

PROTEÓLISE DO RESÍDUO DO EXTRATO

HIDROSSOLÚVEL DE SOJA

15/85

PROTEOLISE DO RESÍDUO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL

DE SOJA

Paquer

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Walter Augusto Ruiz
e aprovada pela Comissão Julgadora em
12.09.85. Campinas, 12 de Setembro de 1985.*

Jaime Yaf
Presidente da Banca

POR

WALTER AUGUSTO RUIZ

Tese Apresentada para Obtenção do
Título de Doutor em
Ciências de Alimentos

Dr. Jaime Amaya Farfan
Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas

1985

A

Marta Maria e Tássia Alicia,
as maravilhas do meu mundo

Meu reconhecimento ao carinho, fê e esperança

de meus Pais

José Augusto Cabredo

Elena Ruiz Paiva

e irmãos

José, Alicia, Marlene e Fredy

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos a:

Professor Dr. Jaime Amaya-Farfan, pela orientação do trabalho.

Fundação Universidade do Rio Grande-RS (FURG) pelo auxílio e facilidades concedidas.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.

Eng^o Carlos Donida, Olvebra S.A. Indústria e Comércio, pela cessão do "Protideal" e do Extrato Hidrossolúvel de Soja.

Dr. J. Adler-Nissen, Novo Industri-Denmark, pela cessão da enzima Alcalase 0,6L.

Laboratórios Okochi Ltda. - São Paulo pela cessão da enzima Denapsina-10P.

Dr. J.W. Finley, Universidade de Iowa-USA, pela cessão do padrão lisinoalanina.

Professores: Valdemiro C. Sgarbieri, Frederick C.Strong III, Ruth dos Santos, Maria A.C. Moraes, Débora Q. Tavares, Emilio S. Contreras, Norma M. Contreras, Ramón Hinojosa, Regina B. Franco, Eliana B. Furlong, J. Fernando Durigan, Tânia Guimarães e Marisa G. Madernell pela colaboração e amizade.

Ao pessoal técnico pela prestimosa colaboração, da FEAA: Rosana Manzo, Luciene Venturelli, Cristina B. Ferreira e Elci S. Hossri; da FURG: Rudiney M. Ribeiro e Luiz R. Ferro e da PUCC: Silvana A. Cavotto e Kátia R.S. Lima.

Associação Brasileira de Indústrias de Alimentação ABIA pelo subsídios de cópias do trabalho.

ÍNDICE

Pág.

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMO	xvii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Extrato Hidrossolúvel de Soja	5
2.1.1 Processos de Obtenção	5
2.1.2 Composição Química	7
2.1.3 Valor Nutritivo	10
2.1.4 Formulações Comerciais com Base no Extrato Hidrossolúvel de Soja	12
2.2 Sub-produto do Extrato Hidrossolúvel	14
2.2.1 Processos de Obtenção	14
2.2.2 Composição Química	15
2.2.3 Propriedades Nutricionais	16
2.2.4 Produtos Formulados	19
2.3 Modificação Enzimática de Produtos Proteícos	19
2.3.1 Matérias-Primas Utilizadas	20
2.3.2 Enzimas Proteolíticas Usadas na Produção de Hidrolisados	22
2.3.3 Processos Utilizados na Obtenção de Hidro lisados Enzimáticos das Proteínas da Soja	27
2.4 Propriedades Nutricionais do Hidrolisado Proteí co	36
2.5 Aplicação dos Hidrolisados Enzimáticos	39

3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Matéria-prima	42
3.2 Caracterização Granulométrica do RES	42
3.3 Caracterização Proximal do RES	44
3.4 Determinação do Índice de Solubilidade de Nitro <u>g</u> <u>ê</u> nio (NSI)	44
3.5 Determinação do Índice de Dispersibilidade Pro <u>te</u> <u>i</u> ca (PDI)	44
3.6 Obtenção do Resíduo Desengordurado RESD	45
3.7 Determinação das Atividades Enzimáticas	45
3.7.1 Determinação do Nitrogênio Total ($N_T\%$) das Enzimas	45
3.7.2 Preparo de uma Curva-padrão de Tirosina.....	46
3.7.3 Atividade Enzimática da Pepsina	46
3.7.4 Atividade Enzimática da Papaína	47
3.7.5 Atividade Enzimática da Denapsina-10P	48
3.8 Métodos para Determinar o Grau de Hidrólise (GH%) ...	48
3.8.1 Purificação do Ác. Trinitrobenzensulfônico	48
3.8.2 Determinação dos Grupos Amino Livres pe lo Método do TNBS	49
3.8.3 Procedimentos para Determinar o Grau de Hidrólise com o TNBS	49
3.8.4 Determinação do GH% pelo Método da Titu- lação em Formaldeído ($H_F\%$)	50
3.8.5 Determinação do GH% Mediante a Reação da Ninidrina	51
3.8.6 Determinação do GH% com a Reação de Lowry ...	51

3.9 Hidrólise Enzimática do Resíduo Desengordurado	51
3.9.1 Ensaio para Determinar a Relação Enzima/ Substrato (E/S)	51
3.9.2 Efeitos da Temperatura, pH e Tempos de Hidrólise	53
3.9.3 Hidrólise Enzimática do Resíduo Desengor- durado (RES _D) com Diferentes Enzimas	54
3.9.4 Tratamento Térmico do RES _D	55
3.9.5 Determinação do GH%, N _T % nos RES _{DT} Hidro- lisados com Alcalase 0,6L	55
3.9.6 Hidrólise Enzimática do RES _D para fins de Avaliação Sensorial	56
3.9.7 Avaliação Sensorial dos Hidrolisados En- zimáticos do RES _D com Alcalase 0,6L	57
3.10 Hidrólise Enzimática do Resíduo sem Desengor- durar (RES)	59
3.11 Obtenção de Hidrolisado Enzimático do RES com Alcalase 0,6L	61
3.12 Caracterização do Hidrolisado Enzimático (H30, H30L) e seu Resíduo (RH30L)	61
3.12.1 Composição Centesimal Aproximada	61
3.12.2 Determinação de Carboidratos Totais	63
3.12.3 Detecção Qualitativa de Carboidratos por Cromatografia de Camada Delgada (TLC)	62
3.12.4 Determinação da Composição em Aminoáci- dos	64
3.12.5 Determinação de Triptofano	64

3.12.6 Determinação de Lisina Disponível	65
3.12.7 Detecção Qualitativa de Lisinoalani- na (LAL) por TLC	66
3.12.8 Determinação Quantitativa da LAL por Cromatografia de Troca Iônica em Ana- lisador de Aminoácidos	66
3.12.9 Determinação Espectrofotométrica de Ácido Fítico	67
3.12.10 Determinação do Índice de Peróxidos	68
3.12.11 Determinação do perfil dos Pesos Mo- leculares	68
3.12.12 Comportamento Eletroforético	69
3.12.13 Contagem Total de Microrganismos	70
3.12.14 Determinação da Atividade Ureásica	70
3.12.15 Determinação do Inibidor de Tripsina	70
3.12.16 Determinação da Atividade de Lipoxi- genase (LPO)	73
3.12.17 Determinação da Atividade Residual da Alcalase 0,6L no Hidrolisado H3O	74
3.12.18 Determinação da Solubilidade	74
3.12.19 Ensaio Biológico	75
3.12.20 Avaliação Fisiológica em Ratos Alimen- tados com o Hidrolisado Enzimático Lio- filizado	76
3.13 Hidrólise Enzimática do Resíduo RES sem Con- trole de pH nem de Temperatura	76
3.13.1 Determinação do GH% em Função da Massa Enzimática	76

3.13.2 Determinação da Quantidade de Água à Temperatura Ambiente e à Temperatura de Ebulição Necessária para Manter a Massa Reagente a Aproximadamente 50°C	77
3.13.3 Obtenção de Hidrolisados Enzimáticos sem Controle de pH nem de Temperatu- ra	78
3.14 Produto Formulado com Base no Hidrolisado H45L e Resíduo RH45L	78
3.15 Avaliação Sensorial das Sopas Desidratadas	79
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1 Composição Centesimal da Matéria-prima	81
4.2 Composição Granulométrica do RES	82
4.3 Dispersibilidade Protéica e Conteúdo de Ni- trogênio Solúvel do RES	83
4.4 Atividades Enzimáticas	84
4.5 Seleção do Método para Determinar o Grau de Hidrólise Enzimática (GH%)	85
4.6 Grau de Hidrólise Inicial do Resíduo RESD	90
4.7 Hidrólise do RESD com Diferentes Enzimas	92
4.8 Efeito da Autoclavagem do Resíduo Desengor- durado na susceptibilidade à Hidrólise	96
4.8.1 Dispersibilidade Proteica e Solubili- dade de Nitrogênio	96
4.8.2 Hidrólise Enzimática dos Resíduos RESDT-15 e RESDT-30 com Alcalase 0,6L	97
4.9 Rendimentos	99

	Pág.
4.10 Hidrólise Enzimática do Resíduo Desengordurado RESD com Alcalase 0,6L para prova Sensorial	100
4.10.1 Grau de Hidrólise (GH%), Teor de Proteína e Grau Brix (°B) dos Hidrolisados	100
4.10.2 Avaliação Sensorial dos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo Desengordurado RESD com Alcalase 0,6L	102
4.11 Hidrólise do Resíduo sem Desengordurar RES	104
4.12 Porcentagens de Proteína, Sólidos Totais e Graus Brix dos Hidrolisados Enzimáticos dos Sistemas RES/Alcalase 0,6L e Denapsina-10P/RES para Fins Sensoriais	107
4.13 Avaliação Sensorial dos Hidrolisados Enzimáticos Obtidos do RES com Alcalase 0,6L e Denapsina-10P	108
4.14 Caracterização Química, Físico-Química e Biológica do Hidrolisado Enzimático de 30 min, Produto do RES e Alcalase 0,6L	112
4.14.1 Composição Centesimal	112
4.14.2 Composição em Carboidratos	113
4.14.2.1 Carboidratos Solúveis por Cromatografia em Camada Delgada	113
4.14.2.2 Carboidratos Totais por Espectrofotometria	115
4.14.3 Composição em Aminoácidos	116
4.14.4 Testes de Lisinoalanina (LAL)	119

	Pág.
4.14.5 Confirmação da Ausência da LAL para Cromatografia de Troca Iônica	120
4.14.6 Conteúdo de Ácido Fítico	123
4.14.7 Índice de Peróxidos	125
4.14.8 Pesos Moleculares por Filtração em Gel	126
4.14.9 Comportamento Eletroforético	130
4.14.10 Contagem Total de Microrganismos	133
4.14.11 Atividades Enzimáticas Diversas	134
4.14.12 Solubilidade do Hidrolisado Enzimático H30L	140
4.14.13 Ensaio Biológico para o H30L	140
4.14.14 Efeito Fisiológico da Dieta Preparada com o Hidrolisado Enzimático Liofilizado (H30L)	142
4.15 Determinação do Grau de Hidrólise (GH%), em Função da Massa Enzimática (ME), nos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo sem Desengordurar (RES) com Alcalase 0,6L sem Controle de pH	146
4.16 Obtenção de Hidrolisado Enzimático de Resíduo sem Desengordurar (RES) com Alcalase 0,6L sem Controle de pH nem de Temperatura	148
4.17 Caracterização do Hidrolisado Enzimático Liofilizado H45L e de seu Resíduo Liofilizado (RH45L)	149
4.18 Avaliação Sensorial dos Produtos Formulados com Base no Hidrolisado Enzimático H45L	154

4.18.1	Teste de Diferença Triangular para So-	
	ja Preparada com o Hidrolisado Enzimá-	
	tico e Liofilizado H45L	154
4.18.2	Teste de Preferência Pareada para So-	
	pa Preparada com Feijão, Arroz e Hidro	
	lisado Enzimático H45L	156
5.	CONCLUSOES	159
6.	BIBLIOGRAFIA	162

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Composição Centesimal do Extrato Hidrossolúvel de Soja	8
TABELA 2. Composição do Extrato Hidrossolúvel Formula do com Vitaminas e Sais Minerais para Consumo Infantil	9
TABELA 3. Características Nutricionais do Extrato Seco Comparadas com as do Leite	10
TABELA 4. Composição em Aminoácidos do Extrato Hidrossolúvel Seco	11
TABELA 5. Composição Centesimal do Resíduo do Extrato Hidrossolúvel, Farinha Desengordurada de Soja (FDS) e o Isolado Proteico de Soja (IPS)	16
TABELA 6. Comparação dos Parâmetros Operacionais de Alguns Produtos de Soja	17
TABELA 7. Composição em Aminoácidos (g/16g N) dos Produtos Proteicos de Soja, Comparados com os Aminoácidos da Proteína do Leite Integral em Pó, segundo a FAO	18
TABELA 8. Funções das Enzimas Proteolíticas Utilizadas na Modificação das Proteínas	24
TABELA 9. Rendimentos na Recuperação da Proteína Hidrolisada de Soja Utilizando Diferentes Processos sobre a Farinha Desengordurada.....	32
TABELA 10. Avaliação Biológica de Proteínas Alimentícias e Hidrolisados Enzimáticos	37
TABELA 11. Composição Centesimal de Hidrolisado Enzimático das Proteínas de Soja	38

TABELA 12. Composição em Aminoácidos do Hidrolisado Enzimático do Isolado Proteico de Soja (g/16g N)	38
TABELA 13. Parâmetros Operacionais para a Hidrólise Enzimática do RESD com Alcalase 0,6L	52
TABELA 14. Enzimas e Parâmetros Operacionais para a Hidrólise Enzimática do Resíduo Desengordurado RESD	54
TABELA 15. Enzimas e Parâmetros Operacionais Usados na Hidrólise Enzimática do Resíduo sem Desengordurar RES	59
TABELA 16. Parâmetros Operacionais para Determinar o GH% em Função da Massa Enzimática no Hidrolisado do RES e Alcalase 0,6L sem Controle de pH	77
TABELA 17. Composição Centesimal do Resíduo do Extrato Hidrossolúvel de Soja (RES) Comparada com a Composição Centesimal da FDS, FIS, EHS	81
TABELA 18. Distribuição Porcentual dos Tamanhos das Partículas do RES	82
TABELA 19. Atividades Enzimáticas da Pepsina, Papaína, Denapsina-10P e Alcalase 0,6L	84
TABELA 20. Resultados Porcentuais do Grau de Hidrólise (GH%) Obtidos com os Métodos do Formaldeído, Ninidrina Lowry e TNBS dos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo Desengordurado RESD e Alcalase 0,6L	86
TABELA 21. Porcentagens do Grau de Hidrólise dos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo Desengordurado com Diferentes Enzimas	93
TABELA 22. PDI e NSI do Resíduo Desengordurado RESD e seus Produtos da Autoclavagem RESDT-15 e RESDT-30	97

TABELA 23. Grau de Hidrólise dos Resíduos RESDT-15 e RESDT-30 Tratados Enzimaticamente com a Alcalase 0,6L Para Comparação, Mostram-se os Valores do RESD não Autoclavado.....	98
TABELA 24. Comparação das Porcentagens dos Sólidos Totais, Graus Brix e Rendimentos Obtidos no Processo da Hidrólise Enzimática do Resíduo sem Desengordurar RES com 30 min. de Digestão	99
TABELA 25. Acompanhamento da Hidrólise do RESD com Alcalase 0,6L Visando a Obtenção de Hidrolisado para Fins de Avaliação Sensorial	101
TABELA 26. Perfil Sensorial (%) do Sabor dos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo Desengordurado RESD com Alcalase 0,6L	102
TABELA 27. Grau de Hidrólise (GH%) dos Hidrolisados Enzimáticos do RES com Alcalase 0,6L e Denapsina-10P...	105
TABELA 28. Proteína Solúvel, Sólidos Totais e Graus Brix dos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo sem Desengordurar (RES) para Fins Sensoriais	108
TABELA 29. Composição Centesimal do Hidrolisado Enzimático H30L	112
TABELA 30. Fatores de Retenção Percentual (HRf) dos Carboidratos Separados por TLC	113
TABELA 31. Teor Médio de Carboidratos Totais Expressos como Glucose	115
TABELA 32. Perfil de Aminoácidos (g/100g Prot) do Hidrolisado Enzimático Liofilizado (H30L) Comparados com Outros Produtos Proteicos de Soja	117

TABELA 33. HRf dos Produtos da Hidrólise Separados por TLC no Teste Qualitativo para LAL	120
TABELA 34. Conteúdo de Ácido Fítico do H30L, RES, FIS, PVI e EHS	124
TABELA 35. Índice de Peróxido dos Extratos Clorofórmicos da FIS, RES, H30L, e EHS	125
TABELA 36. Pesos Moleculares dos Padrões, Amostras H30L e Isolado Proteico PVI Determinado por Filtra ção em Gel	126
TABELA 37. Mobilidades Relativas por cento (MR%) dos Compostos Separados por Eletroforese de Disco...	131
TABELA 38. Quantidades de Microrganismos Presentes nos Produtos após 24 e 48 horas de Incubação a 30°C	134
TABELA 39. Atividade Ureásica (Uase), Lipoxigenásica e Ati vidade Residual da Alcalase 0,6L no Hidrolisa do Enzimático H30 Comparados com Outros Produ tos de Soja	135
TABELA 40. Atividade do Inibidor da Tripsina dos Extra tos Hidrossolúveis Obtidos da FDS, Resíduo sem Desengordurar RES, Hidrolisado Enzimático H30 e do Extrato Hidrossolúvel Comercial	136
TABELA 41. Comparação dos Parâmetros da Avaliação Biolô gica, em Ratos, de Quatro Produtos Proteicos de Soja Incluindo o Padrão Caseína.....	141
TABELA 42. Porcentagens dos Pesos Ganhos e Pesos dos Rins e Fígados dos Animais com Ração Basal de Caseína e Animais Alimentados com a Ração Preparada com 10% de Proteína do Hidrolisado Enzimático H30L	134

TABELA 43. Porcentagens do Grau de Hidrólise (GH%) a 60 min de Digestão em Função da Massa Enzimática	146
TABELA 44. Composição Centesimal do Hidrolisado Enzimático H45L e de seu Resíduo HR45L	149
TABELA 45. Composição em Aminoácidos (g/100g Prot) do Resíduo do Hidrolisado Enzimático RH54L Comparada com outros Produtos Proteicos de Soja e um Padrão de Aminoácidos Essenciais	151
TABELA 46. Quadro Resumo dos Resultados do Teste de Diferença Triangular	155
TABELA 47. Resumo e Significância dos Resultados do Teste de Preferência Pareada para as Sopas Formuladas e Desidratadas	157

FIG. 1.	Diagrama de Fluxo Operacional de um Processo Industrial para a Produção de Extrato Hidrossolúvel de Soja e de seu Resíduo.....	14
FIG. 2.	Fluxograma Operacional de Processo de Obtenção de Hidrolisado Enzimático das Proteínas da Soja, em Escala Piloto	31
FIG. 3.	Diagrama de Fluxo para o Processo de Obtenção de um Hidrolisado Enzimático Brando.....	33
FIG. 4.	Diagrama de Fluxo para a Obtenção de um Hidrolisado Enzimático das Proteínas da Soja Mediante Processo Tipo "pH-stat"	34
FIG. 5.	Diagrama Esquemático do Estudo do Resíduo do Extrato Hidrossolúvel de Soja.....	43
FIG. 6.	Diagrama de Fluxo Operacional para Obtenção de Hidrolisado Enzimáticos do Resíduo sem Desengordurar RES	60
FIG. 7.	Diagrama de Fluxo Operacional para Obtenção de Hidrolisado Enzimático do RES com Alcalase 0,6L...	62
FIG. 8.	Diagrama de Fluxo para Obtenção de Extratos Hidrossolúveis de Soja para Determinar as Atividades do Inibidor da Tripsina	72
FIG. 9.	Representação Gráfica do GH% Obtida por Quatro Métodos Diferentes	87
FIG. 10.	Efeito da não Adição da Enzima no GH% do Resíduo Desengordurado RESD	91
FIG. 11.	Porcentagens do Grau de Hidrólise (GH%) dos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo Desengordurado	

RES D com Alcalase 0,6L, Pepsina, Papaína e Denapsina-10P	94
FIG. 12. Representação Gráfica do Perfil do Sabor dos Hidrolisados Enzimáticos do RES D e Alcalase 0,6L	103
FIG. 13. Representação Gráfica do GH% dos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo sem Desengordurar RES e Alcalase 0,6L e Denapsina-10P.....	106
FIG. 14. Representação Gráfica do Perfil do Sabor dos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo sem Desengordurar RES e Alcalase 0,6L	110
FIG. 15. Representação Gráfica do Perfil do Sabor do Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo sem Desengordurar RES e Denapsina-10P	111
FIG. 16. Cromatogramas Obtidos por Troca Iônica do Padrão LAL, Hidrolisado Enzimático H30L e Mistura do Padrão LAL e Hidrolisado Enzimático	121
FIG. 17. Cromatogramas Obtidos por Troca Iônica do Padrão LAL, Isolado Proteico PVI e Lisina Padrão	122
FIG. 18. Curva-Padrão dos Pesos Moleculares dos Padrões e seus Respetivos Volumes de Eluição Corrigidos (Ve/Vo), Obtidos por Cromatografia de Filtração em Gel	127
FIG. 19. Perfil de Eluição dos Componentes do Hidrolisado Enzimático Liofilizado H30L	128
FIG. 20. Perfil de Eluição Cromatográfico do Isolado Proteico PVI	129
FIG. 21. Representação Esquemática dos Componentes do H30L e outros Produtos de Soja Separados por Eletroforese de Disco. As Mobilidades Relativas Aparecem na Tabela 36	132

FIG. 22. Curva-padrão da Digestão da Caseína pela Ação da Tripsina	139
FIG. 23. Fotomicrografias dos Tecidos dos Órgãos Digestivo, Córdio-respiratório, Linfocitário e Urinário de Ratos Alimentados com Dieta de Hidrolisado H30L	144
FIG. 24. Representação Gráfica do GH% em Função do Tempo de Hidrólise e da Massa Enzimática.....	147
FIG. 25. Cromatogramas Obtidos por Troca Iônica do Resíduo Liofilizado (RH45L) do Hidrolisado Enzimático Comparado com o Padrão LAL	152
FIG. 26. Perfil de Eluição Cromatográfica do Hidrolisado Enzimático Liofilizado H45L	153
FIG. 27. Representação Esquemática dos Componentes do Hidrolisado Enzimático e seu Resíduo RH45L e da FDS Separados por Eletroforese de Disco.....	154

RESUMO

Foi estudada a ação de quatro enzimas proteolíticas, duas ácidas (Denapsina-10P e pepsina) e duas alcalinas (Alcalase 0,6L e papaína) sobre as proteínas do resíduo do extrato hidrossolúvel de soja. A reação de hidrólise foi acompanhada através dos métodos de titulação com formaldeído, reação da ninidrina e reação do ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) com os grupos amina livres. Adotou-se este último método por fornecer respostas mais consistentes e reprodutíveis na determinação do grau de hidrólise do produto.

O grau de hidrólise produzido pela Alcalase 0,6L foi o maior alcançado pelas enzimas testadas nas condições de 3% de substrato e 0,02 de relação enzima/substrato e nos tempos de 0 a 180 min de hidrólise. O grau de desnaturação do substrato foi considerado ideal para a hidrólise na forma em que se encontra no resíduo comercial.

Os hidrolisados enzimáticos produzidos pela Alcalase 0,6L revelaram maior teor de sólidos totais (4,80%) com alta porcentagem de proteína recuperada (60,26%), quando comparados com os hidrolisados da Denapsina-10P, papaína e pepsina. Na avaliação sensorial foram detectados sabores moderados de feijão e amargo em todos os hidrolisados enzimáticos.

O hidrolisado enzimático obtido do resíduo sem desengordurar e Alcalase 0,6L com 30 min de hidrólise (52,17% de proteínas, 0,6% umidade) foi comparável à farinha de soja desengordurada

(FDS) na sua composição em aminoácidos, possuindo maior conteúdo de lisina disponível que a FDS e o isolado protéico de soja. O perfil de filtração em gel demonstrou alta porcentagem de peptídeos com pesos moleculares em torno de 5.700, que foram separados em seis componentes eletroforéticos bem definidos. Análise do produto desidratado não revelou a presença de lisinoalanina. No entanto, os oligossacarídeos rafinose e estaquiose foram detectados em níveis inferiores aos de outros produtos de soja. O teor de ácido fítico do hidrolisado foi de aproximadamente 4% do encontrado no isolado protéico.

Caracterização adicional desse produto mostrou que o nível residual de atividade Alcalase 0,6L e do inibidor de tripsina foram de 11 e 1,8% respectivamente. A atividade lipoxigenásica encontrada foi de $0,2 \times 10^{-3}$ UE, ao passo que atividade ureásica não foi detectada. Porém, o índice de peróxidos do hidrolisado foi superior ao da farinha integral de soja (FIS), ou seja, comparável com o do resíduo sem hidrólise. A qualidade microbiológica foi considerada aceitável com 2.300 MO totais/g.

Após avaliação biológica, com ratos, verificou-se que o hidrolisado enzimático foi o produto de melhor qualidade proteica, quando comparado com o extrato hidrossolúvel comercial de soja ou com o resíduo sem hidrólise. Os resultados sugerem que o processo enzimático possibilita a melhor utilização das proteínas pelo organismo animal. A qualidade biológica geral foi confirmada pela análise histológica dos órgãos digestivo, cardio-respiratório, urinário e linfocitário de ratos alimentados, durante sessenta dias, com dietas à base do hidrolisado enzimático.

Uma sopa desidratada formulada com feijão, arroz e hi
drolisado enzimático (resíduo sem desengordurar e Alcalase 0,6L a
pH neutro) foi bem aceita por um painel de 32 provadores, não se
detectando sabor amargo e produzindo ligeira melhoria no sabor em
relação à sopa sem o aditivo.

SUMMARY

The actions of four proteolytic enzymes, two acid (Denapsin-10P and pepsin) and two alkaline (Alcalase 0,6L and papain) on the proteins of the residue of the water-soluble soy extract was studied. The hydrolysis reaction was monitored by the following methods: formol titration, the ninhydrin reaction and the trinitrofluorobenzene sulfonic acid (TNBS) reaction with the free amino groups. The latter method showed more consistent and reproducible results and was, therefore, used throughout the study.

Among the enzymes tested, Alcalase 0,6L produced the highest degree of hydrolysis, for a 3% substrate concentration, 0.02 enzyme/substrate ratio and within the time interval 0 to 180 min. The denaturation index of the substrate as is found in the residue was considered ideal for the hydrolysis.

Enzymatic hydrolyzates by Alcalase 0,6L contained higher amounts of total solids (4,80%) and yielded high protein recovery (60,26%) when compared with the hydrolyzates of Denapsin-10P, papain and pepsin. Sensory evaluation detected moderate bitterness and beany flavor in all hydrolyzates.

The 30 min hydrolyzate of the full-fat residue (52,17% protein, 0,6% moisture) was similar to the defatted soy flour in terms of amino acid composition but showed higher levels of available lysine than either the defatted soy flour or the soy protein isolate. Gel filtration of peptides showed a predominance

of fragments in the neighborhood of 5.700 daltons; six well-defined electrophoretic components were separated from this group of fragments.

Further analysis of the dehydrated product did not reveal the presence of lysinoalanine. The oligosaccharides raffinose and stachyose, however, were detected in levels below those found in other soy products. Phytic acid content of the hydrolyzate was about 4% of that found in the protein isolate.

The product was also tested for residual enzyme and inhibitor activity. Residual Alcalase 0,6L, trypsin inhibitor and lipoxigenase activities were 11%, 1,8% and $0,2 \times 10^{-3}$ EU, respectively. Urease activity was not detectable. The peroxide index of the hydrolyzate was higher than that of the fresh soy bean meal, however comparable to that of the unhydrolyzed residue. The microbiological quality of the product was considered acceptable from the standpoint of total microorganism count (2,300/g).

Biological evaluation with rats revealed that the protein hydrolyzate was of better quality than either the water-soluble extract or the unhydrolyzed residue. These results suggest that the enzymatic process permits a better utilization of the protein by the animal. The general biological quality of the hydrolyzate was confirmed in a sixty-day feeding trial with rats in which histological analysis of the digestive, cardio-respiratory and urinary systems appeared normal.

A dehydrated bean-and-rice soup, formulated with the enzymatic hydrolyzate (full-fat residue and Alcalase 0,6L, neutral

pH) was well accepted by a 32-member taste panel and ranked slightly better than the soup without the hydrolyzate.

1. INTRODUÇÃO

A introdução da soja no Brasil data do século passado e sua exploração vem se acentuando industrialmente ano após ano. No período compreendido entre os anos 70 e 78 registrou-se uma taxa geométrica anual de crescimento de produção em torno de 30% e, em 1981, a área plantada atingia 8,5 milhões de hectares, com uma produção de 15 milhões de toneladas/ano.

Dentre os fatores que contribuem para o sucesso da soja no Brasil, mencionam-se (132): as condições favoráveis no mercado externo e interno, alternância com outras culturas, capitalização das empresas agrícolas, apoio à pesquisa e à assistência técnica entre outros. Este quadro favorável trouxe consigo o surgimento de modernos complexos industriais, com capacidade instalada para processamento da soja em torno de 93.738 toneladas/dia em 1981 (48).

No período de janeiro a outubro, de 1984, a soja contribuiu com uma alíquota de 33% do total das exportações dos produtos agrícolas alimentícios, atingindo 5% do total das exportações do mesmo período. A soja foi exportada como grão ($1,6 \times 10^6$ ton), farelo ($6,7 \times 10^6$ ton) e óleo bruto e refinado ($0,9 \times 10^6$ ton), representando um item de importância na balança comercial do Brasil (45,46). Em contraste com o papel da soja no comércio exterior, existem dados estatísticos que mostram que a proteína da soja, consumida no Brasil em 1973, representou menos do que 0,5% do total da produção de soja do mesmo ano (59).

Há um consenso, por parte das autoridades de requerimentos alimentares, de que as proteínas das sementes oleaginosas,

para consumo humano direto, são a fonte mais promissora para suprir a escassez de proteína (145). Estima-se que um hectare de cultura de soja pode chegar a satisfazer as necessidades protéicas de 52 pessoas, enquanto que a mesma área, se produzisse proteína animal, sustentaria apenas 5 pessoas (63).

Um dos aspectos mais importantes das proteínas vegetais são suas propriedades funcionais, sendo os dados de caracterização funcional os que fornecem informação do campo da aplicação do produto protéico (110). O saboroma característico dos produtos protéicos de soja é o fator que limita seu uso (228), portanto são justificáveis os esforços que objetivem atenuar ou eliminar as características desvantajosas nos produtos de soja.

A utilização e preparo das proteínas vegetais é uma arte milenar e com demanda crescente. Os produtos protéicos da soja, modificados enzimaticamente, são considerados produtos de terceira geração e oferecem uma ampla margem de utilidades (226). Pode-se chamar de proteína modificada enzimaticamente a proteína que é alterada, na sua estrutura física e nas suas propriedades químicas, pela ação das enzimas proteolíticas (100).

Numerosos artigos têm sido publicados sobre a hidrólise enzimática das proteínas, como forma conveniente de melhorar suas propriedades funcionais, sem afetar seu valor nutricional. Proteínas hidrolisadas como alimento ou ingredientes alimentícios têm sua origem no Leste Asiático onde, por muitos anos, os processos de fermentação haviam sido usados para preservar ou modificar o sabor dos alimentos protéicos (207). A hidrólise, pela ação das enzimas proteolíticas, procede lentamente e só dá resultados de hidrólise parcial, podendo ainda apresentar sabor amargo, causado por alguns aminoácidos de baixo peso molecular (91). No entanto, exis

tem hoje hidrolisados protéicos vegetais (HPV) de grande interesse industrial, obtidos por hidrólise ácida e que se apresentam como mistura de aminoácidos, peptídios e sais minerais (207). Em adição, há suficiente evidência de que o volume de produtos protéicos não convencionais, usados hoje na alimentação, têm aumentado, seja por razões técnicas e/ou econômicas (7).

Segundo estatísticas da FAO, foi previsto déficit de aproximadamente 20 milhões de toneladas de produtos lácteos no ano de 1980, devido ao desequilíbrio entre a demanda e a produção de leite, fenômeno mais acentuado nos países da América Latina e da África (204).

O extrato hidrossolúvel da soja tem sido considerado, por nutricionistas, como o possível substituto do leite, particularmente na alimentação de infantes, por apresentar aproximadamente o mesmo teor protéico de leite, embora seu valor nutritivo varie em função dos parâmetros de obtenção (151). O extrato hidrossolúvel em pó é industrializado e comercializado em grande escala por, pelo menos, uma indústria brasileira, sendo insumo básico em programas de alimentação institucional (175). Independente da opinião dos nutricionistas e da validade ou não do uso dos produtos de soja na alimentação institucional, parece-nos que o sub-produto do extrato hidrossolúvel de soja apresenta-se como matéria prima abundante que merece estudos cuidadosos para maximizar o aproveitamento e oferecer produtos protéicos alternativos de soja.

Modificando enzimaticamente as proteínas objetivamos transformar o resíduo do extrato hidrossolúvel de soja, em produtos de melhor utilidade tanto industrial como nutricional. Esses objetivos se justificam pela matéria-prima abundante considerada como bagaço, até há pouco tempo, pela condição de segundo produtor

mundial de soja que o Brasil ocupa, e pela necessidade de se reduzir o consumo de produtos de importação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Extrato hidrossolúvel da soja

2.1.1 Processos de obtenção

Análise da indústria do extrato hidrossolúvel de soja dos 116 maiores produtores mundiais desse produto se encontram bem documentadas (251), fornecendo dados de mercado, de país para país, produção, crescimento industrial, estratégias de mercado, etc.

Embora os princípios dos processos da obtenção sejam bem conhecidos (251), ainda continua o trabalho de aperfeiçoamento das operações dos processos, conforme evidenciado pelo número das patentes registradas (23, 61, 73, 43, 126, 144).

Os processos da obtenção do extrato hidrossolúvel variam grandemente entre si (255), porém cabe mencionar dois grandes grupos de processos gerais (169): os processos orientais e os processos ocidentais; sendo os mais conhecidos, neste último grupo, os processos de NELSON (33, 222), MUSTAKAS e o da FTA-Unicamp (177). Pode-se mencionar, como sendo etapas básicas na obtenção do extrato hidrossolúvel, as seguintes: desintegração, inativação enzimática e a separação dos sólidos insolúveis (112).

A qualidade do extrato começa com a escolha da matéria-prima. Recomenda-se o emprego de grãos de boa qualidade e, de preferência, descortçados e livre de impurezas (55, 59). Entretanto, também se usam grãos sem descortçar (33, 180, 188) ou flocos desengordurados (137). Sabe-se que o extrato hidrossolúvel, impropriamente processado, apresenta saboroma desagradável típico de

soja crua, causado pela presença dos compostos n-hexanal, 3-cis-hexanal, n-pentil furano, 2(1-pentil) furanilvinilcetona; típico de tinta oxidada devido à presença de 2,4-alcadienos, ou até mesmo rancidez devido à presença de lípidos residuais (228). Constitui-se, portanto, grande preocupação a eliminação dessas substâncias; embora sejam removíveis por processos de extração com solventes e de fermentação (228), aconselha-se evitar a liberação das mesmas através da adequação do processo.

Essa e muitas outras divergências de opinião tornam a obtenção dos produtos da soja matéria bastante controvertida entre seus próprios autores. Assim, alguns autores recomendam a operação de maceração antes da desintegração do grão (112, 77, 180, 188, 33, 134, 222), seja com água (112, 121, 145) ou com soluções alcalinas (62, 112, 188, 222) na temperatura ambiente (121, 188, 222) ou em temperaturas que variam desde 60°C a 98°C (77, 134, 137, 180), e por tempos que variam de 0,5 até 24 horas (177, 188, 222). Outros, todavia, aduzem evidência de que, com a desintegração hidrotérmica a 98°C, sem a operação prévia de maceração, obtem-se bons resultados (33, 127, 57, 293).

Desde que o teor de proteína é o principal atributo do extrato hidrossolúvel da soja, cabe mencionar que a extratabilidade desses compostos é propriedade que está influenciada por vários fatores, como: o tamanho da partícula, tratamento térmico, natureza do extratante (pH, força iônica, solvatação), temperatura, relação soluto/solvente (94), o que torna a operação dependente de todas essas variáveis.

Pouco se tem registrado a respeito do tamanho da partícula e da obtenção do extrato hidrossolúvel. No entanto, é consenso geral que a relação soluto/solvente deva es-

tar em torno de 1:10 (145, 177, 188, 222). Quanto a inativação enzimática e a separação dos sólidos usam-se operações de ebulição por tempos que podem ir dos 15 aos 45 min (33, 55, 177, 188, 292, 57), e centrifugação em centrífugas contínuas horizontais (55, 177) ou de cesto (178, 180).

Se o extrato hidrossolúvel for destinado à comercialização na forma líquida, ele será formulado, pasteurizado e embalado (33, 55, 180). Entretanto, se o produto desejado for na forma de pó, o extrato deverá sofrer operações de concentração, como a realizada por filme descendente ou em superfície raspada, secagem por atomização (55, 112, 274) e moagem.

Quanto ao rendimento, sabe-se que, em processo industrial contínuo (1.200 L/hr) para a produção do extrato hidrossolúvel com a operação de desintegração em água em ebulição, obtem-se rendimento de 9,3 kg de extrato formulado por kg de soja (57). Com o processo NELSON, pode-se obter 9L do extrato por cada quilo de soja (180, 188). Existem trabalhos que mostram que a relação de 1:10 soluto:solvente produz rendimento de 7,5 kg de extrato não formulado por kg de soja (33, 55, 59, 242). Se, em adição, a maceração é efetuada com agentes complexantes como com o EDTA, ácido cítrico, pirofosfato de sódio e posteriormente, na desintegração, se acrescentam enzimas proteolíticas, como a bromelina e papaína, o rendimento de nitrogênio protéico solúvel aumenta (62) e, dependendo do pH e do tipo de extratante, os sólidos totais podem variar de 0,85% a 6,55% (112).

2.1.2 Composição Química

A composição química do extrato hidrossolúvel apresenta ampla variação, devido principalmente às variedades da soja,

processos de extração, tamanho da partícula, relação soluto/solvente, temperatura de extração, formulação (255), entre outros.

TABELA 1. Composição centesimal do extrato hidrossolúvel da soja (a).

Componentes	Extrato líquido	Extrato seco
Proteína	2,7 - 3,0	46,6 - 66,6
Gordura	1,6	25,0 - 28,6
Carboidratos	2,3	14,4 - 27,8
Umidade	-	3,0
Cinza	0,41	8,72 - 6,6
Fibra	-	0,8
Sólidos totais	4,75	-

(a) Dados compilados de (40, 63, 145, 180, 274).

O índice de dispersibilidade protéica (PDI) do extrato hidrossolúvel seco, por atomização, está em torno de 44% a 55%, dependendo principalmente das seguintes variáveis: tipos de atomização, pré-tratamento da matéria-prima, tipo de branqueamento, natureza do agente branqueador, pH da suspensão para a secagem.

TABELA 2. Composição do extrato hidrossolúvel, formulado com vitaminas e sais minerais para consumo infantil (a).

Componentes	Quantidade
Sólidos (%)	15,0
Energia (Kcal/100mL)	72,5
Proteínas (%)	2,8
Gorduras (%)	3,2
Carboidratos (%)	8,0
Distribuição calórica:	
Proteína (%)	16,0
Gordura (%)	40,0
Carboidratos (%)	44,0
Minerais (em 1 litro):	
Cálcio (mg)	1080
Fósforo (mg)	540
Sódio (mg)	300
Potássio (mg)	1000
Cloretos (mg)	735
Magnésio (mg)	90
Zinco (mg)	4,4
Iodo (ug)	60
Ferro (mg)	7,2
Cobre (ug)	435
Vitaminas (em 1 litro):	
A (UI)	5400
B1 (mg)	0,44
B2 (mg)	0,58
B6 (mg)	0,44
B12 (µg)	1,2
C (mg)	75
D (UI)	540
E (UI)	30
K (UI)	30
Niacina (mg)	7,2
Pantotenato (mg)	2,6
Folacina (µg)	30

a) Dados colhidos da referência (40).

2.1.3 Valor Nutritivo

O extrato hidrossolúvel da soja é um produto de alto valor nutritivo (59) que, sendo adequadamente formulado, constitui alternativa importante na alimentação de crianças com intolerância ao leite de vaca (242), nutrizes e gestantes e na alimentação institucional em geral (59).

Os valores dos quocientes de eficiência proteica (PER) e da utilização líquida de proteína (NPR) do extrato hidrossolúvel variam aproximadamente entre 75 e 89% dos valores apresentados pela caseína, quando o extrato é formulado com as proteínas do soro de queijo (180).

TABELA 3. Características nutricionais de extrato hidrossolúvel de soja seco, comparadas com as do leite de vaca (a).

Parâmetros	Extrato	Leite integral em pó
PER	2,15 - 2,20	2,50
Digestibilidade aparente (%)	80 - 86	92
Solubilidade (%)	0,35 - 0,40	0,30
Energia (Kcal/kg)	485	582
Umidade (%)	3	2
Proteínas (%)	48	26,4
Vitaminas:		
Tiamina (mg/100g)	1,16	2,29
Riboflavina (mg/100g)	0,52	1,46
Niacina (mg/100g)	2,73	0,60
A (UI)	28	1130
Valor biológico (%)	80	87
Utilização líquida de proteína(%)	76	79
Urease	negativo	negativo -
Antitripsina (%)	0 - 3,6	negativo
Índice de peróxidos (meq/kg gordura)	0,50	-

a) Dados compilados de (59, 67, 151, 177, 272, 274)

Entre os fatores anti-nutricionais, presentes na soja, mencionam-se: a) inibidor da tripsina, b) hemaglutininas, c) saponinas, d) estrógenos, e) fitatos, f) fatores goitrogênicos, g) fatores antivitaminicos, h) fatores de flatulência, sendo considerados a, b, e, f, g, termolábeis (151,160). No extrato hidrossolúvel, imprópriamente processado, pode-se encontrar alguns desses fatores e, inclusive, um fator alergênico termoestável (180°C, 30 min), porém de baixa atividade em relação a substâncias semelhantes encontrados em outras plantas ou no leite de vaca; isso pode explicar a baixa incidência de manifestações alérgicas em crianças alimentadas com extrato hidrossolúvel, em relação às crianças alimentadas com leite de vaca (229).

TABELA 4. Composição em aminoácidos do extrato hidrossolúvel de soja seco (a).

Aminoácidos	g A.a/16g N.
Lisina	6,20 - 6,81
Histidina	1,41
Arginina	7,07
Ác. aspártico	9,28
Treonina	3,80
Serina	5,32
Ác. glutâmico	17,80
Prolina	5,59
Glicina	4,57
Alanina	5,48
Cistina (1/2)	0,90 - 1,55
Metionina	1,20 - 1,72
Valina	5,00 - 6,28
Isoleucina	4,70 - 5,32
Leucina	7,32 - 8,30
Tirosina	4,53
Fenilalanina	5,30 - 6,08
Triptofano	1,10 - 1,30
Total de aromáticos	8,30 - 9,00

a) Dados obtidos das seguintes fontes bibliográficas (67, 151, 177, 272).

2.1.4 Formulações comerciais com base no extrato hidrossolúvel de soja

O extrato hidrossolúvel de soja tem demonstrado ser um estímulo à imaginação do tecnólogo de alimentos, preocupado em oferecer alternativas para a alimentação humana (2, 39, 51, 59, 98, 116, 196, 241, 250, 278). Dois estudos de aceitação bem sucedidos testemunham os esforços realizados com inúmeras formulações comerciais: o "vital", bebida formulada com base no extrato hidrossolúvel açúcar, sal, minerais, vitaminas, saborizantes e aromatizantes alcançou ampla aceitação (77% média aritmética) em teste de campo com 1.497 escolares, na faixa etária de 6 a 14 anos, no interior do estado de São Paulo (55, 174). A nível internacional, tem-se o relato de que o extrato hidrossolúvel formulado substitui, com sucesso, o leite desnatado, produto conhecido nos EEUU como "soy-whey drink mix", quando experimentado com crianças da Guatemala, Chile, Bolívia, Costa Rica, Haití e Paquistão (291)

Ainda na qualidade nutricional do extrato hidrossolúvel, é necessário levar em consideração as perdas dos nutrientes, causado pela operação de esterilização. Sabe-se que as bebidas não carbonatadas, formuladas com o extrato hidrossolúvel e vitaminas (A, D, B1, B6, B12, D e Niacina), tiveram perdas de até 40% do seu conteúdo vitamínico formulado (79). Portanto, é recomendável que a legislação defina padrões de identidade para bebidas nutritivas, baseados no extrato hidrossolúvel da soja (123).

Tais medidas fazem-se necessárias tanto mais quando podemos constatar um aumento nas populações alvo para os produtos da soja. As desvantagens do EHS com respeito ao leite podem ser obviadas se na fabricação de produtos para lactantes e lacten

tes, por exemplo, forem acrescentadas quantidades de minerais e vitaminas suficientes para contrabalançar a deficiência de lactose na soja: açúcar que, no leite, é adjuvante na absorção de minerais, aminoácidos e vitaminas (286). Em adição, produtos vegetais, como a soja, possuem fitatos, que por sua vez, seqüestram minerais como ferro e zinco, impedindo sua absorção.

Existe uma tendência, talvez louvável quanto à produção de novas fórmulas, com base no extrato hidrossolúvel, levando em consideração recomendações multidisciplinares. Menciona-se, por exemplo, que, seguindo recomendações pediátricas, produziu-se uma fórmula alimentícia para crianças acima de 6 meses de idade, com excelentes resultados no tangente ao estado nutricional das mesmas. A formulação consistia de leite de vaca, extrato hidrossolúvel, farinha integral de soja, açúcar, gordura hidrogenada, vitaminas e sais minerais (242). Também cabe mencionar que hidrolisados enzimáticos das proteínas da soja, formulados com ésteres de aminoácidos sulfurados, mas sem fenilalanina, podem ser empregados como alimentos terapêuticos no tratamento da fenilcetonúria, na sua fase mais crítica (91).

