

CONTRIBUIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO
DE UMA MISTURA PROTÉICA SOLÚVEL
EM pH ÁCIDO PARA CRIANÇAS EM
IDADE ESCOLAR

Por Roberto Herminio Moretti

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos e Agrí
cola da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do tí
tulo de Livre Docente.

Campinas, S.P. - Outubro de 1976.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À memória de meu avô

Silvio Moretti

AGRADECIMENTO

O autor agradece sinceramente ao Professor Dr. André Tosello pelo apoio e incentivo na execução deste trabalho. Agradece também aos colegas Ramon Hinojosa Gutierrez, Luiz Fernando Ribeiro de Miranda e Pedro Luiz Antunes pelo auxílio na execução dos trabalhos experimentais.

Os agradecimentos especiais são destinados a Maria Helena, Roberto, Maria Eliane e Maria Elizabeth pela paciência e compreensão durante toda a execução deste trabalho.

Os aminogramas foram executados nos laboratorios da Duratex S.A.- Indústria & Comércio, com a colaboração dos Drs. José Eduardo Butolo e Julio J. N. Silveira.

Os agradecimentos são extensivos ao Prof. Dr. Leopold Hartman, Sra. Angelina Franco de Godoy e a todos que colaboraram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.	i
SUMMARY	iii
1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	45
5. CONCLUSÕES.	97
6. LITERATURA CITADA	100

...ooo0ooo...

RESUMO

Foram desenvolvidos e caracterizados dois produtos proteicos solúveis em bebidas ácidas, tipo refrigerante.

Lactoalbuminas de soro de queijo, tipo Minas, com baixo teor de sais e lactose, foram recuperadas por ultrafiltração até obtenção de 58 a 63% de proteína na base seca. Parte das frações protéicas de baixo peso molecular foi perdida com o permeado, bem como frações de pesos moleculares mais elevados foram desnaturadas durante o processo de pasteurização.

O "PER" do produto final variou de 2,91 a 3,50 conforme seu pH final fosse 3,50 ou 6,50 respectivamente. A solubilidade das proteínas foi mantida durante o processo e o poder tamponante foi reduzido 5 vezes, possibilitando a elaboração de uma bebida de baixa acidez titulável com um baixo pH. O aminograma do produto recuperado apresentou-se bastante equilibrado e bem superior ao da proteína referência FAO/OMS-1973.

As proteínas de soja foram hidrolisadas por enzima proteolítica ácida (Denapsin) a baixa temperatura e moderada acidez total titulável, o que possibilitou a obtenção de um produto protéico de ótimo valor nutritivo semelhante ao das proteínas originais. O teste de digestibilidade "in vitro", demonstrou um aumento significativo após a hidrólise enzimática.

O fator antitriptico foi destruído pela ação da protease ácida, bem como lipoxigenases, o que resultou num hidrolisado estável e de melhor valor nutricional que a matéria prima.

Os sabores de soja crua foram eliminados e os sabores amargos e adstringentes que normalmente ocorrem em hidrolises enzimáticas, não apareceram. Os pesos moleculares das proteínas originais, que variavam de 20.000 a 300.000, foram reduzidos para uma faixa de 75 a 15.000 em quase sua totalidade. O aminograma do hidrolisado mostrou-se semelhante ao aminograma das proteínas originais.

Tomando-se por base a proteína referência FAO/OMS-1973, e os aminogramas das proteínas recuperadas do soro e dos hidrolisados de soja, calculou-se uma mistura que utilizando o máximo de hidrolisado de soja satisfizesse a mencionada referência. Esta mistura constituiu-se de 31,4% de lactoalbuminas e 68,6% de hidrolisado protéico de soja.

Foi calculado o custo do produto protéico hidrolisado, que resultou em Cr\$ 11,00 a 11,50 por quilo.

Uma merenda escolar foi calculada para satisfazer 15% das necessidades protéicas de uma criança de 7 a 14 anos, utilizando a mistura desenvolvida. Os resultados mostraram que a merenda formulada com 4,2 g de proteína, 36 g de açúcares, mistura de vitaminas e sais minerais, corantes, sabores e antioxidante teria um custo em torno de Cr\$ 0,226.

SUMMARY

Two protein products soluble in acid soft drinks were developed and characterized.

Lactalbumins from cheese whey (Minas type) with a low content of mineral salts and lactose, were recovered by ultrafiltration amounting to 58-63% of proteins on dry basis. A part of protein fractions with low molecular weight were lost in the filtrate whereas fractions with a higher molecular weight were partially denatured during pasteurization.

The "PER" of the final product varied from 2.91 to 3.50 according to its final pH of 3.50 and 6.50, respectively. The solubility of proteins was maintained during the process and their buffering power was reduced 5 times, making possible the obtaining of a beverage with a low titratable acidity and low pH. The aminogram of the recuperated product was well balanced and superior to the reference protein of FAO/OMS-1973.

The soya proteins were hydrolysed by an acid proteolytic enzyme (Denapsin) at a low temperature and moderate total titratable acidity, thus making possible the obtention of a protein product with an excellent nutritional value, similar to that of the original proteins. Digestibility test "in vitro" showed a significant increase after enzymatic hydrolysis.

The anti-trypsin factor as well as lipoxigenases were destroyed by the action of the acid protease, which resulted in a stable hydrolysate with higher nutritional value than that of the starting material.

The flavors of crude soya were eliminated and bitter and adstringent flavors associated usually with enzymatic hydrolysis did not appear. The molecular weights of the original proteins, which varied from 20.000 to 300.000, were reduced almost completely to a value of 75 to 15.000. The aminogram of the hydrolysate resembled that of the original proteins.

Taking as basis the reference protein of FAO/OMS-1973 and the aminograms of proteins recovered from whey and of soya hydrolysate, there was calculated a mixture which employing a maximum quantity of soya hydrolysate would be equivalent to the above mentioned reference protein. This mixture consisted of 31.4% of lactalbumins and 68.6% of protein hydrolysate of soya.

The cost of the protein hydrolysate was assessed and was found to be 11.00-11.50 cruzeiros per 1 kg.

A school luncheon was calculated, using the above described mixture, which would satisfy 15% of the protein requirements of a child 7-14 years old. It was found that the school luncheon containing 4.2 g of protein, 36 g of sugars, mixture of vitamins and mineral salts, coloring matter, flavors and antioxidant would cost about 0.226 cruzeiros.

1. INTRODUÇÃO

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de uma bebida nutritiva ácida, com proteínas solúveis em pH 3 a 3,5, que preenchesse os seguintes requisitos: 1) alto valor nutritivo, dentro dos padrões estabelecidos pela FAO/OMS-1973, 2) adequado às condições brasileiras, 3) baixo custo, 4) possibilidade de atender a um mercado de 10 a 15 milhões de crianças em idade escolar e pré-escolar, suprimindo em 15 a 20% as necessidades proteicas diárias dessa população em uma única merenda, 5) sabor e aroma neutros, possibilitando a adição de sabores artificiais ou a mistura com sucos naturais de frutas ácidas. Essas proteínas devem permanecer em solução estável, mesmo quando carbonatadas, para produzir refrigerantes e, finalmente, não devem apresentar viscosidade muito diferente da usual em refrigerantes e sucos de frutas.

Um grande problema da atualidade, que tende a se agravar num futuro próximo é o da eliminação de efluentes industriais, que vêm contaminando as águas dos rios, consumindo seu oxigênio, poluindo a atmosfera, além de causar outros danos à natureza.

A indústria de laticínios é, dentre as do setor alimentício, das que mais poluem os rios, visto que na elaboração de queijos, 77% do leite utilizado no processo é eliminado sob a forma de soro, que encerra cerca de 0,6% de proteínas, de alto valor nutritivo, e 4,7% de lactose.

Nos Estados Unidos, cerca de 3 bilhões de litros de soro são perdidos ou eliminados anualmente, somente no estado de Wisconsin,

que é grande produtor de leite e derivados. Isto representa uma perda anual de 18.000 toneladas de proteínas.

No Brasil, o volume de soro resultante da fabricação de queijo é de 370 milhões de litros, o que corresponde a uma perda anual de aproximadamente 2.000 toneladas de proteínas.

É do conhecimento geral que as razões do não aproveitamento dessas proteínas são a sua baixa concentração, o custo elevado do transporte, as fábricas de pequeno porte e, principalmente, a falta de tecnologia econômica e de uso adequado para o produto resultante.

Este trabalho visa contribuir para a resolução do problema, desenvolvendo, por meio de uma tecnologia adequada, produto de relevante importância política, econômica e social.

Devido à impossibilidade do aproveitamento total do soro produzido no país, e à insuficiência desse produto para um plano mais arrojado, desenvolvemos um outro produto que, juntamente com o soro, poderia ampliar a recuperação de suas proteínas.

Este produto utiliza como matéria-prima a soja, cuja produção anual no Brasil chega a 11 milhões de toneladas, tendendo esta cifra a aumentar ainda mais.

A proteína de soja, de alto valor nutritivo e baixo custo, juntamente com as proteínas do soro de queijo possibilitam uma mistura protéica de valor nutritivo semelhante ao do leite de vaca. A maioria das proteínas da soja são insolúveis em pH baixo e apresentam um sabor de soja crua; além disso, há os fatores antinutricionais conhecidos, dos quais o principal é o fator anti-tripsina.

Um produto já existente no mercado, a proteína isolada de soja, ainda apresenta atividade antitriptica, não é solúvel em pH baixo,

seu custo é elevado e seu valor nutritivo é baixo, devido à baixa con centração de aminoácidos sulfurados, razões pelas quais não satisfaz as nossas exigências.

A necessidade diária de proteínas de uma criança com peso médio de 35 kg, atendendo às especificações da proteína referência da FAO/OMS-1973, é de 28 gramas, aproximadamente, o que resultaria numa de manda diária de 63 toneladas de proteína para atender a 15% da carên cia protéica de 15.000.000 de crianças.

Para alcançar os objetivos expostos, propusemo-nos a desenvol ver uma tecnologia que torne as proteínas de soja solúveis, a um custo reduzido. Esperamos com este trabalho contribuir para o encami nhamento da solução deste problema brasileiro, que tem implicações econômicas, políticas e sociais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. VALOR NUTRITIVO DAS LACTOALBUMINAS

As lactoalbuminas, proteínas encontradas no leite, são uma mistura de proteínas coaguláveis que precipitam quando acidificadas e aquecidas. São compostas principalmente por α -lactoglobulinas e β -lactoalbuminas, com pequenas quantidades de outras proteínas que compõem o soro (Jenness et al., 1956). Elas perfazem aproximadamente 18% do total de proteínas do leite de vaca.

As lactoalbuminas têm sido reconhecidas como proteínas altamente nutritivas (Block et al., 1953; Chow et al., 1948; DeBaun e Connors, 1954; Edelstein et al., 1919; Kirk, 1938; Mitchell e Block, 1946; Osborne e Mendel, 1916; Osborne et al., 1919; Osborne e Mendel, 1924; Ruegamer et al., 1950; Riggs et al., 1955; Supplee e Clark, 1946).

O colostro e o primeiro leite das vacas são particularmente ricos em lactoalbuminas. O leite humano contém maior teor de lactoalbumina do que de caseína. Estes fatos impressionaram muitos dos primeiros nutricionistas e pediatras, levando-os a reconhecer importantes propriedades nutricionais das lactoalbuminas. Portanto Jolt, em 1916, observou: "... no leite humano a quantidade de lactoalbumina é duas vezes maior que a de caseína, enquanto que no leite de vaca ela representa somente um sexto da caseína. Seguramente, não é mero acidente que o leite humano contenha, relativamente, doze vezes mais lactoalbuminas que o leite de vaca" (Holt, 1916).

Ainda em 1941, Marriot e Jeans mostraram que, enquanto o leite humano contém menos proteínas que o leite de vaca, quase 60% são lactoalbuminas (18% no leite de vaca), e estabeleceram: "Apesar das proteínas desses dois leites terem alto valor nutritivo, o leite de vaca tem menor valor que o leite humano, possivelmente 20% a menos". (Marriot e Jeans, 1941).

Relatórios típicos, encontrados na literatura científica, atestam a excelência das lactoalbuminas como alimento protéico:

O trabalho clássico de Osborne e Mendel, comparando o crescimento de ratos machos jovens em dietas nas quais a proteína foi fornecida por lactoalbuminas, caseína, ou edestina (proteína vegetal), com a mesma quantidade de alimento ingerido, mostrou que "os alimentos com lactoalbuminas produziram os maiores ganhos em todos os casos". (Osborne e Mendel, 1916).

Em outro trabalho, os mesmos autores reportam: "A maior eficiência relativa das lactoalbuminas em promover crescimento é alarmante;... com a mesma porcentagem das seguintes proteínas-lactoalbuminas, edestina, caseína, globulinas de semente de abóbora e glicina - as lactoalbuminas deram os melhores resultados de crescimento". (Osborne e Mendel, 1917).

Supplee e Clark afirmam: "A evidência mostra claramente a superioridade das lactoalbuminas sobre a caseína". (Supplee e Clark, 1946).

O valor dietético das lactoalbuminas foi também demonstrado na formação do sangue. Nutricionistas têm demonstrado claramente que o fornecimento de uma proteína incompleta ou de quantidade insuficiente de uma proteína completa resulta no desenvolvimento de uma anemia

moderada. Investigando o valor comparativo de várias dietas proteícas para formação de sangue, Orten encontrou: "... dos animais machos alimentados com o baixo nível de proteína -2,8%- aqueles que receberam lactoalbuminas foram definitivamente mais favorecidos do que os que receberam caseína ou proteínas de outras fontes;... todos os ratos alimentados com lactoalbuminas sobreviveram a um período experimental de 180 dias, enquanto que a quase totalidade dos animais, recebendo caseína ou as outras fontes de proteínas, sucumbiram".

Foi ainda comprovado que, "parecia haver um paralelismo entre o valor hematopoiético (formação do sangue) das proteínas e sua habilidade para manter o crescimento". (Orten e Orten, 1946).

Apesar de a mistura de proteínas encontrada no ovo ter sido relatada como sendo comparável às lactoalbuminas em qualidade, quando a disponibilidade, a uniformidade de qualidade e o custo são considerados, é difícil deixar de concluir que as lactoalbuminas são as escolhidas. Como disse um ex-Diretor do Comitê de Alimentos protéicos do Conselho Nacional de Pesquisas dos E.U.A. (NRC), "Nossa proteína-padrão durante os trabalhos de guerra, foi a lactoalbumina, porque tínhamos uma razão para acreditar que não havia proteína disponível tão boa e que pudesse ser obtida constantemente". (Cannon, 1950).

A excelência das lactoalbuminas observada nesta lista de estudos biológicos é, por certo, prontamente explicada pelo aminograma que apresentam. Comparações de lactoalbuminas com o aminograma padrão do quadro 1 (Allison, 1958; Allison, 1958) mostram serem elas proteínas completas (Howard et al., 1958; Howard et al., 1960).

Quadro 1. Comparação de Aminoácidos em Lactoalbuminas com Proteínas Referência.

	Proteína Referência	Lactoalbumina	
	(FAO/OMS-73) g/16 g N	(Block e Bolling, 1956) g/16g N	% da Ref.
Isoleucina	3,7	7,5	202,7
Leucina	5,6	12,1	216,0
Lisina	7,5	10,5	140,0
Metionina + Cistina	3,4	6,6	194,1
Fenilalanina + Tirosina	3,4	10,3	302,9
Treonina	4,4	6,0	136,4
Triptofano	0,46	2,5	543,5
Valina	4,1	6,6	161,0

O Comitê de Aminoácidos do "Food and Nutrition Board" do "National Research Council", afirmou que 17,4 g de proteína de ovo integral, ou 28,4g de proteína de leite de vaca, fornecem a média da quantidade mínima requerida por adultos de 70 kg (Food and Nutrition Board Report, 1959). Somente 14,5 g de lactoalbuminas entretanto, seriam necessários para prover essas quantidades de aminoácidos, como mostra o Quadro 2. Na forma de caseína, aproximadamente 68% a mais de proteína seriam requeridos.

Quadro 2. Necessidades de Aminoácidos

	Necessidade mínima (FAO/OMS-73)	Aminoácido fornecido por 14,5 g de proteí nas lactoalbuminas
	<u>g/dia</u>	<u>gramas</u>
Triptofano	0,245	0,37
Treonina	0,490	0,90
Isoleucina	0,700	1,12
Leucina	0,98	1,80
Lisina	0,840	1,57
Metionina + Cistina	0,91	1,01
Valina	0,70	1,01
Fenilalanina + Tirosina	0,98	1,54

SUPLEMENTAÇÃO PROTÉICA

Os resultados de um aminograma revelam que as lactoalbuminas são uma fonte protéica completa. Além do mais, sua riqueza relativa em aminoácidos essenciais, tais como lisina, triptofano e treonina, torna-as um excelente suplemento para proteínas que são deficientes em um ou mais desses importantes nutrientes. Sua eficácia nesse sentido tem sido confirmada por extensivos trabalhos experimentais, começando com o de Osborne e Mendel (1914). Em testes de crescimento

com ratos alimentados com ração protéica incompleta, concluíram que "... as lactoalbuminas forneceram todos os (aminoácidos) fatores re queridos para um crescimento normal" (Osborne e Mendel, 1914).

"Com galinhas, bem como com ratos, lactoalbuminas, ricas em triptofano e lisina, são um eficiente coadjuvante para proteínas do glúten de milho" (Osborne e Mendel, 1916).

"...Entre as proteínas estudadas (15 preparados protéicos entre todos), uma pequena adição de lactoalbumina ultrapassa, em muito, a eficiência suplementar de outras proteínas ou de preparados protéicos testados... Crescimento satisfatório é obtido com menores quantidades desta proteína (lactoalbumina), do que quaisquer outras reportadas". (Osborne e Mendel, 1917).

Por muitos anos, estas descobertas têm sido menosprezadas, pois os nutricionistas, num esforço para elucidar a causa de deficiências de proteínas específicas, desviaram sua atenção para a tentativa de suplementar as proteínas com principal aminoácido limitante - tal como a lisina no caso de farinhas.

Entretanto, em algumas proteínas a suplementação com um único aminoácido é inadequada. Como Osborne e Mendel assinalaram, "Apesar da adição de lisina à gliadina promover o crescimento em experimentos com ratos, outras proteínas, como a zeína, revelaram-se pobres em mais de um aminoácido essencial. A suplementação dessas proteínas com lactoalbumina foi determinada como sendo o mais eficiente método de promover o crescimento de animais". (Osborne e Mendel, 1914).

Investigações recentes não cobrem outras limitações na suplementação com um único aminoácido- condições em que a adição de um único aminoácido em uma dieta pode causar um efeito adverso ao invés de

benéfico. (Allison, 1958).

Block afirma: "Deveríamos sempre relembrar que nenhuma proteína pode ser formada a menos que todos os aminoácidos dos quais ela seja composta estejam disponíveis para a sua sintetização. Ainda mais, a quantidade de proteína que pode ser formada está limitada pelo aminoácido que está relativamente disponível em menor quantidade. A síntese de proteínas é governada pela lei do mínimo. Mesmo que uma proteína seja marcadamente deficiente em um único aminoácido, como por exemplo a deficiência de lisina em trigo, a nutrição ideal nunca é atingida, mesmo que grandes quantidades de proteína de trigo sejam fornecidas a um determinado animal..." (Block, 1956).

Allison destaca: "... Na quantidade de nitrogênio (proteína) necessária para satisfazer as necessidades do crescimento, a repressão ou manutenção variará de acordo com a habilidade da proteína dietética de prover o mais eficiente padrão para as necessidades metabólicas". (Allison, 1958).

Howe observa: "As proteínas vegetais... têm, via de regra, um baixo teor de aminoácidos essenciais; ainda mais, são pobres em balanceamento com respeito aos vários aminoácidos que as compõem. O potencial para a suplementação de aminoácidos na alimentação do homem e dos animais é enorme". (Howe, 1958).

"Desde que as simples proteínas vegetais são relativamente pobres em valor biológico, devido ao fato do seu conteúdo em aminoácidos não satisfazer as necessidades dos mamíferos, elas devem ser suplementadas com proteínas animais ou ser misturadas com outras proteínas vegetais que possuam um conteúdo complementar de aminoácidos. A primeira possibilidade mencionada, combinar proteínas vegetais com

animais, é a base das misturas dietéticas bem feitas". (Scrimshaw e Bressani, 1960).

2.2. TECNOLOGIA DA RECUPERAÇÃO DAS LACTOALBUMINAS

A utilização das proteínas de soro de queijo foi dificultada até o presente pela falta de um processo tecnológico econômico, que tornasse a sua recuperação, e pela alta perecibilidade dessa matéria-prima após a separação da massa coagulada (McDonough, 1971).

A otimização das membranas ultrafiltrantes e dos aparelhos de ultrafiltração nos últimos anos tornou o seu uso exequível e econômico, mesmo em laticínios pequenos, para a recuperação das proteínas solúveis do soro de queijo (McDonough, 1971; McDonough et al., 1971; Forbes, 1972; Fenton May, 1971; Morrison, 1970; Abcor, 1969).

Existem dois tipos de soros de queijos: os ácidos, que apresentam pH em torno de 4,6 a 5,4 (McDonough, 1968), e os de pH 6,0 a 6,5, que são denominados "doces" (Forbes, 1972). Ambos podem ser utilizados como matéria-prima na recuperação de suas proteínas solúveis. Os soros ácidos apresentam maiores dificuldades devido à proximidade do ponto isoelétrico das lactoalbuminas, girando em torno de 5,2, o que causa entupimentos frequentes das membranas e, por conseguinte, a diminuição do fluxo do permeado (Forbes, 1972).

A pasteurização do soro de queijo aumenta o tempo de vida útil dessa matéria-prima; porém, no caso de soros ácidos, a desnaturação de proteínas é maior (Guy, et al. 1967).

A utilização do processo de ultrafiltração no Brasil foi viabilizado em 1973, por Moretti, que estudou a recuperação das proteínas

de soro de queijo tipo Minas, o qual apresentava as seguintes características: (Moretti, 1973)

pH	-	6,40-6,60
Acidez	-	16-19º Dornic
Brix refratométrico	-	6,0-6,7º Brix
Gordura	-	0,05-0,25%
Contagem microbiológica	-	$10^4 - 10^7$
Proteína solúvel	-	0,56-0,68%

Atualmente, o desenvolvimento de membranas ultrafiltrantes poliviníticas planas, com suporte de poliolefinas, tornou o processo ultrafiltrante ainda mais econômico, devido à maior vida útil dessas membranas plásticas, bem como à sua maior resistência a tratamentos de limpeza e sanitização (Wang, 1972).

O soro de queijo pode ser concentrado por ultrafiltração até teores de 6,5 a 9,0% de proteínas com sólidos totais de 12 a 15%. Isto resulta numa diminuição de até 20 vezes do volume original de soro, o que possibilita o armazenamento e o transporte para indústrias centrais a fim de se processar a sua secagem (Moretti - 1973 - Malaspina et al., 1972).

Nos E.U.A. existem várias companhias produzindo proteínas solúveis de soro por diferentes processos, entre os quais a ultrafiltração, a eletrodialise e a concentração (Purity, 1972 - Foremost, 1970), a preços econômicos e com o benefício da diminuição do problema de poluição (Forbes, 1972).

As proteínas de soro de queijo são solúveis no seu ponto isoelê

trico e, portanto, podem ser utilizadas na formulação de bebidas ácidas carbonatadas, tipo refrigerantes (Moretti, 1975). Esta característica é importantíssima, principalmente quando aliada ao seu alto valor nutritivo, que permite suplementar proteínas deficientes em aminoácidos essenciais, nas quais até 60% do valor nutritivo potencial como proteína não é utilizado na ausência de uma suplementação adequada. Isto é verdade não somente nas partes do mundo onde a suplementação da dieta com alimentos animais não é prática, mas também nas áreas altamente desenvolvidas, onde a suplementação é inadequada por motivos de hábitos alimentares errados (Altschul, 1965).

