

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**LICERES CORRÊA DE MIRANDA**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS  
ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNAS DO FARELO DE SOJA**

**SÃO CARLOS – SP  
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**LICERES CORRÊA DE MIRANDA**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS  
ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNAS DO FARELO DE SOJA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli**

**Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel de lima Camargo Giordano**

**SÃO CARLOS – SP  
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M672oc Miranda, Liceres Corrêa de.  
Obtenção e caracterização de hidrolisados enzimáticos  
de proteínas do farelo de soja / Liceres Corrêa de Miranda. -  
- São Carlos : UFSCar, 2012.  
125 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2012.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Hidrólise de proteínas. 3.  
Soja. 4. Enzimas. I. Título.

CDD: 664 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LICERES CORRÊA DE MIRANDA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 30 DE MAIO DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:



Paulo Waldir Tardioli  
Orientador, PPGEQ/UFSCar



Raquel de Lima Camargo Giordano  
PPGEQ/UFSCar



Angélica Marquetotti Salcedo Vieira  
DAL/UEM



Roberto de Campos Giordano  
PPGEQ/UFSCar

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Laudo e Kharin, por todo amor, dedicação e incentivo. Ao meu cachorro, Toco, pelo sacrifício das noites em claro e das minhas ausências durante as viagens. Também agradeço aos amigos por entenderem as minhas ausências e principalmente àqueles que souberam me motivar.

Agradeço aos orientadores, professor Dr. Paulo Waldir Tardioli e professora Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano, pela generosidade com que dividem seus conhecimentos e pela enorme paciência. A todos os professores do Departamento de Engenharia Química da UFSCAR, especialmente ao professor Dr. Roberto de Campos Giordano por toda a ajuda prestada. Aos técnicos Tiago, Thais e Amadeus por todo o auxílio. Aos colegas da UFSCar por me acolherem com tanta simpatia, em especial à Fernanda por sua amizade. Às pesquisadoras Dasciana Rodrigues e Cristine de Pretto pela participação na execução dos experimentos.

Agradeço à diretoria da Imcopa – Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A., principalmente ao Sr. Frederico José Busato Júnior, pelo apoio e incentivo. À verdadeira idealizadora deste projeto, Paula Fernandes de Siqueira, obrigada pela confiança. Aos colegas da Imcopa, em especial aos que trabalharam na execução dos testes: Augusto, Rafael, João, Marcos e Blaudemir. Aos amigos Fernanda, Carlos e João por me ajudar, motivar, incentivar ou simplesmente me ouvir.

Agradeço à Novozymes Latin América Ltda. por todo auxílio prestado, representada por Fabrício, Michele, Viviane, Dr. Isaac Ashee e Dr. Morten Fisher.

Agradeço ao Dr. Paulo Tabajara pela consultoria em nutrição animal, ao Dr. Alex Maiorka e aos pesquisadores da UFPR Ananda Portella Félix e Fábio Luiz de Paula Valle pela execução dos testes em animais.

A todos o meu muito obrigada!

## RESUMO

O concentrado proteico de soja (SPC) é utilizado como ingrediente para alimentos e ração animal. É obtido a partir do farelo de soja desengordurado através da extração de açúcares e outros compostos solúveis. A principal consequência do processo de extração é a remoção ou inativação de grande parte dos fatores antinutricionais da soja, o que faz com que este produto possa ser utilizado em substituição de proteínas de origem animal em dietas especiais. Este trabalho teve o objetivo de estudar o processo de hidrólise proteica como alternativa de aumentar o valor agregado do SPC através do melhoramento do seu valor nutricional. O processo de hidrólise tem sido feito há muitos anos com finalidade de melhorar propriedades físico-químicas, organolépticas e valor nutricional de proteínas alimentares. A hidrólise enzimática é a mais adequada quando o objetivo é melhorar o valor nutricional, pois os métodos químicos causam inúmeros efeitos indesejados. Foram estudadas duas proteases alcalinas comerciais: Alcalase<sup>®</sup> e Novo-Pro D<sup>®</sup>. A Novo-Pro D<sup>®</sup> apresentou atividades superiores às da Alcalase<sup>®</sup> em todas as condições de pH testadas. As condições de processo que maximizaram a eficiência da hidrólise do SPC pela Novo-Pro D<sup>®</sup> foram: 55°C, pH 9 e relação enzima/substrato de 0,5% (massa de enzima/massa de proteína). O grau de hidrólise máximo obtido, em três horas de reação nestas condições, foi de aproximadamente 15,2% em escala de bancada e 12,8% em escala piloto. Aumentando-se a concentração de sólidos do meio de reação de 10 para 30%, o grau de hidrólise máximo obtido foi de 11,2%, nas mesmas condições citadas. Avaliou-se a digestibilidade de nutrientes e metabolizabilidade da energia de um SPC hidrolisado com grau de hidrólise de 3,3% contra um SPC não hidrolisado em cães adultos e perus em fase inicial. Em cães, a hidrólise aumentou os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca de 76,5 para 86,2%, da proteína bruta de 83,9 para 90,6% e a energia metabolizável aumentou em aproximadamente 5%. Em perus, o aumento foi de 54,6 para 62,9% para a digestibilidade da matéria seca e 9% de aumento da energia metabolizável.

**PALAVRAS-CHAVE:** Concentrado proteico de soja. Hidrólise de proteínas. Novo-Pro D<sup>®</sup>.

## ABSTRACT

Soy protein concentrate (SPC) is used as an ingredient for food and animal feed. It is obtained from defatted soybean meal by extracting sugars and other soluble compounds. The main consequence of the extraction process is removal or inactivation of most anti-nutritional factors of soybean, which makes this product can be used in place of animal proteins in special diets. This work aimed to study the process of protein hydrolysis as an alternative to increase the value of the SPC through the improvement of their nutritional value. Hydrolysis process has been done many years ago with the purpose of improving physico-chemical, organoleptic and nutritional value of food proteins. Enzymatic hydrolysis is the most appropriate when the objective is to improve the nutritional value, because the chemical methods cause many unwanted effects. We studied two commercial alkaline proteases, Alcalase<sup>®</sup> and Novo-ProD<sup>®</sup>. Novo-ProD<sup>®</sup> showed superior activity than Alcalase<sup>®</sup> in all pH conditions tested. The process conditions that maximized efficiency of the hydrolysis of SPC by Novo-ProD<sup>®</sup> were: 55°C, pH 9 and enzyme/substrate ratio of 0.5% (enzyme mass / protein mass). The maximum degree of hydrolysis obtained in three hours reaction under these conditions was approximately 15.2% in bench scale and 12.8% in pilot scale. Increasing solid concentration of the reaction medium from 10 to 30%, maximum degree of hydrolysis of 11.2% was obtained in the same conditions. Digestibility trial was conducted with SPC hydrolyzate with 3,3% against SPC unhydrolyzed in adult dogs and turkeys in the initial growth phase. In dogs, hydrolysis increased apparent digestibility of dry matter from 76.5 to 86.2%, crude protein from 83.9 to 90.6% and metabolizable energy increased by approximately 5%. In turkeys, the increase was from 54.6 to 62.9% for dry matter digestibility and 9% increase in metabolizable energy.

**KEY WORDS:** Soy protein concentrate. Protein hydrolysis. Novo-ProD<sup>®</sup>.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Utilização do farelo de soja nos Estados Unidos por pecuária, Frangos e animais domésticos (STEIN <i>et al</i> , 2008). .....	20
Figura 2.2 - Diagrama de blocos do processo de extração de óleo de soja por solvente. Adaptado de Johnson <i>et al.</i> (2008). .....	21
Figura 2.3 - Estrutura dos oligossacarídeos presentes na soja. Direita: Estaquiose; Esquerda: Rafinose. Fonte: HILDEBRAND, 2010. ....	26
Figura 2.4 - Diagrama de fluxo do processo de produção de SPC por extração alcoólica. Adaptado de Lusas e Rhee (1995). ....	28
Figura 2.5 - Análise histológica do intestino proximal de salmões do atlântico (a) com dieta a base de farinha de peixe e (b) com dieta a base de farelo de soja desengordurado não tostado (farelo branco). Fonte: REFSTIE <i>et al.</i> , 2005. ....	35
Figura 2.6 - Reação de hidrólise da ligação peptídica (TARDIOLI, 2003) .....	45
Figura 2.7 - Classificação de enzimas proteolíticas (Ward, 1985). ....	46
Figura 2.8 - Mecanismo catalítico da quimiotripsina (VOET e VOET, 1995). ....	48
Figura 2.9 - (a) Grupos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima cataliticamente envolvidos na hidrólise de uma ligação peptídica; (b) intermediário tetraédrico enzima-substrato (VOET e VOET, 1995). ....	49
Figura 2.10 (A) Formação de produto P em função do tempo de reação t, para diferentes concentrações de enzima E, e (B) velocidade inicial de reação ( $\Delta P/\Delta t_1$ ) em função da concentração de enzima (GIORDANO, 1987). ....	52
Figura 3.1 - Fotografia de gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) das enzimas Alcalase <sup>®</sup> e Novo-Pro D <sup>®</sup> .....	61
Figura 3.2 - Curvas de hidrólise de BSA a 60°C catalisada por (a) Alcalase <sup>®</sup> e (b) Novo-Pro D <sup>®</sup> em pH 7(♦), 8(■) e 9(▲). ....	62
Figura 3.3 - Curvas de hidrólise de BSA utilizando a enzima Novo-Pro D em pH 7,0 nas temperaturas de (♦) 45°C; (■) 55°C; (▲) 60°C; (×) 65°C e (*) 70°C. Os pontos foram conectados por linhas suaves para facilitar a visualização e entendimento do gráfico. ....	63
Figura 3.4 - Atividade enzimática inicial, em microequivalente de ligações peptídicas quebradas por grama de proteína por minuto, da enzima Novo-Pro D em BSA, em diferentes condições de temperatura. ....	64



Figura 3.5- Curva de hidrólise de BSA pela enzima Novo-Pro D <sup>®</sup> a 55°C em pH 7,0(♦); 8,0(■); 9,0(▲); e 10(●). Os pontos foram conectados por linhas suaves para facilitar a visualização e entendimento do gráfico.....	64
Figura 4.1 – Distribuição dos desvios para o método das Áreas Cromatográficas. ....	83
Figura 4.2 - Distribuição dos desvios para o método Sousa Jr.....	84
Figura 4.3 - Distribuição dos desvios para o método Silvestre. ....	84
Figura 5.1 Diagrama de blocos do processo de produção do SPC e alterações necessárias para a produção do produto hidrolisado (azul).....	86
Figura 5.2 - Sistema piloto para hidrólise do SPC composto por : (1) bateadeira industrial e (2) módulo de controle TEC-BIO. ....	89
Figura 5.3 - Curvas de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D <sup>®</sup> a 55°C, pH 8,0 com (■) 0,25% (massa de enzima/massa de proteína); (♦)0,5% (massa de enzima/massa de proteína); (▲)1,0% (massa de enzima/massa de proteína e (●) 1,5% (massa de enzima/massa de proteína. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico. ....	93
Figura 5.4 – Velocidades iniciais por unidade de atividade enzimática em diferentes relações enzima/substrato. ....	93
Figura 5.5 Curvas de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D a 0,50%, 55°C, pH 8,0 com diferentes velocidades de agitação: (♦) 300; (■) 400; (▲) 500 e (X) 600 rpm. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico.....	94
Figura 5.6 Curvas de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D a 0,50%, pH 8,0 nas temperaturas de (♦) 45°C; (■) 55°C e (▲) 65°C. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico. ....	94
Figura 5.7 (a) Curvas de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D <sup>®</sup> a 0,50%, 55°C em (♦) pH 8,0; (■) pH 9,0 e (▲) pH 10. (b) pH 8,0 (♦) com enzima e (●) sem enzima. (c) pH 9,0 (■) com enzima e (●) sem enzima. (d) pH 10 (▲) com enzima e (●) sem enzima. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico.....	95
Figura 5.8 Curvas de hidrólise do SPC a 55°C e pH 9 utilizando (♦) 0,5% de Alcalase 2.4L <sup>®</sup> ; (●) 0,5% de Novo-Pro D <sup>®</sup> ; (▲) 1,0% de Alcalase 2.4L <sup>®</sup> e (■) 1,0% de Novo-Pro D <sup>®</sup> . Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico. ....	96
Figura 5.9 Curvas de hidrólise do SPC com Novo-Pro D <sup>®</sup> 0,5%, 55°C e pH 9 (♦) em escala de bancada com 10% de sólidos; (■) em bateadeira industrial com 10% de sólidos e (▲) em bateadeira industrial com 30% de sólidos. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico.....	97

Figura 5.10 – Curva de hidrólise do SPC com Novo-Pro D <sup>®</sup> 0,5%, 55°C e pH 9 (▲) analisada em pHStat; (◆) analisada por OPA. ....	97
Figura 5.13 Hidrólise do SPC com 30% de sólidos. (a) após mistura do farelo com água e correção do pH; (b) após dosagem da enzima; (c) no final do processo de hidrólise. ....	100
Figura 5.14 Hidrólise do SPC com 20% de sólidos. ....	101
Figura 6.1 Cães alojados em gaiolas para avaliação de digestibilidade dos produtos proteicos de soja. ....	104
Figura 6.2 Perus em fase inicial utilizados nas avaliações de digestibilidade, metabolizabilidade da energia e desempenho dos derivados proteicos de soja. ....	107
Figura 6.3 Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS), da matéria orgânica (CDMO), da proteína bruta (CDPB), do extrato etéreo (CDEE), dos extrativos não nitrogenados (CDENN) e da energia bruta (CDEB) dos SPCs em cães adultos (■) SPC não hidrolisado; e (■) SPC hidrolisado. <sup>a,b</sup> Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). ....	110
Figura 6.4 Resultados energia metabolizável do concentrado proteico com e sem hidrólise em cães adultos. <sup>a,b</sup> Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). ....	111
Figura 6.5 Produção de fezes (em gramas de fezes úmida produzida por grama de ração seca ingerida por dia) de cães adultos tratados com a dieta referência, com a dieta referência com 30% de substituição pelo concentrado proteico e com a dieta referência com 30% de substituição pelo concentrado proteico hidrolisado. <sup>a,b,c</sup> Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). ....	112
Figura 6.6 Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS), da proteína bruta (CDPB) e do extrato etéreo (CDEE) do concentrado proteico (■) hidrolisado e (■) não hidrolisado em perus em fase inicial. <sup>a,b</sup> Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). ....	112
Figura 6.7 Resultados energia metabolizável do concentrado proteico com e sem hidrólise em perus em fase inicial de crescimento. <sup>a,b</sup> Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). ....	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição do grão de soja (%m/m). .....	19
Tabela 2.2 - Composição de aminoácidos da proteína de soja em g/100g de proteína. ....	23
Tabela 2.3 - Composição aproximada de SPCs obtidos por três diferentes processos. ....	27
Tabela 2.4 – Composição aproximada do melão de soja.....	29
Tabela 2.5 Resumo de trabalhos da literatura avaliando hidrólise enzimática de proteínas de soja.....	54
Tabela 3.1 - Valores do grau médio de dissociação dos grupos $\alpha$ -NH <sub>2</sub> para diferentes condições de temperatura e pH.....	60
Tabela 3.2 - Teor de proteína e atividade azocaseínolítica (25°C, pH 8,0) das enzimas comerciais Alcalase <sup>®</sup> e Novo-Pro D <sup>®</sup> .....	61
Tabela 3.3 - Comparação das velocidades iniciais de hidrólise de BSA, a 60°C, catalisada pelas enzimas Novo-Pro D <sup>®</sup> e Alcalase <sup>®</sup> em diferentes condições de pH. ....	62
Tabela 4.1 Ensaio de solubilização das proteínas do concentrado proteico de soja.....	68
Tabela 4.2 Valores de $\alpha$ , $\beta$ e $\text{htot}$ para as proteínas alimentares mais comuns.....	71
Tabela 4.3 Padrões utilizados para o estudo de diferentes métodos para a determinação do perfil peptídico em farelo de soja. ....	73
Tabela 4.4 Dados do fracionamento de proteínas e peptídeos usando Superdex 200. Fase móvel: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,2. Fluxo = 0.40 mL/min. Leitura a 214 nm. ...	78
Tabela 4.5 Resultados de solubilidade das proteínas das amostras de concentrado proteico de soja.....	79
Tabela 4.6 Resultados de solubilidade das proteínas dos SPCs em tampão fosfato 20 mM, NaCl 0,25 M, SDS 40g/L e DTT em diferentes concentrações. ....	80
Tabela 4.7 Distribuição da massa molecular do Imcosoy 60 <sup>®</sup> não hidrolisado e desvios dos resultados em relação ao Kjeldahl. ....	81
Tabela 4.8 Distribuição da massa molecular de proteínas do Imcosoy 60 <sup>®</sup> com GH de 6,7% hidrolisado e desvios dos resultados em relação ao Kjeldahl.....	82
Tabela 4.9 Distribuição da massa molecular do Imcosoy 60 <sup>®</sup> com GH de 19,7% hidrolisado e desvios dos resultados em relação ao Kjeldahl. ....	82
Tabela 5.1 Composição centesimal do SPC utilizado nos testes em escala de bancada. Analisado do Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda. ....	91

