conseguidas as condições de temperatura necessárias, junta-se a solução de enzima (20 ml), fecha-se o sistema hermeticamente e ajusta-se a válvula de pressão da saída do cilindro de Nitrogênio, a pressão desejada.

Com as retrocitadas condições estabelecidas, a reação se manteve por 5 horas e, no seu transcorrer, foram tiradas amostras a cada 30 minutos. À medida que o volume do sistema diminuía, aproximadamente em um 10%, este era alimentado com solução de substrato na mesma quantidade de permeado extraído.

Nos casos em que se trabalhou com vacuo, foi conectada uma fonte de vacuo (trompa de água) à saída do permeado do reator enzimático.

Previamente, em ambos os casos, antes de se juntar a solução de substrato, fez-se circular água destilada pelo sistema, com a finalidade de testar a velocidade de fluxo possível à membrana.

4.6. Variáveis que afetam o processo de solubilização do isolado de proteínas de soja

Para analisar o efeito de todas as variáveis testadas, que vêm a seguir, foi seguido o método descrito no item 4.5.

4.6.1. Efeito da concentração de substrato

Para se determinar o efeito da concentração do substrato sobre a solubilização do isolado de proteínas de soja, foram testadas as concentrações : 1,0 ; 2,0 ; e 3,0% (p/v) sobre o substrato, com as demais variáveis permanecendo fixas, ou seja : concentração de enzima = 2,0% sobre o substrato; pH = 3,0; temperatura = $50^{\circ}\text{C} \pm 2$; vacuo = 0,3 kg/cm²; tempo de reação 5 horas.

4.6.2. Efeito da concentração da enzima

Para se determinar o efeito da concentração da enzima sobre a solubilização do isolado de proteínas de soja, foram testadas as concentrações : 1,0 ; 2,0 ; 4,0 e 8,0% (p/p) sobre o substrato, com as demais variáveis permanecendo fixas, ou seja : concentração de substrato = 2,0% (p/v); pH = 3,0; temperatura = $50\text{ C} \pm 2$; vacuo = $0,3\text{ kg/cm}^2$; tempo de reação = 5 horas

4.6.3. Efeito do pH

Para se determinar o efeito do pH sobre a solubilização do isolado de proteínas de soja, foram testados os valores : 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; e 4,0, com as demais variáveis permanecendo fixas, ou seja : concentração do substrato = 2,0% (p/v); concentração da enzima = 2,0% (p/p) sobre o substrato; vacuo = 0,3 kg/cm²; temperatura = 50°C $\pm$ 2; tempo de reação = 5 horas.

4.6.4. Efeito da temperatura

Para se determinar o efeito da temperatura sobre a solubilização do isolado de proteínas de soja, foram testadas as temperaturas 40° e 50°C, já que são as que mais se aproximam da temperatura ótima de ação da enzima; as demais variáveis permaneceram fixas, ou seja : concentração do substrato = 2,0% (p/v); concentração da enzima = 2,0% (p/p) sobre o substrato; pH = 3,0; vacuo = 0,3 kg/cm²; tempo de reação = 5 horas.

4.6.5. Efeito da pressão

Para se determinar o efeito da pressão exercida no sistema sobre a solubilização do isolado de proteínas de soja, foram testadas as pressões: 1,0 ; 1,5 ; e 2,0 kg/cm², comparando-se ainda com o efeito causado por vacuo a 0,3 kg/cm², com as demais variáveis permanecendo fixas, ou seja : concentração do substrato = 2,0% (p/v); concentração da enzima = 2,0% (p/p) sobre o substrato; pH = 3,0; temperatura = 50°C $\pm$ 2; tempo de reação = 5 horas.

4.6.6. Efeito da desnaturação do substrato

Para se determinar o efeito da desnaturação do substrato sobre a solubilização do isolado de proteínas de soja, verificou-se que o substrato se desnaturou nas seguintes condições : temperatura = 121°C, tempo = 15 minutos; com

parando-se seu efeito com o de um substrato não desnaturado, sob as mesmas, e seguintes condições : concentração de substrato = 2,0%(p/v); concentração da enzima = 2,0% (p/p) sobre o substrato; pH = 3,0; temperatura = 50°C $\pm$ 2; tempo de reação = 5 horas.

4.7. Medições efetuadas durante a solubilização do isolato de proteínas de soja

4.7.1. Análises dos peptídios solúveis do permeado

Os peptídios solúveis do permeado obtido foram analisados com o reagente de FOLIN, de acordo com o método de LOWRY et al. (1951), para o que foi necessário realizar um ajuste do pH das amostras, para aproximadamente neutro.

A leitura da absorvância foi realizada a 750 m μ , e expressa em μ g/ml de albumina de bovino; sendo que, para tanto, foi necessário contar com uma curva padrão desta a 750 m μ . Posteriormente os valores serão expressos em porcentagem de peptídios solúveis.

As determinações foram realizadas a cada 30 minutos, durante todo o transcorrer da reação.

4.7.2. Medição do fluxo do permeado

As medições do fluxo do permeado foram realizadas na saída do reator enzimático, pela quantidade de permeado acumulado cada 30 minutos, durante todo o transcorrer da reação, ou seja, 5 horas. Para isso foi empregado um cronômetro e uma bureta.

Posteriormente estes valores serão expressos em unidades de tempo e superfície, correspondendo, estas últimas, à área de membrana ultrafiltrante.

4.8. Análises dos peptídios solúveis contidos no permeado

4.8.1. Peso molecular

Foi utilizado o método de WEBER e OSBORN (1969) de determinação de peso molecular por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS) poliacrilamida.

A amostra (concentrada e seca à vacuo) em uma contração de 1 mg/ml foi incubada a 37°C durante 16 horas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, 1,0% em SDS, e 1,0% em mercapto etanol.

A solução dos geis foi preparada com acrilamida (13,5 ml) tampão "gel" (15 ml) (7,8 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 20,4 g de Na_2HPO_4 e 2 g de SDS em 1 litro de H_2O), persulfato de amônio 1,5 ml e N,N,N',N',-tetrametil-etilenodiamina 0,01 ml; esta foi colocada em tubos de vidro e deixou-se polimerizar durante 1 hora.

Em tubos de ensaio foram colocados 10 microlitros de azul de bromofenol, 0,1 de sacarose 40% e 0,1 ml de solução dos peptídios preparados previamente. Desta solução colocou-se 50 μl sobre o gel de SDS-poliacrilamida.

A eletroforese em gel foi realizada em um aparelho elaborado no próprio laboratório.

As amostras colocadas nos tubos com gel foram inseridas na célula de eletroforese; foi utilizado tampão "gel" diluído 1:1 com água destilada; aplicou-se 8 mA por tubo durante 4 horas. Após terem sido medidos, a migração do corante (azul de bromofenol) e o comprimento dos geis, estes últimos são removidos dos tubos de eletroforese e colocados em tubos de ensaio com TCA 50% para fixar os peptídios, durante 2 horas. A descoloração se fez por lavagem contínua por 3 dias com ácido acético a 7%.

Após a descoloração total, foi medido o comprimento do gel e a migração dos peptídios e calculou-se a mobilili

dado pela seguinte fórmula :

$$\text{Mobilidade} = \frac{\text{Migração da amostra}}{\text{Migração dos peptídeos}}$$

Através das mobilidades da amostra e utilizou-se o peso molecular por regressão na curva padrão feita por GUE RRA (1974).

4.8.2. Cromatografia em camada fina

As peptídeos existentes no permeado de Soja foram cromatografias em camada fina, tomando-se, para isso, os trabalhos de RANDIRATH (1968) por base, e de qual foi utilizada sílica gel 60 como adsorvente e, como solvente, a seguinte mistura : n-hexano/éter acetico/água na relação de 50/50/20 respectivamente, sendo de 10 µl o volume da amostra.

As amostras, na mistura de solvente, foram aplicadas no prato adsorvente durante 1 hora : 30 minutos. Após secagem na estufa foi utilizada vanilidrina em spray para a revelação.

4.9. Processo de solubilização do isolado de proteínas de soja em um reator enzimático tipo "batch"

Para realizar a solubilização do isolado de proteínas de soja em um reator tipo "batch" foi necessário, em primeiro lugar, modificar o reator enzimático contínuo, criando, para isso, a membrana ultrafiltrante por uma borbocha que o vedasse e, dessa maneira, não houvesse possibilidade de passagem do permeado. O principal objetivo desta solubilização do isolado de proteínas de soja por meio de uma hidrólise enzimática tipo "batch" foi poder determinar o máximo que a enzima poderia hidrolisar o substrato sob certas condições, que foram, neste caso, as seguintes : concentração do substrato = 2,0 (p/v); concentração da enzima = 2,0% (p/p)

sobre o substrato; pH = 3,0; temperatura = $50^{\circ}\text{C} \pm 2$; tempo de reação = 5 horas.

4.10. Variação do pH do permeado obtido no processo de solubilização das proteínas de soja a través do tempo de reação

Em intervalos de tempo de 30 minutos, foram realizadas medições do pH do permeado obtido, utilizando-se, para isso, um pH-metro. Estas medições foram realizadas das experiências nas quais se procurava determinar o efeito do pH no processo, de tal maneira que os pH iniciais do substrato foram diferentes (2,0 - 2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0) e as demais condições de processo foram as mesmas anteriormente (item 4.6.3.).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises do substrato

No quadro Nº 02 são apresentados os resultados das análises efetuadas no isolado de proteínas de soja (PROTEI MAX 90, SANBRA).

As análises realizadas, e que seguiram os métodos descritos de 4.2.1. a 4.2.5., foram as seguintes : proteína (N x 6,25), umidade, óleo, fibra e cinzas.

QUADRO Nº 02. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ISOLADO DE PROTEÍNAS DE SOJA (PROTEIMAX 90, SANBRA), EXPRESSA EM PORCENTAGEM

	a	b
PROTEÍNA	83,70	89,40
UMIDADE	5,30	-
ÓLEO	-	-
FIBRA	0,80	0,90
CINZAS	3,80	4,10

a : em base úmida

b : em base seca

As análises químicas mostram resultados similares aos obtidos por outros pesquisadores, como WOLF (1970), CIRCLE e SMITH (1972). Ainda que o valor de proteína esteja ligeiramente inferior ao mínimo dado pelas especificações dos fabricantes (SANBRA), verificamos que, sem dúvida, os

valores encontrados para umidade, fibra e cinzas encontram-se dentro do intervalo especificado pelos fabricantes.

5.2. Determinação da atividade da enzima

A determinação da atividade da enzima foi realizada tomando-se por base o procedimento descrito no item 4.4.

Os resultados obtidos são apresentados no quadro Nº 03, e que correspondem aos valores médios para as diferentes concentrações da enzima analisada em relação às velocidades iniciais de hidrólise das proteínas da soja.

QUADRO Nº 03. ATIVIDADE DA ENZIMA UTILIZADA, OBTIDA DE Rhizopus chinensis

ENZIMA	ATIVIDADE
DENAPSIN 10P (NAGASE ENZYMES)	642 UE/mg (*)

(*) a unidade enzimática foi definida no item 4.4.

5.3. Variáveis que afetam o processo de solubilização do isolado de proteínas de soja

Através das medições e análises, apresentadas nos itens de 4.7.1. a 4.7.2., foram analisados os efeitos das variáveis, as quais encontram-se descritas nos itens de 4.6.1. a 4.6.6., e que afetam o processo de solubilização.

Também foi calculado, para as diversas condições do processo e à intervalos de tempo iguais do mesmo, o rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao total do substrato alimentado ao sistema.

5.3.1. Efeito da concentração do substrato

Nas figuras N^{as} 04, 05, 06, e 07 são apresentados os resultados da concentração dos peptídios solúveis no permeado, a quantidade de peptídios solúveis acumulados e o fluxo de permeado total através do tempo de reação, respectivamente, para as concentrações de 1,0 ; 2,0 ; e 3,0% de substrato.

Ao estudar o efeito da concentração do substrato sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado, que é ilustrado pela figura N^a 04, deduz-se que existe uma relação direta, já que à medida que se aumenta a concentração do substrato a concentração de peptídios solúveis no permeado aumenta também proporcionalmente, até um tempo máximo de reação (4 horas), pois ultrapassado esse tempo a atividade enzimática se mantém ou decai. Esta diminuição de concentração de peptídios solúveis no permeado, segundo CHEFTEL et al. (1971), pode ser provocada por uma menor eficiência de transferência enzima-substrato ou por inibição da enzima pelo substrato.

Ao estudar o efeito da concentração do substrato sobre a quantidade de permeado acumulado, ilustrado na figura N^a 05, pode-se afirmar que existe uma relação inversamente proporcional entre as mesmas, pois verifica-se que, à medida que aumenta a concentração de substrato, a acumulação de permeado diminui.

Da figura N^a 06, que no fundo é a representação gráfica das duas figuras anteriores (N^{as} 04 e 05), pode-se observar que um incremento na concentração do substrato produz uma diminuição significativa no fluxo de permeado total. Este gráfico também estaria representando, para uma dada concentração de substrato, o entupimento da membrana em relação ao tempo.

No quadro Nº 04 são apresentados os valores de rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao substrato alimentado ao sistema, para as concentrações de 1,0 ; 2,0 ; e 3,0% (p/v) de substrato e, do mesmo, pode-se deduzir que o melhor rendimento é obtido quando se trabalha com concentrações de substrato de 1,0% (p/v) e, os mínimos rendimentos são obtidos ao trabalhar com concentração de substrato de 2,0% (p/v).

Para a concentração de substrato de 1,0% (p/v), o volume de permeado acumulado, conforme a figura Nº 05, é significativamente grande, obtendo-se consecuentemente uma maior quantidade absoluta de material solúvel; enquanto que, para uma concentração de substrato de 3,0% (p/v), o volume de permeado acumulado é menor, mas a concentração de peptídios solúveis, conforme a figura Nº 04, é significativamente maior. Contudo, para a concentração de substrato de 2,0% (p/v), tanto os valores da concentração de peptídios como os da quantidade de permeado acumulado, são valores médios, e assim, consequentemente, a quantidade de peptídios solúveis (g) torna-se um pouco superior aos que se obtém com a concentração de substrato de 3,0% (p/v), conforme a figura Nº 06.

5.3.2. Efeito da concentração da enzima

Nas figuras Nºs 08, 09, 10 e 11 são apresentados os resultados da concentração dos peptídios solúveis no permeado, a quantidade de permeado acumulado, a quantidade de peptídios solúveis acumulados e o fluxo de permeado total em relação ao tempo de reação, respectivamente, para as concentrações da enzima de 1,0 ; 2,0 ; 4,0 ; e 8,0% (p/p) sobre o substrato.

Ao analisar o efeito da concentração da enzima sobre a concentração de peptídios solúveis, ilustrado na figura Nº 08, deduz-se que existe uma relação direta, já que,

á medida que se aumenta a concentração da enzima, a concentração de peptídios aumenta de forma proporcional. Esta relação se mantém até uma concentração da enzima de 4,0%, já que a concentração de peptídios no permeado para 8,0% de enzima não mantém a mesma relação. Daí podemos afirmar que a máxima concentração da enzima recomendada para este sistema seria de pH 4,0%, lembrando aqui que esta concentração de enzima é considerada elevada, dentro das condições tradicionais de reações enzimáticas. Isto é importante para se obter uma maior eficiência do sistema, já que ao empregar altas concentrações de enzima se maximiza a produtividade do reator, segundo CHEFTEL et al. (1971). Contudo, é importante considerar também o efeito da concentração da enzima sobre sua propria estabilidade.

Ao analisar o efeito da concentração da enzima sobre a quantidade de permeado acumulado, conforme a figura Nº 09, observa-se que, em geral, a quantidade de permeado acumulado é menor à medida que a concentração da enzima aumenta, de tal maneira que, a quantidade de permeado acumulado para a concentração da enzima de 1,0% , são bastante superiores às obtidas com outras concentrações. Isto ocorre porque existindo uma menor concentração da enzima a quantidade de peptídios solúveis produzida torna-se menor, conforme a figura Nº 08, o que permite um fluxo de permeado maior quando este é menos concentrado.

A quantidade de peptídios solúveis acumulada durante o tempo de reação é ilustrada na figura Nº 10, da qual pode-se extrair o fato de que, ao se empregar uma concentração de enzima de 2,0% (p/p) sobre o substrato, é produzida a quantidade mínima de peptídios solúveis, comparando-a às quantidades produzidas ao se utilizar uma concentração de enzima menor, 1,0%. Este fenômeno pode ser explicado ao se observar a figura Nº 08, onde se vê que a concentração de pep

tídios solúveis no permeado, para a concentração de enzima de 1,0 % sobre o substrato, é baixíssima, o que permite que o fluxo de permeado seja grande, conforme a figura Nº 11, resultando uma grande acumulação, em quantidade, de permeado que, por sua vez, resulta uma maior quantidade de peptídios solúveis acumulados. Por outro lado, como é de se esperar para as maiores concentrações de enzima sobre substrato, 4,0 e 8,0%, a concentração de peptídios solúveis no permeado é alta e, ainda que à estas concentrações se obtenha um fluxo baixo de permeado, a quantidade de peptídios solúveis acumulados produzida é significativamente maior que a obtida à uma concentração de enzima de 2,0% sobre o substrato.

Ao analisar a figura Nº 11, que nos mostra a relação entre o fluxo de permeado total por unidade de superfície de área ultrafiltrante em relação ao tempo de reação, pode-se observar que um aumento da concentração da enzima provoca uma diminuição da intensidade do fluxo de permeado total. Isto pode ser explicado pelo fato de que, ao aumentar a concentração da enzima se incrementa a produção, ou liberação, dos peptídios solúveis, que, por sua vez, vão aumentar a concentração do permeado, o que faz com que a passagem de permeado através da membrana seja menor. Este fato também leva a um entupimento da membrana mais rápido.

Do quadro Nº 05; no qual são apresentados os valores do rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao substrato alimentado ao sistema, isto é, a porcentagem de solubilização do isolado de proteínas de soja para as diferentes porcentagens de concentrações sobre o substrato, estudadas; pode-se deduzir que o rendimento sofre uma melhora significativa à medida que se incrementa a concentração da enzima. Assim, isto estaria em concordância com CHEFTEL et al. (1971), que assinalam que, com altas concentrações de enzima, obtém-se a máxima

produtividade do reator enzimático para um sistema contínuo.

5.3.3. Efeito do pH

O efeito do pH sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado, a quantidade de permeado acumulado, a quantidade de peptídios solúveis acumulados e o fluxo de permeado total através do tempo de reação, é mostrado nas figuras Nºs 12, 13, 14 e 15 respectivamente.

Neste sistema a variação do pH afeta, praticamente, apenas a atividade da enzima, a qual está representada graficamente pela figura Nº 12, e onde pode-se observar que a enzima tem uma atividade maior no intervalo de pH 2,5 a 3,0, e esta atividade enzimática decresce a um mínimo a pH 2,0, analisada do ponto de vista da concentração de peptídios solúveis no permeado. Consequentemente ao fato de que a uma maior atividade da enzima ocorre uma maior formação, ou liberação, de peptídios solúveis, o que concorre para a concentração do permeado, o que, por sua vez, influi no fluxo de permeado total, conforme a figura Nº 15, e, portanto, na quantidade de permeado acumulado, conforme a figura Nº 13. Isto tudo vem comprovar que a concentração de peptídios solúveis no permeado a pH 2,0 é mínima e que o fluxo de permeado total é máximo, para as condições estudadas.

Contudo, estas diferenças se minimizam para os diferentes pH analisados, conforme a figura Nº 14, na qual se apresenta graficamente a quantidade de peptídios solúveis acumulados, que resultam da concentração destas no permeado e da quantidade de permeado total através do tempo de reação.

Finalmente, ao analisar o quadro Nº 06; que apresenta o rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado em relação ao total de substrato alimentado ao sistema, ou, em outras palavras, a porcentagem de solubilização do isolado de proteínas de soja, o que, no fundo, repre

sentaria a melhor condição de pH (pH ótimo) para a atividade da enzima, pode-se observar que dos valores de pH analisa dos, esta seria ideal a pH 2,5 e mínima a pH 2,0. Pode-se observar também que a atividade da enzima tende a decrescer à medida que o pH se torna maior que 3,0.