2.3. VALOR NUTRITIVO DAS PROTEÍNAS DE SOJA

Numa publicação das Nações Unidas (1968) intitulada "Ação Internacional para Evitar a Ameaça da Crise de Proteínas", uma proposta específica foi feita no sentido de aumentar o uso de sementes oleaginosas e proteínas de sementes oleaginosas concentradas como fontes diretas de proteína na dieta humana, desde que "nenhuma outra fonte única de proteína não convencional poderia contribuir tão eficaz e prontamente para eliminar a deficiência protéica existente".

Experimentos de nutrição com o ser humano apresentam como resultado problemas especiais, entre os quais o mais difícil de ser solucionado é o da "aceitabilidade". O ser humano não consumirá certos alimentos "simplesmente porque eles são nutritivos e bons para a saúde". (Liener, 1972).

Importantes trabalhos têm sido publicados a respeito do papel das proteínas vegetais na nutrição humana (Swaminathan, 1967 - Bressani

et al., 1967). O uso específico de produtos de soja como fonte proteica para o ser humano foi o tema de duas conferências patrocinadas pelo USDA (1961, 1966).

Um dos métodos utilizados para avaliar proteínas é o da relação entre os aminoácidos essenciais totais e o nitrogênio total da proteína (FAO/OMS-1965). Em geral, as proteínas de origem animal são as de maior índice, enquanto que as de origem vegetal têm índices inferiores. As proteínas de soja ocupam uma posição intermediária, conforme podemos observar no Quadro 3. (FAO, 1965).

Quadro 3. Relação entre Aminoácidos Essenciais Totais e Nitrogênio Total em Alimentos Seleccionados e na Proteína Referência da FAO-1957.

Fonte Protéica	E/T g/g nitrogênio total
Proteína de ovos inteiros	3,22
Leite de vaca	3,20
Carne de vaca	2,79
Peixe	2,66
Farinha de soja	2,58
Semente de gergelim	2,47
Semente de algodão	2,15
Farinha de amendoim	2,08
Farinha de trigo	2,02
Referência FAO-1957	2,02
Glúten de trigo	1,99
Mandioca	1,31
Gelatina	1,05

2.4. FATORES QUE AFETAM O VALOR NUTRITIVO DAS PROTEÍNAS DE SOJA

Entre os fatores que influem no valor nutritivo das proteínas de soja destacam-se os seguintes:

- a) Fatores antinutricionais (antitripsina)
- b) Fracionamento das proteínas

Logo após a introdução da soja como cultura comercial nos E.U.A., Osborne e Mendel (1917), num estudo do seu valor potencial como fonte de proteínas para animais, notaram que a soja não promovia o crescimento de ratos a não ser que fosse aquecida num banho de vapor. Após esse trabalho, muitos outros se sucederam e confirmaram os resultados de Osborne e Mendel, conforme revisão feita por Liener (1958).

Uma explanação do efeito benéfico do tratamento da soja a quente sobre seu valor nutritivo tem sido objeto de inúmeros estudos; a vasta literatura que trata deste assunto foi revista por Liener (1958, 1969) chegando-se à conclusão que a melhoria do valor nutritivo de soja pelo tratamento a quente parece estar relacionada com a destruição dos inibidores de tripsina e, possivelmente, de outros componentes biologicamente ativos (Sgarbieri e Antunes, 1975 - Liener, 1969).

Um tratamento térmico muito severo poderá acarretar uma diminuição do valor nutritivo das proteínas da soja (Fritz et al., 1947; McGinnis e Evans, 1947; Klose et al., 1948; Iriarte e Barnes, 1966; Taira et al., 1969). Essas deficiências em soja superaquecida podem ser explicadas pela vulnerabilidade da cistina e da lisina à destruição e/ou à inativação pelo calor (Evans et al., 1951; Taira, 1966;

Liener, 1958).

Sendo as proteínas de soja uma fonte importante de lisina, sua inibição parcial pela interação entre os grupos ϵ -amino da lisina e açúcares redutores, referida como Reação de Maillard (Liener, 1958), torna-a um suplemento menos efetivo que seu valor potencial (Iriarte e Barnes, 1966).

Outro fator mencionado anteriormente é o fracionamento das proteínas da soja.

A solubilidade das proteínas da soja varia com o pH do meio solvente, conforme se pode observar na Fig. 1. (Smith e Circle, 1938).

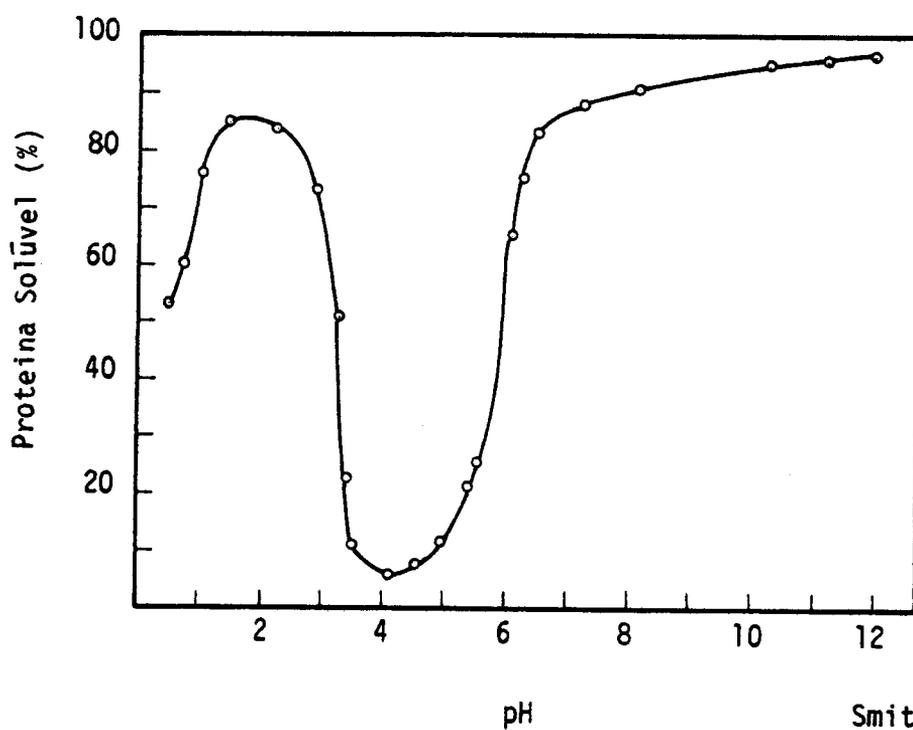


Fig. 1: SOLUBILIDADE DAS PROTEINAS DE SOJA NOS DIFERENTES pH.

No processamento de isolado protéico de soja, essa curva é a base do processo (Meyer, 1967; Smith, 1958). Como resultado, na precipitação das globulinas uma fração de proteínas solúveis no ponto isoeletrico não precipita nessa fase, e ocorre um fracionamento das proteínas originais. As proteínas que precipitam e são separadas do soro são mais pobres em aminoácidos sulfurados do que o total das proteínas da soja (Meyer, 1967; Berry et al., 1966; Hackler et al., 1963, 1967). Portanto as proteínas isoladas de soja apresentam um valor nutritivo inferior ao de suas proteínas totais. Nesse fracionamento, parte dos inibidores de tripsina precipitam juntamente com as globulinas da soja, resultando num isolado com atividade antitriptica residual. Por esta razão, o aquecimento dos isolados protéicos de soja melhora o seu valor nutritivo, devido à inativação desse fator antinutricional (Bressani e Elias, 1967; Longenecker et al., 1964).

Foram feitos estudos mostrando a utilidade do tratamento de proteínas de soja com enzimas proteolíticas ácidas, isoladas de microorganismos da espécie Aspergillus saitoi (Yoshida, 1972), que eliminam o sabor de soja crua. Foi também demonstrado o efeito benéfico de tratamentos enzimáticos sobre os fatores antitripsina, valor nutricional e propriedades bioquímicas (Birk e Gertler, 1962).

A redução do peso molecular de proteínas hidrolisadas por enzima proteolítica ácida foi demonstrada por Pezoa (1975), que obteve hidrolisado de proteína isolada de soja por meio de um reator enzimático ultrafiltrante, com pesos moleculares inferiores a 10.000.

Os rendimentos na produção de proteína de soja isolada são relativamente baixos, visto que somente as proteínas insolúveis no seu ponto isoelétrico são recuperadas; boa parte das proteínas originais

são eliminadas juntamente com as fibras na primeira centrifugação (Alderks, 1941). Esses rendimentos são considerados bons quando estão em torno de 42% em escala de laboratório, e de 30% quando em escala industrial (Smith, 1954). Outro fator bastante importante, que contribui para o custo elevado do isolado protéico de soja, é a necessidade de secagem por secador atomizador, que consome 3 kg de vapor por quilo de água evaporada, no produto isolado com cerca de 87% de água (Johnson, 1969), sem mencionar os elevados consumos de energia elétrica.

Em 1967, a produção de isolado protéico de soja nos E.U.A. foi calculada em 10 a 16 milhões de quilos por ano (Eley, 1968). No Brasil, essa produção está em torno de 1.000 toneladas anuais e seu preço no mercado é de aproximadamente Cr\$ 16,00/kg (Udvari e Kohlmann, 1976).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Materiais Protéicos

Farinha de Soja Desengordurada (F.S.D.), fornecida por SAMRIG - Sociedade Anônima Moinho Riograndense-RGS e COMOVE - Companhia Mogiana de Óleos Vegetais-SP.

Proteína isolada, - Proteimax-90, fornecida por SAMRIG - Sociedade Anônima Moinho Riograndense-RGS.

Soro de queijo - fornecido por CCPL-Cooperativa Central de Produtores de Leite-RJ.

3.1.2. Enzimas

Denapsin - Enzima proteolítica ácida produzida por Rhizopus chinensis - Nagase Enzymes - Japão. Atividade 642 UE/mg. (Whitaker, 1971).

Molsin-Enzima proteolítica ácida produzida por Aspergillus saitoi - Seishin Seiyaky Co. - Japão. Atividade 595 UE/mg.

Enzima fúngica - proteolítica neutra produzida por Aspergillus oryzae - Sankyo Co. - Japão. Atividade 350 UE/mg.

3.1.3. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram puros pró análise, obtidos

das firmas:

Sigma Chemical Co.

Distillation Products Industries, Eastman KODAK

Baker

Carlo Erba

Merck

Ecibra, etc...

3.1.4. Equipamentos utilizados

Potenciômetros-Metrohm - Modelos 500 e 516

Bureta-Metrohm - Modelo Dosimat

Agitador magnético-Metrohm

Vibrador para peneiragem-PRODUTEST

Jogo de peneiras-PRODUTEST

Reator enzimático ultrafiltrante (Moretti et al., 1975)

Centrífuga-International Equipment - Modelo B-20A

Agitador-estufa - New Brunswick Sci. Co. (Controlled Environment Incubator Shaker)

Banho-maria - Soc. FABBE Ltda - Modelo L69

Analisador de Aminoácidos-Beckman - Modelo 119-C

Espectrofotômetro - Bausch & Lomb - Modelo Spectronic-20

Espectrofotômetro - Perkin-Elmer - Modelo 402

Destilador de Nitrogênio - (Analytical Chem, 1951)

Aparelho p/ eletroforese de disco em gel de poliacrilamida (Ornstein, 1962)

Tacho Basculante com camisa de vapor - ICMA - Máquinas Alimentí
cías S.A.

Centrífuga Super decantadora - SHARPLES

Evaporador Centrífugo - Centriterm CT-IB -2, Alfa-Laval

Cromatógrafo de gás - Perkin-Elmer - Modelo 990

Ultrafiltro piloto - Havens - 215 com 5 módulos e 1 estágio

Gaiolas individuais para ratos construídas em tela e chapas gal
valinadas

Balança analítica - SAUTER - Modelo 414

Estufa a vácuo - Fanem Ltda. Mod. Retilínea

Estufa - Fanem Ltda. Mod. Retilínea

Liofilizador de laboratório - Virtis - Modelo 10-146 MR-BA.

Evaporador rotativo de vidro - Buchler Instruments, Inc.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Umidade

A determinação de umidade foi feita segundo o método descrito no AOAC, procedimento 14.004, 11th ed., 1970.

3.2.2. Nitrogênio total

A determinação do teor de nitrogênio total nas amostras foi realizada segundo o método micro-Kjeldahl descrito no AOAC, procedimento 2.051(1970). O valor obtido nas determinações em produtos de soja foi multiplicado pelo fator 6.25, e nos produtos de soro de queijo

pelo fator 6.38, para a obtenção do teor de proteína bruta.

3.2.3. Acidez Total Titulável

Utilizou-se NaOH-0,1N para titular 0,173g de proteína de cada amostra até a neutralização a pH 7,0 com auxílio de um potenciômetro.

Os resultados foram expressos em ml de NaOH-1N por 100 ml de bebida.

3.2.4. Sólidos Totais

Tanto para os soros de queijo como para os hidrolisados enzimáticos de proteína de soja, os seus sólidos totais foram determinados pesando-se 20,000 g da amostra em uma cápsula de porcelana, evaporando-se em banho-maria a 97°C até a secagem quase completa. Em seguida, a cápsula foi levada à estufa a 110°C e após duas horas iniciou-se o procedimento de pesagens intermitentes até a obtenção de peso constante.

Os resultados foram expressos em porcentagem, peso por peso.

3.2.5. Lactose

A determinação de lactose em soro de queijo e produtos de soro de queijo foi feita segundo o método de Munson e Walker (1906). Os resultados foram expressos em porcentagem, peso por peso.

3.2.6. Gordura em soro de queijo

Em um funil de separação foram colocados 100 ml de amostra, com duas gotas de laranja de metilo. A esta amostra foram adicionados 100 ml de mistura 1:1 de éter sulfúrico e petróleo, além de HCl suficiente para virar a cor do indicador. Após a separação das fases por agitação, a fase aquosa foi esgotada num segundo funil, no qual mais 100 ml da mesma mistura de solvente foram adicionados, repetindo-se o processo de agitação para o esgotamento da fase aquosa. As fases etéreas dos dois funis foram juntadas e agitadas. Depois da separação, o restante da fase aquosa foi eliminado. Em seguida foi adicionado sulfato de sódio anidro, removendo-se os últimos vestígios de água através de leve agitação.

A água residual da fase aquosa foi totalmente eliminada através de um filtro de papel contendo sulfato de sódio anidro, e o filtrado recolhido num balão de fundo chato, previamente tarado.

O processo de evaporação consistiu de um banho-maria a aproximadamente 70°C.

3.2.7. Contagem microbiológica

Foram feitas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} e a incubação foi conduzida a 35°C em caixa de "Petri" com "Orange Serum Agar" como meio de cultura (Florida State Hort. Soc., 1951). As contagens foram realizadas após 48 e 72 horas de incubação.

3.2.8. Recuperação das proteínas do soro de queijo

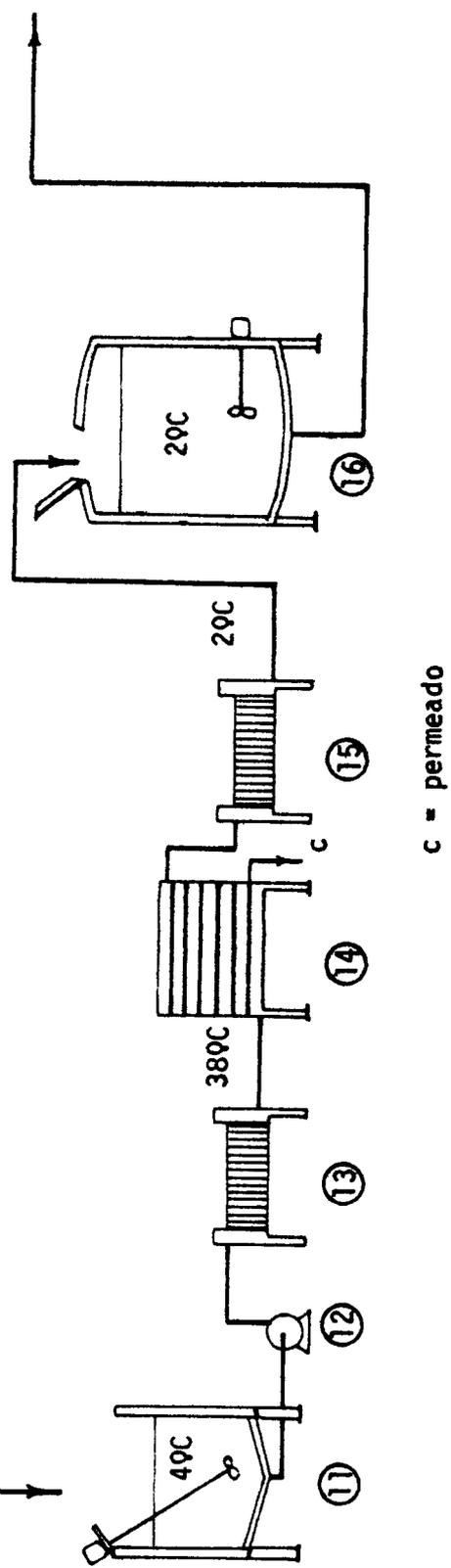
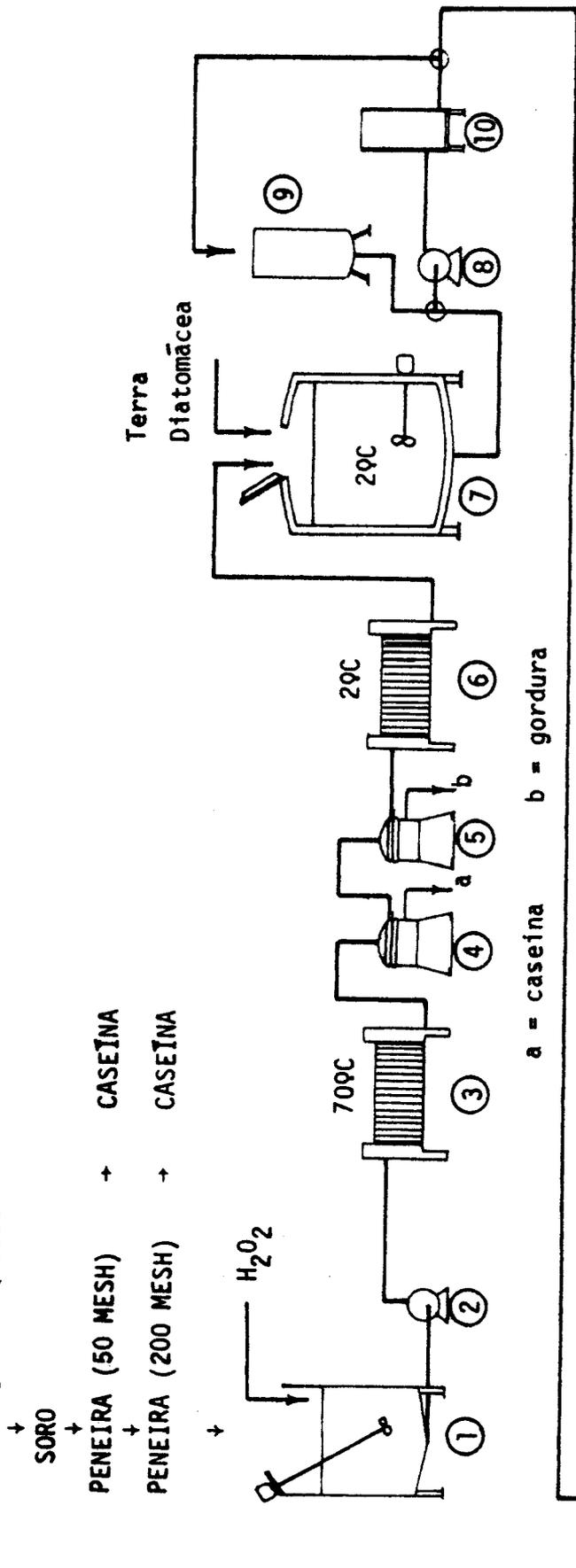
Para a recuperação das proteínas do soro de queijo tipo Minas, utilizou-se o processo patenteado por Malaspina e Moretti (1974). O fluxograma seguido é dado na Figura 2. O ultrafiltro foi utilizado com a configuração descrita por Moretti (1973) no esquema 4.

O teor de sólidos totais no concentrado apresentou uma leitura de 15,39 Brix com uma relação de sólidos totais para proteína igual a 1,61. A quantidade de água utilizada, para permitir uma maior eliminação de lactose e sais, correspondeu a 27% do volume inicial de soro. Sem a adição desta quantidade de água não é possível atingir a concentração final de aproximadamente 65% de proteína na base seca.

3.2.9. Teste de estabilidade das proteínas do soro de queijo

Um volume de 100 ml de concentrado com 6 a 8% de (N x 6,38) foi dissolvido com água destilada até se obter 200 ml de solução, ajustando-se o pH com NaOH até 7,3-7,5. A solução foi agitada e centrifugada a 10.000 x g. Eliminado o sobrenadante, o precipitado foi dissolvido com água a pH 7,3-7,5. Repetidos o processos de centrifugação e eliminação do sobrenadante, o precipitado foi resuspenso em 5 ml de água a pH 7,3-7,5. Verificou-se então que, com a absorvância a 600 nm menor que 0,10, a proteína era estável e, com a absorvância maior que 0,15, instável ou parcialmente desnaturada. Para testar a estabilidade das proteínas recuperadas de soro em pó, procedeu-se da mesma maneira, dissolvendo previamente o soro a uma concentração de 6 a 8% de proteína com água a pH 7,3.

FABRICAÇÃO DE QUEIJO



Moretti (1973)

Fig. 2. FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO PARA RECUPERAÇÃO DE LACTOALBUMINA DE SORO DE QUEIJO.

FLUXOGRAMA DO SISTEMA PARA RECUPERAÇÃO DE
LACTOALBUMINA DE SORO DE QUEIJO

1. TANQUE DE RECEPÇÃO DO SORO
2. BOMBA CENTRÍFUGA
3. INTERCAMBIADOR DE CALOR DE PLACAS - AQUECIMENTO POR VAPOR
4. CLARIFICADORA
5. DESNATADEIRA
6. INTERCAMBIADOR DE CALOR DE PLACAS - RESFRIAMENTO POR ÁGUA GELADA
7. TANQUE ISOTÉRMICO COM AGITADOR
8. BOMBA CENTRÍFUGA
9. TANQUE PARA "PRÉ CAPA" DO FILTRO
10. FILTRO
11. TANQUE ISOTÉRMICO C/ AGITADOR
12. BOMBA CENTRÍFUGA
13. INTERCAMBIADOR DE CALOR DE PLACAS - AQUECIMENTO POR ÁGUA QUENTE
14. UNIDADE DE ULTRAFILTRAÇÃO "HAVENS"
15. INTERCAMBIADOR DE CALOR DE PLACAS - RESFRIAMENTO POR ÁGUA GELADA
16. TANQUE ISOTÉRMICO COM RESFRIAMENTO POR ÁGUA GELADA.

3.2.10. Fracionamento das proteínas em gel de poliacrilamida

Utilizou-se o método de eletroforese de disco em gel de poliacrilamida, de acordo com Davis (1964).

3.2.11. Determinação dos pesos moleculares das frações proteicas do soro de queijo ultrafiltrado por dodecilsulfato de sódio-gel de poliacrilamida.

Foi utilizado o método proposto por Weber e Osborn (1969), seguindo-se o procedimento de Shapiro et al. (1967). Como proteínas-padrão para a elaboração da curva foram utilizadas a albumina de ovo, a albumina bovina, a tripsina e a lisosima.

3.2.12. Ensaio Biológico

Para a determinação do valor biológico das proteínas recuperadas do soro de queijo pelo processo da ultrafiltração, utilizou-se o quociente de eficiência protéica (PER) em testes com ratos da raça "Whistar" recém desmamados, alimentados com a proteína em questão como fonte protéica em uma das rações, utilizando-se a caseína como padrão referência na outra ração. Os animais, em número de 6 para cada teste, foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração "ad libitum".