Tabela 5.2 Composição de aminoácidos do SPC utilizado nos testes em escala de bancada. Analisado do Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda. ....	92
Tabela 5.3 Distribuição de peptídeos dos produtos finais de hidrólise (3 horas) para o processo em escala de bancada e piloto.....	98
Tabela 6.1 ingredientes e composição química da dieta referência utilizada nos testes em cães adultos.....	105
Tabela 6.2 Resultados de análises físico-químicas, toxicológicas e microbiológicas dos produtos proteicos testados na determinação de digestibilidade e metabolizabilidade em cães e perus. ....	109
Tabela 6.3 Distribuição de tamanho das proteínas e peptídeos dos farelos utilizados nos testes de digestibilidade e energia metabolizável.....	110
Tabela 6.4 Características das fezes de cães adultos tratados com a dieta referência, com a dieta referência com 30% de substituição pelo concentrado proteico e com a dieta referência com 30% de substituição pelo concentrado proteico hidrolisado. ....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%m/m	Porcentagem mássica, g/100g
2S, 7S, 11S e 15S	Coefficientes de sedimentação
$A_{366}$	Absorbância a 366 nm
$A_{230}$	Área cromatográfica de uma amostra lida a 230 nm
$A'_{230}$	Área cromatográfica corrigida de uma amostra lida a 230 nm
$A_{280}$	Área cromatográfica da amostra em 280 nm
$A^{tr}_{230}$	Área cromatográfica da tirosina e do triptofano a 230 nm
$A^{trip}_{230}$	Área cromatográfica do triptofano a 230 nm
$A^{tiro}_{230}$	Área cromatográfica da tirosina a 230 nm
$A^{trip}_{300}$	Área do triptofano na amostra em 300 nm
$A^{tiro}_{280}$	Área da tirosina na amostra em 280 nm
$A^{trip}_{280}$	Área do triptofano na amostra em 280 nm
$A^{trip,p}_{300}$	Área do triptofano no padrão em 300 nm
$A^{tiro,p}_{230}$	Área da tirosina no padrão em 230 nm
$A^{tiro,p}_{280}$	Área da tirosina no padrão em 280 nm
$A^{trip,p}_{230}$	Área do triptofano no padrão em 230 nm
$A^{trip,p}_{280}$	Área do triptofano no padrão em 280 nm
Ala	Alanina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
<i>B</i>	Volume de hidróxido de sódio consumido
BBI	Inibidor de tripsina Bowman-Birk
BSA	Albumina de soro bovino
CA	Concentração/Área
CDA	Coefficiente de digestibilidade aparente
CDEB	Coefficiente de digestibilidade da energia bruta
CDEE	Coefficiente de digestibilidade do extrato etéreo
CDENN	Coefficiente de digestibilidade dos extrativos não nitrogenados
CDMO	Coefficiente de digestibilidade da matéria orgânica
CDMS	Coefficiente de digestibilidade da matéria seca
CDPB	Coefficiente de digestibilidade da proteína bruta

Cys	Cistina
DO	Densidade óptica
DT	Dessolventizador tostador
DTSR	Dessolventizador-tostador-secador-resfriador
DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
E/S	Relação entre a massa de enzima e a de substrato
EB	Energia bruta
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EE	Extrato etéreo
EM	Energia metabolizável
ENN	Extrativos não nitrogenados
ES	Complexo Enzima-Substrato
F1-F7	Frações peptídicas de acordo com determinado tempo de retenção
FB	Fibra bruta
GH	Grau de hidrólise
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
<i>h</i>	Hidrólise equivalente
His	Histidina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
<i>h<sub>tot</sub></i>	Número de ligações peptídicas por grama de proteína
kDa	Quilodalton – unidade de massa atômica
HVP	Hidrolisado de proteína vegetal
KM	Constante de Michaelis-Menten
KSTI	Inibidor de tripsina Kunitz
Leu	Leucina
Lis/Lys	Lisina
<i>M</i>	Massa
Met	Metionina
MM	Massa molecular
Mmi	Matéria mineral
MO	Massa orgânica

MP	Massa de proteína
MS	Massa seca
$N_b$	Normalidade da base
NSI	Índice de solubilidade do nitrogênio
OH	Grupo hidroxila
OPA	o-Ftaldialdeído
P	Produto
$P$	Teor de proteína
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PB	Proteína bruta
PC	Peso corporal
PDI	Índice de dispersibilidade da proteína
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Q10	Coeficiente de temperatura
REF	Resultado de uma referência
S	Substrato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SH	Grupo sulfidríla
SPC	Concentrado proteico de soja
SPI	Isolado proteico de soja
t	Tempo
TCA	Ácido tricloroacético
Thr	Treonina
TNBS	Ácido trinitrobenzenosulfônico
tr	tempo de retenção
Tyr	Tirosina
V	Velocidade de reação
Vit.	Vitamina
Vmax	Velocidade máxima de reação
$\alpha$	Grau médio de dissociação dos grupos $\alpha$ -NH <sub>2</sub>

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 SOJA – Histórico, Composição e Aplicações .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Processamento de Soja.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Produtos Proteicos de Soja .....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Concentrado Proteico de Soja (SPC).....</b>	<b>25</b>
2.4.1 Processo de obtenção do SPC por extração alcoólica .....	27
<b>2.5 A Proteína de soja.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Fatores antinutricionais inerentes à proteína de soja .....</b>	<b>32</b>
2.6.1 Inibidores de Protease .....	32
2.6.2 Lectinas .....	33
2.6.3 Antígenos .....	34
<b>2.7 Digestão e Absorção de Proteínas .....</b>	<b>36</b>
2.7.1 Fase I.....	36
2.7.2 Fase II.....	37
2.7.3 Fase III .....	40
2.7.4 Implicações Nutricionais.....	40
<b>2.8 Hidrólise de Proteínas .....</b>	<b>41</b>
2.8.1 Hidrólise ácida de proteínas .....	41
2.8.2 Alterações proteicas causadas por tratamento alcalino .....	42
2.8.3 Hidrólise enzimática de proteínas .....	43
<b>2.9 Enzimas .....</b>	<b>44</b>
2.9.1 Enzimas proteolíticas ou peptídeo hidrolases.....	45
<b>2.10 Cinética enzimática .....</b>	<b>50</b>
2.10.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática .....	50
2.10.2 Influência da concentração de substrato.....	51
2.10.3 Influência da concentração de enzima.....	52
<b>2.11 Hidrólise enzimática de proteínas de soja .....</b>	<b>53</b>
<b>3. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES PARA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1 Introdução.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2 Materiais e Métodos .....</b>	<b>57</b>
3.2.1 Dosagem de proteína.....	58
3.2.2 Determinação do tamanho molecular das enzimas .....	58



3.2.3	Determinação da atividade específica .....	58
3.2.4	Ensaio de hidrólise.....	59
<b>3.3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>3.4</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>64</b>
<b>4.</b>	<b>DETERMINAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DO CONCENTRADO PROTEICO DE SOJA HIDROLISADO .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>66</b>
<b>4.2</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>67</b>
4.2.1	Solubilização das proteínas do SPC .....	67
4.2.2	Determinação do Grau de Hidrólise (GH).....	70
4.2.3	Separação Cromatográfica .....	72
4.2.4	Dosagem de proteína das frações coletadas na separação cromatográfica .....	73
4.2.5	Análise dos Cromatogramas pelo Método das Áreas Cromatográficas .....	74
4.2.6	Análise dos Cromatogramas pelo Método Sousa Jr. ....	74
4.2.7	Análise dos Cromatogramas pelo Método Silvestre.....	75
4.2.8	Estudo comparativo dos métodos de análise .....	77
<b>4.3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>78</b>
<b>4.4</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>84</b>
<b>5.</b>	<b>OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CONCENTRADO PROTEICO DE SOJA .....</b>	<b>86</b>
<b>5.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>86</b>
<b>5.2</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>87</b>
5.2.1	Relação Enzima/Substrato.....	87
5.2.2	Influência da velocidade de agitação.....	88
5.2.3	Condições de pH e Temperatura .....	88
5.2.4	Comparação da Novo-Pro D <sup>®</sup> com a Alcalase 2.4L <sup>®</sup> .....	88
5.2.5	Aumento de escala e variação do teor de sólidos no meio de reação .....	89
5.2.6	Determinação dos perfis peptídicos de amostras com diferentes graus de hidrólise .....	90
5.2.7	Avaliação da solubilidade proteica em água de farelos com diferentes graus de hidrólise .....	90
5.2.8	Comparação entre os resultados de GH obtidos pelos métodos pHStat e OPA .....	91
<b>5.3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>91</b>
<b>5.4</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b>ESTUDO DE DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E METABOLIZABILIDADE ENERGÉTICA DO SPC HIDROLISADO EM CÃES E PERUS .....</b>	<b>102</b>
<b>6.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>102</b>
<b>6.2</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>103</b>

6.2.1	Produção e caracterização dos produtos proteicos testados em animais .....	103
6.2.2	Avaliação dos produtos proteicos em cães .....	104
6.2.3	Avaliação dos produtos proteicos em perus em fase inicial .....	106
6.2.4	Cálculos e análise estatística .....	108
<b>6.3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>108</b>
6.3.1	Caracterização dos farelos proteicos utilizados nos testes em animais .....	108
6.3.2	Avaliação dos produtos proteicos em cães .....	110
6.3.3	Perus em fase inicial.....	112
<b>6.4</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>115</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>116</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A soja é extremamente importante para a economia brasileira, pois é a oleaginosa mais cultivada em todo o mundo e movimentada bilhões de dólares anuais sendo o Brasil o segundo maior produtor e exportador mundial.

Além do óleo de soja para consumo humano e animal, o principal produto obtido da soja é o farelo, que contém cerca de 50% de proteína e é a base proteica da alimentação animal. A partir do farelo, podem-se obter diversos produtos de alto valor agregado baseados em proteína de soja.

A proteína de soja “*in natura*” não é de boa qualidade nutricional, pois contém diversos fatores antinutricionais que interferem no desempenho de animais e podem causar alergias em humanos. A tecnologia de processamento de soja para consumo animal se baseia no tratamento térmico para inativação destes fatores. Esse tratamento é satisfatório para a maioria das aplicações (rações para aves, suínos, gado, etc.), entretanto, algumas criações requerem produtos mais refinados.

Para atingir o mercado de rações para criação de peixes nobres e substitutos de leite para vitelos e leitões desenvolveu-se o Concentrado Proteico de Soja (SPC – *Soy Protein Concentrate*), no qual grande parte dos fatores antinutricionais ainda existentes no farelo tostado foram inativados, seja pelo tratamento térmico adicional ou pela lavagem com etanol.

Procurando melhorar ainda mais a disponibilidade e o valor agregado da proteína de soja, a Imcopa – Importação, Exportação e Indústria de Óleos S/A, líder mundial na fabricação de concentrados proteicos de soja, em parceria com o grupo de pesquisa em Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de São Carlos e a Novozymes Latin America Ltda., tem estudado o desenvolvimento de produtos baseados em proteína de soja hidrolisada enzimaticamente.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática das proteínas do concentrado proteico de soja, visando à obtenção de um produto composto de pequenos peptídeos, a fim de melhorar a digestibilidade e a qualidade nutricional dos aminoácidos constituintes.

Para atingir os objetivos do trabalho, inicialmente selecionou-se uma protease que operasse satisfatoriamente a alta temperatura e pH alcalino, necessários para maior solubilização das proteínas do concentrado proteico de soja (Capítulo 3).

A fim de se avaliar a distribuição de tamanho dos peptídeos, houve a necessidade de se selecionar um método cromatográfico que permitisse representar os perfis reais de tamanho molecular (Capítulo 4).

As condições pré-selecionadas para hidrólise de proteínas (enzima, pH e temperatura) foram validadas na hidrólise de proteínas do concentrado proteico de soja (Capítulo 5). Nesta etapa do trabalho, estudou-se a influencia de importantes variáveis operacionais na hidrólise das proteínas, a saber, concentração de enzima, pH, temperatura e velocidade de agitação. As condições pré-estabelecidas para a hidrólise das proteínas do concentrado proteico de soja foram testadas em escala piloto, onde variou-se também a concentração de sólidos no reator.

Por fim, foi conduzido um estudo de digestibilidade com cães e perus comparando-se o concentrado proteico de soja com o mesmo farelo após processo de hidrólise.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SOJA – Histórico, Composição e Aplicações

As primeiras citações do grão aparecem no período entre 2883 e 2838 a.C., quando a soja (*Glycine max (L) Merrill*) era considerada um grão sagrado, ao lado do arroz, do trigo, da cevada e do milho. Os Estados Unidos iniciaram sua exploração comercial na segunda década do século vinte. Hoje a soja é a mais cultivada de todas as sementes oleaginosas em todo o mundo (HYMOWITZ, 2008).

Os grãos de soja maduros são quase esféricos e variam consideravelmente dependendo do cultivar e condições de crescimento. A semente de soja consiste de três partes principais: casca, cotilédone e gérmen ou hipocótilo. A casca contém o hilo, que é o ponto de ligação com a vagem. A soja é uma semente dicotiledônea, na qual os dois cotilédones são unidos pela casca. Na remoção da casca, os cotilédones se separam e o germe é desalojado. A soja comercial contém cerca de 8% de casca, 90% de cotilédone e 2% de hipocótilo (PERKINS, 1995). A composição do grão de soja é mostrada na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1 - Composição do grão de soja (%m/m).**

<i>Componentes</i>	<i>Rendimento</i>	<i>Proteína</i>	<i>Óleo</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Carboidratos</i>
Soja inteira	100	40,3	21,0	4,9	33,9
Cotilédone	90,3	42,8	22,8	5,0	29,4
Casca	7,3	8,8	1,0	4,3	85,9
Hipocótilo	2,4	40,8	11,4	4,4	43,4

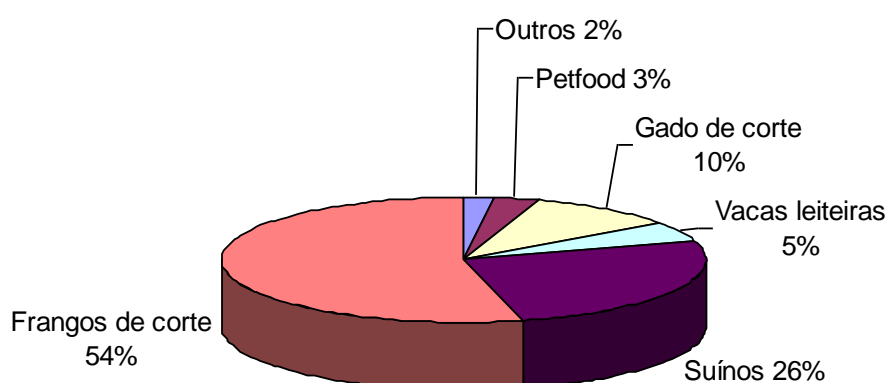
Fonte: PERKINS, 1995.

Entre os cereais e outras espécies de leguminosas, a soja tem o mais alto teor de proteína (acima de 40%). Outras leguminosas, por exemplo, canola, têm teores de proteína entre 20% e 30%, ao passo que os cereais têm teores de proteína na faixa de 8-15%. Outros componentes valiosos encontrados nos grãos de soja incluem fosfolipídios, vitaminas e isoflavonas (FISHER, 2006).

A soja é aplicada a uma variedade de produtos, incluindo pães, bolos e petiscos. Apesar de uso amplo em diferentes alimentos, apenas uma pequena percentagem da produção global de proteína de soja entra nesses produtos. Os grãos de soja de hoje são

cultivados principalmente para a produção de óleo vegetal para consumo humano, mas, como um subproduto, o farelo de soja está se tornando cada vez mais importante. Numa escala global, a soja está dominando o mercado para farelos proteicos, devido ao seu alto teor de proteína e boa disponibilidade. Isto torna a soja um excelente ingrediente nas formulações de rações. A soja representa 70-80% de todos os farelos ricos em proteína, fornecidos aos animais de criação intensiva nos Estados Unidos. A União Europeia é um dos mercados líderes para a importação de farelo de soja. Uma grande parte deste farelo entra na ração para a produção de animais monogástricos (Figura 2.1). A soja é particularmente importante para a produção de aves, constituindo aproximadamente 40% de uma dieta padrão de soja/milho, uma vez que os frangos de corte e as poedeiras precisam de uma elevada proporção de proteína nas suas dietas (FISHER, 2006).

**Figura 2.1 - Utilização do farelo de soja nos Estados Unidos por pecuária, Frangos e animais domésticos (STEIN *et al*, 2008).**



## 2.2 Processamento de Soja

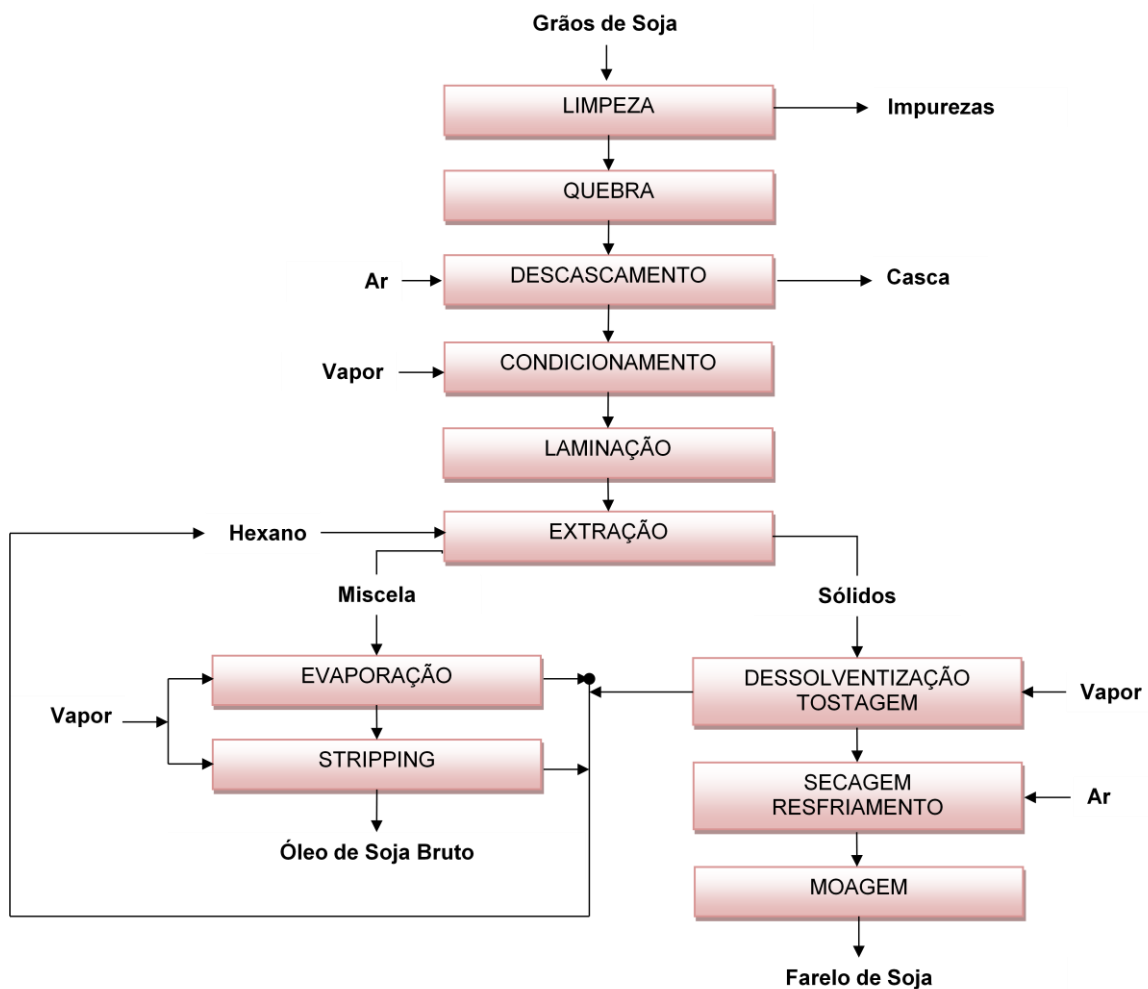
O processamento de soja mais comumente utilizado envolve a remoção do óleo por extração com solvente; o óleo é posteriormente processado. O farelo proteico residual é de alta qualidade e é usado na alimentação humana e animal. A casca pode ser removida ou deixada no farelo. O farelo de soja comum é principalmente utilizado em ração animal e seu processamento se resume na dessolventização, tostagem e moagem dos flocos desengordurados. O conteúdo proteico do farelo de soja comum varia de 44-48% de acordo com a quantidade de casca que é deixada ou adicionada ao farelo. O farelo descascado e

desengordurado contém cerca de 17% de açúcares solúveis e 21% de carboidratos insolúveis (PERKINS, 1995).