É interessante mencionar a hipótese de VERMA e MACCALLA (1966), que assinalam que uma proteólise enzimática sob condições de pH ácido é capaz de induzir à formação de u ma grande quantidade de polipeptídios como produtos interme diários na reação, os quais alcançam um tamanho molecular su ficientemente pequeno para que sejam solúveis, mas não tanto que os levem a provocar o aparecimento de sabores indesejá veis, principalmente o amargo.

5.3.4. Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado, a quantidade de permeado acu mulado, a quantidade de peptídios acumulados e o fluxo de permeado total através do tempo de reação, é apresentado nas figuras Nºs 16, 17, 18 e 19, respectivamente.

Da mesma forma que o pH, a temperatura afeta, prin cipalmente, neste caso, a atividade da enzima, ainda que tam**ém** deva influir sobre uma serie de parâmetros, tanto físi cos como químicos, que não foram estudados neste trabalho.

Na figura Nº 16 pode-se observar que a enzima tem uma atividade mais intensa à 50°C que a 40°C, analisada sob o ponto de vista da concentração de peptídios solúveis no permeado. Como por efeito da maior atividade da enzima a 50°C de temperatura, ocorre uma maior formação, ou libera ção, de peptídios solúveis, o que provoca, consecuentemente, que a quantidade de permeado acumulado, por ser o permeado mais concentrado, seja menor a 50°C que a 40°C, conforme a figura Nº 17; tem-se também que o fluxo de permeado total de

va ser menor à 50°C que à 40°C, conforme figura Nº 19, o que também significaria que o entupimento da membrana é maior e mais rápido à 50°C que à 40°C.

Como a quantidade de peptídios solúveis acumulados, analisados a partir da figura Nº 16, é maior à 40°C que à 50°C, isto significa que a quantidade de permeado acumulado é muito mas significativa, já que a concentração de peptídios solúveis no permeado é aproximadamente constante.

Temos contudo que, ao analisar o quadro Nº 07, que apresenta o rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao total de substrato alimentado ao sistema através do tempo de reação, poder-se-ia dizer que representa, ainda melhor, a atividade, enzimática. Pode-se observar ainda que o rendimento se vê favorecido a 50°C, em comparação com o rendimento a 40°C. Conclui-se, então, que a temperatura de 50°C deve estar mais próxima da temperatura ideal da atividade da enzima.

5.3.5. Efeito da pressão exercida no sistema

O efeito da pressão exercida no sistema sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado, a quantidade de permeado acumulado, a quantidade de peptídios solúveis e o fluxo de permeado total através do tempo de reação, é apresentado nas figuras nas figuras Nºs 20, 21, 22, e 23, respectivamente.

Diferentemente do pH e de temperatura, a pressão exercida no sistema não afeta a atividade da enzima, analisando-a sob o ponto de vista da concentração dos peptídios solúveis no permeado, fato este apresentado graficamente na figura Nº 20, onde pode-se observar que os valores da concentração de peptídios solúveis no permeado, para as diversas pressões estudadas, são praticamente similares.

Sem dúvida, a pressão exercida no sistema influi

diretamente na quantidade de permeado acumulado, o que pode ser observado na figura Nº 21, e de onde se extrai que a quantidade de permeado acumulado é maior quanto maior seja a pressão.

Como a concentração de peptídios solúveis no permeado é aproximadamente similar para as diversas pressões exercidas no sistema, a quantidade de peptídios solúveis acumulados estaria basicamente na dependência das quantidades de permeado acumulado, e estes sim é que estariam diretamente relacionados com a pressão exercida no sistema, de tal maneira que, da figura Nº 22, pode-se observar que a uma maior pressão exercida no sistema corresponde uma maior quantidade de peptídios acumulados

Por outro lado, ao exercer pressões negativas no sistema ($\text{vacuo} = 0,3 \text{ kg/cm}^2$), os efeitos na quantidade de permeado acumulado, e no fluxo de permeado total, são levemente inferiores aos obtidos quando se aplica uma pressão de $1,0 \text{ kg/cm}^2$, porém, na quantidade de peptídios solúveis acumulados são praticamente similares, já que a concentração de peptídios solúveis no permeado é levemente superior à obtida com as demais, e diversas, pressões.

No quadro Nº 08 são apresentados os valores de rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao total de substrato alimentado ao sistema, através do tempo de reação, para as diversas pressões estudadas.

Como foi mencionado anteriormente, a pressão exercida no sistema não afeta a atividade enzimática, e assim os valores do rendimento, para as diversas pressões estudadas, são praticamente os mesmos. Nota-se, porém, que o rendimento apresenta uma melhora relativa quando se empregam pressões negativas (vacuo) no sistema.

5.3.6. Efeito da desnaturação do substrato

O efeito da desnaturação de substrato sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado, a quantidade de permeado acumulado, a quantidade de peptídios solúveis acumulados e o fluxo de permeado total através do tempo de reação, é apresentado nas figuras N^os 24, 25, 26, e 27, respectivemente.

Conforme a figura N^o 24, e da qual pode-se analisar o efeito da desnaturação do substrato sobre a concentração de peptídios solúveis no permeado, e onde pode-se comprovar uma vez mais que o substrato desnaturado favorece a atividade enzimática, pois obtem-se uma maior concentração de peptídios solúveis no permeado com o substrato desnaturado.

Assim temos que, ao mesmo tempo, a desnaturação do substrato favorece o fluxo de permeado total, conforme a figura N^o 27, e a quantidade de permeado acumulado, conforme a figura N^o 25.

Como consequência desta última observação, temos que a quantidade de peptídios solúveis acumulados, quando se utiliza um substrato desnaturado, é significativamente maior que a obtida com um não desnaturado, conforme a figura N^o 26.

No quadro N^o 09 é apresentado o rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis do permeado acumulado em relação ao total de substrato alimentado ao sistema através do tempo de reação, tanto para substrato desnaturado como não desnaturado e, também deste quadro, pode-se afirmar que representa, em parte, a atividade enzimática. Assim temos que, neste caso, mais uma vez, fica demonstrado que a atividade enzimática é maior quando sobre um substrato desnaturado, já que os valores deste rendimento são mais elevados para o substrato desnaturado se comparados aos obtidos para

um substrato não desnaturado.

5.4. Variação do pH do permeado obtido no processo de solubilização do isolado de proteínas de soja através do tempo de reação

As determinações do pH do permeado através do tempo de reação para a solubilização de um isolado de proteínas de soja são apresentadas no quadro Nº 10.

No quadro Nº 10, pode-se comprovar que, independente do pH do substrato, porém sendo respeitado o intervalo de pH ácido estudado, ocorre sempre uma diferença entre o pH do permeado e o do substrato, na qual o pH do permeado é superior ao do substrato, com uma variação possível de 0,25 a 0,65.

Por outro lado, esta diferença entre o pH do permeado e o do substrato ocorre sempre na primeira meia hora de reação, tendendo a se manter constante posteriormente com o transcorrer da reação.

5.5. Análises dos peptídios solúveis contidos no permeado

5.5.1. Peso molecular

A determinação do peso molecular foi realizada através do método descrito em 4.8.1.

Ainda que com a determinação do peso molecular não se tenha podido chegar a concluir exatamente qual o peso molecular que têm as frações protéicas contidas no permeado, pode-se afirmar que estes devem possuir um peso molecular inferior a 10 000. Isto porque seus pesos moleculares devem ser inferiores aos que se podem determinar por este método, já que, segundo WEBER et al. (1969), este se aplica à determinação de pesos moleculares de cadeias de polipeptídios com pesos moleculares entre 10 000 e 100 000.

5.5.2. Cromatografia em camada fina

A determinação foi feita através do método descrito em 4.8.2.

Na figura Nº 29 é apresentada a análise de cromatografia em camada fina para a identificação dos peptídios solúveis existentes no permeado, e na qual pode-se observar, em primeiro lugar, que não existe diferenciação entre as frações do permeado obtido com um substrato desnaturado e as obtidas com um substrato não desnaturado e; em segundo lugar, que os permeados obtidos possuem apenas três frações, o que era de se esperar nas condições de pH ácido da reação enzimática e também pelo processo de ultrafiltração. Isto porque uma vez que os peptídios formados, ou liberados, pela hidrólise enzimática das proteínas do isolado de soja alcançassem um tamanho e/ou peso molecular que os tornasse capaz de passar pela membrana ultrafiltrante, por ela fluíam, impedindo, desta forma, que os peptídios continuassem a ser hidrolisados. Assim, dificilmente poder-se-ia obter um permeado, primeiramente com muitas frações protéicas e, depois, com peptídios de um tamanho e/ou peso molecular demasiadamente baixo.

5.6. Solubilização do isolado de proteínas de soja em um reator enzimático tipo "batch"

Na figura Nº 28 é apresentada a variação da concentração dos peptídios solúveis obtidos através do tempo de reação enzimática em um reator enzimático tipo "batch".

No quadro Nº 11 são apresentados os resultados do rendimento (porcentagem em peso) dos peptídios solúveis formados, ou liberados, por hidrólise enzimática das proteínas do isolado de soja em um reator enzimático tipo "batch" através do tempo de reação.

Ao se comparar os resultados da figura Nº 28 com os da figura Nº 28, que também representa a concentração de peptídios solúveis no permeado, através do tempo de reação, para as diferentes pressões exercidas no sistema estudadas, pode-se observar que a concentração em peptídios solúveis é ligeiramente superior à obtida no reator tipo "batch", o que significaria que, pela ação enzimática os peptídios continuariam sendo hidrolisados até alcançar tamanhos e/ou pesos moleculares um pouco inferiores que os dos peptídios que são obtidos quando se utiliza o processo de solubilização enzimática do isolado de proteínas de soja em um sistema contínuo por meio de ultrafiltração.

Ao analisar o rendimento dos peptídios formados, ou liberados, por hidrólise enzimática das proteínas do isolado de soja em um reator enzimático tipo "batch" através do tempo de reação, conforme o quadro Nº 11, e comparando-o com o obtido pelo processo de solubilização enzimática do isolado de proteínas de soja em um sistema contínuo, por meio de ultrafiltração, conforme o quadro Nº 08, pode-se concluir que os valores do rendimento no primeiro caso são superiores, demonstrando-se, desta maneira, que no reator tipo "batch" é obtida uma ação enzimática mais exaustiva; porém, não se pode deixar de considerar que neste caso o substrato estaria sendo hidrolisado por um espaço de tempo de 5 horas, já que não existe renovação do substrato durante o período de hidrólise, como no caso do reator contínuo. Em síntese, a ação enzimática, em ambos os casos, não é extremamente degradativa, o que estaria em concordância com a hipótese de VERMA e MC CALLA (1969), a qual assinala que em condições de pH ácido pode-se obter apenas peptídios, produtos intermediários de degradação protéica, que alcancem um tamanho e/ou peso molecular que lhes permitam ser solúveis, mas não tão reduzidos, de forma que possam produzir sabores desagradáveis.

QUADRO Nº 04. RENDIMENTO (PORCENTAGEM EM PESO) DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS DO PERMEADO ACUMULADO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE SUBSTRATO ALIMENTADO AO REATOR ENZIMÁTICO A TRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO, À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO. (*)

TEMPO (h)	RENDIMENTO (%)		
	CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO (%, p/v)		
	1,0	2,0	3,0
0,5	15,33	12,50	13,33
1,0	17,53	14,43	16,43
1,5	18,90	16,27	18,06
2,0	20,62	17,34	19,32
2,5	22,03	18,47	20,56
3,0	23,08	19,42	21,58
3,5	25,07	20,36	22,85
4,0	26,39	21,39	23,71
4,5	25,87	22,21	24,21
5,0	25,46	22,93	24,52

- (*) : Condições do Processo
- [E] = 2,0% (p/p) sobre o S.
 - pH = 3,0.
 - $t^{\circ} = 50^{\circ}\text{C} \pm 2$.
 - Vacuo = 0,3 kg/cm².

QUADRO Nº 05. RENDIMENTO (PORCENTAGEM EM PESO) DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS DO PERMEADO ACUMULADOS EM RELAÇÃO AO TOTAL DE SUBSTRATO ALIMENTADO AO REATOR ENZIMÁTICO À TRAVÉS DO TEMPO DE REACÃO, À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENZIMA. (*).

TEMPO (h)	RENDIMENTO (%)			
	CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA SOBRE O SUBSTRATO (%, p/p)			
	1,0	2,0	4,0	8,0
0,5	12,18	12,50	17,45	24,67
1,0	12,74	14,43	22,77	28,65
1,5	14,00	16,27	25,20	30,65
2,0	15,00	17,34	27,47	31,86
2,5	15,69	18,47	28,72	32,99
3,0	16,42	19,42	29,88	33,69
3,5	17,00	20,36	30,83	34,20
4,0	17,49	21,39	31,64	35,00
4,5	18,16	22,21	32,47	35,54
5,0	18,51	22,93	32,89	35,34

(*) : Condições do Processo

- [S] = 2,0% (p/v).
- pH = 3,0.
- $t^{\circ} = 50^{\circ}\text{C} \pm 2$.
- $\text{Vacuo} = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

QUADRO Nº 06. RENDIMENTO (PORCENTAGEM EM PESO) DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS DO PERMEADO ACUMULADO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE SUBSTRATO ALIMENTADO AO REATOR ENZIMÁTICO A TRAVÉS DO TEMPO DE REAÇÃO, À DIFERENTES pH. (*).

TEMPO (h)	RENDIMENTO (%)				
	pH				
	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
0,5	6,77	11,25	12,50	15,74	10,36
1,0	8,42	16,28	14,43	17,50	13,27
1,5	9,84	19,21	16,27	18,78	15,03
2,0	10,74	20,86	17,34	19,55	16,26
2,5	11,37	22,09	18,47	20,08	17,49
3,0	11,82	23,02	19,42	20,67	18,23
3,5	12,19	23,48	20,36	20,91	19,23
4,0	12,61	24,02	21,39	21,04	19,78
4,5	12,84	24,45	22,21	21,05	21,58
5,0	13,14	24,83	22,93	20,97	21,58

(*) : Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $t^{\circ} = 50^{\circ}\text{C} \pm 2$.
 - $\text{Vacuo} = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

QUADRO Nº 07. RENDIMENTO (PORCENTAGEM EM PESO) DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS DO PERMEADO ACUMULADO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE SUBSTRATO ALIMENTADO AO REATOR ENZIMÁTICO A TRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO, À DIFERENTES TEMPERATURAS. (*).

TEMPO (h)	RENDIMENTO (%)	
	TEMPERATURAS	
	50°C ± 2	40°C ± 2
0,5	12,50	7,97
1,0	14,43	11,64
1,5	16,27	14,39
2,0	17,34	15,29
2,5	18,47	16,46
3,0	19,42	19,04
3,5	20,36	18,72
4,0	21,39	19,61
4,5	22,21	20,12
5,0	22,93	20,58

- (*) : Condições do Processo
- [S] = 2,0% (p/v).
 - [E] = 2,0% (p/p) sobre o S.
 - pH = 3,0.
 - Vacuo = 0,3 kg/cm².

QUADRO Nº 08. RENDIMENTO (PORCENTAGEM EM PESO) DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS DO PERMEADO ACUMULADO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE SUBSTRATO ALIMENTADO AO REATOR ENZIMÁTICO À TRAVÉS DO TEMPO DE REAÇÃO, À DIFERENTES PRESSÕES EXERCIDAS SOBRE O SISTEMA. (*).

TEMPO (h)	RENDIMENTO (%)			
	PRESSÃO (kg/cm ²)			
	0,3	1,0	1,5	2,0
0,5	12,50	10,52	10,36	10,27
1,0	14,43	13,00	12,54	12,05
1,5	16,27	15,00	14,36	13,59
2,0	17,34	16,51	15,83	16,23
2,5	18,47	17,58	16,98	16,28
3,0	19,42	15,50	17,89	17,24
3,5	20,36	19,23	18,77	18,24
4,0	21,34	19,83	19,34	19,01
4,5	22,21	20,29	19,64	19,65
5,0	22,93	20,61	19,75	20,32

- (*) : Condições do Processo
- [S] = 2,0% (p/v).
 - [E] = 2,0% (p/p) sobre o S.
 - pH = 3,0.
 - t° = 50°C ± 2.

QUADRO Nº 09. RENDIMENTO (PORCENTAGEM EM PESO) DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS DO PERMEADO ACUMULADO EM RELAÇÃO AO TOTAL DE SUBSTRATO ALIMENTADO AO REATOR ENZIMÁTICO A TRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO, PARA UM SUBSTRATO DESNATURADO E NÃO DESNATURADO. (*).

TEMPO (h)	RENDIMENTO (%)	
	SUBSTRATO DESNATURADO	SUBSTRATO NÃO DESNATURADO
0,5	11,65	10,27
1,0	12,90	12,05
1,5	14,51	13,69
2,0	16,02	16,23
2,5	17,84	16,28
3,0	19,00	17,24
3,5	20,01	18,24
4,0	20,90	19,01
4,5	21,15	19,65
5,0	21,35	20,32

(*) : Condições do Processo

- [S] = 2,0% (p/v).
- [E] = 2,0% (p/p) sobre o S.
- pH = 3,0.
- P = 2,0 kg/cm².
- t° = 50°C ± 2.

QUADRO Nº 10. VARIAÇÃO DO pH DO PERMEADO OBTIDO NO PRO-
 DE SOLUBILIZAÇÃO DO ISOLADO DE PROTEÍNAS
 DE SOJA ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO, A DI-
 FERENTES pH INICIAIS. (*).

TEMPO (h)	VARIAÇÃO DO pH				
0,0	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00
0,5	2,42	2,86	3,40	3,75	4,28
1,0	2,40	3,09	3,40	3,84	4,33
1,5	2,41	3,10	3,45	3,93	4,33
2,0	2,43	3,09	3,40	3,98	4,34
2,5	2,40	3,01	3,50	3,98	4,36
3,0	2,43	3,02	3,40	3,99	4,36
3,5	2,42	3,13	3,45	3,99	4,36
4,0	2,40	3,11	3,40	4,00	4,38
4,5	2,42	3,14	3,40	3,99	4,37
5,0	2,43	3,15	3,40	4,02	4,36

- (*) : Condições do Processo
- [S] = 2,0% (p/v).
 - [E] = 2,0% (p/p) sobre o S.
 - $t^{\circ} = 50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$.
 - Vacuo = 0,3 kg/cm².

QUADRO Nº 11. RENDIMENTO (PORCENTAGEM EM PESO) DOS PEPTÍDIOS SOLÚVEIS FORMADOS, OU LIBERADOS, POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO ISOLADO DE SOJA EM UM REATOR TIPO "BATCH" ATRAVÉS DO TEMPO DE REAÇÃO. (*).

TEMPO (h)	RENDIMENTO (%)
0,5	24,15
1,0	29,70
1,5	30,35
2,0	30,45
2,5	32,55
3,0	32,95
3,5	33,10
4,0	33,45
4,5	35,40
5,0	35,90

(*) : Condições do Processo

- [S] = 2,0% (p/v).
- [E] = 2,0% (p/p) sobre o S.
- pH = 3,0%.
- t° = $50^{\circ}\text{C} \pm 2$.