A composição centesimal das dietas utilizadas para o teste está especificada no Quadro 4.

Quadro 4. Composição Centesimal das Dietas Utilizadas nos Ensaio
Biológicos.

Componentes	Porcentagem
Proteína (Proveniente da lactoalbumina recuperada por ultrafiltração)	10
Óleo de Soja Comercial (Primor)	8
Mistura de sais minerais (Rogers et al., 1965)	5
Mistura de vitaminas ((Werner, 1962) x 2)	2
Sacarose (União)	25
Amido de milho (Refinações de Milho Brasil Ltda)	<u>50</u>
	100

Da porcentagem de açúcar e gordura da dieta foram descontadas as existentes na proteína do soro de queijo ultrafiltrado.

3.2.13. Classificação por malha e teor protéico de frações de farinha de soja desengordurada

A farinha de soja desengordurada foi separada em frações, através de peneiragem em vibrador tipo PRODUTEST, utilizando-se peneiras

de 35, 48, 65, 100 e 200 mesh. As frações assim separadas foram analisadas quanto ao teor em proteínas e foram também pesadas para cálculo da porcentagem retida em cada malha. As condições da peneiragem foram as seguintes:

quantia da amostra: 100 gramas
Vibração: 100 por segundo
tempo: 10 minutos

3.2.14. Extração de proteínas de farinha de soja desengordurada a pH 8,5

As frações obtidas por peneiragem foram suspensas em água, com o pH final ajustado a 8,5 com NaOH, na proporção de 10 partes de farinha para 90 partes de água.

As temperaturas das suspensões variaram de 60 a 90°C e o tempo de agitação lenta foi de 15 minutos. Após essa agitação, a suspensão foi centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi pesado e determinou-se o teor de nitrogênio total.

3.2.15. Determinação da atividade das enzimas proteolíticas

A determinação da atividade das enzimas proteolíticas foi realizada segundo o método de Whitaker (1971).

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

e pH 3,0 em um minuto de incubação.

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

3.2.16. Processo da digestão enzimática da farinha de soja desengordurada, para prova sensorial

Uma suspensão de 4 g de farinha de soja desengordurada em 180g de água destilada, com pH final ajustado a 3,0 com HCl, foi inicialmente mantida em banho-maria a 42°C, durante 30 minutos, para em seguida ser adicionada das enzimas a serem estudadas.

Foram preparadas suspensões de 2% de enzimas em relação à proteína da amostra, em 3 ml de água destilada.

As amostras de farinha de soja em suspensão eram colocadas em Erlenmeyers de 500 ml, que, por sua vez, eram colocados num agitador-estufa regulado para 40°C. Cada amostra era então adicionada da suspensão de enzima previamente preparada, com o agitador-estufa regulado para 125 rpm.

As enzimas utilizadas neste experimento foram Denapsin, Molsin e Fúngica. A digestão foi conduzida por 6 horas e amostras foram retiradas a 0, 10, 30, 60, 120, 240 e 360 min.

Durante a digestão ocorreu uma mudança do pH em torno de 0,2; esta variação foi desprezada por apresentar influência insignificante na atividade das enzimas. Soluções-tampão não foram utilizadas,

pelo inconveniente de conferirem sabor às amostras.

As amostras retiradas eram acertadas a pH 5,0 com NaOH e colocadas em banho de água fervente por 15 minutos para inativar as enzimas; eram então centrifugadas. Os sobrenadantes eram comparados com o controle incubado sem enzima. As intensidades de sabor do feijão cru, amargo e adstringente, foram descritos por um painel de seis provadores, que deram notas de 0 a 3, com o seguinte critério (Scheffee, 1952):

- 0 - Sabor insignificante
- 1 - " muito fraco
- 2 - " não muito forte
- 3 - " forte

3.2.17. Processo de digestão enzimática de farinha de soja de sengordurada para determinação da curva de hidrólise e curva de destruição do fator antitripsina.

Uma suspensão de 20 g de farinha de soja desengordurada em 180 g de água destilada com pH ajustado a 3,0 com HCl, foi inicialmente mantida em banho-maria a 42°C por 30 minutos, para em seguida ser adicionada das enzimas a serem estudadas.

Foram preparadas suspensões de 2% de enzimas em relação à proteína da amostra, em 3 ml de água destilada.

As amostras a 42°C foram colocadas em agitador-estufa, regulado a 40°C e 125 rpm. Adicionou-se a suspensão de enzima e a incubação foi conduzida por quatro horas. As enzimas estudadas foram as seguintes:

tes:

- 1 - Denapsin
- 2 - Molsin
- 3 - Fúngica

Além das enzimas separadas, foram feitos ensaios com a mistura delas, nas seguintes proporções:

- 4 - 33% Denapsin, 33% Molsin, 33% Fúngica
- 5 - 50% Denapsin, 50% Molsin
- 6 - 50% Denapsin, 50% Fúngica

Amostras foram retiradas a 0, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min.

3.2.18. Determinação do grau de hidrólise durante a incubação com enzimas

As amostras retiradas das suspensões de farinha em incubação com as enzimas citadas no item 3.2.17 foram de 5 ml, sendo que 4 ml foram adicionados de 6 ml de TCA-5%. Os 10 ml resultantes foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 1. O filtrado foi diluído na proporção de 3:97 em água destilada e procedeu-se à leitura da absorbância a 280 nm.

Uma curva padrão foi estabelecida com um hidrolisado de quatro horas, diluído duas, quatro, seis e oito vezes, após a precipitação com Ácido Tricloroacético (TCA)-5%, da maneira anteriormente descrita. A leitura da absorbância foi feita também a 280 nm. Paralelamente

te, determinou-se o nitrogênio total da mesma amostra pelo processo Micro-Kjeldahl.

3.2.19. Determinação do fator antitripsina residual durante a incubação com as enzimas.

A digestão de farinha de soja desengordurada foi conduzida de acordo com o procedimento 3.2.17.

Após 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min foram retiradas amostras, das quais 0,2 ml foram pipetados e diluídos em 25 ml de solução tampão fosfato - 0,1 M com pH 7,6.

Em tubos de ensaio (1,2 x 15 cm), onde havia sido previamente colocado 1 ml de solução de tripsina (40 mg/l de tampão fosfato - 0,1 M - pH 7,6), foi adicionado 1 ml da amostra anteriormente diluída; após um processo de agitação, adicionaram-se 2 ml de solução de caseína a 2%. A mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos.

A reação foi interrompida com 6 ml de TCA-5%, e procedeu-se à filtração em papel de filtro Whatman nº 1; fez-se então a leitura a 280 nm contra um branco, no qual o TCA fora adicionado antes da amostra.

3.2.20. Avaliação da distribuição dos pesos moleculares

A filtração em Gel-Sephadex foi utilizada para determinar simultaneamente os pesos moleculares das frações protéicas e os polipeptídeos nas amostras de proteína original de farinha de soja desengordurada e do hidrolisado da mesma proteína após 4 horas de digestão.

Porath e Bennich (1962), e Andrews (1964) estudaram essa aplicação para determinar pesos moleculares de proteínas individuais, mas a de terminação de pesos moleculares de uma mistura de proteínas na mes ma amostra aparentemente não foi estudada. Presumivelmente, a distri buição de pesos moleculares num hidrolisado enzimático de proteínas de soja após 4 horas de incubação deve variar de 100 (aminoácidos li vres) até mais de 100.000 (proteínas intactas). O seguinte método foi desenvolvido: cinco colunas de vidro, cada uma com 1,2 cm de diâme tro interno e 30 cm de altura, com filtro de vidro poroso na parte inferior, foram combinadas em série. Sephadex G-100, 75, 50, 25 e 10, em solução tampão fosfato, foram acondicionados nessas colunas em ordem decrescente. O tampão fosfato utilizado foi 0,0325 M K_2HPO_4 - 0,0026M KH_2PO_4 - 0,40M NaCl, pH 7,6 e força iônica 0,5. O hidrolisado (1 mg) foi aplicado e eluído com o mesmo tampão sob pressão hidrostática de 1 m. O fluxo foi ajustado a 0,2 ml/min e cada amostra de 3 ml era co letada. Cada fração era em seguida adicionada de 3 ml de HCl concen trado, hidrolisada por trinta horas em água em ebulição e submetida à reação de ninhidrina.

3.2.21. Digestão péptica e tríptica "in vitro"

Os hidrolisados enzimáticos de farinha de soja, desengordurada a 0 e a 4 horas, foram utilizados como substrato. As amostras foram centrifugadas e filtradas para eliminação dos insolúveis da farinha. O filtrado foi ajustado a 1% de proteína equivalente (N x 6,25) e adicionado de pepsina ou tripsina, que constituíram 1% do substrato (N x 6,25). Os pH foram ajustados a 1,6 com HCl para a digestão pép

tica e a 7,6 com NaOH para a digestão triptica. A incubação desenvolveu-se a 37°C com agitação vigorosa. Foram utilizadas enzimas pepsina de estômago bovino e tripsina de pâncreas bovino, com atividade 1:10000 (unidades BAEE/mg), obtidas da Sigma Chemical Co.

Em cada hidrolisado foi adicionado volume equivalente de TCA a 20%; a amostra solúvel resultante foi analisada quanto a seu teor em nitrogênio. O teor de nitrogênio na fração solúvel, em relação ao teor total de nitrogênio no hidrolisado original foi considerado o grau de hidrólise.

3.2.22. Atividade de lipoxigenase

Amostras às 0 horas, 2, 4 e 8 foram retiradas da farinha de soja desengordurada, em digestão por Denapsin, e serviram como substrato. A atividade de lipoxigenase foi medida de acordo com o método proposto por Surrey (1964). Paralelamente, uma amostra adicionada de lipoxigenase foi preparada, com 1 mg de lipoxigenase de soja comercial (8000 unidades/mg de proteína) em 10 g de proteína da farinha incubada de maneira semelhante à Denapsin. A vários intervalos do tempo de incubação, amostras de 2 ml foram retiradas e sua atividade de lipoxigenase foi medida.

3.2.23. Determinação da quantidade de Denapsin e tempo de diges tão em relação ao efeito de desodorização do extrato hi drolizado de farinha de soja desengordurada

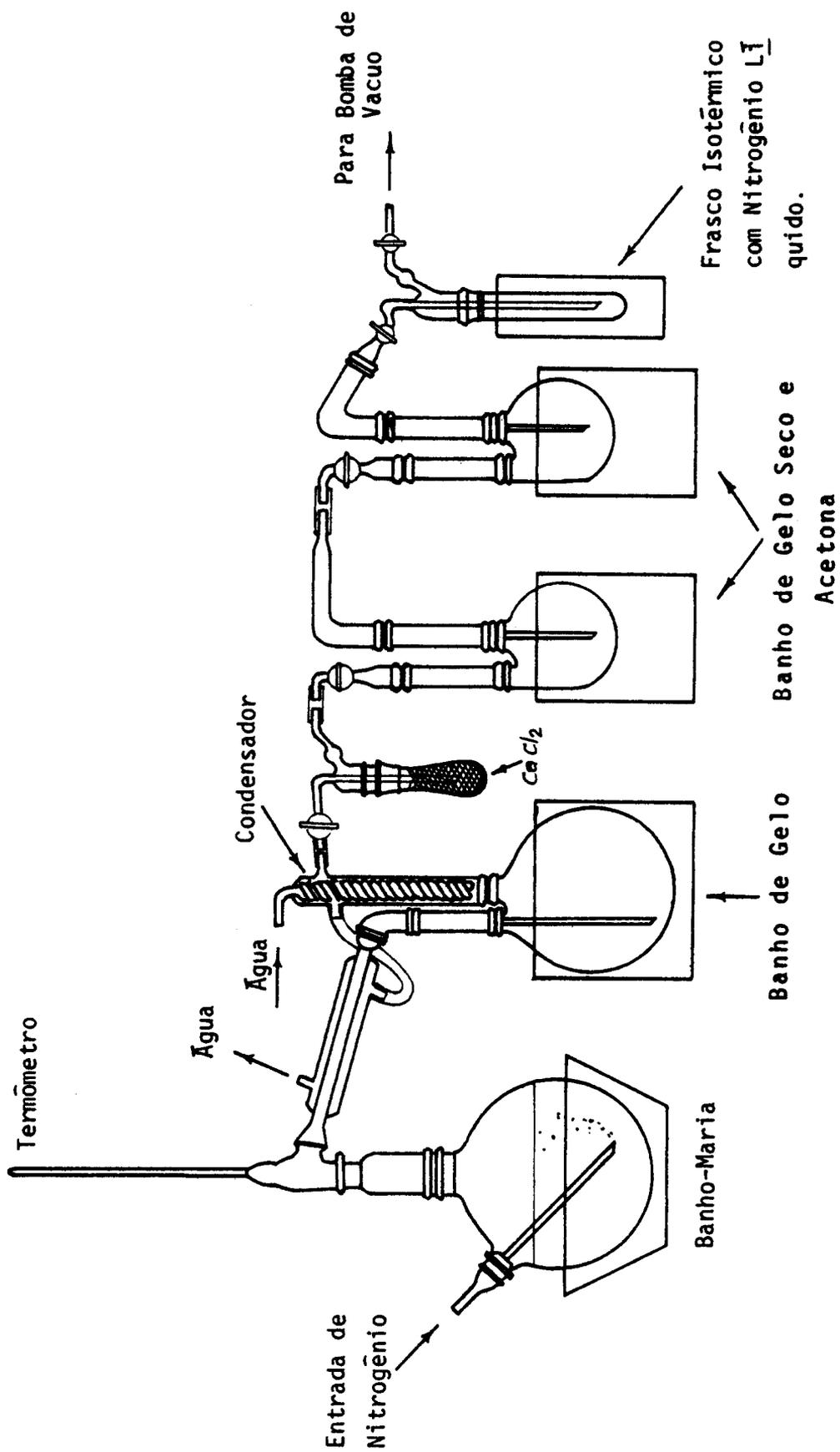
Foram tomados 20 g de farinha de soja desengordurada, tratadas

com 900 ml de HCl diluído (pH 1,5) por duas horas a 30°C e levados a centrifugação. O extrato assim obtido teve seu volume acertado para 100 ml, com ajuste de pH para 3,0, com NaOH diluído e digerido com quantidades variáveis de Denapsin a 40°C (0, 50, 250, 500 e 1000 mg de Denapsin por cada 100 g de farinha).

O extrato preparado, conforme descrito anteriormente, foi incubado com as diferentes quantidades de Denapsin num frasco de fundo redondo (Fig. 3) com duas aberturas. Nitrogênio foi admitido por uma das aberturas, borbulhando no extrato, arrastando as substâncias voláteis liberadas. Esses voláteis foram conduzidos através da outra abertura para uma série de garrafas imersas, respectivamente, em banho de gelo, banho de gelo seco e acetona e nitrogênio líquido. O produto condensado foi submetido a cromatografia de gás; o n-Hexanal e o n-Hexanol foram identificados de acordo com o método que utiliza 10% de carbowax 6000, acondicionado em uma coluna (0,3 x 200 cm), à temperatura de 80°C, usando nitrogênio a um fluxo de 30 ml/min. A detecção foi feita por ionização de chama de nitrogênio. A determinação foi feita medindo-se as áreas sob os picos, calibrados por soluções-padrão de n-Hexanal e n-Hexanol.

3.2.24. Comparação das quantidades de substâncias redutoras vo
lâteis liberadas, n-Hexanal, n-Hexanol e do sabor duran
te a incubação de farinha de soja desengordurada (F.S.D.)
com e sem Denapsin.

Para cada teste foram usados 100 g de farinha de soja desengordurada, preparada da mesma forma que no item 3.2.23 e incubada com 1%



Mattick & Hand (1969)

Fig. 3. SISTEMA DE RECUPERAÇÃO DE VOLÁTEIS DE FARINHA DESENGORDURADA DE SOJA HIDROLISADA COM DENAPSIN.

de Denapsin na base da proteína contida na amostra.

O n-Hexanal e o n-Hexanol foram determinados a intervalos de 1 hora, durante 4 horas de incubação, de acordo com o método descrito no mesmo item.

O sabor foi avaliado conforme descrito em 3.2.16, também a intervalos de uma hora.

A quantidade total de substâncias redutoras voláteis liberadas durante a incubação foi medida segundo o método de Farber et al. (1956) e Mattick e Hand (1969); este, no entanto, sofreu algumas modificações. Conforme o descrito no item 3.2.23, as substâncias voláteis redutoras, arrastadas pelo nitrogênio, foram conduzidas a uma série de dois retentores contendo, respectivamente, 10 ml de KMnO_4 -0,1N e NaOH-1N. As substâncias voláteis redutoras retidas foram contra-tituladas com solução padronizada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, para que se pudesse medir a quantidade de KMnO_4 consumido.

3.2.25. Hidrólise enzimática de farinha de soja desengordurada em escala piloto

Oito quilos de farinha de soja desengordurada foram suspensos em 72 kg de água com pH final ajustado para 3,0 com HCl. Essa suspensão foi realizada num tacho basculante com camisa de vapor, com capacidade para 120 litros e munido de agitador tipo âncora. A mistura foi inicialmente aquecida a 41°C; em seguida, adicionou-se uma suspensão de Denapsin em quantidade equivalente a 1% do total de proteínas no tacho.

Fez-se incubação a 40°C durante cinco horas com agitação cons

tante. Decorrido o tempo predeterminado, aqueceu-se a mistura até 95°C durante dez minutos, para paralisar a reação enzimática.

Centrifugou-se a mistura numa centrífuga horizontal super-decantadora "Sharples", concentrando-se o centrifugado num evaporador "Centri-Term CT-1B-Alfa Laval" a 44°C, até a concentração final de 50° Brix.

O concentrado foi analisado quanto a:

- a) concentração de proteínas (N x 6,25)
- b) pH
- c) sólidos solúveis totais
- d) acidez total
- e) viscosidade aparente
- f) sabor (1,5% proteína - (N x 6,25)) a pH 3,5)

3.2.26. Viscosidade

A determinação de viscosidade aparente foi realizada por meio de um viscosímetro Ostwald, segundo método descrito por Cannon e Fenske (1938); os resultados foram expressos em centistokes.

3.2.27. Avaliação do rendimento de extração de proteínas de soja das diferentes amostras hidrolisadas

O rendimento de extração de proteínas de soja das diferentes amostras hidrolisadas pelo processo "batch", ou pelo processo do reator enzimático ultrafiltrante, foi determinado da seguinte maneira:

A quantidade inicial de proteína existente na matéria prima (N x 6,25) utilizada foi considerada como 100%. Após o processo de hidrólise, o líquido filtrado obtido foi pesado e seu teor de nitrogênio analisado; o resultado foi multiplicado pelo fator 6,25; este valor final foi então relacionado com o valor inicial de proteína na amostra, em base de porcentagem, o que constituiu o rendimento de extração.

1. Para o caso de hidrólise enzimática pelo processo "batch", duas maneiras de recuperação das proteínas hidrolisadas foram utilizadas:

a) O produto hidrolisado foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1, sendo em seguida pesado e seu teor de nitrogênio determinado.

b) O produto hidrolisado foi tratado como em a, porém o precipitado resultante da centrifugação foi lavado com água na quantidade equivalente a 33,3% do peso original do produto hidrolisado. Após nova centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos, o sobrenadante foi juntado ao da primeira centrifugação e ambos foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 1. O filtrado final foi analisado quanto ao seu teor de nitrogênio e pesado.

2. Para o caso de hidrólise enzimática no reator ultrafiltrante, o rendimento foi calculado na base da relação porcentual do total de nitrogênio, multiplicado por 6,25, existente no permeado, e a quantidade total de nitrogênio existente na amostra colocada no reator.

3. Quando o isolado protéico de soja foi usado como matéria prima, considerou-se um rendimento de extração inicial para produção do isolado de 30% em relação à farinha de soja desengordurada utilizada.

3.2.28. Determinação dos aminoácidos nas amostras de proteínas e nos seus respectivos hidrolisados

1. Preparo das amostras

1.1. Isolado protéico de soja; foi utilizado o produto Proteimax -90, descrito no item 3.1.1.

1.2. Farinha de soja desengordurada; foi utilizado o produto da SAMRIG, descrito no item 3.1.1.

1.3. Proteína de soro de queijo; foi utilizado o produto obtido por Moretti (1973), descrito no item 3.2.8.

1.4. Hidrolisado protéico de farinha de soja desengordurada; obtido pelo processo "batch", descrito no item 3.2.25, e liofilizado até umidade final de 2,8%.

1.5. Hidrólise de farinha de soja desengordurada em reator enzimático ultrafiltrante.

Duzentas e quarenta gramas de farinha desengordurada de soja foram suspensos com 1.800 g de água com o pH final ajustado a 8,50 com NaOH. Após agitação vigorosa, a suspensão foi centrifugada a 1500 rpm, durante dez minutos. O sobrenadante teve seu pH ajustado para 3,0 com HCl e sua temperatura para 40°C. Adicionou-se 4% de enzima Denapsin em relação à proteína do sobrenadante, previamente determinada.

Incubou-se por quatro horas a 40°C no reator enzimático ultra

filtrante, recolhendo-se o ultrafiltrado, que era eliminado por vácuo a uma pressão absoluta de $0,3 \text{ kg/cm}^2$. A cada intervalo de trinta minutos, repunha-se a quantidade equivalente ao volume de permeado que era recolhido.

A concentração deste material de reposição foi de 1,5% de proteína da mesma matéria prima, a pH 3,0.

Evaporou-se o permeado num evaporador rotativo até a concentração de 30% de sólidos. Efetuou-se então a desidratação, por meio de um liofilizador, até a umidade final de 3,0%.

1.6. Hidrolisado protéico de proteína isolada de soja; obtido pelo processo "batch", descrito por Pezoa, (1973) e liofilizado até umidade final de 2,8%.

1.7. Hidrolisado protéico de proteína isolada de soja; obtido pelo processo de reator enzimático ultrafiltrante, descrito por Pezoa (1975) e liofilizado até umidade final de 2,8%.

1.8. Soro de queijo em pó; obtido por concentração de soro doce de queijo tipo Minas em evaporador Centri-term CT-IB até 50º Brix, e por secagem em secador "spray" Niro Atomysen - modelo "production minor" - com umidade final do pó de 3%.

2. Hidrólise das proteínas

Todas as amostras foram hidrolisadas na base de 12 mg de nitrogênio para 300 ml de HCl-6N (Mauron, 1973), sob atmosfera de nitrogênio (Dustin et al., 1953), durante vinte e quatro horas, a 110°C.

3. Determinação do aminograma

A amostra hidrolisada pelo HCl foi evaporada sob vácuo a 40-45°C num evaporador rotativo até ficar quase seca e o excesso de ácido ter sido removido por três reevaporações após adições de água. A amostra foi finalmente diluída com tampão apropriado para um volume conhecido, e alíquotas foram removidas para determinação de nitrogênio e do aminograma.

O analisador de aminoácidos utilizado foi o Beckman, modelo 119C.

3.2.28. Determinação do poder tamponante dos produtos protéicos desenvolvidos

As proteínas recuperadas do soro de queijo, o próprio soro de queijo em pó, e as proteínas de soja hidrolisadas pelos diferentes procedimentos, foram analisadas quanto ao seu poder tamponante.

Conhecida a composição centesimal dos produtos, tomou-se uma quantidade de cada amostra, equivalente a 0,173 g de proteína. Diluiu-se com 20 ml de água destilada, e procedeu-se à titulação com NaOH-0,1N, traçando-se uma curva de titulação do pH original até o pH 6,5, anotando-se as variações de pH a cada 0,5 ml de NaOH-0,1N adicionado.

3.2.29. Formulação da mistura de proteínas de soro de queijo com proteínas de soja hidrolisadas

Tomou-se como base a proteína referência FAO/OMS-1973 para esco

lares de dez a doze anos.