A soja é uma importante fonte de óleo comestível, no entanto, 60-70% dos rendimentos do processamento de soja são devidos à venda de farelo. Nenhuma outra oleaginosa contém níveis tão altos de proteína. Logo, os processos usados para a extração de óleo são projetados para maximizar a quantidade de farelo para uso na alimentação animal (JOHNSON *et al.*, 2008).

O processamento da soja para obtenção de óleo e farelo comum está mostrado no diagrama da Figura 2.2.

**Figura 2.2 - Diagrama de blocos do processo de extração de óleo de soja por solvente. Adaptado de Johnson *et al.* (2008).**



A Limpeza é usualmente a primeira etapa do processo, materiais indesejáveis como caules, vagens, folhas, grãos quebrados, sujeira, areia, pequenas pedras e sementes estranhas são removidos através de peneiras vibratórias, em alguns casos com aspiração. Os grãos limpos são quebrados por moinhos de rolos compostos de dois rolos corrugados girando um em direção ao outro com um rolo girando ligeiramente mais rápido do que o outro. Na quebra os grãos são partidos em 6-8 pedaços e a casca se solta integralmente. Peneiras vibratórias, aspiradores e mesas gravitacionais podem ser utilizados para separar a casca da polpa, pois as cascas são maiores e menos densas. A parede celular da soja é bastante impermeável ao solvente de extração, portanto, precisa ser rompida. Isto requer a laminação dos fragmentos da polpa por compressão das partículas. Para isso, a soja é previamente condicionada (aquecida) em cozedores verticais ou condicionadores de tubo rotatório a temperatura de 60-70°C por 10-15 minutos. A Laminação é feita passando os fragmentos condicionados através de um conjunto de dois rolos de superfície lisa. Como na quebra, os rolos giram em velocidade apropriada e diferencial e devem estar em paralelo. A umidade das lâminas influencia a eficiência de extração por solvente, na maior parte dos casos, 9,5-10,5% de umidade é ideal (JOHNSON *et al.*, 2008).

Na extração, o solvente atualmente utilizado é o hexano. Existem muitas variações de método de extração (por imersão ou percolação; contínuo ou semi-contínuo) e modelos de extratores (Desmet, Rotocell, Crown, entre outros). Em todos os processos da atualidade o fluxo do solvente em relação ao das lâminas é contracorrente para reduzir a quantidade de solvente utilizada. O processo dura de 30-60 minutos e o residual de óleo no material extraído é inferior a 1%. Na extração de óleo de soja, menos de uma parte de hexano é utilizada para cada parte de soja laminada extraída. A micela (solvente contendo o óleo extraído) que deixa o extrator contém 22-30% de óleo e é enviado para as colunas de evaporação e *stripping* para separar o óleo do hexano (JOHNSON *et al.*, 2008).

A massa sólida que deixa o extrator é dessolventizada e tostada em um aparelho vertical que combina a evaporação do solvente com uma cocção úmida denominado dessolventizador-tostador (DT). Esse equipamento consiste de sete estágios. O vapor direto entra no segundo estágio, sendo distribuído pelo farelo no terceiro estágio através de venezianas laterais. O solvente é eliminado quase completamente nos dois primeiros estágios, com simultânea umidificação do farelo, que adquire um teor de 18% a 20% de umidade. Nos estágios seguintes, o farelo é tostado e, a fim de reduzir esse teor de umidade ao limite desejado, o material é novamente seco após a saída do tostador. O tempo de permanência do



farelo no tostador é de cerca de uma hora e a temperatura nos estágios individuais é de 85°C a 115°C. O produto final é moído e armazenado em silos e sua umidade não deve ultrapassar 12% (MANDARINO e ROESSING, 2001).

### 2.3 Produtos Proteicos de Soja

Produtos proteicos de soja referem-se tipicamente a produtos processados de soja secos que não o farelo comum utilizado em rações animais. Muitos produtos proteicos de soja têm sido utilizados em alimentação humana, *pet foods*, substitutos de leite e rações iniciais para animais jovens (DEAK *et al.*, 2008).

A qualidade de um produto proteico é determinada pelo seu perfil de aminoácidos e pela disponibilidade ou digestibilidade dos aminoácidos constituintes. O perfil de aminoácidos da proteína de soja está mostrado na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2 - Composição de aminoácidos da proteína de soja em g/100g de proteína.**

Alanina	4,5	Lisina	6,6
Arginina	7,7	Metionina	1,4
Ácido aspártico	12,1	Fenilalanina	5,2
Cistina	1,5	Prolina	5,6
Ácido Glutâmico	18,9	Serina	5,3
Glicina	4,4	Treonina	4,2
Histidina	2,7	Triptofano	1,4
Isoleucina	4,9	Tirosina	3,9
Leucina	8,1	Valina	5,4

Fonte: PERKINS, 1995.

A utilização de produtos de soja em alimentos pode ser limitada devido à presença de fatores antinutricionais associados ao grão de soja como saponinas, fitoesteróis, oligossacarídeos, fitato, antígenos, inibidores de protease e lectinas. A presença destes compostos pode influenciar direta ou indiretamente na digestibilidade da proteína de soja. Os fatores antinutricionais associados à proteína, que serão apresentados em maior detalhe no item 2.6, podem ser completa ou parcialmente inativados através de tratamento térmico. No farelo de soja comum, esta inativação é feita através do processo de tostagem. O tratamento térmico excessivo, por outro lado, pode alterar de maneira indesejável a estrutura das

proteínas tornando-as menos acessíveis e reduzindo a disponibilidade da lisina e, em menor extensão, de outros aminoácidos via reação de Maillard (CAPRITA, *et al.* 2010).

Testes de laboratório são necessários para avaliar se as amostras de produtos proteicos receberam tratamento térmico adequado. Os testes comumente utilizados são:

- a) Atividade Ureática: baseado no aumento de pH gerado pelo desprendimento de amônia resultante da degradação da ureia catalisada pela atividade residual de urease na amostra. Quanto maior a intensidade do tratamento térmico, menor a atividade ureática e vice-versa (CAPRITA, *et al.* 2010).
- b) Solubilidade da Proteína em KOH: a amostra é moída e incubada por 20 minutos a temperatura ambiente em solução de hidróxido de potássio 0,2%. O teor de proteína desprendido no sobrenadante é quantificado e a solubilidade é dada como porcentagem da proteína existente na amostra inicial. Quanto maior a intensidade do tratamento térmico, menor a solubilidade da proteína na amostra (CAPRITA, *et al.* 2010).
- c) Índice de Solubilidade do Nitrogênio (NSI – *Nitrogen Solubility Index*): é também baseado na solubilidade da proteína contida na amostra, porém neste ensaio a amostra moída é incubada por 2 horas a 30°C em água deslilada sob agitação lenta (120 rpm). O resultado é expresso em porcentagem do nitrogênio total que é solubilizado nas condições do teste (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY – AOCS, 2004).
- d) Índice de Dispersibilidade da Proteína (PDI – *Protein Dispersibility Index*): porcentagem da proteína total que é solubilizada em água destilada após 10 minutos de agitação a 8.500 rpm e 25°C (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY – AOCS, 2004).

Dentre os produtos proteicos de soja o menos processado é a *Farinha de Soja*, obtida por moagem e peneiramento do grão de soja descascado e contém 40% de proteína. A *Farinha Desengordurada de Soja* é obtida por moagem e peneiramento do farelo descascado e desengordurado e contém 52-54% de proteína. Estas farinhas são disponíveis no mercado em várias granulometrias e com vários graus de solubilidade da proteína, inclusive na forma enzima-ativa (DEAK *et al.*, 2008). São denominados produtos enzima-ativa, as farinhas nas quais a enzima lipoxigenase está ativa, tais produtos são desejáveis na indústria de panificação, pois os pigmentos carotenoides existentes na farinha de trigo contribuem bastante

para um aspecto amarelado indesejável nos miolos de pães ou em pré-misturas. A farinha de soja enzima-ativa é utilizada na formulação juntamente com a farinha de trigo, a lipoxigenase ativa degrada os pigmentos e produz uma farinha clara (REGITANO-D'ARCE, 2006).

A farinha desengordurada pode ser adicionada de óleo refinado para obtenção de um produto diferenciado que pode conter até 30% de óleo em sua composição. São usadas quando o sabor do óleo de soja bruto não é aceitável. Também a partir da farinha desengordurada podem-se obter as *Farinhas Lecitinadas* para aplicações em que se deseja rápida dispersibilidade da farinha facilitada pela ação emulsificante da lecitina (DEAK *et al.*, 2008).

O *Concentrado proteico de soja (SPC - Soy protein concentrate)* e o *Isolado proteico de soja (SPI - Soy protein isolate)* são obtidos a partir do farelo desengordurado, também denominado por “farelo branco”, submetido a um processo de extração adicional (LUSAS e RIAZ, 1995).

O principal objetivo ao se produzir o SPC é a remoção de compostos de sabor e aroma fortes e de açúcares causadores de flatulência (estaquiase e rafinose), no entanto, outros compostos solúveis e alguns minerais são também extraídos. Por consequência, o teor de proteínas e fibras alimentares é aumentado (LUSAS e RIAZ, 1995). O processo de produção dos SPCs será mais detalhadamente apresentado no item 2.4.

Farelos brancos e farinhas moídas com alto PDI são utilizados como matéria-prima para produção de SPIs. A proteína é solubilizada em pH de 6,8-10 e 27-66°C utilizando hidróxido de sódio ou outro agente alcalino. A solução de proteínas é então separada dos flocos ou farinha insolúveis por centrifugação. Os sólidos que, após secagem até 6-7% de umidade, contêm 16-36% de proteínas, 9-13% de fibra-bruta e 45-75% de fibra dietética total são comercializados para uso em alimentos. A solução é então acidificada a pH 4,5, por utilização de ácido clorídrico ou fosfórico, e a proteína é precipitada como um coalho. As proteínas coaguladas sofrem sucessivas lavagens com água para aumento da pureza e são neutralizadas a pH 6,5-7,0 ou secas em Spray-dryer na forma ácida (LUSAS e RIAZ, 1995).

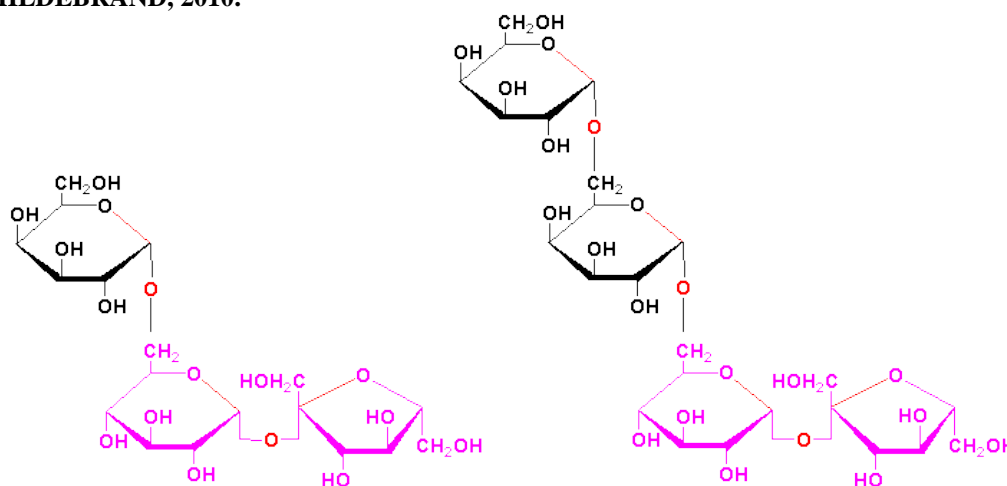
#### **2.4 Concentrado Proteico de Soja (SPC)**

O Concentrado Proteico de Soja deve conter, no mínimo, 65% (m/m) de proteína em base seca e, em sua maior parte, são farinhas em que componentes solúveis em

água ou álcool, especialmente açúcares promotores de flatulência e compostos de sabor forte, são extraídos (DEAK *et al.*, 2008).

O acúmulo de gases intestinais resulta da presença de oligossacarídeos  $\alpha$ -ligados, principalmente estaquiose e rafinose (Figura 2.3). Estes açúcares são não redutores e são compostos por uma ou duas unidades de galactose ligadas à sacarose. Humanos e animais monogástricos não possuem  $\alpha$ -1,6-galactosidase em sua mucosa intestinal e quando estes açúcares são ingeridos, passam pelo intestino delgado e são metabolizados no intestino grosso pela microflora intestinal conduzindo a produção de gás (LIENER, 1994).

**Figura 2.3 - Estrutura dos oligossacarídeos presentes na soja. Direita: Estaquiose; Esquerda: Rafinose. Fonte: HILDEBRAND, 2010.**



O processo de obtenção do SPC consiste em imobilizar a proteína enquanto os compostos solúveis são lixiviados. Existem três procedimentos básicos (LUSAS e RHEE, 1995):

- Extração do farelo comum com solução alcoólica 20 a 80% (m/m), preferivelmente 60%;
- Lixiviação ácida do farelo comum com água em pH 4,5 (ponto isoelétrico das proteínas de soja);
- Desnaturação da proteína por calor úmido e extração com água.

As composições aproximadas de SPCs obtidos pelos três processos estão mostradas na Tabela 2.3. A diferença mais óbvia está no teor de cinzas que é menor nos concentrados preparados por ácido ou calor-água, indicando maior remoção de minerais. Cerca de 5-10% dos carboidratos remanescentes são solúveis, os demais são polissacarídeos

insolúveis (LUSAS e RHEE, 1995). O processo alcoólico é muitas vezes referido como “processo tradicional” e está descrito no item 2.4.1.

**Tabela 2.3 - Composição aproximada de SPCs obtidos por três diferentes processos.**

<i>Componente</i>	<i>Processo Alcoólico</i>	<i>Processo Ácido</i>	<i>Processo Calor-água</i>
Proteína	67%	66%	68%
Umidade	6,0%	6,0%	5,0%
Óleo	0,3%	0,3%	0,1%
Fibra Bruta	3,5%	3,4%	3,8%
Cinzas	5,6%	4,8%	3,0%
Carboidratos*	17,6%	19,5%	20,1%

\*Calculado por diferença.

Fonte: LUSAS e RHEE, 1995.

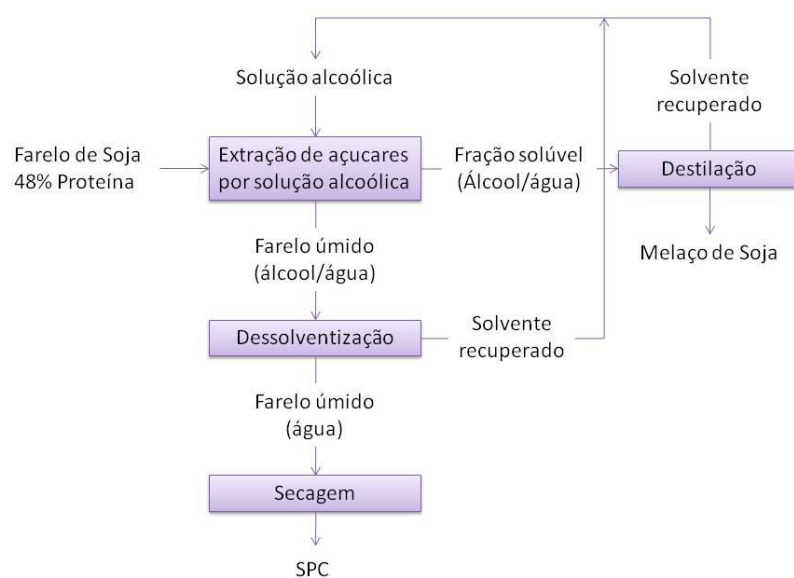
#### **2.4.1 Processo de obtenção do SPC por extração alcoólica**

A Figura 2.4 mostra o diagrama de fluxo do processo de obtenção de SPC por extração alcoólica. A extração é feita em extrator contínuo, em contracorrente. Os modelos normalmente utilizados são os fabricados pela *Crown Iron Works*, *DeSmet* ou *Rotocel*. O farelo é alimentado no extrator através de roscas e deve fazer um leito com altura que varia de 20 até 200 cm para assegurar boa percolação. A temperatura de alimentação do álcool varia desde a temperatura ambiente até o ponto mais próximo possível do ponto de ebulição do álcool, sendo tanto melhor a extração quanto mais alta for a temperatura do álcool. A quantidade de álcool adicionada no extrator também varia. Essa variação ocorre de acordo com a quantidade de farelo que entra no extrator, sendo de 3-6 litros de solução alcoólica por kg de farelo (BUSATO JUNIOR, 2009).

O farelo, após sair do extrator é passado por uma prensa para a retirada do excesso de umidade. A prensa retira normalmente até 30 pontos percentuais de umidade do farelo. Esta umidade é para este processo, álcool e água. A umidade que a prensa retirou é realimentada no extrator, pois contém certa quantidade de solução alcoólica que poderá ser utilizada na extração. A umidade do farelo na entrada da prensa é normalmente de 45 até 75%. Na saída da prensa, o farelo possui uma umidade de 25 até 55%. Ao sair da prensa, o farelo é alimentado no dessolventizador. Neste equipamento, o farelo é alimentado na parte superior e vai descendo em contato direto com os pratos. Estes pratos contam com

aquecimento por vapor e o calor dos pratos é passado ao farelo e desta maneira o álcool (nos primeiros pratos) e a água (nos pratos seguintes) vão sendo forçados para fora da superfície do farelo, por ebulição. Para facilitar o processo de recuperação do solvente e diminuição da umidade do farelo, alguns pratos contam com aquecimento direto, ou seja, injeção direta de vapor no farelo. Conforme o farelo desce dentro do equipamento, sua temperatura sobe, até que deixa o dessolventizador com temperatura de 90 – 107°C e 25% de umidade (BUSATO JUNIOR, 2009).