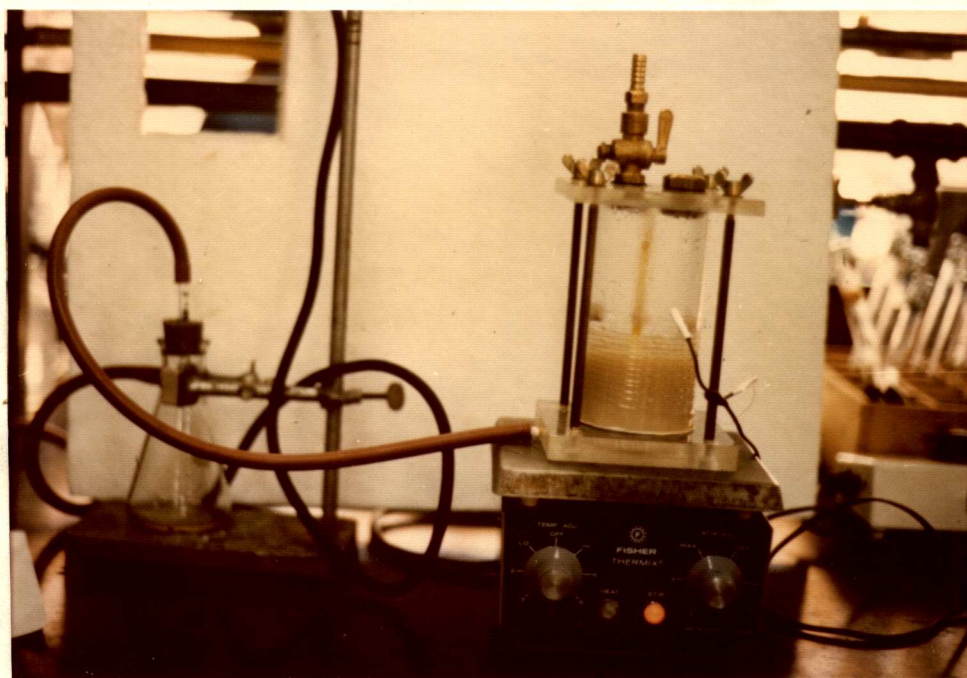


FIG. Nº 03. ESQUEMA DA SOLUBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE UM ISOLADO DE PROTEÍNAS DE SOJA EM UM SISTEMA CONTÍNUO POR MEIO DE ULTRAFILTRAÇÃO.

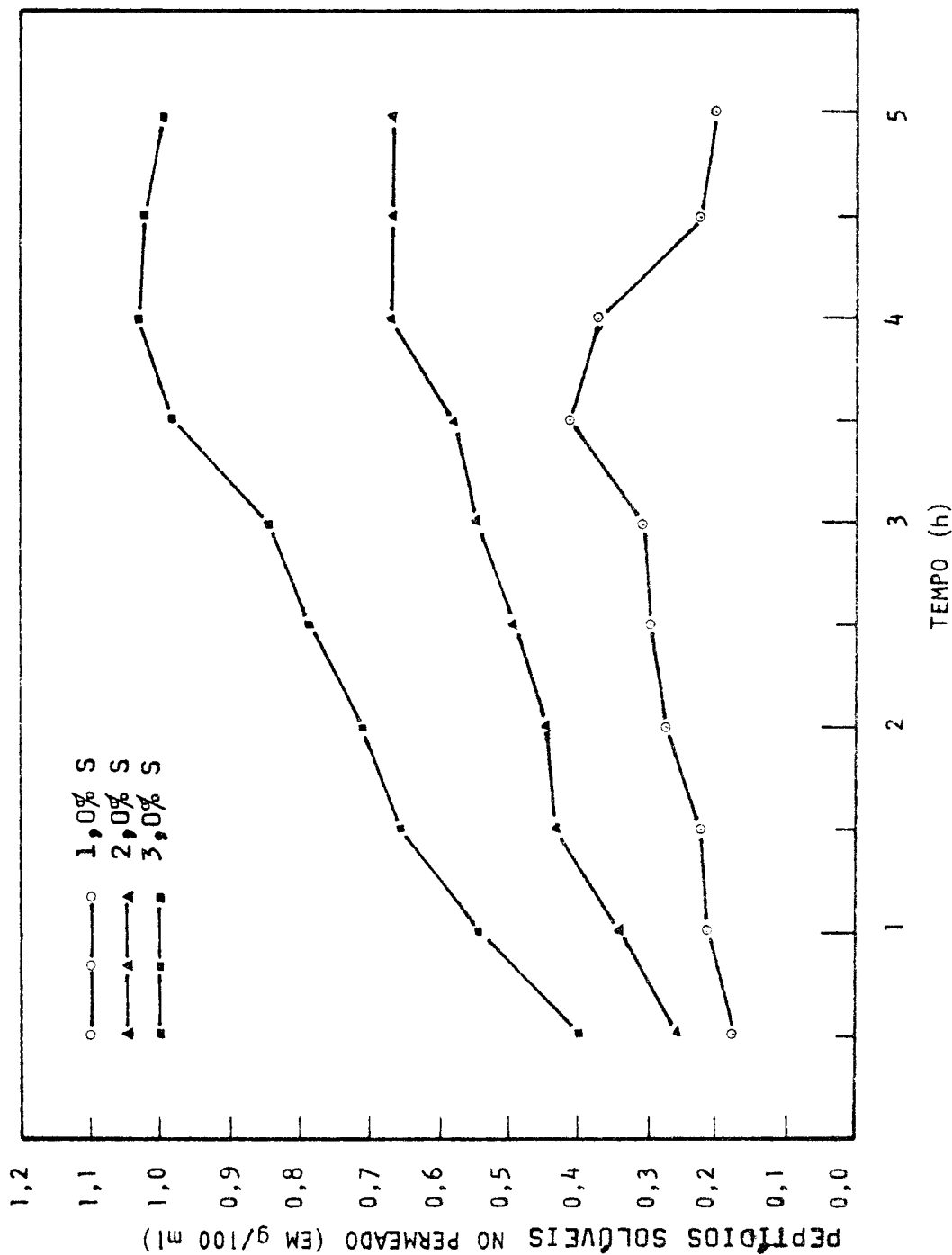


FIG. Nº 04. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS NO PERMEADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $pH = 3,0$.
 - $t = 50^{\circ}C + 2^{\circ}$.
 - $V_{acuo} = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

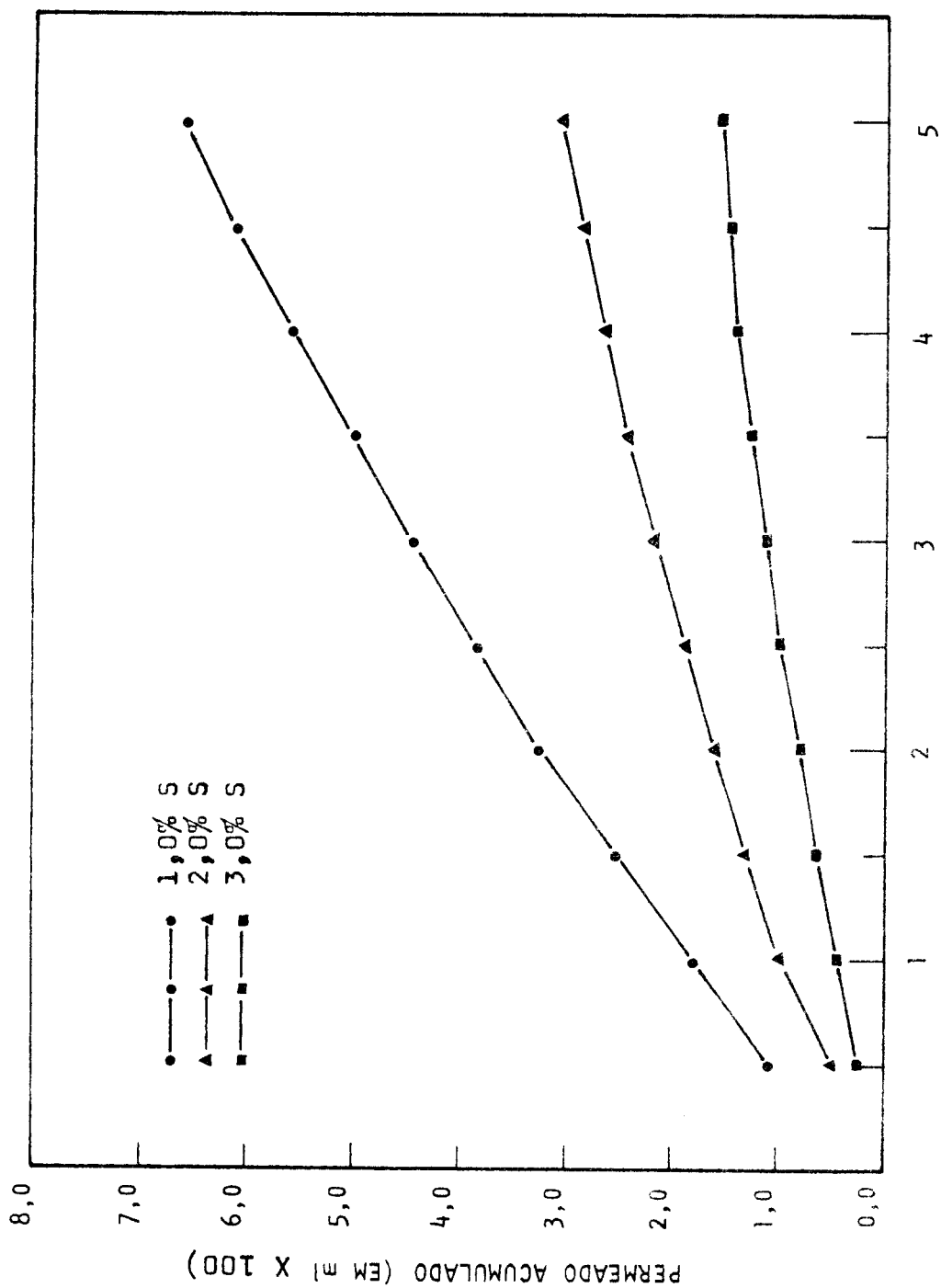


FIG. Nº 05. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE A QUANTIDADE DE PERMEADO ACUMULADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $E = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $pH = 3,0$.
 - $t = 50^\circ C + 2^\circ$.
 - $Vacuo = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

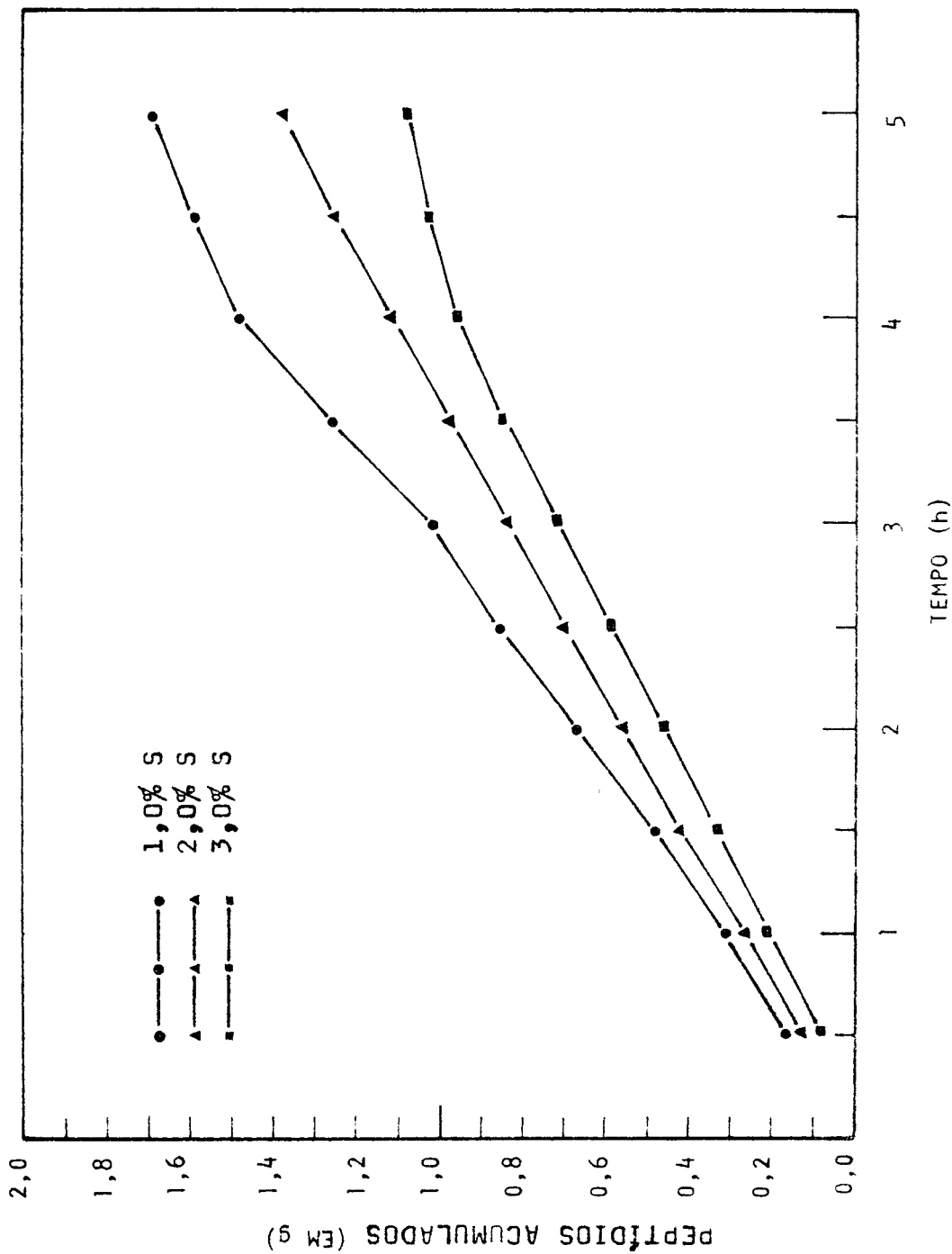


FIG. Nº 06. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE A QUANTIDADE DE PEPTÍDIOS SO LUVES ACUMULADOS ATRAVÉS DO TEMPO DE REAÇÃO.

Condições do Processo
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $pH = 3,0$.
 - $t = 50^{\circ}C \pm 2^{\circ}$.
 - $Vacuo = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

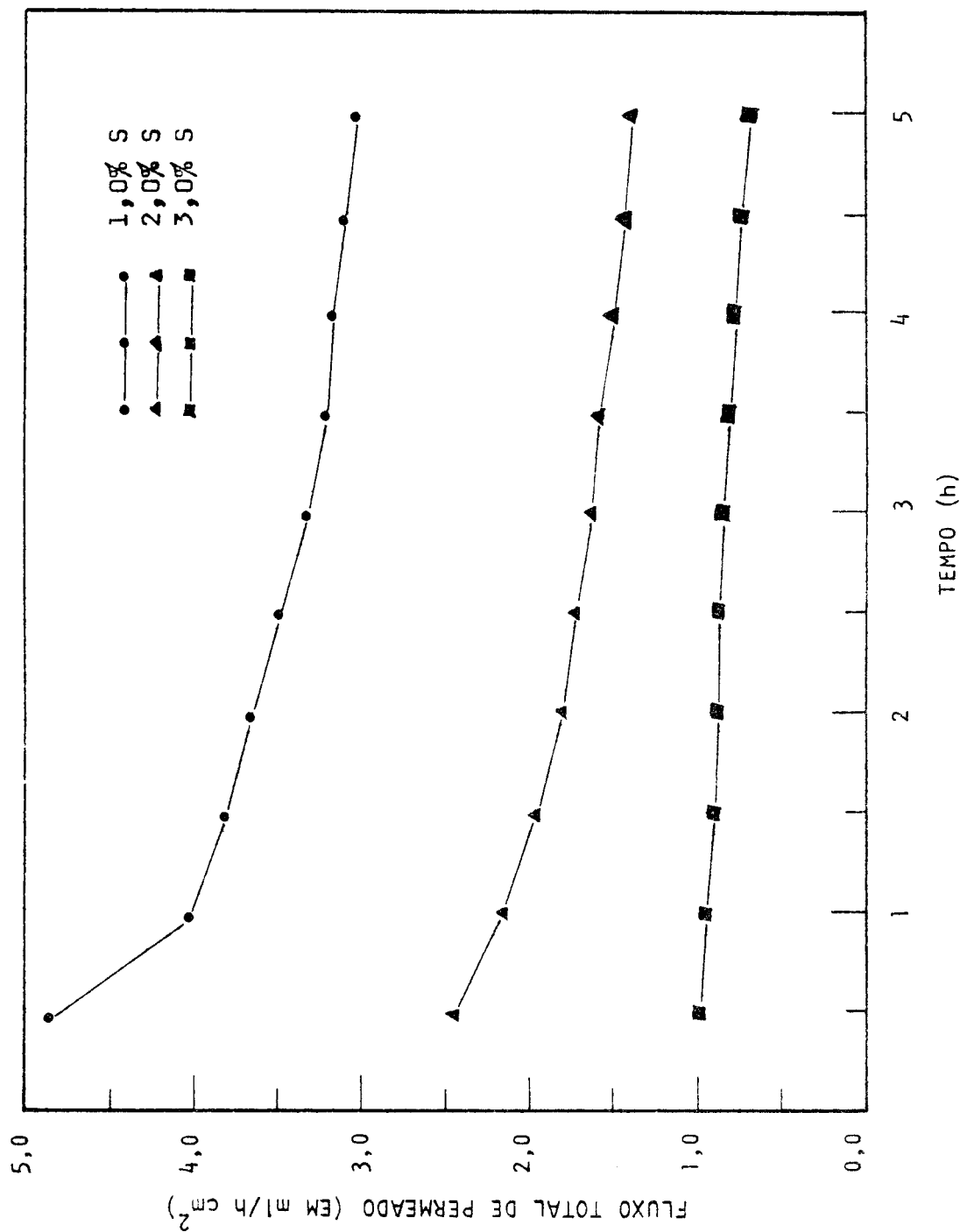
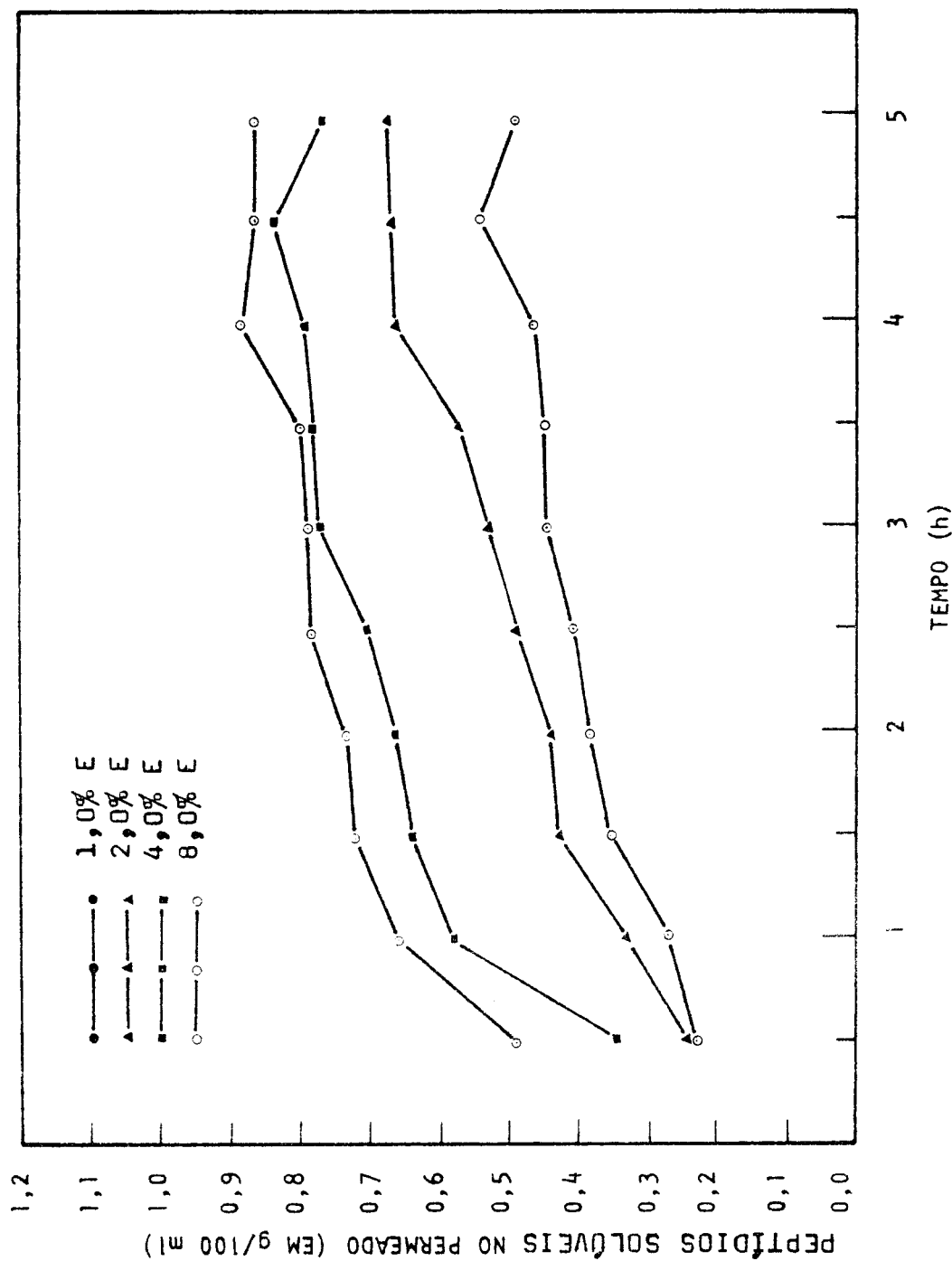