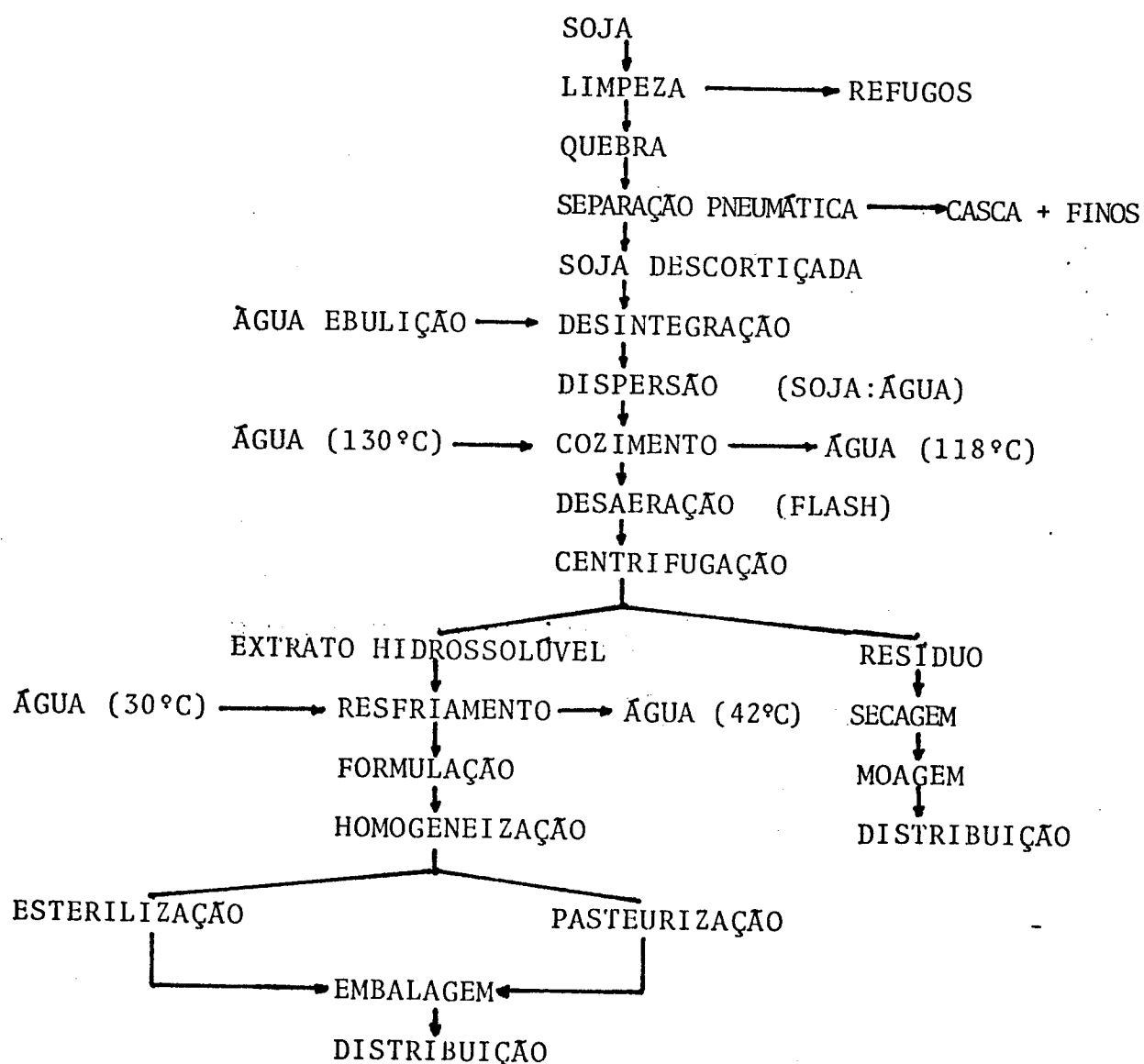
Uma grande tendência às formulações com proteínas solúveis está direcionada para a obtenção de bebidas neutras. No entanto, as proteínas hidrolisadas enzimaticamente estão mais direcionadas para bebidas acídicas do que para as neutras, sendo que o fator essencial é o poder tamponante do hidrolisado; nos hidrolisados protéicos quanto menor o poder tamponante, menor a quantidade de ácido necessário para ter um pH inferior a 4, sem se apresentar elevada acidez titulável (180) e elevado teor de cinza.

2.2 Subproduto do extrato hidrossolúvel

2.2.1 Processos de Obtenção

Como principal subproduto do processamento do extrato hidrossolúvel resulta um resíduo ou "bagaço" (58, 142) que é a fração insolúvel separada do extrato por centrifugação, após a inativação enzimática ou cozimento (33). O subproduto obtem-se como aparece no diagrama da Figura 1.

FIGURA 1. Diagrama de fluxo operacional de um processo industrial para a produção do extrato hidrossolúvel de soja e de seu resíduo (a).



a) Fluxograma transcrito das referências bibliográficas (272, 178).

Dependendo do processamento, é possível se obter um resíduo com 15% de sólidos, com rendimento que pode estar na faixa de 1,7 - 3,0 kg de resíduo por kg de soja processada (33, 57, 272). Esse resíduo deve ser desidratado o mais brevemente possível para evitar sua deterioração (273). Industrialmente pode ser seco em secadores tipo pneumático ("flash dryer") até um teor de umidade de 5 a 6% (272, 256) ou em secadores de bandejas com circulação forçada de ar, à temperatura constante de 65°C, até atingir uma umidade de 5% (274).

Há evidências experimentais mostrando que o resíduo seco é de 0,2 kg por kg de soja, o que corresponde a aproximadamente 22% da proteína e 20% dos sólidos totais (274). O resíduo seco e moído, que pode ser considerado como farinha intermediária entre a farinha integral e a farinha desengordurada de soja (58, 148), é praticamente inodoro e isento de fatores tóxicos (272).

2.2.2 Composição Química

A composição química do resíduo ou bagaço apresenta variabilidade, dependendo principalmente do cultivar da soja e dos parâmetros indicados para o extrato hidrossolúvel (255). Sua composição química pode ser comparada com a dos produtos da soja apresentados na Tabela 5.

TABELA 5. Composição centesimal do resíduo do extrato hidrossolúvel, farinha desengordurada de soja (FDS) e o isolado protéico de soja (IPS) (a).

Componentes	Resíduo	FDS	IPS
Umidade	4,6 - 6,0	5,0 - 7,0	--
Proteína (b)	28,0 - 38,0	57,0 - 51,5	96
Gordura	15,0 - 25,0	0,9 - 3,5	0,1
Fibra	10,0 - 12,0	2,3 - 3,0	0,1
Cinza	3,1 - 3,8	5,8 - 6,0	3,5
Carboidratos	25,2 - 30,0	30,0	0,3

- a) Dados compilados de: (55, 59, 63, 118, 133, 253, 268, 274).
- b) É interessante notar que, conforme recomendado (133, 253), o fator de conversão para as proteínas de soja normalmente usado é 5,71. Porém, tem-se demonstrado que esse fator para a soja varia entre 5,64 a 6,84 (183). Em algumas Tabelas o valor utilizado ainda é de 6,25.

2.2.3 Propriedades Nutricionais

O resíduo, conforme citado anteriormente, representa cerca de 20 - 30% da matéria-prima utilizada na produção do extrato hidrossolúvel. Embora seja essa uma quantidade altamente expressiva, não se tem suficientes dados experimentais no que diz respeito ao seu valor nutricional, tem-se apenas estimativas baseadas

na sua semelhança com os produtos FDS e FIS (farinha desengordurada e integral de soja, respectivamente). As propriedades nutricionais, conhecidas para esses produtos, são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6. Comparação de parâmetros nutricionais de alguns produtos de soja (a).

Parâmetros	Resíduo seco	FDS(b)	FIS(c)	IPS(d)
PDI (%)	13	45 - 90	90 - 95	90
PER	2,2	1,8-2,7	2,4	0,6-1,9
B.V (%)	--	60 - 75	65	60 - 81
NPU (%)	--	48 - 61	74	75
NPR (%)	88	83	79	85
D.A (%)	--	82 - 96	84	81 - 89
Atividade ureásica	negativa	0,1-2,5	1,9-2,5	negativa
Antitriptico (% residual)	0,66 (e)	58	81	18,3

a) Dados colhidos de: (40, 56, 133, 223, 253, 243, 272, 274).

b) Farinha desengordurada de soja

c) Farinha integral de soja

d) Isolado protéico de soja

e) Unidades enzimáticas por mg do produto

Nas condições do processamento do alimento, é inevitável que aconteça alguma degradação das proteínas. Isso porém não é necessariamente prejudicial. Em geral, a ruptura das estruturas é benéfica, devido a desnaturação tornar, por exemplo, as proteínas mais digeríveis.

A perda nutricional, ocorrida ocasionalmente durante o processamento térmico das proteínas, é causada pela "destruição" de alguns aminoácidos que se tornam metabolicamente não disponíveis, devido às interações com carboidratos, lipídios, compostos fenólicos, etc. (209). Alguns autores mostram que a composição dos aminoácidos das proteínas da soja pode variar, dependendo do processo de obtenção do produto, como aparece na Tabela 7.

TABELA 7. Composição, em aminoácidos (g/16g N) dos produtos proteicos da soja, comparados com os aminoácidos da proteína do leite integral em pó, segundo a FAO.

Aminoácidos	FIS (a)	FDS (a)	IPS (a)	Resíduo seco (b)	Resíduo seco (c)	Leite (d)
Arginina	8,42	7,06	7,20	7,44	3,97	3,97
Histidina	2,55	2,84	2,50	2,70	--	2,50
Lisina	6,86	6,90	5,70	6,14	3,65	3,65
Tirosina	3,90	3,78	3,00	3,30	--	--
Triptofano	1,28	1,30	1,00	--	--	--
Fenilalanina	5,01	5,00	5,90	5,24	--	--
Cisteína (1/2)	1,58	1,60	1,00	0,71	--	--
Metionina	1,56	1,60	1,30	1,63	--	2,50
Serina	5,57	4,92	5,00	5,97	4,04	5,60
Treonina	4,31	4,30	3,80	4,67	2,41	4,10
Leucina	7,72	7,70	7,90	8,91	3,51	9,70
Isoleucina	5,10	5,10	5,00	6,02	3,06	5,20
Valina	5,38	5,40	5,20	6,37	3,62	6,30
Ác. glutâmico	21,00	19,61	20,60	17,76	26,23	20,50
Ác. aspártico	12,01	11,78	12,40	12,39	1,70	7,70
Glicina	4,52	4,33	4,00	5,21	2,12	1,90
Alanina	4,51	4,39	3,90	5,73	1,57	3,40
Prolina	6,28	5,22	4,80	5,35	--	--

a) Dados compilados de: (56, 133, 151, 253, 295).

b) Resíduo obtido no preparo do isolado protéico de soja (253)

c) Resíduo obtido no preparo do extrato hidrossolúvel, mediante processo não descrito pelos autores (67)

d) Dados da referência (67).

2.2.4 Produtos formulados

O resíduo do extrato hidrossolúvel foi usado primeiramente como ingrediente de ração animal (33, 59). Posteriormente, tem sido usado, com sucesso, em produtos panificáveis, confeitaria (273), sopas, produtos cárneos (55) ou como ingrediente para produtos de cereais de desjejuns principalmente na sua forma tostada (255). Menciona-se que, para se ter sucesso na formulação de salichas, o pó deve primeiro ser hidratado (268). O resíduo, quando adicionado às farinhas de trigo e milho, tem demonstrado efetividade na preservação da mistura (33). O resíduo é passível de ser consumido em forma direta, se formulado com frutas e cereais (33). Um trabalho mostra que mistura de 50% de farinha de arroz e 50% de resíduo seco pode ser útil na produção de pão francês e de forma, onde substitui até 10% da farinha de trigo (273).

Embora se entenda que o resíduo, devido às suas propriedades gerais, é substituto potencial de ingredientes protéicos, prevalece a ênfase de que sua utilização está no preparo de ração animal (33, 59, 273).

2.3 Modificação Enzimática de Produtos Protéicos

A proteólise "in vivo" é processo de alta eficiência e de difícil imitação em escala laboratorial e industrial. Em sistemas não vivos, é necessário controlar cuidadosamente variáveis como temperatura, pH, contaminação bacteriana, extensão da reação, etc., as quais limitam a sua aplicabilidade prática. Entretanto, a utilidade de hidrolisados protéicos parciais no campo da medicina e dos alimentos é indiscutível, como é testemunhado pelos agen-

tes modificadores do saboroma de determinados produtos alimentícios (7, 91, 221).

2.3.1 Matérias-primas Utilizadas

Na obtenção de hidrolisados protéicos vegetais, a soja talvez seja a matéria-prima mais estudada, devido à sua facilidade de obtenção, seu poder nutritivo e sua versatilidade. Não obstante, isso não significa que fontes protéicas, como o gluten do trigo (279) e farinhas de diversas sementes, não possam servir para elaborar hidrolisados protéicos (87, 194, 207).

Várias são as formas sob as quais a soja tem sido utilizada como substrato. Entre elas podemos encontrar as seguintes:

- Farinha integral de soja (195),
- Farinha desengordurada e não tostada (19, 25, 168, 180, 205)
- Concentrado protéico (6, 96, 206),
- Isolado protéico (6, 19, 96, 100, 142, 156, 214, 226),
- Proteinato de soja (96, 238, 239, 266).

Como se pode observar pelo número de referências, a farinha integral de soja é talvez a matéria-prima menos empregada para essa finalidade, enquanto que os isolados ácidos ou neutros e as farinhas desengorduradas parecem ser os substratos mais comumente utilizados.

É interessante ressaltar que existem diferenças na composição das diferentes matérias-primas usadas, as quais, de algum modo, referem-se ao seu valor nutricional. Os dados das Tabelas 6 e 7 não obedecem rigorosamente a uma determinada variedade de soja,

porém esses resultados concordam com os resultados da pesquisa de ALDERKS (8) que, em 1949, estudou 20 variedades de soja, com respeito à quantidade de proteína e valor nutricional, entre outros.

Os concentrados e isolados protéicos, comercialmente disponíveis, contêm aproximadamente 70 e 90% de proteína, respectivamente, e sua qualidade nutricional pode ser aumentada pela adição de determinados aminoácidos, como metionina, ou através de formulações com outras fontes protéicas complementares. Geralmente esses produtos são preferidos porque oferecem, ao processador, um alto conteúdo de proteína, por unidade de volume, além das propriedades funcionais desejáveis (166).

A preferência de uma matéria-prima sobre a outra, para fins de hidrólise enzimática, talvez se deva à solubilidade das proteínas, sendo que a região isoelétrica das proteínas da soja está em torno do pH 4 a 5 (304) e sua máxima solubilidade em pH 8. Assim, os concentrados e isolados protéicos têm máxima solubilidade em pH 8 e, os proteinatos a pH neutro (243, 253).

A nível comercial, a solubilidade das proteínas é expressa em termos de percentagem, tal como o índice de solubilidade de nitrogênio (NSI) ou o índice de dispersibilidade protéica (PDI) (18), o que significa que determinadas frações da proteína são solúveis, em condições específicas; esses parâmetros são de grande valor, porque fornecem uma estimativa do grau de desnaturação das proteínas (7).

As proteínas globulares nativas geralmente são resistentes à proteólise. Essa relativa resistência à proteólise pode ser explicada pela estrutura terciária compacta da proteína que protege muitas ligações peptídicas; no entanto, na proteína, já desnaturada, essas ligações peptídicas se encontram expostas à ação enzimática (7).

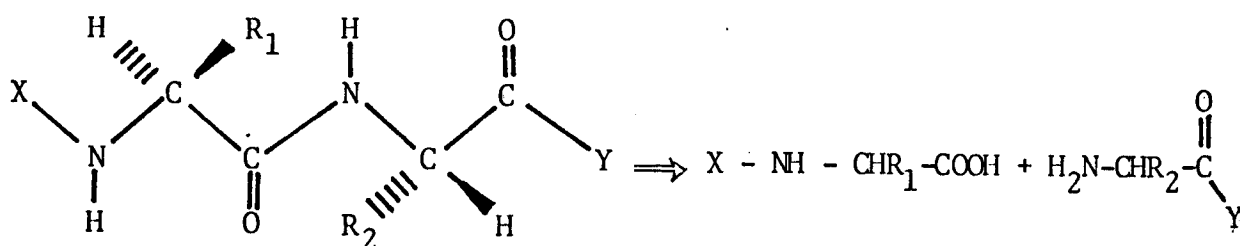
As proteínas da soja têm sido objeto de vários estudos, visando modificar suas propriedades funcionais, mediante reações químicas como a acetilação, succinilação e carboximetilação (276), sem se chegar a comprometer o valor nutricional (105). Tanto a acetilação como a hidrólise enzimática, seguida de ressíntese pela reação da plasteína, aparentemente minimizam os problemas do saboroma desagradável (165).

2.3.2 Enzimas proteolíticas usadas na produção de hidrolisados protéicos

O processamento dos lipídios e carboidratos são ocasionalmente modificados com a intenção de se obter as características mais desejáveis do alimento. Embora tecnicamente seja factível modificar as propriedades funcionais, inclusive nutricionais da proteína, tais transformações são muito restritas na prática.

As propriedades funcionais e nutricionais das proteínas podem ser melhoradas pelo uso de enzimas específicas que as hidrolisam parcialmente, promovem ligações cruzadas entre proteínas, adicionam-lhes grupos funcionais específicos (287) ou regeneram ligações peptídicas, mediante a reação da plasteína (20, 21, 76).

A hidrólise das proteínas é talvez a transformação enzimática mais aceita para melhorar a qualidade das proteínas. Essa hidrólise envolve a ação de enzimas proteolíticas, selecionadas para romper ligações específicas da proteína, trazendo diminuição no tamanho e aumento na solubilidade da mesma (287). Sua ação pode ser representada pela seguinte reação: (289):



onde a natureza química das cadeias laterais. R_1 e R_2 é o principal fator responsável pela especificidade da enzima. Também são importantes o tamanho da cadeia e a natureza dos grupos X e Y que determinam se a enzima é uma endo ou uma exo-peptidase (289).

Das várias funções das enzimas proteolíticas, listadas na Tabela 8, as mais utilizadas comercialmente estão na indústria de cerveja (processo "chillproofing"), na produção de queijo, no amaciamento de carnes e na produção de hidrolisados protéicos. Por outro lado, as áreas de maior pesquisa, na atualidade, são o uso de enzimas proteolíticas na reação da plasteína e a solubilização de proteínas animal e vegetal.

As enzimas que têm sido utilizadas para a produção de hidrolisados protéicos de soja são principalmente:

- a) Alcalase 0,6L (6, 142, 195): é uma serinoprotease do *Bacillus licheniformis*, sendo classificada como Subtilisina Carlsberg (210).
- b) Protease Ácida A-12 da *T. sanguinea* (Takeda Chem.Ind. Ltda. Osaka, Ja.) (266).
- c) Protease neutra do *A. orizae* (226).
- d) Pankreasproteinase A e Bakterinoproteinase N, da Röhm CmbH, Darmstadt; FAAN tipo A e Sauce Protease SPR da Schweiz Ferment A, G; HT Proteolytic 200 da

TABELA 8. Funções das enzimas proteolíticas utilizadas na modificação das proteínas (a).

Alimento	Propósito ou ação
Massas ("naked goods")	Abrandar e aumentar a extensibilidade; melhorar a textura e volume; liberar α -amilase.
Cerveja	Desenvolver corpo, gosto e sabor durante a fermentação; ajudar na filtração e clarificação.
Cereais	Modificar as proteínas para aumentar a velocidade de secagem; melhorar as características de manuseio do produto; miso e tofu.
Queijo	Coagular caseína; desenvolver sabor e gosto característicos durante o envelhecimento.
Chocolates	Ação durante a fermentação
Ovos e seus produtos	Melhorar as propriedades e secagem.
Alimentos para animais	Converter sub-produtos para alimentos animais, adjuvantes digestivos particularmente para porcos.
Pescado	Solubilizar concentrados protéicos; recuperar óleos e proteínas das partes não comestíveis.
Sementes oleaginosas	Remover o sabor e gosto indesejáveis de hidrolisados protéicos, formação de plasteína, inibição específica de enzimas proteolíticas e amilases.
Carnes	Amaciar e recuperar proteínas dos ossos.
Leite	Coagulação.
Hidrolisados protéicos	Condimentos, sopas desidratadas, pós para sucos e molhos, carnes processadas, dietas especiais.
Vinhos	Clarificação.
Produtos vários	Conversão de zimôgenes para enzimas ativas, etc.

a) Reproduzido com adaptação da referência bibliográfica (287).

Takamine Miles Lab. Inc., Rhozyme P-53 con. da Rømh & Hass, Philadelphia (87, 217).

- e) Pepsina 3X cristalizada da ICN Pharm. Inc. (92, 100, 155, 261, 294, 306).
- f) Tripsina (100, 129, 155, 213).
- g) Proteinase ácida e Carboxipeptidase IV ácida do *A. orizae*-460 (156, 187).
- h) Molsina, Aspergilopectidase-A ácida da Seishin Sei yaku Co. Ja. (195).
- i) Molsina, Aspergilopectidase-A cristalizada; carboxipeptidase ácida (19, 195).
- j) Papaína (Difco Lab.), Bromelina (Nutri. Bioch. Corp.), Rapidase da *T. sanguinea* ou Protease ácida-A12, Coronase do *R. WR-35*, Prozyme do *Streptomyces* nº1033; Takadiastase-SS do *A. orizae*; Termoase PC-10, uma proteína bacteriana termofílica; Proteinase alcalina do *B. subtilis* (Daiwa Kase Co.); Pronase do *S. griseus* (Kahen Kagaku Co.); Biopraxe do *B. Subtilis* (Nagase Sangyo Co.) (93, 100, 200).
- k) Denapsina-10P (Nagase Enzyme Ja. Lab, Okochi), proteína ácida do *R. chinensis* (179, 180, 214, 256).
- l) Protease fúngica neutra produzida pelo *A. orizae* (179, 180).
- m) Neutraxe (Novo Ind.) (198).
- n) α -quimotripsina (213).

Uma das razões porquê se procura modificar as proteínas é a de melhorar suas propriedades funcionais e nutricionais (287);

entre estas últimas, podemos mencionar as seguintes (136): a) absorção de água e ligação de água, b) viscosidade, c) solubilidade, d) geleificação, e) adesão e coesão, f) elasticidade, g) emulsificação, h) absorção de gorduras, i) ligação do sabor e gosto, j) espumação e k) cor.

Dentre as propriedades funcionais das proteínas que resultam melhoradas com o processo de hidrólise parcial, podemos mencionar cinco como sendo as mais importantes: solubilidade, viscosidade, geleificação, ligação do sabor e gosto e a espumação (136). É necessário lembrar, porém, que tais propriedades não somente dependem dos atributos físicos intrínsecos da proteína, como sua composição, sequência de aminoácidos, conformação e estrutura, mas também das interações com os demais componentes do sistema, como a água, tipo de íons, poder iônico, temperatura, pH, lipídios, carboidratos, saborizantes.

Durante anos, associou-se o sabor amargo de hidrolisados protéicos apenas com a natureza da enzima (122, 135, 239, 299). A característica de amargor de alguns proteolisados, porém, depende em muito do substrato e pouco da enzima (239). Como é de se esperar, é então normal encontrar dados muitas vezes contraditórios. Assim, por exemplo, existem relatos de que as proteínas da soja produzem hidrolisados amargos ao serem tratadas com enzimas ácidas (239), enquanto que outros autores recomendam o uso de enzimas ácidas justamente para se obter hidrolisados com sabor brando (180). Por outro lado, dois substratos diferentes, como são a caseína e a gelatina, ao serem tratados com a mesma enzima, podem produzir hidrolisados com sabor brando ou neutro (287).

A proteólise enzimática alcalina também tem sido apon-tada como produtora de hidrolisados com sabor amargo (100), não

obstante proteolizados sem sabor amargo já terem sido obtidos ao se tratarem proteínas da soja com enzimas alcalinas (6, 210, 237). Isto é evidenciado pelo número de patentes registradas na literatura sobre o particular (107, 131, 139, 193, 227, 305).

Encontram-se comercialmente disponíveis enzimas provenientes de microrganismos, como as dos gêneros *Aspergillus*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* (6, 78, 94, 123, 165, 180, 210, 226). As enzimas do gênero *Bacillus* são conhecidas por diversos nomes comerciais e isso dificulta sua identificação, como é o caso da enzima alcalina E.C. 3.4.4.16 do *B. subtilis*, que é da mesma família do *B. pumilis* e do *B. licheniformis*. Esta serino-protease é conhecida como Alcalase ou Subtilisina Carlsberg ou Subtilisina A ou Subtilisina ou Subtilopeptidase A (210). A Alcalase, uma preparação líquida da Novo Industri, apresentou elevada atividade proteolítica sobre as proteínas de milho (12% de grau de hidrólise, GH), algodão (7% de GH), caseína (14%GH), soja (12%GH), trigo (10%GH) e gelatina (4%GH), em 180 min de digestão (6), produzindo hidrolisados de sabor neutro (142).

2.3.3 Processos Utilizados na Obtenção de Hidrolisados Enzimáticos das Proteínas da Soja.

MORETTI (179), trabalhando com farinha desengordurada de soja e a enzima ácida Denapsina-10P, determinou o grau de hidrôlise (GH), mediante curva de hidrólise obtida suspendendo a farinha em solução aquosa, nas seguintes condições: Relação enzima/substrato 2:100, pH = 3,0, 42°C, 4 horas de duração com agitação constan.te.

Amostragens foram feitas em tempos de 0, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min de digestão; inativou-se cada amostra pela adi-

ção de ácido tricloroacético e, depois da filtragem, foi lida a absorbância a 280 nm. Paralelamente determinou-se o conteúdo de nitrogênio total por microkjeldahl e, dos dois resultados, obteve-se o grau de hidrólise e a destruição do fator anti-tríptico.

ADLER-NISSEN (4) propôs um método para determinar o grau de hidrólise, no qual o hidrolisado é inativado em solução de dodecil sulfato de sódio e, depois de tamponado o meio, com solução de fosfato, é adicionada uma solução de ácido trinitrobenzensulfônico (TNBS), permitindo-se reagir no escuro, por 60 min a 50°C. Depois da adição de HCl, é lida a absorbância a 340 nm. A partir da curva-padrão de leucina, são obtidos os equivalentes amino (Leu - NH₂) liberados durante a hidrólise.

O grau de hidrólise pode também ser obtido com um processo de monitoração do pH (201, 205, 206), em que o substrato é enzimaticamente hidrolisado, em determinado valor de pH superior ao valor do pK do grupo amino (pK = 7,1 a 50°C). Neste processo o pH, que tende a diminuir com a digestão, é mantido constante pela adição de base (NaOH) e o grau de hidrólise é calculado pelo emprego da seguinte expressão (5, 201):

$$GH \% = B \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{NB}{MP} \times \frac{1}{h_T} \times 100$$

onde:

B = consumo de base (em litros)

α = grau de dissociação

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

NB = normalidade da base

MP = massa da proteína (kg)

h_T = número total de ligações peptídicas, em equivalentes por kg de proteína. No caso das proteínas de soja, apresentam-se valores entre 7,75 e 8,00

O grau de hidrólise também pode ser definido (7, 201) como sendo:

$$GH \% = \frac{\text{Número de ligações peptídicas rompidas}}{\text{Número total de ligações peptídicas}} \times 100$$

$$GH \% = \frac{\text{Peso mol. médio dos resíduos de aminoácidos}}{\text{Peso equivalente dos grupos finais formados}} \times 100$$

O grau de hidrólise pode ser calculado empiricamente pela seguinte relação (7, 201):

$$GH \% = (h) (h_T)^{-1} (100)$$

onde:

$$h = B \times \frac{NB}{M \times (S\%/100)} \times \frac{\text{meq. aminoácidos}}{\text{g proteína}}$$

h = equivalentes de hidrólise, obtido experimentalmente

M = massa reagente total

$S\%$ = substrato

A desnaturação do substrato pelo calor ou pela ação de solventes, como o etanol ou outros de menor polaridade que a água, pode ser de utilidade para aumentar o grau de hidrólise (239). Tem-se verificado igual efeito com o uso de soluções salinas (202), em pH alcalino ou ácido (100).

É necessário que a atividade das enzimas, em uso, seja testada experimentalmente com o método fornecido pelo produtor ou por outro método confiável e amplamente aceito, como é o método de ANSON (15); isto leva à determinação das unidades enzimáticas que ainda não foram padronizadas, ficando a critério de cada experimentador a adoção da magnitude das unidades enzimáticas (32).

Um hidrolisado enzimático das proteínas da soja para testes sensoriais foi produzido a partir de farinha desengordurada de soja e Denapsina-10P (179). As amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo, tiveram seu pH ajustado para 5,0 e os sobrenadantes inativados foram dados a um painel de provadores que os compararam com os sabores do feijão crú, amargo e adstringente. Os resultados demonstraram que, a partir de 4 horas de hidrólise, não foi possível distinguir no hidrolisado nenhum dos sabores da escala proposta.

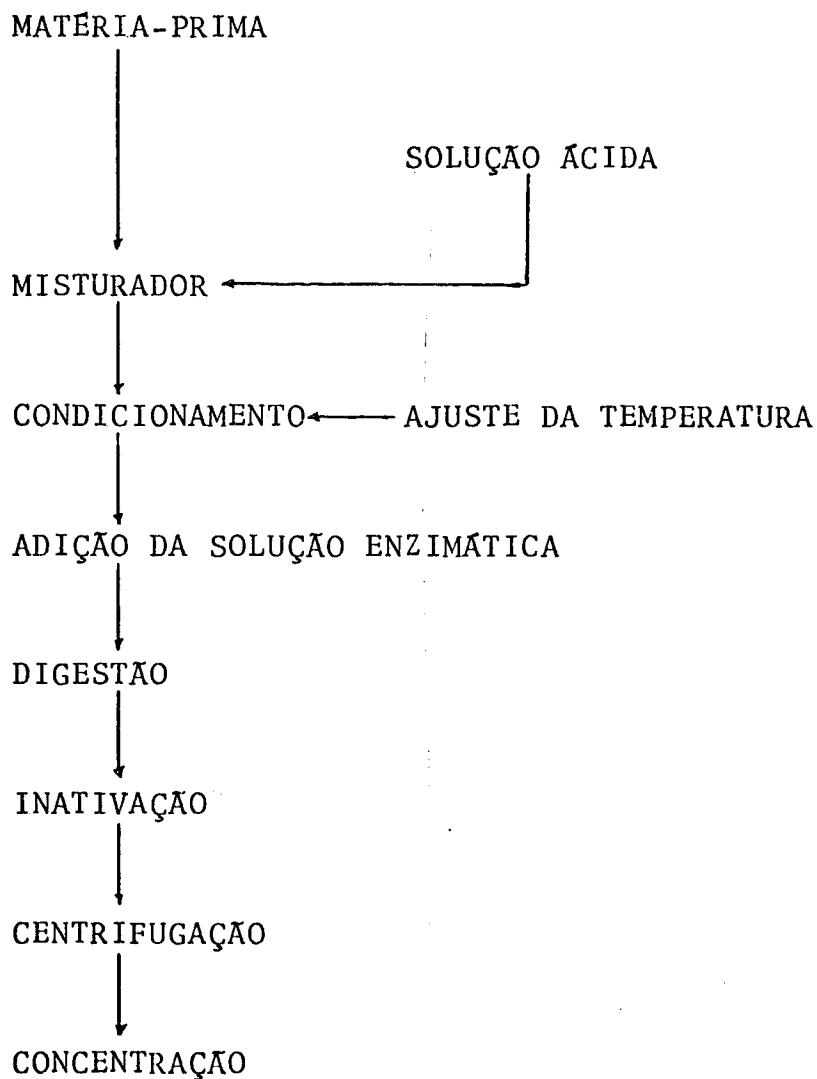
A hidrólise enzimática do proteinato de sódio (Promine-D) com enzimas ácidas produziu um hidrolisado de sabor amargo intenso depois de 24 horas de hidrólise. No entanto, nos hidrolisados das enzimas alcalinas esse sabor desapareceu apenas com a segunda hora de digestão (93). Para o teste sensorial, as amostras foram retiradas da massa reatante, liberadas dos sólidos, inativadas em água fervente por 15 min e ajustadas para pH 6,0.

MORETTI (179, 180) descreveu um processo de obtenção de hidrolisado enzimático das proteínas da soja em escala piloto, cujo fluxograma operacional se esquematiza na Figura 2.

A mistura, o condicionamento e a digestão foram realizadas em tacho basculante, com camisa de vapor com capacidade para 120 litros e munido de agitador tipo âncora. O tempo de digestão

foi de 5 horas e a inativação foi a 95°C por 10 min. A separação dos sólidos do líquido foi feita em centrífuga ejetora de sólidos e centrífuga horizontal Super D Center Sharples. O uso dessas centrífugas é adequado para separar fases sólidas de líquidos, onde as partículas sólidas têm maior densidade do que a fase líquida (211, 212).

FIGURA 2. Fluxograma operacional do processo de obtenção do hidrolisado enzimático das proteínas da soja em escala piloto (179).



A concentração do sobrenadante foi realizada em evaporador radial ("Centri Term CT-1B-Alfa Laval") a 44°C até a concentração final de 50^oBrix. O processo descrito é detalhado pelo seu autor como sendo em batelada e, dentro deste, diferencia-se um processo que inclui lavagens do precipitado e outro que não efetua essa lavagem. Assim como PEZOA (214), MORETTI (179, 180) usou também um reator enzimático com membrana ultrafiltrante em escala piloto, sendo seus resultados apresentados na Tabela 9.

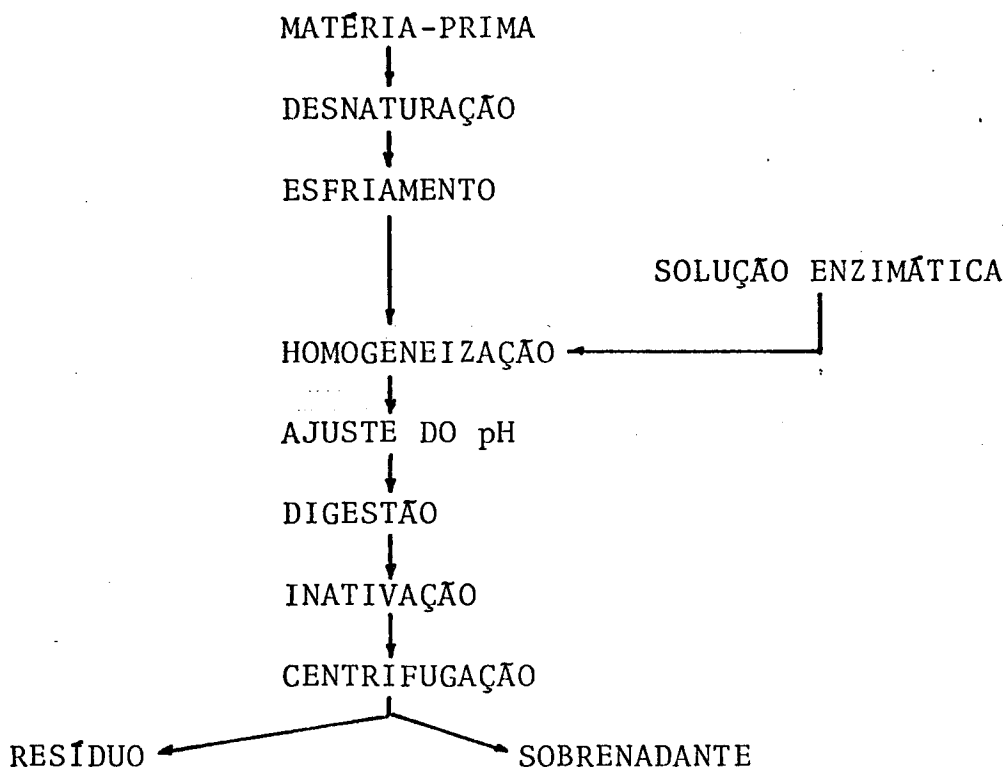
TABELA 9. Rendimentos na recuperação de proteína de soja hidrolisada utilizando-se diferentes processos sobre a farinha de soja desengordurada.

Processo	Rendimento (%)
Batelada sem lavagem	35,05
Batelada com lavagens	48,61
Ultrafiltrante	7,28

O hidrolisado protéico, obtido em escala piloto com o processo em batela, teve as seguintes características (179): pH=3,3; sólidos solúveis = 54,8%; proteína = 36,0%; viscosidade = 450 cSt; sabor neutro. Este mesmo hidrolisado, após liofilizado, apresentou a seguinte composição centesimal; Proteína = 65,63% (N x 6,25); carboidratos 25,85%; cinzas = 5,83%; lipídios = 0,45% e umidade = 3,00%.

O processo enzimático para obtenção de hidrolisado das proteínas da soja, descrito por SUJIMOTO *et alii* (266), pode ser representado na Figura 3.

FIGURA 3. Diagrama de fluxo para o processo de obtenção de um hidrolisado enzimático brando.

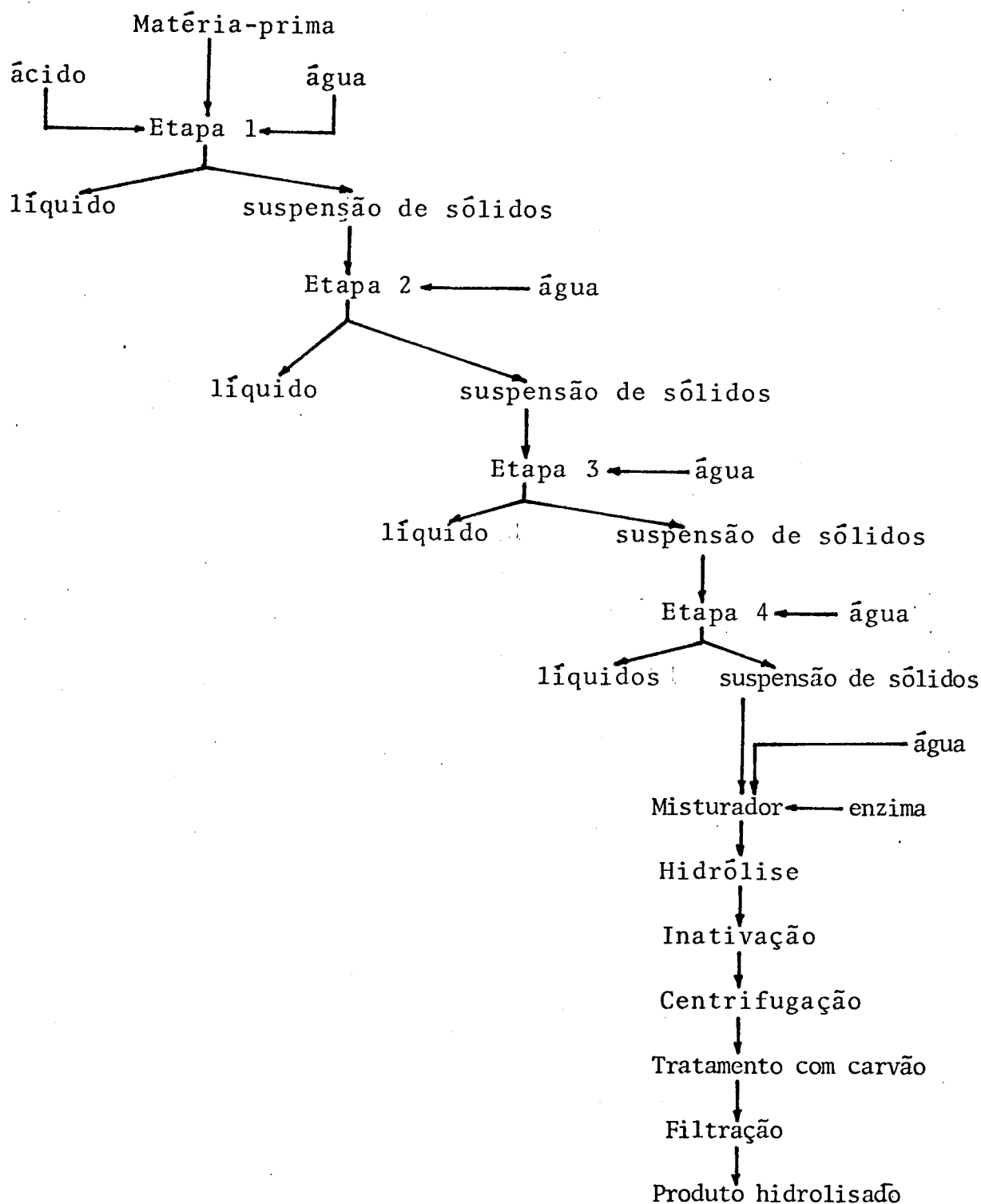


Mediante o processo esquematizado na Figura 3, usando-se como matéria-prima o Promine-D, a desnaturação foi realizada por autoclavagem a 121°C por 4 min; o ajuste do pH foi feito mediante a adição de suco concentrado de limão até um pH 3,3, sendo a enzima a protease ácida da *T. sanguinea*. A reação se manteve a 50°C por 8 a 10 hrs, com constante agitação. A inativação se efetuou em água fervente por 5 min.

A produção industrial de hidrolisado enzimático das proteínas da soja, utilizando um processo de "pH stat", pode ser descrito com o fluxograma da Figura 4.

A matéria-prima utilizada para esse processo foi a farinha desengordurada. As etapas 1 até 4 são para a produção do concentrado protéico e podem ser eliminadas partindo-se do isolado

FIGURA 4. Diagrama de fluxo para a obtenção de hidrolisado enzimático das proteínas da soja, mediante processo tipo "pH stat" (a).



(a) Diagrama compilado das seguintes referências bibliográficas(6, 7, 205, 206).

protéico. A enzima utilizada foi a alcalase a pH em torno de 8,0 e temperatura de 50°C. A hidrólise foi mantida por 3 horas, atingindo cerca de 10% GH. Inativação enzimática foi conseguida mediante a adição de ácido málico ou por elevação da temperatura a 70°C, por 10 min (226). A centrifugação foi realizada em centrífuga ejetora de sólidos, tipo Westfalia SAMR. O tratamento com carvão foi para remoção de odores e sabores estranhos residuais, com este processo, obteve-se um hidrolisado que, sem concentração, apresentou as seguintes características: pH = 4,0 - 4,2; proteína = 3%. Depois de concentrado em evaporadores de filme descendente, o produto pode atingir cerca de 40% de matéria seca ou pode ser concentrado por osmose reversa até 20% de matéria seca. O mesmo também pode ser seco por atomização, onde se obteve um produto com densidade de 0,5 g/mL (205, 206). Para o processo acima citado, que fornece 10% GH, geralmente é obtido entre 65 a 75% de proteína solubilizada a pH 4,2 (205).

Usando um processo semi-contínuo, mediante reator de ultrafiltração, obteve-se hidrolisado enzimático das proteínas da soja com os seguintes parâmetros operacionais: S = 1%, E = 0,572mg/mL (Alcalase ou Pronase), pH = 8,0, T = 50°C, tempo = 5 horas/batida; O hidrolisado apresentou elevado teor de cinza (10%), com faixa de pesos moleculares em torno de 2500 (64). A ultra-filtração parece útil na preparação de hidrolisados enzimáticos, com pesos moleculares homogêneos com as vantagens de reuso da enzima, proteínas e polipeptídeos de tamanhos maiores (49, 180). O sistema, apresenta porém, algumas limitações fundamentais, no que se refere à enzima e à membrana ultra-filtrante (64, 180, 237).

Os hidrolisados protéicos vegetais (HVP), comercialmente produzidos, apresentam as pirazinas alquiladas. como a maior

fração volátil alcalina. Outros constituintes voláteis, também detectados foram: p,m-cresóis, 5-metilfurfural, benzaldeído, O-metoxifenol (158), ácido levulínico, duas lactonas, quatro fenois e 13 ácidos orgânicos (157). Por sua vez, os componentes voláteis, identificados no hidrolisado enzimático das proteínas da soja, foram álcoois, aldeídos de baixo peso molecular, ésteres, fenóis e ácidos graxos (162).

Na obtenção de hidrolisado protéico vegetal (HVP), o agente hidrolítico mais usado é o HCl diluído (74, 75, 104, 265), podendo também ser usados o ácido fosfórico (74, 75) e ácidos orgânicos (265). Após a hidrólise, é necessário um tratamento de descoloração (carvão ativado), seguido das etapas de neutralização, concentração e secagem (104, 265). O HVP eficientemente reproduz as propriedades do monoglutamato de sódio (MSG), tão largamente usado na formulação de sopas, molhos, carnes, "snack foods" e alimentos formulados (14).

2.4 Propriedades Nutricionais do Hidrolisado Protéico

Os hidrolisados enzimáticos das proteínas de soja têm sido avaliados em estudos de balanço nitrogenado, usando-se ratos, e as suas propriedades nutricionais são apresentados na Tabela 10.

Como pode ser observado, tanto o valor biológico, como a utilização líquida de proteína do isolado e do concentrado protéico, diminuem após a hidrólise enzimática da proteína. Quando o substrato foi o isolado protéico, a diferença foi mínima e houve inversão do valor do NPU. No entanto, a digestibilidade in vivo dos produtos hidrolisados foi aumentada.

TABELA 10. Avaliação biológica de proteínas alimentícias e hidrolisados enzimáticos (a).

Fonte protéica	TD	BV	NPU
Isolado protéico de soja (IPS)	81	53	43
Hidrolisado enzimático do IPS	91	49	44
Concentrado protéico de soja (CPS)	87	69	60
Hidrolisado enzimático do CPS	93	55	52
Caseína (padrão)	89	80	72

a) Dados extraídos das referências (6, 205).

TD = digestibilidade verdadeira (%)

BV = valor biológico (%)

NPU= utilização líquida de proteína (%)

A proteólise péptica e triptica in vitro dos hidrolisados enzimáticos da farinha desengordurada da soja foi também maior que na própria farinha desengordurada de soja, ao passo que, por determinação gás-cromatográfica dos aminoácidos, demonstrou-se que a hidrólise enzimática não modifica o aminograma das matérias-primas (179, 180).