**Figura 2.4 - Diagrama de fluxo do processo de produção de SPC por extração alcoólica. Adaptado de Lusas e Rhee (1995).**



Após deixar o dessolventizador, o farelo é alimentado em um secador, para que a umidade final do produto possa ser obtida. O secador abaixa a umidade do farelo de 20-25% para 8-15%. Esse processo ocorre por contato indireto de vapor com o farelo, por meio de um feixe tubular, aumentando sua temperatura. Depois do secador, o farelo deve ser resfriado em um resfriador. Neste equipamento o farelo entra com uma temperatura próxima a 85°C e é resfriado com ar para uma temperatura próxima a temperatura ambiente. O resfriador, por injetar uma corrente de ar forçado contra o leito de farelo ajuda no processo de secagem deste farelo. Assim, a umidade pode cair até quatro ou cinco pontos percentuais após o produto

passar pelo resfriador. Na saída do resfriador, o farelo está pronto para ser estocado e comercializado (BUSATO JUNIOR, 2009).

Além de utilizar um dessolventizador, um equipamento de secagem e um equipamento de resfriamento, pode-se utilizar um equipamento também conhecido como DTSR (dessolventizador – secador – resfriador) que possui em um equipamento apenas, a função de dessolventização, secagem e resfriamento. Desta forma, o farelo sai de dentro deste equipamento já pronto para ser estocado e comercializado, dentro de suas especificações (BUSATO JUNIOR, 2009).

A corrente líquida que sai do extrator segue para a desalcoolização, para recuperação de todo o álcool utilizado no processo e, finalmente, para a concentração dos açúcares, gerando o chamado melaço de soja, que é um produto composto de água e açúcares com teores variando de 30 até 97% de açúcares em água. Mais preferencialmente com a composição de acordo com a Tabela 2.4 (BUSATO JUNIOR, 2009).

**Tabela 2.4 – Composição aproximada do melaço de soja.**

<i>Parâmetros</i>	<i>Valores (Intervalo)</i>
Umidade (%)	20 – 30
Sólidos Totais (%)	70 – 80
Cinzas (%)	16 – 20
Açúcares (°Brix)	75
Glicose (%)	0,20 - 0,50
Frutose (%)	1,0 – 1,5
Galactose (%)	2,6 – 3,0
Sacarose (%)	17 – 26
Rafinose (%)	9 – 10
Estaquiose (%)	17 – 19
Carboidratos Totais (%)	54 – 60

Fonte: BUSATO JUNIOR, 2009.

O melaço de soja consiste de um xarope marrom viscoso com sabor agridoce característico. Pode ser utilizado como ingrediente em misturas para ração, como auxiliar de peletização ou pode ser adicionado ao farelo de soja ou à casca (CHAJUSS, 2004). Pode também ser utilizado como fonte de carbono para processos fermentativos como, por

exemplo, na produção de etanol (SIQUEIRA, *et al.*, 2008) e de ácido láctico (KARP, *et al.*, 2011). Siqueira (2010) desenvolveu uma caldeira geradora de vapor que utiliza o melão de soja concentrado como combustível. Além das aplicações citadas, o melão pode ainda ser utilizado para recuperação e purificação de compostos como isoflavonas, saponinas, lecitinas, entre outros.

## 2.5 A Proteína de soja

Tradicionalmente, as proteínas de soja foram classificadas usando uma extração sequencial por uma série de solventes (FUKUSHIMA, 1991). Com base em seus padrões de solubilidade, as proteínas de sementes leguminosas são divididas em albuminas hidrossolúveis e globulinas solúveis em solução salina. Aproximadamente 80% das proteínas presentes no farelo de soja estão na forma de globulinas de reserva. A maior parte das proteínas de soja são insolúveis em água no seu ponto isoelétrico, mas são solubilizadas na presença de sal. Estudos feitos em proteínas de soja por ultracentrifugação analítica revelaram a presença de 4 frações com coeficientes de sedimentação 2S, 7S, 11S e 15S (KOSHIYAMA, 1969). Estas frações não são homogêneas, mas contêm uma mistura de proteínas.

Foi relatado que a fração 2S contém de 8 a 22% da proteína de soja extraível por tampão fosfato (pH 7,6) e consiste de várias enzimas e proteínas pequenas com uma massa molecular média de 26 kDa (CATSIMPOOLAS e EKENSTAM, 1969; WOLF, 1970). Os inibidores de protease estão incluídos nesta fração. A fração de proteína 15S compreende aproximadamente 5% da proteína extraível total e é composta principalmente de polímeros das outras proteínas de soja (WOLF, 1970; PARKKONEN *et al.*, 1997).

As principais proteínas da soja são  $\beta$ -conglucina (7S) e glicina (11S). A  $\beta$ -conglucina é constituída de subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$ , e  $\beta$ , com massas moleculares de 84, 72 e 51 kDa, respectivamente. A glicina tem subunidades ácidas (36-40 kDa) e básicas (18-20 kDa) (GARCIA *et al.*, 1998; RIBLETT *et al.*, 2001).

A glicina é a maior fração das proteínas totais do grão, 25-35%, sendo composta por no mínimo seis subunidades não idênticas, totalizando uma massa molecular de 350 kDa. Cada subunidade tem um polipeptídeo ácido associado a um básico por ligações dissulfeto e ligações de hidrogênio (GARCIA *et al.*, 1998; LIU, 1997; SATHE *et al.*, 1987). Os polipeptídeos ácidos têm pontos isoelétricos que variam de 4,75 a 5,4. Os polipeptídeos básicos podem ser separados em três grupos que têm pontos isoelétricos de 8,0, 8,25 e 8,5,



respectivamente (KOSHIYAMA, 1983). Além destas subunidades a soja pode apresentar uma banda de menor intensidade, ao redor de 15 kDa. Riblett *et al.*, (2001), comentaram que esta banda é outra subunidade da glicinina, uma vez que quando as frações 7S e 11S foram avaliadas separadamente, ela foi revelada somente na eletroforese da glicinina.

A fração 7S da proteína de soja compreende cerca de 35% da proteína solúvel. Esta fração contém enzimas, várias hemaglutininas e predominantemente uma fração protéica conhecida como globulinas 7S. Aproximadamente 85% da fração 7S é composta de  $\beta$ -conglucina (THANH e SHIBASAKI, 1976). Esta proteína heterogênea tem estrutura quaternária trimérica e é glicosilada para cerca de 5%. A  $\beta$ -conglucina é composta de sete combinações diferentes das subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$ , e  $\beta$ . As sete combinações B<sub>0</sub>.B<sub>6</sub> são  $\beta\beta\beta$ ,  $\beta\beta\alpha'$ ,  $\beta\beta\alpha$ ,  $\beta\alpha\alpha$ ,  $\beta\alpha\alpha'$ ,  $\alpha\alpha\alpha'$ ,  $\alpha\alpha\alpha$ , respectivamente (FUKUSHIMA, 1991). As subunidades não estão associadas covalentemente, mas por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (BOGRACHEVA *et al.*, 1996). Em forças iônicas baixas, a  $\beta$ -conglucina existe como um trímero que tem massas moleculares variando de 140.000 a cerca de 170.000 Da. A  $\beta$ -conglucina não tem grupos SH livres, e, em média, tem duas ligações dissulfeto por molécula trimérica. Em altas forças iônicas, a  $\beta$ -conglucina forma oligômeros com massa molecular de aproximadamente 280.000 a 350.000 Da e um coeficiente de sedimentação de 9S. O ponto isoelétrico da  $\beta$ -conglucina trimérica é 4,64 (KOSHIYAMA, 1983).

Devido a diferenças na composição e na estrutura, as globulinas 7S e 11S exibem diferenças nas características nutricionais e funcionais: todas as subunidades da  $\beta$ -conglucina são glicoproteínas, contendo 4-5% de carboidratos e somente uma pequena porção da glicinina é glicosilada; a 11S tem 3 a 4 vezes mais metionona e cisteína do que a 7S, e tem melhor formação de gel, enquanto a 7S tem melhor capacidade emulsificante (LIU, 1997).

Além das proteínas citadas acima, a parede celular vegetal contém proteínas estruturais que desempenham papel importante na arquitetura da parede por meio de ligações cruzadas com outros componentes. Dentre elas, a melhor descrita é a extensina, que constitui aproximadamente 5% da camada primária dos vegetais dicotiledôneos. É uma glicoproteína constituída de cerca de 40% de hidroxiprolina e outros aminoácidos, lisina, serina e tirosina. Este último está envolvido em ligações cruzadas com compostos fenólicos contribuindo para a insolubilidade da proteína na parede (DA-SILVA *et al.*, 1997; WALDRON *et al.*, 2003).

As proteínas podem reagir reversível ou irreversivelmente com os compostos polifenólicos reduzidos ou oxidados. Quando reduzidos a reação se dá por ligações de

hidrogênio ou interações hidrofóbicas; quando oxidados seus produtos de oxidação, as quinonas, formam ligações covalentes com grupos sulfidrilos (cisteína) e  $\epsilon$ -amino (lisina) (SGARBIERI, 1996).

Showalter (1993) cita quatro classes de proteínas em paredes celulares: proteínas ricas em glicina; proteínas ricas em prolina; lectinas e proteínas de arabinogalactanos.

## **2.6 Fatores antinutricionais inerentes à proteína de soja**

O valor nutritivo da proteína de soja é afetado de forma negativa pela presença de fatores antinutricionais. Os fatores antinutricionais caracterizados em melhor forma são inibidores de protease, lectinas, fitato e compostos fenólicos. Além disso, oligossacarídeos e epítomos alergênicos de proteínas de reserva também estão considerados entre os fatores antinutricionais da soja (FISHER, 2006).

De acordo com Proll *et al.* (1998) as leguminosas de maneira geral podem conter fatores antinutricionais e outras substâncias nocivas a saúde, desta forma, grãos não convencionais com potencial de uso na alimentação, devem ser testados em dietas animais antes da utilização em dietas humanas.

### **2.6.1 Inibidores de Protease**

Os inibidores de proteases são proteínas de ampla distribuição no reino vegetal, capazes de inibir as atividades da tripsina, quimotripsina, amilase e carboxipeptidase (XAVIER-FILHO e CAMPOS, 1989). Geralmente, são denominados como inibidores da primeira enzima contra a qual foram testados e na maioria das pesquisas foi investigada a tripsina (SGARBIERI e WHITAKER, 1982).

Os inibidores de proteases na soja incluem inibidores de tripsina e quimiotripsina. Os inibidores de tripsina são proteínas com capacidade para inibir a maioria das serina-proteases (DIPIETRO e LIENER, 1989). Conhecem-se duas famílias: o inibidor de tripsina de soja Kunitz (KSTI) e o inibidor de tripsina Bowman Birk (BBI).

A molécula BBI consiste de 71 aminoácidos e tem um massa molecular de 7,8 kDa. A proteína pode formar dímeros e trímeros em solução, o que explica sua associação com as outras proteínas 2S. A molécula BBI é altamente simétrica e se compõe de vários

anéis mantidos juntos pela presença de 7 ligações dissulfeto. Embora muitas proteínas de soja sejam pobres em aminoácidos que contêm enxofre, este inibidor tem 14 de seus 71 aminoácidos compostos de cisteína. O sítio de inibição de tripsina é a ligação entre lisina-16 e serina-17. Embora normalmente a tripsina clivaria uma ligação Lis-Ser, parece que a estrutura em anel rígido na qual existe esta ligação frequentemente evita a clivagem. Embora a tripsina se ligue a esta proteína, não pode clivar a ligação e não é facilmente liberada para clivar outras moléculas. Na extremidade oposta da molécula, a ligação entre leucina-43 e serina-44 interage com quimiotripsina. Esta ligação tampouco é clivada. Embora denominada inibidor de tripsina Bowman-Birk, a proteína também pode inibir a atividade de quimiotripsina, dependendo das condições experimentais (LIENER, 1994).

A molécula KSTI é composta de 181 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 21,5 kDa (LIENER, 1994). Tem duas ligações dissulfeto, tornando-a uma molécula menos rígida do que o inibidor Bowman-Birk. Arginina-63 e isoleucina-64 formam a ligação no sítio ativo do inibidor. A tripsina cliva esta ligação, mas a enzima não é liberada do inibidor.

A estabilidade térmica dos inibidores de proteases depende de sua massa molecular e do grau de estabilização da conformação ativa por ligações dissulfeto. O inibidor de Bowman-Birk da soja é mais estável ao calor e as variações do pH do que o inibidor de Kunitz, devido às diferenças de tamanho e número de ligações dissulfeto (SGARBIERI e WHITAKER, 1982).

## **2.6.2 Lectinas**

A definição de lectina mais completa foi formulada por Kocourek e Horejsi citados por Etzler (1985). De acordo com estes autores, lectinas são proteínas não pertencentes ao sistema imunológico, porém capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se reversivelmente a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios.

As lectinas ou hemaglutininas podem ser caracterizadas e detectadas por sua habilidade em aglutinar eritrócitos, em certos casos com alta especificidade (LIS e SHARON, 1973; ASKAR, 1986). Algumas lectinas são específicas em suas reações com grupos sanguíneos humanos ABO e MN e subgrupo A1 (SHARON e LIS, 1972). Todos estes efeitos são produzidos pela habilidade das lectinas de se ligarem a tipos específicos de açúcares na

superfície celular (DESHPANDE e DAMODARAN, 1990). Além dessas propriedades, as lectinas podem promover estimulação mitogênica de linfócitos e aglutinação de células cancerosas (LIS e SHARON, 1973; LIENER, 1981).

Embora muitas lectinas reconheçam e se liguem a açúcares simples tais como glicose, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina ou fucose, a afinidade é muito maior para com os constituintes de glicoproteínas: ácido siálico e N-acetilgalactosamina contendo cadeias de glicanos, encontrados em animais e seres humanos (NICOLSON, 1974; PEUMANS e VAN DAMME, 1996).

As alterações frequentes, produzidas em animais experimentais após injeção de lectina, são o surgimento de inflamação intensa com destruição das células do epitélio, edema, hiperemia, hemorragia em tecidos linfáticos, degeneração gordurosa e necrose do fígado e lesões do miocárdio e sistema vascular (JAFFÉ, 1969).

Em animais, efeitos tóxicos de lectinas após ingestão oral, podem ser devido à habilidade destas substâncias em ligar-se a sítios receptores específicos na superfície das células intestinais, acarretando interferência não específica na absorção de nutrientes (LIENER, 1981).

As alterações da função fisiológica causada por lectinas no intestino parecem ser produtos da sua estabilidade aos processos digestivos e a especificidade pelas células da mucosa intestinal em diferentes regiões (BRADY *et al.*, 1978). Contudo, não há evidências de que as lectinas presentes nos alimentos apropriadamente processados sejam tóxicas ao homem (DESHPANDE, 1992).

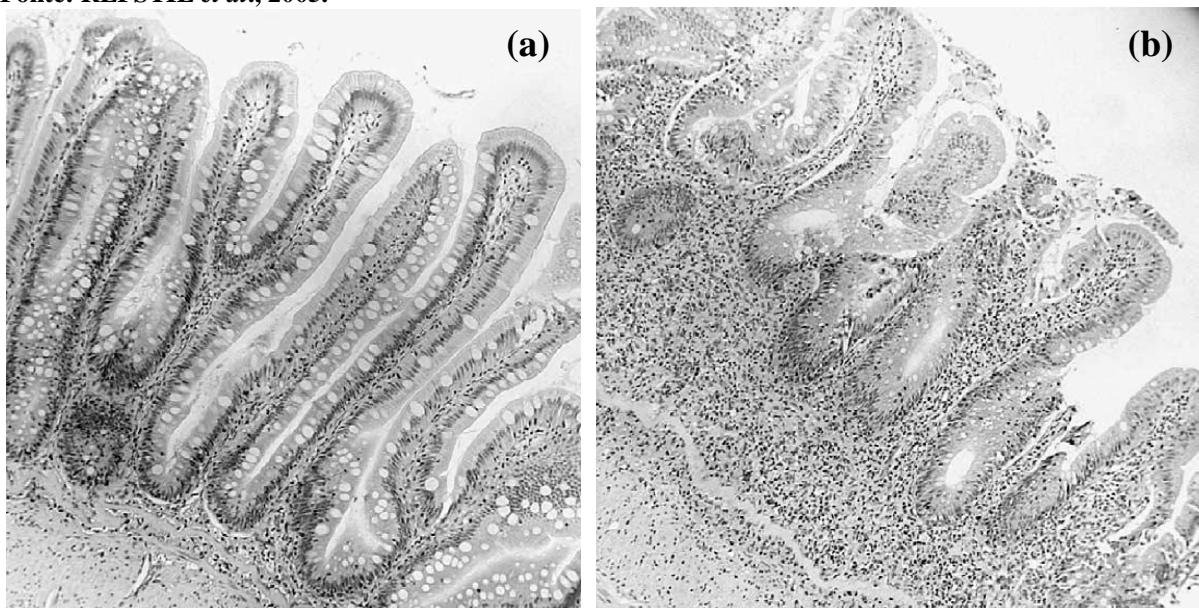
### **2.6.3 Antígenos**

Os fatores antinutricionais termo lábeis como os inibidores de protease e as lectinas são largamente desativados pela etapa de tostagem da produção do farelo de soja, entretanto, muitos fatores antinutricionais são termo estáveis. Entre os mais críticos em estudo estão os ainda não identificados fatores que causam alterações patomorfológicas no intestino distal de salmonídeos. A Figura 2.5 mostra imagens de microscopia óptica de seções de intestino proximal de salmões do atlântico obtidas em estudo realizado por Refstie *et al.*, (2005). O tecido proveniente dos peixes alimentados com farinha de peixe apresentou-se normal (Figura 2.5a), enquanto o tecido proveniente dos peixes alimentados com farelo branco apresentou graves infiltrações inflamatórias (Figura 2.5b).

Utilizando extratos salinos de soja em um estudo em coelhos, Petersen (1988) identificou mais de 34 frações proteicas antigênicas diferentes capazes de estimular o sistema imune dos animais. Reportou que estes antígenos são capazes de sensibilizar suínos, vitelos e humanos.