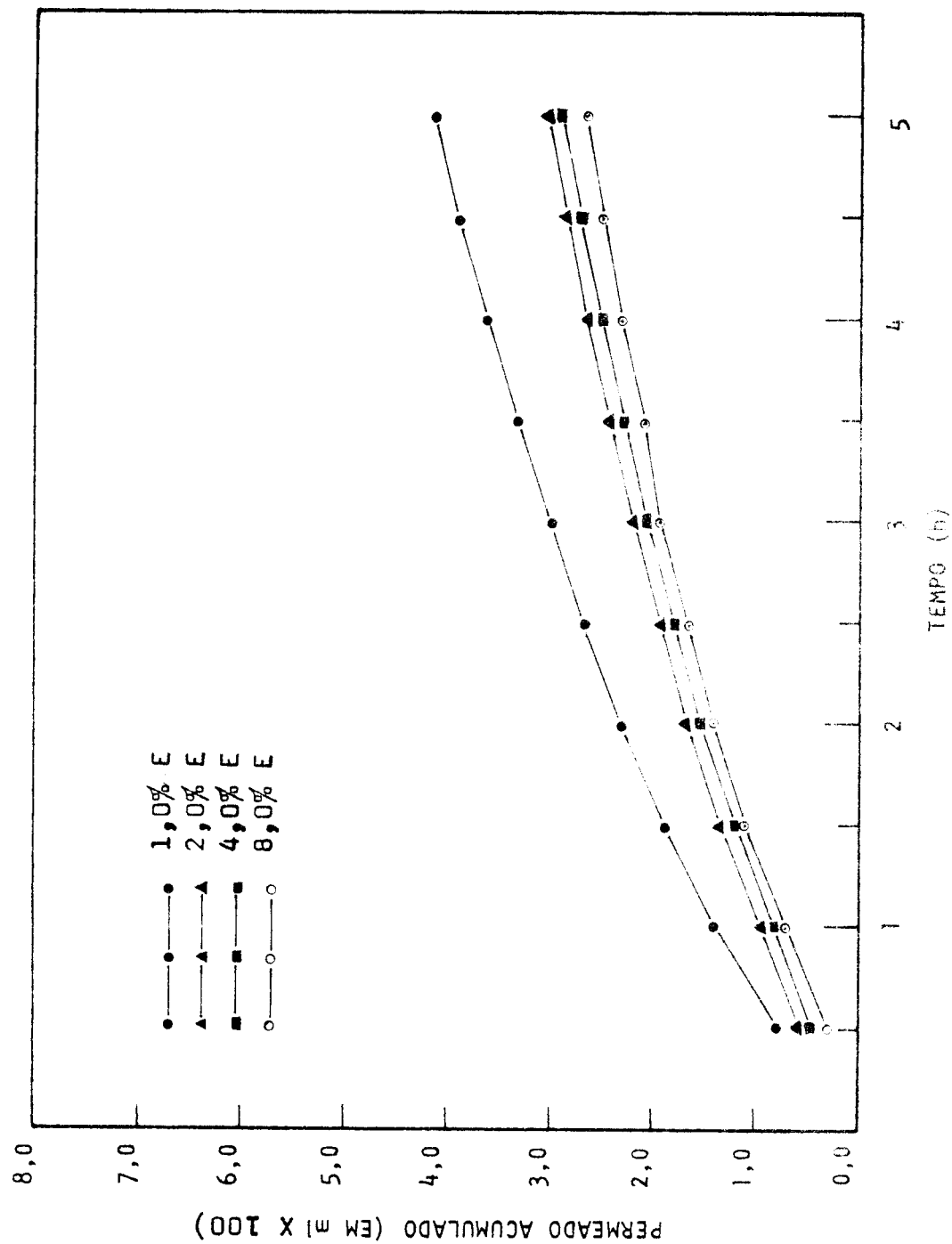
FIG. Nº 07. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE O FLUXO DE PERMEADO TOTAL A TRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $pH = 3,0$.
 - $t^{\circ} = 50^{\circ}C + 2$.
 - $Vacuo = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.



Condições do Processo
 - $[S] = 2,0 \text{ (p/v)}_{\text{mL}}$
 - $\text{pH} = 3,0$
 - $t^\circ = 50^\circ\text{C} \pm 2$
 - $\text{Vacuo} = 0,3 \text{ kg/cm}^2$

FIG. Nº 08. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS NO PERMEADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.



Condições do Processo

- $[S] = 2,0\%$ (p/v).
- $pH = 3,0$.
- $t^{\circ} = 50^{\circ}C \pm 2$.
- $Vacuo = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

FIG. Nº 09. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA SOBRE A QUANTIDADE DE PERMEADO ACUMULADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

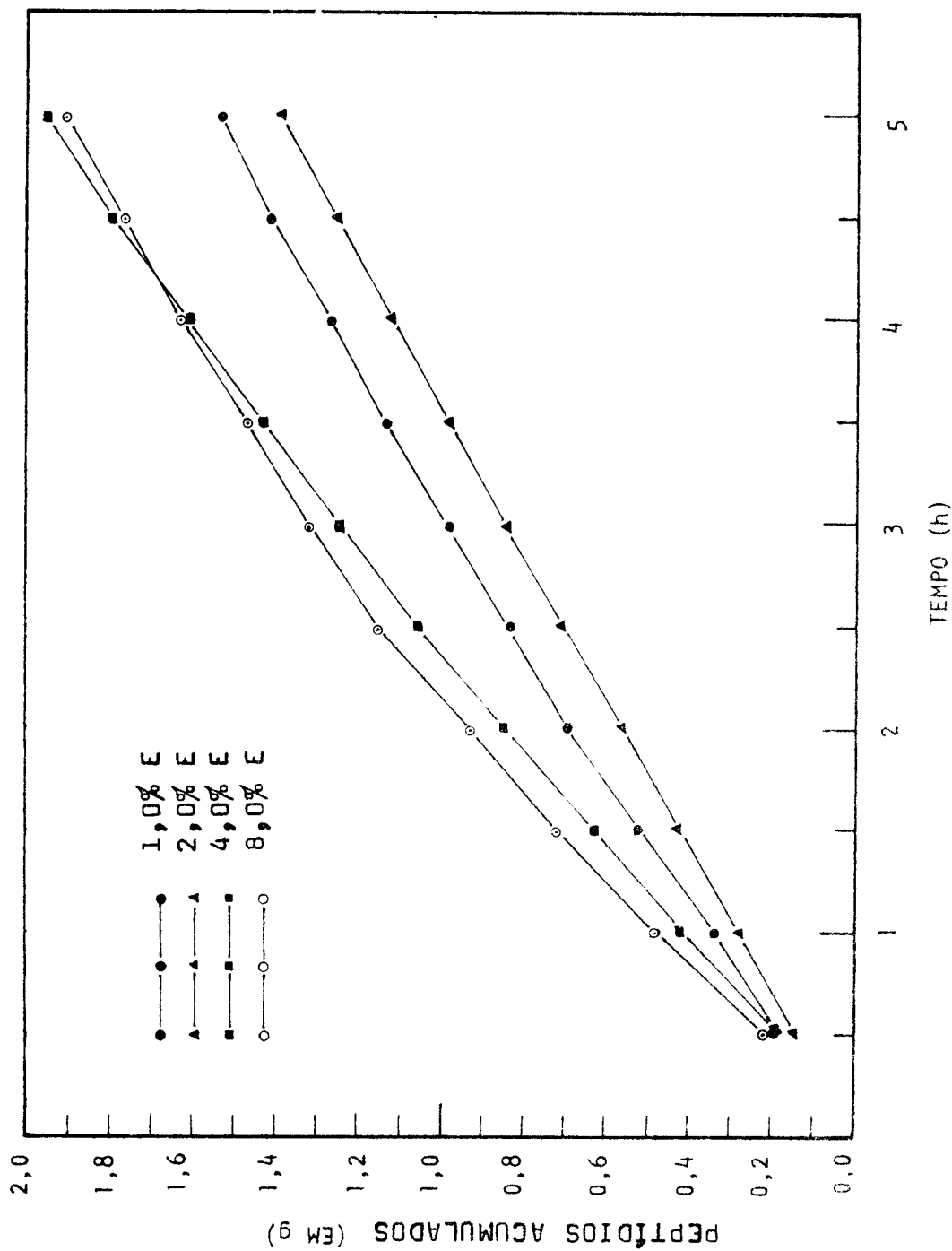
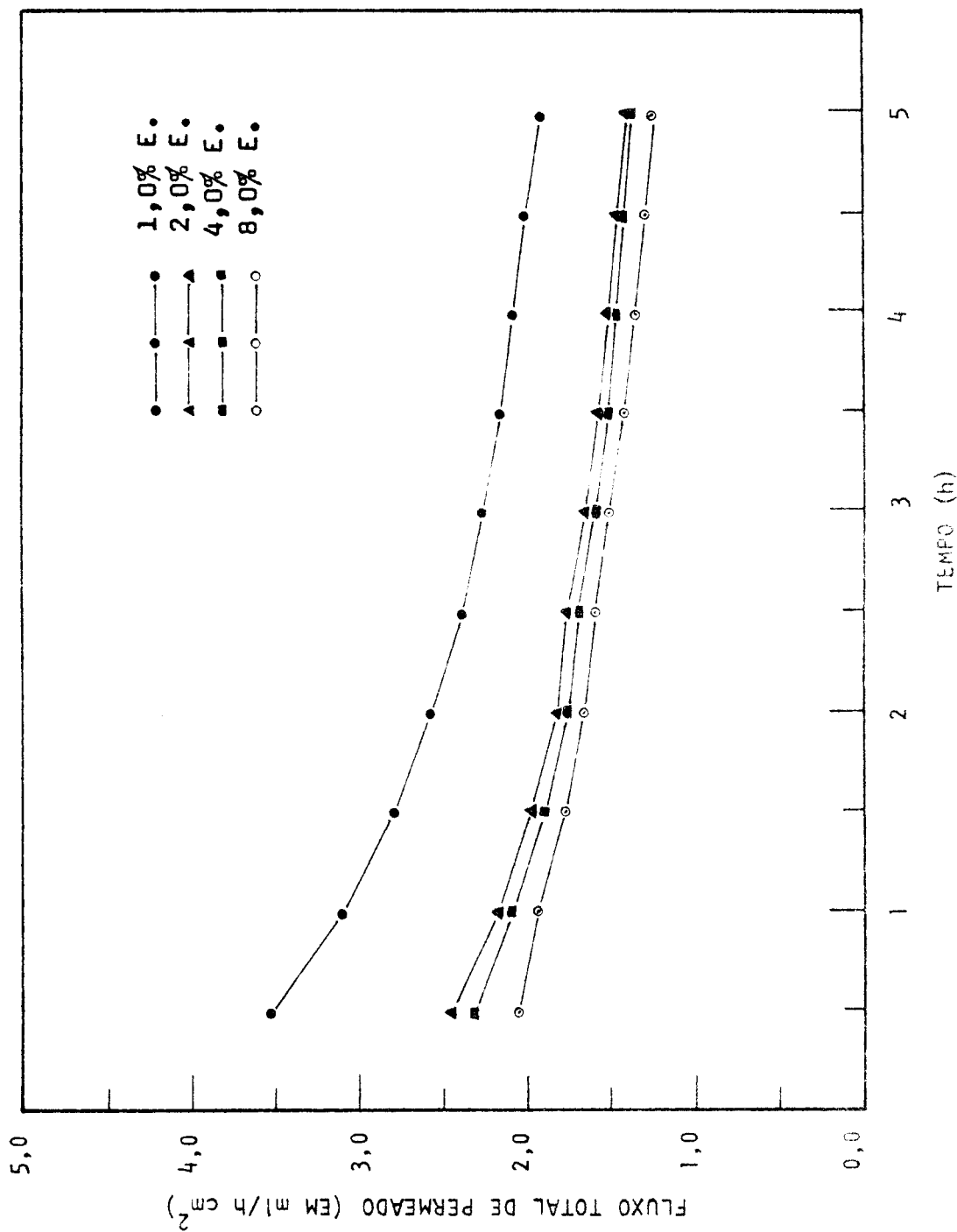


FIG. Nº 10. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA SOBRE A QUANTIDADE DE PEPTÍDIOS SOLUVEIS ACUMULADOS ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $pH = 3,0$.
 - $t^{\circ} = 50^{\circ}C + 2$.
 - $Vacuo = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.



Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $pH = 3,0$.
 - $t^{\circ} = 50^{\circ}C \pm 2^{\circ}$.
 - $Vacuo = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

FIG. Nº 11. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA SOBRE O FLUXO DE PERMEADO TOTAL ATRAVÉS DO TEMPO DE REAÇÃO.

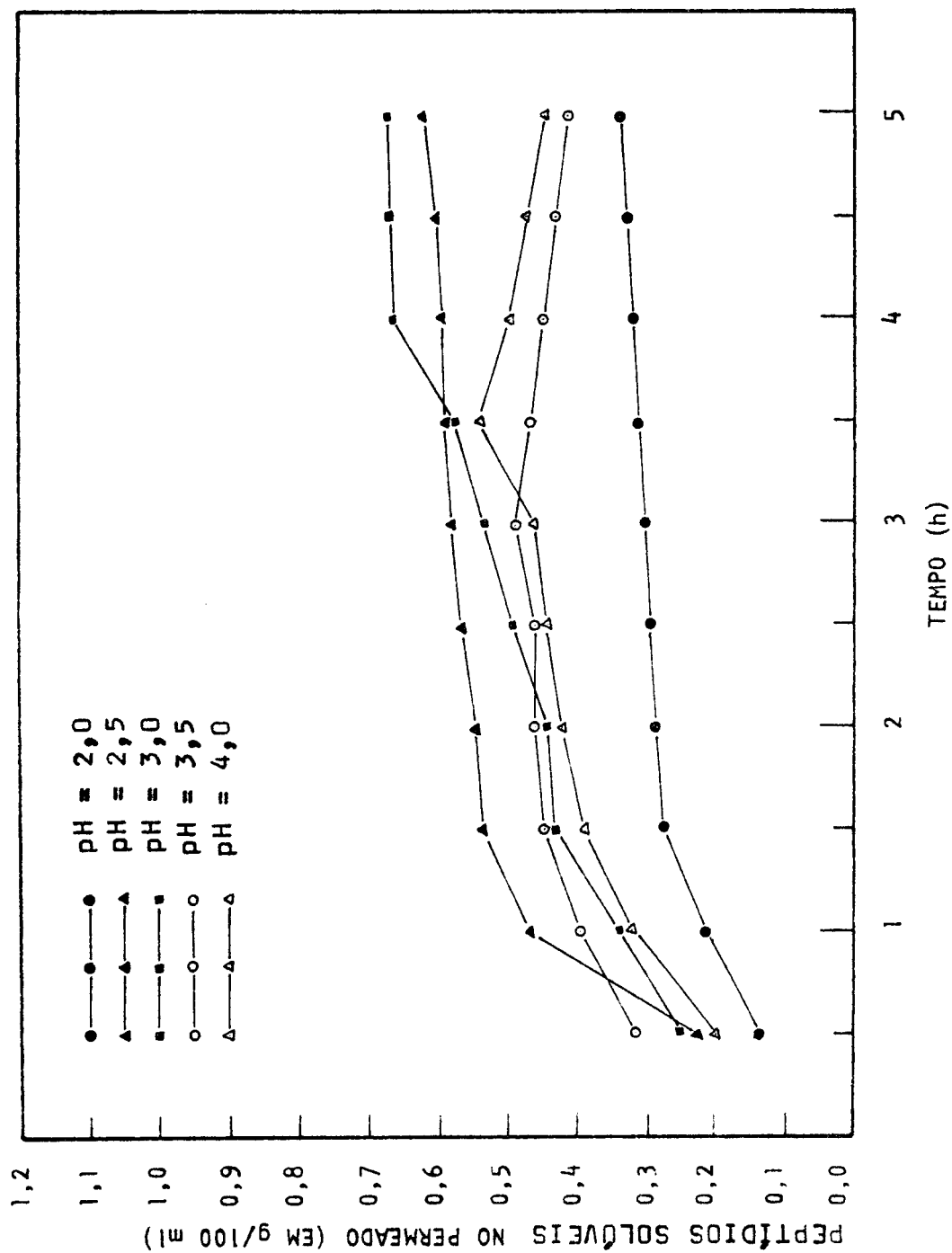


FIG. Nº 12. EFEITO DO pH SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS NO PERMEADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $t^0 = 50^\circ\text{C} \pm 2^\circ$.
 - Vacuo $\approx 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

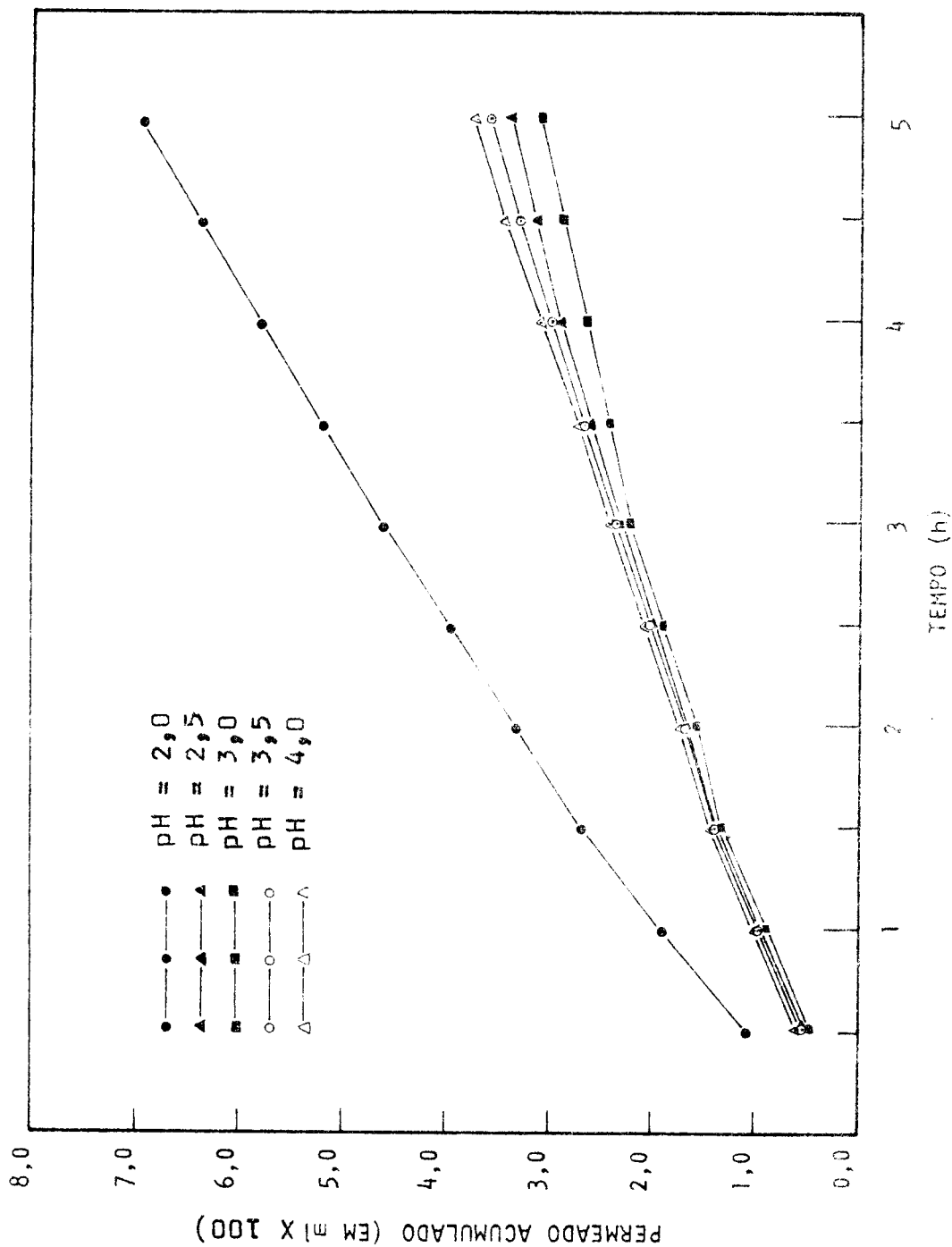


FIG. Nº 13. EFEITO DO PH SOBRE A QUANTIDADE DE PERMEADO ACUMULADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ $\left(\frac{p}{v}\right)$ sobre o S.
 - $[E] = 2,0\%$ $\left(\frac{p}{p}\right)$ sobre o S.
 - $t^0 = 50^\circ\text{C} + 2^\circ$
 - Vacuo = $0,3 \text{ kg/cm}^2$.