A composição de um hidrolisado enzimático de proteínas de soja, produzido tanto industrialmente (154) como em escala semi-industrial (142), é apresentada nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 11. Composição centesimal de hidrolisado enzimático das proteínas da soja (a).

Componentes	Porcentagem
Nitrogênio total	1,21
Nitrogênio aminoacídico	0,86
Carboidratos	4,12
Compostos nucleicos	0,18
Lipídios	0,43
Cinza	10,0
Sólidos totais	17,23

(a) Dados reproduzidos da referência (154).

TABELA 12. Composição em aminoácidos do hidrolisado enzimático do isolado protéico de soja (g/16g N).

Aminoácidos	A	B
Ácido aspártico	12,57	12,05
Treonina	3,69	3,44
Serina	5,43	4,75
Ácido glutâmico	21,17	23,17
Prolina	5,22	5,00
Glicina	3,89	3,79
Alanina	3,86	3,55
Valina	4,82	4,44
Metionina	1,09	1,16
Isoleucina	4,75	4,18
Leucina	8,29	7,08
Tirosina	4,00	3,19
Fenilalanina	5,30	4,79
Lisina	6,45	6,24
Histidina	2,20	2,56
Arginina	7,74	7,76
Cistina	1,40	0,89
Triptofano	1,08	1,08

A = Hidrolisado enzimaticamente com a Alcalase 0,6L (142).

B = Hidrolisado enzimaticamente com Denapsin-10P (179).

O PER do isolado protéico de soja pode ser melhorado de 1,33 para valores que variam entre 1,37 (185) a 1,87 (161) no hidrolisado enzimático, ou ainda para 2,23, se o mesmo for suplementado com metionina (185). É possível, pelo menos tecnicamente, melhorar ainda mais o PER para 3,38, usando-se a reação da plasteína para ressintetizar uma nova proteína (91). Esses valores, quando comparados com o valor de 2,5 para a caseína, revelam que o hidrolisado enzimático, sem suplementação, possui um valor máximo de 75% do PER da caseína.

2.5 Aplicação dos Hidrolisados Enzimáticos

A produção dos hidrolisados protéicos por enzimas objetivam geralmente usos nobres, como a formulação de alimentos convencionais e terapêuticos-dietéticos. Recentemente, cita-se que os hidrolisados enzimáticos de proteínas de soja podem ser usados como agentes antioxidantes, dado o seu poder sinérgico com o BHT e o BHA; atribui-se, esse efeito, à presença de peptídeos pequenos e de aminoácidos livres (106, 270, 302). Sabe-se que alguns aminoácidos, como a cisteína e a metionina, podem agir como catadores de radicais livres.

Os hidrolisados enzimáticos das proteínas de soja foram usados como nutrificantes protéicos para bebidas não carbonatadas (6, 136, 200) e carbonatadas (167) e bebidas de frutas onde agem também como preservante da fruta fresca (6, 136, 200). Noutros casos podem também ser usados como agentes aerantes (136) e geleificantes (220). Para usos menos nobres, têm sido propostos como ingredientes na formulação de misturas para extintores de incêndio (113).

Sendo boa fonte de peptídeos e aminoácidos livres, os hidrolisados protéicos possuem grande potencial na elaboração de

dietas ricas em oligopeptídeos de fácil digestão e absorção que sensivelmente melhoram os índices antropométricos de pacientes com eles alimentados (42), e podem ser de utilidade na alimentação parenteral (143).

Um dos problemas, na elaboração dos hidrolisados proteicos, é o aparecimento de certos peptídeos que conferem sabor amargo ao hidrolisado como um todo. Até hoje, melhores teorias apontam a hidrofobicidade elevada dos aminoácidos que constituem esses peptídeos, como a responsável pelo sabor amargo (190). Na prática, se bem que até hoje foi impossível impedir a liberação desses peptídeos, a mesma pode ser minimizada controlando-se o grau de hidrólise (5).

A formulação de produtos com base em hidrolisados enzimáticos de proteínas abrange uma ampla gama de produtos, podendo ir desde bebidas tipo refrigerante, até os condimentos (217, 245, 275, 287), sopas desidratadas, sucos de carne em pó, carnes processadas, dietas especiais (288), cereais para desjejuns (224) ou imitações do leite (230).

Hidrolisados enzimáticos de proteínas de soja foram usados para preparar bebidas enriquecidas a um nível de 1,5 a 3,5% de proteína em bebidas cítricas, mas não apresentaram boas qualidades sensoriais (152); no entanto os formulados com saborizantes artificiais foram bem aceitos (96). Formulação de hidrolisado enzimático com sal, caramelo e xarope de milho, reproduz o tradicional molho de soja oriental (207); e sopas formuladas com hidrolisados enzimáticos, desidratados, são um bom veículo para enriquecimento com minerais e aminoácidos (218).

O interesse industrial pelos hidrolisados proteicos (HVP) como aditivo aumentou grandemente depois que IKEDA (1908) des

cobriu que o MSG era o maior componente dos hidrolisados protéicos. A importância econômica dos HVP, como ingrediente alimentar, se exemplifica pelo volume de produção que, em 1979, nos EEUU, se estimou em aproximadamente 55.000 ton (207).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado foi o de uso comum como vidraria Pyrex e instrumentos de uso diário. Apenas nos casos especiais se mencionará a natureza do material. Os reagentes, solventes e produtos químicos foram de grau analítico (p.a) de diversas procedências comerciais.

3.1 Matéria-Prima

O resíduo do extrato hidrossolúvel da soja em forma de pó, comercializado com o nome de "Protideal", foi doação da Empresa Olvebra S.A Indústria e Comércio. As amostras foram enviadas em sacos plásticos de 5 kg de capacidade e, aproximadamente 3 dias após a data de seu processamento, foram armazenadas em sacos de 1 kg, na temperatura de 0°C até sua utilização. Essas amostras foram denominadas "RES".

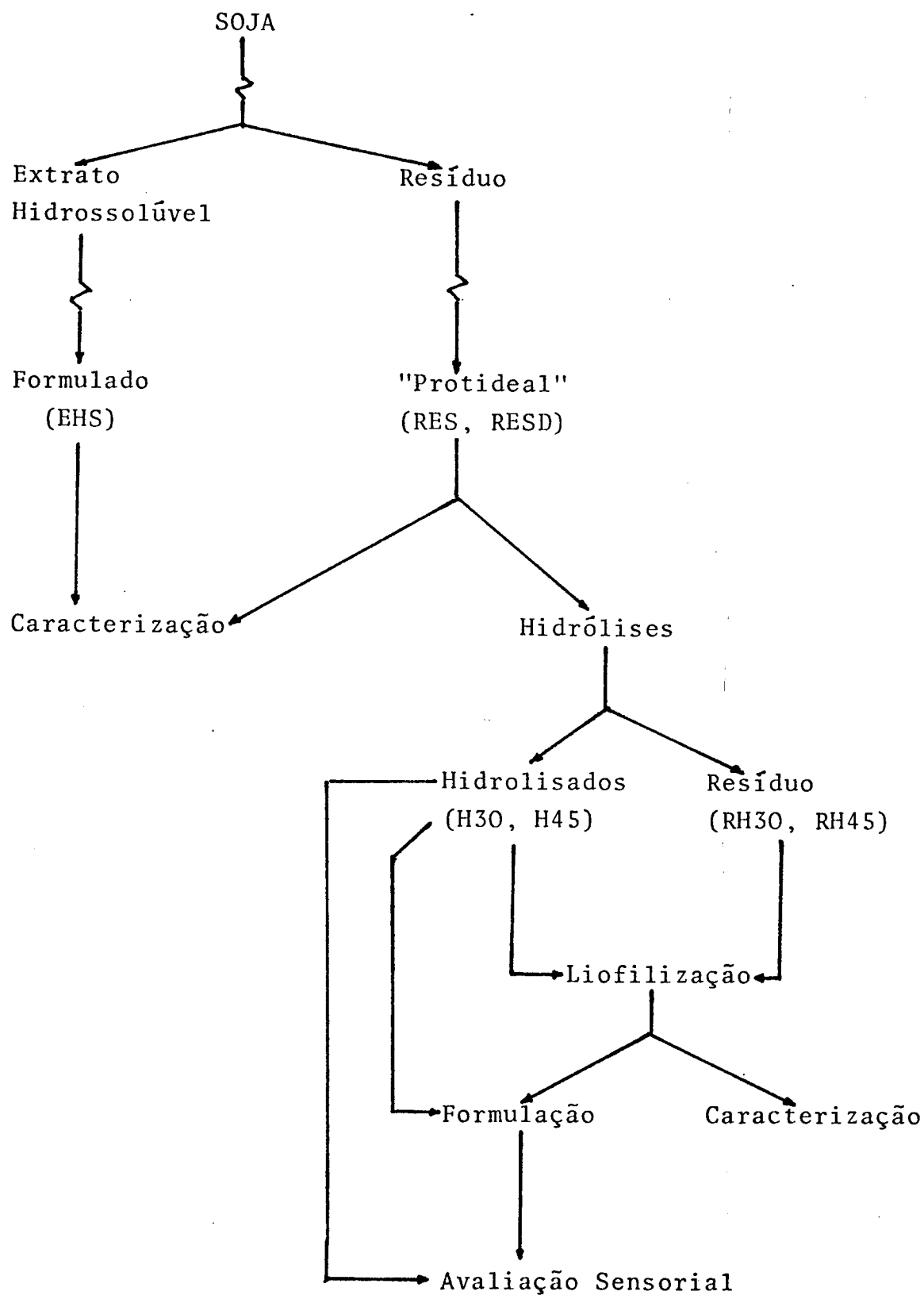
Na Figura 5, se apresenta o diagrama dos processos a serem estudados.

3.2 Caracterização Granulométrica do RES

O resíduo RES foi separado em frações de diferentes tamanhos de partículas, mediante peneiragem usando-se um agitador Produtest, com as seguintes condições de operação:

- peneiras de 35, 48, 65, 100, 150 mesh
- quantidade de amostra 100,0 g
- vibrações = 100 por segundo
- tempo = 10 min

FIGURA 5. Diagrama esquemático do estudo do resíduo do extrato hidrossolúvel da soja (a).



a) A definição das siglas encontram-se no texto.

3.3 Caracterização da Composição Centesimal Aproximada do RES

Para determinar a composição centesimal, foram usados os métodos analíticos recomendados pela literatura especializada (1). Para o resíduo integral RES se determinou:

- umidade e material volátil (Mét. AACC nº 44-31)
- extrato lipídico (Mét. AACC nº 30-26)
- fibras (Mét. AACC nº 32-17)
- cinzas (Mét. AACC nº 08-16)
- carboidratos totais por diferença
- proteína total (%N x 6,25), método Nº 46-13 usando

uma mistura catalizadora de sulfato de cobre, sulfato de potássio e di-óxido de titânio, como mistura eficiente, barata e não tóxica (293). O fator de conversão utilizado foi de 6,25, já que existem divergências quanto ao melhor valor para as proteínas da soja. Esses valores variam entre 5,64 e 6,84 (183).

3.4 Determinação do Índice de Solubilidade de Nitrogênio (NSI)

O NSI foi determinado segundo os métodos Nº Ba 11-65 (18), Nº 46-23 (1, 254), modificados apenas no que diz respeito ao uso de agitador magnético, em vez de agitador mecânico, e à determinação do $N_T\%$ por microkjeldahl.

3.5 Determinação do Índice de Dispersibilidade Protéica (PDI)

O PDI foi determinado segundo os métodos Nº Ba 10-55 (18), Nº 46-24 (1, 254), modificados apenas no emprego de liquidificador de uso doméstico, em vez de "waring blender", e na determinação do $N_T\%$ por microkjeldahl.

3.6 Obtenção do Resíduo Desengordurado "RES D"

O resíduo RES foi submetido a uma extração com solventes, com a finalidade de torná-lo farinha desengordurada. Para tal finalidade, foi realizada a extração em forma contínua com percolação do éter de petróleo 30-60° por 6 a 8 horas, desolventizando-o em estufa com circulação forçada de ar a 40-50°C por 2 horas. Fim do esse período, o resíduo foi homogeneizado mecanicamente, apresentando-se como pó fino, seco e inodoro. Este resíduo desengordurado foi codificado como RES D para seu posterior estudo.

3.7 Determinação das Atividades Enzimáticas

Foram determinadas as atividades das enzimas: Pepsina, Denapsina-10P e Papaína com a finalidade de padronizar as unidades enzimáticas, de acordo com as unidades estabelecidas para a enzima Alcalase 0,6L (6, 197, 198, 199, 200), que são:

- a) Unidade Anson (AU), definida como a quantidade de enzima que inicialmente digere seu substrato liberando uma quantidade de produtos correspondentes à absorvância de 1,0 miliequivalente de tirosina por minuto (6, 15).
- b) Atividade Real (A'/E) = (AU)/g enzima.
- c) Atividade específica = (AU)/mg nitrogênio.

3.7.1 Determinação do Nitrogênio Total ($N_T\%$) das Enzimas

Determinou-se o $N_T\%$ mediante o método de microkjeldahl, usando a mistura catalizadora de TiO_2 (293).

- a) Pepsina (E.C. 3.4.4.1 (29) da Sigma N° P7000).
- b) Papaína (E.C. 3.4.10 (29, 91) da Sigma N° P3375).
- c) Denapsina-10P (PM. 35.000 (256) do Lab. Okochi Ltda).
SP.

3.7.2 Preparo de uma Curva-Padrão de Tirosina

A curva-padrão para tirosina (T) foi preparada segundo o método de Anson (15), pelo qual uma solução de tirosina p.a (Carlo Erba), em HCl-formaldeído, foi tratada com o reagente fenol (1+1) em meio alcalino, com leituras das absorbâncias no comprimento de onda de 660 nm. A curva se obteve graficando absorbâncias contra concentração, até $1,0668 \times 10^{-3}$ meq. de tirosina.

3.7.3 Atividade Enzimática da Pepsina

Na determinação da atividade enzimática da Pepsina, seguiu-se o método de Anson (15), adaptado no laboratório. Hemoglobina, Hb (Sigma H2625) em solução, foi purificada por diálise em membranas de celofane a 5°C por 48 horas, contra água destilada renovada periodicamente. Após diálise, a proteína foi protegida com solução de timerosal e estocada sob refrigeração; essa solução foi desnaturada à temperatura ambiente com HCl 0,3 N até pH = 1,5 - 1,6 e estocada sob refrigeração por 48 hrs. Teor de proteína final, 2,0%, determinado por microkjeldahl.

Preparou-se uma solução estoque de Pepsina a 20 µg/mL de N em HCl pH 1,6. A partir dessa solução, preparou-se a série padrão de soluções com concentrações crescentes até 6 µg de N. Quando as soluções enzimáticas e a solução de Hb atingiram 35-36°C, as mesmas foram misturadas e deixadas reagir por 10 min. Findo esse

período, adicionou-se solução de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, retirou-se alíquota do sobrenadante clarificado, a qual foi tratada com o reagente fenol (1+1) em meio alcalino e, depois de 10 min, leram-se as absorbâncias a 660 nm.

Segundo Anson (15), a soluçãc-controlé (branco) deve ser sem enzima, quando a enzima usada não for purificada; nesse ensaio foram levados tanto o branco-enzima como o branco-hemoglobina.

3.7.4 Atividade Enzimática da Papaína

Para determinar a atividade enzimática da Papaína, segundo o método de Anson (15), preparou-se uma solução de Hb purificada por diálise e desnaturada com uréia (Merck, p.a) em meio alcalino e pH 10,0, sendo posteriormente neutralizada até pH 7,5 com HCl e estocada sob refrigeração por 24 hrs, com proteção de timerosal. Essa solução apresentou um teor de proteína 2,0% determinada por microkjeldahl.

Preparou-se uma solução estoque de Papaína de 20 µg/mL de N em meio de NaCN a pH 10,0, a partir da qual foi obtida a série de soluções padrão em concentrações crescentes até 4,0 µg de N. Após 30 min de equilíbrio a 25°C, misturaram-se a enzima e seu substrato, deixando-se reagir por 10 min. Após esse período, adicionou-se solução de TCA a 5%, separando os insolúveis depois de 30 min. Alíquotas do sobrenadante em meio alcalino foram adicionadas ao reagente fenol (1+1) e depois de 10 min de reação, leram-se as absorbâncias a 660 nm. Nesse ensaio foram comparados os efeitos do branco-enzima e do branco-substrato.

3.7.5 Atividade Enzimática da Denapsina-10P

Denapsina-10P foi obtida dos Lab. Okochi Ltda SP, na forma de pó marrom preparado a partir de culturas de *Rhizopus cheniensis* (141); segundo seus fornecedores, o método de ensaio usa como substrato caseína a aproximadamente pH 3,0, a 30°C. O método é seguido por vários autores (94, 214, 256), diferindo, porém, quanto ao meio em que a caseína é preparada.

A determinação da atividade enzimática foi feita segundo o método adaptado dos métodos de Anson (15) e de Sodek (256) e que consistiu fundamentalmente no preparo de solução estoque de 20 µg/mL de N enzimático, em água destilada, da qual se prepararam a série de soluções-padrão de concentrações crescentes até 6,0 µg de N enzimático. O substrato foi uma solução de caseína em ácido láctico, ajustado a pH 3,0. O título dessa solução foi 0,6% de proteína. Após equilibrados à temperatura de 35°C, tanto a enzima como seu substrato misturaram-se e deixaram-se reagir por 10 min. A reação foi detida adicionando-se solução de TCA a 5%. Após 30 min, foram separados os sólidos, retiraram-se alíquotas dos sobrenadantes e reagiu-se cada uma com o reagente fenol (1+1) em meio alcalino. As absorbâncias foram lidas a 660 nm depois de 10 min. Nesse ensaio também foram incluídos o branco-enzima e o branco-substrato.

3.8 Métodos para Determinar o Grau de Hidrólise (GH%)

3.8.1 Purificação do Ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS)

O TNBS (Sigma Chemicals) foi purificado segundo o método de Fields (80). A solução concentrada de TNBS é tratada com HCl a 4°C, os sólidos são separados nessa temperatura e o ex-

cesso de $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$ é removido em dessecador sob lentilhas de NaOH . O sólido amarelo-esbranquiçado obtido apresentou um rendimento de aproximadamente 65%.

3.8.2 Determinação de Grupos Amino Livres pela Reação com o TNBS

Para estimar a quantidade de grupos amino livres, produzidos pela reação enzimática, foi necessário se referir a uma curva-padrão preparada pela reação de leucina com o TNBS, segundo os métodos das referências (4, 80), e adaptado no laboratório.

Preparou-se solução estoque 0,1 N de leucina (Sigma Chemicals N° 18000) em dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1,0% em água desionizada. A partir dessa solução, foram preparadas a série de soluções-padrão com concentrações crescentes até $5,00 \times 10^{-4}$ meq. de leucina. Uma alíquota de cada solução foi levada a volume de referência com solução tampão fosfato 0,2125 M e pH 8,2. Solução, recém preparada de TNBS a 0,1% em água deionizada, foi reagida com padrões de leucina e amostras por 60 min a 50°C no escuro e com agitação ocasional. A reação foi detida adicionando-se HCl 0,1 N a todas as soluções, deixando-se em repouso por 30 min na temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas a 340 nm (Carl Zeiss).

3.8.3 Procedimento para Determinar o GH% com o Ácido Trinitrobenzensulfônico (TNBS)

Esse procedimento foi adaptado do método de Adler-Nissen (4), para o qual uma alíquota de 2,0 mL de amostra (massa reagente) foi misturada com 5,0 mL de solução de SDS 1,0%, completando-se o volume até aproximadamente 10 mL com SDS e a mistura aquecida a 75°C por 15 min para inativar a enzima. Depois de esfriar, à tem

peratura ambiente, e separar os sólidos por centrifugação ou filtração em papel (Whatman Nº 1), o sobrenadante ou o filtrado é levado a um volume de 50 mL com SDS 1,0%.

Na determinação espectrofotométrica dos grupos aminas livres formados, retiram-se alíquotas de 0,25 mL dos sobrenadantes ou dos filtrados respectivos e processam-se segundo o método descrito no item 3.8.2. Os grupos aminas livres são quantificados mediante o uso de curva-padrão de leucina e a porcentagem do grau de hidrólise (GH%) é calculada tomando como base as seguintes relações (4, 197, 201):

$$GH\% = \frac{h}{h_T} \times 100$$

$$h = \frac{\text{meq. Leu.}}{\text{g proteína}}$$

$$h_T = \text{hidrólise total} = 7,85 - 8,00$$

meq. Leu. = miliequivalentes de leucina

3.8.4 Determinação do GH% pelo Método da Titulação em Formaldeído ($N_F\%$)

Para determinar o GH% por esse método (125, 257), retiram-se alíquotas da mistura reagente e padroniza-se até um volume referência com solução de formaldeído a 12%, titulando com NaOH 0,100 N em presença de fenolftaleína. É necessário padronizar o método por titulação potenciométrica com solução de glicina 0,100 M. O GH% pode ser calculado mediante a seguinte relação:

$$GH\% = \frac{N_F}{N_T} \times 100$$

onde: N_F = nitrogênio titulado em formol

N_T = nitrogênio total por microkjeldahl

3.8.5 Determinação do GH% Mediante a Reação da Ninhidrina

Para essa determinação, segundo os métodos citados na literatura (93, 304), prepara-se uma curva-padrão de leucina, a partir de solução estoque 0,100 N. Alíquotas das amostras e do padrão diluído (0,05 - 5,6 µg) são tamponadas com solução citrato 0,2 M e pH 5,0 e reagidas com ninhidrina (1,3-diona-2,2-dihidroindano) a 5% em metil cellosolve (monometil éter do etilenglicol, Merck), em meio de KCN por 15 min a 100°C com agitação constante; depois de esfriar em água corrente e levar a volume com etanol (Merck), leram-se as absorbâncias a 570 nm (Spectronic 20, Micronal).

3.8.6 Determinação do GH% com a Reação de Lowry

O GH% foi determinado com o método de Lowry, seguindo as recomendações citadas por outros autores (108, 146, 153). A uma alíquota da amostra ou do padrão adicionou-se solução alcalina de sulfato de cobre e tartarato de sódio, com vigorosa agitação. Após 10 min de reação, adicionou-se o reagente fenol (1+1) sob constante agitação e 30 min depois foram lidas as absorbâncias a 540 nm.

O padrão, utilizado como referência, foi um isolado protéico de soja, preparado no laboratório com essa finalidade, a partir de farinha desengordurada de soja (FDS), segundo método descrito por Nicolas (192).

3.9 Hidrólises Enzimáticas do Resíduo Desengordurado RESD

3.9.1 Ensaios para Determinar a Relação Enzima:Substrato (E/S)

Os ensaios foram realizados com RESD e a Alcalase 0,6L, tendo como parâmetros operacionais os apresentados na Tabela 13.

TABELA 13. Parâmetros operacionais para a hidrólise enzimática do RESD com Alcalase 0,6L.

Parâmetros	I	II	III	IV	V	VI
PR (%)	33,14	33,14	33,14	33,14	33,14	33,14
M (g)	120	120	120	120	120	120
S (%)	2,0	2,5	3,0	3,34	3,5	8,0
MR (g)	7,242	9,05	10,86	12,09	12,67	24,14
MW (g)	112	111	109	108	107	75,86
ME (g)	0,05	0,05	0,05	0,075	0,05	0,075
A/S(AU/g)	0,0141	0,0113	0,0094	0,0127	0,0081	0,0064
E/S (%)	2,35	1,88	1,57	2,115	1,35	1,06
T (°C)	50	50	50	50	50	50
pH	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0

PR = proteína do resíduo; M = massa reagente; S = substrato; MR = massa do resíduo; MW = massa da água (não incluída a água da enzima); A/S = unidades Anson/g de proteína; ME = massa da enzima.

os parâmetros foram calculados mediante as seguintes relações:

$$MR = \frac{M \cdot S\%}{PR\%}$$

$$MW = M - MR$$

$$ME = \frac{M \cdot S\%}{100} \cdot \frac{A/S}{A'/E} = \frac{M \cdot S\% \cdot E/S}{10.000} \cdot \frac{A/E}{A'/E}$$

$$A/E = \text{atividade declarada} = 0,60 \text{ (N17, N10)}$$

$$A'/E = \text{atividade real} = 0,678 \text{ (N17, N10)}$$

A hidrólise se realizou segundo os métodos recomendados na literatura (179, 189, 197, 201) com algumas modificações.

A massa reagente foi condicionada a 50°C por 15 min com agitação constante em reator enzimático com camisa de aquecimento. Após a adição de enzima, à mesma temperatura, se mantiveram constantes a agitação e a temperatura. O pH foi mantido manualmente a pH 8,0 mediante a adição de NaOH e HCl 4,0 N respectivamente, monitorando toda a reação com eletrodo duplo combinado e pH metro (Micronal B 221).

Esses ensaios foram realizados para selecionar os parâmetros, porcentagem de substrato (S%) e relação enzima/substrato (E/S). Em alguns casos a massa reagente (M) se apresentava como uma massa muito pastosa, depois de um determinado período de hidrólise.

3.9.2 Efeitos da Temperatura, pH e Tempos de Hidrólise

Para determinar os efeitos de temperatura, pH e tempo de hidrólise, o resíduo RESD foi processado utilizando os seguintes parâmetros operacionais sem adição de enzima:

M = 120 g

MR = 10,86 g

PR = 33,14 %

S = 3,0%

ME = 0,0

MW = 109 g

T = 50°C

pH = 8,0

Tempo = 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min.

O GH% foi determinado nos respectivos tempos, seguindo-se o método descrito no item 3.8.3, tomando-se como tempo inicial o tempo de 15 min, após a temperatura da massa reagente ter atingido 50°C.

3.9.3 Hidrólise Enzimática do Resíduo Desengordurado (RES D) com Diferentes Enzimas

O RES D foi hidrolisado usando-se as enzimas e parâmetros operacionais apresentados na Tabela 14.

TABELA 14. Enzimas e parâmetros operacionais para a hidrólise enzimática do resíduo desengordurado (RES D).

Parâmetros	Alcalase 0,6L	Papaína	Pepsina	Denapsina-10P
PR (%)	39,70	39,70	39,70	39,70
M (g)	150	150	150	150
S (%)	3,0	3,0	3,0	3,0
MR (g)	11,34	11,34	11,34	11,34
MW (g)	138	138	138	138
ME (g)	0,0796	0,090	0,090	0,090
E/S (%)	2,0	2,0	2,0	2,0
A/S (AU/g)	0,0136	11,733	12,3528	2,7128
pH	8,00	7,50 ^(a)	1,60	3,0
T (°C)	50	50 ^(a)	50	50

a) segundo dados da referência (186).

O procedimento da hidrólise foi o mesmo para cada enzima, usando-se reator enzimático com aquecimento termoestável (banho circulante de água termoestabilizada, Universal Thermostat U3) e sistema de "pH stat" (Metrohm) para monitorar o pH durante a hidrólise.

Em todos os casos, a massa reagente foi condicionada a 50°C, por 15 min, antes da adição da respectiva enzima, à mesma temperatura, mantendo constante a agitação durante todo o processo (agitador magnético Fisatón). Em cada caso, o pH foi ajustado mediante a adição de NaOH ou HCl 4,0 N.

O GH% foi determinado mediante a reação do TNBS (ítem 3.8.3), depois da inativação enzimática em SDS 1,0% a 75°C por 15 min, retirando-se alíquotas de 2,0 mL da massa reagente a 0,5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 min, respectivamente.

3.9.4 Tratamento Térmico do RESD

Com a finalidade de produzir maior desnaturação das proteínas do RESD, foram efetuados tratamentos térmicos de 15 e 30 min respectivamente a 121-123°C, 1,1-1,3 mg/cm² (autoclave vertical Fa be Mod. 103); esses produtos foram denominados RESDT-15 e RESDT-30, respectivamente.

3.9.5 Determinação de GH% e N_T% nos RESDT Hidrolisados com Alcalase 0,6L

Para determinar o Grau de Hidrólise (GH%), foram usados os seguintes parâmetros operacionais:

M = 250 g

S = 3,0%

PR = 39,7%

MR = 19 g

MW = 230 g

E/S = 2,0%

A/S = 0,012

$$\begin{aligned} A'/E &= 0,678 \\ ME &= 0,1327 \text{ g} \\ pH &= 8,0 \\ T &= 50^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

e os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.8.2 e 3.8.3. Paralelamente determinou-se o nitrogênio total ($N_T\%$) por microkjeldahl, para o qual retiraram-se alíquotas a 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 e 150 min, respectivamente e, após a inativação térmica, por 10 min, em banho maria (BM) em ebulição se separaram os sólidos por filtração determinando-se o $N_T\%$ nos filtrados.

Também foram determinados os índices NSI e PDIdos RESDT segundo os métodos descritos na seção 3.4 e 3.5, respectivamente.

3.9.6 Hidrólise Enzimática do RESD para Fins de Avaliação Sensorial

Para cada batelada da hidrólise usaram-se os seguintes parâmetros operacionais:

$$\begin{aligned} M &= 450 \text{ g} \\ S &= 3,0\% \\ PR &= 39,7\% \\ MR &= 34,0 \text{ g} \\ MW &= 410 \text{ g} \\ pH &= 8,0 \\ T &= 50^{\circ}\text{C} \\ E/S &= 2,0 \\ A/E &= 0,60 \\ A'/E &= 0,678 \\ A/S &= 0,012 \\ ME &= 0,250 \text{ g} \end{aligned}$$

em um reator enzimático com capacidade para 500 g e termoestabilizado a 50°C. A massa reagente foi homogeneizada com um agitador magnético (Contrac Mod. 100 Fanem Ltda.), e o pH monitorado com eletrodo duplo combinado e pH metro digital (Digi Sense), sendo manualmente ajustado com a adição de NaOH ou ácido málico 4,0 N.

Findo cada tempo de hidrólise (0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 min) a enzima foi inativada em BM em ebulição por 15 a 20 min e os sólidos separados por centrifugação (7.000 g por 15 min a 5°C, Centrifuga Sorval) retirando-se alíquotas para determinar os graus Brix (°B) (refratômetro manual ABBÉ) e para determinar a porcentagem de sólidos totais em estufa com circulação forçada de ar.

Os sobrenadantes foram neutralizados com ácido málico 4,0 N e estocados em congelador até avaliação sensorial. Paralelamente foram determinados o GH% e o N_T% nos hidrolisados e seus respectivos resíduos liofilizados.

3.9.7 Avaliação Sensorial do Hidrolisado Enzimático do RESD com Alcalase 0,6L

Os sobrenadantes neutralizados, descritos no item 3.9.6, foram apresentados aos provadores à luz e temperatura ambientes, em bêqueres de 30 ml devidamente codificados de acordo ao delineamento do experimento, 7 provadores e 2 repetições e 8 amostras.

O teste foi aplicado com provadores devidamente instruídos para essa finalidade usando a seguinte ficha:

Avaliação do Sabor

Nome:.....

Data:/..../....

Instruções: Apresentam-se as amostras abaixo discriminadas e codificadas para sua avaliação sensorial, tendo como parâmetro sensorial o Sabor.

Pede-se, por obséquio, caracterizar cada amostra como seu respectivo sabor.

Amostra	Sabor (es)	Observações
.....		
.....		
.....		

Sugestão de termos que descrevem o sabor:

01 - feijão	10 - desagradável
02 - feijão cru	11 - ligeiramente amargo
03 - feijão cozido	12 - amargo
04 - ligeiramente azedo	13 - fortemente amargo
05 - azedo	14 - adstringente
06 - fortemente azedo	15 - mofo
07 - ranço	16 - pútrido
08 - picante	17 - neutro
09 - agradável	18 - outros (especifique)

3.10 Hidrólise Enzimática do Resíduo sem Desengordurar RES

O RES foi hidrolisado enzimaticamente usando os parâmetros operacionais da Tabela 15.

TABELA 15. Enzimas e Parâmetros Operacionais usados na hidrólise do resíduo sem desengordurar RES.

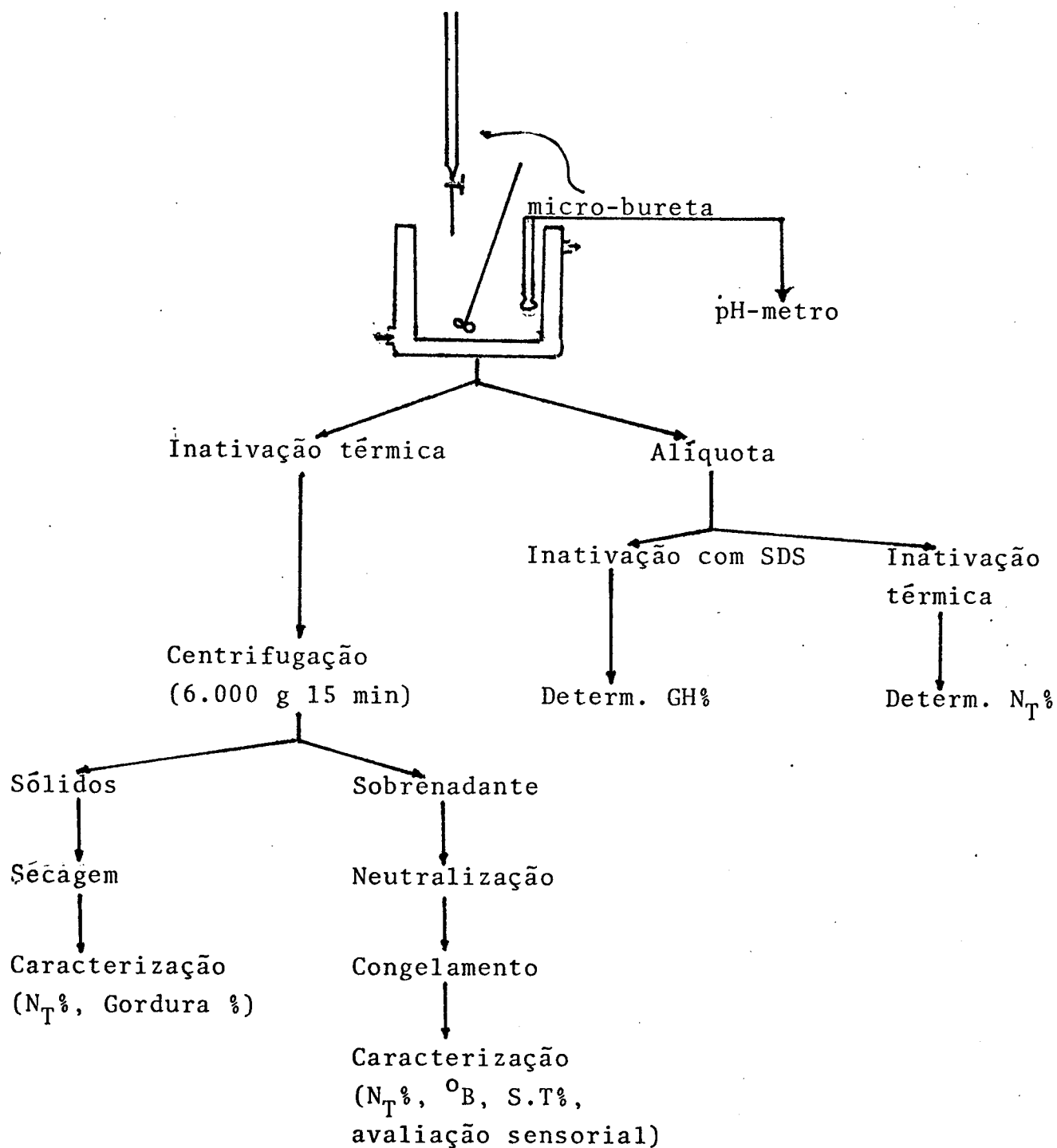
Parâmetros	Alcalase 0,6L	Denapsina-10P
PR (%)	31	31
M (g)	450	450
S (%)	3,0	3,0
MR (g)	44	44
MW (g)	405	405
E/S(%)	2,0	2,0
A/S(AU/g)	0,012	2,7118
ME (g)	0,250	0,270 ^(a)
pH	8,0	3,0
T (°C)	50	50

(a) calculada mantendo a relação $A/E = A'/E$ (4, 197, 201).

Em ambos os casos, em cada batelada, manteve-se a massa reagente termoestabilizada em agitação constante, sendo ajustado o pH com NaOH ou ácido málico 4,0 N.

Na obtenção e caracterização dos hidrolisados enzimáticos seguiram-se as operações apresentadas no diagrama de fluxo da Figura 6.

FIGURA 6. Diagrama de fluxo operacional para a obtenção de hidrolisados enzimáticos do resíduo sem desengordurar RES.



A inativação enzimática foi realizada em BM em ebulição por 15 min e agitação constante. Na determinação do GH%, (ítem 3.8.3), usou-se SDS 1,0% em BM a 75°C. Os sólidos foram secos por liofilização efetuando-se a neutralização com ácido málico 4,0 N e determinando-se o N_T% por microkjeldahl (17). A porcentagem de gorduras foi determinada pelos métodos das referências (1, 36), e os °B e ST% conforme o citado em 3.9.6. A avaliação sensorial se realizou usando o mesmo delineamento descrito em 3.9.7.

3.11 Obtenção de Hidrolisado Enzimático do RES com Alcalase 0,6L

O resíduo sem desengordurar RES, foi hidrolisado com a enzima Alcalase 0,6L seguindo o fluxograma de operações apresentados na Figura 7.

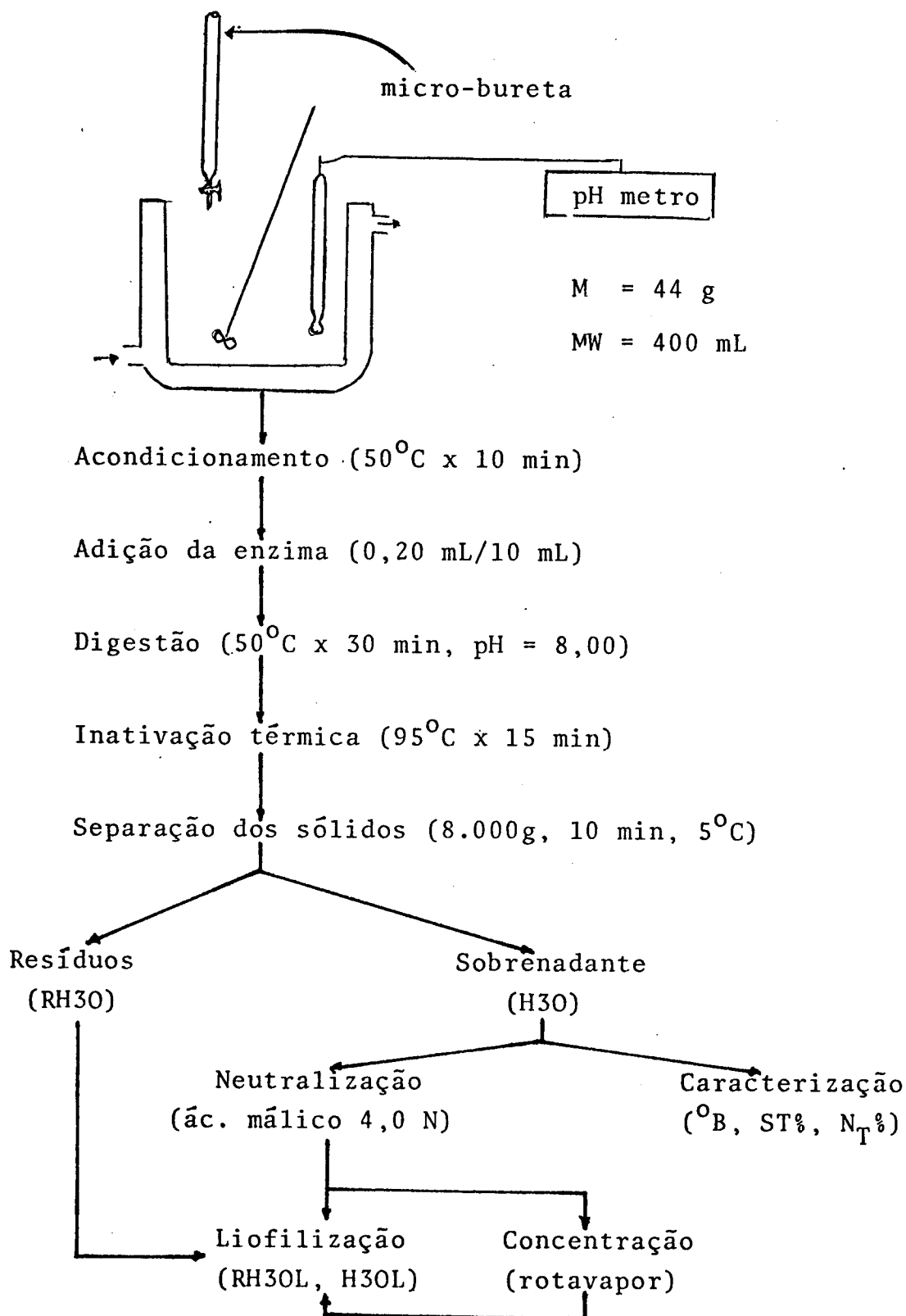
O resíduo do hidrolisado foi seco por liofilização (RH30L) enquanto que o sobrenadante (H30) após neutralização com ácido málico 4,0 N, foi liofilizado ou concentrado a 45°C e 10mm Hg (rotavapor Buchi) até reduzir à metade o volume original para depois ser liofilizado (H30L).

3.12 Caracterização do Hidrolisado Enzimático (H30, H30L) e seu Resíduo (RH30L)

3.12.1 Composição Proximal

A gordura foi determinada pelo método de BLIGH & DYER (36); as cinzas pelo método N° 0816 (1); o nitrogênio total por microkjeldahl (17), usando mistura catalizadora de TiO₂; o conteúdo de fibra foi determinado por gravimetria do resíduo seco de amostras que foram submetidas a refluxo com TCA, num meio nitro-acético por 30 min, método adaptado da referência (277).

FIGURA 7. Diagrama de fluxo operacional para a obtenção de um hidrolisado enzimático do RES com Alcalase 0,6L (a).



a) as quantidades que aparecem no diagrama foram para cada batelada usando um reator enzimático de 500 g de capacidade.

3.12.2 Determinação de Carboidratos Totais

Os carboidratos totais foram determinados espectrofotometricamente com o reagente fenol-sulfúrico (17, 65, 68, 117, 269, 280).

As amostras foram condicionadas em etanol, a seguir adicionou-se tampão acetato e uma solução de tungstato de sódio ao 12% levando a um volume de referência com tampão acetato. Após separação dos sólidos por filtração, retiraram-se alíquotas e acrescentou-se o reagente fenol em meio sulfúrico, permitindo a reação por 10 min a temperatura ambiente, 20 min a 30°C e 30 min a temperatura ambiente sucessivamente; findados esses tempos foram lidas as absorbâncias a 490 nm (Spectronic 20, Micronal).

Para a quantificação usou-se uma curva-padrão preparada a partir de solução estoque de 1.000 ppm de glicose (Merck). Esse procedimento apresentou um rendimento de 97,35% para amostra enriquecida com uma quantidade conhecida de glicose.

3.12.3 Detecção Qualitativa de Carboidratos por Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

Para detectar a presença dos sacarídeos rafinose e estaquiose seguiu-se o método descrito por CRUZ (60), em que a estaquiose, rafinose, melibiose, sacarose e glicose são separadas por TLC usando uma fase estacionária de sílica gel G-ácido bórico com ativação a 110°C por 30 min e, como fases móveis, misturas de EtOAc + HOAc + H₂O em diferentes proporções; a solução reveladora foi difenilamina-anilina em ácido fosfórico-acetona (281).

Os extratos aquosos das amostras foram precipitados com Ba(OH)_2 0,33 N e ZnSO_4 5% (65) que depois de separar os sólidos por filtração foram aplicadas na camada delgada.

3.12.4 Determinação da Composição em Aminoácidos

Para esta determinação seguiu-se o método de SPACKMAN (24, 258) modificado no laboratório. As amostras, aproximadamente 25 mg de proteína, foram hidrolisadas em HCl 6,0 N por 22 hrs a 110°C (estufa Fanem) separando os sólidos por filtração em funis de vidro sinterizado (Pyrex 36.060) e o filtrado foi levado ao volume de referência. Retiraram-se alíquotas as quais foram liberadas do excesso de ácido por sucessivas lavagens com água destilada e evaporadas em rotavapor a 50°C retirando o resíduo seco em um volume conhecido de tampão citrato pH 2,2 e estocados em refrigeração, depois foram filtrados em Millipore 0,2 μm e injetados numa coluna de troca iônica (resina tipo W3 Beckman) instalada no analisador de aminoácidos Beckman 119 CL, de onde os aminoácidos foram eluídos, e detectados. A quantificação fez por comparação das áreas dos aminoácidos padrão com as respectivas áreas dos picos dos aminoácidos das amostras.

3.12.5 Determinação de Triptofano

O conteúdo de triptofano foi determinado mediante método adaptado das referências bibliográficas (9, 99, 259) e consistiu na hidrólise em álcali (KOH 5,0 N por 180 min a 121°C), neutralização, aferição ao volume de referência, retirada de alíquotas e reação com p-dimetilaminobenzaldeído (DAB) em meio sulfúrico por 60 min no escuro, diazotação por 20 min com NaNO_2 e leitura das absor-

bâncias a 590 nm. A quantificação foi feita usando uma curva-padrão com uma função linear:

Absorbância = $(1,047 \times 10^{-3}) \times (\mu\text{g de triptofano})$ tendo um $r = 0,999$.

O procedimento aplicado às amostras de FDS enriquecidas com quantidades conhecidas de Trp forneceu 91,75% de recuperação.

3.12.6 Determinação de Lisina Disponível

A lisina disponível foi determinada usando método espectrofotométrico (27), o qual consiste fundamentalmente em tratar as amostras em meio alcalino (CuCO_3 , NaHCO_3 4,0% pH 8,5) a 40°C por 30 min, retirando alíquotas para a reação com o TNBS (40°C no escuro por 120 min) e depois adicionar HCl concentrado, para a hidrólise a 121°C por 60 min. Posteriormente, os sólidos são separados por filtração e o α -TNP extraído com Et_2O . O ϵ -TNP foi desolventizado por aquecimento suave durante 20 min e as absorbâncias lidas a 346 nm (Carl Zeiss).