Segundo Suida (2012), o fator relacionado com a alta inclusão do farelo de soja nas dietas pós-desmame tem especial importância porque os animais reagem sensivelmente a algumas frações particulares da proteína da soja. Estas frações são bastante resistentes à digestão enzimática, um processo que se mostrou deprimido em leitões desmamados. Isto também poderia explicar porque alguns pesquisadores observaram melhores desempenhos e menos diarreias quando os animais receberam dietas complexas no lugar das dietas simples. Em geral, o efeito da produção de uma “dieta complexa” é o de substituir o farelo de soja, que possui proteína antigênica, pela proteína menos antigênica, como a farinha de peixe e produtos lácteos, por exemplo. Mudanças abruptas no tipo de dieta imposta aos leitões por ocasião do desmame podem resultar em uma resposta imune anormal. Antígenos presentes na soja, particularmente a glicinina e a beta-conglicinina, são responsáveis por uma reação de hipersensibilidade que resulta na produção indesejável de anticorpos contra a soja antes que o sistema imune alcance a tolerância imunológica (SOUZA, 2011).

**Figura 2.5 - Análise histológica do intestino proximal de salmões do atlântico (a) com dieta a base de farinha de peixe e (b) com dieta a base de farelo de soja desengordurado não tostado (farelo branco). Fonte: REFSTIE *et al.*, 2005.**



## 2.7 Digestão e Absorção de Proteínas

Todas as espécies animais requerem altos níveis de suplementação de aminoácidos na dieta para manutenção e síntese de proteínas corporais. Proteínas são transportadoras de aminoácidos na natureza. A função crítica do trato gastrointestinal é a hidrólise destas proteínas em aminoácidos livres e liberação destes na circulação sanguínea. O trabalho é realizado em três fases: I) no lúmen intestinal; II) na membrana da mucosa intestinal e III) no citoplasma do epitélio intestinal (ADIBI, 1985).

### 2.7.1 Fase I

Proteínas são digeridas no lúmen intestinal por enzimas gástricas e pancreáticas. O suco gástrico contém diversas classes de enzimas proteolíticas, o principal grupo é o das pepsinas. Pepsinas são secretadas como pepsinogênio, mas na presença de ácido são autocataliticamente ativadas pela clivagem de um pequeno peptídeo do pepsinogênio.

A proteólise no estômago requer pH abaixo de 5. Portanto, ao entrar no duodeno, onde o pH é acima de 5, enzimas gástricas não tem atividade proteolítica. A digestão de proteínas no duodeno e em outras partes do intestino é feita pelas enzimas pancreáticas. A secreção pancreática contém diversas enzimas proteolíticas incluindo tripsina, quimotripsina, elastina e carboxipeptidase. Estas enzimas também são secretadas na forma inativa. A conversão do tripsinogênio em tripsina requer enteroquinase, uma enzima secretada pela mucosa intestinal. A tripsina, por sua vez, é responsável pela conversão do quimotripsinogenio em quimotripsina, proelastase em elastase e procarboxipeptidase em carboxipeptidase. Os produtos de ação destas enzimas são aminoácidos livres e oligopeptídeos. Oligopeptídeos não são hidrolisados no lúmen, pois não são substratos adequados para as enzimas pancreáticas. (ADIBI, 1985).

Foi estudada a digestão “*in vivo*” pelo monitoramento da concentração de albumina de soro bovino no lúmen intestinal de indivíduos saudáveis após ingestão de dieta balanceada contendo 50g de proteína (ADIBI e MERCER, 1973). Os resultados mostraram que a digestão completa da albumina de soro bovino requer todo o comprimento do intestino delgado por mais de 4 horas. Apesar de a maior parte da digestão (60%) ocorrer no intestino delgado proximal, uma fração significativa da proteína ingerida atinge o íleo. Uma pequena

fração da proteína escapa da digestão e atinge o íleo terminal. A quantidade total de proteína que passou para o cólon sem digestão durante o período de 4 h pós-prandial foi de 500 mg.

Aminoácidos livres e oligopeptídeos acumularam no lúmen dos indivíduos que ingeriram a dieta. Os oligopeptídeos foram principalmente dipeptídeos, tripeptídeos e tetrapeptídeos. A concentração de aminoácidos na forma de peptídeos aumentou agudamente no jejuno e no íleo. Este aumento foi mais pronunciado no jejuno que no íleo. A concentração de aminoácidos livres foi bastante modesta em ambos. Estes aumentos de concentração de peptídeos e aminoácidos no intestino não foram encontrados quando a dieta teste foi administrada sem a inclusão da albumina de soro bovino (ADIBI e MERCER, 1973). Estes resultados indicaram que a função da membrana com borda em escova do epitélio intestinal é limpar a mistura de aminoácidos e peptídeos do lúmen intestinal (ADIBI, 1985).

## **2.7.2 Fase II**

A membrana com borda em escova do epitélio intestinal limpa os produtos da digestão protéica por três mecanismos separados. Os aminoácidos são absorvidos por sistemas transportadores de aminoácidos; di- e tripeptídeos são absorvidos por sistemas transportadores de peptídeos; e oligopeptídeos com mais de três aminoácidos são hidrolisados a produtos absorvíveis por enzimas peptídeo hidrolases.

### **2.7.2.1 Sistema transportador de aminoácidos**

Apesar de diversos sistemas transportadores de aminoácidos já terem sido descritos, existem evidências que apontam para a existência de apenas dois deles. Um é largamente responsável pelo transporte de aminoácidos neutros, como leucina e metionina, o outro é responsável pelo transporte de aminoácidos básicos, como lisina e arginina. Apesar destes sistemas transportadores não terem sido isolados para permitir sua análise química, muita informação está disponível sobre suas características funcionais, inclusive seus requerimentos por energia e sódio e suas afinidades por diferentes aminoácidos (ADIBI, 1985).

O transporte de aminoácidos neutros e básicos é ativo, o que significa que ele requer despesa energética, o transporte ocorre contra um gradiente de concentração maior nos enterócitos. Sob condição favorável do metabolismo energético, quando preparações de

intestino delgado são incubadas com um aminoácido, as concentrações intracelulares geralmente excedem as concentrações extracelulares. Este fenômeno usualmente não ocorre “*in vivo*”, porque os aminoácidos são transferidos para a circulação sanguínea (ABIDI E MERCER, 1973).

Quando o jejuno de humanos saudáveis é perfundido com soluções teste contendo concentrações equimolares de 18 aminoácidos, um padrão de absorção altamente reprodutível e consistente é obtido. Metionina e aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) exibem as maiores taxas de absorção, ácido glutâmico e aspártico exibem as menores taxas. Diversos fatores parecem explicar esse padrão. Primeiramente, aminoácidos com cadeias laterais longas tem maior afinidade com os sítios de absorção e conseqüentemente maior taxa de absorção. Segundo, aminoácidos com cadeias laterais positivas ou negativas não tem forte afinidade como os aminoácidos neutros para os sítios de absorção e conseqüentemente são absorvidos mais lentamente. Terceiro, aminoácidos com alta afinidade inibem competitivamente a absorção de aminoácidos com baixa afinidade (ABIDI, 1985).

Finalmente, estudos de perfusão em segmentos do intestino de humanos saudáveis mostraram que a capacidade do transporte de aminoácidos é muito maior no jejuno que no íleo. Os sistemas transportadores em ambos os segmentos, entretanto, parecem se comportar similarmente. Por exemplo, aminoácidos com cadeias laterais mais lipofílicas são preferidas em ambos os segmentos (ADIBI, 1985).

### **2.7.2.2 Sistema transportador de peptídeos**

Por muito tempo acreditou-se que a absorção de aminoácidos livres era o único mecanismo de assimilação de proteínas. Essa noção tornou-se insustentável, tendo em conta uma série de estudos que mostraram absorção em grande escala de di-e tripeptídios no intestino de humanos e animais experimentais. Evidências indicam que existe apenas um único sistema transportador de peptídeos, pois peptídeos neutros, ácidos e básicos competem pelo mesmo sistema de transporte. Aparentemente, a captação de peptídeos, ao contrário da captação de aminoácidos, é indiferente à carga líquida das cadeias laterais dos aminoácidos. Todavia, o sistema transportador de peptídeos é substrato-específico, considerando que não transporta aminoácidos ou peptídeos com mais de três resíduos (ADIBI, 1985).



A absorção intestinal de aminoácidos a partir de soluções de dipeptídeos e tripeptídeos difere quantitativamente e qualitativamente daquelas de soluções contendo resíduos de aminoácidos daqueles peptídeos na forma livre. Por exemplo, quando as taxas de absorção jejunal de glicina e leucina a partir de soluções contendo estes aminoácidos como glicil-L-leucina são comparados com a absorção dos mesmos aminoácidos na forma livre, duas importantes diferenças foram observadas. Primeiro, as taxas de absorção dos aminoácidos na forma de dipeptídeos foram significativamente maiores que dos aminoácidos livres. Segundo, a diferença de absorção entre a glicina e a leucina, que ocorre porque glicina inibe a absorção de leucina, é muito menor com dipeptídeos do que com os aminoácidos livres. Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que o sistema transportador de peptídeos é muito mais eficiente que o de aminoácidos neutros. Além do mais, a falta de hidrólise antes da absorção em grande parte evita que o sistema de transporte de aminoácidos neutros exerça a sua preferência por leucina sobre glicina (ADIBI, 1985).

### **2.7.2.3 Peptídeo Hidrolases**

A atividade de peptídeo hidrolase é muito baixa no lúmen intestinal, considerando que a mucosa intestinal é rica nestas enzimas. Diversas peptídeo hidrolases têm sido isoladas da membrana em borda em escova. Dentre estas enzimas, as aminooligopeptidases parecem ser predominantes. Aminooligopeptidases removem sequencialmente um aminoácido da extremidade aminoterminal de oligopeptídeos. Apesar de os substratos para as peptídeo hidrolases de membrana serem peptídeos de dois a oito resíduos de aminoácidos, a atividade hidrolítica contra estes peptídeos varia notavelmente. As atividades, expressas como porcentagem da atividade celular total, são 5-10% para dipeptídeos, 10-60% para tripeptídeos, 90% para tetrapeptídeos e 98% para peptídeos maiores. Estes dados mostram uma notável coordenação entre hidrólise e sistema de transporte para a assimilação de peptídeos. A atividade hidrolítica é menor para peptídeos que podem ser transportados intactos e maior contra os que não podem. Portanto, a principal função das enzimas da borda em escova parece ser hidrolisar peptídeos não absorvíveis em produtos absorvíveis (di- tripeptídeos e aminoácidos). Além do mais, estas enzimas desempenham um papel importante na assimilação intestinal de certos tripeptídeos que são pouco solúveis em água, como trileucina (ADIBI, 1985).

### 2.7.3 Fase III

Diversas peptídeo hidrolases foram isoladas do citoplasma de células epiteliais do intestino delgado. Estas enzimas são diferentes daquelas encontradas na borda em escova. O substrato para as enzimas citoplasmáticas são peptídeos de dois a quatro resíduos de aminoácidos. As atividades expressadas como porcentagem da atividade celular total foram 80-95% para dipeptídeos, 30-60% para tripeptídeos, 10% para tetrapeptídeos e nenhuma para peptídeos maiores. Com isso, as enzimas citoplasmáticas parecem muito especializadas em completar a hidrólise dos peptídeos absorvidos. Devido à alta atividade de hidrolase contra di e tripeptídeos, dificilmente os peptídeos absorvidos acumularão nas células da mucosa ou alcançarão a circulação intactas. Certos peptídeos, entretanto, podem atingir a veia porta hepática na forma intacta. Exceto por peptídeos que contêm prolina, os peptídeos que alcançam a circulação sistêmica são eficientemente hidrolisados por tecidos extra intestinais no sangue (ADIBI e MORSE, 1982).

### 2.7.4 Implicações Nutricionais

Pacientes incapazes de comer devido à perda de apetite ou doenças no trato gastrointestinal podem necessitar de nutrição enteral (ADIBI, 1985). Uma importante consideração na nutrição enteral é a escolha da fonte de nitrogênio. As escolhas disponíveis são misturas de aminoácidos livres e proteínas hidrolisadas. Em geral, experiências com aminoácidos livres não têm apresentado resultados favoráveis. Eles são hipertônicos e podem causar diarreia. Além disso, nutrição enteral com aminoácidos como fonte de nitrogênio tem mostrado pouca retenção de nitrogênio, pois o nitrogênio ingerido é convertido em uréia ao invés de proteínas corporais (SMITH *et al.*, 1982).

Di e tripeptídeos são superiores a aminoácidos livres para nutrição enteral por várias razões. Eles são mais eficientemente absorvidos, e a substituição dos aminoácidos em soluções enterais reduz ou elimina o problema de hipertonicidade. Contudo, muitas preparações enterais têm usado hidrolisados proteicos como fonte de nitrogênio (ADIBI, 1985).

Um hidrolisado proteico é uma mistura de aminoácidos livres e peptídeos de tamanho e composição variados. O tamanho e composição determinam se um peptídeo é substrato para o sistema transportador de peptídeo. Por exemplo, oligopeptídeos com mais de

três resíduos de aminoácidos não são transportados pelo sistema transportador, logo, a taxa de absorção para uma solução destes peptídeos poderá ser consideravelmente inferior à encontrada para aminoácidos livres. Outro problema com hidrolisados proteicos é a possibilidade de que aminoácidos presentes possam inibir a atividade de peptídeo hidrolases da mucosa. Estes problemas poderiam ser resolvidos com a utilização de misturas cristalinas de di e tripeptídeos com composição de aminoácidos apropriada. Entretanto, estas misturas não são disponíveis comercialmente. Neste caso, hidrolisados proteicos parecem ser superiores a aminoácidos cristalinos como fonte de nitrogênio para nutrição enteral (ADIBI, 1985).

## **2.8 Hidrólise de Proteínas**

Aminoácidos livres e pequenos peptídeos com composições pré-definidas são desejáveis do ponto de vista nutricional. Podem ser obtidos sinteticamente ou a partir de hidrólise de proteínas que pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas (ADLER-NISSEN, 1986). No entanto, tanto o tratamento ácido quanto o alcalino oferecem diversas desvantagens, seja por consequência de reações adversas, pela severidade das condições operacionais ou pela composição do produto final.

### **2.8.1 Hidrólise ácida de proteínas**

Produtos obtidos por hidrólise ácida de proteínas vegetais tem aplicação na indústria de alimentos por apresentarem sabor característico que imita carne. São utilizados em temperos, molhos, caldos, sopas, alimentos congelados, produtos cárneos, alimentos para cães e gatos, etc. Estes produtos são internacionalmente conhecidos pela sigla HVP (*Hydrolysate Vegetable Protein*) e estão disponíveis no mercado nas formas líquida, pastosa ou pó.

O gosto de um alimento é devido à reação entre moléculas do alimento com os sítios receptores da língua ou do palato. As moléculas que mais contribuem para o sabor do alimento são pequenos fragmentos de proteínas. Aminoácidos e peptídeos produzidos por hidrólise de proteínas podem ser amargos ou doces dependendo dos aminoácidos e de sua sequência na proteína. Além disto, aminoácidos e peptídeos são quimicamente reativos e, portanto, podem se envolver em inúmeras transformações como, por exemplo, a reação com

açúcares redutores que dá origem a aromas e pigmentos denominada reação de Maillard. Neste contexto, os HPVs são utilizados como realçadores de sabor, já que contêm aminoácidos, açúcares e muitos compostos intermediários e de degradação que contribuem para as reações de sabor (JARUNRATTANASRI, 2008).

O processo de produção de HVPs consiste em se adicionar de 2 a 7,5 vezes (m/m) ácido clorídrico, com concentração de 15-30% (m/m), sobre o material proteico a 100-120°C por 4-8 horas. O material proteico pode ser glúten de trigo ou de milho, farinhas desengorduradas de soja, algodão, amendoim, isolados proteicos, entre outros. O hidrolisado apresenta coloração marrom escura podendo ser tratado com carvão ativado. O produto é então neutralizado com hidróxido de sódio a valores de pH entre 4 e 6,8 (BELOHLAWEK, 1989).

O produto resultante da hidrólise ácida, após neutralização, contém cerca de 40% de sal em sua composição e 80% do total de aminoácidos na forma livre (AASLYNG, *et al.*, 1998), fatores que impossibilitam sua utilização como fonte proteica em dietas. Além disso, a reação dá origem a uma classe de compostos organoclorados denominados cloropropanóis (VELÍŠEK, *et al.*, 2002) que tem sido estudados devido a sua atividade carcinogênica para estabelecimento dos níveis aceitáveis destas substâncias nos HPVs.

### **2.8.2 Alterações proteicas causadas por tratamento alcalino**

Tratamentos alcalinos brandos a pH 8 ou 9 aparentemente causam pouco dano às proteínas, no entanto, tratamentos severos a altos valores de pH podem causar alterações e reduzir severamente o valor nutricional de proteínas e ainda levar a uma possível toxicidade. As três principais alterações causadas são: racemização de aminoácidos, destruição de aminoácidos e formação de ligações cruzadas (HURRELL e FINOT, 1985).

Treonina, lisina e cist(e)ina são os aminoácidos mais suscetíveis à destruição. Serina, arginina e histidina podem também ser destruídos em grande quantidade. Sob condições alcalinas severas, todos os aminoácidos, essenciais e não essenciais, podem ser extensivamente ou completamente racemizados. Os aminoácidos essenciais mais sensíveis a racemização são metionina, fenilalanina e treonina, enquanto que serina, ácido aspártico e histidina são possivelmente os aminoácidos mais facilmente racemizados (HURRELL e FINOT, 1985).

Lisoalanina é uma ligação cruzada formada pela reação da lisina com a desidroalanina, que é produto da degradação da cist(e)ina e da serina. A lisoalanina tem sido estudada principalmente pela sua habilidade de causar citomegalia renal em ratos. Podem ainda ocorrer outras ligações cruzadas via desidroalanina dando origem a compostos denominados ornitinoalanina e lantionina. Estas ligações cruzadas podem reduzir a digestibilidade proteica (HURRELL e FINOT, 1985).

Todos os fatores supracitados oriundos de tratamento alcalino causam a perda de sítios de ataque enzimático. Ligações peptídicas L-D, D-L e D-D são resistentes ao ataque enzimático. Além disso, Friedman *et al.* (1981) reportaram em suas pesquisas sobre a influência de diferentes teores de lisinoalanina e D-aminoácidos na digestibilidade da caseína que parte do nitrogênio absorvido não foi metabolizado por ratos, provavelmente devido à absorção de D-aminoácidos ou outros aminoácidos modificados que foram excretados na urina.

### **2.8.3 Hidrólise enzimática de proteínas**

A utilização de proteases específicas apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado final e, ainda, a formação mínima de subprodutos (MANNHEIM e CHERYAN, 1992).