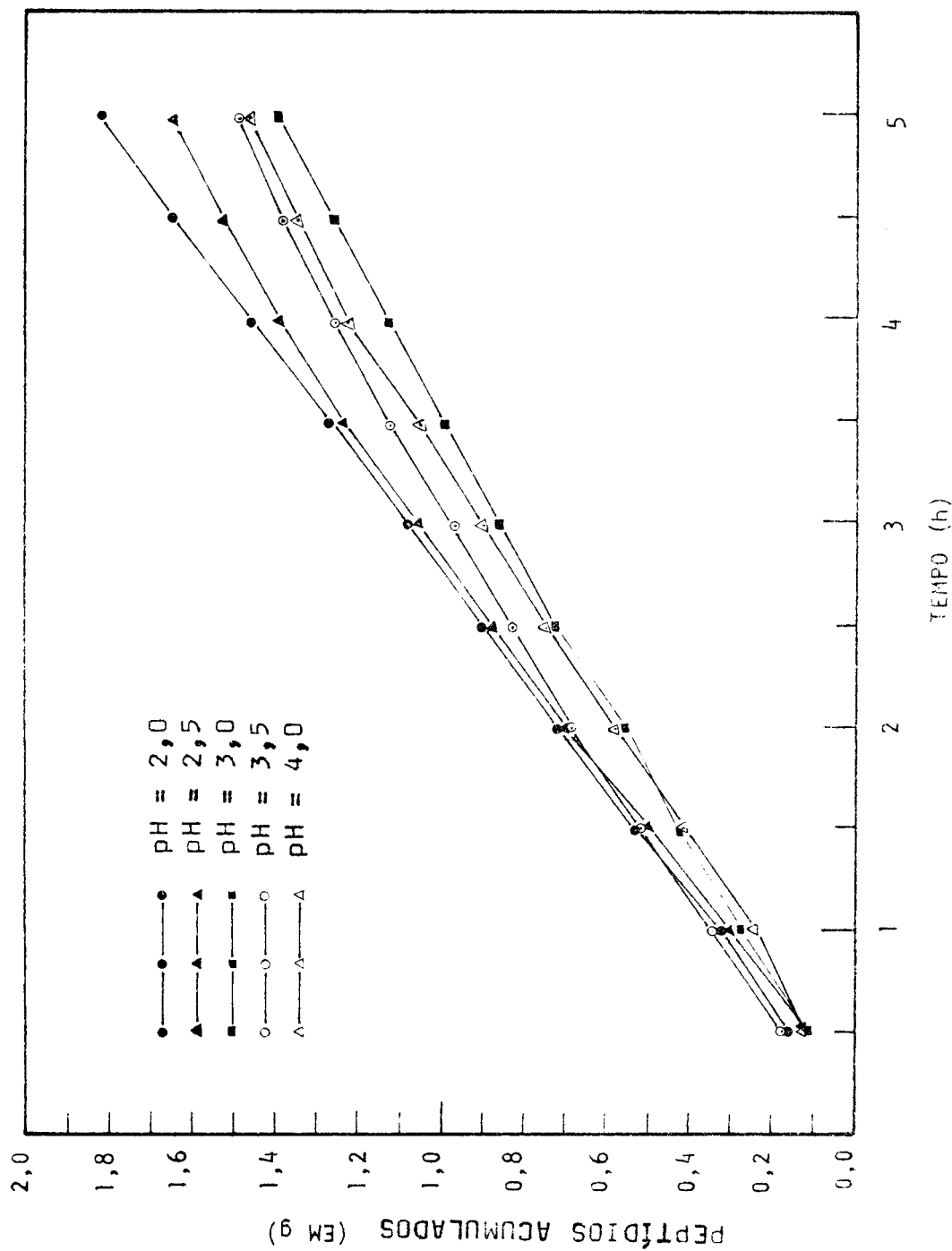


FIG. Nº 14. EFEITO DO pH SOBRE A QUANTIDADE DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS ACUMULADOS ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $t_0 = 50^\circ\text{C} + 2$.
 - $\text{Vacuo} = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

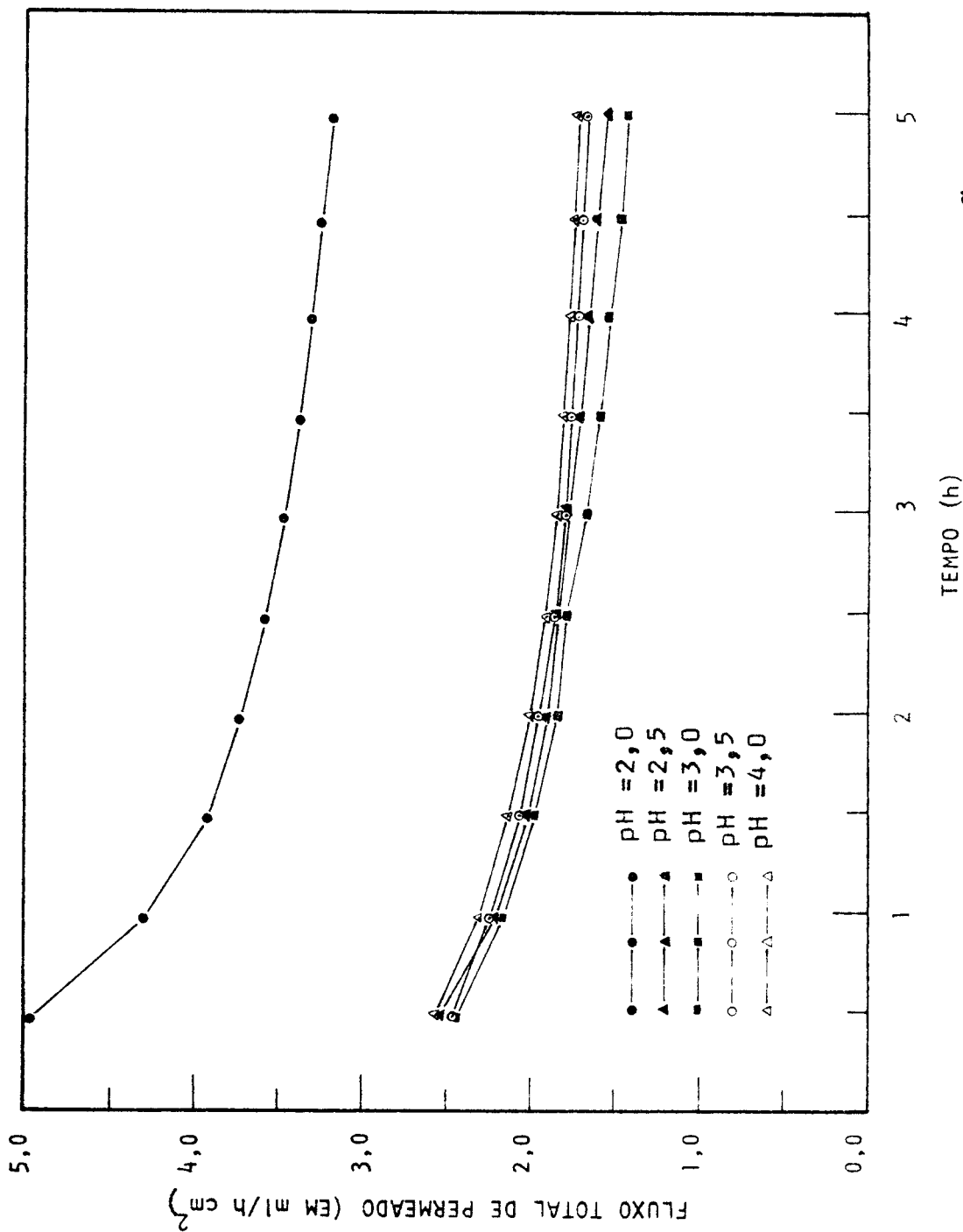


FIG. Nº 15. EFEITO DO pH SOBRE O FLUXO DE PERMEADO TOTAL ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÃO.

Condições do Processo

- $[S] = 2,0\% \left(\frac{p}{v} \right)$.
- $[E] = 2,0\% \left(\frac{p}{p} \right)$ sobre o S.
- $t^{\circ} = 50^{\circ}\text{C} \pm 2$.
- Vacuo = $0,3 \text{ kg/cm}^2$.

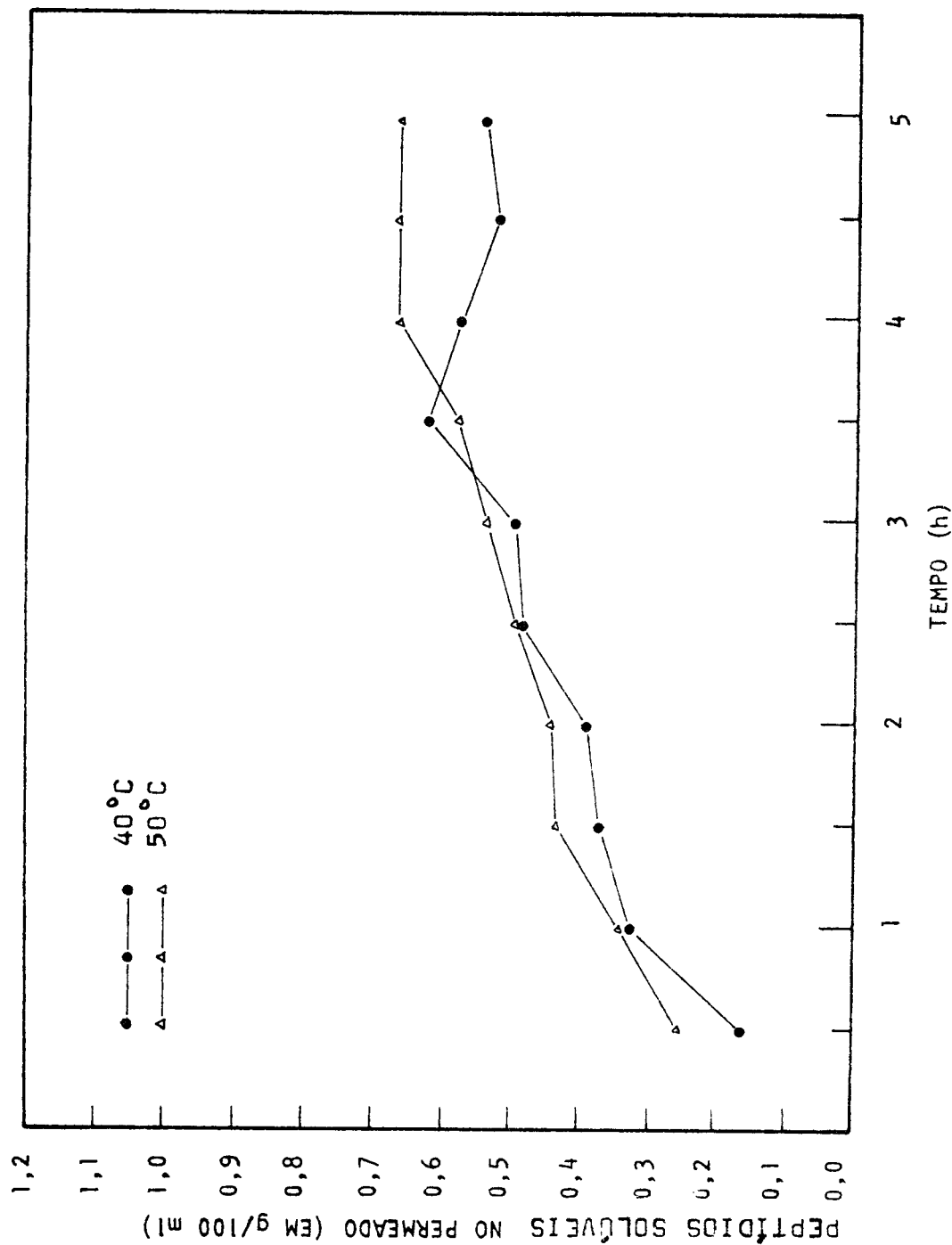


FIG. Nº 16. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS NO PERMEADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - pH = 3,0.
 - Vacuo = 0,3 kg/cm².

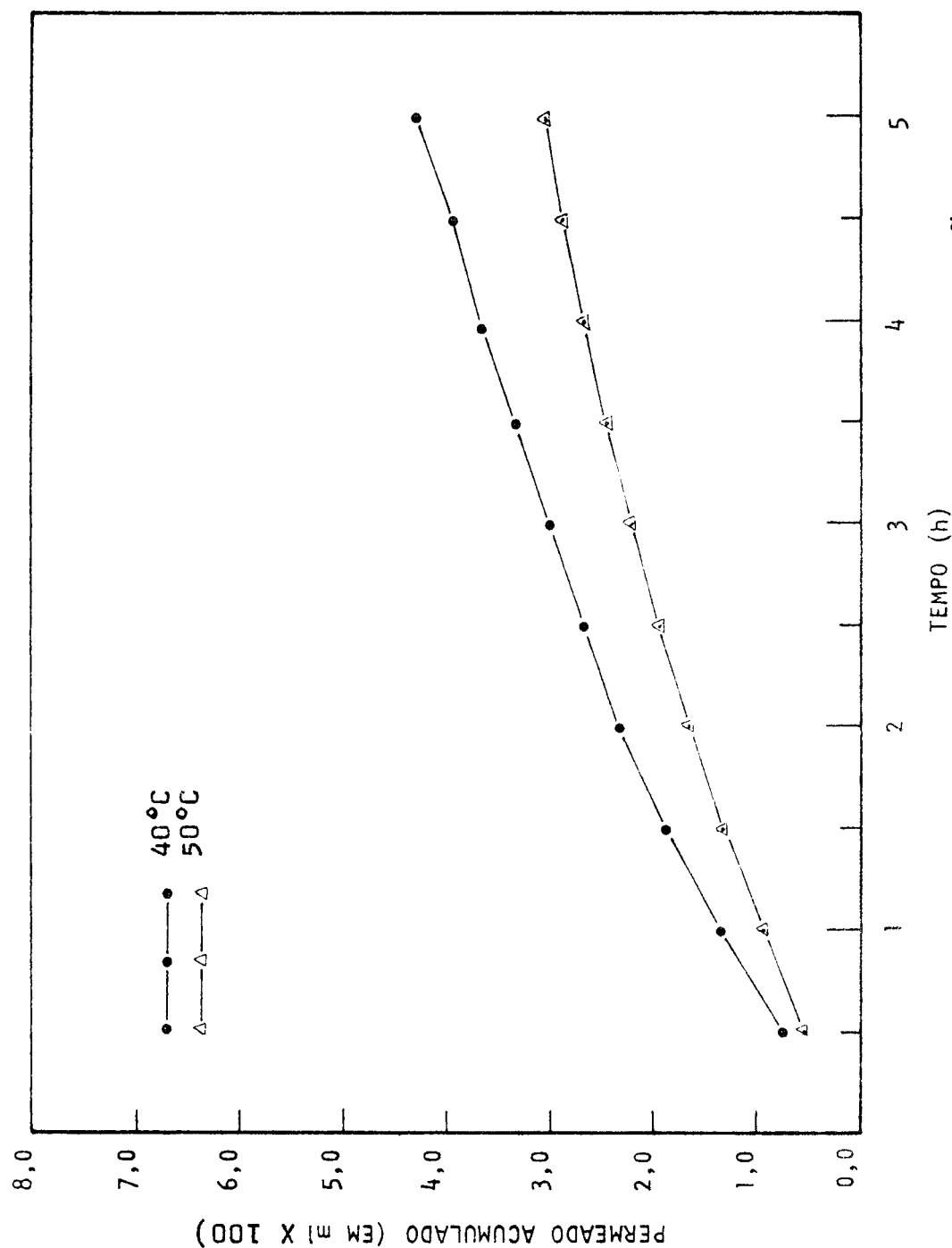


FIG. Nº 17. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A QUANTIDADE DE PERMEADO ACUMULADO ATRÁVES DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - pH = 3,0.
 - Vacuum 0,3 kg/cm².