A quantificação foi calculada mediante o emprego de uma curva-padrão com função linear:

Absorbância = $(8,9365 \times 10^{-3}) \times (\mu\text{g de lisina})$

tendo um $r = 0,9903$, preparada a partir de solução estoque de 800 ppm de hidrocloreto de lisina tratada com CuCO_3 sólido.

Uma amostra de FDS enriquecida com quantidades conhecidas de lisina e processada por este método, forneceu 84,0% de recuperação.

3.12.7 Detecção Qualitativa de Lisinoalanina (LAL) por TLC

A LAL foi detectada qualitativamente usando um método cromatográfico de camada delgada adaptado de outros autores (84, 85, 37, 101, 264). Neste método a fase estacionária é a celulose microcristalina (Avicel) e, como fases móveis, usaram-se misturas de solventes com caráter ácido como o n-BuOH + Ác. fórmico + H₂O (23 + 4 + 5), n-BuOH+HOAc +H₂O (4 +1+5) ou misturas de solventes com caráter básico como Piridina (Py) + MeOH + H₂O (4 + 20 + 80) e, finalmente, revelação com solução de minidrina butanólica em ácido acético.

As amostras, aproximadamente 25 mg de proteína, foram hidrolisadas em HCl 6,0 N por 22 hrs a 110°C, separando os sólidos por filtração através de funis de vidro sinterizado (Pyrex 36.060) e levando o filtrado a um volume de referência. O excesso de HCl das alíquotas foi eliminado mediante lavagens com água destilada e evaporação em rotavapor. O resíduo seco foi dissolvido em volume conhecido de água destilada de onde se retiraram aproximadamente 100µL, que foram aplicados na camada. A detecção qualitativa na placa se fez comparando com o padrão LAL (82) corrido como padrão interno.

3.12.8 Determinação Quantitativa da LAL por Cromatografia de Troca Iônica em Analisador de Aminoácidos

A LAL foi determinada quantitativamente por cromatografia de troca iônica em analisador de aminoácidos (Beckman 119 CL), segundo a literatura (37, 50, 83, 176, 184).

As amostras foram processadas por hidrólise ácida, como descrito em 3.12.7, em que o extrato seco por evaporação foi

dissolvido em volume conhecido de tampão citrato 0,2 M pH 2,2 e es-
tocado sob refrigeração até sua utilização. Esses extratos, depois
de condicionados à temperatura ambiente, foram filtrados em Milli-
pore 0,2 μ m e injetados automaticamente na coluna de troca iônica
(resina tipo W3-220 Beckman, 6 x 460 nm) mantida a 50°C. O sistema
eluente foi tampão citrato 0,35 M pH 5,25 usando-se um programa de
60 min e detectando os produtos da reação com a ninidrina a 440
e 570nm (258). A determinação quantitativa se fez comparando as
áreas das amostras e do padrão de LAL (82).

3.12.9 Determinação Espectrofotométrica do Ácido Fítico

Para determinar o conteúdo de ácido fólico com um mé-
todo espectrofotométrico (208, 282, 286) mediante a reação colori-
métrica da o-fenantrolina e o Fe^{3+} (17), se processaram aproxima-
damente de 2 a 5 g de amostra com TCA 3,0% levando-se a BM em ebu-
lição por 60 min. Os sólidos foram separados a 10.000 x g por 10
min e tratados com TCA 3,0% a BM em ebulição por 30 min.

Depois de separar, lavar com água destilada e sedimen-
tar novamente a 10.000 x g, os sólidos foram suspensos em solu-
ção de NaOH 1,5 N e levados a volume conhecido com água destilada.
Seguidamente foram colocados em BM em ebulição por 30 min e poste-
riormente centrifugados a 10.000 x g por 10 min. Foram repetidas
as lavagens com água destilada, depois redissolvido o precipitado
com HCl 6,0 N e levado a volume de referência com água destilada.
Dessa solução foram retiradas alíquotas de 20,0 mL para a reação
com a o-fenantrolina pelo método N° 3.011 a 3.013 (17).

A determinação quantitativa foi realizada através de
curva-padrão com função linear:

$$\text{Absorbância} = (2,4778 \times 10^{-3}) \times (\mu\text{g de \u00e1c.f\u00edtico})$$

tendo um $r = 0,997$. A curva foi preparada a partir de solu\u00e7\u00e3o estoque de 1.000 ppm de Fe^{2+} .

Usou-se a rela\u00e7\u00e3o molar de Fe/P de 4/6 como recomendam alguns autores (282, 286, 297). Uma amostra de farinha integral de soja (FIS) enriquecida com quantidades conhecidas de \u00e1cido f\u00edtico forneceu 92,5% de recupera\u00e7\u00e3o.

3.12.10 Determina\u00e7\u00e3o do \u00cdndice de Per\u00f3xidos

Para determinar o \u00cdndice de per\u00f3xidos mediante titula\u00e7\u00e3o iodom\u00e9trica (17, 18, 169, 182), foram usados os extratos lip\u00eddicos da determina\u00e7\u00e3o da gordura, ap\u00f3s desolventizados *in vacuo* (54).

3.12.11 Determina\u00e7\u00e3o do Perfil do Pesos Moleculares

O perfil dos pesos moleculares foi determinado por cromatografia de filtra\u00e7\u00e3o sobre gel (3, 13, 262, 290, 307), usando-se como fase estacion\u00e1ria Sephadex G 75/120 da Sigma (34, 219) e como fase m\u00f3vel a solu\u00e7\u00e3o de tamp\u00e3o Tris-HCl 0,05 M pH 7,50 e for\u00e7a i\u00f4nica (μ) de 0,15 (97) em uma coluna de 1,5 x 95 cm e uma altura de empacotamento de 84 cm e 95 cm de cabe\u00e7a hidrost\u00e1tica; os elu\u00e1tos foram coletados sob temperatura de refrigera\u00e7\u00e3o.

As amostras e os padr\u00f5es foram dissolvidos no tamp\u00e3o Tris-HCl e aplicados na coluna em concentra\u00e7\u00f5es que permitissem a leitura entre 15 a 60% de transmit\u00e2ncia (T%) a 280 nm.

Usaram-se como marcadores as seguintes solu\u00e7\u00f5es padr\u00e3o:

- a) solução de BSA, Sigma, PM = 67.000 (§)
- b) solução de ovalbumina, Sigma, PM = 45.000 (§)
- c) solução de Pepsina, Sigma, PM = 36.000 (E.C. 3.4.4)
- d) solução de tripsina, Sigma, PM = 24.000 (E.C. 3.4.4.4)
- e) solução de lisozima, Sigma, PM = 14.700 (E.C. 3.2.1.17)
- f) solução de insulina, Sigma, PM = 5.733

os pesos moleculares (§) foram reproduzidos da referência (215).

Para determinar o volume morto (V_0), usou-se uma solução de azul de dextrana PM = 2.000.000 (216) encontrando-se uma função logarítmica ao graficar o volume de eluição (V_e) corrigido e os respectivos pesos moleculares dos marcadores (114). A relação dos volumes (V_e/V_0), foi obtida usando o volume de eluição do co-rante azul de dextrana (V_0).

3.12.12 Comportamento Eletroforético

O perfil eletroforético das amostras foi determinado por eletroforese de disco (16, 63, 72, 73, 119, 120, 164, 181, 297, 300, 301).

Usaram-se tubos de vidro (0,4 x 9,5 cm) em que se adicionou solução recém preparada a 46,4% de gel (12, 115); depois de 30 min de polimerização foram adicionadas solução de gel com 12,5% de ligações cruzadas (12, 115), solução de riboflavina (Merck), tam-pão Tris-HCl-TEMED pH 6,80 mais solução de sacarose 40% e o indica-dor azul de bromofenol a 0,1%.

A separação foi realizada em tampão glicina-Tris 0,005 M pH 8,20 aplicando um potencial elétrico crescente até se obter a fron-te do indicador a aproximadamente 8,0 cm. A revelação dos componentes se

parados se fez tingindo com solução de amido schwartz a 1,0% em HOAc 7,5% e eliminando o excesso de corante por lavagens sucessivas com HOAc 7,5% até se obter bandas nítidas. As mobilidades relativas foram determinadas medindo as distâncias (90, 251).

3.12.13 Contagem Total de Microrganismos

Para a contagem total dos microrganismos usou-se o método das diluições sucessivas (191), em que as amostras foram diluídas até 1×10^{-4} em solução de 0,1% de peptona. Aliquotas dessa solução foram semeadas em placa usando meio de agar lactosado (Difco Lab.), incubadas a 30°C por 24 e 48 hrs.

3.12.14 Determinação da Atividade Ureásica

A atividade ureásica foi determinada segundo os métodos recomendados na bibliografia (18, 35, 41).

3.12.15 Determinação do Inibidor da Tripsina (IT)

A atividade do IT foi determinada a partir de uma curva-padrão de tripsina (T) segundo o método de KUNITZ (140), modificado no que diz respeito à determinação da atividade da Tsin.

A tripsina em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 foi condicionada a 37°C adicionando-se, nessa temperatura, solução de caseína 2,0%. Após 30 min de digestão a 37°C adicionou-se solução de TCA a 10,0% e as absorbâncias foram lidas a 280 nm depois de 60 min à temperatura ambiente.

Definiu-se unidade trípica $|TU|^{cas}$, como a atividade que produz aumento de uma unidade de absorbância por minuto de digestão e, atividade específica mediante a relação:

$$|TU|_{\mu\text{g T.}}^{\text{cas.}} = \frac{|TU|^{\text{cas.}}}{\mu\text{g proteína}}$$

Com esses dados obteve-se a curva-padrão da absorbância contra μg de T, a partir desses dados derivou-se a curva-padrão da absorbância contra unidades tríplicas.

Para determinar a atividade do IT preparou-se uma solução estoque de 200 ppm do inibidor (tripsina inibitor, Lima bean, type III-L, Sigma) em tampão fosfato 0,1 M; pH 7,6 e dessa solução preparou-se a série de soluções padrão (0 a 25 μg). A cada solução adicionou-se 50 ppm de T. e deixou-se reagir por 10 min à temperatura de 37°C; a seguir adicionou-se solução de caseína a 2,0% permitindo uma digestão por 30 min a 37°C. Findado esse tempo adicionou-se solução de TCA 10% e depois de 60 min foram lidas as absorbâncias a 280 nm.

Amostras do H30, extrato hidrossolúvel de soja preparado no laboratório (EHSL) pelo método de COSTA (57), extratos preparados a partir da FDS (S1, S2, S3, S4) e do RES (SI, SII, SIII, SIV) segundo o esquema da Figura 8, foram diluídos em tampão fosfato 0,1M pH 7,6 e determinou-se a atividade do IT, como descrito para a curva-padrão.

Os extratos da FDS e do RES foram obtidos com os seguintes parâmetros operacionais:

M = 450 g

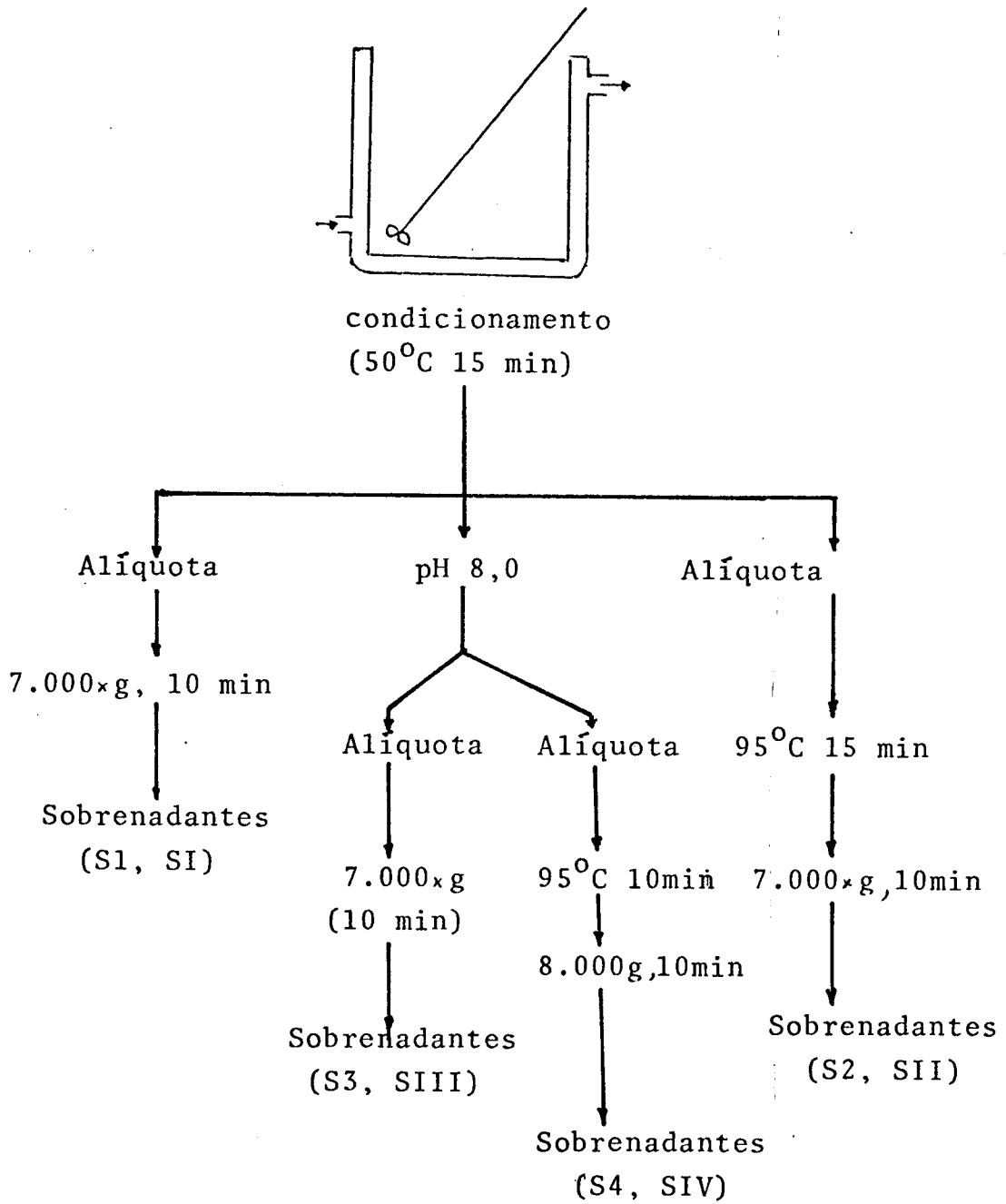
S = 3,0%

FDS = 26 g (53% PR)

RES = 44 g (31% PR)

MW = 410 g RES, 425 g FDS

FIGURA 8. Diagrama de fluxo para a obtenção de extratos hidrossolúveis de soja para determinar atividade do inibidor de tripsina.



3.12.16 Determinação da Atividade de Lipoxigenase (LPO)

Para determinar atividade de lipoxigenase, foi necessário preparar extrato da enzima lipoxigenase que servisse como padrão de referência. Esse extrato foi obtido segundo o método de KOCH, *et alii* (138), partindo de farinha desengordurada de soja (FDS).

Foi usado um método laboratorial para determinar atividade LPO (30, 147, 189, 228, 268, 271), em que se define a unidade lipoxigenásica como a quantidade, em gramas, da enzima lipoxigenase que oxida um micromol de linoleato por minuto.

O metil linoleato (Polyscience Corp.), usado como substrato, foi adicionado às amostras em tampão fosfato 0,05 M pH 6,5. Depois de 10 min na temperatura ambiente se fez extração com cicloexano (Merck), desidratou-se com Na₂SO₄ anidro (Merck) e as absorbâncias foram lidas a 230 nm.

A determinação quantitativa baseou-se em curva-padrão definida pela função linear:

$$\text{Absorbância} = (1,9878) \times (\text{mL do extrato LPO})$$

tendo um $r = 0,9982$.

A partir do valor da absortividade molar específica de $27,4 \times 10^3$ (L. cm⁻¹. mol⁻¹) (271) para hidroperóxidos, e a curva padrão experimental, derivou-se a seguinte função linear:

$$\text{Absorbância} = (27,4306) \times (\text{mol})$$

tendo um $r = 0,998$. Usando essa função calcularam-se as atividades da lipoxigenase de acordo às recomendações do método de LEE *et alii* (147).

3.12.17 Determinação da Atividade Residual da Alcalase 0,6L no Hidrolisado H30

A atividade residual da alcalase foi determinada segundo o método fornecido pelos fabricantes da enzima (197), em que a amostra em tampão fosfato 1/15 M pH 7,5 foi adicionada hemoglobina desnaturada e, após 10 min a 25°C, precipitaram-se as proteínas com solução de TCA 0,3 N, separando-se os sólidos por centrifugação. Retiram-se alíquotas as que foram submetidas à reação do fenol em meio alcalino, lendo-se as absorvâncias a 660 nm.

A quantificação foi feita através de curva padrão preparada a partir de solução estoque de 94 ppm de nitrogênio enzimático e processada de igual forma que as amostras, usando-se para tanto o seguinte sistema de unidades:

$$\text{a) atividade real} = A/E = (\text{AU})/\text{g enzima} = "b" \times N\% \times 1.000$$

$$\text{b) atividade específica} = A'/E = (\text{AU})/\text{mg N} = (A/E) \times (10 N\%)^{-1}$$

$$\text{c) atividade declarada} = ((A/E)/A'/E) \times (A/E) \text{ experimental,}$$

onde: "b" = coeficiente de regressão ou declividade da reta que resulta ao se graficar o inverso da absorvância contra o inverso de E, em AU/L.

3.12.18 Determinação da Solubilidade

A solubilidade dos hidrolisados liofilizados (H30L) foi determinada na temperatura ambiente e pH 7,0. As amostras foram ho

mogeneizadas em solução aquosa por 30 min e, após separar os sólidos a 6.000 x g, determinou-se a porcentagem do nitrogênio solúvel ($N_S\%$) nos sobrenadantes.

Com os valores de $N_S\%$ e $N_T\%$ obteve-se uma função linear já usada por outros autores (226).

3.12.19 Ensaio Biológico

A avaliação biológica foi realizada para determinar a Utilização Líquida da Proteína (NPU), Digestibilidade Aparente (D%), Valor Biológico (VB%), quociente de utilização líquida da Proteína (NPR) e quociente de Eficiência Proteica (PER)_{cal.} (17, 171, 172) usando-se ratos desmamados da raça Wistar, albinos de 20 a 25 dias de idade, sendo 50% fêmeas e 50% machos.

Os animais foram condicionados em gaiolas individuais durante 4 dias em que foi fornecida a ração padrão de caseína (17). Findo esse período, se separaram grupos de 10 animais com pesos homogêneos e que foram distribuídos ao acaso segundo o delineamento experimental.

As dietas testes foram formuladas para conter 10% de proteína, 8% de gordura, 5% de sais minerais, 2% de vitaminas, 25% de sacarose e amido de milho em quantidade suficiente para completar a ração. A fonte de gordura foi o óleo de soja refinado, a mistura de sais minerais e de vitaminas foram preparadas no laboratório segundo as recomendações da literatura (17).

Ao término de 10 dias, os animais foram sacrificados por asfixia em clorofórmio, codificados e congelados por 72 hrs a -40°C . Depois foram seccionados integralmente em guilhotina e secos em estufa a 80°C até peso constante para determinar a quantidade de água corporal (164, 171).

3.12.20 Avaliação Fisiológica em Ratos Alimentados com o Hidrolisado Enzimático Liofilizado (H30L)

Este estudo foi realizado com ratos desmamados da raça Wistar, álbino, todos machos, de 20 a 25 dias de idade, condicionados por 15 dias de alimentação "ad-libitum" com ração padrão (17).

O hidrolisado H30L foi formulado para se ter uma dieta de 10% de proteína, 8% de gordura, 5% de sais minerais, 2% de vitaminas, 25% de sacarose e amido de milho em quantidade suficiente para completar a dieta (26).

Para se verificar o efeito de uma ingestão mais prolongada do hidrolisado, dois grupos de animais foram alimentados durante 60 dias com as seguintes rações: a) Ração padrão de caseína com 10% de proteína e b) a mesma ração substituindo a caseína pelo hidrolisado. Durante o andamento da experiência houve acompanhamento com análises de urina. Ao término, os animais foram sacrificados e as vísceras avaliadas macroscopicamente tendo sido pesados rins e fígados (26). Amostras dos tecidos dos sistemas digestivo, cardíaco-respiratório, urinário e linfocitário foram preparados histologicamente e avaliadas microscopicamente.

3.13 Hidrólise Enzimática do Resíduo RES sem Controle de pH nem de Temperatura

3.13.1 Determinação do GH% em Função da Massa Enzimática (ME)

O grau de hidrólise (GH%), foi determinado pelo método do TNBS nos hidrolisados obtidos do RES e Alcalase 0,6L com parâmetros operacionais apresentados na Tabela 16.

Os parâmetros da Tabela 16 foram mantidos em cada batelada para se obter o GH% nos tempos de 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90 e 120 min respectivamente.

TABELA 16. Parâmetros operacionais para determinar o GH% em função da massa enzimática (ME) no hidrolisado do RES e Alcala se 0,6L sem controle de pH.

Parâmetros	Massa Enzimática				
	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25
M (g)	450	450	450	450	450
MR (g)	45	45	45	45	45
PR (%)	31	31	31	31	31
MW (g)	400	400	400	400	400
S (%)	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
E/S (%)	2,0	4,0	6,0	8,1	10,1
A/S (AU/g)	0,0122	0,0243	0,0365	0,0486	0,0608
ME (g)	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25
T (°C)	50	50	50	50	50

3.13.2 Determinação da Quantidade de Água à Temperatura Ambiente (MW_1) e à Temperatura de Ebulição (MW_2) Necessária para Manter a Massa Reatante a Aproximadamente 50°C

Para determinar esse efeito, experimentaram-se diversas relações MW_1/MW_2 para uma massa reagente com $S = 3,0\%$ monitorando a temperatura até 60 min com agitação constante; para tanto, se misturaram MW_2 e a MW , com boa agitação e imediatamente se adicionaram a MW_1 mantendo-se constante a agitação.

3.13.3 Obtenção de Hidrolisado Enzimático sem Contrôl de pH nem de Temperatura

O resíduo RES foi hidrolisado com a Alcalase 0,6L sem controlar a temperatura nem o pH com as seguintes condições por batelada:

M = 2.000 g
MR = 200 g
PR = 31%
S = 3,1%
MW₁ = 800 mL
MW₂ = 1.000 mL
ME = 2,88 g
E/S = 5,25%
A/S = 0,0315 AU/g
T = 50-60°C
pH = 6,1-6,6
Tempo = 45 min

Após os 45 min de hidrólise se inativou a enzima em BM em ebulição por 15 min, separando os sólidos a 7.000 x g por 10min e estocando, resíduo e sobrenadante, em congelador para posterior liofilização. Dessa forma obtiveram-se o hidrolisado H45L e o resíduo RH45L, que foram posteriormente secos.

3.14 Produto Formulado com Base no Hidrolisado H45L e Resíduo RH45L

A formulação de uma sopa desidratada com base em feijão e arroz mais o hidrolisado H45L teve a seguinte composição básica:

Arroz	45,40%
Feijão	24,65%
Gordura	5,00%
Sal	6,49%
Alho	0,34%
Cebola	1,04%
Amido	2,00%
Farinha de trigo	14,98%
Salsa	0,10%
Hidrolisado H45L	1,00%

Preparou-se um controle (Neutro) sem o H45L e uma sopa de referência com igual composição básica substituindo o H45L por um hidrolisado de proteína vegetal comercial (HPV) ao mesmo nível.

3.15 Avaliação Sensorial das Sopas Desidratadas

As sopas desidratadas foram avaliadas sensorialmente a nível laboratorial para determinar se existe ou não diferença entre as seguintes amostras:

- a) amostra neutra = sopa sem hidrolisado
- b) amostra com hidrolisado protéico vegetal (HPV) = 99% da composição básica e 1,00% do HPV
- c) amostra com o hidrolisado enzimático H45L = 99% da composição básica e 1,00% do H45L

e qual a ordem de preferência entre elas (10, 95, 236, 245), usando-se os métodos de Diferença Triangular e de Preferência Pareada.

O Preparo das amostras, para um painel de 10 provadores, foi a seguinte: a 100 g de amostra se adicionaram 800 mL de água e com agitação constante se levou a fervura suave por 10 min

e em seguida esfriadas à temperatura de 35-30°C e apresentadas aos provadores em béqueres de 50 mL em cabines com luz vermelha e chapas de aquecimento para manter a temperatura da sopa entre 30 e 35°C.

As fichas individuais para os testes foram as seguintes :

Teste Triangular - Diferença

Nome: Data: / /

Duas amostras são iguais e uma diferente. Coloque um círculo ao redor da amostra diferente em cada um dos grupos.

Grupos

1.
2.

Teste Triangular - Diferença

Nome: Data: / /

Por favor, prove cada par, da esquerda para a direita, fazendo um círculo na amostra que você preferiu em relação ao sabor. Lave a boca ou espere 20 seg entre cada amostra.

Procure dar uma opinião na primeira tentativa.

Porque preferiu?

1.
2.
3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição Centesimal da Matéria-prima

Os resultados da determinação centesimal aproximada do resíduo sem desengordurar RES, comparados com outros produtos de soja, se apresentam na Tabela 17.

TABELA 17. Composição centesimal aproximada do resíduo do extrato hidrossolúvel de soja (RES) comparado com a composição centesimal da FDS, FIS, EHS (a).

	RES	FDS	FIS	EHS
Umidade	4,65	5,95	6,60	7,80
Cinza	4,50	4,90	6,35	5,50
Extrato etéreo	17,73	0,75	22,05	24,75
Fibra bruta	6,70	3,15	7,15	0,42
Proteína (N x 6,25)	34,64	53,06	36,27	27,78
Carboidratos (diferença)	31,78	32,19	21,58	33,75

a) FDS = farinha desengordurada de soja

FIS = farinha integral de soja

EHS = extrato hidrossolúvel de soja, formulado comercialmente

Os valores apresentados, são as médias de 4 repetições exceto os valores de proteína que foram as médias de 10 repetições.

Os resultados da composição centesimal parecem estar em concordância com resultados publicados por outros autores (8, 55, 56, 59, 63, 118, 223, 268) no que diz respeito à composição do RES, FDS,

FIS. No entanto, não há suficiente informação publicada com respeito à composição do extrato hidrossolúvel formulado comercialmente, razão pela qual não é possível comparar esses dados com os dados publicados para o extrato hidrossolúvel sem formular (40, 63, 145, 180, 274).

Pela sua composição, o resíduo RES, poderia ser classificado como uma farinha intermediária entre a FDS e a FIS como já foi sugerido por outros autores (58, 148), com teor protéico próximo ao da FIS.

4.2 Composição Granulométrica do RES

O conhecimento da distribuição porcentual das partículas do RES (Tabela 18) foi considerado importante na futura interpretação da hidrólise.

TABELA 18. Distribuição porcentual dos tamanhos das partículas do RES.

Peneira		Fração
Mesh	μm	(%)
35	420	25,5
48	297	29,5
65	210	9,5
100	149	26,5
150	105	5,0
<150	<105	2,5
perdas		1,5

Verificou-se que o RES apresenta maior proporção de partículas com diâmetros na faixa de 35 a 100 mesh, comparável à FDS na distribuição das partículas com diâmetro de 48 mesh (179).

Há um estudo mostrando que a distribuição das proteínas na FDS não guarda relação com o tamanho da partícula já que as partículas com 35 mesh diferem das de tamanho menor que 200 mesh em apenas 4,3% do teor de proteína (179). Todavia, a extração das proteínas é variável dependendo do tamanho da partícula (179, 253, 295). Neste caso, pelo fato do RES apresentar-se com 26,5% de partículas com diâmetros de 149 μm (100 mesh) é de se esperar que a extratabilidade das proteínas seja limitada.

4.3 Dispersibilidade Protéica e Conteúdo de Nitrogênio Solúvel do RES

O RES apresentou 13,8% de nitrogênio solúvel (NSI) e 12,88% de dispersibilidade protéica (PDI) o que significa que tanto NSI quanto o PDI foram afetados pelo processo térmico de obtenção do extrato hidrossolúvel.

Ao se comparar os índices PDI e NSI de uma farinha desengordurada de soja (FDS) ou de uma farinha integral de soja (FIS) obtidas sem tratamento térmico (11, 223, 254, 298), com os respectivos índices do resíduo RES, verifica-se que este último apresenta apenas 15% dos valores das farinhas. Entretanto, os índices aqui obtidos estão próximos dos publicados para uma FIS obtido por tratamento térmico entre 80 e 90°C (223).

Cabe mencionar que o PDI e NSI de um produto protéico estão associados com as características de absorção de água do mesmo e dependem do grau de desnaturação protéica, tamanho de partícu

la, temperatura da extração, relação soluto/solvente, pH do meio (254, 298), o que sugere que as proteínas do RES deveriam apresentar baixa absorção de água.

4.4 Atividades Enzimáticas

Os resultados dos testes de atividade das enzimas papaína, pepsina, denapsina-10P e alcalase 0,6L se encontram relatadas na Tabela 19.

TABELA 19. Atividades enzimáticas de pepsina, papaína, denapsina-10P e alcalase 0,6L.

Atividade	Pepsina	Papaína	Denapsina-10P	Alcalase
Real (A'/E)	208,50	195,58	45,20	0,678 (a)
Específica	1,57	3,08	1,31	-
Declarada (A/E)	-	-	-	0,60 (a)
Nitrogênio (%)	13,27	6,35	3,46	0,62 (a)
Declividade da reta (b)	$1,57 \times 10^{-4}$	$3,0795 \times 10^{-4}$	$1,3049 \times 10^{-4}$	-
Coef. correlação (Rn)	0,9863	0,9984	0,9907	-

a) Dados fornecidos pelos fabricantes (197, 198, 199).

Para o cálculo da atividade foram usadas as seguintes relações:

$$A'/E = (N\%) \times (b) \times (10^5) = \text{AU/g}$$

$$\text{Ativ. específica} = (A'/E) \times (10 \times N\%)^{-1} = \text{AU/mg N}$$

$$b = (\text{meq. tirosina}) \times (\mu\text{g N})^{-1} = \text{declividade da função linear da curva-padrão de cada enzima}$$

1AU = quantidade de enzima que libera 1,00 meq. de tirosina por minuto

Os resultados da Tabela 19 foram calculados a partir de curva padrão preparada para cada enzima usando o valor da declividade da curva-padrão de tirosina ($b = 7,346 \times 10^{-4}$ unidades de absorbância/meq, $r = 0,986$) e a absorbância de cada solução de enzima ($\mu\text{g de N}$) processada segundo a metodologia respectiva.

A atividade enzimática é um parâmetro de importância como indicador da eficiência dos processos onde a enzima atua (288); entretanto, sua determinação ainda é realizada em forma empírica devido à complexidade estrutural da enzima e seu substrato (32). Parece existir consenso no uso do método de Anson na determinação da atividade enzimática, o qual se baseia na formação de cromóforo azul produzido pela reação do ácido fosfomolibdico tungstico (reagente fenol) e os resíduos de tirosina ou de triptofano (260).

4.5 Seleção do Método para Determinar o Grau de Hidrólise Enzimático (GH%)

Foram testados os métodos de determinação do nitrogênio titulável em formol ($N_F\%$), reação dos grupos $-\text{NH}_2$ com ninhidrina, reação de Lowry e a determinação de grupos $-\text{NH}_2$ livres com o TNBS, com o objetivo de determinar o GH% do resíduo desengordurado RESD, quando hidrolisado com a enzima alcalase 0,6L usando os parâmetros

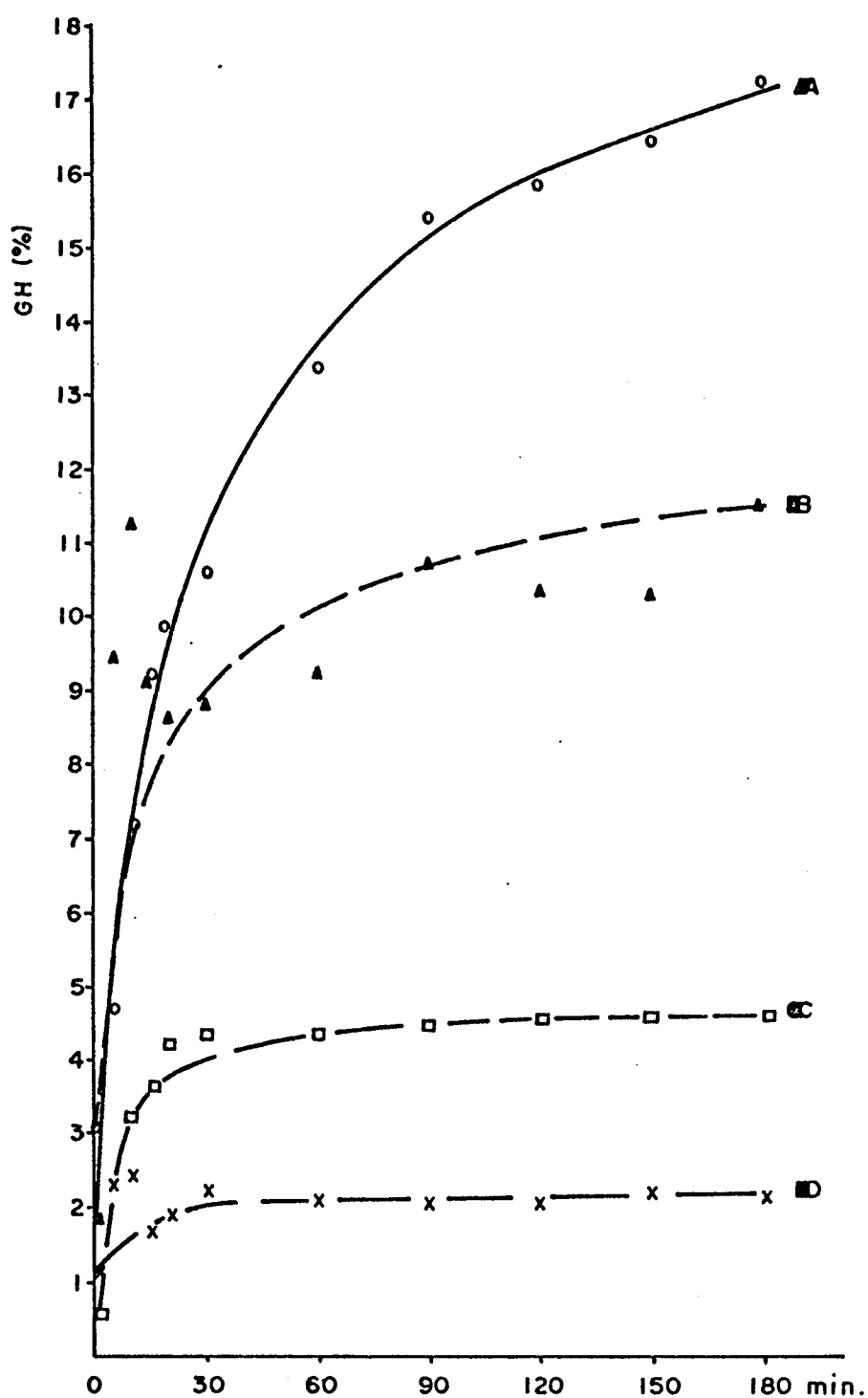
operacionais definidos sob o ítem III da Tabela 13, exceto que a massa de água foi 105,5 g e a relação E/S foi de 0,02.

Os resultados dos testes estão resumidos na Tabela 20 e na Figura 9.

TABELA 20. Resultados percentuais do grau de hidrólise (GH%) obtidos com os métodos do formaldeído, ninhidrina, Lowry e TNBS dos hidrolisados enzimáticos do resíduo desengordurado RESD e alcalase 0,6L.

Tempo (min)	Formaldeído (GH%) _F	Ninhidrina (GH%) _N	Lowry (GH%) _L	TNBS (GH%)
0	1,89	0,55	1,06	3,17
5	9,46	2,18	2,34	4,71
10	11,26	3,23	2,44	7,22
15	9,11	3,65	1,71	9,14
20	8,69	4,25	1,96	9,81
30	8,89	4,35	2,25	10,65
60	9,21	4,40	2,10	13,43
90	10,71	4,50	2,10	15,41
120	10,38	4,60	2,02	15,85
150	10,33	4,65	2,25	16,45
180	11,50	4,68	2,25	17,26

FIGURA 9. Representação gráfica da porcentagem do grau de hidrólise (GH%) obtida por quatro métodos diferentes



Onde: A = resultado do GH% com o método do TNBS (o)
 B = resultado do GH% com o método do formaldeído (▲)
 C = resultado do GH% com o método da ninhidrina (□)
 D = resultado do GH% com o método de Lowry (x)

onde:

$$(GH\%) = \frac{N_F \%}{N_T \%} \times 100 = \frac{\% \text{ Nitrog. titulável em formol}}{\% \text{ Nitrog. total da amostra}} \times 100$$

$$(GH\%)_N = (\text{meq. leucina}) \times 100$$

$$(GH\%)_L = \% \text{ de proteína}$$

$$GH\% = (h) \times (100) \times (h_T)^{-1}$$

Na determinação do $(GH\%)_N$, foi usada a curva-padrão de leucina definida pela função linear:

$$\text{Absorbância} = (2,8618 \times 10^3) \times (\text{meq. leucina})$$

tendo um $r = 0,9908$. Para determinar a porcentagem de proteína pela reação de Lowry, se usou a curva-padrão de um isolado proteico de soja definida pela função linear:

$$\text{Absorbância} = (1,055 \times 10^{-3}) \times (\mu\text{g de proteína})$$

tendo um $r = 0,9909$. Para determinar o GH% pela reação do TNBS foram testados ambos os TNBS recristalizado no laboratório e o TNBS sem purificar não se encontrando diferenças entre os dois. Como resultado, usou-se o TNBS sem purificar para todas as demais reações onde o TNBS foi requerido.

O GH% foi determinado pelo método do TNBS segundo recomendações de vários autores (4, 7, 201, 206), mediante o emprego da equação empírica:

$$GH\% = (\text{absorbância}) \times (100) \times (h_T \times b \times g \text{ prot.})^{-1}$$

onde:

$$h_T = 8,00$$

g de proteína = g de proteína da amostra em digestão

b = coeficiente de regressão da curva-padrão aqui levantada com leucina e TNBS = $1,4465 \times 10^3$, $R_n = 0,9909$

O processo de digestão enzimática das proteínas pode ser monitorado por várias técnicas, cada uma possuindo vantagens e desvantagens (100). O método da titulação com Formol, proposto em 1907 (257), demonstrou ser de grande utilidade para titulações de aminoácidos mono e dicarboxílicos e de hidroxiaminoácidos; porém, apresenta desvios nos resultados quando existe uma mistura de vários aminoácidos como os iminoácidos, aminoácidos dibásicos e aminoácidos sulfurados (125).

A detecção e quantificação dos aminoácidos com a reação da ninhidrina é devida à formação estequiométrica do cromóforo púrpura de Ruhemann que, embora de grande utilidade na determinação rotineira de aminoácidos apresenta desvantagens para esta finalidade devido a efeitos da temperatura e tempo da reação, natureza do aminoácido e à toxicidade do reagente (304).

O método de Lowry, amplamente usado para determinar proteínas colorimetricamente, baseado na reação entre resíduos laterais aromáticos, ligações peptídicas e o complexo cobre-tartarato, pode sofrer interferências com as glicosaminas e as galactosaminas em hidrolisados ácidos (109).

Pode-se também acompanhar o curso da hidrólise enzimática usando-se a reação do TNBS com os aminoácidos primários formados durante a hidrólise (32, 100). Todavia, existem algumas interferências inerentes à mistura hidrolisada, sendo que o TNBS pode reagir com compostos como ribose e guanina, provenientes de ácidos nucleicos e pentosanas. Esses compostos porém, não são abundantes na soja, o que favorece sua utilização, neste caso (226). O íon sulfito é subproduto da reação do TNBS com grupos aminas livres que catalisa a ruptura de ligações dissulfídicas a pH alcalino (80), daí que a velocidade de reação dos grupos sulfidrilas ser de 30 a 50 ve

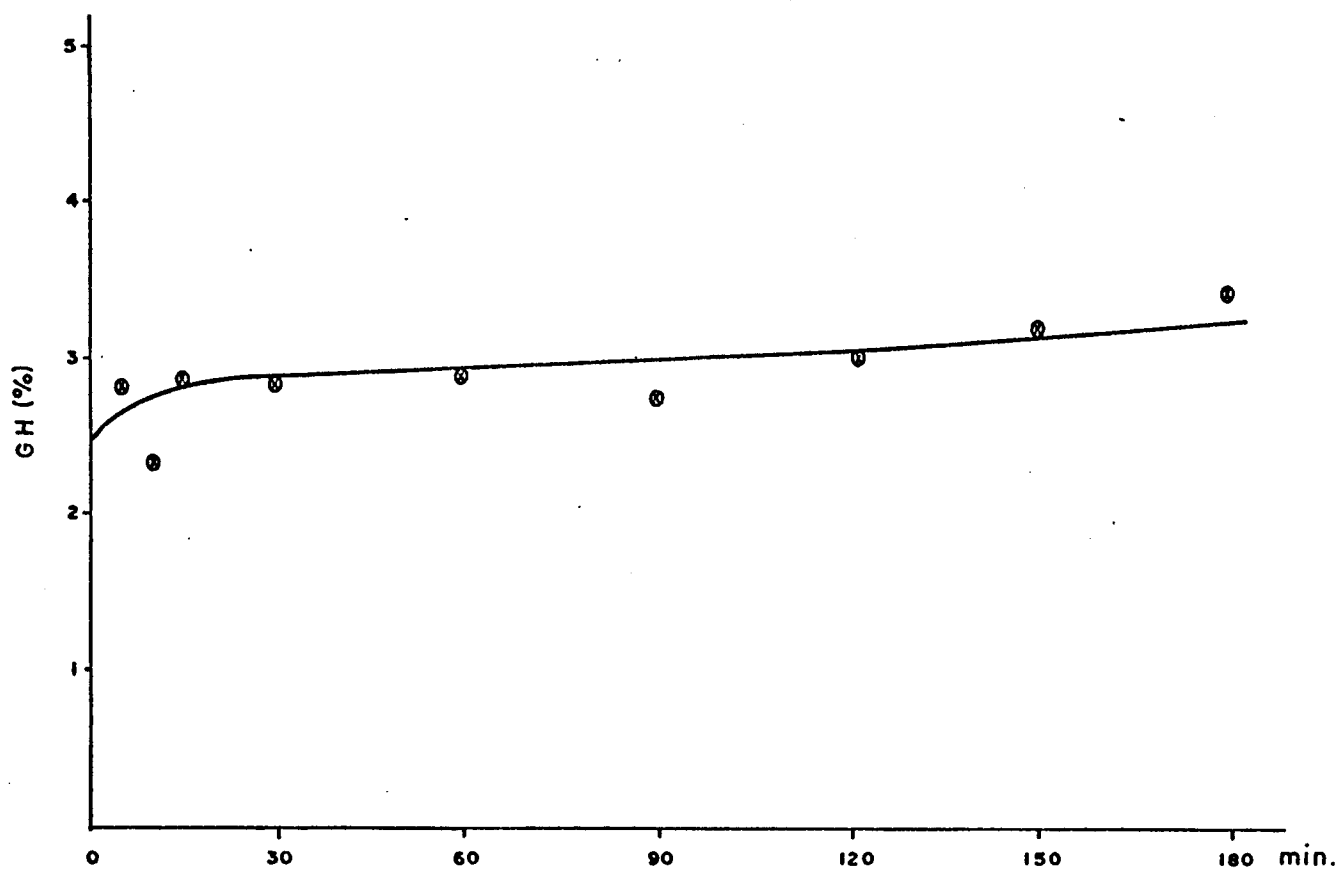
zes maior que as dos grupos aminos (81). O SDS a pH 8,5 ou menor liga cadeias protéicas formando pontes do tipo ξ -lisina-proteína, no entanto a pH maiores que 8,5 provoca dissociação das cadeias polipeptídicas ficando expostos os grupos aminos que estavam impedidos, podendo dessa forma alterar os valores de absorbância (102).

Pelos resultados apresentados na Tabela 20 e na Figura 9, pode-se observar que o método do 1NBS foi o que ofereceu maior sensibilidade e homogeneidade durante as três horas de hidrólise e, por tanto, foi escolhido como o mais confiável.

4.6 Grau de Hidrólise (GH) Inicial do Substrato RESD

Foi necessário, antes de se efetuar qualquer hidrólise, no substrato RESD, verificar qual o grau de solubilização inicial da proteína. Para tanto o RESD foi tratado de igual maneira quanto a hidrólise, exceto o acréscimo de enzima. O efeito de manter o substrato nas condições de hidrólise é apresentado na Figura 10.

FIGURA 10. Efeito da não adição da enzima no GH% do resíduo desen-
gordurado RESD. S = 3,00% E/S = 0,00, pH = 8,00,
T = 50°C.



Porque a solubilização e extração das proteínas da soja aumenta quando o diâmetro das partículas diminui e o pH do meio aumenta (179, 253), o resíduo desengordurado (RES_D) foi previamente homogeneizado granulometricamente para 100 mesh e o pH foi mantido em $8,00 \pm 0,05$. Os valores praticamente constantes do GH% demonstraram que não ocorreu ruptura de ligações peptídicas ou liberação de grupos aminas durante o teste (7, 100). O pequeno aumento registrado no GH% foi provavelmente ocasionado pela lenta hidratação da partícula e solubilização interna de proteínas inteiras ou peptídios.

4.7 Hidrólise do RES_D com Diferentes Enzimas

Com o objetivo de estudar a atuação da enzima frente ao substrato específico o resíduo desengordurado (RES_D) foi hidrolisado com quatro enzimas: pepsina, denapsina-10P, papaína e alcalase 0,6L, tendo como parâmetros operacionais os indicados na Tabela 14.