Com base nos aminogramas das respectivas amostras, verificou-se qual foi o aminoácido limitante no hidrolisado enzimático em relação à proteína referência FAO/OMS-1973, uma vez que as proteínas de soro de queijo sempre apresentaram um aminograma superior a essa referência.

Verificou-se qual a quantidade do aminoácido limitante que existia em 10 g da amostra de proteína hidrolisada. A quantidade que faltava para completar a recomendada pela FAO/OMS-1973 foi suplementada pela proteína recuperada de soro de queijo.

Em seguida foram calculadas as porcentagens em que cada uma das proteínas deveria entrar na mistura para satisfazer as exigências da proteína referência.

Uma vez conhecidas as porcentagens de cada proteína na mistura, efetuou-se o cálculo para determinação do total da mistura que deveria entrar numa porção de 260-300 ml de refrigerante para satisfazer a 15% das necessidades diárias de uma criança de dez a doze anos com peso médio de 35 kg.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO DE QUEIJO

4.1.1. Características do soro de queijo e sua pasteurização

Os soros utilizados neste trabalho foram resultantes da fabricação de queijo tipo Minas, apresentando a seguinte composição média:

Proteína (N x 6,38)	- 0,60 %
Cinzas	- 0,70 %
Lactose	- 4,70 %
Gordura	- 0,20 %
Contagem Microbiológica	- 10^7 /ml

Estes resultados aproximam-se bastante dos obtidos por Reyna et al. (1975) para soro de massa mole, tipo queijo Minas.

Após a recepção do soro foram efetuados os tratamentos de pasteurização a 70°C, por sessenta segundos, e de resfriamento, a 2°C. Conseguiu-se com esta pasteurização uma redução na contagem total de microrganismos de 10^7 para 10^3 a 10^4 . Os soros pasteurizados foram aquecidos a 38°C e assim mantidos durante vinte horas, efetuando-se contagens totais a intervalos de uma hora. Os resultados são apresentados no quadro 5.

Quadro 5. Contagem Microbiológica no Soro após Pasteurização a 70°C por um minuto. (colonias/ml)

Horas	Contagem	Horas	Contagem
1	2×10^3	11	2×10^3
2	2×10^3	12	2×10^3
3	2×10^3	13	3×10^3
4	2×10^3	14	3×10^3
5	2×10^3	15	2×10^3
6	2×10^3	16	5×10^3
7	2×10^3	18	7×10^3
8	2×10^3	18	3×10^4
9	2×10^3	19	6×10^5
10	2×10^3	20	3×10^7

Conforme pode ser observado, o tratamento de pasteurização efetuado não destruiu os microrganismos totalmente, mas satisfaz as necessidades do processo, ou seja, preservar o soro à temperatura de 38°C por tempo suficiente para operar posteriormente o equipamento de ultrafiltração, antes de interromper o processo para limpeza e sanitização.

Desta forma conseguiu-se operar o sistema de ultrafiltração durante 20 horas, sem necessidade de limpeza e sanitização.

4.1.2. Filtração do soro

O soro refrigerado a 29°C foi filtrado através de filtro de aço inox (Laredo) com auxílio de terra diatomácea Dicalite (Hyflo Super cel). Mediu-se o conteúdo de gordura antes e depois da filtração, constatando-se que o processo de filtração reduziu o teor de gordura de 0,1 para 0,03%. A mesma filtração, efetuada à temperatura de 38°C, resultou num filtrado com o mesmo teor inicial de gordura, o que mostrou a vantagem de se colocar o filtro logo após a refrigeração a 29°C, e não imediatamente antes da unidade de ultrafiltração, quando o soro já está aquecido a 38°C. O menor teor de gordura no soro permite uma operação do ultrafiltro com grandes fluxos de permeado por tempo mais longo, sem ocorrência de entupimentos.

4.1.3. Ultrafiltração do soro

4.1.3.1. Influência da Temperatura

Foram realizados testes de ultrafiltração a temperaturas de 5, 15 e 38°C. Os resultados de fluxo de permeado na mesma área ultrafiltrante mostraram um aumento proporcional ao aumento de temperatura do soro. O quadro 6 mostra os resultados de permeação a diferentes temperaturas.

Como pode ser observado, o fluxo de permeado aumenta significativamente com o aumento da temperatura. O limite de 38°C foi estabelecido em função da resistência do acetado de celulose, que, em temperaturas superiores, tende a diminuir sua porosidade, o que resulta

Quadro 6. Fluxo de permeado em função da temperatura do soro

Temperatura do soro em °C	Fluxo de permeado ($\ell/m^2 \times hr$)
5	6,75
15	9,82
38	17,88

numa diminuição de fluxo de permeado, tornando o processo anticonô
mico.

Estes resultados também foram obtidos por Fenton May et al., 1971, trabalhando com soro de queijo tipo "Cheddar".

4.1.3.2. Influência do grau de diluição com água

O soro previamente diluído com água e ultrafiltrado até a con
centração máxima de proteínas. As quantidades de água usadas na di
lução foram 7,8, 9,4, 13,8 e 27,0% em relação ao soro original. O fator limitante da concentração foi a pressão máxima permitida pelo ultrafiltro, que era de $20,0 \text{ kg/cm}^2$. O quadro 7 mostra a influência da quantidade de água na porcentagem final de proteínas no concentra
do.

Como se pode verificar, o aumento da diluição com água permite uma maior eliminação de lactose e sais no permeado, contribuindo

Quadro 7. Influência da quantidade de água na diluição do soro, na concentração máxima de proteína conseguida no ultrafiltrado.

% de água	% de proteína no produto desidratado
7,8	40,1
9,4	45,9
13,8	53,5
27,0	62,0

para uma maior concentração relativa de proteínas. Convém ressaltar que o limite máximo da concentração de proteínas no produto girou sempre em torno de 9%, independentemente da concentração dos outros componentes. Isto é explicável devido ao fato de a proteína conferir ao soro a característica de líquido não newtoniano.

4.1.4. Secagem do Concentrado

O soro concentrado pelo ultrafiltro foi desidratado em "secador spray" APV, até umidade final de 3%. O secador foi alimentado por um concentrado, que apresentou uma concentração com 15 a 16% de sólidos solúveis. O produto desidratado nessas condições apresentou uma densidade aparente de 0,18.

4.2. CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS RECUPERADAS

4.2.1. Composição centesimal

O produto desidratado apresentou a seguinte composição centesimal média:

	%
Proteína (N x 6,38)	61,98
Lactose	27,78
Cinzas	3,35
Gordura	1,88
Umidade	3,25

A relação entre sólidos totais e proteínas foi de 1,53, enquanto que o soro original apresentou uma relação igual a 10, o que significou um aumento na concentração relativa da proteína equivalente a 6,66 vezes.

Um soro equivalente ao original, quando desidratado sem sofrer a ultrafiltração, apresentou a seguinte composição:

	%
Proteína (N x 6,38)	9,5
Lactose	75,2
Sais	11,2
Gordura	0,8
Umidade	3,0

O processo de ultrafiltração permitiu a obtenção de um produto

desidratado bem mais concentrado em proteínas, com teores bem reduzidos de lactose e sais, que são geralmente indesejáveis na formulação de bebidas ácidas; os sais, porque conferem ao produto um maior poder tamponante, que será discutido num próximo item, e a lactose porque muitas vezes pode não ser tolerada por certos grupos de consumidores, que apresentam deficiência em lactase.

Outro fator bastante interessante é a diminuição de peso e volume do produto, para as mesmas quantidades de proteína, o que viabiliza a sua utilização na formulação de refrigerantes, sob a forma de concentração produzido numa indústria central para posterior distribuição em todo o país.

4.2.2. Estabilidade das proteínas

O produto resultante do processo de ultrafiltração foi testado quanto à estabilidade em solução, tanto na forma de concentrado como na forma já desidratada.

O processo desenvolvido permitiu a obtenção de produtos bastante estáveis, que, quando utilizados em bebidas refrigerantes ácidas, não precipitavam após o engarrafamento.

O teste de estabilidade desenvolvido, apresentado no item 3.2.9 mostrou os resultados do quadro 8.

Segundo Moretti (1973) estes são produtos de ótima estabilidade, visto que o limite da absorbância a 660 nm, para produtos estáveis, era de 0,10. Somente produtos com absorbância de 0,15 a 660 nm foram considerados instáveis; quando utilizados em refrigerantes com pH 3,0, precipitavam na garrafa.

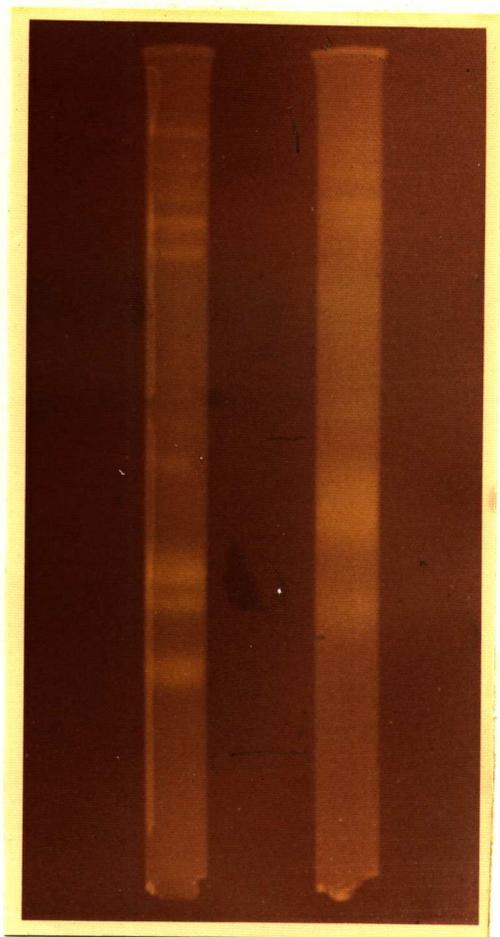
Quadro 8. Teste de Estabilidade das proteínas de soro de queijo.

Produto	Absorbância a 660 nm
Concentrado	0,03
Desidratado	0,04

4.2.3. Frações protéicas obtidas por eletroforese de disco em gel de poliacrilamida

Os produtos desidratados após ultrafiltração, bem como o soro original, foram submetidos à eletroforese de disco segundo método de Davis (1962).

Os resultados da eletroforese do soro de queijo original, comparados com os resultados da eletroforese do concentrado por ultrafiltração, mostraram uma maior concentração de lactoglobulinas e α -lactoalbuminas e menor concentração de α -lactoglobulinas, no último produto. A distribuição das frações de proteínas do soro original coincidiu com a encontrada por Amundson et al. (1976) e Hidalgo et al. (1971). A foto 1 mostra a distribuição das frações protéicas do soro de queijo, original, e do concentrado por ultrafiltração.



A

B

Foto 1 - Distribuição das frações protéicas de soro de queijo original e do concentrado por ultrafiltração.

A: Soro original

B: Soro ultrafiltrado

4.2.4. Avaliação dos pesos moleculares das frações de proteínas do soro concentrado por ultrafiltração.

Foi empregado o método de Weber e Osborn (1969), utilizando-se lisosima, albumina de ovo, albumina bovina e tripsina como padrões. Foram obtidas cinco frações protéicas, com pesos moleculares diferentes:

<u>Frações</u>	<u>Peso molecular</u>
Caseína hidrolisada	86.000
Albumina de soro sanguíneo	62.000
α -lactoglobulina	31.000
β -lactoalbumina	17.000
Polipeptídeos	14.300

Efetuuou-se também o mesmo experimento com o soro de queijo original liofilizado, encontrando-se onze frações com pesos moleculares variando de 8.000 a 130.000. As frações de peso molecular inferior a 12.000 foram perdidas juntamente com o permeado, enquanto que as frações de peso molecular mais elevado, provavelmente as α -lactoglobulinas, foram desnaturadas pelo processo de pasteurização.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Amundson et al. (1976), que comprovaram além disto a presença de α -lactoalbumina e polipeptídeos nos permeados, o que também se verificou neste trabalho. Isto se deve ao fato de faixas de α -lactoalbumina e polipeptídeos das eletroforeses efetuadas no concentrado ultrafiltrado se

apresentarem bem mais claras que as do soro original. Ao mesmo tempo, o concentrado apresentou as faixas correspondentes à caseína hidrolisada, à albumina de soro e a β -lactoalbuminas bem mais escuras.

4.2.5. Poder tamponante do produto obtido e do soro original

A figura 4 mostra as curvas de titulação das mesmas quantias de proteína do soro original e do concentrado ultrafiltrado. Com a ultratrafiltração ocorre uma eliminação de sais, polipeptídeos e outros compostos de peso molecular baixo, que contribuem grandemente para o poder tamponante do soro original. Este fato, como citamos anteriormente, torna o produto ultrafiltrado bastante útil para a elaboração de refrigerantes, visto que, para a produção dos mesmos, há necesidade de grandes quantidades de ácidos orgânicos para baixar o pH do produto, quando se usa soro original. Uma vez ultrafiltrado, pequenas quantias de ácidos orgânicos são suficientes para baixar significativamente o pH do refrigerante.

Foram empregados 0,173 g de proteína para a elaboração da curva de titulação, porque esta é a concentração de proteínas encontrada em 10 ml de refrigerante por nós formulado. O resultado de acidez total é que expressa realmente a acidez mesmo no paladar, enquanto que o pH não tem muito influência no mesmo.

Para se elevar o pH da mesma quantidade de proteínas do soro original, foi necessária uma quantia 5 vezes maior de soda decinoral do que na titulação do soro ultrafiltrado.

Um refrigerante com 12 a 13% de açúcares, para ser aceitável quanto à acidez, deve gastar de 6 a 7 ml de NaOH-1N por 100 ml para

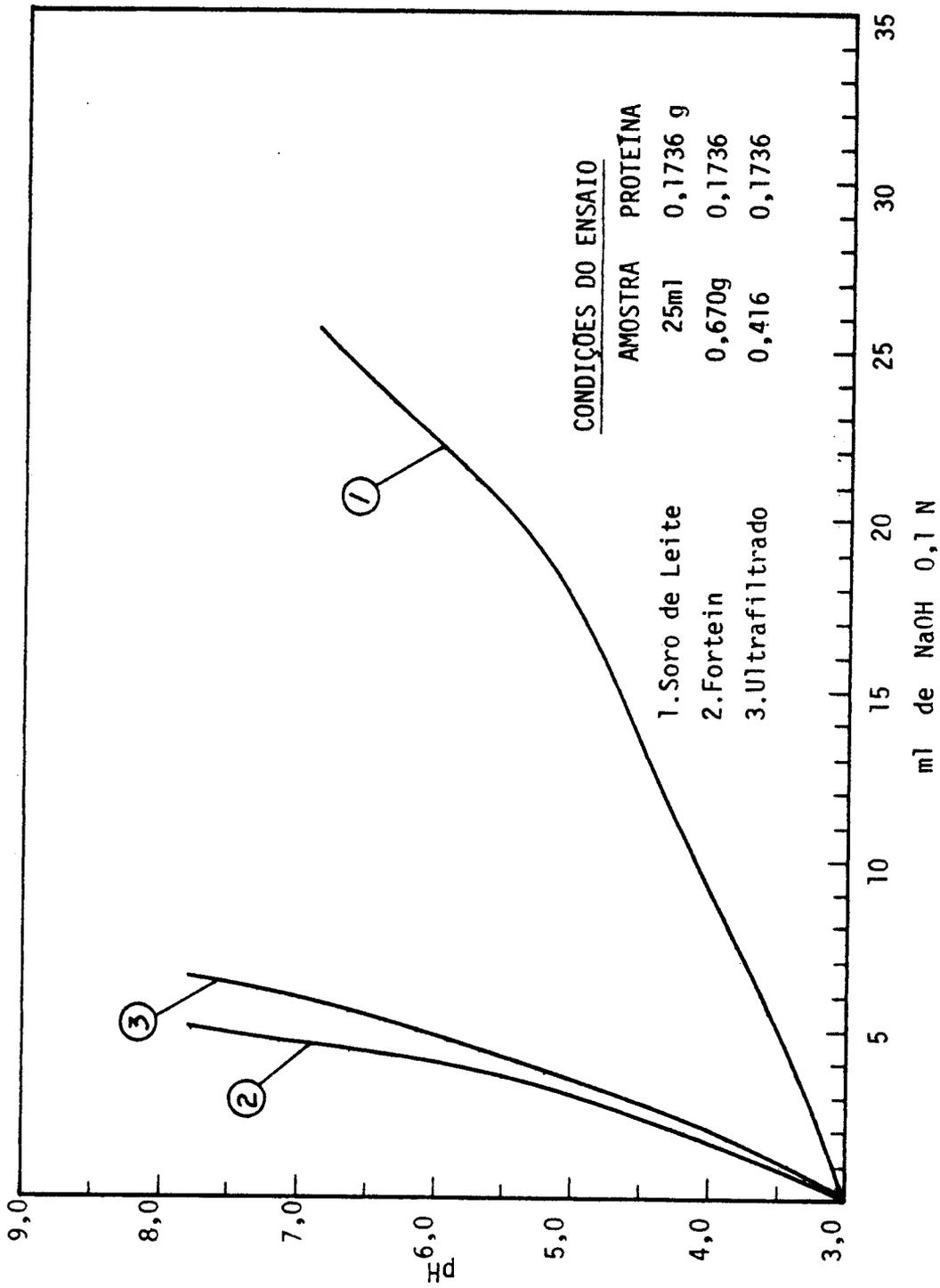


Fig. 4. CURVAS DE TITULAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SORO COM NaOH 0,1 N

e elevar seu pH para 7,0. Quando 100 ml de um refrigerante necessitam de 8,5 ml de NaOH-1N para elevar seu pH para 7,0, seu gosto ácido é inaceitável ao consumidor (Project Star-1970).

4.2.6. Teste biológico do soro ultrafiltrado em pó

O produto descrito em 3.1.1. foi testado na alimentação de ratos da raça "whistar" em crescimento, segundo o método citado no item 3.2.12.

Usando-se a caseína como padrão, e assumindo-se seu valor PER como 2,5, foi encontrado o valor 2,91 para as proteínas do soro de queijo concentrado por ultrafiltração, quando o pH era de 3,5. A mesma proteína de soro ultrafiltrado, porém com seu pH ajustado para 6,5, apresentou um valor PER de 3,5.

Os animais alimentados com a dieta contendo o produto ácido apresentaram durante todo o decorrer do teste uma diarreia não muito severa. Seu peso final foi igual a 93% do peso final dos ratos alimentados com caseína.

Os animais alimentados com a dieta de pH das proteínas previamente ajustado para 6,5, apresentaram um peso final equivalente a 120% do peso atingido pelos ratos alimentados com a dieta padrão. Durante todo o teste os animais tiveram uma saúde perfeita, com ausência completa de diarreia.

Uma vez que a dieta apresentou como fonte única de proteína o produto ácido, concluiu-se que a acidez muito elevada do produto provocou a diarreia nos ratos; ao mesmo tempo, fez com que o ganho de peso não fosse tão elevado, devido ao baixo consumo da ração. Enquanto

to que os ratos que consumiram a ração padrão ingeriram 203,5 g de proteína durante os 28 dias, os ratos testados com a dieta ácida ingeriram somente 163,85 g de proteína no mesmo período. Os animais alimentados com a proteína de soro com pH 6,5 consumiram 205 g de proteína durante o teste.

De qualquer maneira, o valor biológico das proteínas do soro ultrafiltrado apresentou-se bem superior ao valor biológico da caseína; trata-se, portanto, de uma matéria prima de alto valor nutritivo para complementar outras proteínas de origem vegetal, que apresentam um valor biológico inferior devido à deficiência de certos aminoácidos (Mueller e Cox, 1947).

4.2.7. Aminograma das proteínas de soro e do produto ultrafiltrado.

Os aminogramas dos produtos foram realizados conforme o descrito no item 3.2.27 de Material e Métodos.

Os resultados estão apresentados no quadro 9.

Conforme se pode observar, o processo de ultrafiltração resultou numa diminuição relativa dos aminoácidos essenciais, lisina, fenilalanina, e metionina, quando comparado com o mosto original, sendo que as maiores reduções ocorreram no teor de metionina e fenilalanina, o que se justifica pela maior perda de α -lactoalbumina; esta apresenta maiores teores de tirosina e fenilalanina quando comparada com a β -lactoglobulina, que apresenta os menores teores dos respectivos aminoácidos dentre todas as frações do soro. Este por sua vez apresentou maior concentração no produto oriundo de ultrafiltração.

Quadro 9. Aminogramas do soro de queijo liofilizado e do concentrado ultrafiltrado desidratado por secador "spray"

Aminoácidos	Soro de queijo origi nal liofilizado g/100 g prot.	Proteínas recuperadas por ultrafiltração g/100 g prot.
Ac. Aspártico	10.154	10.593
Treonina	4.895	6.000
Serina	4.350	4.183
Ac. Glutâmico	17.232	17.318
Prolina	4.210	4.191
Cistina	4.854	4.969
Glicina	1.793	1.812
Alanina	4.567	4.680
Valina	4.980	5.071
Metionina	2.265	2.082
Isoleucina	4.850	5.130
Leucina	11.477	11.555
Tirosina	2.894	2.919
Fenilalanina	3.511	3.457
Histidina	1.848	1.930
Lisina	10.500	10.002
Amônia	1.312	1.232
Arginina	2.541	2.520
Triptofano	2.522	2.415

4.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE SOJA

4.3.1. Solubilidade das proteínas em função da granulometria da farinha e temperatura de extração.

A farinha de soja desengordurada foi separada por peneiras e o teor de proteína em cada fração foi determinado, conforme mostra o quadro 10.

Quadro 10. Separação por peneiras da farinha desengordurada de soja e conteúdo protéico das frações.

Mesh	35	48	65	100	200	<200
Peso retido %	5,9	53,8	24,5	11,0	3,0	2,3
Proteína %	47,9	49,6	50,2	50,2	51,5	52,2

O maior teor de proteínas foi encontrado nas frações mais finas; isto vem mostrar que as proteínas da parte mais tenra do grão, o cotilédone, mais facilmente triturável que a casca, são separadas com maior facilidade que as da casca. Este teor aumenta à medida que as frações ficam mais finas.

As frações mais grossas, isto é, de 35 e 48 mesh, apresentaram maior teor de fibras e, portanto, menor concentração de proteínas.

Utilizando-se as mesmas frações num ensaio de extração de proteínas com água a pH 8,5, chegou-se ao resultado expresso no quadro 11.

Quadro 11. Rendimento da extração de proteínas de F.S.D. a diferentes temperaturas e tamanhos de partículas.

Malha	temperatura (°C)				
	50	60	70	80	90
35	43,2	45,7	43,0	39,9	40,2
48	50,5	52,5	48,8	45,7	43,0
65	55,8	60,4	58,3	54,2	51,4
100	60,3	69,9	65,3	59,7	62,0
200	68,5	75,5	68,4	64,6	64,1
< 200	75,8	83,5	76,1	73,5	68,4

Como pode ser observado, o menor tamanho de partícula, à temperatura de 60°C, possibilitou uma maior extração de proteínas; por outro lado, temperaturas mais baixas e mais altas que 60°C resultaram num decréscimo do rendimento de extração.

Estes resultados demonstram que, para se obter um maior rendimento econômico de extração, deve-se utilizar a temperatura de 60°C combinada a uma malha de 65 mesh, visto que essa fração constitui 40,8% do total da farinha. A solubilidade das proteínas da mistura das frações que passam por essa peneira foi de 65,3%, o que é bem superior à solubilidade das frações mais grossas, retidas no interior de células.

Uma vez que as proteínas estão no interior das células dos cotilédones, quanto mais fina a partícula, maior o número de células rom

pidas e, portanto, maior a liberação de proteínas solúveis.

Quando as células não são rompidas, as proteínas não podem ser solubilizadas pelo solvente (Saio e Watanake, 1968).