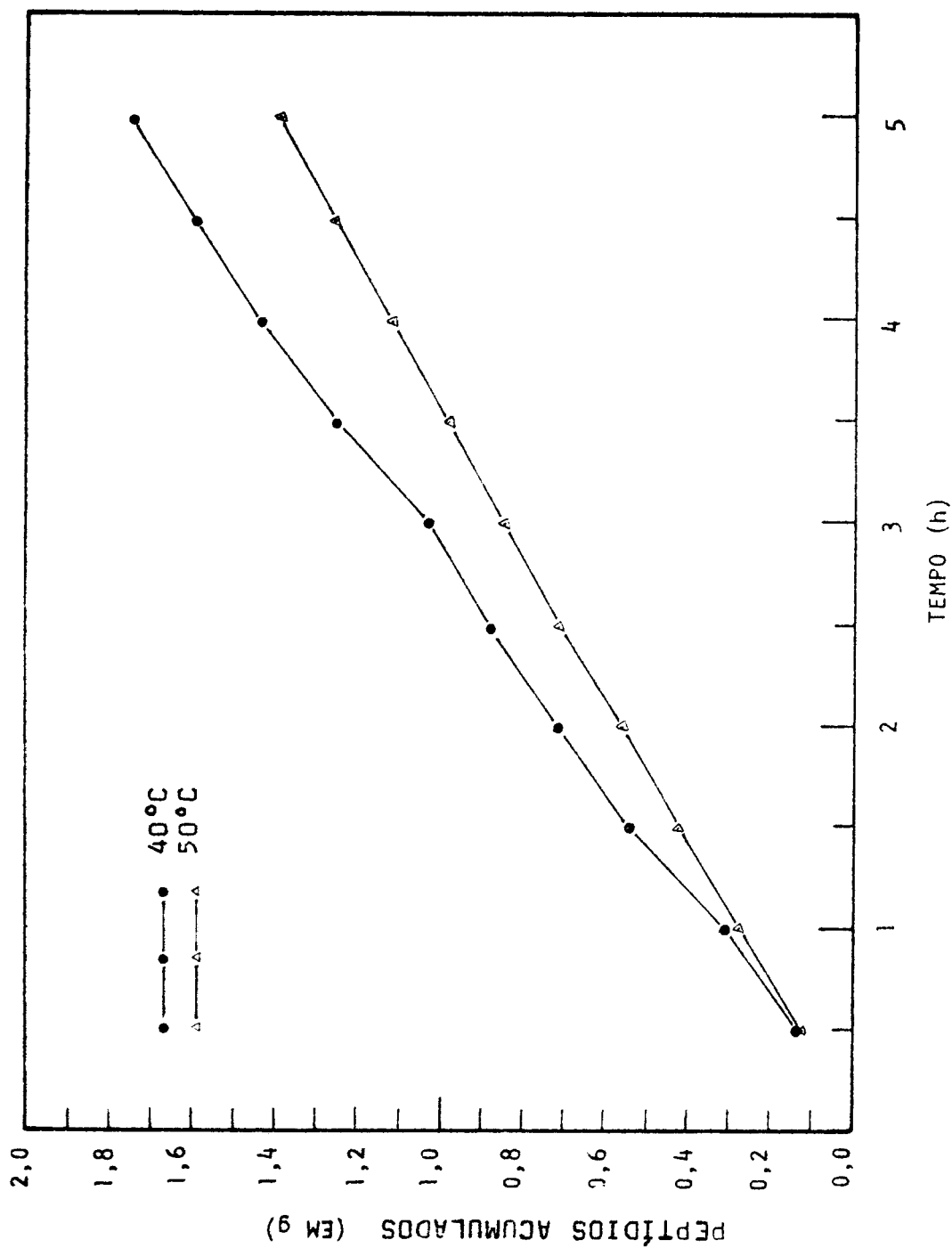
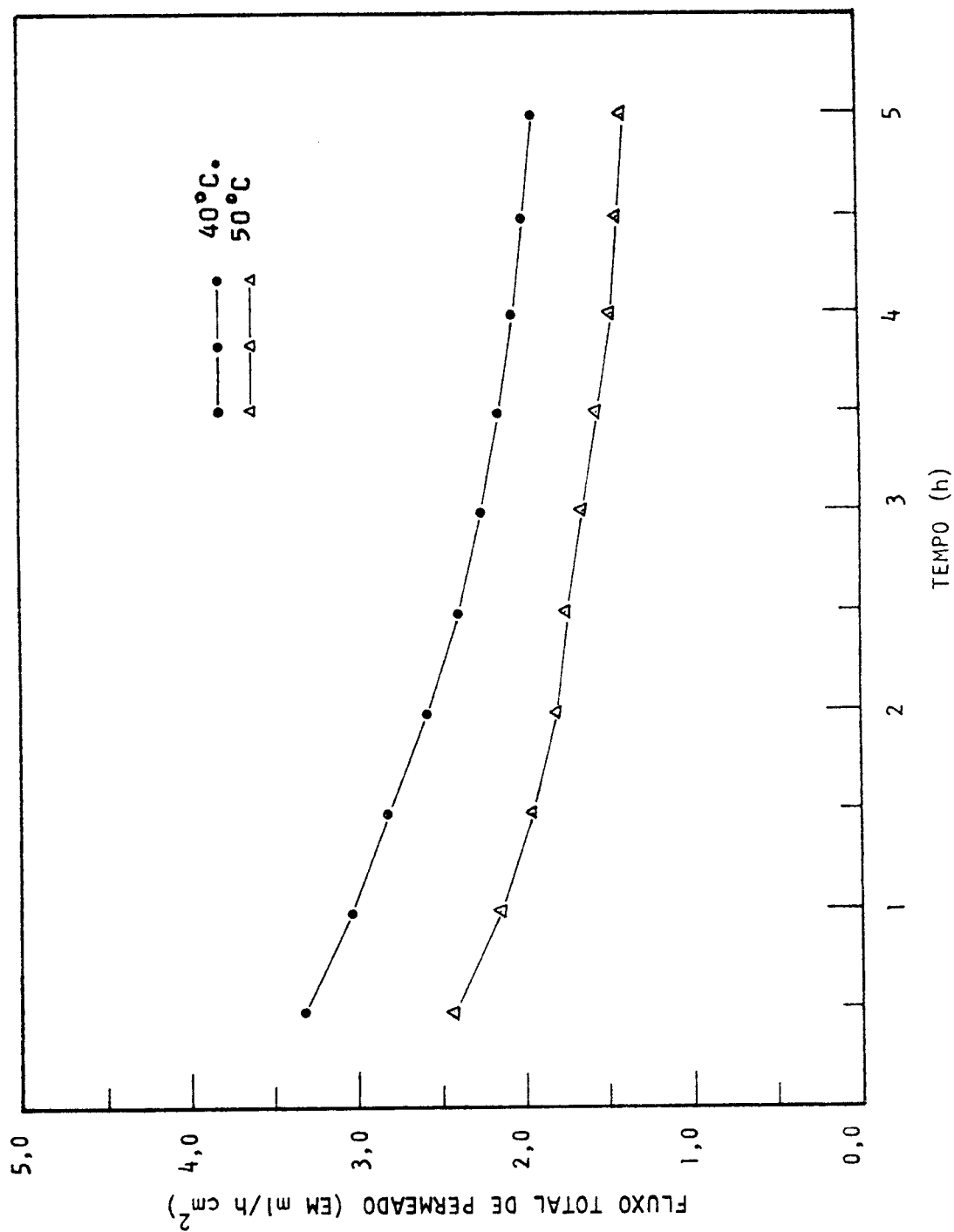


FIG. Nº 18. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A QUANTIDADE DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS ACUMULADOS ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ $\left\{ \frac{p}{v} \right\}$
 - $[E] = 2,0\%$ $\left\{ \frac{p}{p} \right\}$ sobre o S.
 - $\text{pH} = 3,0$
 - $\text{Vacuo} = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.



Condições do Processo

- $[S] = 2,0\%$ $\left\{ \frac{p}{v} \right\}$ sobre o S.
- $[E] = 2,0\%$ $\left\{ \frac{p}{p} \right\}$ sobre o S.
- $pH = 3,0$.
- $Vacuo = 0,3 \text{ kg/cm}^2$.

FIG. Nº 19. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O FLUXO DE PERMEADO TOTAL ATRAVÉS DO TEMPO DE REAÇÃO.

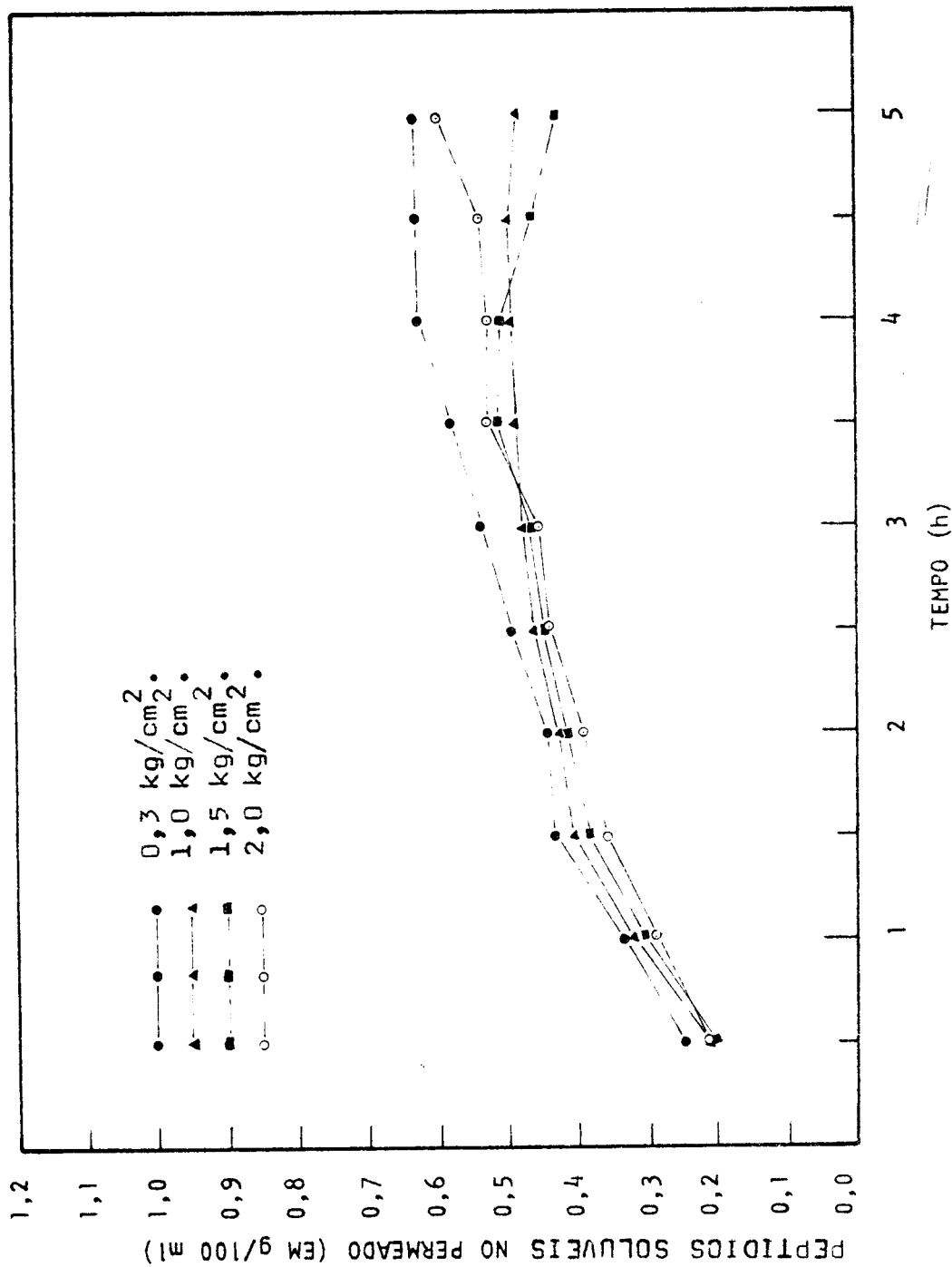


FIG. Nº 20. EFEITO DA PRESSÃO EXERCIDA NO SISTEMA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE PEPTÍDIOS NO LÚMEIS NO PERMEADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do processo
 - [S] = 2,0% (p/v)
 - [E] = 2,0% (p/p) sobre o S.
 - pH = 3,0.
 - $t_0 = 50^{\circ}\text{C} \pm 2$.

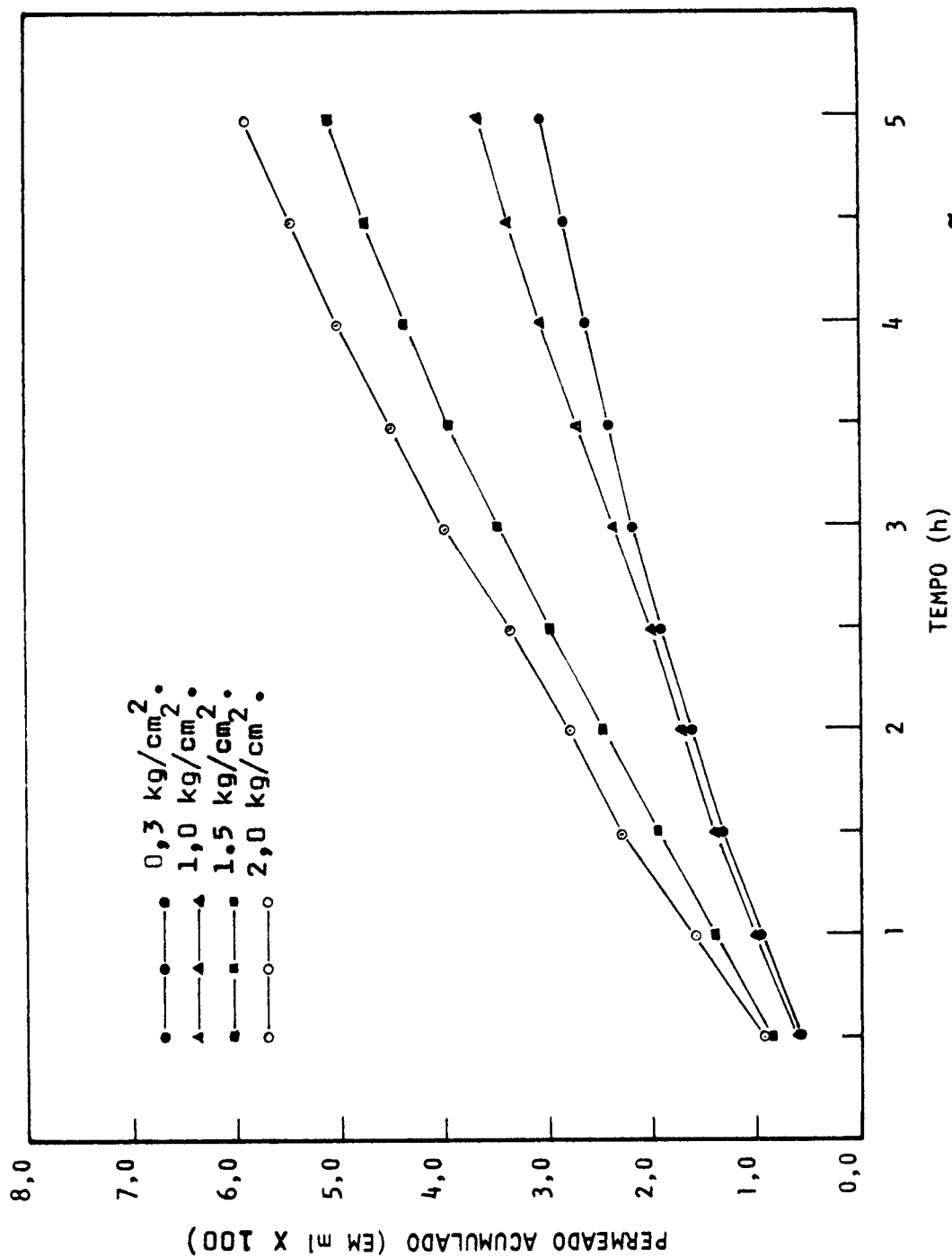


FIG. Nº 21. EFEITO DA PRESSÃO EXERCIDA NO SISTEMA SOBRE A QUANTIDADE DE PEPTÍDIOS SOLÚ VEIS ACUMULADOS ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $\text{pH} = 3,0$.
 - $t^{\circ} = 50^{\circ}\text{C} \pm 2$.

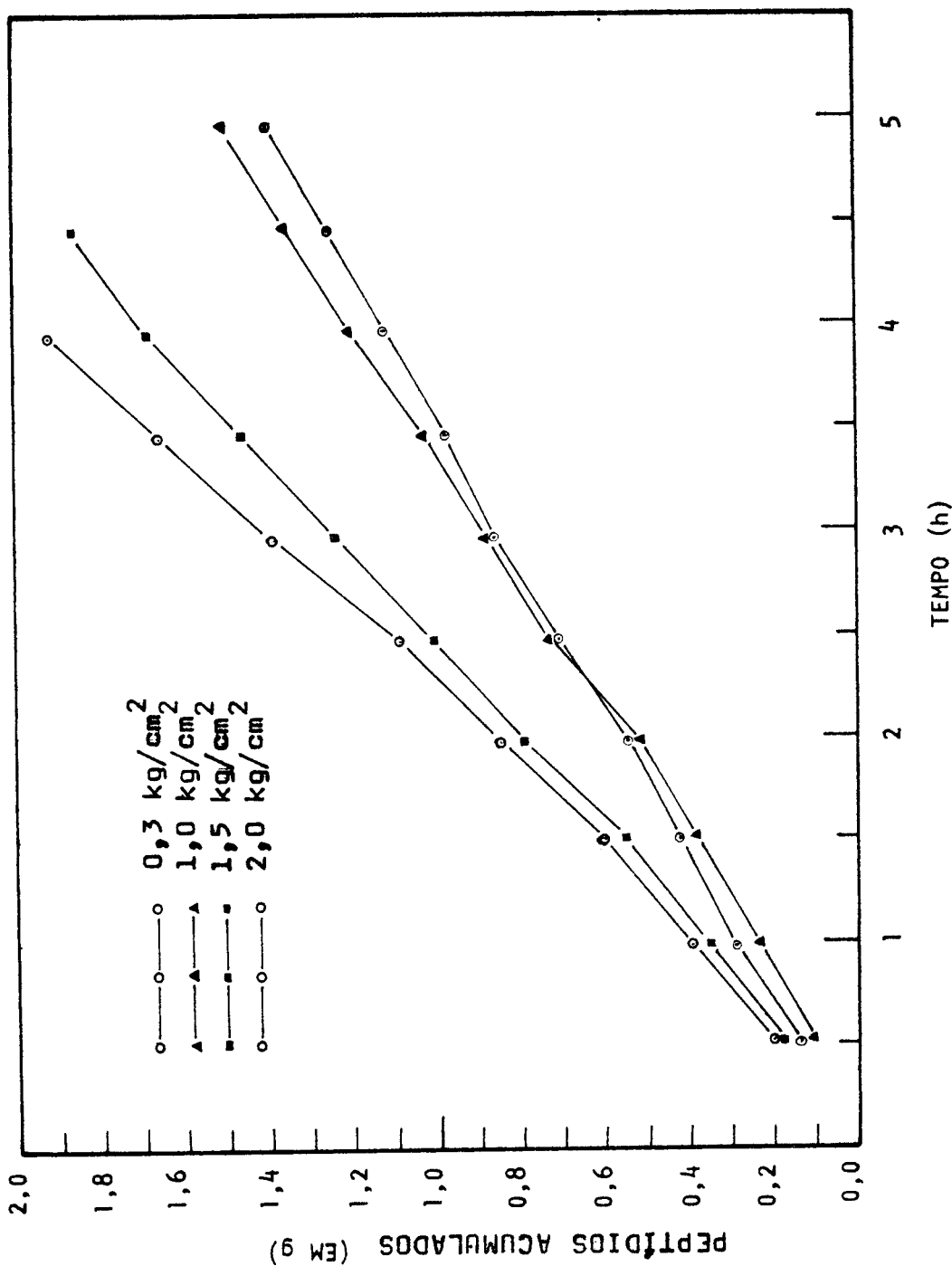


FIG. Nº 22. EFEITO DA PRESSÃO EXERCIDA NO SISTEMA SOBRE A QUANTIDADE DE PEPTÍDIOS SOLÓ DE VEIS ACUMULADOS ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo

- [S] = 2,0% (p/v)
- [E] = 2,0% (p/p) sobre o S.
- pH = 3,0.
- t° = 50°C ± 2°

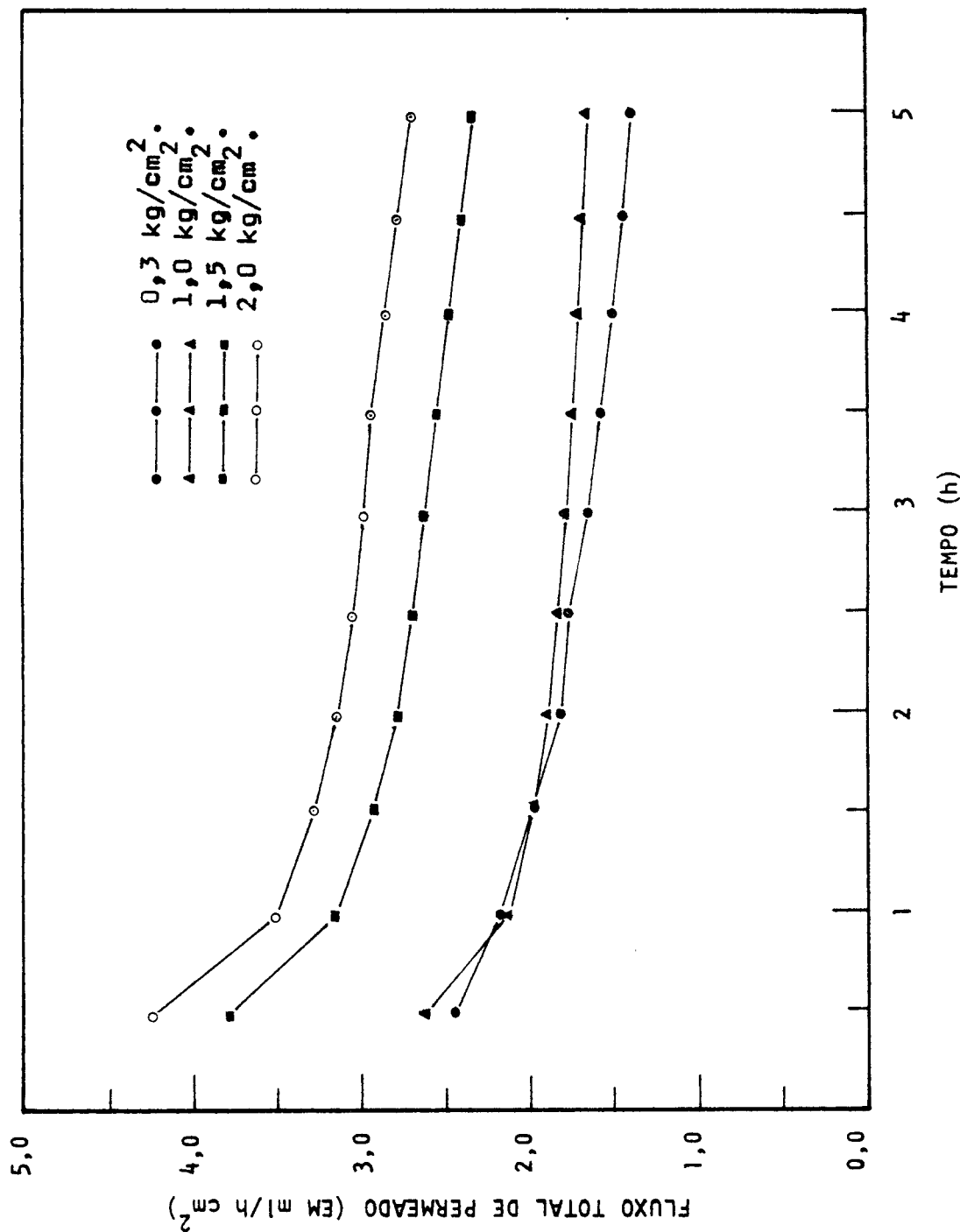


FIG. Nº 23. EFEITO DA PRESSÃO EXERCIDA NO SISTEMA SOBRE O FLUXO DE PERMEADO TOTAL ATRÁS VÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $\text{pH} = 3,0$.
 - $t_0 = 50^\circ\text{C} \pm 2$.