Os resultados correspondentes, apresentados na Tabela 21 e na Figura 11, demonstraram que o resíduo desengordurado foi excelente substrato para a alcalase 0,6L; com 90 min de hidrólise, o produto apresentou 24,2% GH, enquanto que o isolado e concentrado protéico de soja ($S = 8,0\%$) só atingiram 10% GH com 3 horas de hidrólise (4, 7, 206, 208). A digestão péptica produziu maior GH% que a papaína e a denapsina-10P, porém, somente 44,7% do grau apresentado pela alcalase 0,6L sob os mesmos parâmetros. Cabe mencionar que a relação E/S, mantida constante em todos os casos, foi obtida experimentalmente como sendo a relação em que a massa reagente oferecia a fluidez necessária para a tomada das alíquotas as

quais foram processadas pelo método do TNBS na determinação do GH%.

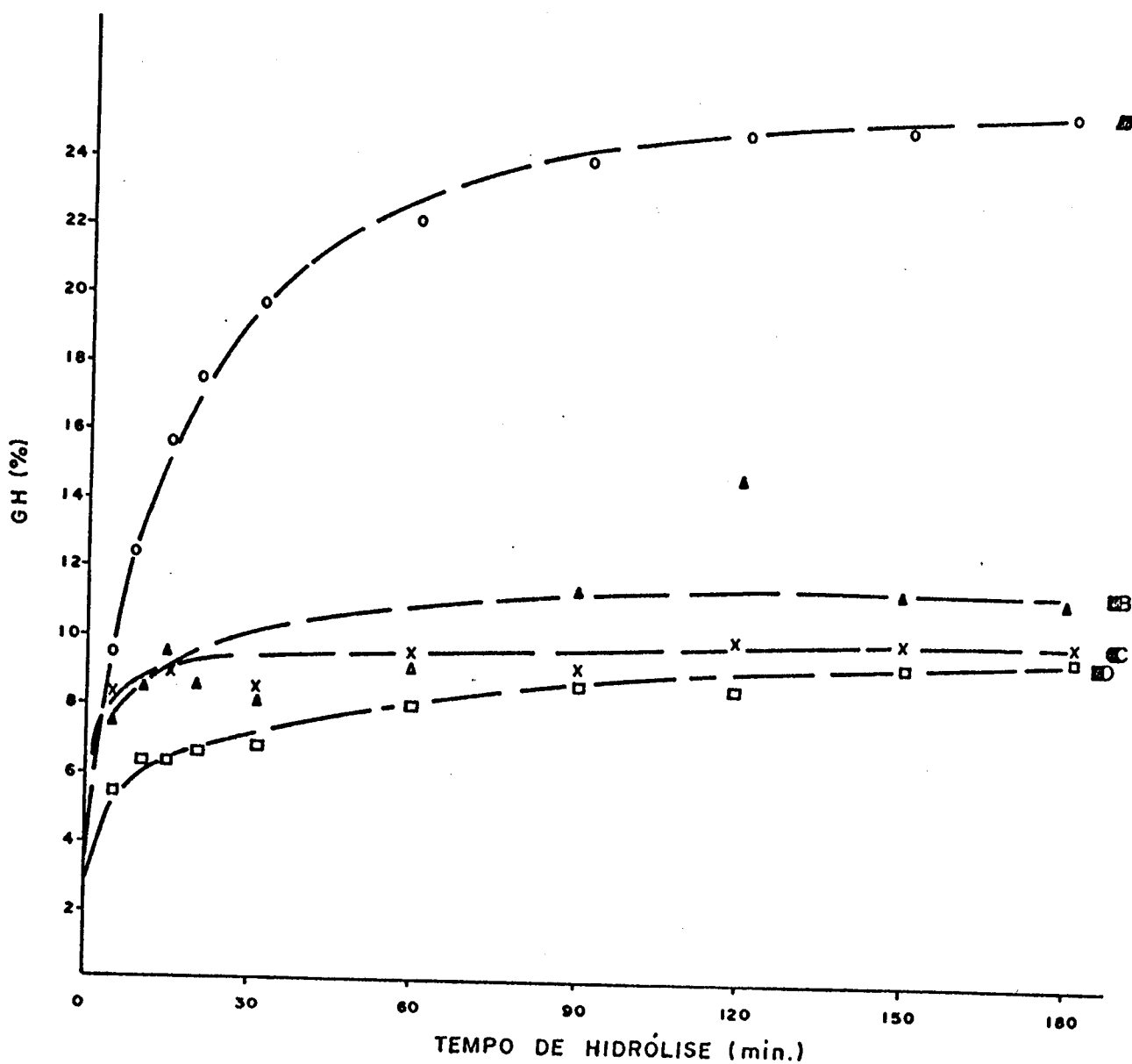
A variabilidade do GH com a pepsina e com a papaína, provavelmente tem sido causada pela falta de homogeneidade da massa reagente particularmente no início da reação.

TABELA 21. Porcentagens do grau de hidrólise (GH%) dos hidrolisados enzimáticos do resíduo desengordurado (RGSD) com diferentes enzimas (a).

Tempo (min)	Pepsina	Denapsina-10P	Papaína	Alcalase 0,6L
0	3,12	2,90	4,42	3,58
5	7,17	5,25	8,19	9,40
10	8,58	6,17	8,83	12,21
15	9,42	6,24	8,83	15,80
20	8,50	6,65	9,27	16,85
30	8,07	6,82	8,43	19,73
60	9,37	8,05	9,58	22,20
90	11,53	8,93	9,09	24,20
120	14,86	8,68	10,08	24,93
150	11,47	9,50	10,08	25,10
180	11,47	9,91	10,62	25,65

a) Foram mantidas constantes, em todos os casos, as seguintes relações: E/S = 2,0%; S = 3,0%. Os resultados do GH% para cada enzima são valores médios para a pepsina: 3 repetições, denapsina-10P: 3 repetições, papaína: 3 repetições e para a alcalase 0,6L: 10 repetições.

FIGURA 11. Porcentagens do grau de hidrólise (GH%) dos hidrolisados enzimáticos do resíduo desengordurado RESD com Alcalase 0,6L (A), Pepsina (B), Papaína (C) e Denapsina-10P (D).



Podemos todavia afirmar que, perante um mesmo substrato, e não alterando as condições químicas ou físico-químicas da reação, o grau de desnaturação da proteína é talvez o fator principal que governa a hidrólise enzimática; assim, a proteína na sua forma nativa é pouco ou nada susceptível à degradação enzimática devido à conformação compacta (91).

É sugerida uma relação ideal entre enzima e substrato, em que a concentração do substrato é aproximadamente 20 vezes o valor do K_M da enzima (91). Recomenda-se também que para hidrólise com mais de 2 horas de digestão se use aproximadamente 5% de etanol ou 0,5% de tolueno como agentes preservantes ou anti-microbianos, que devem ser removidos ao findar o processo, por aquecimento (52).

A proteólise com a pepsina (pH 1,5 - 2,0) em baixa concentração de enzima, resulta apenas na hidrólise de poucas ligações peptídicas. A maiores concentrações enzimáticas e tempos prolongados, porém, observa-se hidrólise exaustiva. A ação desta enzima é promovida pela presença de sítios ligantes hidrofóbicos próximos à ligação susceptível, ao passo que o aparecimento de grupos aminas livres adjacentes à ligação potencialmente susceptível, limita a hidrólise péptica (111).

A hidrólise das proteínas com denapsina-10P é semelhante à da pepsina sendo de ação lenta e requerendo tempos de até 24 horas (256). Essa enzima é fortemente inibida por detergentes como o SDS. A denapsina-10P hidrolisa as proteínas da soja a pH 3,5 e 50°C, em 3 dias, e libera peptídios de 7 a 9 resíduos de aminoácidos comportando-se como uma endoptidase, ainda que diferente das aminopeptidases ou das carboxipeptidases. A farinha desengordurada de soja (FDS), quando hidrolisada com denapsina-10P apresentou

aproximadamente 1,8% de proteína hidrolisada depois de 240 min de hidrólise (179).

A papaína é uma sulfidrilo-protease de ampla especificidade e apresenta maior poder degradativo que a pepsina. As ligações mais suceptíveis são as formadas pelos grupos carboxila e alfa amina da lisina, arginina, fenilalanina (22, 111).

A alcalase, pertence ao grupo das serino-proteases (E. C.3.4.4:16) e de ampla especificidade. Há evidências de que essa enzima ataca aproximadamente 1/3 das ligações peptídicas da caseína, 1/4 das ligações peptídicas de gelatina (29, 210) e hidrolisa o isolado protéico da soja até 10% GH em 3 horas de digestão a pH e temperaturas de 8,0 e 50°C, respectivamente (4, 6, 205, 206).

4.8 Efeito da Autoclavagem do Resíduo Desengordurado na Susceptibilidade à Hidrólise

4.8.1 Dispersibilidade Protéica e Solubilidade de Nitrogênio

O resíduo desengordurado RESD foi tratado termicamente por autoclavagem de 30 e 15 min resultando os produtos denominados RESDT-15 e RESDT-30. Os índices de dispersibilidade protéica (PDI) e de solubilidade do nitrogênio (NSI), determinados para esses produtos são apresentados na Tabela 22.

TABELA 22. PDI e NSI do resíduo desengordurado RESD e seus produtos de autoclavagem RESDT-15 e RESDT-30.

Índices	RESD	RESDT-15	RESDT-30
PDI (%)	12,80	3,64	3,58
NSI (%)	13,80	5,83	5,73

Esses resultados revelaram que o RESDT-15 foi desnaturado termicamente até um 71,6% enquanto que o RESDT-30 perdeu 72,0% do valor inicial do RESD, indicando que o processo térmico por autoclavagem aumentou a desnaturação até reduzir a 28% o valor inicial de dispersibilidade protéica do resíduo desengordurado, e que há pouca diferença entre os tratamentos de 15 e 30 minutos.

4.8.2 Hidrólise Enzimáticas dos Resíduos RESDT-15 e RESDT-30 com Alcalase 0,6L

Os resultados do GH% dos resíduos RESDT hidrolisados enzimaticamente com Alcalase 0,6L se apresentam na Tabela 23.

TABELA 23. Grau de Hidrólise (GH%) dos resíduos RESDT-15 e RESDT-30 tratados enzimaticamente com a Alcalase 0,6L. Para comparação, mostram-se os valores do RESD não autoclavado.

Tempo (min)	RESD	RESDT-15	RESDT-30
0	3,58	1,52	1,97
5	9,40	4,83	6,06
10	12,21	8,64	7,51
15	15,80	9,44	8,21
20	16,85	9,52	9,75
30	19,73	9,72	10,74
60	22,20	11,60	14,50
90	24,20	16,29	14,90
120	24,93	17,57	16,30
150	25,10	17,50	17,80
180	25,65	17,60	17,90

É interessante notar que no tempo 0, o GH do RESD é aproximadamente o dobro dos produtos termicamente desnaturados isso vem demonstrar o alto grau de desnaturação protéica, favorável à hidrólise exibida pelo RESD. A vantagem do RESD sobre os produtos autoclavados foi mantida, ainda que com certa diminuição, até o fim do tempo de hidrólise.

É evidente que o processo térmico usado para desnaturar a proteína promoveu insolubilização e indigestibilidade ao invés do efeito contrário, como era de se esperar, segundo alguns autores

(5, 7, 91, 221, 234, 239, 287). O fato pode sugerir que o tratamento térmico tenha propiciado a formação de agregados protéicos através de ligações cruzadas onde a enzima não pode penetrar com facilidade (283, 287).

4.9 Rendimentos

Para determinar os rendimentos, expressos em porcentagem de proteína recuperada, dos produtos enzimáticos, tratou-se o resíduo sem desgordurar RES com as diversas enzimas em estudo e se comparou as porcentagens de sólidos totais (S.T), graus Brix (^oB), e a proteína recuperada. Esses resultados encontram-se na Tabela 24.

TABELA 24. Comparação das porcentagens de sólidos totais, graus Brix e rendimentos obtidos no processo da hidrólise enzimática do resíduo sem desgordurar RES com 30 min de digestão.

Enzima	S.T. (%)	^o B	Rendimento (%)
I (a)	1,98	1,50	16,3
II (b)	2,27	1,70	18,2
Pepsina	5,55	5,25	48,72
Denapsina-10P	4,57	3,60	24,29
Papaína	4,03	4,00	50,40
Alcalase 0,6L	4,80	3,80	60,26

a) I = efeito da extração aquosa sem elevar o pH (50°C)

b) II = efeito da extração aquosa ajustando o pH para 8,00 (50°C).

sendo o rendimento calculado usando a seguinte relação:

$$\text{Proteína recuperada (\%)} = \frac{(\text{Peso hidrolisado}) \times (\% \text{ Proteína})}{(\text{peso total de proteína})} \cdot 100$$

A maior recuperação de nitrogênio encontrada ocorreu com a enzima alcalase 0,6L. Esses resultados estão em concordância com as suas respectivas porcentagens de grau de hidrólise (GH), em que se verificou a mesma ordem decrescente. Pode-se notar também que o tratamento alcalino a pH 8,00 não contribuiu em forma expressiva para o aumento do rendimento da extração em relação ao tratamento sem elevar o pH da massa reagente. Esse fato indiretamente evidencia a eficácia de qualquer uma das enzimas testadas na extração de nitrogênio de origem protéica.

4.10 Hidrólises Enzimáticas do Resíduo Desengordurado RESD, com Alcalase 0,6L para Prova Sensorial

4.10.1 Grau de Hidrólise (GH), Teor de Proteína e Graus Brix (^oB) dos hidrolisados

O grau de hidrólise (GH), teor de proteína do hidrolisado, porcentagem de proteína hidrolisada, sólidos totais no hidrolisado clarificado e teor de proteína do resíduo seco resultante em função do tempo de hidrólise do RESD com alcalase 0,6L se apresentam na Tabela 25.

TABELA 25. Acompanhamento da hidrólise do RESD com alcalase 0,6L visando a obtenção de hidrolisados para fins de avaliação sensorial.

Tempo (min)	GH (%)	Prot. no hidrolisado (%)	Prot. hidrolisadas (%)	G.B. (°B)	Prot. do re síduo do hi- drolisado (%B.S.)
0	4,16	1,35	45,0	1,8	31,6
5	11,44	2,49	83,0	3,0	30,6
10	12,15	2,66	88,7	3,2	30,2
15	12,58	2,62	87,4	3,2	30,5
20	13,51	2,62	87,4	3,4	31,0
30	13,62	2,76	92,0	4,0	30,7
60	18,63	2,85	95,0	4,8	31,0
90	20,14	2,85	95,0	5,0	31,0

Em função do tempo de hidrólise, o GH teve um desenvolvimento semelhante àquele mostrado na seção 4.7. Observando o desenvolvimento dos graus brix (°B) e a proteína do hidrolisado, podemos notar que o incremento dos °B é pouco superior ao incremento das proteínas hidrolisadas, podendo isso significar a dissolução gradativa de substâncias não protéicas e/ou aminoácidas.

É interessante notar que no tempo 0 o hidrolisado apresentou 4,16% GH com 1,35% de proteínas equivalendo a 45,0% da hidrólise do teor inicial de proteínas, fato que demonstra que houve atividade enzimática devido ao tempo necessário para que a massa reatante atingisse a temperatura de desnaturação.

4.10.2 Avaliação Sensorial dos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo Desengordurado RESD com Alcalase 0,6L

Os resultados percentuais que caracterizam os hidrolisados enzimáticos do RESD e Alcalase 0,6L estão apresentados na Tabela 26 e Figura 12.

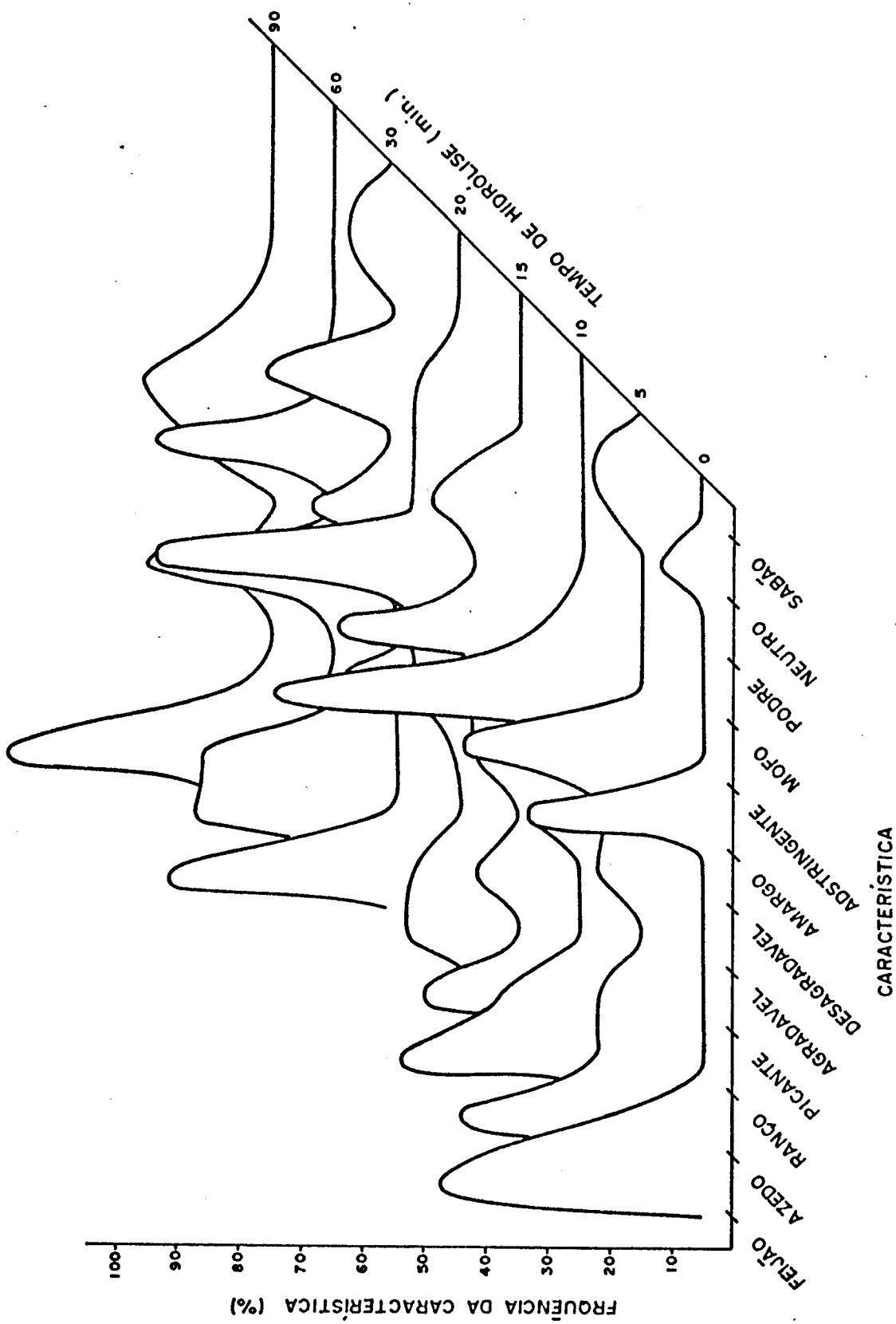
Os valores percentuais representam a frequência com que os vários sabores foram sugeridos pelos provadores. Entende-se como "feijão" as sugestões feijão cru, feijão e feijão cozido; azedo como ligeiramente azedo, azedo e fortemente azedo; amargo como ligeiramente amargo e fortemente amargo.

TABELA 26. Perfil sensorial (%) de sabor dos hidrolisados enzimáticos do resíduo desengordurado RESD com alcalase 0,6L (a).

Sabores	Tempos de hidrólise (min)							
	0	5	10	15	20	30	60	90
Feijão	45	29	29	29	7	36	21	43
Azedo	21	7	14	0	7	0	21	7
Ranço	0	7	0	7	0	0	0	0
Picante	0	0	0	0	0	7	0	7
Agradável	0	7	0	7	7	0	29	0
Desagradável	0	7	0	7	7	7	0	14
Amargo	29	29	50	29	50	14	29	21
Adstringente	0	0	7	7	7	0	0	7
Mofo	0	0	0	14	7	21	0	0
Podre	0	0	0	0	7	0	0	0
Neutro	7	7	0	0	0	7	0	0
Sabão	0	7	0	0	0	7	0	0

a) Valores médios de 8 x 3 (provadores x repetições)

FIGURA 12. Representação gráfica do perfil do sabor dos hidrolisados enzimáticos do resíduo desengordurado RESD e Alcalase 0,6L.



Todos os hidrolisados enzimáticos apresentam tanto o sabor amargo quanto o sabor a feijão e, em menor extensão, outros sabores. A característica amarga era de se esperar desde que, como é sabido, a hidrólise enzimática das proteínas produz alguns peptídios amargos, seja com enzimas ácidas ou básicas. Porém, tem-se demonstrado que o sabor amargo de um hidrolisado enzimático é devido à ação hidrofóbica de aminoácidos em peptídios com valores de "Q" (valor médio da hidrofobicidade de um peptideo) elevados e as proteínas da soja são um substrato que tem apresentado elevados valores de "Q" quando hidrolisadas enzimaticamente (190).

A extensão da hidrólise, indicada pelo GH, parece estar relacionada com a intensidade do sabor amargo. Vários autores (12, 206, 217, 234) já concordaram que o GH não maior que 20% é necessário para se ter um hidrolisado enzimático com sabor relativamente brando. Sob o ponto de vista sensorial, o hidrolisado do RESD apresentou característica de amargor moderado e estável, especialmente depois dos 20 primeiros minutos de hidrólise. Sabor característico de feijão também foi encontrado em todos os casos, acentuando-se aos noventa minutos de hidrólise.

4.11 Hidrólises Enzimáticas do Resíduo sem Desengordurar RES

O resíduo comercial "Protideal", aqui denominado de RES, foi também hidrolisado, sem mais preparo, com Alcalase 0,6L e com denapsina-10P. O GH% dos hidrolisados enzimáticos correspondentes são apresentados na Tabela 27 e na Figura 13.

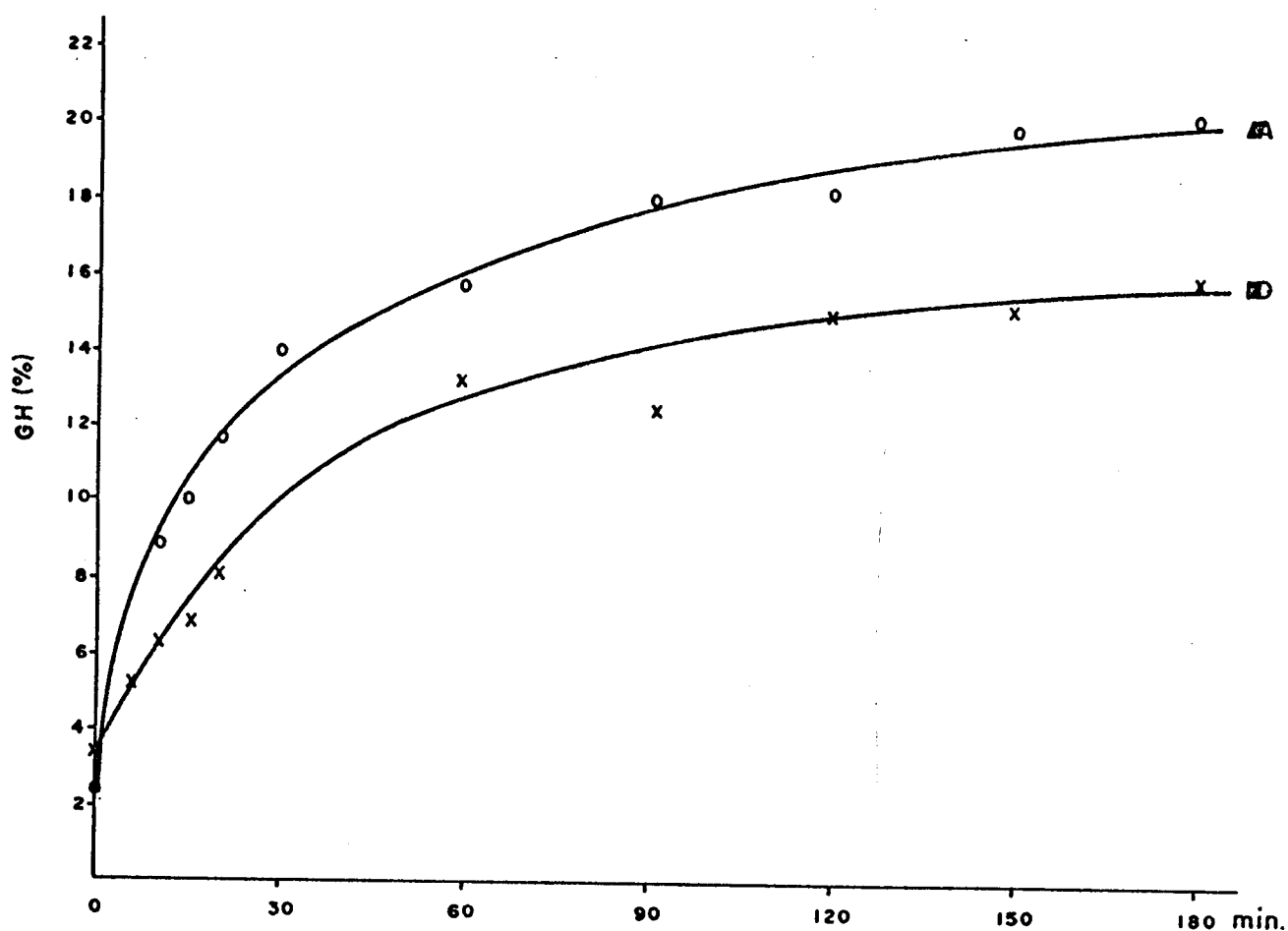
TABELA 27. Grau de Hidrólise (GH%) dos Hidrolisados enzimáticos do RES com alcalase 0,6L e denapsina-10P (a).

Tempo (min)	GH (%)	
	Alcalase 0,6L	Denapsina-10P
0	2,45	3,62
5	7,25	5,24
10	8,79	6,22
15	10,10	6,93
20	11,07	8,13
30	14,00	10,34
60	15,80	13,30
90	17,75	12,41
120	18,20	15,08
150	19,81	15,33
180	20,50	15,96

a) Valores médios de 4 repetições.

Na obtenção destes hidrolisados, foram mantidos $S = 3,0\%$, $E/S = 0,02$ e o GH foi determinado pelo método do TNBS. A massa reagente do substrato não desengordurado apresentou menor fluidez que a massa reagente do RESD; porém, mostrou-se de fácil manuseio para efeitos de agitação e amostragem.

FIGURA 13. Representação gráfica do GH% dos hidrolisados enzimáticos do resíduo sem desgordurar RESD com Alcalase 0,6L (A) e Denapsina-10P (D); S = 3,00%, E/S = 0,02.



Os valores do grau de hidrólise apresentados pela Alcalase 0,6L foram menores que os valores obtidos com o resíduo desengordurado RESD (Fig. 11). O fato não foi de surpreender uma vez que a emulsão do substrato protéico do RES (aproximadamente 18% de gordura) deve dificultar a ação enzimática; mesmo assim, o decréscimo no G.H.% da alcalase foi menor que 1/5. Todavia, a hidrólise com denapsina 10P foi inesperadamente favorecida pela presença da gordura no substrato, fato sobre o qual não se tem conhecimento na literatura (91, 221, 234, 239, 287). A vantagem no GH aqui correspondeu a um fator de até 1.6 vezes o grau atingido com o RESD. A superioridade da hidrólise com Alcalase 0,6L, foi mantida como pode ser observada na Figura 13.

4.12 Porcentagens de Proteína, Sólidos Totais e Graus Brix dos Hidrolisados Enzimáticos dos Sistemas: RES/Alcalase 0,6L e RES/Denapsina-10P para Fins Sensoriais

Os resultados dessas determinações se apresentam na Tabela 28.

As concentrações protéicas dos hidrolisados, foram menores do que as encontradas nos hidrolisados dos resíduos desengordurados (RESD) (Tabela 25). Esse decréscimo era esperado dada a própria natureza do resíduo sem desengordurar e os mesmos graus de hidrólise observados. No entanto, o rendimento de sólidos totais mostrou ser superior ao relatado para uma farinha desengordurada de soja, hidrolisada durante 5 horas com Denapsina-10P, e que apresentou apenas 5,4% de S.T. (179). Através dos sistemas montados com o RES se obteve 5,15 e 5,05% de S.T., com Alcalase 0,6L e Denapsina -10P aos 90 min de hidrólise, respectivamente. Esses resultados su

gerem a existência da certa vantagem no emprego do RES como substrato em contraposição à FDS.

TABELA 28. Proteína solúvel, sólidos totais e graus brix dos hidrolisados enzimáticos do resíduo sem desengordurar (RES) para fins sensoriais (a).

Tempo (min)	Alcalase 0,6L			Denapsina-10P		
	Prot.(%)	S.T.(%)	°B	Prot.(%)	S.T.(%)	°B
0	0,78	1,88	1,8	0,44	2,05	1,8
5	2,04	3,99	2,8	0,58	3,54	2,2
10	1,95	3,99	3,0	0,69	3,57	2,8
15	2,44	4,42	3,0	0,85	4,42	3,0
20	2,49	4,99	3,2	0,90	4,18	3,0
30	2,49	4,79	3,6	0,90	4,57	3,2
60	2,50	4,85	3,8	1,12	5,19	3,4
90	2,54	5,15	4,0	1,22	5,05	3,8

a) Valores médios de 4 repetições

4.13 Avaliação Sensorial dos Hidrolisados Enzimáticos Obtidos do RES com Alcalase 0,6L e Denapsina-10P

O sabor dos hidrolisados enzimáticos do resíduo sem desengordurar RES com Alcalase 0,6L e Denapsina-10P, devidamente neutralizados, foram avaliados sensorialmente por uma equipe de

provalores previamente instruídos e treinados. Os resultados dessa avaliação se encontram nas Figuras 14 e 15.

Tanto os hidrolisados obtidos com a alcalase 0,6L como os obtidos com a Denapsina-10P foram caracterizados, dentro da escala fornecida ao provador, como amargos e com sabor a feijão. Essas características eram de se esperar nos hidrolisados de Alcalase 0,6L mas não nos hidrolisados da Denapsina 10P, pois outros autores (179, 214) assinalaram que a Denapsina-10P, nas mesmas condições de hidrólise, produz hidrolisados sem sabor amargo nem sabor a feijão a partir das proteínas do isolado protéico de soja ou da FDS.

É interessante ressaltar que a representação gráfica do perfil do sabor dos hidrolisados enzimáticos, mostra com facilidade as diferenças entre os dois produtos e entre os diversos tempos de hidrólise. Nos dois casos, o substrato sem hidrólise teve o sabor de feijão mais acentuado entre os vários mencionados pelo painel. A hidrólise destacou a característica de amargo, sendo que com a Denapsina-10P houve gradações de adstringência e desagradável. Foi notável também que, com esta enzima, o produto de maior tempo de hidrólise foi mais claramente amargo.

Deve-se salientar que a percepção do provador, ao que parece, varia o suficiente para provocar oscilações na sua resposta quanto aos sabores de feijão e amargo. Isso pode ser visto nas variações ao longo do tempo de hidrólise com Alcalase 0,6L, as que chegaram a ser de até 100% de uma amostra para a seguinte. Também deve ser observado que, antes de qualquer hidrólise, o extrato do resíduo já apresentava sinais de amargor, segundo alguns provadores e que a altura dos picos da frequência não necessariamente indicam a intensidade das sensações, senão apenas a singularidade da mesma.

FIGURA 14. Representação gráfica do perfil do sabor dos hidrolisados enzimáticos do resíduo sem desengordurar RES e Alcalase 0,6L.

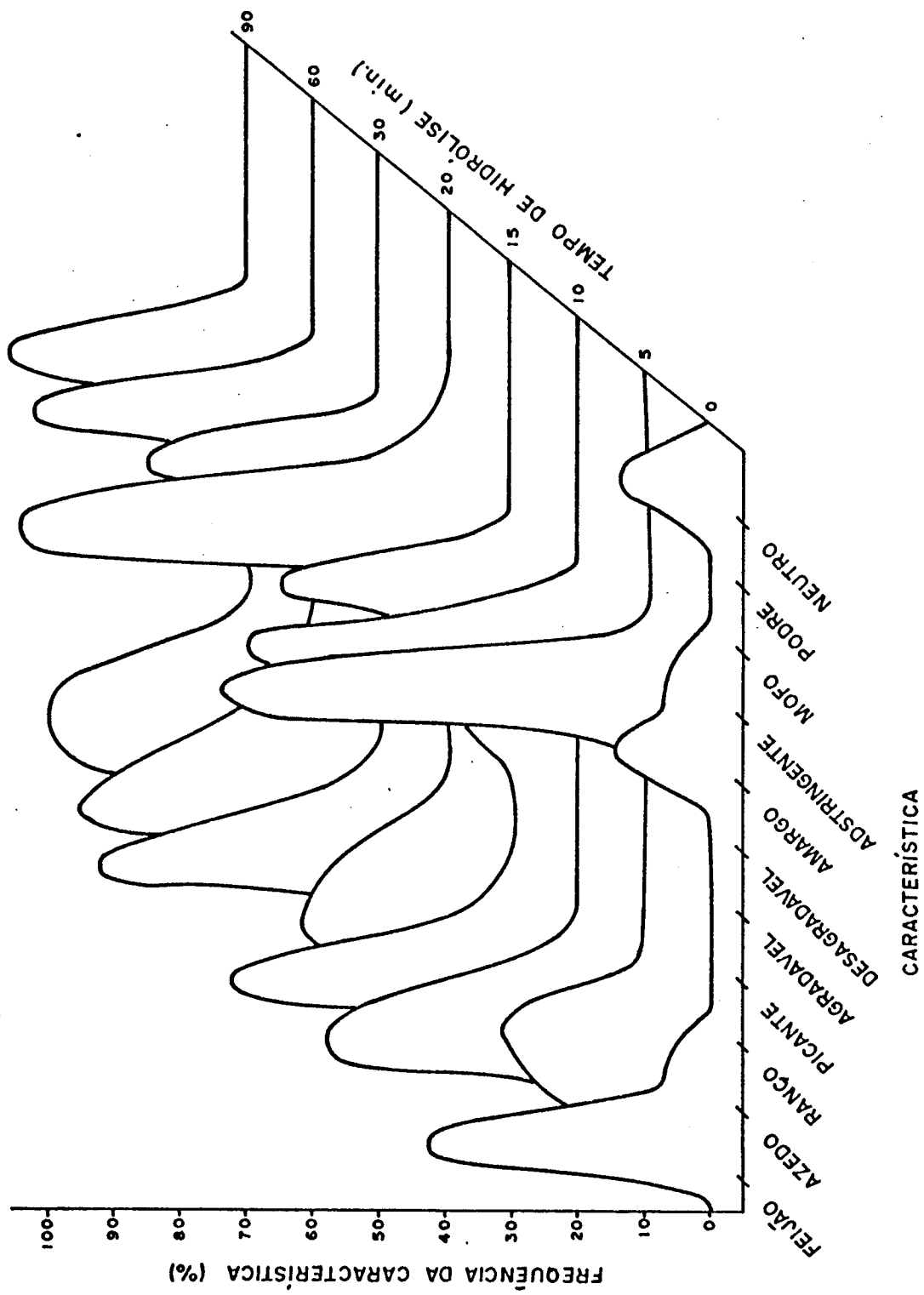
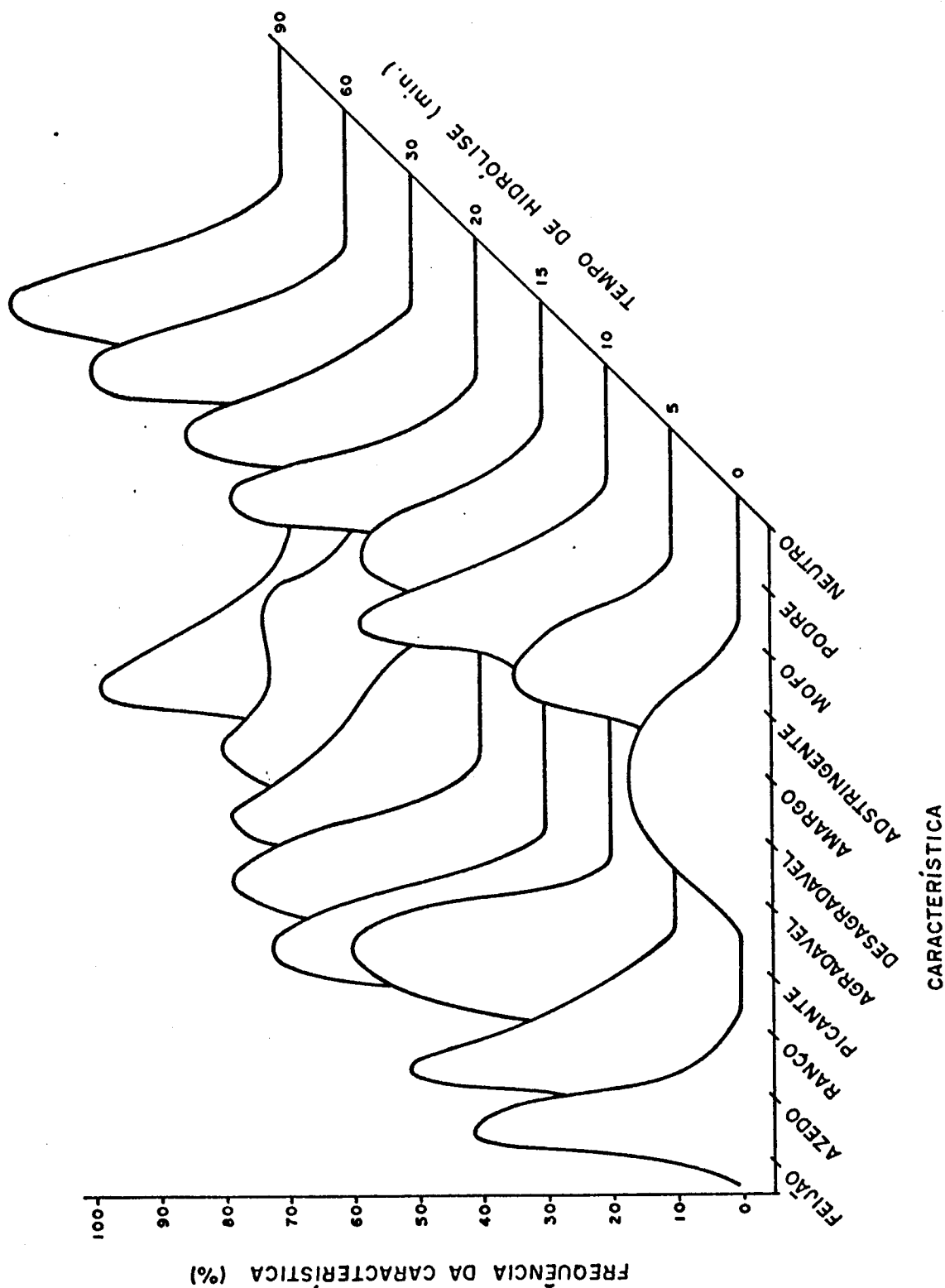


FIGURA 15. Representação gráfica do perfil do sabor dos hidrolisados enzimáticos do resíduo sem desengordurar RES e Denapsina-10P.



4.14 Caracterização Química, Físico-Química, e Biológica do Hidrolisado Enzimático de 30 min, Produto do RES e Alcalase 0,6L

O RES foi hidrolisado enzimaticamente por 30 min com a Alcalase 0,6L como descrito no item 3.11 e apresentado na Figura 7; suas principais características se apresentam a seguir.

4.14.1 Composição Centesimal

Os resultados da composição do hidrolisado enzimático concentrado e liofilizado (H30L) se apresentam na Tabela 29.

TABELA 29. Composição centesimal do hidrolisado enzimático H30L.

Fração	$\bar{x} \pm 1 \sigma$ (a)
Umidade	0,60 $\pm$ 0,13
Proteína (%N x 6,25)	52,17 $\pm$ 1,60
Extrato etéreo	11,44 $\pm$ 0,42
Fibra bruta	0,51 $\pm$ 0,07
Cinza	7,00 $\pm$ 0,37
Carboidratos (diferença)	28,28

a) Média de 10 repetições.

O hidrolisado enzimático H30L, antes de ser liofilizado apresentou 2,47% de proteína, 5,5% de S.T. e 5,8^oB; sendo concentrado por rotavapor até 10,8 de S.T. e 10,5^oB, congelado e liofilizado por 72 horas.

4.14.2 Composição em Carboidratos

4.14.2.1 Carboidratos Solúveis por Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

Esta análise foi realizada para evidenciar a presença dos carboidratos rafinose e estaquiose principalmente no hidrolisado enzimático e outros produtos. Os resultados, expressos como porcentagens de Rf, são apresentados na Tabela 30.

A cromatografia evidenciou a presença da rafinose e estaquiose em todas as amostras testadas menos no isolado protéico de soja. Pela intensidade das manchas, pode-se dizer que em todos os produtos os oligossacarídeos se apresentaram, em concentrações apreciáveis, principalmente a estaquiose.

TABELA 30. Fatores de retenção porcentual (hRf) dos carboidratos separados por TLC (a).

Componentes	M.P	EHS	RES D	PVI	RH30L	H30L	H30	RES	FDS
n.i	-	28	28	-	28	28	28	28	28
Estaquiose	38	38	38	-	38	38	38	38	38
Rafinose	50	50	50	-	50	50	50	50	50
Melibiose	55	55	55	-	55	55	55	55	55
Sacarose	61	61	61	-	61	61	61	61	61
Glicose	65	65	65	-	65	65	65	65	65

a) Valores arredondados.

sistema de desenvolvimento: EtOAc + OHAc + H₂O (60 + 20 + 20)

onde: M.P. = mistura de padrões em concentrações de 0,1% aprox.

EHS = extrato hidrossolúvel de soja formulado comercialmente

PVI = isolado protéico de soja preparado no laboratório

RH30L = resíduo do hidrolisado enzimático liofilizado

H30L = hidrolisado enzimático liofilizado

n.i = componente não identificado

No resíduo do hidrolisado enzimático (RH30L), verificaram-se manchas de menor intensidade; fato esse provavelmente devido à extração prévia dos carboidratos solúveis, primeiro na obtenção do extrato hidrossolúvel (EHS) e segundo durante o processo enzimático que deu origem às amostras H30 e H30L. A presença de um componente não identificado (n.i.), com mancha de pouca intensidade em quase todas as amostras foi evidenciada.

É interessante notar que a hidrólise enzimática com Alcalase 0,6L não degradou os carboidratos rafinose, estaquiose, e outros, o que demonstra que o preparo enzimático utilizado está praticamente livre de carboidrasas como galactosidasas (60).

Há evidências de que os carboidratos da soja, ainda estejam envolvidos em polissacarídeos complexos do tipo arabinogalactanas, arabinanas e polissacarídeos ácidos, semelhantes a substâncias pépticas e que perfazem, esses três componentes cerca de 50% do total dos carboidratos da soja. Os 50% restantes incluem principalmente sacarose (6,6%), rafinose (1,0%) e estaquiose (4,4%) na FDS (223).

4.14.2.2 Carboidratos Totais por Espectrofotometria

Os carboidratos foram determinados por método espectro
fotométrico e os teores expressos em porcentagens de glicose se
apresentam na Tabela 32.

TABELA 31. Teor médio de carboidratos totais expressos como glicose
se (a).

Produto	Glicose
	g/100 $\pm$ D.P
Hidrolisado enzimático (H30)	4,79 $\pm$ 0,04
Hidrolisado enzim.liofilizado (H30L)	17,48 $\pm$ 0,24
Extrato hidrossolúvel em pó (EHS)	32,97 $\pm$ 0,98
Resíduo do hidrolisado H30 (RH30L)	7,59 $\pm$ 0,49
Resíduo sem desengordurar (RES)	9,99 $\pm$ 0,48
Resíduo desengordurado (RES D)	9,65 $\pm$ 0,53
FDS	15,28 $\pm$ 0,62
Isolado protéico (PVI)	0,16 $\pm$ 0,03

a) médias de 5 repetições usando curva padrão de glicose com Absor
bância = $(0,01075) \times (\mu\text{g de gluc.})$, $r = 0,9997$

D.P. = desvio padrão

A reação do reagente fenol-sulfúrico tem mostrado grande utilida
de para produtos da hidrólise de polissacarídeos sejam de pentoses
ou de hexoses, ou para carboidratos solúveis (60,68,269). Pelos re
sultados obtidos nesta determinação, verificou-se que existe uma
estreita relação entre a quantidade de carboidratos totais encontra

da no extrato hidrossolúvel (EHS) e a revelada pelo fabricante. No entanto, existem discrepâncias no que diz respeito às quantidades de carboidratos totais calculadas na composição centesimal, tanto para o hidrolisado enzimático como para as demais amostras. Esse fato provavelmente pode ser devido à presença de monossacarídeos que produzem cromóforos cujo comprimento de onda máximo difere de 490 nm. O comprimento de onda de 490 nm é recomendado para hexoses, porém é sabido que a reação das pentoses produz cromóforos de comprimentos de onda máximos deslocados (296), o que pode introduzir erros na quantificação.

O método usado para esta determinação apresentou 95,4 ± 1,96% de rendimento quando se processou uma amostra de FDS enriquecida com uma quantidade conhecida de glicose (68).

4.14.3 Composição em Aminoácidos

As composições em aminoácidos do hidrolisado enzimático (H30L), FDS, isolado protéico (PVI), extrato hidrossolúvel de soja preparado no laboratório (EHSL), extrato hidrossolúvel de soja formulado comercialmente (EHS) e resíduo sem desengordurar (RES) são relacionados na Tabela 32 para comparação.

Os resultados apresentados na Tabela 32 demonstram que conteúdos de aminoácidos do extrato EHSL e os do isolado protéico PVI, ambos preparados no laboratório, são semelhantes e estão em concordância com dados publicados por outros autores (226, 295). O perfil das proteínas da FDS também está em concordância com dados encontrados na bibliografia (56, 91), a não ser pela ampla variabilidade que apresenta no conteúdo de ácido glutâmico. No entanto, os perfis de aminoácidos do hidrolisado enzimático liofilizado

TABELA 32. Perfil de aminoácidos (g/100g prot.) do hidrolisado enzimático liofilizado (H30L) comparados com outros produtos protéicos de soja (a).