Temperaturas superiores a 60°C insolubilizam partes das proteínas, diminuindo o rendimento de extração; esta desnaturação mostrou-se mais pronunciada nas frações menores.

4.3.2. Seleção de enzimas proteolíticas ácidas em função das qualidades sensoriais do hidrolisado.

As enzimas citadas no item 3.2.16, foram testadas em farinha de sengordurada de soja a pH 3,0. Os produtos hidrolisados foram testados sensorialmente nos intervalos de tempo citados, com os resultados expressos no Quadro 12.

Geralmente o sabor cru da soja diminuiu com o tempo de digestão, para as três enzimas testadas.

No caso da digestão com Denapsin o sabor de soja desapareceu mais rapidamente, ao passo que com enzima Fúngica esse desaparecimento foi o mais demorado.

Esses sabores encontrados nos produtos de soja permanecem mesmo nos isolados protéicos que sofrem uma série de lavagens, (Arai et al., 1970).

O efeito das proteases ácidas na eliminação dos sabores característicos da soja foi salientado nos trabalhos de Fugimaki et al., 1968; Arai et al., 1970b; e Nogushi et al., 1970. De acordo com esses autores, também outros sabores indesejáveis são eliminados; por outro lado, o sabor amargo, por exemplo, simplesmente não aparece.

Quadro 12. Sabor de hidrolisados protéicos digeridos por diferentes proteases ácidas a diferentes intervalos de incubação.

Tempo de Digestão (hr)	0	1/6	1/2	1	2	4	6
<u>Gosto de soja crua</u>							
Molsin	3	2	2	0	0	0	0
Denapsin	3	2	1	0	0	0	0
Fúngica	3	0	0	0	0	0	0
<u>Sabor amargo</u>							
Molsin	0	0	1	1	1	0	0
Denapsin	0	1	1	1	1	0	0
Fúngica	0	1	1	1	1	0	0
<u>Sabor adstringente</u>							
Molsin	0	0	0	0	0	0	0
Denapsin	0	0	0	0	0	0	0
Fúngica	0	1	1	1	0	0	0

3 = forte,

2 = não muito forte

1 = fraco

0 = insignificante

Nesta pesquisa o sabor amargo, provocado por certos aminoácidos, surgiu no decorrer da hidrólise; após duas horas de digestão, porém, desapareceu por completo.

4.3.3. Remoção de aromas e sabores de soja pela ação enzimática

A enzima Denapsin, que melhor se comportou no teste anterior, foi também usada neste, que seguiu o método citado nos itens 3.2.23 e 3.2.24.

Os picos de n-Hexanal e n-Hexanol foram identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa e pelo uso de padrões puros. O tempo de residência na coluna foi de três minutos para o primeiro, e treze minutos para o segundo.

Variando-se a quantidade de enzima em relação ao substrato, verificou-se que até atingir 1% de Denapsin em relação à proteína do substrato, houve um aumento na liberação de n-Hexanal e n-Hexanol, ao passo que maiores quantidades não aumentaram significativamente essa liberação de voláteis. O quadro 13 mostra os resultados obtidos.

Usando-se Denapsin a 2% em relação ao substrato, efetuou-se um ensaio no qual foram coletados os voláteis redutores através de borbulhamento em solução 0,1N de KMnO_4 ; os resultados estão representados na figura 5, juntamente com os resultados de liberação de n-Hexanal e n-Hexanol, bem como da análise sensorial dos hidrolisados, durante 4 horas de incubação. Como pode ser observado, os teores de voláteis liberados aumentam com o tempo de hidrólise, o que também é comprovado pelo aumento proporcional de liberação de n-Hexanal e n-Hexanol. O sabor do produto hidrolisado vai melhorando à medida que

Quadro 13. Efeito da quantidade de enzima na liberação de n-Hexanal e n-Hexanol durante a digestão enzimática de farinha de soja desengordurada¹.

	Quantidade de enzima (Denapsin) ²				
	0	50	250	500 ³	1.000
n-Hexanal	0,55 ⁴	0,75	1,38	1,63	1,62
n-Hexanol	0,23	0,30	0,52	0,63	0,66

¹ Em cada caso o tempo de digestão foi de 2 horas

² mg de enzima por 100 g de farinha de soja desengordurada

³ 1% de enzima em relação a proteína da amostra

⁴ ppm em relação a farinha de soja desengordurada

os voláteis vão sendo liberados.

Resultados semelhantes foram obtidos por Yoshida (1972), que trabalhou com Molsin, mostrando a liberação de voláteis redutores durante a incubação de isolado protéico de soja (Promine D).

4.3.4. Hidrólise das proteínas

Utilizando-se o método descrito nos 3.2.17 e 3.2.18, a cada intervalo era determinada a quantidade de proteína hidrolisada pelas enzimas estudadas.

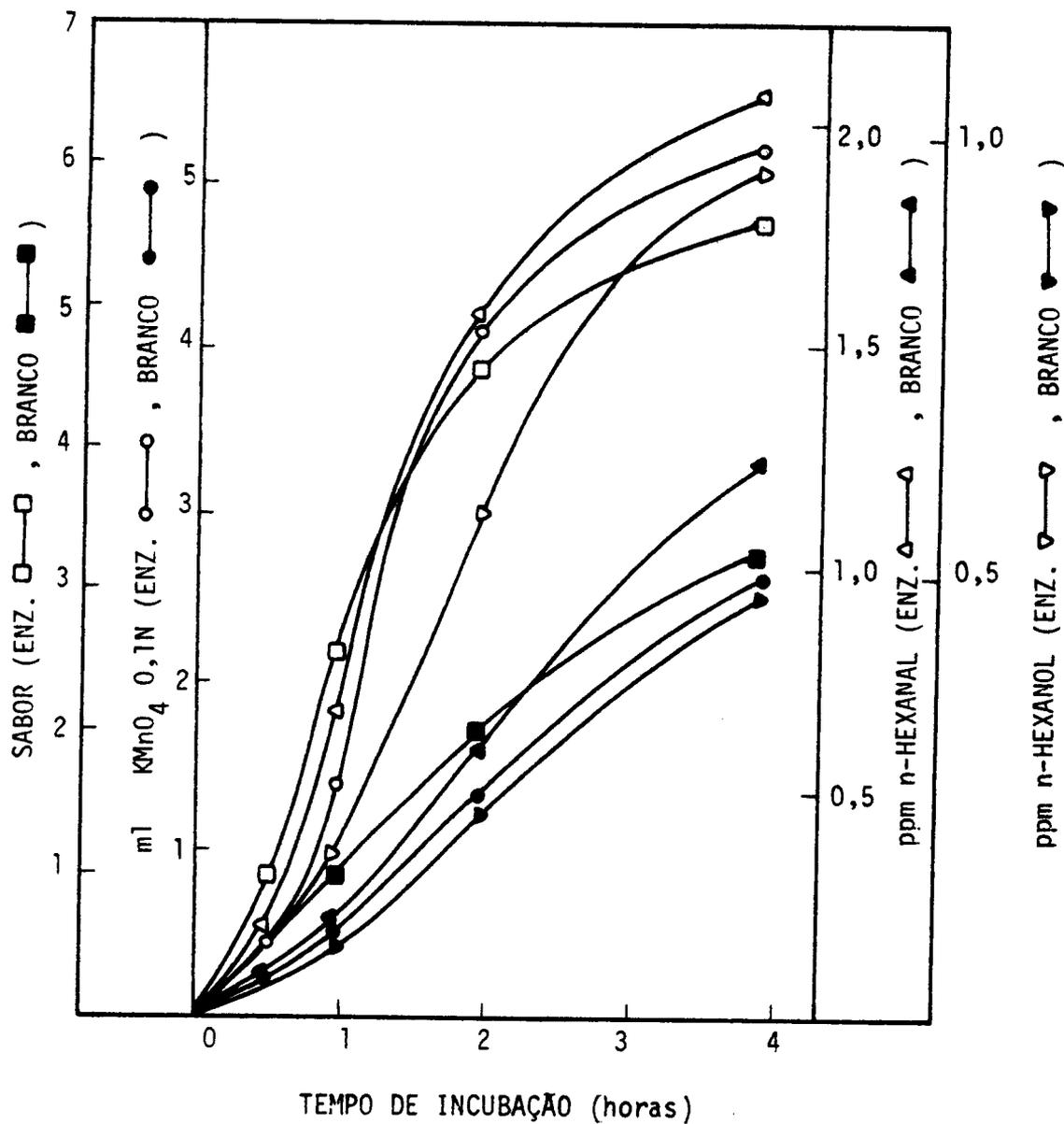


Fig. 5. COMPARAÇÃO ENTRE QUANTIDADES DE SUBSTANCIAS REDUTORAS VOLÁTEIS LIBERADAS, n-HEXANAL E n-HEXANOL, E SABOR DURANTE A INCUBAÇÃO DE FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA COM E SEM DENAPSIN.

Notou-se que em 4 horas a enzima que produziu maior porcentagem de proteína hidrolisada foi a Denapsin. A que produziu menor quantidade foi a enzima Fúngica, que trabalhou num pH desfavorável, pois seu pH ideal seria de 6 a 7, segundo recomendação do produtor (Sankyo Co, 1972).

Os resultados estão apresentados na figura 6.

As combinações de Denapsin com Molsin e com a enzima Fúngica sempre foram mais eficientes que as outras enzimas atuando separadamente. Isto mostrou que não existe efeito sinérgico, uma vez que, quanto maior a quantidade de Denapsin, maior foi a quantidade de proteína hidrolisada produzida.

Em quatro horas, Denapsin hidrolisou 87% das proteínas, Molsin 66% e a enzima Fúngica 17%. As misturas em que entrou 50% de Denapsin em cada caso, resultou numa hidrólise de 73%, quando em combinação com a Fúngica, e 79% quando em combinação com Molsin. A mistura de 33,3% de Denapsin com 33,3% de Molsin e 33,3% de Fúngica resultou numa hidrólise de 75% das proteínas.

Como o interesse era produzir um hidrolisado bastante solúvel e praticamente transparente, quanto maior a quantidade de proteína hidrolisada, melhor o resultado; por esta razão optamos por trabalhar mais acentuadamente com Denapsin, que eliminava, tanto quanto Molsin, os sabores de soja crua e não formava sabores amargos.

Trabalho anterior realizado por Moretti et al. (1976) já havia comprovado a alta eficiência de Denapsin na hidrólise de proteína isolada de soja num reator enzimático ultrafiltrante, bem como no processo "batch".

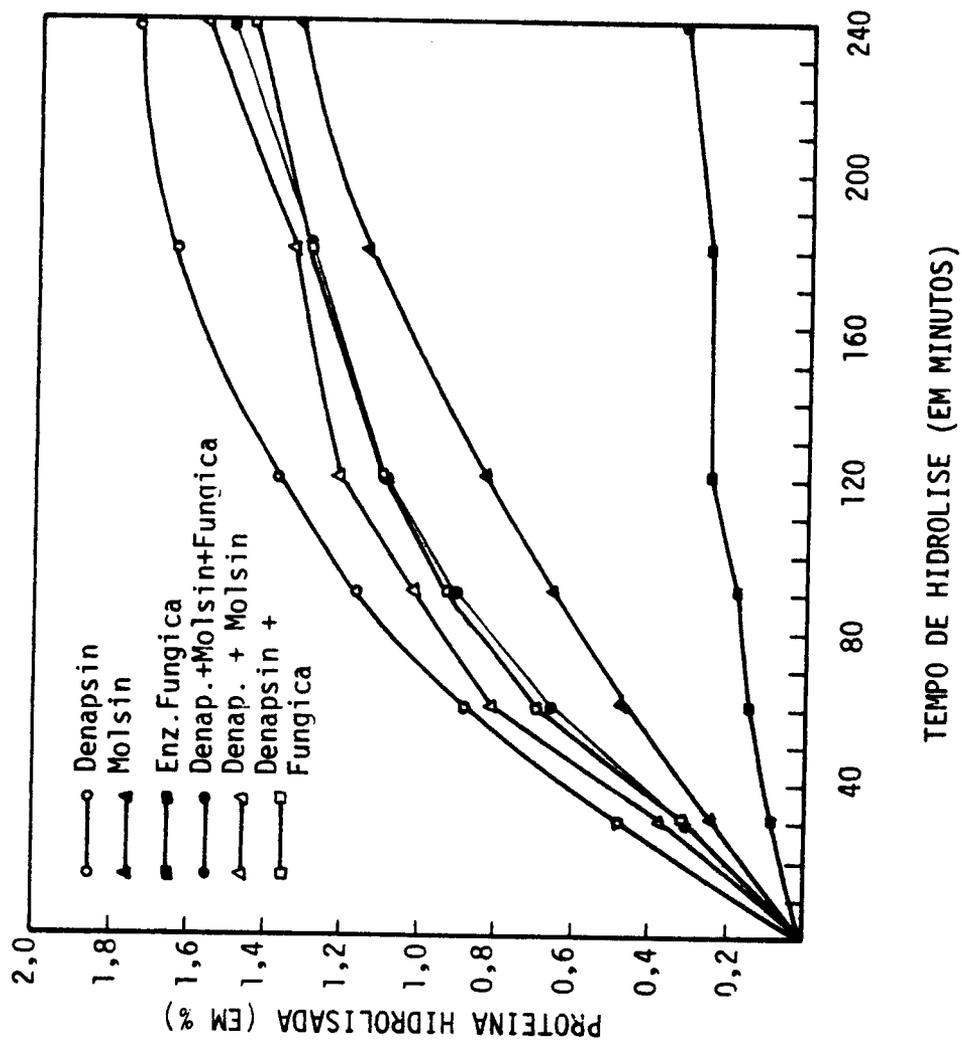


Fig. 6. CURVAS DE HIDROLISE DE PROTEÍNAS DE SOJA COM DIFERENTES ENZIMAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

4.3.5. Hidrólise enzimática de farinha de soja desengordurada pelo processo "Batch".

Conforme descrito nos itens 3.2.17 e 3.2.19, efetuou-se a digestão de farinha de soja desengordurada com 2% de Denapsin, e várias determinações foram feitas durante o transcorrer da incubação.

4.3.5.1. Destruição do fator antitripsina durante a incubação com diferentes enzimas.

Paralelamente à hidrólise das proteínas, observou-se também uma diminuição na atividade residual do fator antitripsina do substrato, que é também constituído de proteínas (Kunitz, 1947).

As figuras 7, 8, 9 e 10 mostram as curvas de hidrólise de proteínas de farinha de soja desengordurada, juntamente com as curvas de destruição do fator antitripsina. Como pode ser observado, a hidrólise enzimática destrói a frio (40°C) o fator anti-nutricional em questão, o que significa a possibilidade de tornar as proteínas de soja livres do fator anti-tríptico, sem destruição do seu valor nutritivo, o que muitas vezes ocorre quando esta inativação é realizada a quente.

Trabalhos efetuados por Sotokawa (1968) mostraram que hidrolisados protéicos, obtidos por ação de proteases ácidas, apresentaram um PER igual ao PER das proteínas originais. Isto não ocorre com os isolados protéicos que apresentam um PER bem inferior ao das proteínas originais (farinha desengordurada de soja), segundo resultados de Meyer (1966), quando trabalhou com ratos, Berry et al. (1966), tra

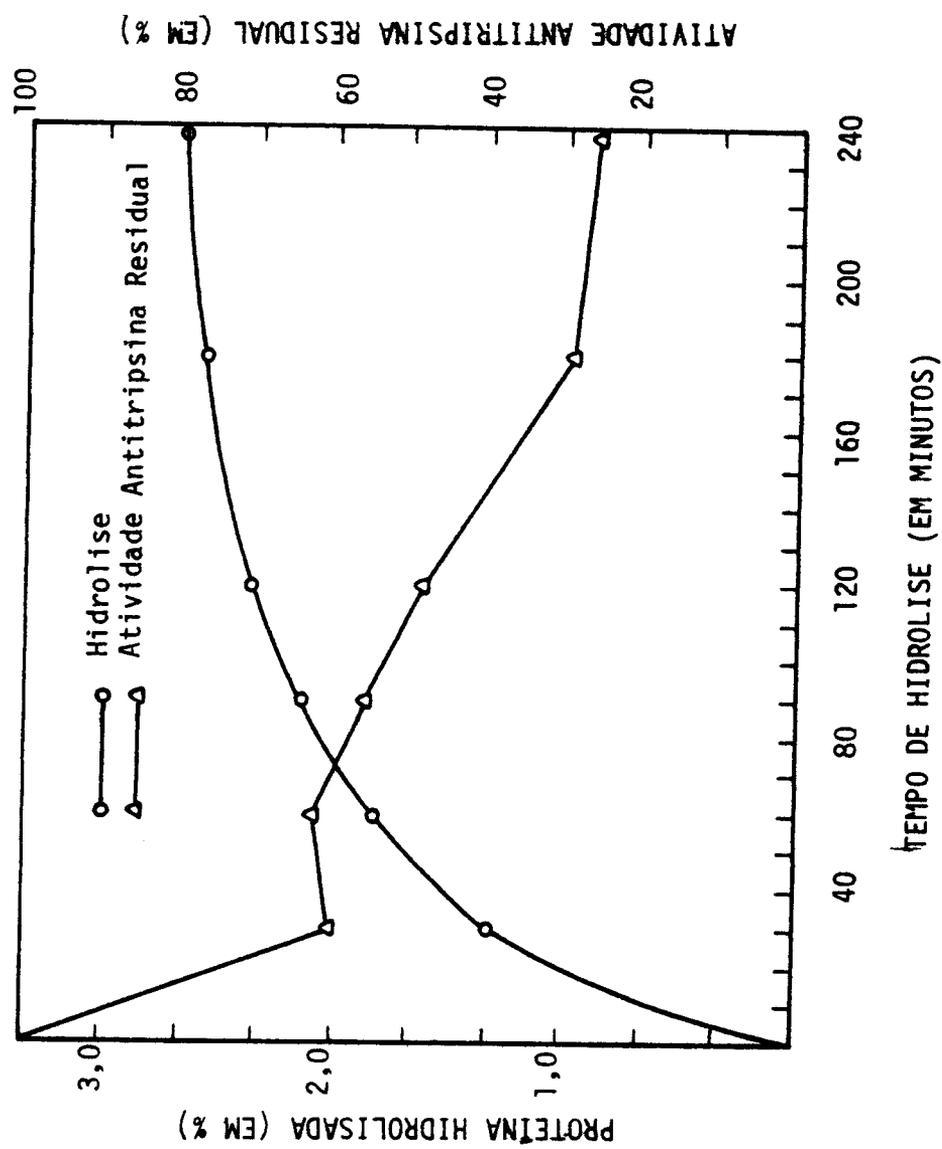


Fig. 7. CURVAS DE HIDROLISE DE PROTEINAS DE FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA E FATOR ANTI TRIPISINA RESIDUAL EM FUNÇÃO DO TEMPO. ENZIMA DENAPSIN 2%

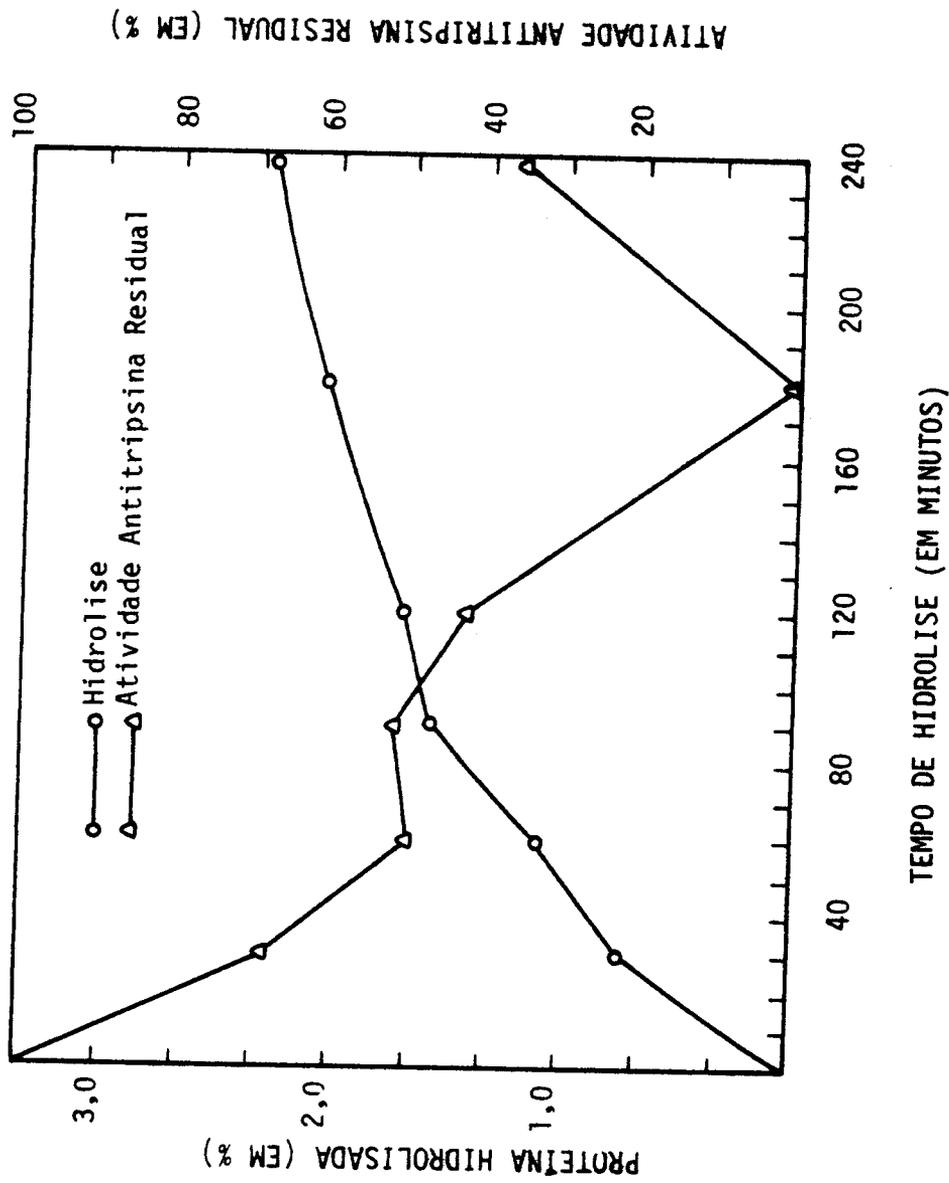


Fig. 8. CURVAS DE HIDROLISE DE PROTEÍNAS DE FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA E FATOR ANTITRIPSINA RESIDUAL EM FUNÇÃO DO TEMPO. ENZIMA MOLSIN 2%

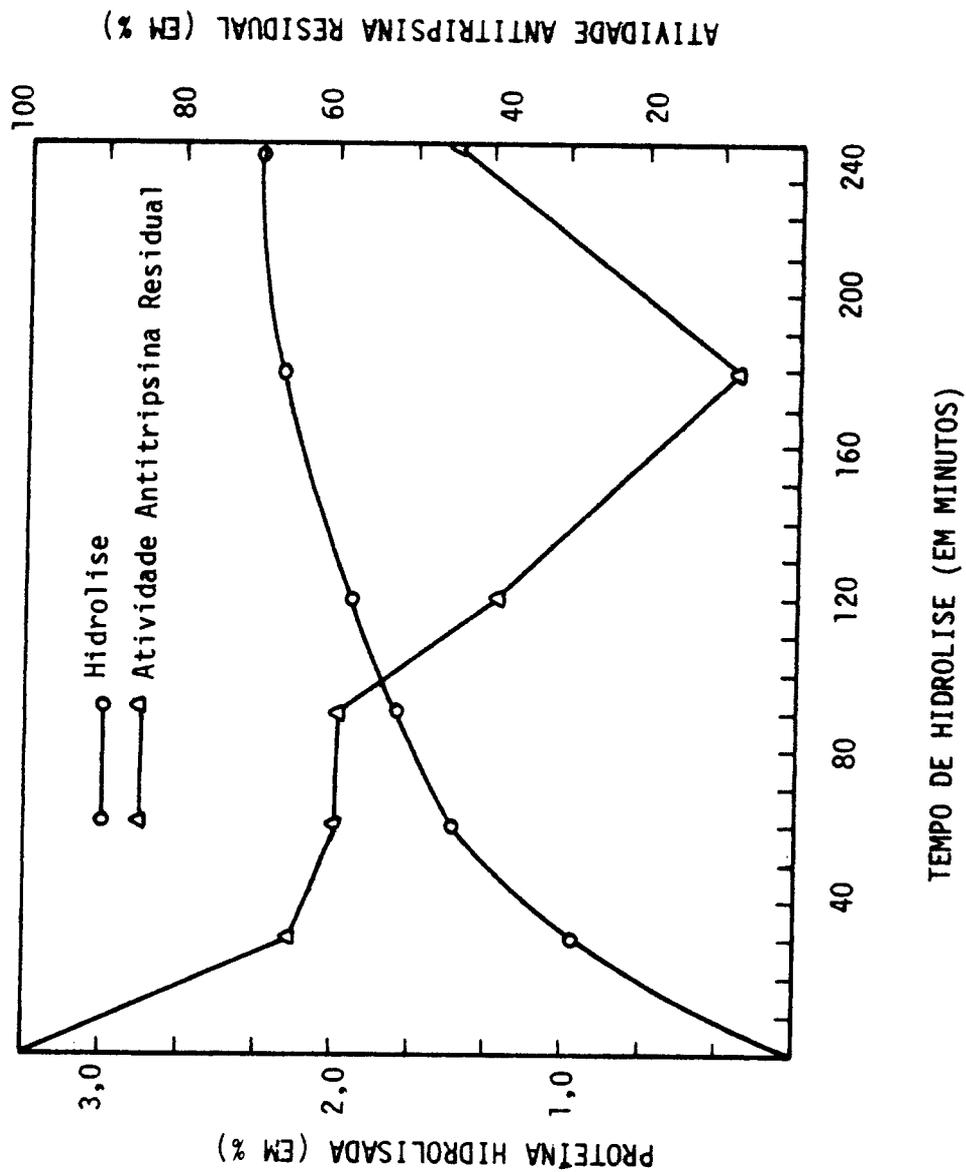


Fig. 9. CURVAS DE HIDROLISE DE PROTEÍNAS DE FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA E FATOR ANTITRIPSINA RESIDUAL EM FUNÇÃO DO TEMPO. ENZIMAS DENAPSIN 1 % + MOLSIN 1 % .