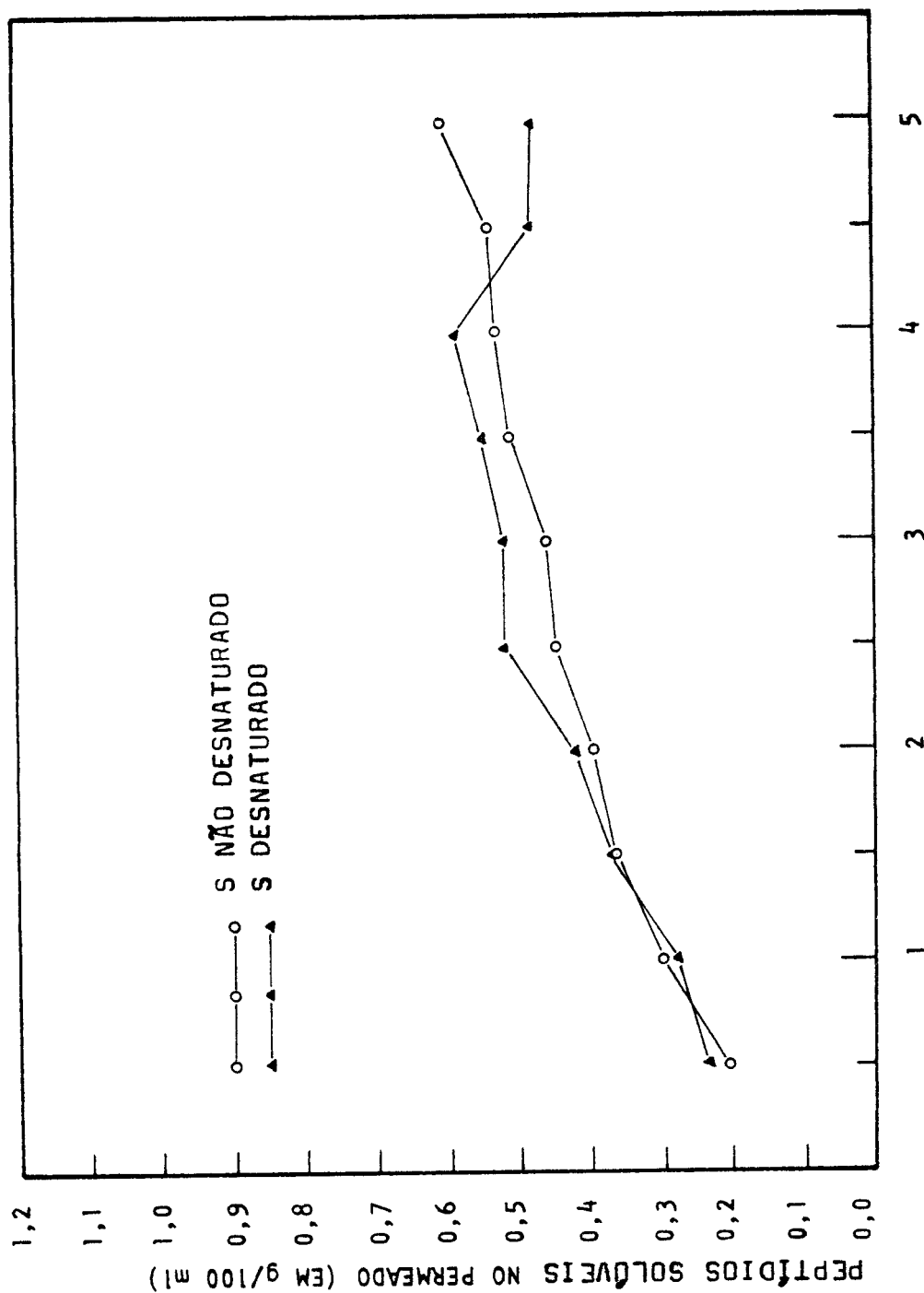


FIG. Nº 24. EFEITO DA DESNATURAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS NO PERMEADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

Condições do processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - pH = 3,0.
 - $t = 50^{\circ}\text{C} \pm 2 \cdot 2$.
 - P = 2,0 kg/cm².

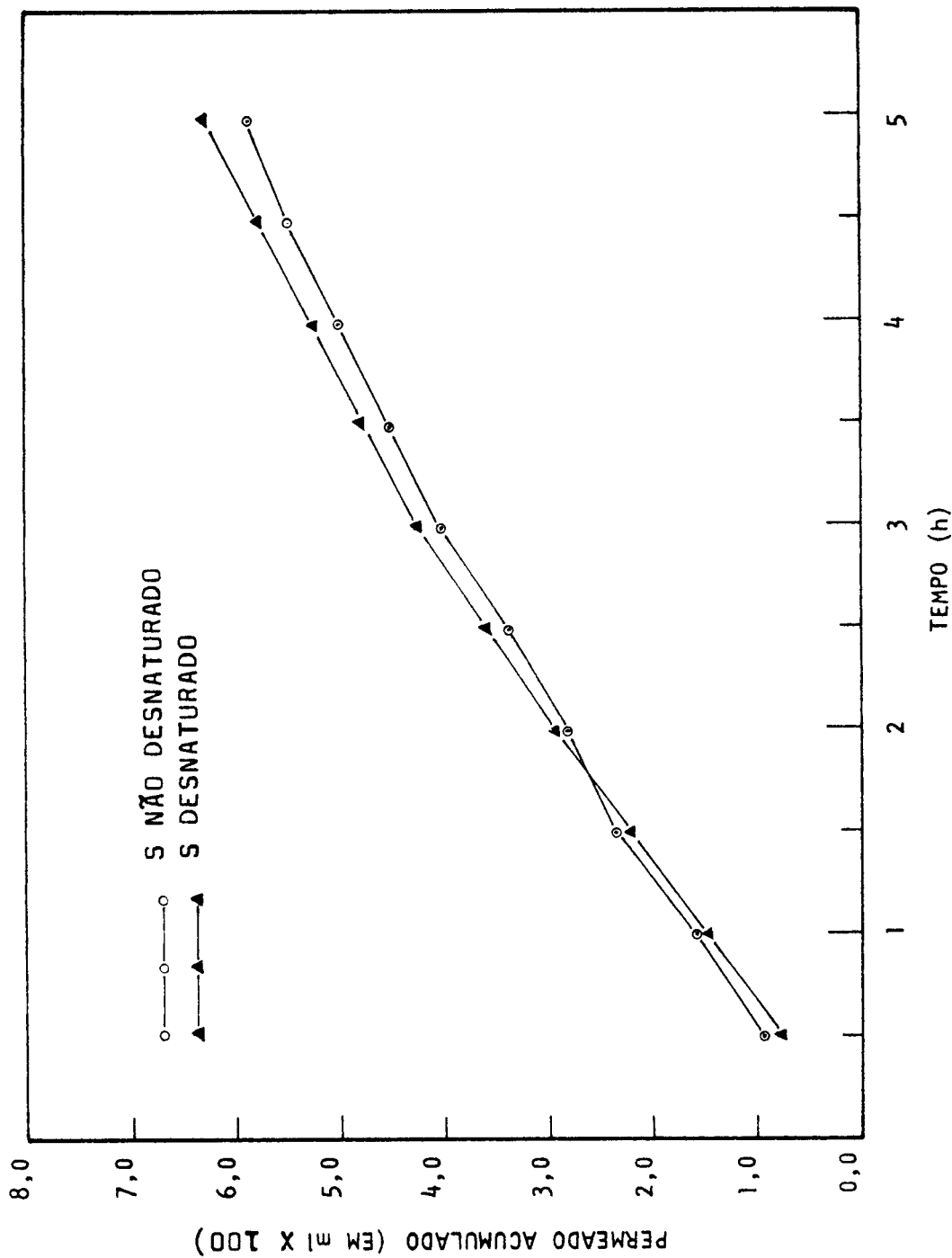
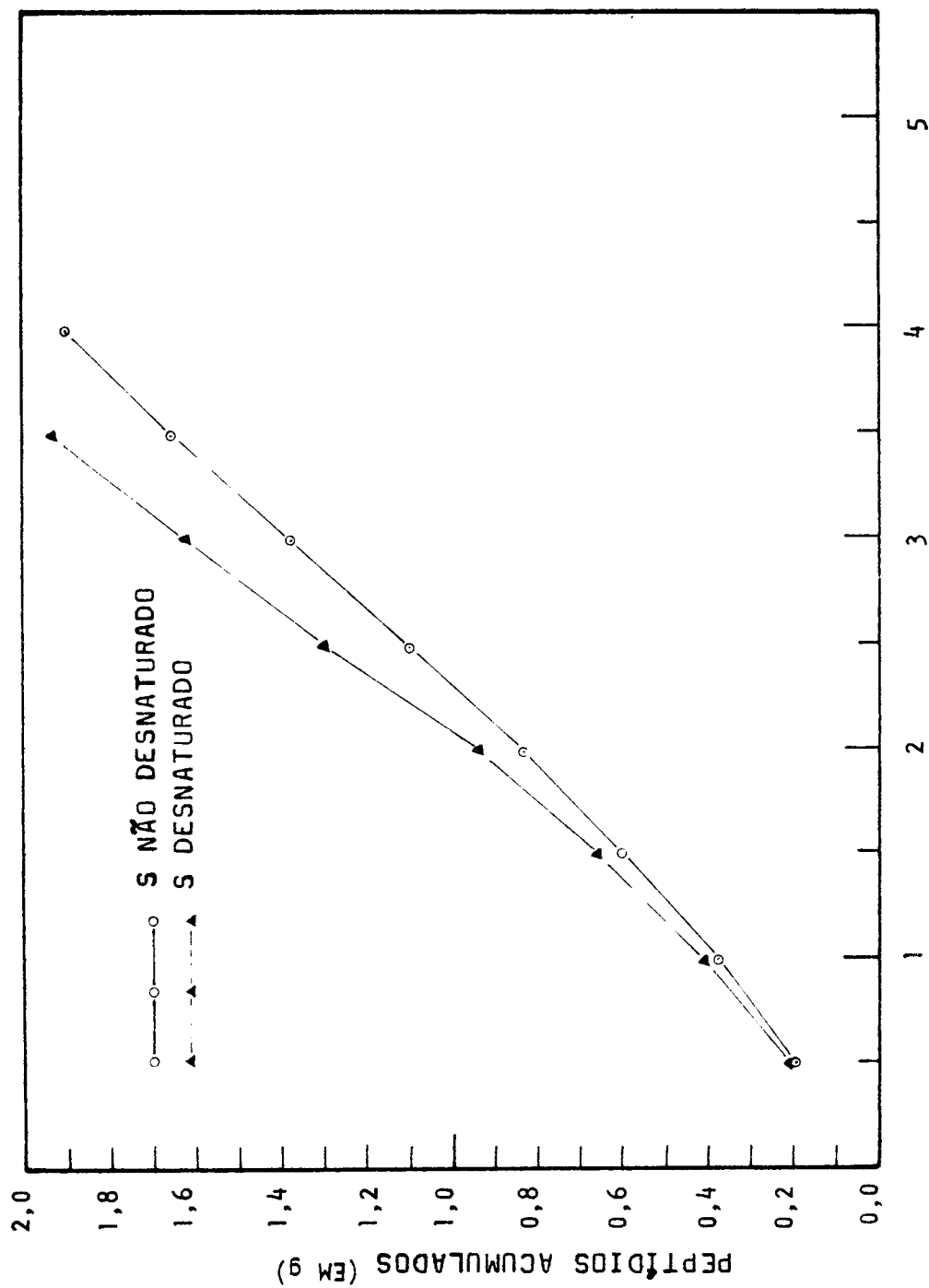


FIG. Nº 25. EFEITO DA DESNATURAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE A QUANTIDADE DE PERMEADO ACUMULADO ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.

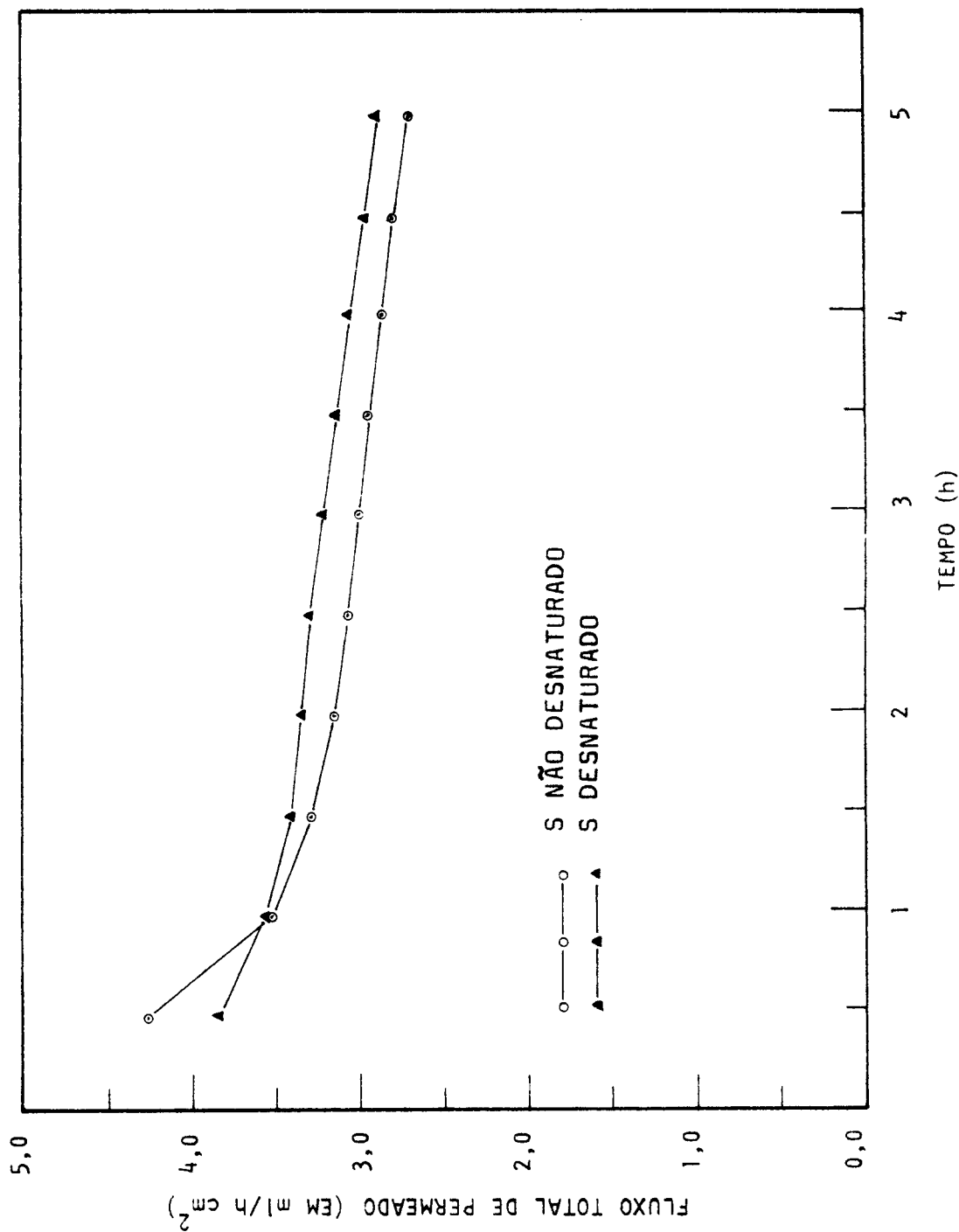
Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\%$ (p/v).
 - $[E] = 2,0\%$ (p/p) sobre o S.
 - $pH = 5,0$.
 - $t_0 = 50^{\circ}C \pm 2.2$.
 - $p = 2,0 \text{ kg/cm}^2$.



Condições do Processo

- $[S] = 2,0\% \left(\frac{p}{v} \right)$.
- $[E] = 2,0\% \left(\frac{p}{p} \right)$ sobre o S.
- $pH = 5,0$.
- $t^{\circ} = 50^{\circ}C \pm 2^{\circ}2$.
- $P = 2,0 \text{ kg/cm}^2$.

FIG. Nº 26. EFEITO DA DESNATURAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE A QUANTIDADE DE PEPTÍDIOS SO LÚVEIS ACUMULADOS ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO.



Condições do Processo
 - $[S] = 2,0\% \left(\frac{p}{v} \right)$.
 - $[E] = 2,0\% \left(\frac{p}{p} \right)$ sobre o S.
 - $pH = 3,0$.
 - $t^0 = 50^{\circ}C + 2 \cdot 2$.
 - $P = 2,0 \text{ kg/cm}^2$.

FIG. Nº 27. EFEITO DA DESNATURAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE O FLUXO DE PERMEACAO TOTAL A-TRAVÉS DO TEMPO DE REACÃO.