	FDS	PVI	H30L	EHSL	EHS	RDS (b)
Proteína (%)	53,04	98,75	51,85	2,99	28,27	-
(c)	(1,94)	(1,05)	(0,89)	(0,25)	(0,08)	
Ác. aspártico	12,21	11,19	10,64	12,5	11,54	-
Treonina	3,44	3,43	3,66	3,77	3,94	3,50
Serina	5,09	4,60	4,48	5,10	5,04	-
Ác. glutâmico	20,13	24,05	24,25	20,13	21,73	-
Prolina	4,74	2,62	3,58	4,85	4,98	-
Glicina	4,24	3,69	3,66	4,14	4,41	-
Alanina	4,30	3,50	3,74	3,75	4,33	-
Cistina (1/2)	1,06	0,91	0,77	1,17	0,99	-
Valina	5,05	4,15	4,38	4,21	4,41	4,80
Metionina	1,18	1,21	1,07	1,29	1,20	-
Isoleucina	5,13	5,20	4,46	4,81	4,82	4,20
Leucina	7,84	7,97	7,13	6,76	6,48	7,00
Tirosina	3,48	3,53	3,51	3,66	2,71	-
Fenilalanina	5,30	5,17	4,59	5,20	4,25	-
Histidina	2,19	2,76	2,97	2,59	2,72	1,70
Lisina	5,77	6,13	6,21	6,07	6,40	5,10
Amônia	1,65	2,64	2,26	2,02	1,80	-
Arginina	7,19	7,58	7,18	7,94	7,76	-
Triptofano	1,41	1,02	1,02	1,45	1,33	1,10
Lisina disponível	4,77	5,48	6,10	6,31	6,40	-
Met + Cys	2,21	2,12	1,84	2,46	2,19	2,60
Phe + Tyr	8,78	8,70	8,10	8,86	6,96	7,30
AAET (d)	41,82	41,48	39,77	40,98	39,26	37,30

a) médias de 2 repetições

b) níveis de AA essenciais de uma proteína de elevada qualidade segundo a "Recommended Dietary Allowances" (232).

c) desvios-padrão de 5 replicatas

d) total de AA essenciais.

(H30L) e do extrato hidrossolúvel comercial (EHS) parecem semelhantes e comparáveis com o perfil da FDS, porém quantitativamente menores que do extrato hidrossolúvel (EHL) e do isolado protéico PVI, sendo que os conteúdos de triptofano e lisina disponíveis estão em concordância com dados encontrados na bibliografia (253).

Ao se comparar os totais de aminoácidos essenciais, pode-se estabelecer a seguinte ordem decrescente FDS, PVI, EHSL, H30L, EHS, sendo que apresentam maior conteúdo de aminoácidos essenciais que os recomendados para uma proteína de elevada qualidade (232). É interessante assinalar que o H30L apresentou melhor perfil de aminoácidos e maior conteúdo de aminoácidos essenciais em relação a hidrolisados enzimáticos do isolado protéico de soja ou da FDS obtidos por digestão com a Denapsina-10P, segundo dados publicados (179).

Comparando os teores de lisina disponíveis com os valores de lisina determinados pelo analisador, se verifica que 90,5% na FDS, 70,0% no PVI, 98,2% no H30L, 85,0% no EHSL e 99,9% no EHS do aminoácido respectivamente está disponível. A relação entre esses dois níveis de lisina é considerada de alta importância por outros autores (203); porém, sabe-se que na determinação de lisina disponível podem agir alguns interferentes como certos carboidratos apresentando valores espuriamente elevados (170). Essa razão foi usada para justificar o elevado conteúdo de lisina disponível encontrado no extrato hidrossolúvel formulado comercialmente (EHS). Por outro lado, a baixa disponibilidade registrada pelo isolado PVI é provavelmente devida ao processo de extração alcalina da proteína.

Há suficiente evidência experimental indicando que, na determinação dos aminoácidos, os dados inter-laboratoriais não reportam os mesmos resultados devido a uma série de variáveis entre

as quais cabe salientar: 1) o cálculo para cada aminoácido deveria ser com base no seu peso molecular não hidrolisado e não na forma de resíduo livre, pois da segunda forma apresentam-se resultados até 18% maiores (103); 2) temperatura e tempo de hidrólise; 3) pureza da amostra; 4) forma de eliminação do excesso de ácido; 5) exatidão da análise cromatográfica (244); 6) concentração e pureza do agente hidrolítico (236).

Dentre os aminoácidos que se degradam na hidrólise ácida com HCl se mencionam a serina, treonina, ác. aspártico, lisina, cisteína, tirosina, arginina, prolina e triptofano (69). No entanto, o ác. glutâmico sofre reações de ciclização no mesmo meio hidrolítico (111).

4.14.4 Testes para Lisinoalanina (LAL)

Para detectar a possível presença da LAL no hidrolisado enzimático H30L, os produtos PVI, EHS, RH30L, RESD e FDS foram paralelamente hidrolisados em ácido e os produtos de hidrólise cromatografados em camada delgada. Dos dois sistemas de desenvolvimento usados, o de n-BuOH + HOAc + H₂O deu manchas menos nítidas mas foi de maior resolução. Os valores dos HRf aparecem na Tabela 33.

Os resultados deste teste levantaram a suspeita da presença da LAL nas amostras H30L e PVI, por apresentar uma mancha difusa, com HRf próximo ao padrão LAL. A presença da LAL porém, ficou quase descartada ao comparar o comportamento da eluição do padrão com uma amostra fortificada com igual volume do mesmo padrão.

TABELA 33. Hrf dos produtos da hidrólise separados por TLC no teste qualitativo para LAL (a).

Lisina	LAL	PVI	EHS	RH30L	H30L	RES D	FDS
-	-	n.i	-	-	n.i	-	-
-	11	-	-	-	-	-	-
-	-	14	14	14	14	-	-
21	-	21	21	21	21	21	21
-	-	24	24	24	24	24	24
-	-	28	28	28	28	28	28
-	-	34	34	34	34	34	34
-	-	39	39	39	39	39	39
-	-	47	47	47	47	47	47
-	-	55	55	55	55	55	55
-	-	56	56	56	56	56	56
-	-	69	69	69	69	69	69
-	-	72	72	72	72	72	72

a) Dados arredondados.

Componente eluidos com um sistema de desenvolvimento contendo nBuOH + HOAc + H₂O (40 + 10 + 50).

4.14.5 Confirmação da Ausência da LAL por Cromatografia de Troca Iônica

A ausência da LAL, foi confirmada por cromatografia de troca iônica usando o analisador de aminoácidos Beckman 119CL. Como pode ser observado na Figura 16, a LAL padrão (tempo de retenção de 66 min) acrescentada ao H30L está completamente resolvida do

FIGURA 16. Cromatogramas obtidos por troca iônica do padrão LAL (A), hidrolisado enzimático H30L (B) e mistura do padrão LAL e hidrolisado enzimático (C).

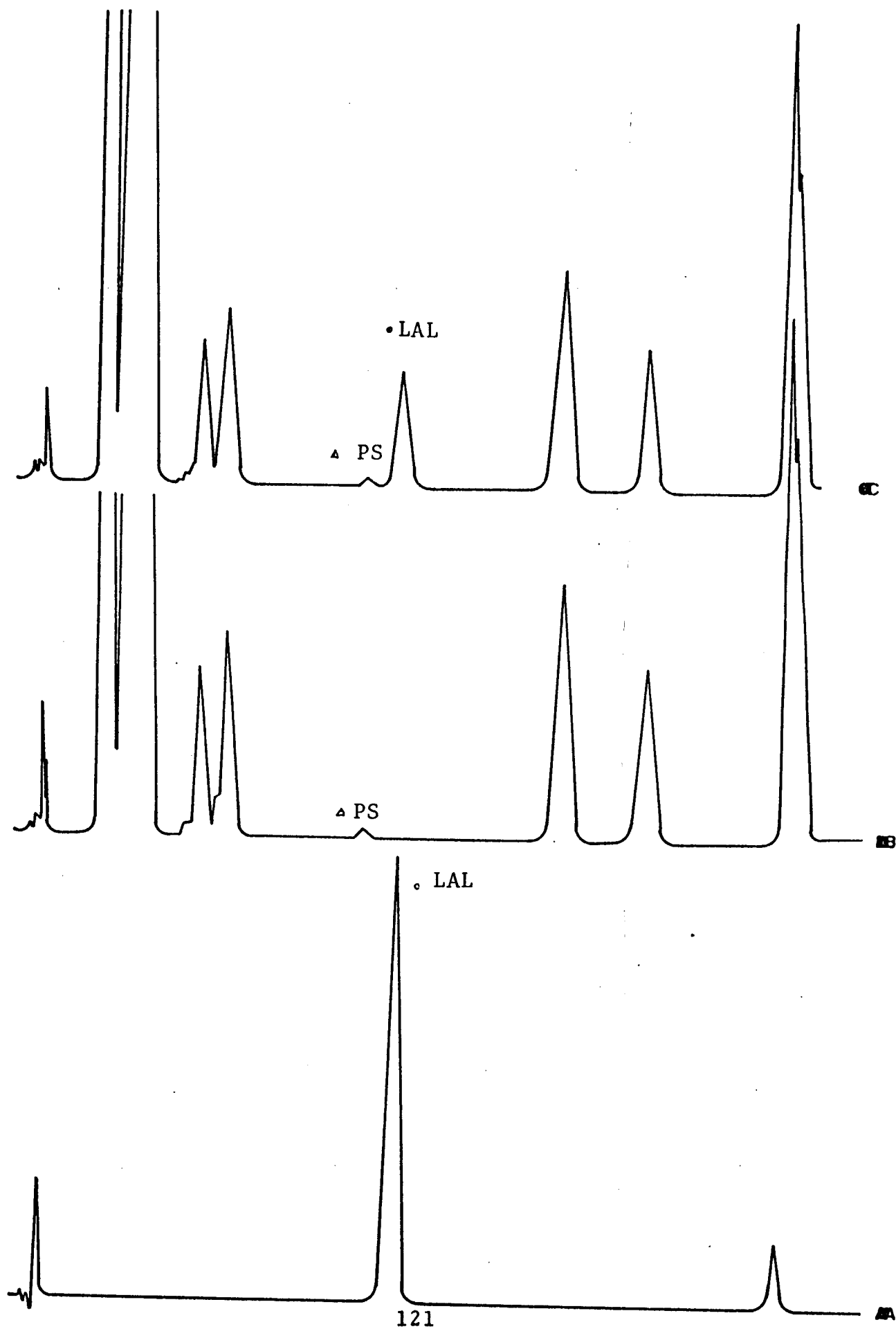
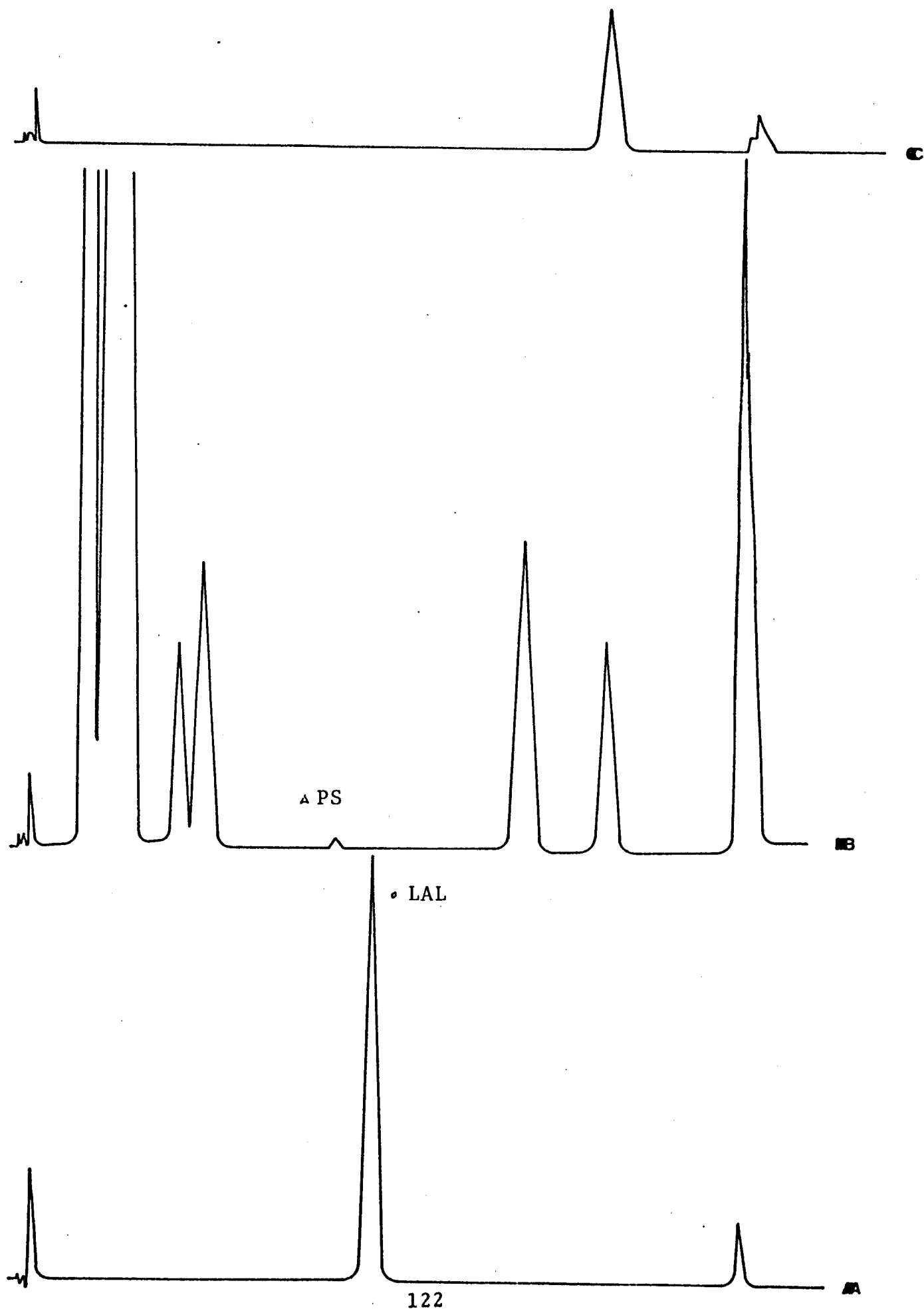


FIGURA 17. Cromatogramas obtidos por troca iônica do padrão LAL
(A), isolado protéico PVI (B) e lisina padrão (C).



pico suspeito encontrado na amostra, indicando que tal produto da degradação da lisina e a cisteína e/ou serina não é detectável no produto H30L. O tempo de retenção (63,5 min) do pico suspeito (P.S) no H30L também está claramente visível nos outros produtos de soja analisados por comparação.

Há suficiente evidência experimental sugerindo que o tratamento alcalino das proteínas pode ocasionar a formação da LAL (130, 225, 248, 263, 70, 86) já que se trata de um produto bastante estável à ação de ácido ou enzimas proteolíticas (253). A presença de determinados níveis de LAL comprovadamente diminui a qualidade protéica e pode causar citomegalia das células dos túbulos renais (86).

A LAL tem sido identificada em amostras protéicas que foram ou não tratadas em meio alcalino e sem tratamentos térmicos, como no caso dos hidrolisados das proteínas (HPV), onde se registraram teores de até 500 µg de LAL/g de proteína (263). No entanto, em produtos onde se incluem aditivos como derivados de alguns aminoácidos, registrou-se inibição na formação de LAL (89).

4.14.6 Conteúdo de Ácido Fítico

O teor de ácido fólico do hidrolisado enzimático H30L, comparado com o do resíduo sem desengordurar RES, farinha de soja (FIS), isolado protéico (PVI), e do extrato hidrossolúvel comercial (EHS), se encontram na Tabela 34.

TABELA 34. Conteúdo de ácido fítico do H30L, RES, FIS, PVI e EHS
(a).

Produtos de soja	Ácido fítico (%)
FIS	1,23 $\pm$ 0,02
PVI	1,29 0,04
RES	0,88 0,01
H30L	0,52 0,02
EHS	0,33 0,01

a) médias de 4 replicatas.

Torna-se conveniente determinar os níveis de ácido fítico em materiais alimentícios de origem vegetal devido às propriedades anti-nutricionais desse composto, que estão relacionadas com a habilidade de tornar biologicamente indisponíveis os íons divalentes cálcio, zinco, magnésio e ferro, entre outros (297).

O conteúdo de ácido fítico da FIS e do isolado protéico PVI estão em concordância com resultados de outros autores (124, 204), pelo que faz supor que os níveis encontrados para o H30L, RES e o EHS sejam confiáveis, inclusive pelo fato da reação ferro-fenantrolina ser uma reação sensível e seu produto estável (159); também, a relação molar do Fe:P de 4:6 é a mais representativa para o cálculo do ácido fítico.

Na Tabela 34 podemos observar que os maiores teores de ácido fítico estão na soja integral e no PVI, enquanto que o extrato hidrossolúvel possui apenas 25% da concentração da soja. O fato do PVI ter maior concentração que a FIS é indicativo do ácido estar associado a certas proteínas. A tendência observada é a do

ácido fítico permanecer seletivamente nos resíduos não solúveis. É importante ressaltar que, mesmo sabendo-se que a indisponibilidade do Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} e Mg^{2+} começa com o sequestro do íon pelo ácido fítico liberado através de hidrólise enzimática da proteína no estômago e no intestino (231). O hidrolisado H30L apresenta um dos teores mais baixos de ácido fítico.

4.14.7 Índice de Peróxidos

Foram determinados os índices do peróxidos por titulação iodométrica dos extratos clorofórmicos obtidos da extração de lipídeos pelo método BLIGH e DYER (36), os resultados se apresentam na Tabela 35.

TABELA 35. Índices de peróxidos dos extratos clorofórmicos da FIS, RES, H30L e EHS.

Amostra	meq. peróxido/kg de gordura	
FIS	48,53	$\pm$ 1,05 (a)
RES	64,34	0,97
H30L	78,75	1,25
EHS	75,34	0,38

a) médias e desvio-padrão de 4 replicatas.

A teoria da oxidação das gorduras postula que os produtos da oxidação inicial são os hidroperóxidos, esses geralmente são referidos como peróxidos sendo que o valor de peróxidos das gorduras é uma medida do conteúdo do oxigênio reativo expresso como miliequivalentes por kg de gordura (169).

O grau de oxidação de uma gordura não pode ser estimado isoladamente pelo seu índice de peróxidos, sendo mais apropriado comparar esses valores ao longo de um processo ou comparar valores de diferentes amostras processadas paralelamente (169). Isto oferece suporte para analisar os resultados apresentados na Tabela 35, em que se pode notar que tanto o hidrolisado H30L quanto o extrato hidrossolúvel comercial (EHS) apresentaram graus de oxidação próximos e maiores do que a FIS e o RES sugerindo um estado de oxidação mais avançado que o que existe no hidrolisado enzimático e no extrato hidrossolúvel comercial.

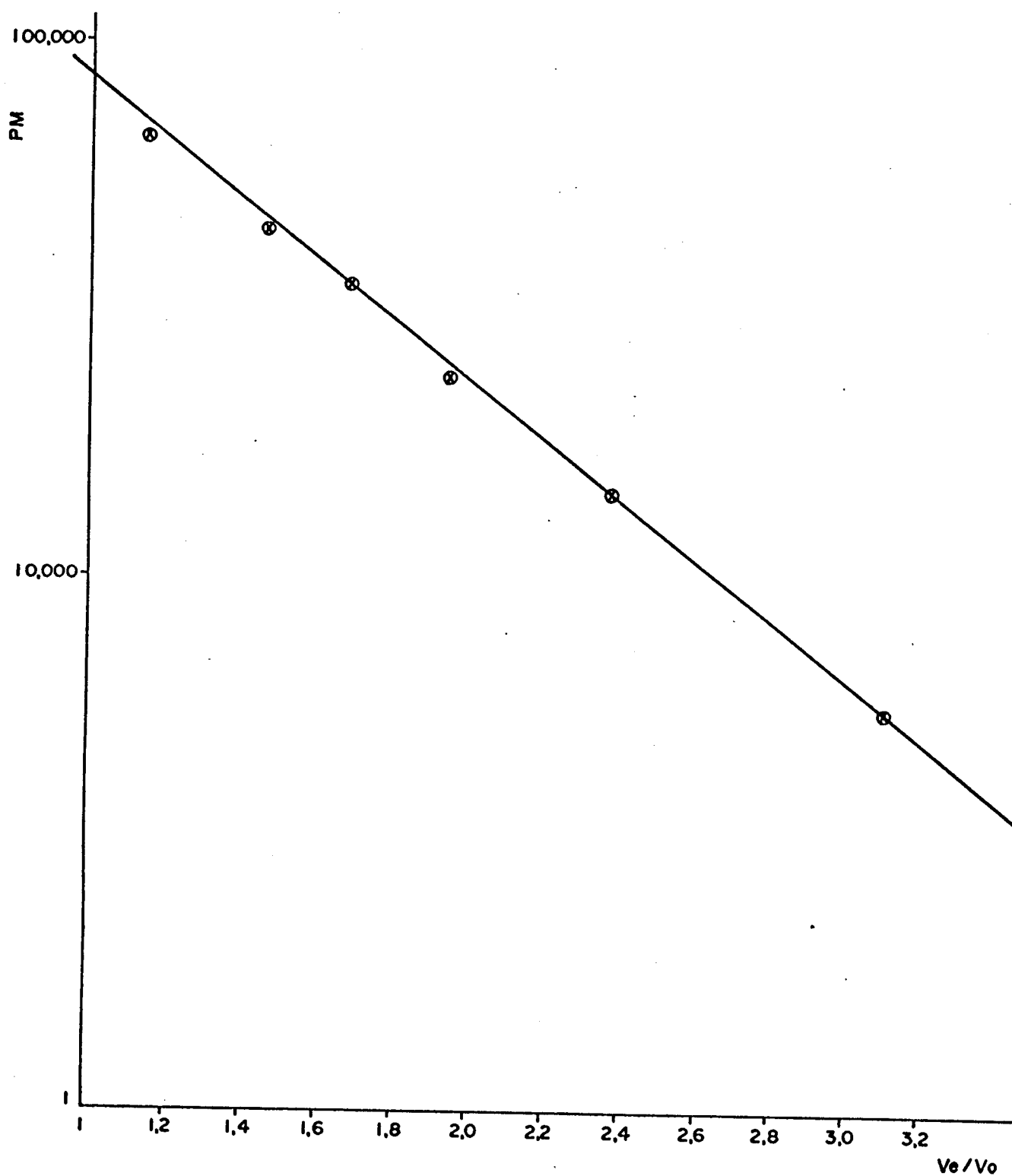
4.14.8 Pesos Moleculares por Filtração em Gel

A distribuição dos pesos moleculares do hidrolisado enzimático da proteína, foi determinado por cromatografia de filtração em gel usando uma série de marcadores cujos pesos moleculares estão dados na Tabela 36 e nas Figuras 18, 19 e 20.

TABELA 36. Pesos moleculares dos padrões, amostras H30L e isolado protéico PVI determinado por filtração em gel.

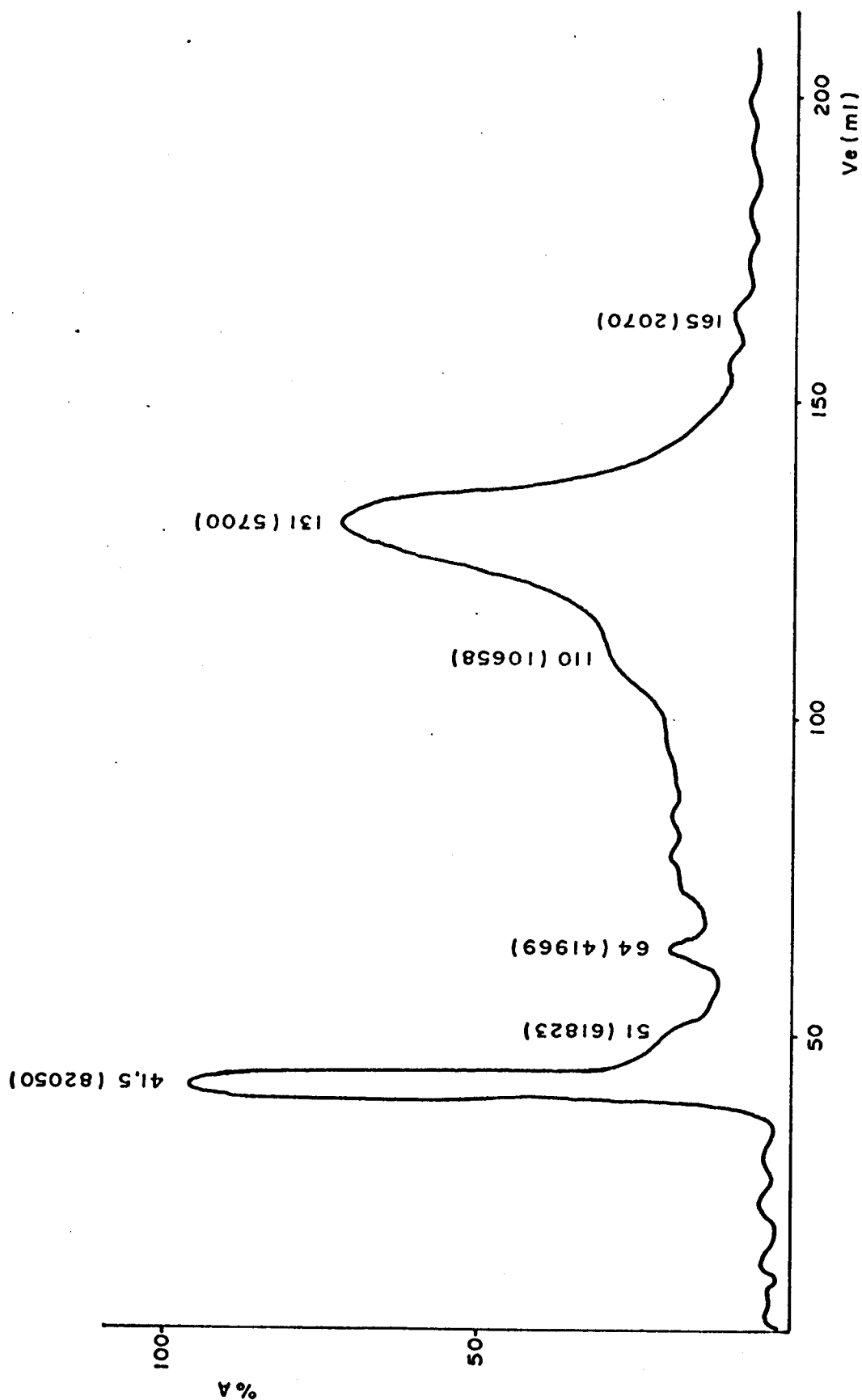
Marcadores e produtos	Pesos moleculares (u.a.m)
Insulina	5.733
Lizozima	14.700
Tripsina	24.000
Pepsina	36.000
Ovalbumina	45.000
Albumina de soro bovino (BSA)	67.000
Isolado protéico de soja (PVI)	80.836
Hidrolisado enzimático liofilizado (H30L)	82.050 - 61.823 - 41.969
	10.658 - 5.700

FIGURA 18. Curva-padrão dos pesos moleculares dos padrões e seus respectivos volumes de eluição corrigidos (V_e/V_o) obtidos por cromatografia de filtração em gel (a).



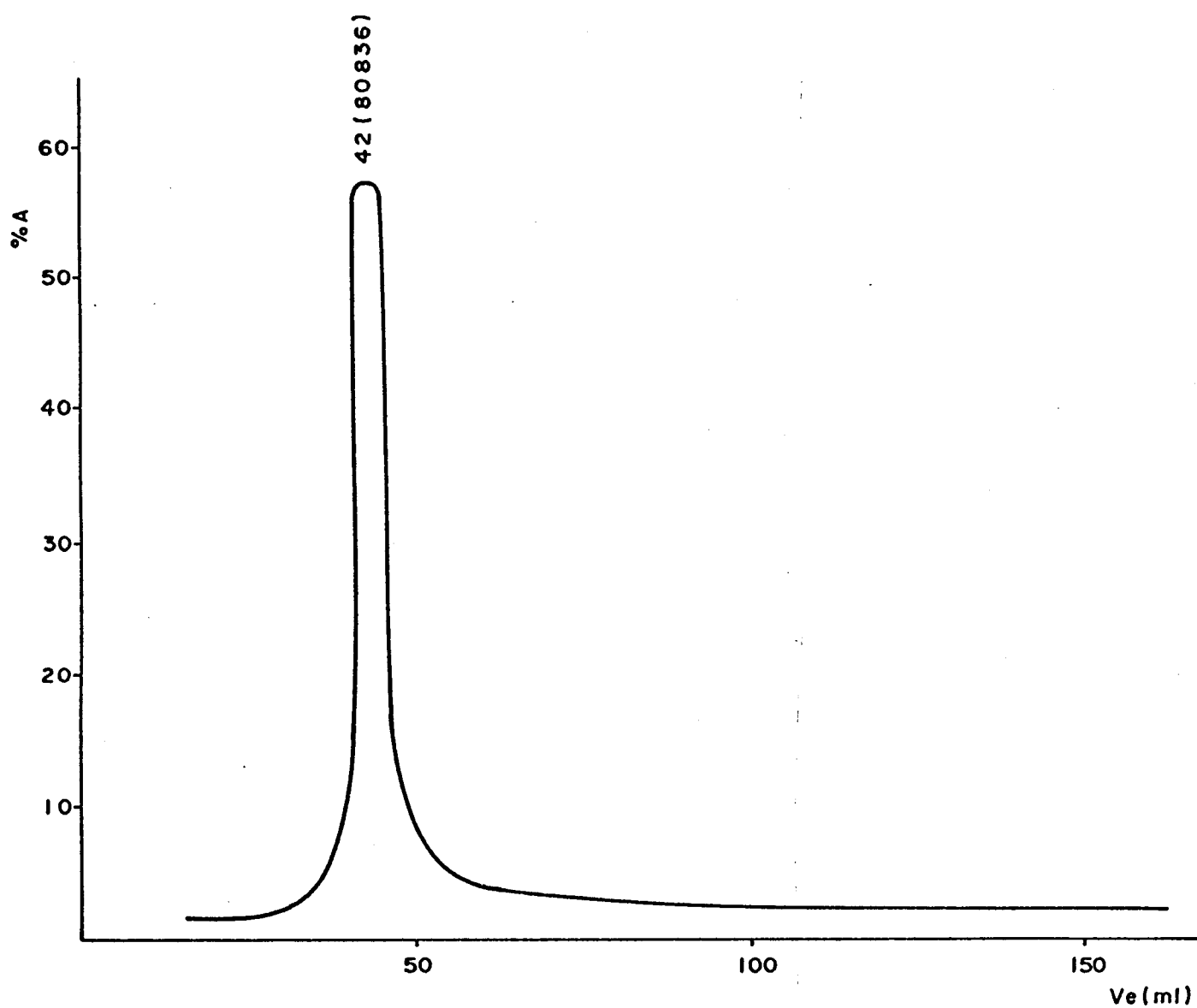
a) A função logarítmica obedece à seguinte relação: $\text{LogPM} = 5,45 - 0,54 V_e/V_o$,
 $R_n = 0,9983$

FIGURA 19. Perfil de eluição dos componentes do hidrolisado enzimático liofilizado H30L (a).



a) Os números nos topos dos picos representam os volumes de eluição e entre parêntesis aparece o peso molecular estimado. %A = 100 x Absorbância lida a 280nm.

FIGURA 20. Perfil de eluição cromatográfico do isolado protéico PVI (a).



a) O número no topo do pico representa o volume de eluição e entre parêntesis aparece o peso molecular estimado.

$\%A = 100 \times \text{Absorbância lida A } 280\text{nm}$

A eficiência do processo cromatográfico, calculada segundo as recomendações da literatura (290, 307), para o isolado protéico PVI foi de 882 pratos teóricos com 0,95mm de altura equivalente para cada prato teórico; esses valores indicam uma elevada eficiência do processo na separação dos constituintes da amostra PVI, e é de se esperar que essa eficiência seja aplicável à filtração do produto hidrolisado.

Pelos resultados obtidos se demonstra que o isolado protéico PVI, usado como referência das proteínas da soja, constitui-se principalmente de proteína com peso molecular médio em torno de 80.836 o que representa uma fração das proteínas da soja que estão nessa faixa de peso molecular (295). No entanto o hidrolisado enzimático H30L apresentou uma distribuição de pesos moleculares abrangendo desde 82.000, para proteínas sem hidrolisar, até pesos moleculares médios de 5.700 para polipeptídeos pequenos. Pela Figura 19 pode-se admitir a presença de elevada proporção de peptídios em relação as proteínas sem hidrolisar. Para volumes de eluição maiores que 250 mL, não foram detectados produtos na faixa de pesos moleculares dos aminoácidos livres, pelo que é de se supor que esses compostos não se encontram em quantidades significativas no hidrolisado enzimático H30L. Pode-se aceitar que os componentes com pesos estimados de 80.836 e os de 82.050, correspondam à mesma entidade desde que a metodologia usada comporta desvios dessa ordem.

4.14.9 Comportamento Eletroforético

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida se encontram na Tabela 37 e Figura 21.

As amostras foram aplicadas em quantidades que corresponderam a aproximadamente 300 μ g de proteína, exceto para o inibidor de tripsina (Lima bean type II) que foi de aproximadamente 200 μ g. Com essas quantidades foi possível visualizar os componentes separados em forma de bandas descontínuas e individuais nos géis cilíndricos.

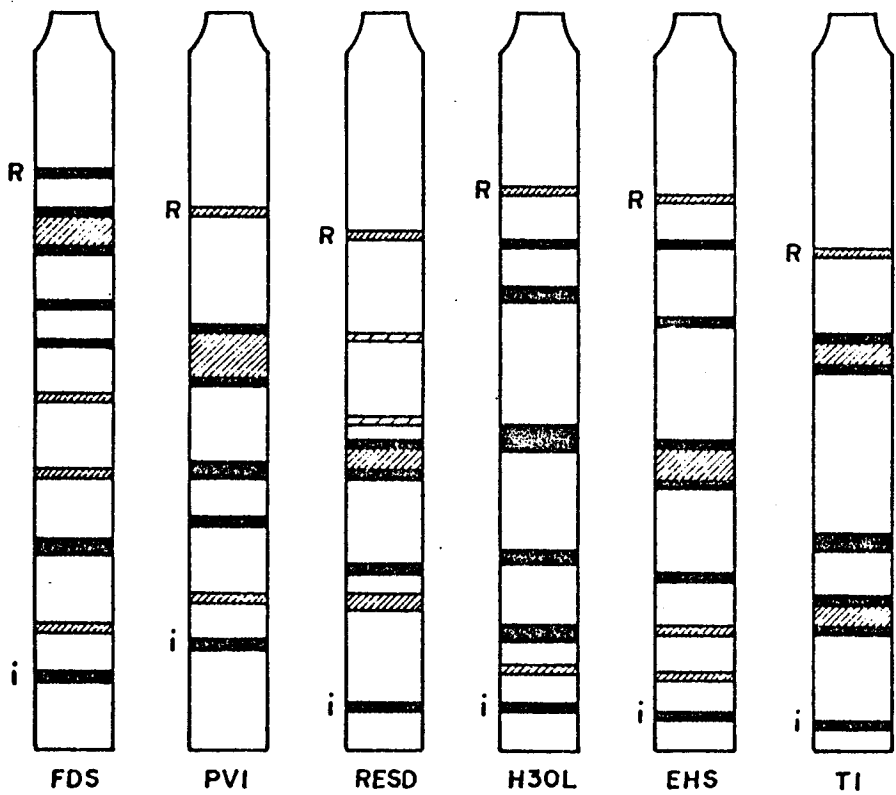
TABELA 37. Mobilidades relativas por cento (MR%) dos componentes separados por eletroforese de disco (a).

Bandas	FDS	PVI	RES	H30L	EHS	TI
Riboflavina	20	29	14	21	22	30
Primeira	26	46	28	29	29	43
Segunda	32	55	44	38	41	46
Terceira	40	70	57	59	59	73
Quarta	46	79	59	78	65	81
Quinta	56	93	65	88	79	85
Sexta	69	-	79	94	87	-
Sétima	80	-	82	-	94	-
Oitava	93	-	-	-	-	-
Indicador	100	100	100	100	100	100

a) valores arredondados.

TI = solução do inibidor da tripsina (500 ppm).

FIGURA 21. Representação esquemática dos componentes do H30L e outros produtos de soja separados por eletroforese de disco. As mobilidades relativas aparecem na Tabela 37.



Onde: R = banda da riboflavina
i = banda do indicador

A eletroforese de disco é uma técnica valiosa na identificação de frações protéicas dada a sua versatilidade, resolução e reprodutibilidade (28), embora a mesma seja afetada por variáveis como o tempo da retenção, potencial e corrente aplicados, natureza e concentração das amostras, temperatura em função da difusão da banda e forma de aplicar as amostras (63).

Pelos resultados obtidos deste teste verificou-se que o hidrolisado H30L apresenta um perfil eletroforético diferente da FDS, RESD, PVI e do TI, aproximando-se do perfil do extrato hidrossolúvel comercial (EHS). O perfil esquematizado do H30L mostra o aparecimento de bandas fortes na faixa de PM médio e baixo, fato que não se repete nos demais produtos. É clara também a grande diferença entre o perfil do hidrolisado enzimático e do RESD, substrato protéico que originou o H30L.

Foi feita a inclusão do inibidor da tripsina (273) devido a que alguns autores (72, 73), sugerem calcular as mobilidades relativas (MR%) com referência à banda do inibidor da tripsina, sempre presente nas proteínas da soja. As diferentes mobilidades relativas dos marcadores riboflavina e do indicador azul de bromo-fenol indicaram a existência de variáveis que influenciaram em forma diferente. Para efeitos de comparação dos perfis, porém, o teste foi considerado satisfatório.

4.14.10 Contagem Total de Microrganismos

As quantidades totais de microrganismos expressos como bactérias do gênero *Bacillus*, se apresentam na Tabela 38.

TABELA 38. Quantidades de microrganismos presentes nos produtos após 24 e 48 horas de incubação a 30°C.

Produtos de soja	Tempo (horas)	
	24	48
FIS	Negativo	120
Resíduo sem desengordurar RES	600	900
Hidrolisado enzimático H30L	1.150	2.300
Extrato hidrossolúvel comercial EHS	7.500	9.600

Esses resultados sugerem que as amostras podem ser consideradas de boa qualidade microbiológica segundo dados da literatura em que se menciona como qualidade de assepsia padrão um total de microrganismos não maior que 10.000 por grama de produto de soja, nas condições do teste (55, 88, 223), observando-se que o extrato hidrossolúvel comercial (EHS) está no limite dessa recomendação, além de se saber que contém alto teor de açúcares fermentescíveis, oque torna o meio apropriado para o desenvolvimento de bactérias (173).

4.14.11 Atividades Enzimáticas Diversas

Os resultados das atividades ureásica (Uase), lipoxigenásica (LPO), residual de Alcalase 0,6L e do inibidor da tripsina (ITsin) se encontram nas Tabelas 39 e 40 e na Figura 22.

Os resultados da atividade ureásica demonstraram que a FIS e FDS apresentam o maior índice de atividade que corresponde a uma variação do pH de 2,35 nas condições de teste, no entanto nas

demais amostras esta atividade foi nula. Estes resultados estão em concordância com os de outros autores (35, 41, 223).

TABELA 39. Atividade ureásica (Uase), Lipoxigenásica (LPO), Atividade residual da Alacalase no hidrolisado enzimático H30 comparados com outros produtos de soja (a).

Produtos de soja	Uase (ΔpH)	LPO (U.E.)	Alcalase 0,6L (%)
FIS	2.30	4.2×10^{-3}	--
FDS	2.40	0.5×10^{-3}	--
Resíduo sem desengordurar (RES)	0.00	4.9×10^{-3}	--
Resíduo desengordurado (RES D)	0.00	0.6×10^{-3}	--
Hidrolisado enzimático (H30)	0.00	0.2×10^{-3}	11.40
Extrato hidrossolúvel (EHS)	0,05	1.2×10^{-3}	--

a) médias de 4 repetições

Dos resultados das atividades demonstrou-se que o resíduo sem desengordurar (RES) foi o produto de maior e o hidrolisado (H30) o de menor atividade lipoxigenásica, estabelecendo que o processo enzimático diminuiu em aproximadamente 96% a atividade original da enzima. No entanto, a atividade apresentada pela amostra de extrato hidrossolúvel comercial (EHS) equivale a aproximadamente 25% da atividade do resíduo sem desengordurar (RES), o que sugere que o RES está em estado de oxidação mais avançado; talvez devido ao tipo de processamento que sofre e ao fato de apresentar aproximadamente 26% de gordura. É interessante salientar que o hidrolisado enzimático H30, com apenas 4% da atividade da enzima LPO presente no resíduo RES, sugere que a oxidação das gorduras (em torno de 12%)

está inibida ou estabilizada. Este fato está em concordância com dados publicados por outros autores (240), embora se tenha evidência de que os ácidos graxos insaturados são excelentes substratos para atividade LPO (228, 268).

TABELA 40. Atividade do Inibidor da Tripsina dos Extratos Hidrossolúveis obtidos da FDS, Resíduo sem Desengordurar RES, Hidrolisado enzimático (H30) e do Extrato Hidrossolúvel Comercial (EHS), (a).

Amostras	10^{-3} TU ^{cas.} _{std.}	10^{-3} TU ^{cas.} _{inibidas}	TU ^{cas.} _{mL}	Residual (%)
Solução de Tsin sem inibidor	35,2	-	-	-
FDS: S1	13,0	22,2	5,6	100
S2	27,6	7,6	1,9	33,9
S3	24,8	10,4	2,6	46,4
S4	32,4	2,8	0,7	12,5
RES SI	30,4	4,8	1,2	21,4
SII	34,4	0,8	0,2	3,6
SIII	33,2	2,0	0,5	8,9
SIV	34,4	0,8	0,2	3,6
H30	34,8	0,4	0,1	1,8
EHSL	27,6	7,6	1,9	33,9

a) Os códigos das amostras dos extratos da FDS e do resíduo sem desengordurar (RES) se apresentam na Figura 8, e o EHSL = extrato hidrossolúvel preparado no laboratório. Os resultados são médias de 3 diluições de cada amostra.

Verificou-se que aproximadamente 90% da atividade da Alcalase 0,6L foi destruída pelo tratamento térmico, esta atividade residual foi determinada no hidrolisado enzimático H30L como índice do grau de sua inativação no processo usado desde que existe evidência experimental mostrando que atividades residuais de proteases são deletérias à estabilidade dos hidrolisados protéicos enzimáticos de soja em armazenamento (246). Porém, dado o baixo teor residual desta enzima, provavelmente não seja necessário o uso de aditivos ou de outros processos para evitar a deterioração do hidrolisado.

No cálculo da atividade residual da alcalase usou-se uma curva padrão de atividade enzimática sobre a hemoglobina desnaturada. A primeira função linear experimental foi:

meq. de tirosina = $(1,1021 \times 10^{-3}) \times (\mu\text{g de N da alcalase})$
tendo um $R_n = 0,973$; com esta função se derivou a atividade real da enzima (0,82 AU/g), e a atividade específica (0,11 AU/mg N), encontrando-se atividade de 4,1 AU/L de solução enzimática. A partir destes resultados, foi obtida outra função linear, a saber:

$$(\text{Absorbância})^{-1} = ((0,5097) + (0,4702) (E)^{-1})$$

onde: E = atividade da solução, que servia para estimar a atividade residual da Alcalase 0,6L no hidrolisado enzimático H30.