O processo de hidrólise enzimática tem se destacado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade, poder emulsificante, textura, tendo grande aplicabilidade em vários produtos alimentícios. As proteases têm sido utilizadas para a modificação de proteínas, como na hidrólise de soja e outros vegetais, para a solubilização de concentrados de peixes, amaciamento de carnes, hidrólise de caseína, na melhoria da textura de queijos, aumentando assim, significativamente, a qualidade e o valor nutritivo dos produtos (CHEFTEL *et al.*, 1989).

Além da melhoria das propriedades funcionais e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas através do tratamento enzimático. Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois é sabido que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção (GRIMBLE *et al.*, 1986). Diversos autores têm demonstrado que fórmulas contendo um elevado teor de oligopeptídeos, especialmente, di- e

tripeptídeos, são utilizadas mais efetivamente pelo organismo do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta, apresentando assim um maior valor nutritivo (GRIMBLE *et al.*, 1986; BOZA *et al.*, 2000).

Uma desvantagem encontrada no processo de hidrólise enzimática é o desenvolvimento de sabor amargo no decorrer da catálise, o qual parece estar relacionado à liberação de grupamentos hidrofóbicos que se encontram no interior das moléculas proteicas. Esta característica representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolisados (SAHA e HAYASHI, 2001).

Entretanto, alguns procedimentos podem ser utilizados para o mascaramento do sabor amargo de hidrolisados proteicos, tais como adição de compostos para mascarar sabor, aplicação de cromatografia hidrofóbica, adsorção de peptídeos amargos, hidrólise com exopeptidases, adição de *Lactobacillus*, formação de plasteína, tratamento com carvão ativado e extração com solventes orgânicos (SAHA e HAYASHI, 2001).

Desta forma, fica evidente que o controle dos parâmetros hidrolíticos nas modificações enzimáticas das proteínas constitui uma etapa importante para se obter produtos com qualidade nutricional elevada, propriedades funcionais desejáveis e características organolépticas agradáveis ao consumidor.

## 2.9 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos, sendo em sua maioria, polímeros constituídos por aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes. Os catalisadores atuam diminuindo a energia de ativação de uma determinada reação, tornando assim mais rápida a obtenção do produto. As reações não catalisadas requerem mais energia para ser iniciada, por isso, sua velocidade é menor que as reações catalisadas. As enzimas têm sua atividade determinada pelas características estruturais das proteínas. A sequência de aminoácidos (estrutura primária) de uma proteína determina a sua estrutura tridimensional, que por sua vez, determina as suas propriedades. Cada enzima tem seu próprio mecanismo de catálise, uma vez que são altamente específicas (LENINGHER *et al.*, 1995).

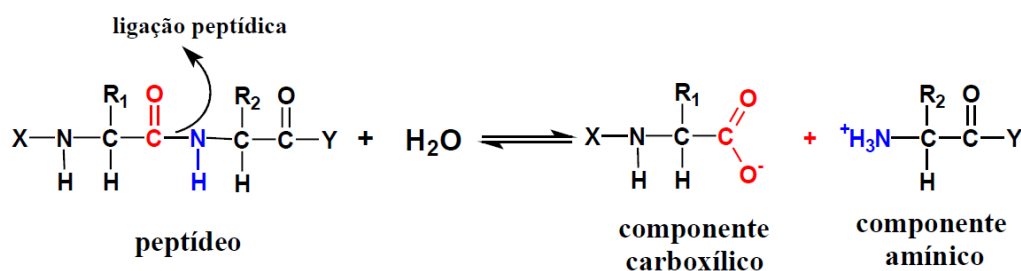
As enzimas podem estar associadas tanto com lipídios como carboidratos e podem conter componentes não proteicos cataliticamente ativos, chamados coenzimas ou cofatores. Muitas delas, para serem cataliticamente ativas, necessitam de íons metálicos, atuando como ativadores e estando diretamente envolvidos na catálise. (KENNEDY, 1987).

### 2.9.1 Enzimas proteolíticas ou peptídeo hidrolases

As enzimas proteolíticas, produzidas por bactérias, plantas e animais superiores, constituem um grupo grande e complexo de enzimas, as quais diferem entre si por sua especificidade pelo substrato, sítio ativo e mecanismo catalítico, perfis de estabilidade e atividade quanto à temperatura e ao pH (WARD, 1985).

A reação comumente catalisada por esse grupo de enzimas é a hidrólise de ligações peptídicas de uma proteína (Figura 2.6), mas também hidrolisam ligações ésteres (-COOR), tiol-ésteres (-COSR) e amidas (-NH<sub>2</sub>). A natureza do grupo R1 ou R2 (Figura 2.6) é o maior fator diferenciador das enzimas proteolíticas. Por exemplo, quimotripsina hidrolisa rapidamente ligações peptídicas quando o grupo R1 for um resíduo de tirosina, fenilalanina ou triptofano. Tripsina hidrolisará somente quando o grupo R1 for um resíduo de lisina ou arginina. Por outro lado, pepsina e carboxipeptidase A têm especificidades baseadas na natureza do grupo R2. Ambas hidrolisam rapidamente ligações peptídicas se o grupo R2 for um resíduo de fenilalanina. A diferença entre as duas é que para a carboxipeptidase A o resíduo deverá ser carboxi-terminal (WHITAKER, 1994).

Figura 2.6 - Reação de hidrólise da ligação peptídica (TARDIOLI, 2003)

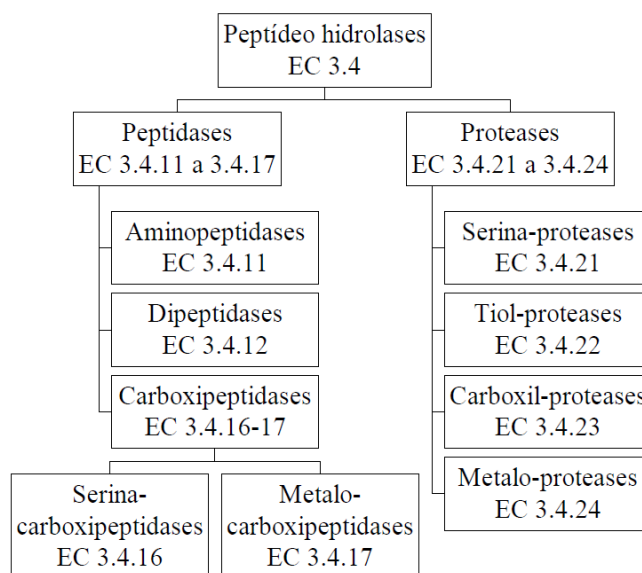


A natureza dos constituintes X e Y (Figura 2.6) permite separar as enzimas proteolíticas em endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases (por exemplo, tripsina, quimotripsina e pepsina) hidrolisam randomicamente ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica com máxima atividade quando X e Y são derivatizados (por exemplo, resíduos de aminoácidos). As exopeptidases (carboxipeptidases, aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases) hidrolisam ligações peptídicas amino- ou carboxi-terminais. As aminopeptidases requerem que X seja um grupo H e preferencialmente que Y não seja um grupo OH. As carboxipeptidases requerem que Y seja um grupo OH e preferencialmente que

X não seja um grupo H. As dipeptidases e tripeptidases requerem que X e Y sejam grupos H e OH, respectivamente (WHITAKER, 1994).

Segundo o sistema internacional de nomenclatura, as enzimas proteolíticas pertencem à subclasse 4 da classe 3 (EC 3.4 Peptídeo hidrolases), conforme mostra a Figura 2.7. As proteases são subdivididas em sub-subclasses com base nos seus mecanismos catalíticos; as enzimas em cada sub-subclasse são distinguidas com base em sua especificidade pelo substrato (WARD, 1985).

**Figura 2.7 - Classificação de enzimas proteolíticas (Ward, 1985).**



As peptidases removem aminoácidos ou pares de aminoácidos a partir dos terminais da cadeia polipeptídica, sejam eles amino- (terminal de atuação de amino-peptidases) ou carboxi-terminais (terminal de atuação de carboxipeptidases). Essas enzimas são muito ineficientes na degradação de proteínas intactas e, portanto, são sempre usadas após ou em conjunto com uma endoprotease. Esta por sua vez, se estiver operando em seu pH ótimo, reduzirá drasticamente o tamanho da molécula de proteína, e os pequenos peptídeos produzidos serão mais solúveis (GODFREY, 1996).

As enzimas proteolíticas são divididas em quatro grupos, com base no seu mecanismo catalítico de ação. Os nomes dos grupos servem para indicar um dos importantes grupos catalíticos do sítio ativo. Os quatro grupos são: serina-proteases, tiol- ou cisteína-proteases, metalo-proteases e carboxil-proteases ou proteases ácidas (WHITAKER, 1994).



### 2.9.1.1 Serina-proteases

Estão incluídas neste grupo a quimotripsina (EC 3.4.21.1 e 3.4.21.2), a tripsina (EC 3.4.21.4), a elastase (EC 3.4.21.36), a trombina (EC 3.4.21.5), a subtilisina (EC 3.4.21.14), dentre outras, sendo todas endopeptidases, exibindo atividade catalítica na faixa de pH de 8 a 10 e sendo inibidas por DFP (di-isopropil-fluorofosfato), que se liga à hidroxila do resíduo serina do sítio ativo. Entretanto, possuem especificidades diferentes: quimotripsina tem especificidade por resíduos tirosina, fenilalanina e triptofano; tripsina por lisina e arginina; trombina por lisina e arginina, elastase por alanina e subtilisina por tirosina, fenilalanina e triptofano (WHITAKER, 1994).

As serina-proteases também diferenciam entre si na seqüência de aminoácidos e em suas estruturas tridimensionais, porém apresentam em comum geometria do sítio ativo e mecanismo catalítico. Todas possuem Asp, His e Ser no sítio ativo (WHITAKER, 1994).

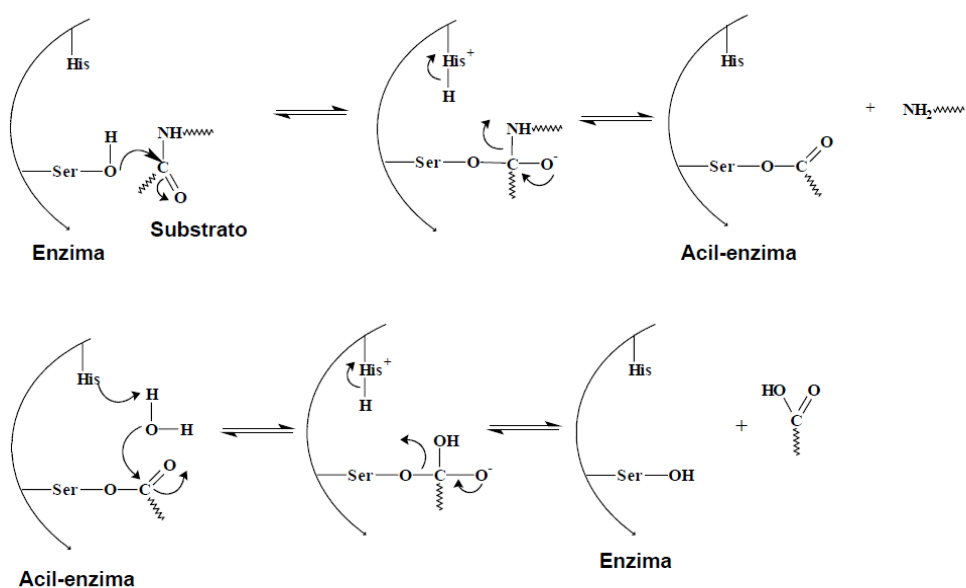
As enzimas deste grupo catalisam a hidrólise de ligações peptídicas pelo ataque nucleofílico sobre a ligação carbono-oxigênio assistida pela doação de um próton para o nitrogênio peptídico. Os resíduos de aminoácidos Asp, Ser e His atuam como nucleófilos e doadores de prótons. As serina-proteases dos mamíferos (quimotripsina, tripsina e elastase) possuem a mesma seqüência próxima do resíduo Ser do sítio ativo (-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-), enquanto a subtilisina (serina-protease bacteriana) tem a seqüência -Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Ser-. Além disso, os resíduos que formam a tríade catalítica dessas enzimas estão localizados em posições diferentes na cadeia polipeptídica: Asp102, His57 e Ser195, para quimotripsina, tripsina e elastase, e Asp32, His64 e Ser221, para a subtilisina (KENNEDY, 1987).

As serina-proteases como, por exemplo, a tripsina e quimotripsina, podem ser obtidas a partir do pâncreas de animais. As subtilisinas são obtidas a partir de bactérias do gênero *Bacillus* (*amyloliquefaciens*, *licheniformis*, *subtilis*, dentre outros) (KENNEDY, 1987). As subtilisinas são moléculas compactas e quase esféricas, com um diâmetro ao redor de 42 Å e com aproximadamente 30% da estrutura em  $\alpha$ -hélice, distribuída em 8 segmentos. O interior da molécula é composto quase inteiramente por resíduos de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas. As subtilisinas são desnaturadas a pH entre 1 e 2, enquanto ao redor do pH 4 uma mistura de enzima ativa e desnaturada dará origem à autólise. Em altos valores de pH (pH > 11), a estrutura da molécula de subtilisina também é desestabilizada. A subtilisina Carlsberg tem pH ótimo entre 8 e 9 (TARDIOLI, 2003).

### 2.9.1.1.1 Mecanismo catalítico das serina-proteases

O mecanismo catalítico das serina-proteases será representado pelo mecanismo proposto para a quimotripsina. A Figura 2.8 mostra a representação esquemática deste mecanismo de ação.

Figura 2.8 - Mecanismo catalítico da quimiotripsina (VOET e VOET, 1995).

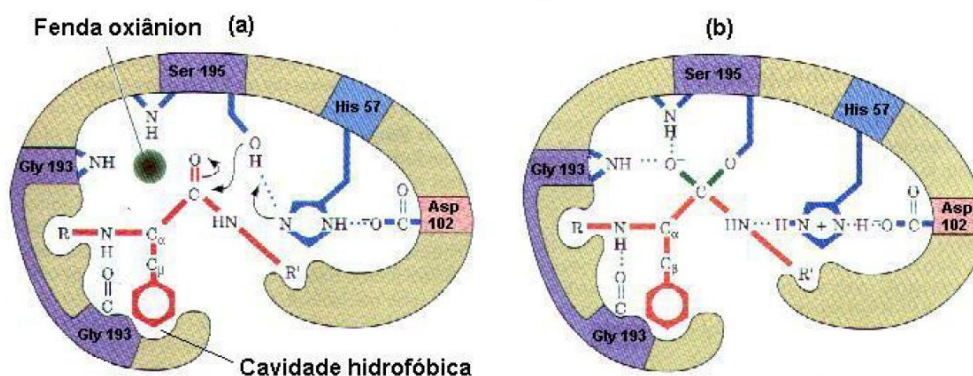


No mecanismo proposto, o substrato (polipeptídeo ou proteína) liga-se ao sítio ativo da enzima. A ligação peptídica susceptível é posicionada próxima ao grupo hidroxila do resíduo Ser195 pela ligação da cadeia lateral hidrofóbica do aminoácido adjacente (um resíduo de fenilalanina na Figura 2.9) em uma cavidade hidrofóbica da enzima. Há a formação de um intermediário covalente entre o grupo acil do substrato e a hidroxila do resíduo Ser195. A hidroxila perde seu átomo de hidrogênio, o qual é fortemente atraído pelo nitrogênio do grupo imidazol da His57. Forma-se, após, uma ligação éster entre o oxigênio da Ser195 e o átomo de carbono do grupo acil do substrato, com a quebra da ligação peptídica. O primeiro produto (amino-terminal) deixa o sítio ativo com a permanência do complexo acil-enzima, conforme mostra a Figura 2.9.

A ligação éster instável, comparada com a ligação peptídica, é hidrolisada, com a participação de uma molécula de água, e o segundo produto (carboxi-terminal) deixa o sítio ativo com a recuperação do átomo de hidrogênio pela Ser195. O grupo imidazol da His57 age

como base geral, retirando um próton do grupo hidroxila da Ser195 e a His57 protonada age como um ácido, doando um próton para o grupo amino de saída. A função do grupo Asp102 (Figura 2.9) é aparentemente auxiliar a atração do átomo de hidrogênio da Ser195 pelo grupo imidazol da His57, estabilizando a carga positiva formada. Isto previne a formação de uma carga positiva muito instável na hidroxila da Ser195 e aumenta sua nucleofilicidade. Nas fases de acilação e deacilação, o oxigênio carbonila do substrato adquire uma carga negativa no estado de transição. Esta carga é formada dentro de uma cavidade na enzima, chamada fenda oxianion (Figura 2.9a), e é estabilizada por ligações de hidrogênio aos nitrogênios amida da Gly193 e da Ser195 (Figura 2.9b). Assim, a menos da especificidade da enzima, regida pelo resíduo de posicionamento, a catálise de todas as serina-proteases é feita segundo esse mecanismo (LENINGHER *et al.*, 1995).

**Figura 2.9 - (a) Grupos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima cataliticamente envolvidos na hidrólise de uma ligação peptídica; (b) intermediário tetraédrico enzima-substrato (VOET e VOET, 1995).**



Na subtilisina o resíduo Ser221 do centro ativo localiza-se numa cavidade pouco profunda na superfície da enzima. Seu grupo OH posiciona-se consistentemente para a formação de uma ligação hidrogênio com o grupamento His64. O grupamento carboxílico do resíduo Asp32 situa-se do outro lado da His64 a uma distância relativa ao comprimento de uma ligação de hidrogênio. O arranjo estérico desses três resíduos concorda muito bem com o arranjo dos sítios ativos das proteases pancreáticas (LENINGHER *et al.*, 1995).

## 2.10 Cinética enzimática

O estudo cinético compreende o estudo da velocidade de reação e como ela se altera em resposta a mudanças nas condições experimentais, tais como temperatura, pH, concentração de enzima, substrato e inibidores.

Cada enzima possui seus ótimos de pH e temperatura e seus parâmetros cinéticos (por exemplo,  $V_{\max}$  e  $K_M$ ) pertinentes a cada sistema enzima-substrato (KUMAR e GUPTA, 1998), onde a influência da concentração de substrato na velocidade de reação pode ser representada pelo modelo cinético de Michaelis-Menten. Portanto, para cada sistema enzima-substrato há de se determinar as condições ótimas de trabalho (temperatura e pH) e a influência da concentração de substrato na velocidade de reação da enzima.