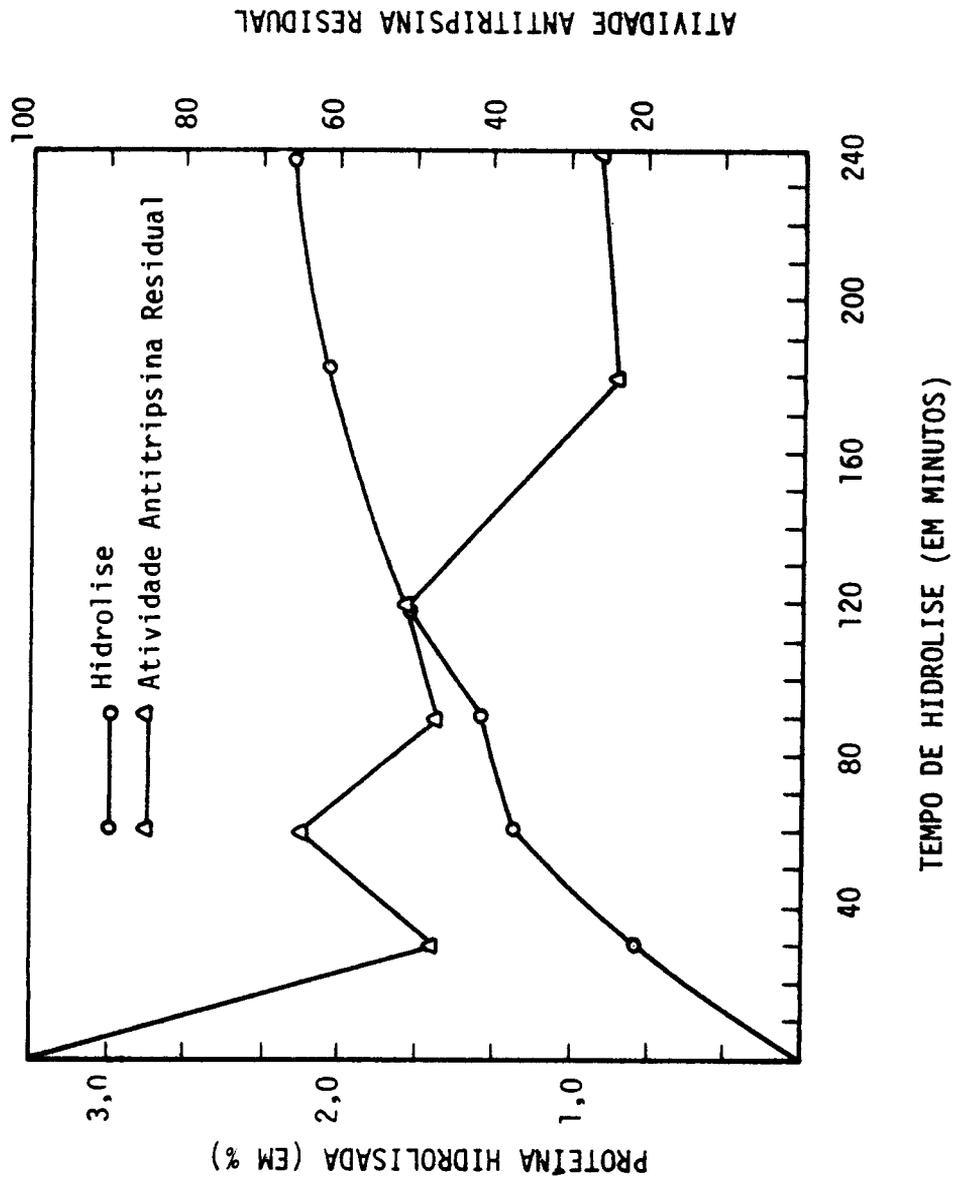


Fig. 10. CURVAS DE HIDROLISE DE PROTEÍNAS DE FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA E FATOR ANTITRIPSINA RESIDUAL EM FUNÇÃO DO TEMPO. ENZIMAS: DENAPSIN 0,67 % + MOLSIN 0,67 % + FUNGICA 0,67 % .

balhando com porcos e Longenecker (1963), trabalhando com seres humanos.

Denapsin destruiu até 75% do valor antitriptico original da farinha, enquanto que os hidrolisados provenientes de incubação com Molsin apresentaram resultados surpreendentes. Sempre que Molsin foi usada como protease, tanto só como em mistura com Denapsin ou Fúngica, houve uma destruição quase contínua do fator anti-tríptico até três horas de incubação, sendo que daí para frente houve um reaparecimento de atividade anti-tríptica. Durante as três primeiras horas a ação destruidora foi maior que no caso de Denapsin, porém entre três e quatro horas de incubação Molsin apresentou uma reativação da característica anti-trípica.

Foi aventada a hipótese de que Molsin, rompe estas ligações das moléculas de proteínas de soja, que têm a característica de complexar-se com a tripsina. Este fato não foi todavia reportado na literatura e deve ser melhor estudado em futuros trabalhos.

Este fato constituiu-se em outra razão para se optar pelo uso de Denapsin ao invés de Molsin; também outros autores a estudaram e recomendaram seu uso na remoção de sabores de soja crua (Fugimak et al., 1968; Arai et al., 1970b; e Naguchi et al., 1970).

4.3.5.2. Destruição da lipoxigenase pela digestão com Denapsin

Seguindo-se o procedimento anterior, digeriu-se farinha de soja desengordurada com Denapsin e acompanhou-se o efeito deste sabor a atividade de lipoxigenase, de acordo com o processo de Surrey (1964).

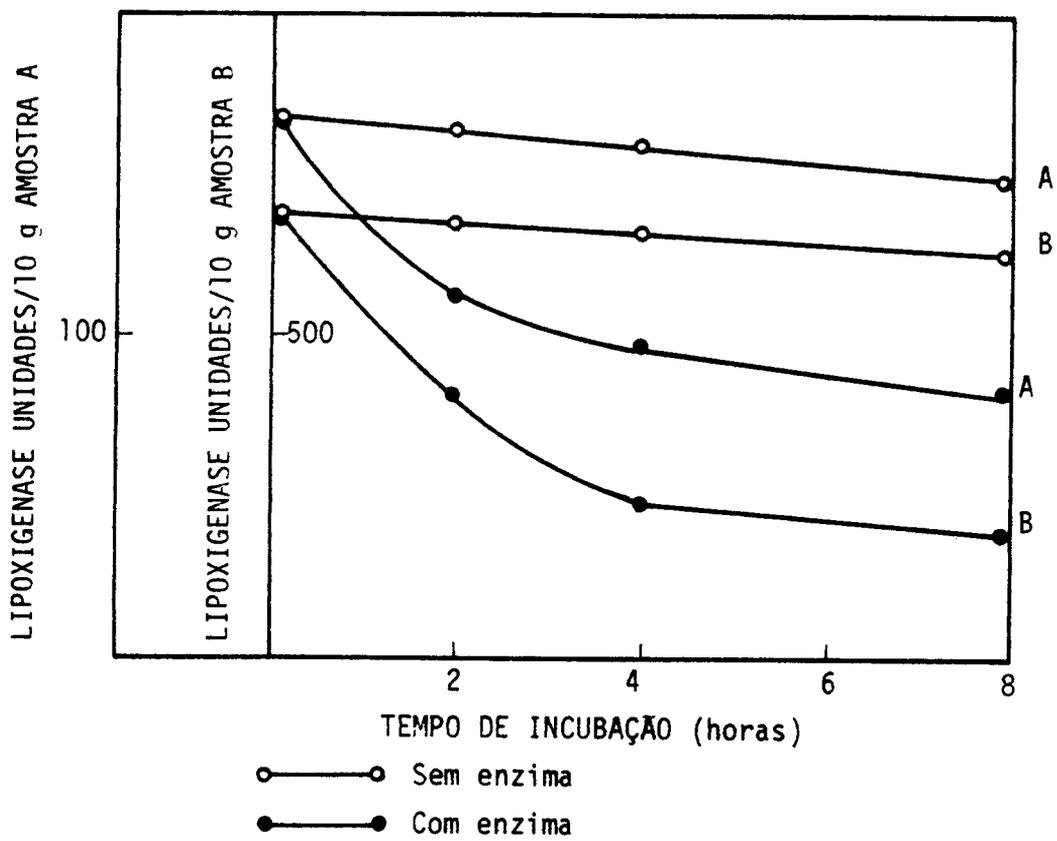
A figura 11, mostra a curva de destruição de lipoxigenase sob a ação de Denapsin. Para comprovar esse efeito da enzima sobre a lipoxigenase, adicionou-se 1 mg de lipoxigenase comercial (8.000 unidades/mg de proteína) a 10 g da mesma farinha e processou-se a incubação, paralelamente ao primeiro experimento. As curvas com círculos cheios mostram o decréscimo semelhante da atividade de lipoxigenase, na amostra em que ela foi adicionada.

É fácil concluir que, sendo a lipoxigenase também uma proteína, a atividade hidrolisadora da Denapsin age também sobre ela, destruindo-a. Estes resultados confirmam os trabalhos realizados por Yoshida (1972), que trabalhou com Molsin e isolado protéico de soja, obtendo resultados semelhantes.

4.3.5.3. Rendimentos na recuperação do hidrolisado protéico, utilizando-se Denapsin.

Para se determinar qual o processo que forneceria maior quantidade de proteína hidrolizada, a partir da mesma matéria prima, dois diferentes processos foram utilizados: o processo "Batch" e processo ultrafiltrante; ambos foram descritos nos itens 3.2.26 e 3.2.27. A matéria prima utilizada nos dois casos foi a farinha desengordurada de soja.

A utilização do isolado protéico de soja apresentou de início um rendimento de 30%, visto que o processo para produção do mesmo, recupera somente 30% da proteína original da farinha desengordurada de soja (Alderks, 1941 e Smith, 1954).



A - Proteína de farinha de soja desengordurada
 B - Mesma amostra com adição de Lipoxigenase

Fig. 11. DECRESCIMO DA ATIVIDADE DE LIPOXIGENASE DURANTE A INCUBAÇÃO COM DENAPSIN A pH 3,0.

Quando o ultrafiltro foi utilizado, considerou-se para o cálculo de rendimento a quantidade de proteína nele colocada, sem descontar a proteína hidrolisada que permaneceu no reator e sem passar pela membrana.

O quadro 14 mostra os resultados de rendimentos quando foram utilizados os dois processos e as duas matérias primas (farinha e isolado); nos casos em que se utilizou o processo "Batch" fez-se o cálculo usando ou não a lavagem do precipitado.

Quadro 14. Rendimentos na recuperação de proteína hidrolisada de soja utilizando-se diferentes processos e matérias primas.

	Farinha desengordurada Rendimento %	Isolado Protéico Rendimento %
Processo "Batch" sem lavagem	35,05	33,45
Processo "Batch" com lavagem	48,61	38,70
Processo Ultrafiltrante	7,28	7,99

Como pode ser observado, o processo "Batch" sempre proporcionou maiores rendimentos, pois todas as proteínas hidrolisadas, bem como as parcialmente hidrolisadas, foram recuperadas. Efetuando-se uma lavagem do precipitado, conseguiu-se um aumento significativo no rendimento.

mento (36,68% no caso da farinha e 14,8% no caso do isolado proteico).

Os rendimentos obtidos no processo em que foi utilizado o reator enzimático ultrafiltrante foram bem inferiores, visto que não se computou a quantia de proteínas parcialmente hidrolisadas, que não passaram pela membrana ultrafiltrante.

Como foi anteriormente constatado que os hidrolisados pelo processo "Batch" não apresentaram sabor amargo, e que os sabores de soja crua foram completamente eliminados, optou-se por este processo, que, além de ser mais econômico e mais rápido, apresenta ainda outras vantagens, como a destruição do fator anti-tríptico e da lipoxigenase.

4.3.5.4. Rendimentos na recuperação do hidrolisado protéico utilizando diferentes proteases ácidas.

Usando-se o processo "Batch", estudaram-se diferentes proteases:

	Denapsin	- 2%	em	relação	ao	substrato
	Molsin	- 2%	"	"	"	"
	Fúngica	- 2%	"	"	"	"
1:1	Denapsin e					
	Molsin	- 2%	"	"	"	"
1:1	Denapsin e					
	Fúngica	- 2%	"	"	"	"
1:1:1	Denapsin e					
	Molsin e					
	Fúngica	- 2%	"	"	"	"

mento (36,68% no caso da farinha e 14,8% no caso do isolado proteico).

Os rendimentos obtidos no processo em que foi utilizado o reator enzimático ultrafiltrante foram bem inferiores, visto que não se computou a quantia de proteínas parcialmente hidrolisadas, que não passaram pela membrana ultrafiltrante.

Como foi anteriormente constatado que os hidrolisados pelo processo "Batch" não apresentaram sabor amargo, e que os sabores de soja crua foram completamente eliminados, optou-se por este processo, que, além de ser mais econômico e mais rápido, apresenta ainda outras vantagens, como a destruição do fator anti-tríptico e da lipoxigenase.

4.3.5.4. Rendimentos na recuperação do hidrolisado protéico utilizando diferentes proteases ácidas.

Usando-se o processo "Batch", estudaram-se diferentes proteases:

	Denapsin	- 2%	em	relação	ao	substrato
	Molsin	- 2%	"	"	"	"
	Fúngica	- 2%	"	"	"	"
1:1	Denapsin e					
	Molsin	- 2%	"	"	"	"
1:1	Denapsin e					
	Fúngica	- 2%	"	"	"	"
1:1:1	Denapsin e					
	Molsin e					
	Fúngica	- 2%	"	"	"	"

A matéria prima utilizada foi farinha desengordurada de soja. Os rendimentos foram calculados para extração após 4 horas de incubação, com e sem lavagem dos precipitados.

Os resultados estão apresentados no quadro 15.

Quadro 15. Rendimentos na recuperação de proteína hidrolisada de soja utilizando diferentes enzimas.

	Sem lavagem Rendimento %	Com lavagem Rendimento %
Denapsin (1)	35,05	48,61
Molsin (2)	28,24	42,86
Fúngica (3)	11,68	20,39
Mistura 1:1 de (1) e (2)	31,58	47,69
Mistura 1:1 de (1) e (3)	20,40	46,40
Mistura 1:1:1 de (1), (2) e (3)	29,98	45,11

Os resultados mostram que existe uma grande vantagem na utilização de Denapsin, pois seu rendimento foi muito superior ao de outras enzimas ou misturas de enzimas, além das demais vantagens anteriormente apontadas.

4.3.5.5. Poder tamponante dos hidrolisados de proteínas de soja

Seguindo-se o mesmo processo utilizado para a proteína de soro

de queijo, elaboraram-se curvas de titulação dos hidrolisados com NaOH-0,1N. A quantidade de proteína hidrolisada ($N \times 6,25$) foi constante, igual a 0,173 g.

A figura 12 mostra as curvas de titulação, que se assemelham bastante às curvas de titulação das proteínas recuperadas de soro de queijo por ultrafiltração.

Curvas de titulação

4.3.5.6. Processo "Batch" de hidrólise enzimática em escala piloto

Com a finalidade de verificar a viabilidade do processo desenvolvido em escala de laboratório, foi realizada uma hidrólise de 8 kg de farinha de soja com Denapsin, segundo o método descrito no item 3.2.25.

O hidrolisado protéico, livre dos insolúveis após a centrifugação, foi concentrado no evaporador centrífugo, apresentando então as seguintes características:

pH	3,3
Sólidos Solúveis	54,8%
Proteína	36,00%
Acidez total	108,3 ml NaOH-1N/100ml
Viscosidade	450 cSt
Sabor	{ Amargo 0
	{ Soja crua 0
	{ Adstringente 0

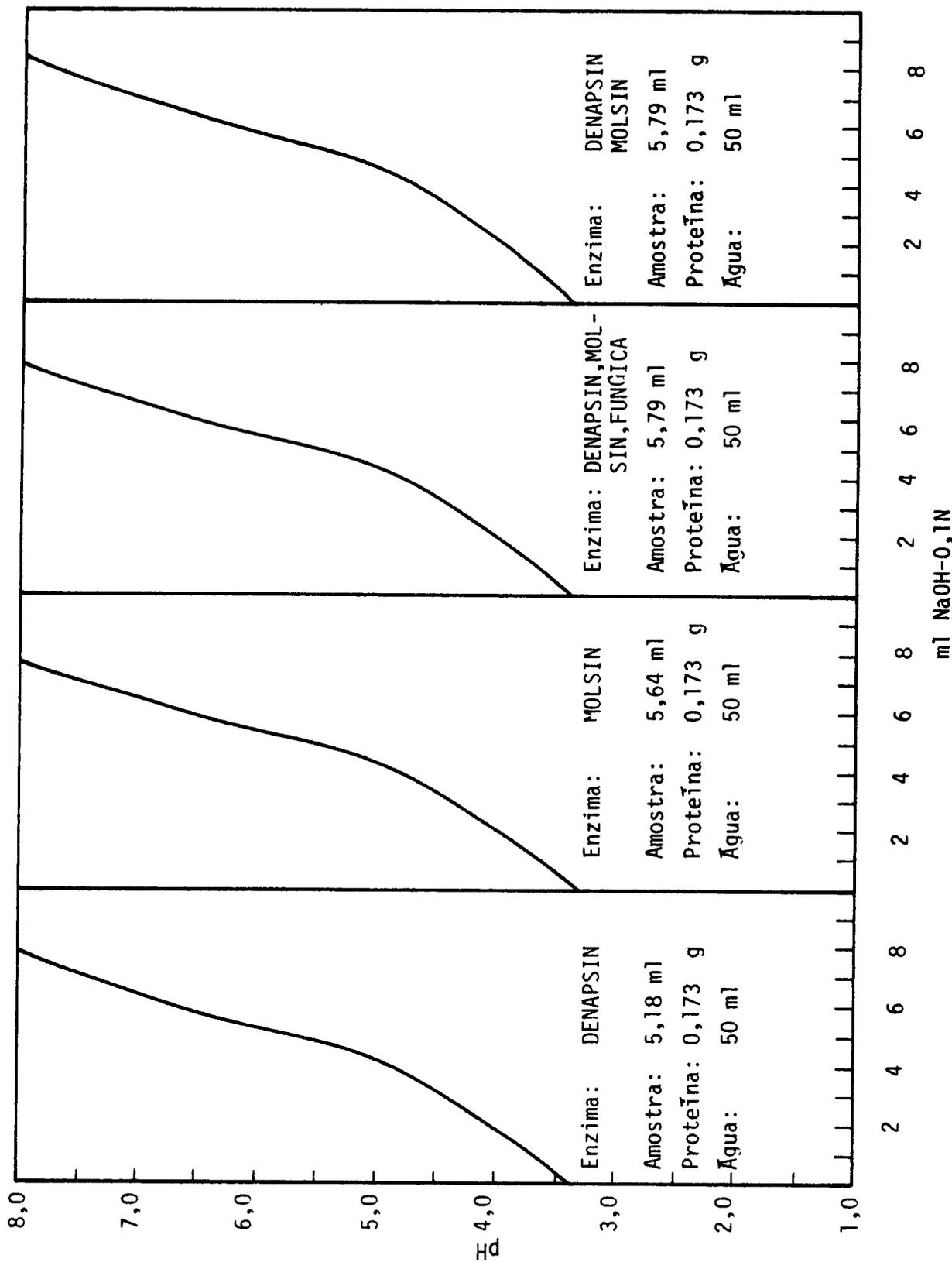


Fig. 12. CURVAS DE TITULAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SOJA HIDROLISADAS COM NaOH-0,1N.

O produto concentrado com 450 centistokes foi diluído gradativamente com água destilada, e as viscosidades de cada diluição foram determinadas segundo o método descrito no item 3.2.26.

A figura 13 apresenta, em escala semilog, a curva de viscosidade aparentes em função da concentração do hidrolisado enzimático. Como se pode observar, foi possível atingir a viscosidade de 450 cSt sem problema na concentração, visto que o evaporador pode trabalhar com concentrados de até 500 centistokes.

Esta característica do produto possibilita uma grande economia de vapor, pois a maior parte da água é eliminada com um consumo de 400 g de vapor por quilo de água eliminada.

No processamento de isolado protéico, o produto concentrado com 87% de umidade deve ir diretamente para o secador "spray", que consome 3 kg de vapor por quilo de água evaporada, enquanto que o hidrolisado vai para o secador com 45,2% de umidade. No processamento de isolado protéico, o consumo de vapor é três vezes maior do que no caso de hidrolisado enzimático.

Como se pode observar, a curva de titulação do hidrolisado, utilizando Denapsin como protease ácida, resultou num menor poder tampante, apesar de não ser significativamente menor que nos outros casos. Para elevar o pH de 0,173 g de hidrolisado protéico de 3,6 para 7,0, foram necessários 6,4 ml, 6,5 ml, 6,6 ml e 7,0 ml de NaOH-0,1N, utilizando-se, respectivamente, Denapsin, Molsin, Mistura 1:1:1 das três enzimas e 1:1 de Denapsin e Molsin.

Como já foi comentado anteriormente, empregando-se cerca de 6 a 7 ml de NaOH-0,1N, os refrigerantes elaborados com essas proteínas apresentaram uma acidez sensorial bastante aceitável (Project Star 1970).