Para a atividade do inibidor da tripsina usou-se curva padrão de atividade de tripsina construída ao graficar absorbâncias e quantidade de tripsina, segundo a metodologia (140). Desta curva obteve-se a relação:

$$\frac{|TU|^{Cas}}{\mu g \text{ Tsin}} = 7,21 \times 10^{-4} \text{ (TU)/}(\mu g \cdot \text{min.})$$

onde:

$$\frac{|TU|^{Cas}}{\mu g \text{ Tsin}} = \text{atividade específica}$$

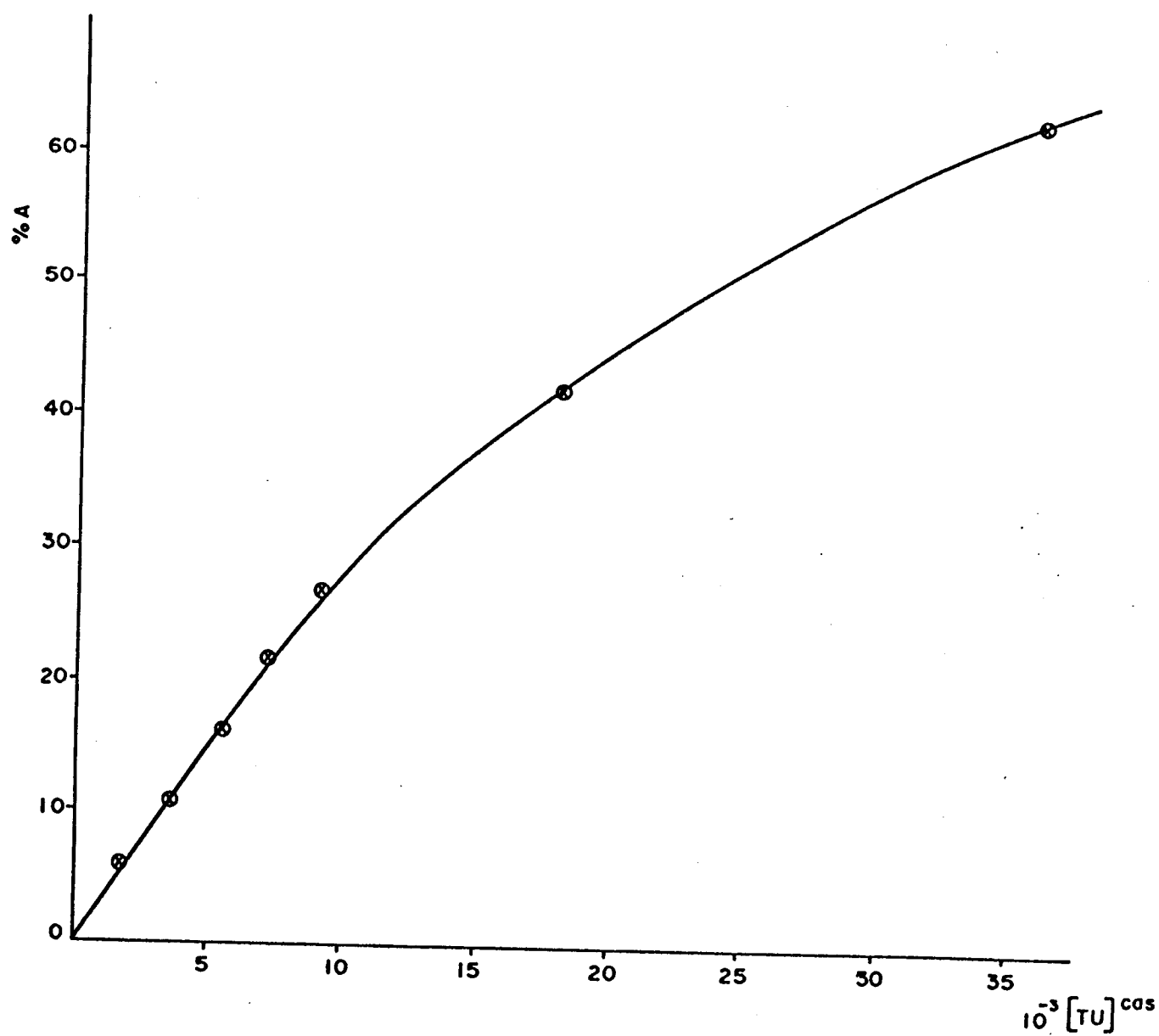
$$|TU| = \text{unidades de tripsina}$$

A partir dos valores experimentais, se construiu a curva-padrão apresentada na Figura 22 da qual foram calculadas as unidades de tripsina de cada amostra ($|TU|_{std}^{Cas}$) e, por diferença da atividade do padrão, calculou-se a unidades tríplicas inibidas ($|TU|_{mL \text{ soln.}}^{cas}$).

Existe suficiente suporte experimental no que diz respeito ao efeito nutricional negativo de certos fatores biologicamente ativos presentes na soja, sendo os inibidores protéicos parcialmente responsáveis pelo baixo valor nutritivo dos produtos de soja inadequadamente processados. É por essa razão que sua determinação em novos produtos sempre é recomendada (47, 128, 150, 229, 233).

Como era esperado as amostras que sofreram tratamento térmico apresentaram a menor atividade antitriptica. De fato verificou-se que o hidrolisado enzimático apresentou o equivalente a 1,8% da atividade original. No entanto, que o extrato hidrossolúvel sem formular (EHS�), mesmo sendo processado termicamente a 95°C por 30 min, apresentou o equivalente a 34% de atividade. Os resultados do EHS� estão em concordância com aqueles publicados por outros autores (149).

FIGURA 22. Curva-padrão da digestão da caseína pela ação da Tripsina.



4.14.12 Solubilidade do Hidrolisado Enzimático H30L

A solubilidade do nitrogênio do hidrolisado enzimático liofilizado (H30L) foi de $87,34 \pm 1,09\%$, calculada mediante a relação experimental.

$$\text{Solubilidade (\%)} = (\text{N solúvel}) \times (\text{N adicionado})^{-1} \times (100)$$

onde:

N solúvel = nitrogênio determinado por microkjeldahl

N adicionado = nitrogênio adicionado, determinado por microkjeldahl

essa relação obedeceu a uma função linear:

$$\text{N solúvel (\%)} = (0,8995) \times (\text{N adicionado \%})$$

tendo um R. = 0,999.

Esse resultado sugere que o hidrolisado enzimático seco, devido a sua natureza polar, pode observar aproximadamente 1,14 vezes seu peso em água, propriedade funcional de grande utilidade nos hidrolisados protéicos (7). Isto significa que poderão ser feitas suspensões com até 46,7% do produto seco.

4.14.13 Ensaios Biológicos para o H30L

Da avaliação biológica das proteínas do hidrolisado enzimático liofilizado (H30L), proteínas do resíduo sem desengordurar (RES), proteína padrão caseína e uma testemunha aprotéica, se obtiveram os resultados encontrados na Tabela 41.

TABELA 41. Comparação dos parâmetros de avaliação biológica, em ratos, de quatro produtos protéicos de soja incluindo o padrão Caseína, (a).

Parâmetros biológicos	Controle	Caseína	RES	H30L	EHS
Proteína (%)	0,94	10,17	10,78	10,29	10,73
Ração consumida (g)	34,40	77,30	83,15	90,50	77,85
NPU ₁₀	-	83,19	57,23	80,43	48,95
Digestibilidade (%)	-	95,68	83,91	87,60	86,16
Valor biológico (%)	-	87,00	68,20	91,81	56,81
NPR	-	5,90	3,56	3,65	3,71
PER calculado	-	3,31	1,47	3,12	0,89
PER corrigido	-	2,50	1,11	2,36	0,67

a) ração consumida = ração média consumida por animal durante o teste.

$$\text{PER calculado} = (\text{NPU} - 36,45) / (14,11)$$

O hidrolisado enzimático demonstrou ser o produto de soja de melhor qualidade protéica quando comparado com o extrato hidrossolúvel comercial (EHS), ou com o resíduo sem desengordurar (RES), sugerindo que o processo enzimático possibilitou melhor utilização das proteínas residuais da matéria-prima usada na hidrólise.

É interessante notar que, embora as amostras H30L, EHS e o RES tenham apresentado valores semelhantes do NPR e de digestibilidade aparente, as proteínas do H30L tiveram NPU maior que as outras duas proteínas e valor biológico superior às demais amostras, se aproximando mais do padrão caseína.

Através de outros estudos pode-se comprovar que o isolado protéico de soja apresenta valores de PER de aproximadamente 1,6 (160), o FIS, valores de NPU de 74,0 (223) e valores de NPR entre 1,8 e 2,6 (56); e ainda, que o tratamento das proteínas de soja com álcali pode diminuir o valor da digestibilidade até 47% do padrão caseína (248). Portanto, os valores encontrados para o hidrolisado enzimático H30L permitem afirmar mais uma vez que o processo proteolítico, em lugar de ser prejudicial, melhora as propriedades biológicas da proteína.

Na Tabela 41 também podemos observar que a dieta contendo o hidrolisado enzimático induziu consumo de ração entre 9 e 16% maior que nas outras dietas, inclusive o extrato hidrossolúvel e a caseína. O fato do grupo de animais mantidos na dieta com o H30L ter registrado o maior consumo da ração foi considerado altamente favorável à qualidade não só protéica, como geral do produto.

Alguns autores (31, 38, 163, 168, 249) concordam com a validade de um ou outro teste aplicado para avaliar biologicamente a qualidade da proteína, porém, a metodologia ideal para se estabelecer a qualidade nutricional de qualquer material protéico alimentício é para muitos ainda inexistente.

4.14.14 Efeito Fisiológico da Dieta Preparada com o Hidrolisado Enzimático Liofilizado (H30L)

O efeito fisiológico da alimentação dos animais com base no hidrolisado enzimático liofilizado (H30L), foi estudado alimentando ratos por 60 dias sendo o controle uma dieta contendo caseína. Durante esse período foram determinados periodicamente o peso e a quantidade de proteína na urina, revelando resultados sempre negativos para proteinúria, hematúria e hemoglobinúria.

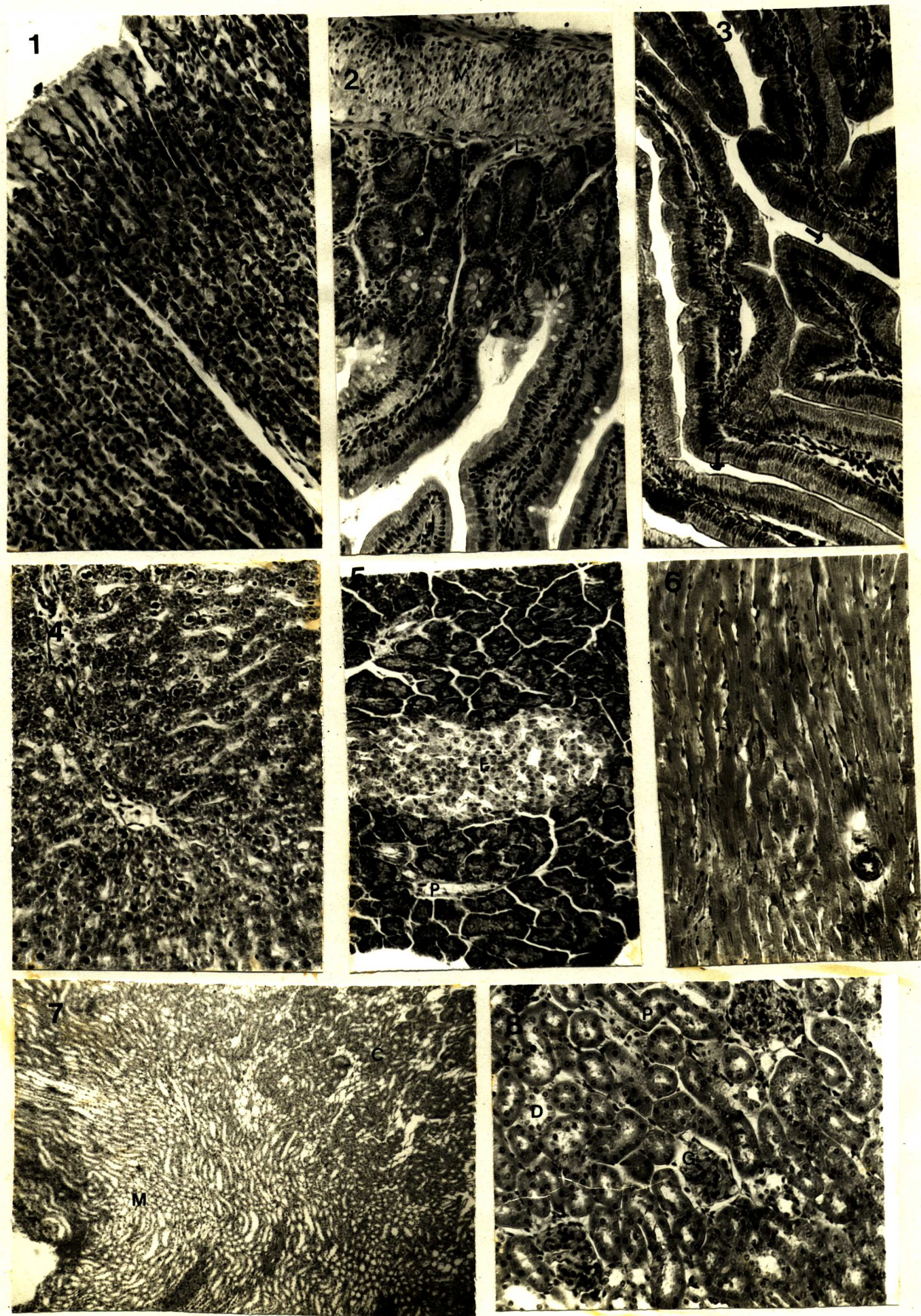
Ao término do experimento, os animais teste e o controle foram pesados, sacrificados e suas vísceras examinadas e comparadas macroscopicamente. Foram retirados e pesados os rins e fígados e tomadas as amostras dos tecidos dos sistemas digestivo, cardiorrespiratório, urinário e linfocitário para seu preparo histológico e avaliação microscópica. Na Figura 23 se apresentam as fotomicrografias das partes dos órgãos avaliados microscopicamente. Na Tabela 42, estão apresentadas as porcentagens de peso corporal e os pesos de rins e fígados.

TABELA 42. Porcentagem de peso corporal ganho e pesos dos rins e fígados dos animais com ração basal de caseína e animais alimentados com ração preparada com 10% de proteína do hidrolisado enzimático H30L.

Animais	Média de peso ganho (%)	Peso de rins + fígados (%)
Teste	95,5	11,0
Controle	112,5	11,5

Verificou-se durante a alimentação por 60 dias que os animais alimentados com a dieta do hidrolisado enzimático diferem dos animais controle em 17% do seu ganho de peso o que esta em concordância com os índices de qualidade proteica encontrados para o H30L. O peso dos órgãos e a aparência histológica em todos os casos, foram normais indicando que não houve efeito fisiológico adverso no organismo do animal.

FIGURA 23. Fotomicrografias dos tecidos dos órgãos digestivo, cardíaco respiratório, linfocitário e urinário de ratos alimentados com dieta do hidrolisado enzimático H30L.



As fotomicrografias apresentadas na Figura 23 são:

Foto 1 = estômago, detalhe das glândulas fúndicas, células do colo, células principais e parietais estão bem configuradas (130X)

Foto 2 = Íleo, detalhe das glândulas de Lieberkühn (L) e parede muscular (M). Notar a ausência de infiltrados na mucosa (130X).

Foto 3 = Jejuno - Íleo, detalhe das vilosidades intestinais. Notar a integridade e a altura do revestimento epitelial e a bordadura em escova (130X).

Foto 4 = Fígado, detalhe de espaço porta; hepatócitos com arranjo e aparência normais (130X).

Foto 5 = Pâncreas, exócrino (P) e endócrino (E) bem configurados e normais (130X).

Foto 6 = Coração, detalhe do miocárdio. Disposição e volume normais das fibras cardíacas. Ausência de infiltrados (130X).

Foto 7 = Rim, região medular (M) e paracortical (C) normais (40X).

Foto 8 = Rim, região cortical. Glomérulos normais (G) e túbulos contornados proximais (P) e distais (D) normais (130X).

As fotomicrografias dos tecidos analisados e apresentados na prancha da Figura 23, são amostragem parcial dos tecidos dos ratos submetidos ao teste. Por serem normais os resultados dispensou-se a apresentação das fotomicrografias dos tecidos dos animais controle. Especial atenção foi dada ao sistema digestivo cuja aparência eutrófica se demonstra nas fotos 1 a 5. As funções renais, que se evidenciaram normais durante o transcurso da alimentação foram comprovadas como tal pela histologia também normal do órgão, quer a nível de medula como de córtex (fotos 7 e 8).

4.15 Determinação do Grau de Hidrólise (GH%), em Função da Massa Enzimática (ME), nos Hidrolisados Enzimáticos do Resíduo sem Desengordurar (RES) com Alcalase 0,6L sem Controle do pH.

Foram obtidos os hidrolisados enzimáticos do resíduo sem desengordurar RES com a Alcalase 0,6L segundo os procedimentos descritos nos itens 3.13 em que se monitorou o GH em função do tempo da hidrólise para determinar qual seria a quantidade da enzima (ME) que produziria o melhor GH. Esses resultados se encontram na Tabela 43 e na Figura 24.

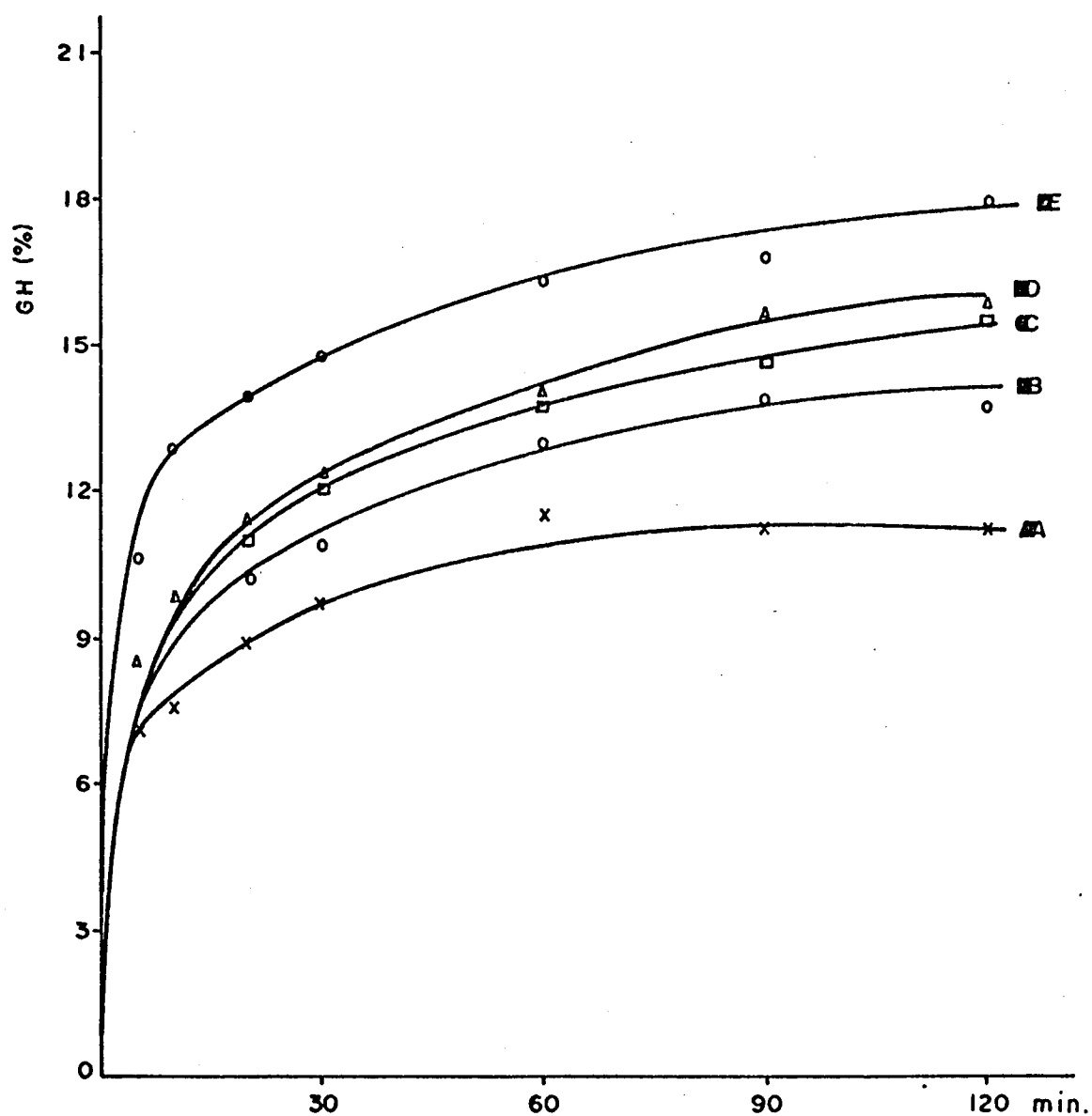
TABELA 43. Porcentagens do grau de hidrólise (GH%) a 60 min de digestão em função da massa enzimática (ME)

Processo (a)	ME (g)	E/S (%)	A/S	GH (%)
A	0,25	2,0	0,0122	11,43
B	0,50	4,0	0,0243	12,76
C	0,75	6,0	0,0365	13,67
D	1,00	8,1	0,0486	13,56
E	1,25	10,1	0,0608	16,71

a) As letras representam o código para cada processo; os resultados são a média de duas replicatas.

O GH% está em função da ME e é afetado pelo pH do meio. Pode-se verificar que existe relação direta entre a ME e o GH, porém, os resultados foram aproximadamente 34% menores quando comparados com o processo com controle de pH a 60 min de digestão (Tab. 21).

FIGURA 24. Representação gráfica do GH% em função do tempo de hidrólise e da massa enzimática; os valores aparecem na Tabela 43 (a).



a) Os valores graficados são a média de 2 repetições.

O GH encontrado a 60 min com 0,50, 0,75 e 1,00 g ME a 4,0, 6,0, 8,1 de ES% respectivamente, são comparáveis entre si, sugerindo que pode ser usada uma relação de 4,0 a 8,0% E/S obtendo-se GH% equivalentes. É interessante ressaltar que o pH da massa reatante mudou em apenas 0,5 unidades durante os 120 min de digestão. Esse efeito pode ser atribuído ao poder tamponante do meio, que como se verifica pela cromatografia de filtração em gel, possui um alto teor de peptídios com peso molecular de aproximadamente 6.000.

4.16 Obtenção de Hidrolisado Enzimático do Resíduo sem Desengordurar RES com Alcalase 0,6L sem Controle de Temperatura nem de pH.

Na obtenção do hidrolisado enzimático H45L e de seu resíduo RH45L, segundo a metodologia descrita nos itens 3.13, foi necessário testar as quantidades de água a diferentes temperaturas que deveriam ser adicionadas à massa do resíduo RES de tal modo a se ter uma temperatura constante em torno de 50°C, durante o período da hidrólise. Os resultados experimentais demonstraram que a relação 4:5, para quantidades de água MW1 e MW2, respectivamente, provocou uma diminuição média de $7,00 \pm 1,25^{\circ}\text{C}$ durante os 60 min, com a temperatura inicial de $59 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Sabe-se que a temperatura ótima de ação da Alcalase 0,6L está em torno de 50°C e que sua atividade máxima diminui em quase 20% quando se trabalha a 60°C por 90 min (197, 198, 199). Isso significa que, em menos de uma hora de trabalho, ter-se-á uma atividade superior a 80%, justificando-se assim o emprego de sistema com controle de temperatura como o empregado.

4.17 Caracterização do Hidrolisado Enzimático Liofilizado H45L e de seu Resíduo Liofilizado RH45L

O hidrolisado enzimático H45 apresentou 13,5% GH com $2,30 \pm 0,02\%$ de S.T. e sua caracterização química e físico-química se encontra nas Tabelas 44 e 45 e Figuras 25, 26, 27.

O hidrolisado H45L apresentou composição centesimal semelhante com a do hidrolisado enzimático obtido a pH 8,00 (H30L), diferindo apenas no que diz respeito à quantidade de cinza.

TABELA 44. Composição centesimal do hidrolisado enzimático H45L e de seu resíduo RH45L.

	H45L		RH45L	
Umidade	$1,57 \pm 0,13$		$2,03 \pm 0,57$	
Proteína	51,59	1,96	30,15	0,55
Extrato etéreo	15,05	0,42	20,21	0,50
Fibra bruta	0,51	0,11	5,72	0,63
Cinza	3,49	0,13	4,50	0,97
Carboidratos (diferença)	27,79		37,39	

A composição centesimal do resíduo do hidrolisado RH 45L também foi comparável à composição do resíduo sem desengordurar RES, sendo os teores de proteína e gordura 5% inferior e 2% superior que no RES, respectivamente. Esses resultados são compatíveis toda vez que no processo de hidrólise enzimática são extraídas aproximadamente 50% das proteínas do RES, concentrando-se assim aproximadamente 2% das gorduras no resíduo do hidrolisado. Surgere - se

que o processo enzimático não favorece a extração indiscriminada das gorduras.

O perfil dos aminoácidos do resíduo do hidrolisado RH 45L é comparável com o perfil dos aminoácidos do RES e da FDS, o que é consistente com a homogeneidade que existe, nas proteínas desses produtos.

Pode-se observar, pelos cromatogramas obtidos por cromatografia de troca iônica (não apresentados), que o H45L não apresentou o composto LAL, o qual foi claramente detectado no resíduo desse hidrolisado RH45L (Fig. 25).

A concentração de ácido fítico no H45L foi aproximadamente $0,41 \pm 0,10\%$ e $0,99 \pm 0,10\%$ do encontrado no resíduo liofilizado RH45L; resultados esperados conforme as características do hidrolisado enzimático H30. Verificou-se também semelhança na distribuição dos pesos moleculares do H45L com relação os de H30L, podendo-se notar uma pequena diferença de concentração entre os componentes de peso molecular de aproximadamente 80.000 e as de 5.500.

Relata-se que os hidrolisados enzimáticos de proteínas, obtidos a pH neutro, podem ser de valiosa utilidade na formulação de alimentos para fins dietéticos ou para fins de alimentação enteral e parenteral (44, 64). Essas possibilidades de utilização sugerem a necessidade de maiores esforços no sentido de aplicar as tecnologias das matérias-prima existentes no país.

TABELA 45. Composição em aminoácidos (g/100 g proteína) do resíduo do hidrolisado enzimático RH45L comparado com outros produtos protéicos de soja e um padrão de aminoácidos essenciais (a).

	FIS	RES	RH45L	RDA (b)
Proteína	36,27	34,60	30,15	-
(c)	(1,38)	(1,37)	(0,55)	
Ác. aspártico	12,21	12,02	11,11	-
Treonina	4,34	3,56	3,95	3,50
Serina	5,07	4,11	5,41	-
Ác. glutâmico	19,79	20,89	17,71	-
Prolina	4,84	5,08	3,81	-
Glicina	4,39	4,00	3,72	-
Alanina	4,07	4,51	4,87	-
Cistina (1/2)	1,24	0,63	0,64	-
Valina	4,71	4,90	5,39	4,80
Metionina	1,31	0,98	1,09	-
Isoleucina	4,93	4,96	4,87	4,20
Leucina	7,56	8,17	9,16	7,00
Tirosina	3,42	3,15	3,69	-
Fenilalanina	5,24	5,30	5,78	-
Histidina	2,50	2,69	2,59	1,70
Lisina	5,67	5,93	6,38	5,10
Amônia	1,81	1,94	1,84	-
Arginina	6,91	7,23	7,85	-
Triptofano	1,55	1,16	1,73	1,10
Lisina disponível	4,54	6,71	6,26	-
Met + Cys	2,55	1,61	6,26	2,60
Phe + Tyr	8,66	8,45	9,47	7,30
AAET (d)	42,47	41,43	44,96	37,30

a) médias de 2 repetições

b) Recommended Dietary Allowances (232), níveis de AAE de uma proteína de elevada qualidade protéica.

c) desvio-padrão de 5 repetições

d) total de aminoácidos essenciais.

FIGURA 25. Cromatogramas obtidos por troca iônica do resíduo liofilizado (RH45L) do hidrolisado enzimático (B) comparado com o padrão LAL (A).

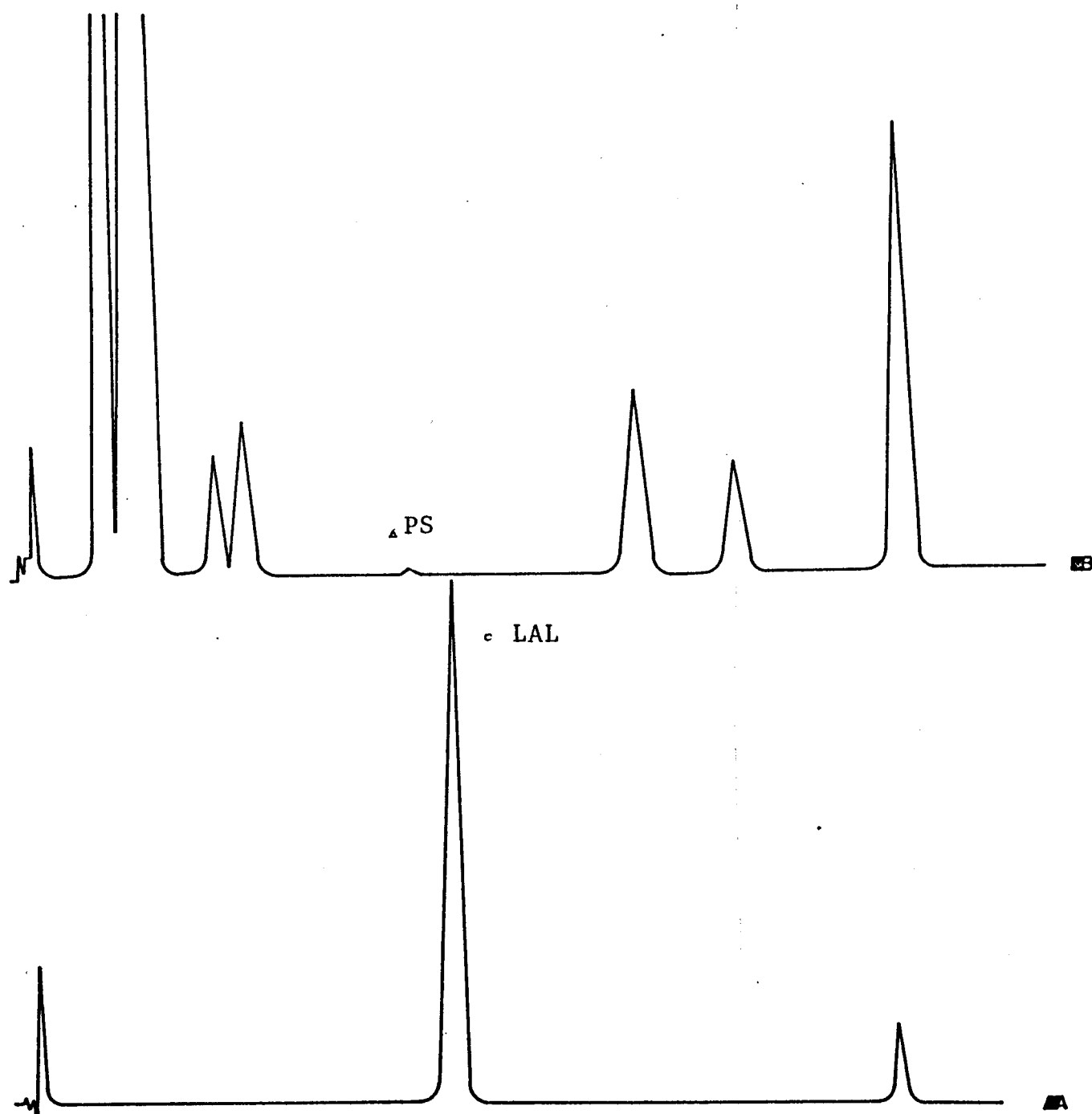
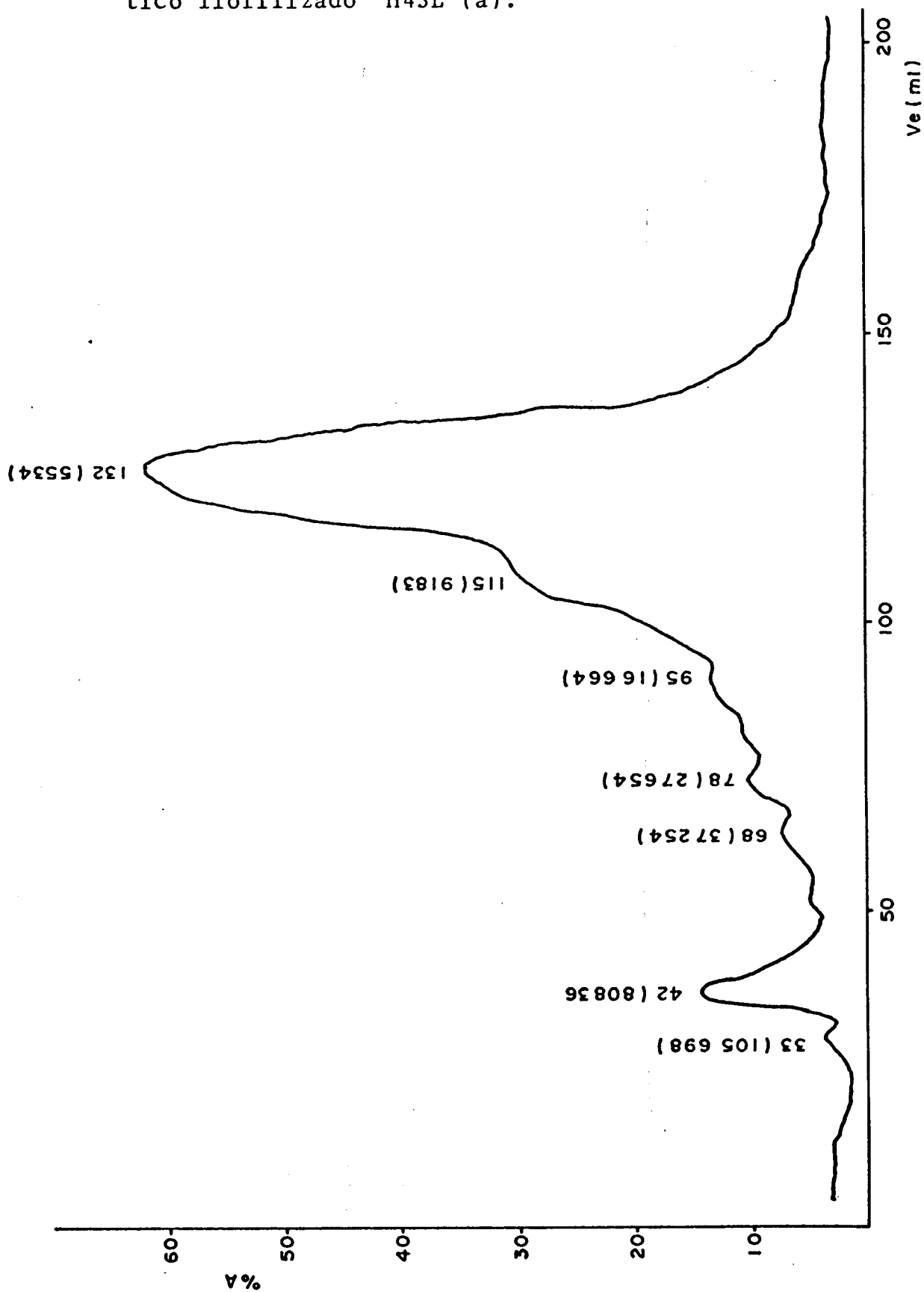
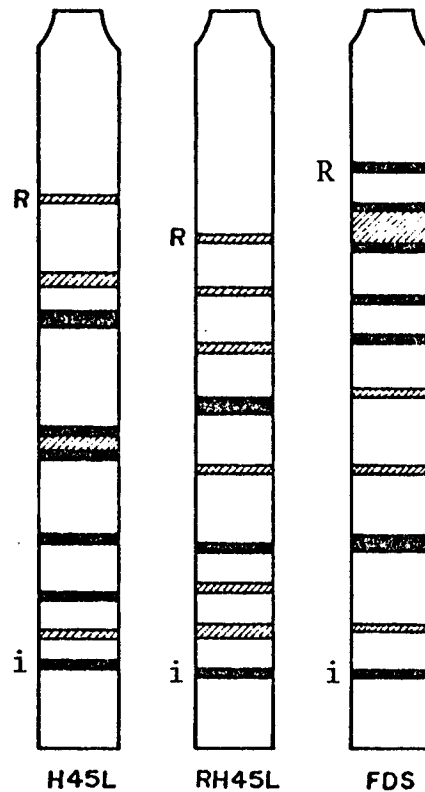


FIGURA 26. Perfil de eluição cromatográfica do hidrolisado enzimático liofilizado H45L (a).



a) Os números que aparecem no topo dos picos representam o volume de eluição e em parêntesis aparece o peso molecular.

FIGURA 27. Representação esquemática dos componentes do hidrolisado enzimático H45L e seu resíduo RH45L e da FDS separados por eletroforese de disco



4.18 Avaliação Sensorial dos Produtos Formulados com Base no Hidrolisado Enzimático H45L.

4.18.1 Teste de Diferença Triangular para Sopa Preparada com o Hidrolisado enzimático e Liofilizado H45L

Este teste foi aplicado para verificar as seguintes hipóteses:

Ho = não existe real diferença entre as amostras

Ha = existe real diferença entre as amostras

sendo as amostras: amostra 1 = sopa de feijão com arroz (Neutro)

amostra 2 = sopa de feijão com arroz e proteína
hidrolisada HPV

amostra 3 = sopa de feijão com arroz e H45L

os resultados do teste de encontram na Tabela 46.

TABELA 46. Resumo dos resultados do teste diferença triangular (a).

Comparações	J.C.	J.T.	Probabilidade	Significância
1 x 2	22	40	<0,5%	***
1 x 3	14	40	5%	n.s
2 x 3	22	40	<0,5%	***

a) teste realizado com 40 julgamentos pareados e 12 repetições por amostra. J.C = julgamentos corretos, J.T = julgamentos totais.

Os dados de probabilidade e os níveis de significância foram comparados com dados tabelados da literatura (236), estabelecendo-se que existe diferença, com 99,5% de ocorrência, entre a amostra Neutro e o Padrão HPV; e com 95% de probabilidade, que não existe diferença entre a referência Neutro e a amostra H45L. No entanto, existiu uma real diferença entre o padrão HPV e a amostra H 45L. Esses resultados demonstram que o hidrolisado enzimático não alterou as características próprias de sabor de sopas de feijão com arroz.

4.18.2 Teste de Preferência Pareada para Sopa Preparada com Feijão, Arroz e Hidrolisado Enzimático H45L

Esse teste foi aplicado para verificar qual a preferência do consumidor a respeito a uma sopa formulada e desidratada com base de feijão e arroz com aditivo de hidrolisado protéico HPV ou hidrolisado enzimático H45L.

Os critérios usados para este teste foram:

- a) número de provadores = 20 (10 homens e 10 mulheres)
- b) volume de amostra/pessoa = 25mL
- c) número de vezes/amostra = 8
- d) número de julgamentos totais = 40 para cada par
- e) número de pares totais = 12
- f) número de julgamentos no desenho = 12×40
- g) número de pares integrados = 6
- h) número de julgamentos totais integrados = 8×40
- i) amostra 1 = sopa de referência Neutro sem aditivo
- j) amostra 2 = sopa padrão com HPV
- k) amostra 3 = sopa com hidrolisado enzimático H45L

os resultados desse teste se encontram na Tabela 47.

Para analisar esses resultados foi aplicado o teste "T" de Student confirmando a ordem de preferência: Amostra-padrão HPV foi a mais preferida seguida amostra com H45L e por último a amostra referência Neutro.

TABELA 47. Resumo e significância dos resultados do teste de preferência pareada para as sopas formuladas e desidratadas

Comparação	Amostras			Total
	1	2	3	
1 x 2	9	30***	-	39
2 x 1	11	29**	-	40
1 x 3	17 ^{n.s}	-	23 ^{n.s}	40
3 x 1	15 ^{n.s}	-	23 ^{n.s}	38
2 x 3	-	24 ^{n.s}	15 ^{n.s}	39
3 x 2	-	27*	13 ^{n.s}	40
Total	52	110	74	236
Preferência (%)	32,12	69,62	47,13	

*** = existe significância para probabilidade menor que 0,1%

** = existe significância para probabilidade menor que 0,5%

* = existe significância para probabilidade menor que 2%

n.s = não existe significância até probabilidade menor que 5%

Dentre os motivos da preferência assinalados pelos prouvadores as opiniões que tiveram maior incidência foram a de "falu tou mais sal", "diminuir a viscosidade". As amostras com H45L e padrão HPV foram assinaladas como as de melhor "tempero" e "mais sau borosas". Essas opiniões sugerem que existiu o efeito de uma prouvável variável na proporção de água no preparo da sopa.

Cabe ressaltar que o experimento foi delineado para evitar o problema do vício o qual é comum em testes dessa natureza.

O método discriminativo da diferença pareada e o método da preferência pareada são os recomendados para esses fins (59).

5. CONCLUSÕES

Ao estudar o resíduo do extrato hidrossolúvel de soja como substrato protéico para hidrólise enzimática e, ao caracterizar os produtos resultantes se conclui que:

1. O resíduo do extrato hidrossolúvel de soja, quando seco, apresenta alto teor protéico, comparável ao da farinha integral de soja; porém com elevado grau de desnaturação conforme os valores de PDI e NSI, 12,88% e 13,88%, respectivamente.
2. A hidrólise enzimática das proteínas do resíduo pode ser acompanhada satisfatoriamente tendo seu grau de hidrólise determinado pela reação dos grupos amínicos livres com ácido trinitrobenzensulfônico.
3. A enzima Alcalase 0,6L, produto enzimático do *Bacillus licheniformis*, hidrolisou mais eficientemente as proteínas do resíduo quando comparada com as enzimas Denapsina-10P, Papaína e Pepsina, produzindo maiores teores de sólidos totais e proteína. A hidrólise com a Alcalase 0,6L solubilizou aproximadamente 60% das proteínas do resíduo.
4. O grau de desnaturação da proteína do resíduo industrial foi um fator positivo; porém o aumento do grau de desnaturação por processo térmico não favoreceu a hidrólise enzimática.

5. Todos os hidrolisados enzimáticos obtidos apresentaram moderado gosto amargo e sabor a feijão, além de outros sabores em menor intensidade.
6. Caracterização química e físico-química do hidrolisado produzido pela Alcalase 0,6L, revelou alto teor de proteína (52,17%, 0,6% umidade), presença da rafinose e estaquiose, teor de aminoácidos essenciais maior que a proteína de referência RDA. Não se detectou a presença de lisinoalinina, e o ácido fítico foi encontrado em teores de aproximadamente 40% do encontrado no isolado protéico de soja. Os peptídios encontravam-se distribuídos principalmente na faixa do peso molecular ao redor 5.700 daltons, em que seis componentes foram separados por eletroforese de disco.
7. O hidrolisado enzimático da Alcalase 0,6L com 11% de atividade residual, não apresentou atividade ureásica, teve baixa atividade lipoxigenásica ($0,2 \times 10^{-3}$ UE) e apenas 1,8% de atividade residual de inibidor de tripsina. O produto seco pode ser dissolvido em água em concentrações de até 46,7%.
8. Os índices biológicos de qualidade protéica demonstraram que o hidrolisado enzimático foi superior ao extrato hidrossolúvel de soja e o resíduo sem hidrólise, sugerindo que a hidrólise enzimática possibilita a melhor utilização das proteínas do resíduo. A boa qualidade biológica da proteína foi consoante com os resultados das análises histológicas efetua-

das nos animais alimentados por sessenta dias com dietas do hidrolisado.

9. Sopas formuladas com base em feijão, arroz e hidrolisado enzimático foram bem aceitas a nível laboratorial onde não se detectou diferença com a sopa sem hidrolisado.
10. O resíduo final, após a operação de hidrólise enzimática, apresentou ainda alto teor de proteínas com conteúdo de aminoácidos essenciais maior que a proteína de referência RDA. Por outro lado, os conteúdos de gordura e fibra foram superiores que os apresentados pelo resíduo industrial original.

6. BIBLIOGRAFIA

1. AACC - Methods (1976). American Association Cereal Chemists Approved Methods.
2. ABOU-EL-ELLA, W.M. (1983). Soy milk for enhancing domiati cheese ripening. Proc. 6th Intern. Congress Food Sci. Tech. 1:143-144.
3. ACKERS, G.K. (1970). Analytical Gel Chromatography of Proteins. Adv. Prot. Chem. 24:346-398.
4. ADLER-NISSEN, J. (191979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzen sulfonic acid. J. Agric. Food Chem. 27(6):1256-1262.
5. ADLER-NISSEN, J. & OLSEN, H.S. (1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. ACS-Symposium Series, N° 92, pp:125-146.
6. ADLER-NISSEN, J. (1978). Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food. Ann. Nutr. Alim. 32:205-216.
7. ADLER-NISSEN, J. (1976). Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. J. Agric. Food. Chem. 24(6):1090-1093.

8. ALDERKS, O. (1949). The study of 20 varieties of soybean with respect to quantity and quality and quality of oil, isolated protein, and nutritional value of the meal. J. Amer. Chem. Soc. 26(3):126.
9. AMAYA F., J.; YOUNG, C. & CHICHESTER, C. (1977). Automated determination of tryptophan in legumes and cereals. J. Agric. Food Chem. 25(1):139-143.
10. AMERINE, M.A.; PANGBORN, R. & ROESSLER, E.B. (1965) Principles of Sensory Evaluation of Food. Academic Press, N.Y.
11. AMINLARI, M.; FERRIER, L. & NELSON, A. (1977). Protein dispersibility of spray-dried whole soybean milk base: Effect of processing variables. J. Food Sci. 42(4):985-988.
12. ANDERSON, R.L. (1980). Analysis of soy protein by disc gel electropherograms. Cereal Chem. 57(3):155-158.
13. ANDREWS, P. (1964). Estimation pf the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. Biochem. J. 91(1):222-233.
14. ANONYMOUS (1980). M.S.G., Substitue in cost-effective food. Food Eng. Intern. 5(12):44-45.
15. ANSON, M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Phys. N° 1, Sept. 20, pp:79-89.

16. ANTUNES, P.L. (1979). Composição e propriedades nutricionais do feijão Rosinha G-2. Tese Doutorado, FEAA - UNICAMP.
17. AOAC - Methods (1980). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th edition. Washington DC.
18. AOCS - Methods (1979). Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists Society, 3th edition,
19. ARAI, S.; NOGUCHI, M.; KUROSAWA, S.; KATO, H. & FUJIMAKI, M. (1970). Applying proteolytic enzymes of soybeans. 6: J. Food Sci. 35(4):392.
20. ARAI, S. & FUJIMAKI, M. (1978). The plastein reaction: Theoretical basis. Ann. Nutr. Alim. 32:701-707.
21. ARAI, S.; YAMASHITA, M. FUJIMAKI, M. (1974). Note on an enlarged-scale method for preparing a methionine - enriched plastein from soybean protein. Cereal Chem. 51(1):142-145.
22. ARNON, R. (1970). Papain, in: Methods in Enzymology Vol. XIX pp:226-244, Ed. by Collowick y Kaplan.
23. ASAHIMATSU KORIDOFU Co. Ltda. (1979). Method of processing soybean. British Patent 1544801.
24. ATKIN, G. & FERDINAND, W. (1970), Acelerated amino acid analysis. Anal. Bioch. 38(2):313-329.