### 2.10.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

Como ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações enzimáticas aumenta com a temperatura, dentro de certa faixa de temperatura na qual a enzima é estável e mantém atividade integral. O efeito da temperatura na velocidade das reações é em geral expresso em termos de coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ) – fator pelo qual a velocidade aumenta quando a temperatura aumenta de 10°C. A velocidade da maioria das reações enzimáticas se duplica aproximadamente para cada elevação de 10°C na temperatura ( $Q_{10} \sim 2$ ). Entretanto, o coeficiente de temperatura  $Q_{10}$  varia consideravelmente de uma enzima para outra, dependendo da energia de ativação da reação catalisada; as velocidades de reações com alta energia de ativação são muito mais sensíveis a variações de temperatura do que reações com baixa energia de ativação - Teoria de Arrhenius (WHITAKER, 1994; LENINGHER *et al.*, 1995).

As enzimas são em geral estruturas muito sensíveis quanto à temperatura e ao pH, desnaturando-se a temperaturas elevadas, ou em alguns casos até mesmo a moderadas temperaturas, e fora de uma faixa muito estreita de pH. Assim, o ótimo aparente de temperatura observado nos perfis de atividade em função da temperatura é resultante de dois processos: aumento na velocidade de reação com a temperatura e crescente desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica (WHITAKER, 1994; LENINGHER *et al.*, 1995).

No caso do pH, a estrutura tridimensional da enzima, responsável pela sua atividade catalítica, depende das interações hidrofóbicas e hidrofílicas da enzima, que são afetadas pelo pH. Assim, alterações nesse parâmetro podem alterar o sítio ativo, diminuindo a atividade catalítica reversivelmente, ou mesmo desnaturar a enzima, causando uma perda irreversível de atividade. Faz-se necessário assim trabalhar em condições (temperatura e pH) ótimas, onde a atividade catalítica se conserve por um maior período de tempo, mesmo que nessas condições suas velocidades não sejam máximas (WHITAKER, 1994; LENINGHER et al., 1995).

### 2.10.2 Influência da concentração de substrato

A concentração de substrato é também uma variável de grande importância no estudo cinético, pois afeta diretamente a velocidade da reação catalisada. O efeito desta variável na cinética de uma reação catalisada por uma enzima (solúvel ou imobilizada) pode ser analisado mediante ensaios de velocidades iniciais. Nesse método, a tangente da curva de liberação do produto em função do tempo, tomada no trecho linear da reação, é tomada como a velocidade inicial da reação correspondente a cada concentração inicial de substrato utilizada no ensaio.

O mais simples modelo cinético utilizado para representar a influência da concentração do substrato (S) na velocidade da reação (V) é o de Michaelis-Menten, que considera a existência de apenas um complexo enzima-substrato (ES) no sistema reacional (LENINGHER *et al.*, 1995):

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_M + S} \quad (2.1)$$

onde: V é a velocidade de reação; S é a concentração de substrato;  $V_{\max}$  é a velocidade máxima da reação, ou seja, a velocidade medida em condições de saturação da enzima pelo substrato;  $K_M$  é a constante de Michaelis-Menten, definida como a constante de dissociação do complexo ES e corresponde à concentração de substrato na qual a velocidade da reação é igual a metade da velocidade máxima.

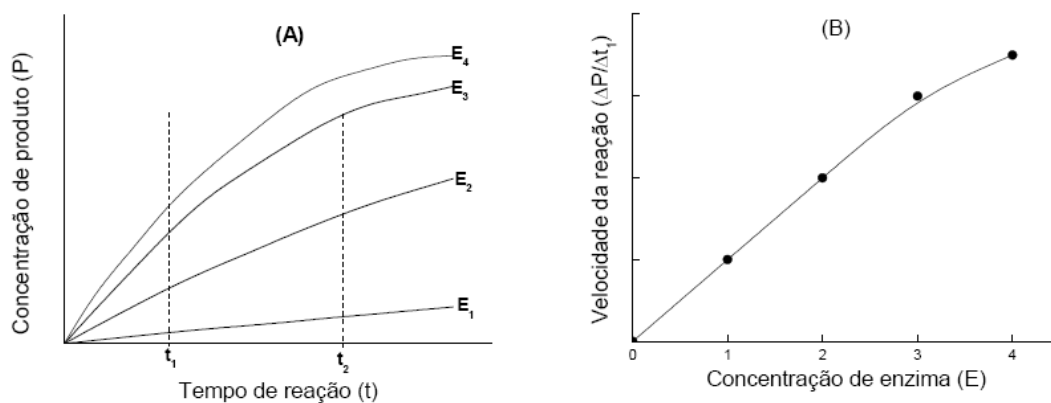
Dependendo do mecanismo de reação,  $K_M$  assume uma relação entre as constantes das reações; num dos casos mais simples, esse parâmetro pode ser considerado como uma medida da afinidade da enzima pelo substrato (LENINGHER *et al.*, 1995).

O grau de complexidade dos modelos cinéticos pode ser aumentado desde a simples inclusão de termos de inibição pelo produto, pelo substrato e pelo produto e substrato no modelo de Michaelis-Menten, até modelos mais complexos, os quais consideram mais de um substrato e, portanto, a presença simultânea no sistema de diferentes complexos ES. Esses últimos resultam em um grande número de parâmetros cinéticos, tornando os modelos de difícil uso e aplicação restrita (GONÇALVES *et al.*, 2002).

### 2.10.3 Influência da concentração de enzima

Como ocorre para qualquer catalisador, a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima depende diretamente da concentração desta. Contudo, esta relação é linear somente se as verdadeiras velocidades iniciais são tomadas; isto é, a velocidade de formação do produto deve ser constante em todo o tempo de ensaio escolhido. A Figura 2.10 mostra que a velocidade de formação do produto ( $\Delta P/\Delta t$ ) é constante para as concentrações de enzima  $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$ , se o tempo de reação  $t_1$  é escolhido; entretanto, se o tempo de reação  $t_2$  é escolhido, a velocidade será constante somente para as concentrações de enzima  $E_1$  e  $E_2$  (GIORDANO, 1987).

**Figura 2.10** (A) Formação de produto P em função do tempo de reação t, para diferentes concentrações de enzima E, e (B) velocidade inicial de reação ( $\Delta P/\Delta t_1$ ) em função da concentração de enzima (GIORDANO, 1987).



Similarmente, se uma concentração alta de enzima é escolhida ( $E_4$ , por exemplo),  $\Delta P/\Delta t$  não será constante para o intervalo de tempo  $0-t_1$ , conforme mostra a Figura 2.10. Dessa forma, verifica-se que para estudos cinéticos, onde velocidades iniciais são tomadas, é necessário estabelecer-se os limites de linearidade, isto é, estabelecer a quantidade máxima de produto que pode ser acumulada tal que as relações entre a concentração de produto e tempo e entre velocidade de aparecimento de produto e concentração de enzima sejam lineares (GIORDANO, 1987).

Para o estudo cinético, onde se pretende ajustar modelo tipo Michaelis-Menten, a linearidade de uma curva Velocidade de reação *versus* Concentração de enzima mostra que para qualquer concentração de enzima escolhida, na faixa de região linear, a influência da concentração do substrato na velocidade da reação segue modelo cinético de Michaelis-Menten. Nessa região, a concentração do substrato é suficientemente maior que a concentração da enzima tal que a hipótese de estado pseudo-estacionário, postulado por Briggs e Haldane, seja válida para praticamente todo o tempo amostrado, ou seja, o tempo para atingir a concentração do estado pseudo-estacionário para o complexo ES é muito curto comparado com o tempo de reação amostrado. Essa é uma condição que tem que ser aferida sempre que se realizam estudos cinéticos assumindo-se modelo de Michaelis-Menten (VOET, 1995).

## 2.11 Hidrólise enzimática de proteínas de soja

Diversos autores estudaram hidrólise enzimática de proteínas de soja, no entanto, a comparação dos resultados é difícil, pois se utilizam diferentes enzimas com diferentes substratos em diferentes condições analisados por diferentes métodos analíticos. A Tabela 2.5 resume alguns destes dados.

Marsman *et al.* (1997) avaliaram a influência do grau de desnaturação da proteína do farelo de soja utilizando farelo não tostado, tostado e extrusado. O farelo não tostado apresentou alta resistência à proteólise devido à conformação espacial nativa das proteínas. As proteínas do farelo tostado apresentavam as ligações não covalentes quebradas e as dissulfeto praticamente intactas, com média resistência à ação das proteases. As proteínas do extrusado tinham tanto as ligações não covalentes como as dissulfeto rompidas e apresentaram baixa resistência à hidrólise. Fisher (2006) observou o mesmo comportamento comparando o grau de desnaturação e a extratabilidade das proteínas do farelo de soja.

**Tabela 2.5 Resumo de trabalhos da literatura avaliando hidrólise enzimática de proteínas de soja**

<b>Enzima</b>	<b>Condição</b>	<b>Resultados</b>	<b>Autor</b>
Esperase <sup>®</sup> , Neutrase <sup>®</sup> e Bio-Feed Pro <sup>®</sup>	Suspensão de farelo comum a 10% em tampão acetado de sódio 0.05M pH 5. Tampão carbonato pH 9 para Esperase <sup>®</sup> .	Farelo tostado: $\beta$ -conglucina bem degradada; glicina mais resistente (polipeptídeo B mais que A). Farelo sem tratamento térmico: alta resistência à hidrólise. Extrusado: ambas as proteínas foram bem degradadas.	Marsman <i>et al.</i> , 1997.
Microorganismos do rúmen bovino	Fermentação com bactérias do rúmen	$\beta$ -conglucina mais suscetível à degradação ruminal que a glicina. Maior resistência para o polipeptídeo B.	Romagnolo <i>et al.</i> , 1990.
Alcalase <sup>®</sup> Flavourzyme <sup>®</sup>	Pré-tratamento ácido (0.05-0.2 N HCl), hidrólise (0-24 h), pH 6-6,2.	Melhora no grau de hidrólise após tratamento ácido. Comprimento médio das cadeias de peptídeos: Alcalase (3 h), 7-8 aminoácidos; Alcalase <sup>®</sup> /Flavourzyme <sup>®</sup> (21 h): 3-5 aminoácidos.	Lee <i>et al.</i> , 2000.
Alcalase <sup>®</sup> Esperase <sup>®</sup> Tripsina	Suspensão com 8% de proteína, relação E/S de 0,2%, pH 8,0, 50°C por 2h.	GH de 10% para farelo comum e 8,2% para SPC. Produto a base de peptídeos solúveis em pH baixo.	Adler-Nissen, 1978.
Alcalase <sup>®</sup> Novozym <sup>®</sup> Flavourzyme <sup>®</sup>	40°C e pH 7,0 por 8 h.	GH de 35,1; 33,3 e 39,5% para Alcalase <sup>®</sup> , Novozym <sup>®</sup> e Flavourzyme <sup>®</sup> , respectivamente.	Hrecková <i>et al.</i> , 2002
Tripsina bovina	Inibidor de tripsina Bowman Birk + 5% (molar) tripsina em diferentes tampões com faixa de pH de 3.5-10.3.	Sequência primária quase totalmente conservada.	Jensen <i>et al.</i> , 1996
Pepsina	Relação Pepsina substrato (100:1), pH 2 por 2 h.	Redução da atividade imunológica do Inibidor de tripsina Kunitz; Pouca redução de atividade do Inibidor Bowman Birk.	Hajos <i>et al.</i> , 1996
Flavourzyme <sup>®</sup>	Isolado proteico a 2.5% (m/v) and 1% (w/w de SPI) Flavourzyme <sup>®</sup> , pH 7, 50°C por 6h. Fracionamento por membranas.	Alta atividade anti-adipogênica da fração peptídica inferior a 1,3 kDa em cultivo "in vitro" de pré-adipócitos durante diferenciação	Tsou <i>et al.</i> , 2010.
Pancreatina	SPI e SPI extrusado 1,6% (m/v), pH 7, 55°C, 3h, E/S de 0,01-5%.	GHs maiores para SPI extrusado. A extrusão combinada com a hidrólise enzimática melhorou a capacidade de emulsão.	Chen <i>et al.</i> , 2011.



A  $\beta$ -conglucina se mostrou mais facilmente degradável que a glicina e o polipeptídeo B da glicina mostrou mais resistência à proteólise que o polipeptídeo A. (MARSMAN *et al.*, 1997; ROMAGNOLO *et al.*, 1990) possivelmente devido ao posicionamento do polipeptídeo B no interior da molécula da glicina (LAKEMOND *et al.*, 2000).

Lee *et al.*, 2000, estudaram o efeito de um pré-tratamento ácido na eficiência de hidrólise e obtiveram um incremento de 9,6 para 14,3% no grau de hidrólise com Alcalase<sup>®</sup> em 3 horas de reação a 50°C e pH 6,0-6,2. Em estudos com Alcalase<sup>®</sup> combinada com Flavourzyme<sup>®</sup>, verificaram que a degradação progride mais rapidamente nas primeiras 5 horas de incubação e que altos graus de hidrólise apenas serão obtidos com a combinação das duas enzimas.

Adler-Nissen (1978) patenteou processo de produção de um hidrolisado de proteínas de soja solúvel em pH baixo para aplicação em bebidas. Declarou que a Alcalase<sup>®</sup> foi superior em atividade comparada a Esperase<sup>®</sup> e a Tripsina. Utilizou a Alcalase 6.0<sup>®</sup> na concentração de 0,2% (massa de enzima por massa de proteína) em meio contendo 8% de proteínas. A reação teve duração de 2 horas a pH 8,0 e 50°C e obteve-se grau de hidrólise de 10% quando utilizou proteína isolada de soja e 8,2% para concentrado proteico de soja.

Adler-Nissen (1978) também relatou que obteve, para proteína soja, graus de hidrólise inferiores aos obtidos para caseína e glúten de milho e superiores aos obtidos para semente de algodão.

Hrcková *et al.* (2002) compararam os GH produzidos pelas enzimas Alcalase<sup>®</sup>, Novozym<sup>®</sup> e Flavourzyme<sup>®</sup> em farinha desengordurada de soja a 40°C e pH 7,0. Os resultados obtidos após 8 horas de reação foram 35,1; 33,3 e 39,5% respectivamente. Os hidrolisados mostraram maior formação de espuma, porém, menos estável.

Resultados de digestão de tripsina do inibidor Bowman-Birk mostraram que sua estrutura primária foi quase que totalmente conservada (JENSEN *et al.*, 1996). Em estudo com degradação por pepsina, o inibidor Bowman-Birk não foi reduzido em tamanho e reteve sua atividade imunológica, enquanto o inibidor de tripsina de soja Kunitz (KSTI) teve a atividade imunológica significativamente reduzida, mas foi apenas parcialmente degradado (HAJOS *et al.*, 1996).

Tsou (2010) estudou a influência de hidrolisados de proteína de soja isolada com Flavourzyme<sup>®</sup> durante a diferenciação de células adiposas “in vitro” e relatou alta supressão no acúmulo de lipídeos pelos adipócitos.

Chen *et al.*, (2011) relatou o efeito do pré-tratamento por extrusão de Proteína isolada de soja na hidrólise por pancreatina em várias relações E/S. A proteína extrusada obteve graus de hidrólise muito maiores aos obtidos com a proteína isolada sem extrusão. O autor estudou também a influência do grau de hidrólise na capacidade de emulsão dos hidrolisados com e sem pré-tratamento por extrusão e os hidrolisados previamente extrusados tiveram maiores capacidades de emulsão.

### 3. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES PARA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS

#### 3.1 Introdução

A Alcalase<sup>®</sup> é uma enzima comercial largamente difundida na literatura científica. Muitos autores descrevem processos de hidrólise utilizando a Alcalase<sup>®</sup> (ADLER-NISSEN, 1984; LEE *et al.*, 2000; DEMIRHAN *et al.*, 2011; GUERÁRD *et al.*, 2001; TARDIOLI *et al.*, 2003; SOUZA JR. *et al.*, 2004; FISHER., 2006; entre outros.). De acordo com Anwar e Saleemuddin (1998), a Alcalase<sup>®</sup> é uma enzima proteolítica isolada de linhagens selecionadas de *Bacillus licheniformis*, sendo seu maior componente enzimático a subtilisina Carlsberg (formada por uma única cadeia polipeptídica com 274 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 27 kDa). Embora a Alcalase<sup>®</sup> venha sendo amplamente utilizada em várias aplicações biotecnológicas, sua especificidade não foi completamente caracterizada. Sabe-se que essa enzima hidrolisa principalmente ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico (ADLER-NISSEN, 1986).

A Novo-Pro D<sup>®</sup> é uma protease alcalina produzida por *Bacillus licheniformis* geneticamente modificado e é principalmente aplicada na indústria de *pet food* no processamento de proteínas animais para melhoramento do sabor. Apenas um trabalho foi encontrado na literatura científica a respeito desta enzima, Kamnerdpetch *et al.* (2006) compararam a hidrólise de proteína de polpa de batata utilizando Alcalase<sup>®</sup> e Novo-Pro D<sup>®</sup> em várias combinações com exoproteases e relataram atividade muito baixa da Novo-Pro D<sup>®</sup> para a proteína de batata.

Nesta etapa do trabalho teve-se por objetivo caracterizar e comparar as proteases comerciais Alcalase<sup>®</sup> e Novo-Pro D<sup>®</sup> e selecionar, entre estas, a enzima mais promissora para utilização em processamento de proteínas visando sua aplicação na hidrólise das proteínas do concentrado proteico de soja. Adicionalmente, avaliou-se o comportamento da enzima selecionada frente a diferentes condições de pH e temperatura.

#### 3.2 Materiais e Métodos

As enzimas Novo-Pro D<sup>®</sup> e Alcalase 2.4L<sup>®</sup> foram cedidas pela Novozymes Latin America Ltda. As atividades específicas declaradas pelo fabricante são 16 KNPU-S/g e

2,4 AU/g respectivamente, estas unidades de atividade são definidas através de metodologias internas do fabricante. Azul brilhante de Comassie G-250, albumina de soro bovino e a azocaseína foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

### **3.2.1 Dosagem de proteína**

O teor de proteína bruta das preparações enzimáticas comerciais foi quantificado pelos métodos de Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 2007) e Bradford (BRADFORD, 1976).

A análise por Kjeldahl foi realizada pelo laboratório de controle de qualidade da Imcopa – Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A. (Araucária-PR).

O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 100 mg de azul brilhante de Comassie G-250 em 50 mL de etanol (95%). Em seguida, adicionou-se 100 mL de ácido fosfórico (85%) e a solução final foi diluída com água deionizada para 1 litro. O reagente foi filtrado em papel filtro qualitativo. A curva padrão para o reagente foi construída utilizando albumina de soro bovino diluída em 0,15M NaCl com concentrações variando entre 0,1-1,0 g/L. A reação foi realizada adicionando 5 mL de reagente e 100 µL de solução de proteína diluída em 0,15M NaCl, o tubo de reação foi agitado em agitador tipo vórtex e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm após 2 minutos.