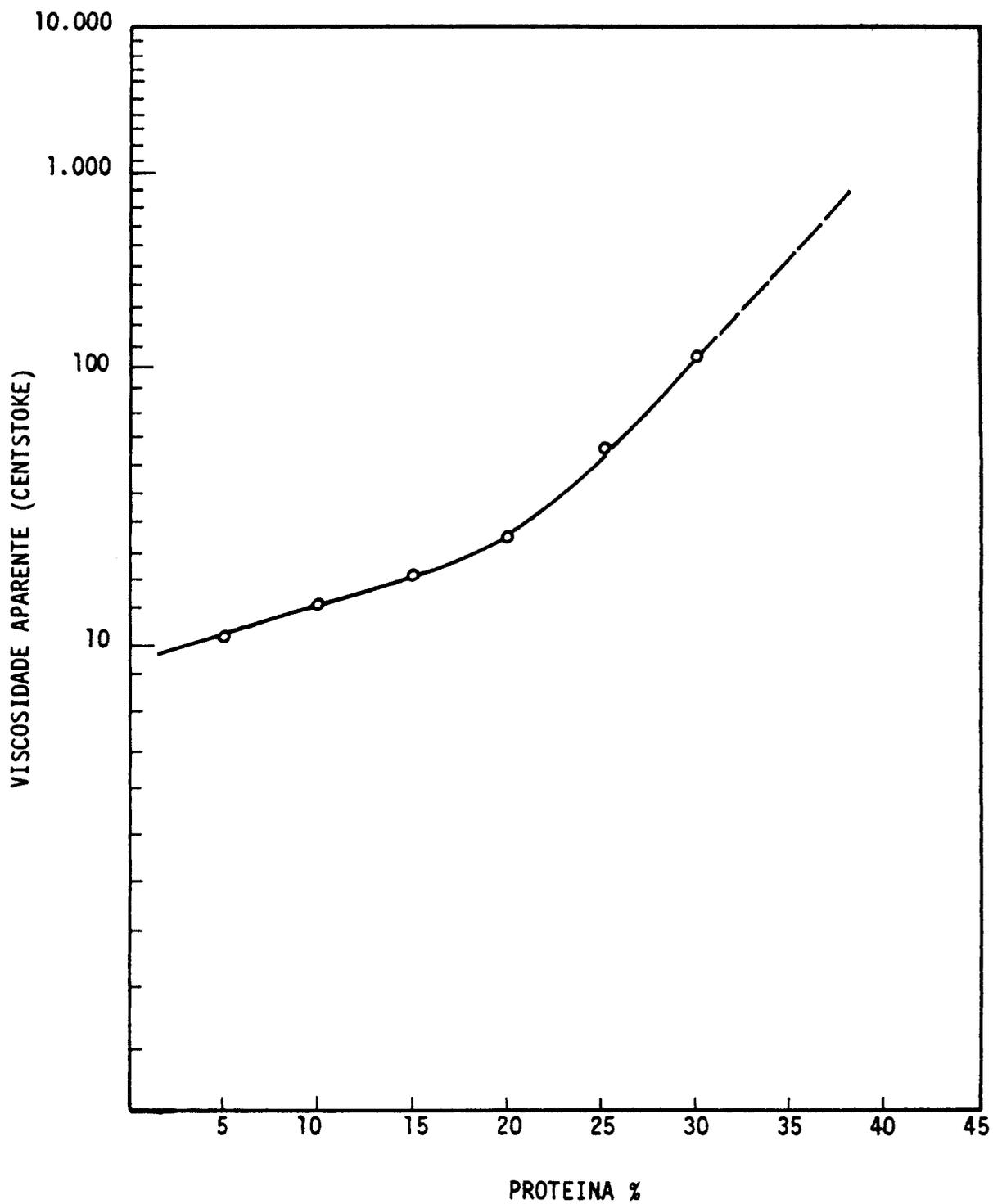


Fig.13. CURVA DE VISCOSIDADE APARENTE (cSt) DO HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE F.S.D. EM FUNÇÃO DE SUA CONCENTRAÇÃO

4.4. CARACTERÍSTICAS DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO PRODUZIDO A PARTIR DE FARINHA DESENGORDURADA DE SOJA INCUBADA POR QUATRO HORAS COM DENAPSIN.

Uma vez definido o processo "Batch" como sendo o mais econômico e vantajoso, a enzima Denapsin (como a melhor protease ácida) e a farinha desengordurada de soja como a melhor matéria prima, vários ensaios foram realizados para caracterizar melhor esse hidrolisado proteico.

4.4.1. Distribuição dos pesos moleculares no hidrolisado

O hidrolisado liofilizado foi submetido a uma cromatografia em gel - Sephadex de diferentes porosidades, em série, conforme descrito no item 3.2.20.

A figura 14 mostra as curvas obtidas no fracionamento das proteínas originais da soja, e do fracionamento das proteínas hidrolisadas.

Uma análise das curvas mostra uma diminuição dos pesos moleculares das proteínas após a digestão com protease ácida. Os pesos moleculares originais, que variavam entre 300.000 e 20.000, na maioria, passaram a ser, em média, menores que 14.000.

Segundo observação de Verma e McCalla (1966), foi comprovado que a ação de enzima proleolítica ácida induz a formação de grande quantidade de polipeptídeos de pesos moleculares não muito reduzidos. Esta pode ser a razão pela qual os hidrolisados enzimáticos obtidos desta forma não apresentam sabores desagradáveis ou amargos.

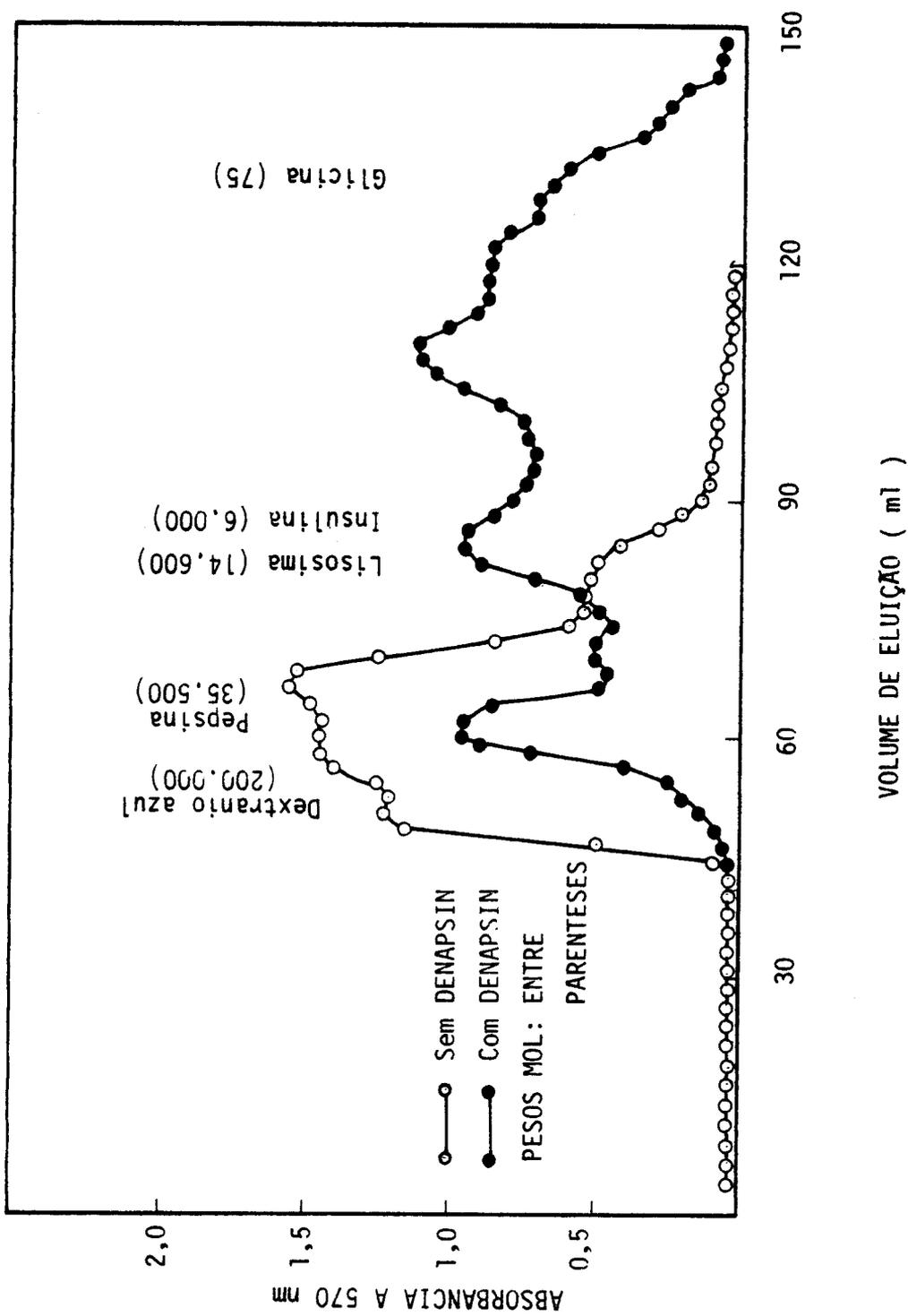


Fig. 14. CROMATOGRAFIA EM GEL SEPHADEX DOS HIDROLISADOS RESULTANTES DA
 INCUBAÇÃO DE FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA COM E SEM "DENAPSIN"

4.4.2. Digestibilidade péptica e trípica dos hidrolisados

Seguindo-se os métodos descritos no item 3.2.21, foram estudadas as digestibilidades péptica e trípica dos hidrolisados, comparadas às da matéria prima, a farinha de soja desengordurada com 60% de proteínas solúveis e 74% de atividade anti-trípica residual. Como pode ser observado na figura 15, a hidrólise das proteínas resulta num aumento significativo da sua digestibilidade. Isto vem mais uma vez comprovar nossa hipótese de que, tratando-se uma farinha de soja desengordurada por um processo enzimático, a frio (40°C), não há destruição do seu valor nutritivo, como ocorre com o calor excessivo, que, além do mais pode destruir seus fatores antinutricionais.

4.4.3. Aminograma dos hidrolisados

Foram feitos aminogramas dos hidrolisados de farinha desengordurada de soja e de isolado protéico, bem como de suas matérias primas. Os resultados são dados no quadro 16.

Analisando-se os aminogramas, pode-se concluir que a hidrólise enzimática praticamente não modifica o aminograma das matérias primas.

Comparando-se os aminogramas dos hidrolisados da farinha do isolado protéico, pode-se notar uma diferença significativa, sendo que o primeiro é superior nos aminoácidos essenciais sulfurados, que são naturalmente limitantes na soja; também em lisina e treonina, que são outros dois aminoácidos bastante importantes na soja, o hidrolisado da farinha é superior. A treonina é um dos limitantes e a lisina é o

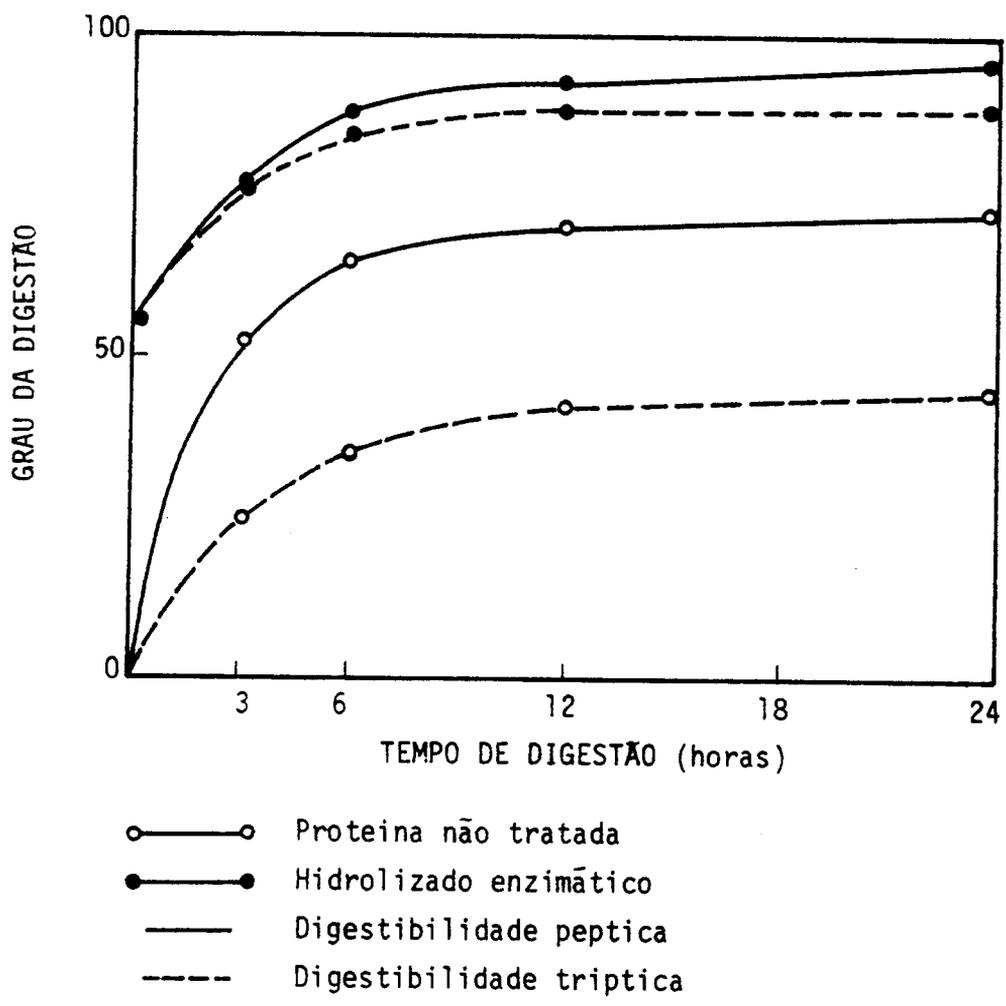


Fig. 15. DIGESTIBILIDADE PEPTICA E TRIPTICA DE PROTEINA DE FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA E SEUS HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS.

Quadro 16. Aminogramas dos hidrolisados protéicos de farinha desen-
gordurada e isolado protéico de soja e de suas matérias
primas.

Aminoácidos	Farinha Desengordurada		Isolado protéico Proteimax - 90	
	Original g/100g prot.	Hidrolisado g/100g prot.	Original g/100g prot.	Hidrolisado g/100g prot.
Ac. Aspártico	8,366	12,236	12,372	12,051
Treonina	3,738	3,667	3,716	3,437
Serina	4,726	4,904	5,012	4,756
Ac. Glutâmico	20,232	22,203	20,557	23,169
Prolina	4,726	4,647	4,776	5,000
Cistina	2,187	1,686	0,980	0,899
Glicina	4,209	3,866	3,981	3,789
Alanina	4,209	3,839	3,898	3,549
Valina	4,906	4,266	4,982	4,436
Metionina	1,180	0,753	0,336	1,158
Isoleucina	4,950	4,024	4,893	4,183
Leucina	8,103	6,833	7,995	7,080
Tirosina	3,345	2,789	3,005	3,194
Fenilalanina	5,415	4,518	5,341	4,792
Histidina	2,702	2,674	2,501	2,561
Lisina	6,402	6,477	5,667	6,238
Amônia	1,762	1,725	1,702	1,752
Arginina	7,517	7,529	7,188	7,776
Triptofano	1,325	1,366	1,103	1,079

aminoácido essencial mais abundante da soja.

Os resultados obtidos concordam com os de Inglett et al. (1969) e de Bressani e Elias (1967) quanto às matérias primas, farinha e isolado.

4.4.4. Composição centesimal dos hidrolisados

Os hidrolisados de farinha desengordurada foram analisados e mostraram a seguinte composição (liofilizado):

Proteína (N x 6,25)	65,63
Carbohidratos	23,85
Cinzas	5,83
Gorduras	0,45
Umidade	3,00

Estes resultados demonstram que o processo concentra a proteína pela eliminação de fibras, subindo de 52,30% para 65,63%. Com tal composição, este produto é bastante superior à farinha de soja, visto que não apresenta fibras, seu teor de proteína é mais elevado, é solúvel em pH baixo, de valor nutritivo semelhante ao da farinha, não apresentando fatores antinutricionais e tendo lipoxigenase inativada. O rendimento do processo é bastante superior ao da extração de isolado protéico (Udvari e Kolmann, 1976) e seu custo de produção inferior como veremos adiante.

4.5. FORMULAÇÃO DA BEBIDA

Obtidos os dois produtos caracterizados nos itens 4.2.1. e 4.4.4, cujos aminogramas estão nos quadros 9 e 16, pode-se formular uma mistura de proteínas solúveis, usando-se principalmente o hidrolisado protéico obtido da soja, um produto barato e abundante em nosso país.

A proteína referência da FAO/OMS-1973 foi a base para orientar o cálculo da mistura. A fim de ser mais prático, este trabalho enfatiza a necessidade premente dos escolares de sete a quatorze anos que recebem merenda nas escolas.

O programa do INAN, segundo planos do PRONAN (1976) para estes próximos anos, pretende fornecer uma merenda escolar para 15 milhões de crianças, atendendo com ela a 15% das necessidades protéico-calóricas dessa população.

O quadro 17 apresenta os aminogramas dos dois produtos desenvolvidos e o aminograma padrão da FAO/OMS-1973.

Os aminoácidos apresentados mostram que o hidrolisado protéico de soja apresenta a treonina, os aminoácidos sulfurados e a lisina como limitantes em relação à proteína referência. O índice químico para treonina é 83,34%, para os aminoácidos sulfurados é 71,74% e para lisina é 89,02%. Bender (1973), no capítulo 11 do livro "Proteins in Human Nutrition", chegou à conclusão que, em se tratando de proteínas de médio para alto valor biológico, este pode ser correlacionado com o índice químico quando os valores biológicos estão entre 0,50 e 1,0.

Uma vez que se trata de proteínas de alto valor biológico, como a soja e as lactoalbuminas, assumiu-se que o índice químico seria

Quadro 17. Aminogramas das proteínas de soro de queijo ultrafiltrado, hidrolisado protéico de farinha desengordurada de soja e da proteína referência FAO/OMS-1973.

Aminoácidos essenciais	Proteína de soro obtida por ultrafiltração. g/100g prot.	Proteína hidrolisada de soja g/100g prot.	Proteína Referência FAO/OMS-1973 crianças 10 - 12 anos.
Treonina	6.000	3.667	4.400
Cistina	4.969	1.686	3.400
Metionina	2.082	0.753	
Valina	5.071	4.266	4.100
Isoleucina	5.130	4.024	3.700
Leucina	11.555	6.833	5.600
Tirosina	2.919	2.787	3.400
Fenilalanina	3.457	4.518	
Lisina	<u>10.002</u>	<u>6.477</u>	7.500
Triptofano	2.415	1.366	0.460
Total (-Histidina)	51.541	36.374	32.560

perfeitamente aplicável para se atingir os objetivos propostos. Para se formular uma mistura que satisfaça as exigências da proteína referência, deve-se complementar esta proteína hidrolisada com as lactoalbuminas recuperadas de soro de queijo, que são ricas em aminoácidos essenciais.

Calculando-se a quantidade de lactoalbuminas que se deve adicionar às proteínas de soja hidrolisadas para elevar o teor de aminoácidos sulfurados para 100% da proteína referência, chegou-se à conclusão que seriam necessários 31,40% de lactoalbuminas e 68,60% de proteína hidrolisada.

O aminograma da mistura, conforme foi calculado, está apresentado no quadro 18.

Quadro 18. Aminograma da mistura de proteínas na proporção de 31,4% de lactoalbuminas para 68,6% de proteínas hidrolisadas de soja.

Aminoácidos	g/100 proteína	Proteína Rfe. FAO/OMS-1973
Treonina	4,40	4,40
Cistina	3,89	3,40
Metionina		
Valina	4,52	4,10
Isoleucina	4,37	3,70
Leucina	8,32	5,60
Tirosina	8,01	3,40
Fenilalanina		
Lisina	7,58	7,50
Triptofano	1,70	0,46
Total (-Histidina)	42,79	32,56

Como pode ser observado, os aminoácidos que eram limitantes, treonina e lisina, passam a satisfazer exatamente o aminograma da proteína referência FAO/OMS-73, enquanto todos os demais apresentam excesso.

4.5.1. Cálculo do custo das proteínas hidrolisadas a partir de farinha desengordurada de soja.

Considerando-se o custo da farinha desengordurada de soja a Cr\$ 2,50 por quilo, com um rendimento de extração de 48,60% por hidrólise enzimática com Denapsin, processo "Batch", com lavagem do precipitado e com um teor de proteína (N x 6,25) de 65,63% no produto desidratado, teremos para a matéria prima um valor de Cr\$ 3,38 por quilo.

O produto hidrolisado, separado dos insolúveis, apresentou um teor de 3,6% de proteína (N x 6,25) e um teor de sólidos solúveis totais de 5,48%. Este líquido pode ser concentrado num evaporador de filme descendente de triplo efeito até a concentração de 36,0% de proteína e um teor de sólidos solúveis de 54,8%, dispendendo 3,6 kg de vapor para produzir 1,0 kg de concentrado, tomando como base um consumo de 0,4 kg de vapor por quilo de água evaporada.

Para desidratar 1,0 kg de concentrado até 3% de umidade final, num secador "spray", gasta-se 1,26 kg de vapor, considerando-se um consumo de 3,0 kg de vapor por quilo de água evaporada.

O consumo total de vapor, para evaporação e desidratação, será de 4,86 kg, que por sua vez utilizam 0,37 kg de óleo para serem produzidos. Considerando-se que o óleo para caldeira custa Cr\$ 2,00 por quilo, chega-se a um custo de Cr\$ 0,74 para o combustível.

Para produzir 2.000 toneladas anuais deste produto gasta-se cerca de Cr\$ 5.000.000,00 em equipamentos, o que representa um custo de Cr\$ 0,25 por quilo de produto elaborado.

Considerando-se juros de 6% ao ano sobre o equipamento, chega-se a um custo de Cr\$ 0,15 por quilo.

A mão de obra necessária para a produção de 2.000 toneladas anuais de hidrolisado representa Cr\$ 0,24 por quilo.

Finalmente, o custo da enzima, que é de Cr\$ 50,00 por quilo, aumenta em mais Cr\$ 0,90 por quilo o custo do hidrolisado produzido.

Somando-se todos os insumos, chega-se a um custo total de Cr\$ 5,66 por quilo de hidrolisado.

Normalmente, o preço de venda de produtos alimentícios é duas vezes o seu custo de produção; portanto, o preço do hidrolisado protéico de soja no mercado seria de Cr\$ 11,00 a 11,50 por quilo.

4.5.2. Custo das proteínas recuperadas de soro de queijo

Atualmente este produto já se encontra à disposição no mercado internacional, sendo os principais fornecedores a Nova Zelândia, através de um único fornecedor, o "New Zealand Dairy Board", e os Estados Unidos da América do Norte, através da Stauffer, da Purity, da Foresmost, etc... O preço desse produto gira em torno de US\$ 2,50 por quilo na base de proteína pura. Considerando-se um produto com 62,00% de proteína, seu preço será de US\$ 1,55 por quilo, ou seja, Cr\$ 18,60.

4.5.3. Custo calculado da mistura

Fazendo-se o cálculo do custo de 314 g de proteína recuperada de soro, chega-se a Cr\$ 9,42, enquanto que no caso das proteínas hidrolisadas de soja, o valor é cerca de Cr\$ 11,50 para 684 g. O custo total de 1,0 kg de proteína, equivalente à proteína referência FAO/OMS-1973, seria, portanto, de Cr\$ 20,92.