25. ATTIYATE, Y. (1978). Pure soy protein isolated facility opens new perspectives. Food Eng. Intern. 3(12):37.
26. AUGUSTO R., W.; AMAYA F., J. & QUEIROZ T., D. de (1984). Aproveitamento do resíduo do extrato hidrossolúvel de soja. III Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, EMBRAPA/IAC.
27. AUGUSTO R., W. & AMAYA F., J. (1984). Método para determinar lisina disponível. Síntese, Merck (no prelo).
28. BALDINI, V.L.S. (1981). Eletroforese: Conceitos teóricos e sua aplicação na pesquisa de proteínas. Boletim do ITAL 18 (2):155.
29. BARMAN, T.E. (1969). Enzyme Handbook Vol. II. Springer Verlag N.Y.
30. BEN-AZIZ, A.; GROSSMAN, S.; ASCARELLI, I. & BUDOWSKI, P. (1970). Linoleate oxidation induced by lipoxigenase and heme proteins. Anal. Bioch. 34(1):88-100.
31. BENDER, A. (1983). Importance of proteins and protein quality. Bibliotheca Nutr. Dieta N° 32:55-66.
32. BEHNKE, U.; TAUFEL, A. & RUTTLOFF, M. (1978). Standardisierung der Aktivitätsbestimmung von Protease, part I. Lebensmittelindustrie 25(12):545-573.
33. BERRA, R. & PANTECORVO V., A. (1975). New ways of utilization of soy in human diets in Latin America. J.AOCS, 52(4):280A.

34. BILLMEYER, F. & ALTGELT, K. (1971). The sizes of polymer molecules and the GPC separation in: Gel Permeation Chromatography Ed. by K.H. Altgelt & L. Segal. Marcel Deckerm N.Y.
35. BIRD, H.; BOUCHER, R.; CASKEY, C.; HAYWARD, J. & HUNTER, E. (1947). Urease activity and other chemical criteria as indicators of inadequate heating of soybean oil meal J. AOAC, 50(2):354-364.
36. BLIGH, E.G. & DYER, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canad. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
37. BOHAK, Z. (1964). N-(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine, a new aminoacid formed an alkaline treatment of protein. J. Biol. Chem. 239(9):2878-2887.
38. BODWELL, C.E. (1979). The nutritive value of the same protein preparations as estimated by human, rat, and chemical assays. J. AOCS. 56(3):156.
39. BOOKWALTER, G.; WARNER, K.; ANDERSON, R.; MUSTAKAS, G. & GRIFFIN, E. (1975). Fortification of dry soybean-based foods with DL-methionine, J. Food Sci. 40(2):266-270.
40. BOSCO S.; J.; GARROFE, J. & GARRONE, D. (1981). Extrato hidrossolúvel de soja integral na alimentação infantil; em: A soja no Brasil, Ed. por S. MIYASAKA & J.C. MEDINA, ITAL pp: 890-900.

41. BRADFORD, C.; SMITH, A. & COWAN, J. (1955). Measurement of urease activity in soybean oil meal. J. AOCS, 32(5):279-282.
42. BRANDL, M.; TONAK, J. & ROTTLE, H. (1982). Influence of high caloric parenteral nutrition on catabolism and cellular immune competence in carcinoma patients. Aust. N.Z.J. Surg. 52(4):350.
43. BURR, J. (1983). Method of making soy milk containing stabilized protein. U.S. Patent 438925.
44. BURGER, U. (1978). Investigation on the utilization of parenterally administered amino acids in healthy adults and surgical patients. J. Parenteral and Enteral Nutrition, 2(3):28.
45. CACEX, Banco do Brasil S.A (1984). Analise Estatística Comparativa Janeiro/Outubro.
46. CACEX, Banco do Brasil S.A (1984). Exportação e Importação, Balança Comercial, Jan.-Ago.
47. CARVALHO, M.; LINDERBERG, F.; ARIKI, F.; DURIGAN, F.; MELO, W.; SOUZA, P. & KANESIRO, M. (1984). Avaliação centesimal de 11 cultivares de soja e dos efeitos nutricionais da atividade antitriptica de aves. VII-Congr. Bras. Ciência e Tec. de Alimentos.
48. CARVALHO, F. de; NETO, D. & NOGUEIRA Jr, S. (1984). Concentração da capacidade de processamento industrial de soja no Brasil. III-Semin. Nac. Pesq. Soja, EMBRAPA/IAC.

49. CHERYAN, M. & DEESLIE, W. (1979). Production of protein hidroly sates in ultra filtration enzymes reactors. Abst. Papers American Chem. Soc. 178(1)Coll 124.
50. CHU, N.; PELLET, NAWAR, W. (1976). Effect of alkali treatment on the formation of lysinoalanine in corn. J. Agric. Food Chem. 24(5):1084-1085.
51. CIRCLE, S.J. (1974). Soy proteins in dairy-type foods, beverages, confections, dietary, and other foods. J. AOAC. 51(1):198A.
52. CLEGG, K. & McMILLAN, A. (1974). Dietary enzymic hydrolysates of protein with reduced bitterness. J. Food Tech. 9(1):21.
53. COCHRAN, W. & COX, G. (1957). Experimental Designs. John Wiley.
54. CONTRERAS G, E. (1982). Manual de métodos para avaliação da qualidade de produtos alimentares para merenda escolar, FEAA-UNICAMP.
55. COSTA, S.I. da (1981). Alimentos derivados de soja, em: A Soja no Brasil, Ed. por S.Muyasaka & J.C. Medina, ITAL, pp:857.
56. COSTA, S.I. da; MIYA, E. & FUJITA, J. (1981). Características químicas, organolépticas e nutricionais de alguns cultiva-res de soja, em: A Soja no Brasil, Ed. S. Miyasaka & J. C. Medina, ITAL, pp: 823-827.

57. COSTA, S.I. da (1978). A soja na produção de alimentos. Anais do I Seminário Nacional de Pesquisa de Soja, Vol. II:235.
58. COSTA, S.I da & MORI E. (1978). Principais formas de aproveitamento da soja na alimentação humana. Boletim do ITAL: nº 56, 27-49.
59. COSTA, S.I. da; QUAST, D.; MORETTI, V.A.; LEITE, W. & COBRE, V. (1976). O emprego da soja na alimentação humana. Bol. ITAL, nº 46 pp:1-24.
60. CRUZ, R.; BATISTELA, J. & WOSIACKI, G. (1981). Microbial α -galactosidade for soymilk processing. J. Food Sci. 46(4): 1196.
61. DAI NIPON SUGAR MANUFACTURING Co Ltda. (1979). Soybean Beverage. Japanese Examined Patent 5411379.
62. DAVEIGA, G.; PORTELLA, F. (1984). Efeito de complexantes e enzimas proteolíticas na solubilização de proteínas nativas da soja (Glycine max (L)-Merril) variedade UFV-1. VII-Congr. Latinoamericano de Nutrição, Brasília.
63. DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis II. Method and applications to human serum proteins. Ann. New York Acad. Sci. 404-427.
64. DEESLIE, W. & CHERYAN, M. (1981). Continuous enzymatic modifications of proteins in a ultrafiltration reactor. J. Food Sci. 46(4):1035.

65. DELENTE, J. & LADENBURG, K. (1972). Quantitative determination of the oligosaccharides in desalted soybean meal by Gas-liquid chromatography. J. Food Sci. 37(3):372-374.
66. DeMAN, J.M. (1982). Principles of Food Chemistry. The AVI Pub. Co. Inc. NY.
67. DIAZ DELGADO, D. (1976). Valor nutritivo y uso potencial de las proteínas solubles e insolubles de la soya. Tecnologia, Rev. del IIT, nº 101:9-27.
68. DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J. & SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and substances related. Anal. Chem. 28(3):350-356.
69. DUGGAN, E.L. (1957). Measurement of amino acids by column chromatography, in: Methods in Enzymology Vol. III, pp:492. Ed. by Colowick & Kaplan, Academic Press, NY.
70. DWORSCHAK, E.; ORSI, F.; ZSIGMOND, A; TREZI, L. & RUSNAK, I. (1981). Factors influencing the formation of lysinoalanine in alkali treated proteins. Die Nahrung, 25(5):441-446.
71. EIDA, T.; SAITO, Y.; YAMOTO, C. & NAKAJIMA, Y. (1979). Method for deodorizing soybean milk obtained from soybeans or defatted soybeans. Us Patent 4138506.
72. ELDRIDGE, A. & KALBRENER, J. & WOLF, J. (1970). Soybean trypsin inhibitor: A reference protein for Gel Electrophoretic studies of soybean proteins. Cereal Chem. 47(2):167.

73. ELDRIDGE, A.; ANDERSON, R. & WOLF, J. (1966). Polyacrylamide gel electrophoresis of soybean whey proteins and trypsin inhibitors. Arch. Bioch. & Bioph. 155(3):495-504.
74. ELLENBERGER, W. (1980). Method for hydrolysis of milk proteins. German Federal Patent Application 2840592.
75. ELLENBERGER, W.; BLUM, H. & MULLERZITZKE, H. & MASCHER, L. (1980). Method for hydrolysis of casein using orthophosphorous acids or salts. US - Patent 4181651.
76. ERICKSEN, S. & FAGERSEON, I.S. (1976). The plastein reaction and its applications: A review I. J. Food Sci. 41(3):490.
77. ESCUETA, E. & BANZON, J. (1977). Pre-extraction boiling of soybeans as a pre treatment in soymilk preparation. Philippine Agriculturist, 61(3):104-107.
78. FEDERICI, F. (1981). Proteasi fungine per L'industria alimentare. Industri Alimentari, 20(10):679-684.
79. FENTON-MAY, R. (1975). Technology of fortification of foods, in: Proc. of a Workshop Nat. Acad. of Sci. Washington DC, pp:100-110.
80. FIELDS, R. (1972). The rapid determination of amino acid groups with TNBS, in: Meth. Enzymology, Vol. XXV pp: 464-468. Ed. by Hirs & Timash, Acad. Press, NY.

81. FIELDS, R. (1971). The measurement of amino acid in proteins and peptides. Biochem J. 124(3):581-590
82. FINLEY, J.W. (1983). Comunicação privada. The University of Iowa, Hospital and Clinics, Department of Pediatrics, USA.
83. FINLEY, J. & KOHLER, G. (1979). Processing conditions to inhibit Lysinoalanine formation in alkaline-treated proteins. Cereal Chem. 56(3):130-132.
84. FINLEY, J.; JOHNSON, P. & FRIEDMAN, M. (1978). Inhibition of lysinoalanine formation in food proteins. J. Food Sci. 43(2):619-621.
85. FINLEY, J. & SNOW, J. (1977). An improved synthesis of lysinoalanine monohydrochloride. J. Agric. Food Chem. 25(6):1421.
86. FINOT, A.; MAGNENAT, E.; MOTTU, F. & BUJARD, E. (1978). Disponibilité biologique et transit métabolique des acides aminés modifiés par les traitements technologiques. Ann. Nutr. Alim. 32:325-338.
87. FREITAS, O.; LAMOUNIER, J.; DUTRA de OLIVEIRA, J; DOS SANTOS, J.; GREENE, L (1984). Hidrolisados protéicos para uso em nutrição enteral I: Caracterização bioquímica. VII-Congresso Latino-americano de Nutrição, Brasília.

88. FREITAS, L., M.F. de (1981). Microbiologia do grão de soja e produtos derivados, em: A Soja no Brasil, Ed. por S. Miya-saka & J.C. Medina, ITAL, pp:909-915.
89. FRIEDMAN, M. (1982). Lysinoalanine formation in soybean proteins: kinetics and mechanisms. ACS - Symposium Series 206:231.
90. FROUIN, A. (1975). Analyse des protéines par électrophorese. Rev. Franç. des Crop. Grs., 22(4):199-204.
91. FUJIMAKI, M. & YAMASHITA, M. (1977). Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement, in: Food Protein Adv. in Chem Series nº 160. pp:156-184.
92. FUJIMAKI, M.; YAMASHITA, M.; OKASAWA, Y. & ARAI, S. (1970). Applying proteolytic enzymes on soybeans. J. Food Sci. 35 (3):215.
93. FUJIMAKI, M.; KATO, H.; ARAI, S. & TAMAKI, E. (1968) Applying proteolytic enzymes on soybean. Food Technology 22(7):77.
94. FUKUMOTO, J.; TSURU D. & YAMAMOTO, T. (1967). Studies on mold protease. Agric. Biol. Chem. 31(6):710-717.
95. GATCHALIAN, M.M. (1981). Sensory Evaluation Methods with Statistical Analysis. College of Home Economics Univ. Philippines. Dilman.
96. GILLIES, M.T. (1973). Soft Drink Manufacture, n.d.c., Park Ridge, N.J. pp: 293-307.

97. GOMORI, G. (1955). Preparation of Buffers for use in enzyme Studies, in: Methods Enzymology Vol. I pp: 138-146. Ed. by Colowick & Kaplan.
98. GOODNIGHT, K. & HARTMAN, G. & MARQUARDT, R. (1976). Aqueous purified soy proteins and beverage. US - Patent 3995071.
99. GREENSTEIN, J. & WINITZ, M. (1961). Chemistry of the Amino Acids Vol. 3 pp: 2316-2325, John Wiley, Inc. NY.
100. GUNTHER, R. (1979). Chemistry and characterization of enzyme modified whipping protein. J. AOCS, 56(3):345.
101. HAASMA, N.; GORTEMAKER, B. (1979). Determination of Lysinoala nine by densitometry. J. Chromat. 168(2):550-556.
102. HABEET, A. (1966). Determination of the amino groups in proteins by trinitrobenzensulphonic acid. Anal. Biochem. 14(3):328-336.
103. HALLORAN, H. (1980). Frustrating analysis. Feedstuffs July, 7. pp: 26.
104. HAMPTON, M. (1978). Process for and product of protein hydrolysis. British Patent 1494856.
105. HAQUE, Z.; MATOBA, T. & KITO, M. (1982). Incorporation of fatty acids into food protein. J. Agric. Food Chem. 30(3): 481.

106. HAYES, R.; BOOWALTER, G. & BAGLEY, E. (1977). Antioxidant activity of soybean flour and derivates - a review. J. Food Sci. 42(6):1527-1532.
107. HEMPENIUS, W. & CHANDLER, K. (1975). Process for the preparation of acid soluble polypeptides and carbonated beverages containing same. US - Patent 3876806.
108. HENRY, R.J. (1970). Clinical Chemistry: Principles and Techniques, pp: 190-193.
109. HERD, J.K. (1971). Interference of hexosamines in the Lowry reaction. Anal. Biochem. 44(2):404-410.
110. HERMANSSON, A.M. (1979). Methods of studying functional characteristics of vegetal proteins. J. AOCS, 56(3):272.
111. HILL, R.L. (1965). Hydrolysis of proteins. Adv. Protein Chem. 20:37-107.
112. HINOJOSA, R. (1974). Contribuição ao estudo da extração e concentração do leite de soja. Tese Mestrado, FEAA-UNICAMP
113. HISAMOTO, I.; MAEDA, T.; AKMUREI, Y. & IIDA, T. (1979). Foam fire extinguisher for polar organic and liquid fire. Jpn. Kokai Tokyo Koho 79, 141, 100.
114. HJERTÉN, S. (1970). Thermodynamic treatment of partition experiments with especial reference to molecular-sieve chromatography. J. Chromat. 50:189-208.

115. HJERTEN, S. (1962). Molecular Sieve Chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method. Arch. of Biochem & Biophys. Suppl. n° 1:147-151.
116. HOLSINGER, V.; SUTTON, C.; VETTEL, H.; ALLEN, C.; TALLEY, F. & WOICHIK, J. (1978). A beverage base from cheese whey and peanut flour. Peanut Sci. 5(2):97-103.
117. HOLLANDER, K. (1952). Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. Anal. Chem. 24(10):1576-1579.
118. HORAN, F. (1974). Soy protein products and their production. J. AOCS. 51(1):67A-73A.
119. HU, B. & ESEN, A. (1982). Heterogeneity of soybean proteins: Two dimensional electrophoretic maps of three solubility fractions. J. Agric. Food. Chem. 30(1):21-25.
120. HU, B. & ESEN, A. (1981). Heterogeneity of soybean proteins: One dimensional electrophoretic profiles of six different solubility fractions. J. Agric. Food Chem. 29(3):497-501.
121. HUNG, T. & ISHII, K. (1975). Hydrolysis of soybean protein by papain. FSTA, 8:6G412.
122. IACOBUCCI, G.A.; MYERS, M.; EMI, S. & MYERS, D. (1974). Large scale continuous production of soybean protein hydrolysates in a constant flux membrane reactor. IV-Intern. Congress of Food Sci. & Techn. 8a:47-50, Ga. USA.

123. INDIA, Indian Standards Institution (1975). Specifications for protein-based beverages. Indian Standards. 1S:7482 - 1974, (FSTA. 9:2U108).
124. JAFFE, G. (1981). Phytic acid in soybeans. J. AOCS. 58(3): 493.
125. JODIDI, S.L. (1926). The formol titration in certain amino acids. J. Amer. Chem. Sci. 48(3):751-753.
126. JOHNSON, L.; HOOVER, W. & DEYOE, C. (1983). Soymilk process. US - Patent. 4409256.
127. JOHNSON, L. (1979). Processing aqueous extracts of soybean by rapid hydration hydrothermal cooking. Diss. Abst. Intern. B, 39(10):4798-4799.
128. KAKADE, M.; RACKIS, J. & MCGHEE, J. & PUSKI, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 51(3):376-382.
129. KAMATA, Y. & SHIBASAKI, K. (1978). Degradation sequence of glycinin by tryptic hydrolysis. Agric. Biol. Chem. 42:2103.
130. KARAYIANNIS, N. (1977). Lyzinoalanine formation in alkali treated proteins and their biological effects. Diss. Abs. Intern. B, 38(2):596-597.

131. KASAKOFF, S. (1973). Soybean processing. US = Patent 3708310 (FSTA:5:5J761).
132. KASTER, M. & BONATO, E. (1981). Evolução da cultura da soja no Brasil, em: A Soja no Brasil, Ed. por S. Miyasaka & J.C. Medina, ITAL, pp: 58-64.
133. KELLOR, R.L. (1974). Defatted soy flour and grits. J. AOCS. 51(1):77A-80A.
134. KHALEQUE, A. & WALLACE, G. (1975). Studies on the processing and properties of artificial milks IV. Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 10(1):148-157.
135. KIKUCHI, T.; ISHII, S. & YOKOTSUKA, T. (1973). Effect of cell wall degrading enzyme on release of protein from soy bean tissue. J. Agric. Chem. Soc. of Japan. 47(5):309 - 312.
136. KINSELLA, J.E. (1979). Functional properties of soy proteins. J. AOCS. __ (3):242-258.
137. KOAZE, Y.; NAKAJIMA, Y. & EIDA, T. (1972). Improvement of soybean products by microbial means. FSTA. 8:8G561.
138. KOCH, R.; STERN, B. & FERRARI, G. (1958). Linoleic acid and triolein as substrates for soybeans lipxygenase. Arch. Biochem. & Biophy. 78(1):165-179.

139. KOLB, H. & BIELIG, J. (1979). Method and apparatus for preparation of protein hydrolysates from oil seeds. FSTA. 12: 4G229.
140. KUNITZ, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol. 30(4):291.
141. LABORATÓRIOS OKOCHI, Ltda. Determinação da atividade proteolítica, controle interno. Comunicação particular, S.P.
142. LALASIDIS, G. (1978). Four new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with high content of essential amino acids. Ann. Nutr. Alim. 32:709-723.
143. LAMOUNIER, J.; FREITAS, O.; DUTRA, J.; GREENE, L.; DOS SANTOS, J. (1984). Hidrolisados protéicos para uso em alimentação enteral: II-caracterização nutricional. VII-Congres. Latino-americano de Nutrição, Brasília.
144. LAWHON, J. (1983). Method for processing protein from nonbinding oilseed by ultrafiltration and solubilization. FTSA. 16:10G772.
145. LAWHON, J.; CATER, C.; MULSOW, D. & MATTIL, K. (1977). Production of protein isolates and concentrates from oilseed flour extracts using industrial ultrafiltration and reverse osmosis systems. J. Food Sci. 42(2):389.
146. LAYNE, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods

for measurement of proteins in: Methods Enzymology Vol. III,
pp:447-454. Ed. by Colowick & Kaplan.

147. LEE, H.R. & SNYDER, H. (1981). Influence of ethanolic soaking of soybean on flavor and lipoxygenase activity of soymilk. J. Food Sci. 46(4):1201-1204.
148. LEITE DO CANTO, W. (1982). Leite de soja líquido, uma opção alimentar. Estudos Economicos, nº 13, ITAL.
149. LIENER, I.E. & TOMLINSON, S. (1981). Heat inactivation of protease inhibitors in a soybean line lacking the Kunitz trypsin inhibitor. J. Food Sci. 46(5):1354-1356.
150. LIENER, I.E. (1979). Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. J. AOCS. 56(3):121.
151. LIENER, I.E. (1977). Nutritional aspects of soy proteins products. J. AOCS. 54(6):454A.
152. LIME, B. & CRUSE, R. (1972). Beverages from whole citrus fruit puree. J. Food Sci. 37(2):250.
153. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. & RANDALL, R. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265.
154. LYANAYA, A. & STRASHNENKO, E. (1982). Biochemical composition of protein hydrolysates. FSTA. 16:6G432.

155. LYNCH, C. & CATSIMPOOLAS, N. (1977). Note on the rapid proteolysis of glycinin by pepsin and trypsin. Cereal Chem. 49: 1282.
156. LYNCH, C.; RHA, C. & CATSIMPOOLAS, N. (1977). Tryptic hydrolysis of glycinin and its subunits. J. Sci. Food Agric. 28:971.
157. MANLEY, C. & FAGERSON, I. (1970). Major volatile neutral and acid compounds of hydrolyzed soy protein. J. Food Sci. 35 (3):286-291.
158. MANLEY, C. & FAGERSON, I. (1970). Major volatile components of the basic fraction of hydrolysate soy protein. J. Agric. Food Chem. 18(3):340-342.
159. MAKOWER, R. (1970). Extraction and determination of phytic acid in beans (*Ph. vulgaris*) Cereal Chem. 47(3):288.
160. MARCHINI, J. & OLIVEIRA, J. (1984). Valor nutritivo de um isolado protéico de soja disponível no Brasil. III-Seminário Nac. Pesquisa de Soja, EMBRAPA/IAC.
161. MARCHINI, J.; FREITAS, O. de; KERCHOVE, H.D. de & DUTRA, J. (1984). Avaliação bioquímica de dois hidrolisados enzimáticos da proteína de soja. Comunicação privada com o primeiro autor.
162. MARKH, A. & VINNIKOVA, L. (1973). Volatile components of protein hydrolysates from soybeans. Prik. Biok. Mikrob. 9 (6):913.

163. MARIANI, A. & SPADONI, M. (1979). Rat models in protein quality evaluation. J. AOCS. 56(3):154.
164. MARTINS G.;M.A. (1978). Extração, purificação e propriedades da polifenoloxidase da banana nanica. Tese Doutorado. FEAA-UNICAMP.
165. MASON, R.; DETAR, C. & EETALL, H. (1975). Protease covalently coupled to porous glass, preparation and characterization. Biotech. & Bioengin. XVII (7):1019.
166. MATTIL, K.F. (1974). Composition, nutritional, and functional properties, and quality criteria of soy protein concentrates and soy protein isolates. J. AOCS. 51(1):81A.
167. McCABE, E. (1973). Soy protein fraction. FSTA. 5:10G488.
168. McLAUGHLAN, IM. (1972). Effect of protein quality and quantity on protein utilization. Newer Methods of Nutritional Biochemistry, Vol. V, pp:33-64.
169. MEHLENBACHER, V.C. (1960). The Analysis of Fats & Oils. The Garrad Press Pub. Ill. USA, pp:219-228.
170. MEJIA de CUEVAS, M.I. & CORREA, L.N. (1980). Estandarización de métodos analíticos sencillos para la determinación de lisina disponible, triptofano e metionina. Revista del Instituto de Investigaciones Tecnológicas 22(128):27.

171. MILLER, G.A. & LACHANCE, P.A. (1977). Techniques in rat bioassays in: Evaluation of Proteins for Humans, pp: 149-161.
172. MILLER, D.S. & BENDER, A. (1955). The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. Brit. Jour Nutr. 9:382-388.
173. MITAL, B. (1983). Growth and activity of starter cultures in soy milk. FTSA. 16:5G379.
174. MIYA MORI, E.; SHIROSE, I. & COSTA, S. (1978). Tese de campo sobre a aceitabilidade do "Vital" para escolares. Anais do I-Seminário Nac. Pesq. de Soja, Vol. II, pp:255-263.
175. MIYASAKA, S. & MEDINA, J.C. (1981). Algumas considerações sobre a tecnologia nacional da soja, em: A Soja no Brasil, Ed. por S. Miyasaka & J.C. Medina, ITAL, pp: 976.
176. MOORE, S.; SPACKMAN, D. & STEIN, W. (1958). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. Anal. Chem. 30(7):1185-1190.
177. MORETTI, R. & HINOJOSA, R. (1981). Produção de leite de soja em escala semi-industrial, em: A Soja no Brasil, Ed. por S. Miyasaka & J.C. Medina, ITAL, pp: 979-986.
178. MORETTI, V.A.; CAMPOS, B.N.; GASPARINO, J.; VIEIRA, L. & MARQUEZ, J. (1981). Estudo técnico-econômico sobre a produção do Vital em: A Soja no Brasil, Ed. por S. Miyasaka & J.C. Medina, ITAL, pp:1065-1062.

179. MORETTI, R.H. (1976). Contribuição ao Desenvolvimento de uma Mistura Protéica Solúvel em pH Ácido para Crianças em Idade Escolar. Tese Livre Docente, FEAA-UNICAMP.
180. MORETTI, R.H. (1975). Enriquecimiento de bebidas con proteínas vegetales a nivel de planta piloto e industrial. Aspectos de sua comercialización. Anales del II-Seminario Avanzado de Tecnología de Alimentos, pp:259-281.
181. MORI, T.; UTSUMI, S.; INABA, H.; KITAMURA, K & HARADA, K. (1981) Differences in subunit composition of glycinin among soy bean cultivars. J. Agric. Food Chem. 29(1):20-23.
182. MORITA, T. ASSUMPÇÃO, R.M. (1972). Manual de soluções e reagentes. Ed. por Edgard Bluchard Ltda., 2^a ed. pp:28-29,132-133.
183. MORR, C. (1981). Nitrogen conversion factors for several soy bean protein products. J. Food Sci. 46(5):1362-1364.
184. MURASE, M. (1980). Effect of glucose on lysinoalanine formation. J. Agric. Chem. Soc. Jap. 54(1):13-19.
185. MYERS, D.; RICKS, E.; MYERS, M.; WILKINSON, M. IACOBUCCI, G. (1974). Chemical and nutrition evaluation of enzymatic soybean hydrolysates. IV-Intern. Congres. Food Sci. & Tech. 8a:51-54.
186. NAIR, B.M.; OSTE, R.; ASP, N.G. & DAHLQVIST, A. (1976). Enzymatic hydrolysis of food proteins for amino acid analysis I. J. Agric. Food Chem. 24(2):386-389.

187. NAKADAI, T. & NASUNO, S. (1977). The action of acid proteinase from *Aspergillus oryzae* on soybean proteins. Agric. Biol. Chem. 41(2):409-410.
188. NELSON, A.; STEINBERG, M.; & WEI, L. (1976). Illinois process for preparation of soymilk. J. Food Sci. 41(1):57-61.
189. NEWAY, S.G. (1948). Studies on lipoxydase IV. Arch. of Biochem. 19(1):133-143.
190. NEY, K.H. (1979). Bitterness of peptides: Amino acid composition and chain length. ACS Symposium Series n° 15:149-173.
191. NICKERSON, J.T. & SINSKEY, J.A. (1972). Microbiology of Foods and Food Processing. American Elsevier Pub. Co., NY.
192. NICOLAS, D. & KADANE, V. (1975). Procédés D'obtention des protéines concentrées et isolées faisant appel. Rev. Franç. des Crops Gras. 22(8/9):439-449.
193. NISSHIN, O.L. Mills Co. Ltda. (1980). Soybean milk beverage. FSTA. 13:9H1466.
194. NISSHIN, O.L. Mills Co. Ltda. (1979). Jellyfish-like food. FSTA. 12:3G153.
195. NOGUCHI, M.; ARAI, S.; KATO, H. & FUJIMAKI, M. (1970). Applying proteolytic enzymes on soybean. J. Food Sci. 35(3):211.

196. NOUT, M. & WILLIAMS, A. (1983). The use of dairy whey in the preparation of fresh and fermented soy milk products. Proc. 6th Intern. Congr. Food Sci. & Techn. 1:135-136.
197. NOVO INDUSTRIES, Enzymes Division. Comunicação Privada. (Analytical Method AF 4.2/6-GB).
198. NOVO ENZYMES Catálogo: Product Range n° B134i-6B-2000, Jun.80, Novo Industri A/S, Novo Allé, Dk - 2880, Bagsvaerd, Dk.
199. NOVO ENZYMES. Catálogo Alcalase 0,6L, n° B207b-GB-1000, July.80, Novo Industri S/A, Novo Allé, Dk-2880, Bs, Dk:
200. NOVO INDUSTRI, A/S. (1970). Hydrolysis of soy proteins. FSTA. 12:2T80.
201. NOVO ENZYMES INFORMATION (1978). Hydrolysis of food proteins in the laboratory 1B n° 102e-GB. Novo Allé, Dk-2880, Bs.Dk.
202. NUNEZ, M. & GEROMEL, E. (1984). Solubilidade de hidrolisados protéicos de pescado. VII-Congr. Brasileiro Ciência e Tecnologia de Alimentos. SBCTA.
203. OBI, I.U. (1982). Application of the 2,4,6-trinitrobenzen-1-sulfonic acid (TNBS) method for determination of available lysine in maize seed. Agric. Biolog. Chem. 46(1):15.
204. OKUBO, K.; WALDROP, A.; IACOBUCCI, G. & MYRES, D. (1975). Preparation of low phytase soybean protein isolated and concentrated by ultrafiltration. Cereal Chem. 52(2):263-271.

205. OLSEN, H. (1979). Applications of proteolytic enzymes for the production of high protein low cost foods. Mift Symposium Protein Rich Foods in Asian, July, R-13.
206. OLSEN, H. & ADLER-NISSEN, J. (1979). Industrial Production and Applications of a soluble enzymatic hydrolysates of soy protein. Process Biochem. 14(7):6-11.
207. OLSMAN, H. (1979). Hydrolyzed and autolyzed vegetable proteins as functional food ingredients. J. AOCS. 56(3):375.
208. OMOSAIYE, O. & CHERYAN, M. (1979). Low phytate, full-fat soy protein product by ultrafiltration of aqueous extracts of whole soybeans. Cereal Chem. 56(2):58-62.
209. OSNER, R. & JOHNSON, R. (1968). Nutritional changes in proteins during heat processing. J. Food Techn. 3(2):81.
210. OTTESEN, M. & SVENDENSEN, I. (1970). The Subtilisins, in: Methods Enzymology Vol. XIX, pp:199-215. Ed. by Colowick & Kaplan.
211. PENNWALT, S.A. Manual Super-D-Canter Sharples, Santo Amaro, SP.
212. PENNWALT, S.A. Centrifugas horizontais Super-D-Canter Sharples Boletim SB-110, Santo Amaro, SP.
213. PETRITSCHKE, A.; LYNEN, F. & BELITZ, H. (1972). Investigations on bitter peptides II. Lebens. Wiss. Und Technologie. 5(3):77.

214. PEZOA, V. (1975). Utilização de um reator enzimático contínuo ultrafiltrante para a obtenção de um hidrolisado proteico. Tese Mestrado, FEAA-UNICAMP.
215. PHARMACIA FINE CHEMICALS (1972). Selectivity curves and the choice of sephadex. Separation News, Jan.
216. PHARMACIA FINE CHEMICALS (1972). Blue Dextran 2000. Jan.72-1. Printed Sw. Rahms Lund.
217. PINTAURO, N. (1979). Food Processing Enzymes, Recent Developments. NDC. US. pp:181-230.
218. PONTECORVO, A. (1981). The role of the hydrolyzes vegetable proteins in iron fortification food programs. J. AOCS 58 (3):533-534.
219. PORATH, J. (1962). Cross-linked dextrans as molecular sieves. Adv. Protein Chem. 17:209-226.
220. POUR-EL, A. (1976). Gelation parameters of enzymatically modified soy protein isolates. Cereal Chem. 53(3):438-456.
221. PRENDERGAST, K. (1974). Protein hydrolyzates: A review. Food Trade Review 44(1):14-21.
222. PRIEPKE, P. (1977). Suspension stability of Illinois soybean beverage. Diss. Abst. Intern. B. 38(1):127-129.

223. PRINGLE, W. (1974). Full fat soy flour. J. AOCS. 51(1):74A-76A.
224. PROCTER & GAMBLE, Co. (1973). Soy protein cereal. FTSA. 6:4G194.
225. PROVANSAL, M.; CUQ, J. & CHEFTEL, J. (1975). Chemical and nutritional modifications of sun flower proteins due to alkaline processing formation of amino acid cross - linked and isomerization of lysine residues. J. Agric. Food Chem. 23(5):938.
226. PUSKI, G. (1975). Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. Cereal Chem. 52(5):655-664.
227. PUSKI, G. (1974). Acidic proteinaceous beverages. FSTA. 7:3H460.
228. RACKIS, J.; SESSA, D. & HINIG, D. (1979). Flavor problems of vegetables food proteins. J. AOCS, 56(3):262.
229. RACKIS, J. (1974). Biological and physiological factors in soybeans. J. AOCS, 51(1):161A-174A.
230. RAHM, O. de (1978). Process for the production of a vegetable based sweetened condensed milk. FSTA. 11:8G643.
231. RANHOTRA, G & LOEWE, R. (1975). Effect of wheat phytase on dietary phytic acid. J. Food Sci. 40:940-942.

232. Recommended Dietary Allowances (1980). 9th edition, Food & Nutrition Board Nat. Res. Council, Nat. Acad. Sci. Washington, pp:37-45.
233. RICHARDSON, M. (1981). Protein Inhibitor of enzymes. Food Chem. 6(3):235-253.
234. RICKS, E.; RIDLING, B.; IACOBUCCI, G. & MYERS, D. (1977). Approaches to analyze and optimize protein hydrolysates. FEBS 11th Meeting Coph., Bol. 44 Symposium A3 pp:119-128.
235. ROACH, D. & GEURKE, C.W. (1970). The hydrolysis of proteins. J. Chromat. 52:393-404.
236. ROESSLER, E.B.; PANGBORN, R.M.; SIDEL, J. & STONE, H. (1978). Spanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo-trio and triangle test. J. Food Sci. 43(3):940-943.
237. ROOZEN, J. & PILNICK, W. (1979). Enzymatic protein hydrolysis in an membrane reactor related to taste properties. Enzymes and Microbial Technology, 1(2):122.
238. ROOZEN, J.P. & PILNICK, W. (1973). Ultrafiltration controlled enzymatics degradation of soy protein. Process Biochem. 8(7):24-25.
239. ROOZEN, J. & PILNICK, W. (1974). Improvement of the acid solubility of soy protein by enzymatic hydrolysis and its influence on their taste properties. Deutsche Lebens. Rundschau. 70(8):280-283.

240. ROUBAL, W. (1971). Free radicals, malonaldehyde and protein damage in lipid-protein systems. Lipids, 6(1):62.
241. SAKAMOTO, K. (1979). Soybean milk substitute. FSTA. 12:1H27.
242. SALES, A.; TRAVAGLINI, D.; COSTA, S. & FERREIRA, V. (1978). Desenvolvimento de fórmula para alimentação infantil à base de soja e leite de vaca. Anais do I-Seminário Nac. Pesq. de Soja.
243. SANTOS, L.C. dos; COSTA, S.; ARCKOOL, D. & ALMEIDA, A. (1978). Produção de concentrados e isolados protéicos de soja. Coletânea do ITAL, Vol. 9:85-103.
244. SAVOY, C; HEINIS, J. & SEALS, R. (1975). Improved methodology for rapid and reproducible acid hydrolysis of food and purified proteins. Anal. Biochem. 68(2):562-571.
245. SCHAEFER, E.E. (1979). ASTM Manual of ^{of} Consumer Sensory Evaluation. ASTM-STP. 682.
246. SCHIFF, H. & ADLER-NISSEN, J. (1978). Quantitative assay of specific proteolytic activity in food protein hydrolysates, by single radial immunodiffusion. J. Food Sci., 43(1):141.
247. SCIBELLE, G. (1980). Fortification of soft drinks with proteins. FSTA, 13:1H170.
248. SGARBIERI, V. (1981). Modificações químicas e físicas das proteínas dos alimentos durante o processamento. ABIA nº 56, pp:6-21.

249. SGARBIERI, V. (1977). A importância dos aminoácidos em nutrição e ciência de alimentos. Ciência e Cultura, 29(10:1152.
250. SHEPHERD, A.; BETSCHART, A.; SAUNDERS, R.; ROCKEY, G. & HUBER, G. (1981). Brokens spark interest in "rice soya" infant milk, Rice J. 84(5):16-21.
251. SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. (1984). Soy milk industry & market worldwide and country-by-country analysis. ISBN 0-933332.
252. SLUMP, P. (1978). Lysinoalanine in alkali treated proteins and factors influencing its biological activity. Ann.Nutr. Alim. 32:271-279.
253. SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. (1972). Soybeans: Chemistry and Technology, Vol. 1. The AVI Publ. Co. Inc.
254. SMITH, A.; RACKIS, I.; ISNARDI, P.; CARTTER, J. & KROBER, O. (1966). Nitrogen solubility index, isolated protein yields, and whey nitrogen content of several soybean strains. Cereal Chem. 43(2):261-270.
255. SMITH, A. & BECKEL, A. (1946). Soybean or vegetable milk. Chem. Eng. News, 24(1):54-56.
256. SODEK, J. & HOFMANN, T. (1970). Microbial acid proteinases, in: Methods Enzymology Vol. XIX, pp:232-397. Ed. by Perlman & Lovand.

257. SORENSEN, S.P.L. (1907). Enzymstudien. Biochem. Zeits. 7:45-101, 407-420.
258. SPACKMAN, D.H.; STEIN, W. & MOORE, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem., 30(7):1190-1206.
259. SPIES, J. (1967). Determination of tryptophan in proteins. Anal. Chem., 39(12):1412-1416.
260. SPIES, J. (1957). Colorimetric procedures for amino acids, in: Methods Enzymology Vol. III pp:467-471. Ed. by Collo-wick & Kaplan.
261. STEINHART, H. (1973). The course of reaction of hydrolysis of isolated soybean protein with pepsin. Zeitschrift für Lebens. Untersuchung und Forschung, 152(6):332.
262. STERLING, C. (1966). Sephadex and Gel Filtration, in: Biochemistry Laboratory Techniques. John Wiley & Sons pp: 40-53.
263. STERNBERG, M.; KIM, C. & SCHWENDE, F. (1975). Lysinoalanine: Presence in foods and foods ingredients. Science, 190:992-994.
264. STERNBERG, M.; KIM, C. & PLUNKETT, A. (1975). Lysinoalanine determination in proteins. J. Food Sci., 40(6):1168-1170.
265. STRASHNENKO, E.; GRUZDEV, L.; LYANAYA, A. & KOCHEVALOVA, L. (1979). Method of purifying and edible acid hydrolysate. FSTA, 12(6):47.

266. SUGIMOTO, H.; VanBUREN, J. & ROBINSON, W. (1971). An enzymatic process for a protein-containing beverage based on soybean protein and lemon juice. J. Food Sci., 36(5):729-731.
267. SURREY, K. (1964). Spectrophotometric method for determination of lipoxydase activity. Plant Physiol., 39(1):65-70.
268. TAKAHASHI, G. & Cia. Ltda. (1981). Utilização de derivados de soja na fabricação de produtos cárneos, em: A Soja no Brasil, Ed. por S. Miyasaka & J.C. Medina, ITAL, pp:885.
269. TANAKA, M.; THANANUNKUL, D.; LEE, T. & CHICHESTER, C.D. (1975). A simplified method for the quantitative determination of sucrose, raffinose and stachyose em legumes seeds. J. Food Sci., 40(5):1087-1088.
270. TANIGUCHI, K.; OGAWARA, M. & MATSUI, T. (1975). Studies on antioxidative effects of enzymatic protein hydrolysates. Bull. Fac. Agric. Meij. Univ., nº 34:39-50.
271. TAPPEL, A. (1962). Lipoxydase, in: Methods Enzymology Vol. V pp:539-542. Ed. by Colowick & Kaplan.
272. TRAVAGLINI, D.A. (1981). Extrato de soja em pó, em: A Soja no Brasil, Ed. por S. Miyasaka & J.C. Medina, ITAL, pp:986.
273. TRAVAGLINI, D.A. & VITTI, P. (1981). Soja em produtos derivados de preparo rápido, em: A Soja no Brasil, Ed. por S. Miyasaka & J.C. Medina, ITAL, pp:872.

274. TRAVAGLINI, D.A.; DeAGUIRRE, J.; TRAVAGLINI, M.; SILVEIRA, E.; DELAZARI, I. & FIGUEIREDO, I.B. de (1980). Processamento do extrato de soja em pó. *Coletânea do ITAL*, 11:139-152.
275. TRESSLER, D.K. & WOODROOF, J.G. (1976). *Food Products Formulary*, Vol. 3, The AVI Publ. Co, NY, pp:194-201.
276. UMEYA, J.; MITSUISHI, N. & YAMAUCHI, F. & SHIBASAKI, K.(1981). Effect of acetylation on hardening and softening properties of soybean protein-water suspending systems. *Agric. Biol. Chem.*, 45(7):1577.
277. VAN De KRAMER, J. & VAN GINKEL, L. (1952). Rapid determination of crude fiber in cereals. *Cereal Chem.* XXIX (7):239.
278. VARANGOON, P. (1977). Development of village scale beverage, coco-soya milk. *Food*, 9(3)62-67.
279. VERMA, S.C. & McCALLA, A.G. (1966). Enzymatic hydrolysis of dispersed wheat gluten, *Cereal Chem.* 43(1):28-34.
280. VILES, F. & SILVERMAN, L. (1949). Determination of starch and cellulose with anthrone. *Anal. Chem.* 21(8):950-953.
281. WALKLEY, J.W. & TILLMAN, J. (1977). A simple thin-layer chromatographic technique for the separation of mono and oligo-saccharides. *J. Chromat.* 132(1):172-174.

282. WALTON, H.F. & REYES, J. (1973). Modern Chemical Analysis and Instrumentation. Marcel Dekker Inc. NY, pp:176-178.
283. WANG, L. (1978). Ultrasonic peptization of soybean proteins from autoclaved flakes, alcohol-washed flakes and commercial samples, J. Food Sci., 43(3):1311-1313.
284. WEBER, K. & OSBORN, (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem., 244(16):4406-4412.
285. WEISBERG, S. (1974). Nutritional experience with infant formulas containing soy, J. AOCS, 51(1):204A-208A.
286. WHEELER, E. & FERREL, R. (1971). A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions, Cereal Chem., 48:312.
287. WHITAKER, J.R. (1977). Enzymatic modifications of proteins applicable to foods. Adv. Chem. Series, n° 160 pp:95-155.
288. WHITAKER, J.R. (1974). Analytical applications of enzymes. Adv. Chem. Series n° 136 pp:31-78.
289. WHITAKER, J.R. (1972). Principles of Enzymology for the Food Science, Marcel Dekker Inc. NY.
290. WHITAKER, J.R. (1963). Determination of molecular weights of protein by gel filtration on sephadex. Anal. Chem., 35(12):1950-1953.

291. WILDING, M.D. (1979). Vegetables protein application in whey soy drink miz and ice cream. J. AOCS, 56(3):392.
292. WILKENS, W. & MATTICK, L. & HAND, D. (1967). Effect of processing method on oxidative off-flavor of soybean milk. Food Techn. 21(12):86-89.
293. WILLIAMS, P.C. (1973). The use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale kjeldahl determinations of the nitrogen content of cereal grains. J. Sci. Food Agric., 24(3):343-348.
294. WOICKA-BEKAS, E.; JAMBORONICZ, W.; MILANIVK, T. & PRONCZUK, A. (1978). Modification on the pepsin-trypsin method for determination of the in vitro digestibility of protein. FSTA, 10:9A538.
295. WOLF, W. (1970). Soybean protein: Their functional, chemical and physical properties. J. Agric. Food Chem., 18(6):969.
296. WOLF, W.; SLY, D. & KWOLEK, W. (1966). Carbohydrate content of soybean proteins. Cereal Chem., 43(1):80-94.
297. WOZENSKI, J. & WOODBURN, M. (19). Phytic acid (myoinositol hexaphosphate) and phytase activity in four cottonseed protein products. Cereal Chem., 52(5):665.
298. WU, V. & INGLET, G. (1974). Denaturation of plant proteins related to functionality and food applications, a review, J. Food Sci., 39(2):218.

299. WYK, K. Van (1978). Factors responsible for bitterness in soybeans. South Afri. Food Rev., 5(6):61-65.
300. YAMAGISHI, T.; YAMAUCHI, F. & SHIBASAKI, K. (1981). Electrophoretic and differential thermal analysis of soybean 11S globulin heated in the presence of N-ethylmaleimide, Agric. Biol. Chem., 45(7):1661-1668.
301. YAMAGISHI, T.; YAMAUCHI, F. & SHIBASAKI, K. (1980). Isolation and partial characterization of heat denatured products of soybean products. 11S globulin and their analysis by electrophoresis. Agric. Biol. Chem., 44(7):1575-1582.
302. YAMAGUCHI, N.; NAITO, S.; YOKOO, Y. & FUJIMAKI, M. (1982). Use of protein hydrolysates as antioxidants in biscuits. J. of Japanese Soc. of Food Sci. & Techn., 27(2):56.
303. YEE, J.J.; SHIPE, W.F. & KINSELLA, J.E. (1980). A research note: Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper catalysed methyl linoleate oxidation. J. Food Sci., 45(4):1082.
304. YEMM, E.W.; COCKING, E. (1955). The determination of amino acid with ninhydrin. The Analyst, 80(948):209-213.
305. YOKOTSUKA, T.; AOYAMA, Y.; KIKUCHI, T.; ISHII, S. & MATSUURA, M. (1975). Preparation of an acidic beverage. FSTA, 8: 2H321.

306. ZAKARIA, F. & McFEETERS, R. (1978). Improvement of the emulsi-
fication properties of soy protein by limited pepsin hy-
drolysates. Lebens. Weisensch. Tech., 11(1):42.
307. ZEITLER, H. & STADLER, E. (1972). Determination of parameters
in dextran gel filtration. J. Chromat., 74(1):59-71.