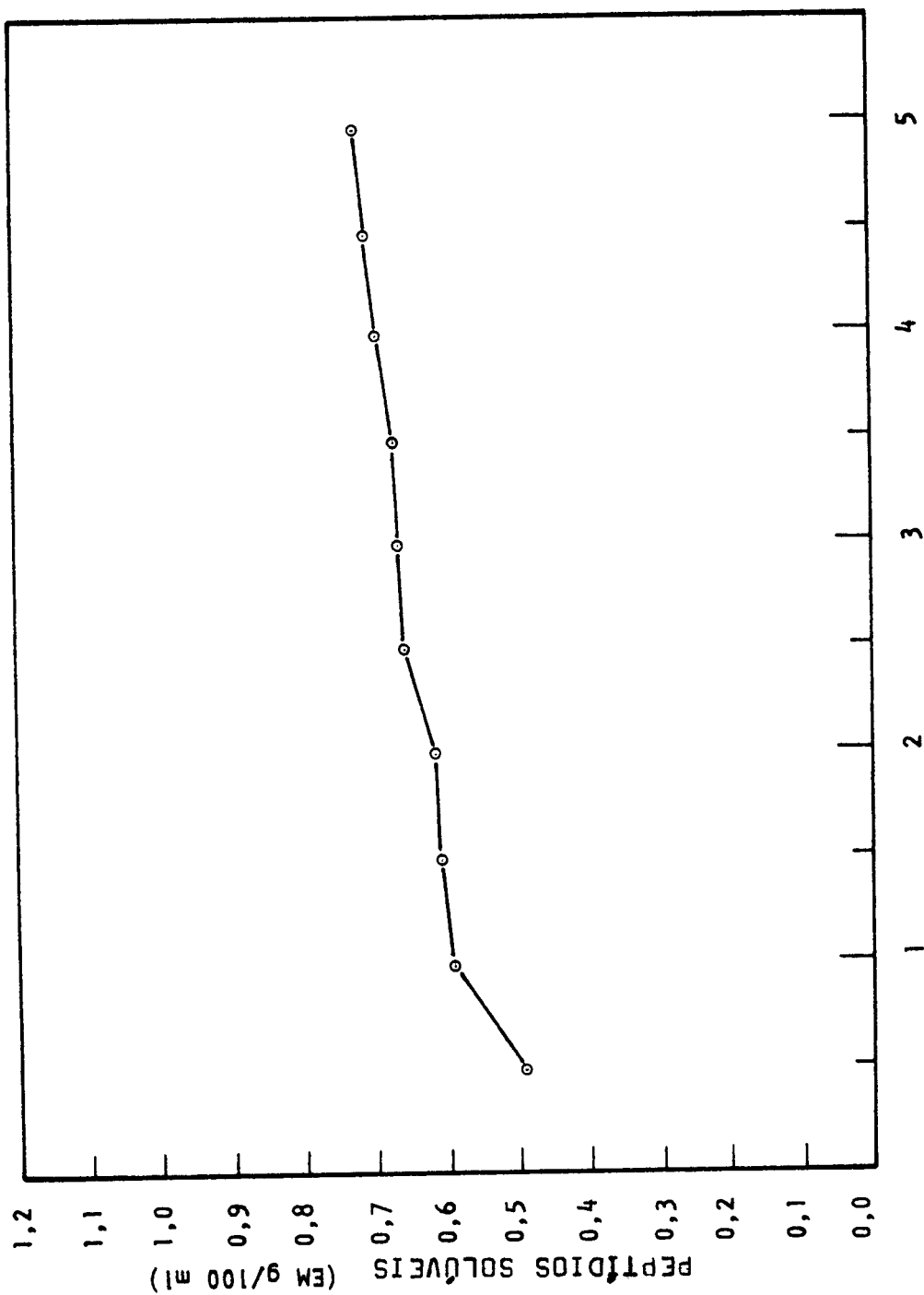


FIG. Nº 28. CONCENTRAÇÃO DE PEPTÍDIOS SOLÚVEIS ATRAVÉS DO TEMPO DE REACÇÃO ENZIMÁTICA EM UM REATOR TIPO "BATCH".

Condições do processo
 - $[S] = 2,0\%$ $\left\{ \begin{matrix} p/v \\ p/p \end{matrix} \right\}$ sobre o S.
 - $[E] = 2,0\%$ $\left\{ \begin{matrix} p/v \\ p/p \end{matrix} \right\}$ sobre o S.
 - $pH = 3,0$.
 - $t^{\circ} = 50^{\circ}C \pm 2$.

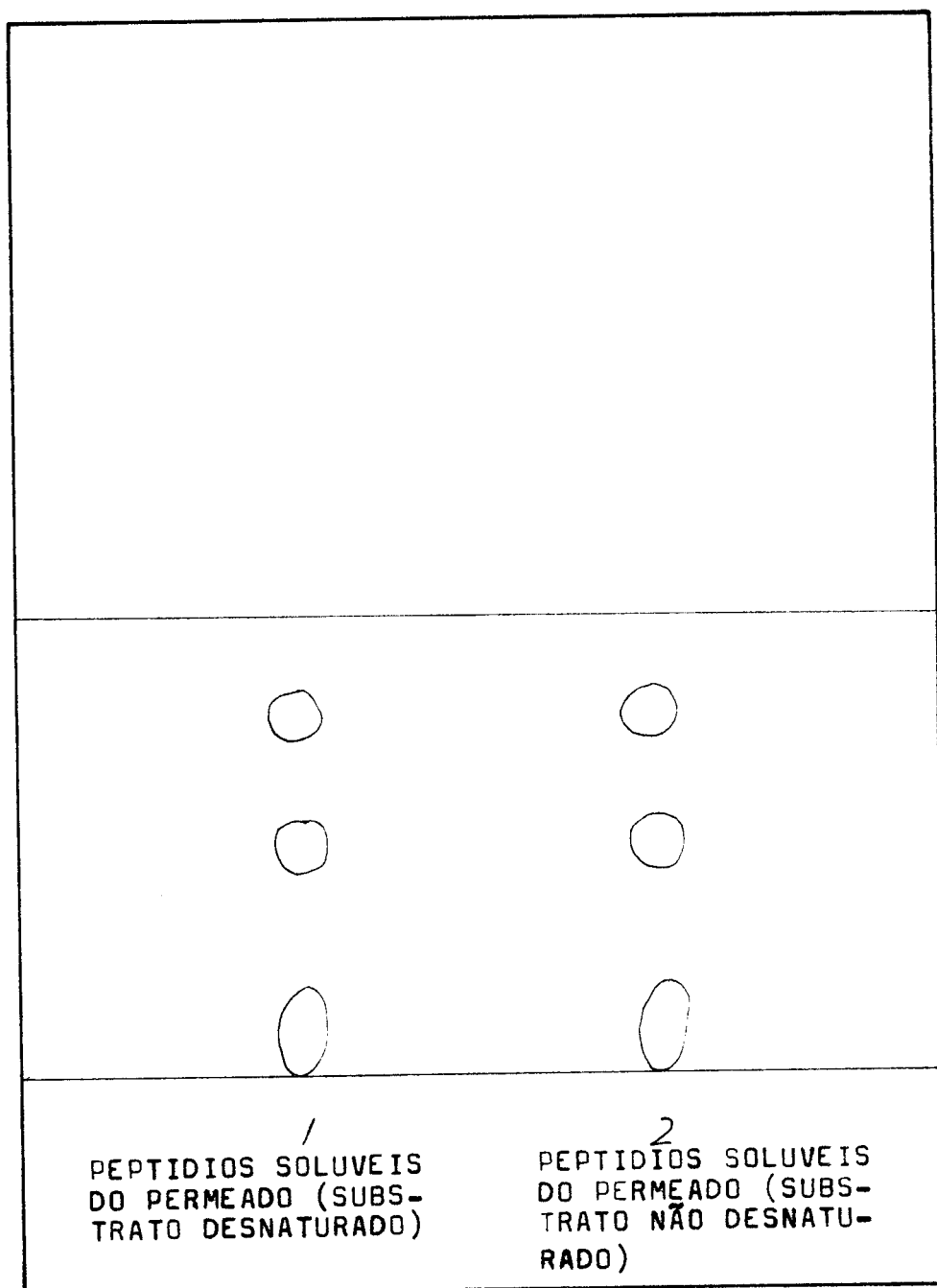


FIG: Nº 29. CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDIOS SOLUVEIS DO PERMEADO.

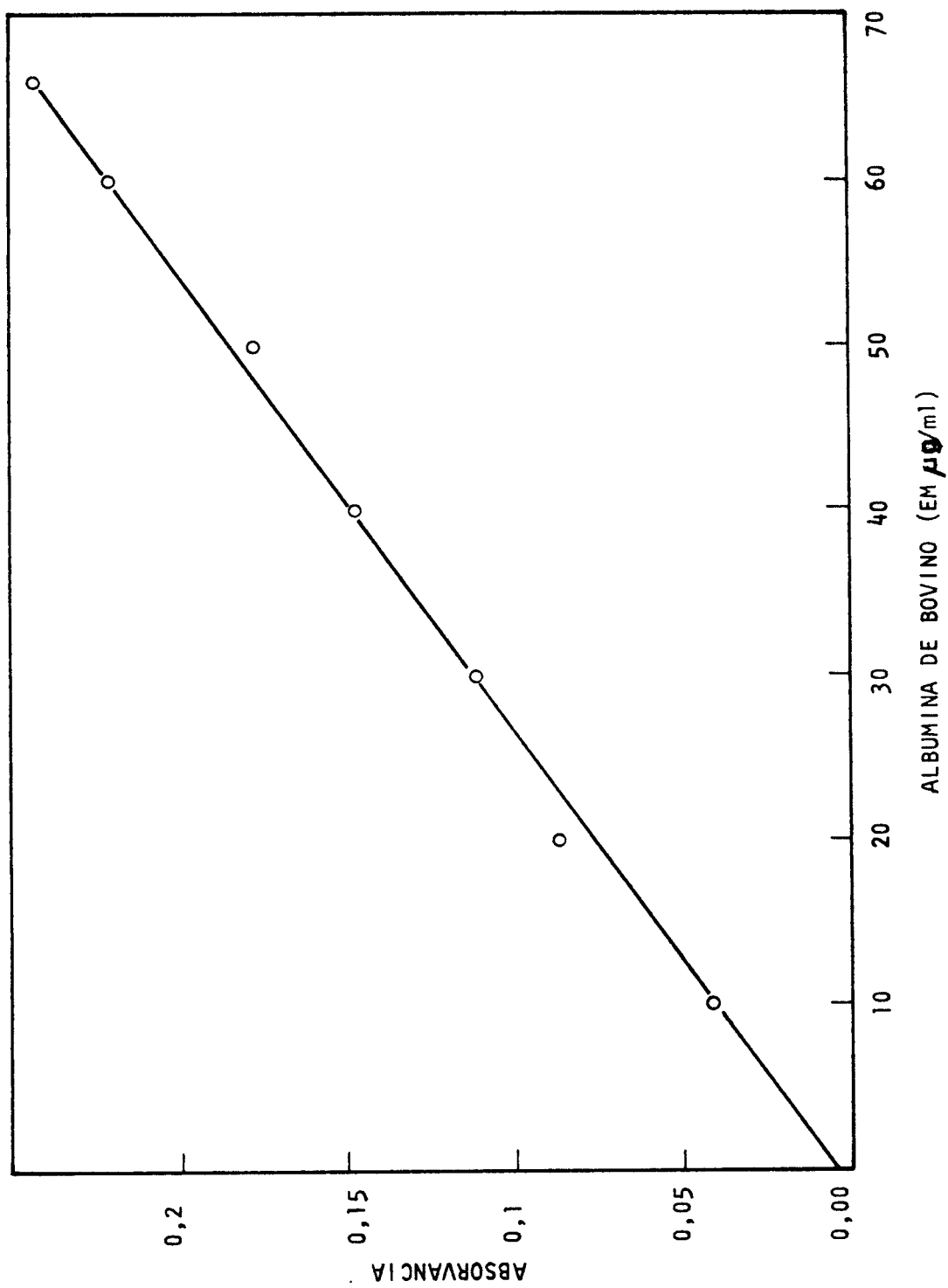


FIG. Nº 30. CURVA PADRÃO.
 μg DE ALBUMINA DE BOVINO VS. ABSORVÂNCIA A 750 $\text{m}\mu$
 (TRATADA PELO MÉTODO DE LOWRY, 1951)

6. CONCLUSÕES.

O presente estudo demonstrou que é possível realizar a solubilização do isolado de proteínas de soja em um sistema contínuo, obtendo-se resultados muito melhores que a través de uma reação enzimática tipo "batch".

Em relação às melhores condições de reação, para a solubilização enzimática do isolado de proteínas da soja em um sistema contínuo por meio de ultrafiltração, pode-se concluir que, algumas delas, estão intimamente ligadas às condições ideais de reação da enzima, como o são o pH e a temperatura; de tal forma que o pH ideal da enzima é entre 2,5 e 3,0, e a temperatura cerca de 50 C. Por outro lado, as concentrações de substrato e enzima recomendadas, tomando-se por base a concentração obtida de peptídios solúveis no permeado e o fluxo de permeado total, seriam de 1,0% (p/v) e 4,0% (p/p) sobre o substrato, respectivamente.

Comprovou-se que para este sistema é melhor exercer pressões positivas do que utilizar pressões negativas (vácuo), já que o rendimento do produto final, peptídios solúveis (g acumulados), é superior nos processos em que se trabalha com pressões positivas, ou seja, superiores a 1,0 kg/cm².

Com o emprego do substrato desnaturado pode-se obter um rendimento maior dos peptídios solúveis acumulados em relação ao total de substrato alimentado ao sistema durante reação, ou, em outras palavras, uma actividade enzimática maior e consecuentemente, uma maior concentração dos peptí

dios solúveis no permeado, assim como um maior fluxo do permeado.

Os peptídios existentes no permeado obtido com põem apenas tres frações protéicas, utilizando-se o metodo de fracionamento anteriormente descrito, as quais possuem um peso molecular inferior a 10 000.

7. LITERATURA CITADA.

01. A.O.A.C. 1965. Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemist. Washington, D.C. 10th.
02. ARAI, S., YAMASHITA, M., KATO, H. and FUJIMAKI, M.1970a. Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. 5. A Nondialyzable Bitter Peptide in Peptic Hydrolyzate of Soybean Protein and Its Bitterness in Relation to the Chemical Structure. Agr. Biol. Chem. 34. 729-738.
03. ARAI, S., YAMASHITA, M., KATO, H. and FUJIMAKI, M.1970b. Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. 7. Properties of Soy Protein Treated with Microbial Acid Protease (Molsin). Agr. Biol. Chem. 34 . 1338-1345.
04. CHEFTEL, C., AHERN, M., WANG, D. I. C. and TANNENBAUM, S. R. 1971. Enzymatic Solubilization of Fish Protein Concentrate : Batch Studies Applicable to Continuous Enzyme Recycling Processes. J. Agr. Food Chem., vol. 19, nº 1. 155-161.
05. CHIAN, E. S. K. and SELLDORF, J. T. 1969. Ultrafiltration of Biological Materials. Process Biochemistry. September. 47-51.
06. CIRCLE, S. J. and SMITH, A. K. 1972. Processing Soy Flours, Protein Concentrates, and Protein Isolates. Soybeans : Chemistry and Technology. Smith and Circle. vol. 1. Protein. Chap. 9. 319-320. The Avi Publishing Company, Inc.

07. COLOWICH, S. P. and KAPLAN, N. D. 1970. Acid Proteinase From Rhizopus chinensis. Methods in Enzymology. vol. XIX. Ed. by Permann, G. E. and Lorand, L. Academic Press. 391-397.
08. COPPOCK, J. B. M. 1970. Chem. Ind. 292-296.
09. FUJIMAKI, M., KATO, H., ARAI, S. and TAMAKI, E. 1968a. Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. 1. Proteolytic Enzyme Treatment of Soybean Protein and Its Effect on the Flavor. Food Technology. 22. 889-893.
10. FUJIMAKI, M., YAMASHITA, M., OKAZAWA, Y. and ARAI, S. 1968b. Dispersible Bitter Peptides in Pepsin Hydrolyzate of Soybean Protein. Agr. Biol. Chem. 32. 794-795.
11. FUJIMAKI, M., YAMASHITA, M., OKAZAWA, Y. and ARAI, S. 1970. Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. 3. Diffusible Bitter Peptides and Free Amino Acids in Peptidic Hydrolyzate of Soybean Protein. J. Food Sci. 35. 215-218.
12. FORBES, F. 1970. Ultrafiltration Processing. Chemical and Process Engineering. December. 49-55.
13. FORBES, F. 1972. Considerations in the Optimisation of Ultrafiltration. The Chemical Engineer. January. 29-34.
14. FUKUMOTO, J., TSURU, D. and YAMAMOTO, T. 1967. Agr. Biol. Chem. 31. 710.

15. GUERRA, M. J. 1974. Estudo das Propriedades Físico-Químicas das Proteínas do Gergelim (Sesamum indicum, L.). Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos Da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência em Tecnologia de Alimentos.
16. HALE, M. B. 1969. Relative Activities of Commercially-Available Enzymes in the Hydrolysis of Fish Protein. Food Technology. vol. 23. nº 1. 107-110.
17. HASEGAWA, K., KUSANO, T., MITSUDA, H. 1963. Agr. Biol. Chem. 27. 878.
18. LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193. 265-275.
19. MORETTI, R. H. 1973. Contribuição ao Estudo do Fracionamento de Soro de Queijo por Ultrafiltração. Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.
20. MURRAY, T. K. and BAKER, B. E. 1952. Studies on Protein Hydrolysis. 1. Preliminary Observations on the Taste of Enzymic Protein - Hydrolisates. J. Sci. Food Agr. 3. 440-475.
21. "NAGASE" ENZYME. 1974. Catálogo Técnico. Denapsin.

22. NASH, A. M., WOLF, W. J. 1967. Cereal Chem. 44. 183.
23. NOGUCHI, M., ARAI, S., KATO, H., and FUJIMAKI, M. 1970. Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. 2. Effect of Aspergillopeptidase-A Preparation on removal of Flavor from Soybean Products. J. Food Sci. 35. 211-214.
24. PORTER, M. C. and MICHAELS, A. S. 1971. Food Prod. Develop. 5. 64-67.
25. RANDERATH, K. 1968. Thin Layer Chromatography. Second Edition. Academic Press. New York and London.
26. ROOZEN, J. P. and PILNIK, W. 1973. Ultrafiltration Controlled Enzymatic Degradation of Soy Protein. Process Biochemistry. July. 24-25.
27. SEN, D. P., SRIPATHY, N. V., LAHIRY, N. L., SREENIVASAN, A. and SUBRAHMANYAN, V. 1962. Fish Hydrolysates. I. Rate of Hydrolysis of Fish with Papain. Food Technology. May. 138-141.
28. SRIPATHY, N. V., SEN, D. P., LAHIRY, N. L., SREENIVASAN, A. and SUBRAHMANYAN, V. 1962. Fish Hydrolysates. II. Standardization of Digestion Conditions for Preparation of Hydrolysates Rich in Peptides and Proteoses. Food Technology. May. 141-142.
29. SUGIMOTO, H., VAN BUREN, J. P. and ROBINSON, W. B. 1971. An Enzymatic Process for a Protein-Containing Beverage Based on Soybean Protein and Lemon Juice. J. of Food Sci. vol. 36. 729-731.

30. TSURU, D., HATTORI, A., JSUJI, H., YAMAMOTO, T. and FUKUMOTO, J. 1969. Agr. Biol. Chem. 33. 1419.
31. VAN DE KAMER, J. H. and VAN FUIKEL, L. 1952. Rapid Determination of Crude Fiber in Cereals. Cereal Chem. 29. 239-251.
32. VERMA, S. C. and MCCALLA, A. G. 1966. Enzymatic Hydrolysis of Dispersed Wheat Gluten. Cereal Chem. 43. 28-34.
33. WEBER, K. and OSBORN, M. 1969. The Reability of Molecular Weight Determination by Dodecyl Sulfate Polyacrilamida Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 (16). 4406-4412.
34. WHITAKER, J. R. 1971. An Introduction to Enzymology. University of California. Davis. U.S.A.
35. WOLF, W. J. and BRIGGS, D. R. 1959. Arch. Biochem. Biophys. 85. 186.
36. WOLF, W. J., SLY, D. A., BABCOCK, G. E. 1964. Cereal Chem. 41. 328.
37. WOLF, W. J. and TAMURA, T. 1969. Cereal Chem. 46. 331.
38. WOLF, W. J. 1970. Soybean Proteins : Their Functional , Chemical and Physical Prooporties. J. Agr. Food Chem. vol. 18. n^o 6. 969-976.
39. YAMASHITA, M., ARAI, S. and FUJIMAKI, M. 1969. Applying Proteolytic Enzymes on Soybean. 4. A Ninhydrin-Negative Bitter Peptide in Peptic Hydrolysate of Soybean Protein. Agr. Biol. Chem. 33. 321-330.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece sinceramente ao Professor Doutor Roberto Hermínio Moretti por sua orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor André Tosello, diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

À Organização dos Estados Americanos.

Aos amigos Mário e Miriam Cunha pela tradução da tese.

A meu amigo e colega Ramón Hinojosa.

Aos professores, companheiros e colegas, e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.