4.5.4. Custo de uma merenda que satisfaça a 15% das necessidades diárias de uma criança em idade escolar

Segundo dados da FAO/OMS-1973, uma criança em idade escolar, com peso médio de 35 kg, necessita de 0,8g de proteína por quilo de seu peso (corporal). Portanto, a necessidade diária total, em proteínas, seria de 28g. Os 15% de 28 g são 4,2 g de proteína equivalente à referência FAO/OMS-1973. Se 1,0 kg da mistura calculada custa Cr\$ 20,92, 4,2 g custariam Cr\$ 0,088. Esta quantidade de proteína deveria estar contida em 280 ml de refrigerante, ou então ser diluída em 280 ml de água. Normalmente, a concentração de açúcares em bebidas deste tipo é de 12 a 13%; portanto, 280 ml deveriam conter 36 g de açúcar. Com o custo do açúcar girando em torno de Cr\$ 3,00 por quilo, isto representaria cerca de Cr\$ 0,108 por merenda.

O custo de sabores artificiais, corantes, antioxidantes, mistura de vitaminas e sais minerais para formulação de uma bebida nutritiva pode ser avaliado em Cr\$ 0,03 por merenda.

Somando-se os valores da proteína, açúcar e "premix" contendo sais minerais, vitaminas, corantes, sabores e antioxidante, chega-se a um valor de Cr\$ 0,226, que seria o custo de uma merenda.

5. CONCLUSÕES

5.1. A hidrólise enzimática de proteínas de farinha desengordurada de soja, pela protease ácida Denapsin, resulta num produto de sabor neutro, solúvel em pH 3 a 4, equivalente, em valor nutritivo, à farinha original, com uma digestibilidade "in vitro" péptica e tríptica bem superior à da matéria prima, com um custo de produção equivalente a 65-68% do custo de um isolado protéico de soja.

5.2. A enzima Molsin não é recomendada, por apresentar um menor rendimento e resultar numa reativação do fator antitripsina, após três horas de incubação.

5.3. A enzima Fúngica não é recomendada devido ao seu baixíssimo rendimento a pH 3,0 e pelo aparecimento de sabor adstringente durante a incubação.

5.4. A hidrólise enzimática da farinha desengordurada de soja por Denapsin provoca uma inativação do fator antitriptico e da lipoxigenase.

5.5. O aminograma do hidrolisado enzimático produzido da farinha desengordurada de soja por Denapsin é praticamente idêntico ao aminograma da matéria prima original, o que significa a obtenção de um produto com sua capacidade nutritiva potencial máxima, o que não ocorre na elaboração de outros produtos protéicos derivados da soja.

5.6. O processo "Batch" de hidrólise de farinha desengordurada proporcionou um rendimento bem superior ao dos demais.

5.7. O poder tamponante do hidrolisado enzimático foi relativamente baixo, o que permite a elaboração de bebidas com 1,5% de proteína (N x 6,25) com baixa acidez total.

5.8. A ultrafiltração consegue remover quantidades suficientes de sais do soro de queijo, para reduzir em cinco vezes seu poder tamponante original, bem como para eliminar lactose suficiente, de modo a não interferir na aceitabilidade do produto final por todas as crianças, mesmo que sejam intolerantes a este açúcar.

5.9. O processo utilizado para a concentração das proteínas do soro de queijo (ultrafiltração) resultou num produto final com um aminograma semelhante ao do produto original, sem a destruição de aminoácidos essenciais.

5.10. A ultrafiltração possibilita concentrar as proteínas do soro de 9,5% para 63% na base seca, o que diminui bastante o volume e o peso, resultando em menores necessidades de espaço de estocagem, menores custos de transporte e de embalagem.

5.11. O valor PER do produto obtido por ultrafiltração do soro foi de 3,5, comparado com o da caseína-2,50- o que significa um valor nutritivo suficiente para poder complementar as proteínas hidrolisadas de soja que são limitantes em treonina e aminoácidos sulfurados.

5.12. As lactoalbuminas recuperadas permanecem solúveis em pH 3 a 4,00 que possibilita sua solubilização de forma estável em bebidas ácidas.

5.13. Tanto o custo do hidrolisado protéico, como o das proteínas recuperadas do soro, possibilita formular uma merenda de custo bastante reduzido.

6. LITERATURA CITADA

- ABCOR. - Ultrafiltration. Process Information, bull. 206, 1969.
- ALDERKS, O.H. The study of 20 varieties of soybeans with respect to quantity and quality of oil, isolated protein, and nutritional value of the meal. J. Am. Oil Chemists Soc. 26, 126, 1949.
- ALLISON, J.B. - Aminoacid requirements. ANRC Meeting, Washington, D.C. October 1958.
- ALLISON, R.J. Balance and inbalance of aminoacids both in regard human and animal nutrition. Voeding 19, 119, 1958.
- ALTSCHUL, A.M. "Proteins: Their chemistry and politics". New York, Basic Books, 1965.
- _____. - In: MILNER, M., ed. Protein-enriched cereal foods for world needs. St. Paul, Min., American Society for Cereal Chemists, 196. p.82.
- ANDREWS, P. - Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. Biochem. J. 91, 222, 1964.
- ANTUNES, P.L. & SGARBIERI, V.S. - Processing effects on the nutritive value of soybean seeds and products. Arq. Latinoamer. de Nutrição (in press).
- A.O.A.C. - Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 11 ed. Washington, D.C., 1970.
- ARAI, S. et al. - N-Hexanal and some volatile alcohols; their distribution in raw soybean tissues and formation in crude soy protein concentrate by lipoxigenase. Agr. Biol. Chem. 34, 1420, 1970a.

- _____ et al. - Applying proteolytic enzymes on soybean. 7. Properties of soy protein treated with microbial acid protease (Molsin). Agr. Biol. Chem. 34, 1338, 1970b.
- BENDER, A.E. - Chemical scores and availability. In: PORTER, J.W.G. & ROLLS, B.A. ed. Proteins in human nutrition. London, Academic Press, 1973. p.167.
- BERRY, T.H. et al. - Responses of the growing pig to alterations in the aminoacid pattern of isolated soybean protein. J. Animal Sci. 25, 722, 1966.
- BIRK, Y. & GERTLER, A. - Effect of mild chemical and enzymatic treatments of soybean meal and soybean trypsin inhibitors on their nutritive and biochemical properties. J. Nutrition 75, 379, 1962.
- BLOCK, R.J. & BOILLING, D. - Aminoacid composition of proteins and foods. 2nd. Ed. Charles E. Thomas, Springfield, Ill., 1951.
- _____ et al. Studies on bovine whey proteins. Arch. Biochem. Biophys. 47, 88, 1953.
- BRAATZ, D.R. - Whey processing challenges. In: Whey Products Conference. Chicago Ill., Sept 18-19, 1974.
- BRESSANI, R. & ELIAS, L.G. Processed vegetable protein mixtures for human consumption in developing countries. Adv. Food Res. 16, 1, 1968.
- _____ ; VALIENTE, A.T. & TEJADA, C.E. - All vegetable proteins mixtures for human feeding. VI. The value of combinations of lime-treated corn and cooked black beans. J. Food Sci. 27, 394, 1962.
- _____ & ELIAS, L.G. - All vegetable protein mixtures for human feeding; the development of INCAP vegetable mixture 14 based on soybean flour. J. Food Sci. 31, 626, 1967.

- CANNON, P.R. - Fed. Security Agency Docket No. FDC-31(b) P. 14990.
- CANNON, M.R. & FENSKE, M.R. - Viscosity measurement. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 10, 297, 1938.
- CHEFTEL, C. et al. - Enzymatic solubilization on fish recycling processes. J. Agr. Food Chem. 19, 155, 1971.
- CHOW, B.F.; ALPER, C. & DEBIASE, S. - The effects of oral administration of different proteins on the plasma proteins or protein depleted dogs. J. Nutrition 36, 785, 1948.
- DAVIS, B.J. - Disc electrophoresis II; method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences, 121, 404, 1964.
- DeBAUN, R.M. & CONNORS, W.M. - Relationship between "in vitro" enzymatic digestibility and "in vivo" protein evaluation of powdered whey. J. Agr. Food Chem. 2, 524, 1954.
- DUSTIN, J.P. et al. Analytica chim. Acta 9, 256, 1953.
- EDELSTEIN, F. & LANGSTEIN, L. Kinderheilk 20, 112, 1919. (Citado por Mueller e Cox).
- ELEY, C.P. Food uses of soy protein. In: Marketing and transportation situation. USDA-ERS 388, MTS-170, 27, 1968.
- EVANS, R.J.; GROSCHKE, A.C. & BUTTS, H.A. - Studies on the heat inactivation of cystine in soybean oil meal. Arch. Biochem. 30, 414, 1951.
- FAO - Protein Requirements. Food Agr. Organ. UN Studies. 16, 1957.
- FAO - Protein Requirements. Food Agr. Organ. UN Nutr. Meeting Rept. F Ser 37, 1965.

- FAO/WHO - Energy and Protein Requirements; Report of a joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee Wld. Hlth. Org. - Tech. Rep. Series No. 522 Geneva, Swiss, 1973.
- FARBER, L. Chemical evaluation of odor intensity. Food Technol. 3, 300 1949.
- FENTON MAY, R.I.; HILL JR, C.G. & ANUMDSON, C.H. Use of ultrafiltration/Reverse osmosis systems for the concentration and fractionation of whey. J. Food Sci. 36, 14 1971.
- FOOD AND NUTRITION BOARD REPORT - Evaluation of protein nutrition. National Research Council Pub. 711 1959.
- FORBES, F. - Ultrafiltration processing. Chemical and process engineering 49, 1970.
- _____. - Considerations in the optimisation of ultrafiltration. Chem. Eng. 1, 1972.
- FOREMOST. Technical catalog on foretein; USA (1970).
- FRITZ, J.C.; KRAMKE, E.H. & REED, C.A. - Effect of heat treatment on the biological value of soybeans. Poultry Sci. 26, 657, 1947.
- FUGIMAKI, M. et al. Applying proteolytic enzymes on soybeans. 1. Proteolytic enzyme treatment of soybean protein and its effect on the flavor. Food Technol. 22, 889 (1968a).
- GUY, E.J.; VETTEL, H.E. & POLLANSCH, M.J. - Denaturation of cottage cheese whey proteins by heat. J. of Dairy Sci. 50, 828 1967.
- HACKLER, L.R. et al. A comparison of the nutritional value of protein from several soybean fractions. J. Nutrition 80, 205 1963.
- _____; STILLINGS, B.R. & POLIMENI, R.J. - Correlation of aminoacid

- indexes with nutritional quality of several soybean fractions.
Cereal Chem. 44, 638, 1967.
- HAGIKARA, B. - Crystalline bacterial amylase and proteinase. Ann.
Rep. Sci. Works Fac. Sci. Osaka Univ. 2, 35, 1954.
- HIDALGO, J. & HANSEN, P.M.T. - Selective precipitation of whey proteins
with CMC. J. Dairy Sci. 54, 1270, 1971.
- HOLT, L.E. - The digestibility of the proteins of milk and their role
infant nutrition. Arch. Ped. 33, 1916.
- HOWARD, H.W. BAUER, C.D. & BLOCK, R.J. - Complete vs. total protein in
the evaluation of diets. Agr. Food Chem. 8, 486, 1960.
- _____ et al. - The nutritive value of bread flour proteins as
affected by practical supplementation with lactalbumin, non fat dry
milk solids, soybean proteins, wheat gluten and lysine. J. Nutrition
64, 151, 1958.
- HOWE, E.E. - Aminoacid supplementation. Borden's Review of Nutrition
Research 19, 19, 1958.
- INGLETT, G.E. et al. - Using a computer to optimize cereal based food
composition. Cereal Sci. Today 14, 69, 1969.
- IRIARTE, B.J.R. & BARNES, R.H. - The effect of overheating on certain
nutritional properties of the protein of soybeans. J. Food Technol.
20, 131, 1966.
- JOHNSON, D.W. - Isolated soy proteins and soy protein concentrates.
UN Ind. Develop. Organ. Meeting on Soya Bean Processing and Use,
Peoria, Ill. Nov. 17-21. UN, N.Y., 1969.
- KAKADE, M.L. & LIENER, I.E. Anal. Biochem. 27, 273, 1969.

- KIRK, M.C. - Arkansas Agr. Exp. Sta., Bull. 352, 1938.
- KLOSE, A.A.; HILL, B. & FEVOLD, H.L. - Food value of Soybeans as related to processing. Food Technol. 2, 201, 1948.
- KUNITZ, M. Crystallin trypsin inhibitor. J. Gen. Physiology 29, 149, 1946.
- LIENER, I.E. - Effect of heat on plant proteins. In: ALTSCHUL, A.M. ed. Processed plant protein foodstuffs, New York, Academic Press, 1958.
- _____ (Editor) Miscellaneous toxic factors. In: Toxic constituents of plant foodstuffs. New York, Academic Press, 1969.
- _____. - Nutritional value of food protein products. In: SMITH, A. K. & CIRCLE, S.J. Soybeans: chemistry and technology. Westport, AVI, 1972. cap. 7, p.203.
- LONGENECKER, J.B.; MARTIN, W.H. & SARRETTI, H.P. - Protein quality improvement: improvement in the protein efficiency of soybean concentrates and isolates by heat treatment. J. Agr. Food. Chem. 12, 411, 1964.
- MALASPINA, A. & MORETTI, R.H. - Treatment of whey protein. U.S. Patent No. 3.896.241, 1974.
- MARRIOT, W. Mck. & JEANS, P.C. Infant nutrition. 3. ed. St. Louis, C.V. Mosby, 1941. p. 49.
- MATTICK, L.R. & HAND, D.B. - Identification of a volatile component in soybeans that contributes to the rawbean flavor. Agr. Food Chem. 17, 15, 1969.
- MAURON, J. - The analysis of food proteins, aminoacid composition and

- nutritive value. In: PORTER, J.W.G. & ROLLS, B.A. Proteins in hu
man nutrition. London, Academic Press, 1973. Cap. 9, p. 139.
- McDONAUGH, F.E. - Whey concentration by reverse osmosis. Food Eng. 40,
124, 1968.
- McDONOUGH, F.E. Membrane processing, a new tool for whey disposal.
Dairy Ind., Sept., 1971.
- _____ ; MATTINGLY, W.A. & VESTAL, J.H. Protein concentrate from
cheese whey by ultrafiltration. J. of Dairy Sci. 54, 10, 1971.
- McGINNIS, J. & EVANS, R.J. - Aminoacid deficiencies of raw and over
heated soybean oil meal for chicks. J. Nutrition 34, 725, 1947.
- MEYER, E.W. - Soy protein concentrates and isolates. Proc. Inter.
Conf. Soybean Protein Foods., Oct. 1966. USDA, 1967.
- MITCHELL, H.H. & BLOC, R.J. Some relationships between the aminoacid
components of proteins and their nutrition values for the rat. J.
Biol. Chem. 163, 559, 1946.
- MOORE, S.; SPACKMAN, D.H. & STEIN, W.H. Analytical Chem. 30, 1185,
1958.
- MORETTI, R.H. Contribuição ao estudo do fracionamento de soro de quei
jo por ultrafiltração. Campinas, 1973. 82p. Tese (Doutoramento)
- Fac. Tecnol. Alimentos - UNICAMP.
- _____. Desenvolvimento de um reator enzimático ultrafiltrante de
laboratório. Ciencia e Cultura, São Paulo, 27 (7): 497, 1975.
supl. (Resumos. 27. Reunião Anual da SBPC, jul. 1975).
- _____. Enriquecimento de bebidas con proteínas vegetales a nivel
de planta piloto y industrial; aspectos de su comercialización.
IIº Congresso Avanzado de Tecnologia, Bogota, Colombia (1975).

- _____ & PEZOA GUTIÉRREZ, V. - Enzymatic hydrolysis of soybean proteins in a continuous ultrafiltration reactor. IFT Annual Meeting, Anaheim, Calif., 1976.
- MORRISON, M.C. - Economic analysis of acid whey protein recovery. San Diego, Calif., Habens International, 1970. 46p.
- MUELLER, A.J. & COX, W.M. - Comparative nutritive value of casein and lactalbumin for man. J. Nutrition 34, 285, 1947.
- MUNSON, L.S. & WALKER, P.H. - The unification of reducing sugar methods. J. Am. Chem. Soc. 28, 663, 1906.
- MURRAY, T.K. & BAKER, B.E. - Studies on protein hydrolysis. 1. Preliminary observations on the taste of enzymic protein hydrolysates. J. Sci. Food Agr. 3, 440, 1952.
- NAGASE Enzyme. Catalogo tecnico. Denapsin, Japan 1974.
- NOGUCHI, M. et al. - Applying proteolytic enzymes on soybean. 2. Effect of Aspergillo peptidase A preparation on removal of flavor from soybean products. J. Food Sci. 35, 211, 1970.
- ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis I - Background and Theory. Annals of the New York Academy of Sciences. 121, 321, 1964.
- ORTEN, J.M. & ORTEN, A.V. - The comparative value of certain dietary proteins for hemopoiesis in the rat. J. Nutrition 31, 765, 1946.
- OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.B. - Aminoacids in nutrition and growth. J. Biol. Chem. 17, 325, 1914.
- _____. A quantitative comparison of casein, lactalbumin, and edestin for growth or maintenance. J. Biol. Chem. 24, 1 1916.

- _____. The effect of the aminoacid content of the diet on the growth of chickens. J. Biol. Chem. 26, 293, 1916.
- _____. The relative value of certain proteins and protein concentrates as supplements to corn gluten. J. Biol. Chem. 29, 69, 1917.
- _____ & MENDEL, L.B. - The nutritive value of lactoalbumin. J. Biol. Chem. 59, 13, 1924.
- _____ ; MENDEL, L.B. & FERRY, E.L. - A method of expressing numerically the growth promoting value of proteins. J. Biol. Chem. 37, 223 1919.
- PALLANSCH, M.J. - Progress in development of whey-soy drink. Proc. Whey Products Conference, Chicago, 111. Sept 18-19, 48, 1974.
- PEZOA GUTIÉRREZ, V. - Utilização de um reator enzimático contínuo ultrafiltrante para obtenção de hidrolisado proteico. Campinas, 1975. 82p. Tese (Mestrado) - Fac. Tecnol. Alimentos - UNICAMP.
- _____ & MORETTI, R.H. Utilização de um reator enzimático contínuo ultrafiltrante para obtenção de hidrolisado protéico. Ciência e Cultura, São Paulo, 27(7): 495, 1975. suppl. (Resumos. 27. Reunião Anual da SBPC, jul. 1975)
- PORATH, J. & BENNICH, H. - Recycling chromatography. Arch. Biochem. Biophys. 1962, 152. suppl. 1.
- PRONAN. Programa Nacional de Alimentação e Nutrição. Conselho de Desenvolvimento Social, Brasília, Fevereiro (1976).
- PROJECT STAR; laboratory report. Rio de Janeiro, The Coca Cola Export Corp., 1970.
- PURITY. Technical Catalog 1972.

- RACKIS, J.J., ANDERSON, R.L. & SMITH, A.K. Chromatography of soybean proteins. J. Am. Chem. Soc. 81, 6265, 1959.
- REYNA, R.D. et al. - Sueros de queseria; determinación de parametros fisico-quimico, Rev. del ITA, Argentina, 1, 129, 1975.
- RIGGS, L.K.; BEATY, A. & MALLON, B.J. - Nutritive value of whey protein powder. Agr. Food Chem. 3, 333, 1955.
- RODIER, W.I. et al. The acceptability of whey-soy mix as a supplementary food for pre-school children in developing countries. Natik, U.S. Army Natik Lab., 1973. (Technical report, 72-20-PR)
- ROOSEN, J.P. & PILNIK, W. Ultrafiltration controlled enzymatic degradation of soy protein. Process Biochm. 6, 24 (1973)
- RUEGAMER, W.R.; POLING, C.E. & LOCKHART, H.B. - An evaluation of the protein qualities of six partially purified proteins. J. Nutrition 40, 231, 1950.
- SAIO, K. & WATANABE, T. - Preliminary investigation on protein bodies of soybean seeds. Agr. Biol. Chem., Tokio, 30, 1133, 1966.
- SBODIO, O.A. et al. Estudio electroforetico de las proteinas solubles de sueros de queseria. Rev. del ITA, Argentina, 1, 149, 1975.
- SCHEFFÉ, H. An analysis of variance for paired comparisons. J. Am. Statistical Ass. 47, 381, 1952.
- SCRIMSHAW, N.S. & BRESSANI, R. - Vegetable protein mixtures for human consumption. p20. Panel II. Protein and aminoacids in nutrition, Fifth Internacional Congress on Nutrition, Washington, Sept. 1960.
- SMITH, A.K. & CIRCLE, S.J. - Peptization of soybean proteins; extraction of nitrogeneous constituents from oil free meal by acids and bases with and without added salts. Ind. Eng. Chem. 30, 1414, 1938.

- _____. - Isolation and utilization of vegetable proteins. Econ. Botany 8, 291, 1954.
- _____. Vegetable protein isolates. In: ASTCHUL, A.M. Processed Plant Protein Foodstuffs. New York, Academic Press, 1958. p.245.
- SODEK, J. & HOFMANN, T. - Acid proteinase from Rhizopus chinensis. In: PERLMANN, G.E. & LORAND, E., ed. Methods in enzymology. New York, Academic Press, 1976. v. 19, p.391.
- SOTOKAWA, Y. - Nutrition of various enzyme-treated proteins. 1. Eiyo to Shokuryo 21, 163 1968.
- SRIPATHY, N.V. et al. Fish hydrolysates. II. Standardization of digestion conditions for preparation of hydrolysates rich in peptones and proteoses. Food Technol. 5, 141, 1962.
- SUGIMOTO, H., VAN BUREN, J.P. & ROBINSON, W.B. - An enzymatic process for a protein containing beverage based on soybean protein and lemon juice. J. Food Sci 36, 729, 1971.
- SUPPLEE, G.C. & CLARK, E.L. Differential nitrogen retention from casein, lactalbumin, and soy protein and hydrolysates there from. J. Dairy Sci 29, 717, 1946.
- SURREY, K. - Spectrophotometric method for the determination of lipoxylase activity. Plant Physiol. 39, 65, 1964.
- SWAMINATHAN, M. - Availability of Plant Proteins. In: ALBANESE; A.A. ed. Newer Methods of nutritional biochemistry. New York, Academic Press, 1967. v.3.
- TAIRA, H. et al. - Studies on aminoacids contents of processed soybean. XI. Evaluation of nutritional losses of overheated deffated soybean flour. Agr. Biol. Chem., Tokio, 33, 1387, 1969.

- _____. Aminoacid content of processed soybean. X. The influence of added sugars on the heat destruction of the basic and sulfur-containing aminoacids in soybean products. Agr. Biol. Chem., Tokio, 30, 847, 1966.
- TOWNEND, R. et al. The solution properties of β -lactoglobulin C. J. Biol. Chem. 239, 4196, 1964.
- UDVARI, R. & KOHLMANN, R. Papel economico da soja na produção de alimentos industrializados no Brasil (Isolados e Concentrados). Soja Brasileira: Realidade e Perspectivas. Porto Alegre, 6 de agosto de 1976.
- UNITED NATIONS. Internacional Action to avert an impending protein crisis. UN publ. E. 68 XIII 2 (1968).
- USDA. Proceedings of Conference on Soybean Products for Protein in Human Foods, Peoria, Sept. 13-15, 1962.
- USDA. Proceedings of Internacional Conference on Soybean Protein Foods, Peoria, Oct. 17-19, 1967.
- VERMA, S.C. & Mc CALLA, A.G. - Enzymatic hydrolisis of dispersed wheat gluten. Cereal Chem. 43, 28 (1966).
- YOKOYA, F. Comunicação pessoal.
- YOSHIDA, F. - Annual Laboratory Report. Noda, Chiba, Japan, Kikkoman Shoyo, 1972.
- WANG, D. - Report on polivinilic ultrafiltration membrane with a polioliophin support. Aquachem Catalog, 1972.
- WEBER, K. & OSBORN, M. - The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406, 1969.
- WHITAKER, J.R. An introduction to enzymology. Davis, University of California, 1971.