### **3.2.2 Determinação do tamanho molecular das enzimas**

O tamanho molecular das enzimas foi estimado por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) por meio de metodologia descrita por Laemmli (1970). A análise foi realizada em laboratório terceirizado BIO4-Soluções Biotecnológicas Ltda.

### **3.2.3 Determinação da atividade específica**

Os ensaios de atividade específica das enzimas foram realizados utilizando azocaseína como substrato (TORO e GARCÍA-CARREÑO, 2002).

Foram adicionados 10  $\mu$ L de solução 1% (m/v) do preparado enzimático em 0,5 mL de tampão Tris.HCl 50mM pH 8,0, mantido em banho seco a 25°C. Adicionou-se 0,5 mL de TCA 20% (m/v) nos tubos relativos ao branco da reação. A reação foi iniciada adicionando-se 0,5 mL de solução de azocaseína 1% (m/v) em todos os tubos que, em seguida, foram incubados por 10 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de TCA 20%. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos em centrífuga de microtubos. O sobrenadante foi separado e a absorbância lida em 366 nm.

A reação para o branco e para cada enzima foi feita em triplicata e a média das leituras do branco ( $A_{366}$ Branco) foi subtraída da média das leituras de cada enzima ( $A_{366}$ amostra). O cálculo para a atividade específica foi feito conforme a equação (3.1).

$$\text{Atividade (U/mg)} = \frac{(A_{366}\text{amostra} - A_{366}\text{Branco})}{[\text{tempo}(\text{min.})] \times [\text{massa enzima}(\text{mg})]} \quad (3.1)$$

No caso, o tempo foi de 10 minutos (conforme o protocolo supracitado) e a massa de enzima (presente em 10  $\mu$ L de solução) foi de 0,1 mg de preparado enzimático comercial. A quantidade de enzima utilizada foi definida por meio de testes de verificação da linearidade da absorbância em função do tempo de reação.

### 3.2.4 Ensaios de hidrólise

Os ensaios de hidrólise foram realizados em titulador automático modelo 718 Stat Titrimo (Metrohm Ltda., Suíça). A temperatura do meio de reação foi mantida por banho termostaticado com circulação de água (Nova Ética) e agitação mecânica (IKA RW20). Utilizou-se albumina de soro bovino fração V (BSA) como substrato, na concentração de 10 g/L, diluída em água destilada, com volume final de 100 mL para todos os experimentos. A relação enzima/substrato foi de 0,75% (m/m) em todos os experimentos. Os resultados de Grau de Hidrólise (GH) foram calculados pelo consumo de hidróxido de sódio para manutenção do pH conforme descrito por Adler-Nissen (1986). O Grau de Hidrólise, em porcentagem, é calculado pela seguinte equação:

$$GH = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (3.2)$$

em que,  $B$  é o volume de NaOH em mL;  $N_b$  é a normalidade da base;  $h_{tot}$  é o número de ligações peptídicas no substrato;  $\alpha$  é grau médio de dissociação dos grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, sendo função das condições de pH e temperatura utilizados; e  $MP$  é a massa de proteínas em gramas. O valor de  $h_{tot}$  utilizado foi 8 meqv/g e a Tabela 3.1 mostra os valores calculados de  $\alpha$  conforme as equações 3.3 e 3.4 (ADLER-NISSEN, 1986).

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} \quad (3.3)$$

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \quad (3.4)$$

**Tabela 3.1 - Valores do grau médio de dissociação dos grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> para diferentes condições de temperatura e pH.**

T (°C)	T (K)	pK	pH	$\alpha$
45	318,15	7,29	7	0,34
55	328,15	7,06	7	0,47
			8	0,90
			9	0,99
60	333,15	6,95	7	0,53
			8	0,92
			9	0,99
65	338,15	6,84	7	0,59
70	343,15	6,74	7	0,65

### 3.3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para os testes de comparação do teor proteico das preparações enzimáticas comerciais estão mostrados na Tabela 3.2. Os resultados indicam que as duas preparações enzimáticas contêm teores aproximados de proteína total. Os resultados de teor de proteína diferem entre os métodos, pois o método de Kjeldahl quantifica o teor de nitrogênio total enquanto o método de Bradford se limita a proteínas com tamanho molecular superior a 4 kDa. A Tabela 3.2 mostra também os resultados obtidos para a análise de

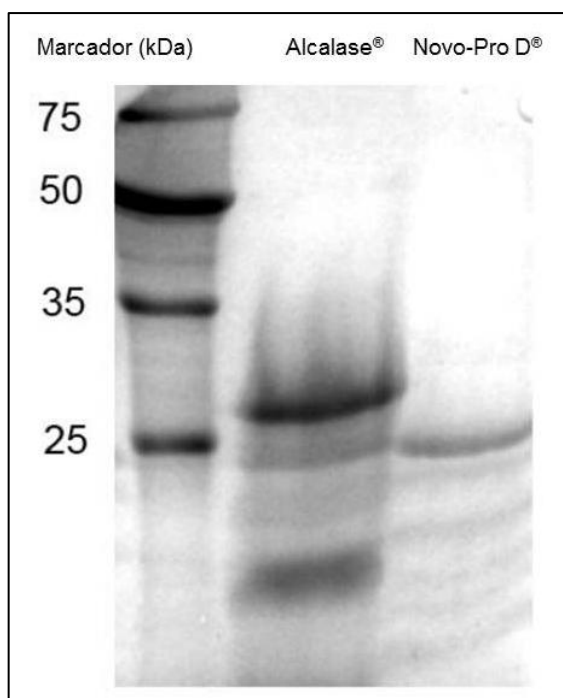
atividade específica das enzimas. A Alcalase<sup>®</sup> teve atividade azocaseinolítica 14% inferior à da Novo-Pro D<sup>®</sup> a 25°C e pH 8,0.

**Tabela 3.2 - Teor de proteína e atividade azocaseinolítica (25°C, pH 8,0) das enzimas comerciais Alcalase<sup>®</sup> e Novo-Pro D<sup>®</sup>.**

	Alcalase <sup>®</sup>	Novo-Pro D <sup>®</sup>
Proteína – Kjeldahl (% m/m)	6,18	6,25
Proteína – Bradford (% m/m)	4,39	4,14
Atividade específica (Azocaseína)	0,43 U/mg	0,50 U/mg

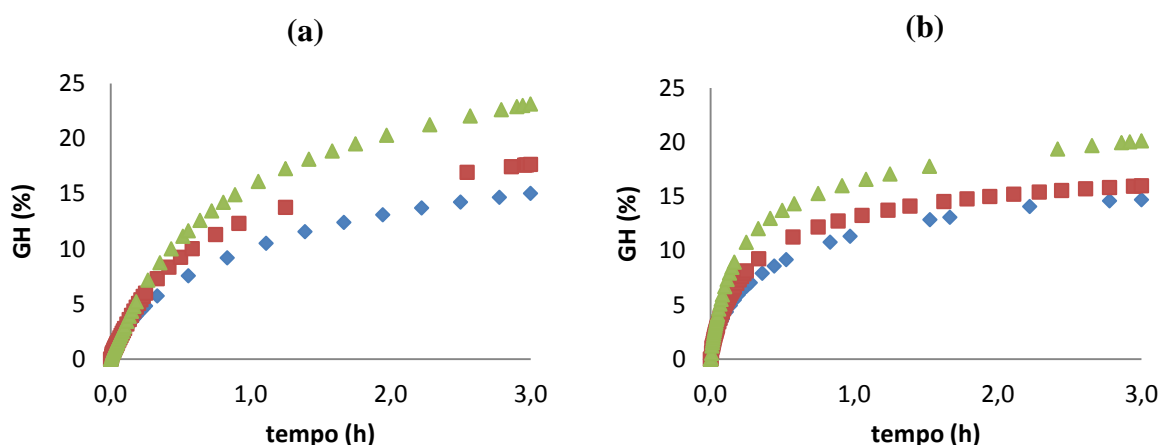
A Figura 3.1 mostra o gel de eletroforese obtido para estimativa do tamanho molecular das enzimas. A Alcalase<sup>®</sup> apresentou uma banda densa na região pouco acima de 25 kDa estando de acordo com os dados reportados por Anwar e Saleemuddin (1998) referente ao tamanho molecular da subtilisina Calsberg. As duas enzimas apresentaram uma banda na região de 25 kDa. A Alcalase apresentou ainda uma banda densa de tamanho inferior a 25 kDa, cujo tamanho molecular não pôde ser estimado. Observa-se também maior pureza para a Novo-Pro D<sup>®</sup> o que explica a maior atividade específica medida com azocaseína.

**Figura 3.1 - Fotografia de gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) das enzimas Alcalase<sup>®</sup> e Novo-Pro D<sup>®</sup>.**



As Figuras 3.2 a e b mostram as curvas de hidrólise obtidas para Alcalase<sup>®</sup> e Novo-Pro D<sup>®</sup> a 60°C e em diferentes condições de pH. Os graus de hidrólise obtidos ao final de 3 horas de reação foram 15,64%; 17,89% e 23,34% para a Alcalase<sup>®</sup> e 14,69%; 15,98% e 20,12% para a Novo-Pro D<sup>®</sup> nos pHs 7, 8 e 9 respectivamente. Os resultados mostram que os graus de hidrólise foram muito próximos, ligeiramente inferiores para a Novo-Pro D<sup>®</sup>. No entanto, ao se observarem os instantes iniciais de hidrólise (Tabela 3.3), nota-se velocidades iniciais maiores para a Novo-Pro D<sup>®</sup> em todas as condições de pH testadas. A Novo-Pro D<sup>®</sup> foi mais sensível ao pH do que a Alcalase<sup>®</sup>. A atividade da Novo-Pro D<sup>®</sup> em pH 9 é praticamente o dobro da atividade em pH 7, enquanto a Alcalase tem atividades semelhantes nos pHs testados.

**Figura 3.2 -** Curvas de hidrólise de BSA a 60°C catalisada por (a) Alcalase<sup>®</sup> e (b) Novo-Pro D<sup>®</sup> em pH 7(♦), 8(■) e 9(▲).



**Tabela 3.3 -** Comparação das velocidades iniciais de hidrólise de BSA, a 60°C, catalisada pelas enzimas Novo-Pro D<sup>®</sup> e Alcalase<sup>®</sup> em diferentes condições de pH.

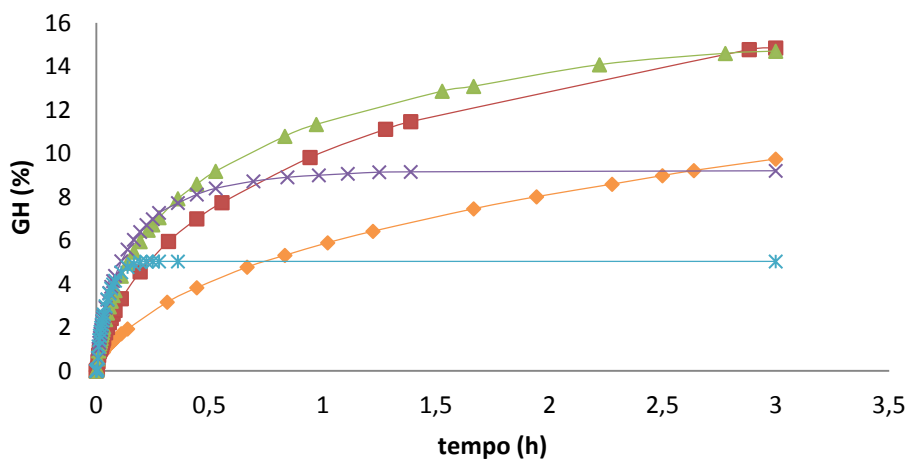
	Velocidade inicial de consumo de substrato (meqv/g.min.)		Velocidade inicial por unidade de atividade enzimática (meqv/U.min.)	
	Novo-Pro D <sup>®</sup>	Alcalase <sup>®</sup>	Novo-Pro D <sup>®</sup>	Alcalase <sup>®</sup>
pH 7,0	$4,99 \cdot 10^{-2}$	$3,17 \cdot 10^{-2}$	$1,33 \cdot 10^{-2}$	$9,83 \cdot 10^{-3}$
pH 8,0	$6,75 \cdot 10^{-2}$	$3,51 \cdot 10^{-2}$	$1,80 \cdot 10^{-2}$	$1,09 \cdot 10^{-2}$
pH 9,0	$9,07 \cdot 10^{-2}$	$3,86 \cdot 10^{-2}$	$2,42 \cdot 10^{-2}$	$1,20 \cdot 10^{-2}$

Devido a obtenção de resultados de graus de hidrólise semelhantes após 3 horas de reação, mesmo preço das duas enzimas, maior atividade em pHs alcalinos e escassez de resultados na literatura selecionou-se a Novo-Pro D<sup>®</sup> para os experimentos seguintes.



A Figura 3.3 mostra os perfis de hidrólise de BSA catalisada por Novo-Pro D<sup>®</sup> a pH 7 e diferentes temperaturas (45 a 70°C) e a Figura 3.4 mostra as velocidades iniciais de hidrólise nas temperaturas ensaiadas. O máximo grau de hidrólise obtido neste experimento (aproximadamente 15%) foi para as temperaturas de 55 e 60°C. Apesar de maiores velocidades iniciais de hidrólise nas temperaturas de 65 e 70°C observou-se inativação total da enzima em tempo inferior a 30 minutos. Além disso, embora a velocidade inicial de hidrólise seja maior a 60°C, após três horas de reação, obteve-se graus de hidrólise semelhantes (aproximadamente 15%) a 55°C. Este resultado mostra que houve inativação da enzima também a 60°C. Com base nestes resultados, selecionou-se 55°C como a temperatura de operação da Novo-Pro D<sup>®</sup> em reações de hidrólise de proteínas.

**Figura 3.3 - Curvas de hidrólise de BSA utilizando a enzima Novo-Pro D em pH 7,0 nas temperaturas de (♦) 45°C; (■) 55°C; (▲) 60°C; (×) 65°C e (\*) 70°C. Os pontos foram conectados por linhas suaves para facilitar a visualização e entendimento do gráfico.**



A avaliação do comportamento da Novo-Pro D<sup>®</sup> em diferentes condições de pH foi realizada a 55°C, pois esta foi a temperatura que apresentou maior atividade sem prejudicar a estabilidade de enzima. As hidrólises foram realizadas em pH 7, 8, 9 e 10 e os graus de hidrólise máximos observados foram 16,52%; 20,21%; 23,42% e 25,62% respectivamente. Os resultados estão ilustrados na Figura 3.5. Observa-se que quanto maior o pH do meio, maior o grau de hidrólise obtido e que a Novo-Pro D<sup>®</sup> é adequada para processos de hidrólise em condição de pH alcalino.

Figura 3.4 - Atividade enzimática inicial, em microequivalente de ligações peptídicas quebradas por grama de proteína por minuto, da enzima Novo-Pro D em BSA, em diferentes condições de temperatura.

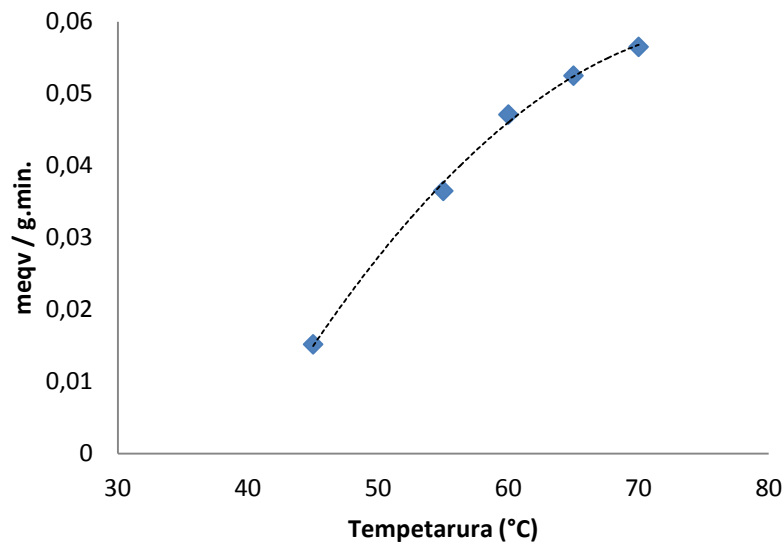
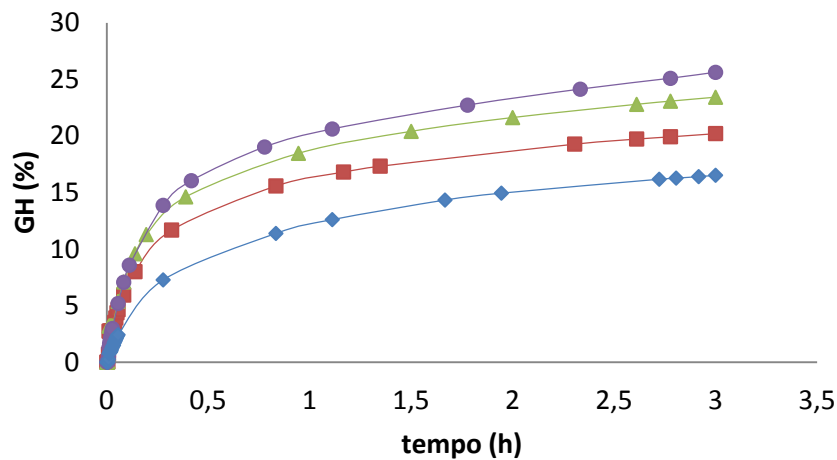


Figura 3.5- Curva de hidrólise de BSA pela enzima Novo-Pro D<sup>®</sup> a 55°C em pH 7,0(♦); 8,0(■); 9,0(▲); e 10(●). Os pontos foram conectados por linhas suaves para facilitar a visualização e entendimento do gráfico.



### 3.4 Conclusão

A enzima Novo-Pro D<sup>®</sup> se mostrou uma boa alternativa em comparação à Alcalase<sup>®</sup> para os processos de produção de hidrolisados proteicos. Mostrou atividades superiores em todas as condições de pH testadas, apesar de apresentar ligeira estabilidade menor. Sendo assim, concluiu-se que a Novo-Pro D<sup>®</sup> é mais eficiente e adequada para processos de curto período de tempo. Selecionou-se a temperatura de 55°C para ensaios de hidrólise das proteínas do farelo de soja, pois nesta condição obteve-se maior atividade sem

perda significativa de estabilidade da enzima. A Novo-Pro D<sup>®</sup> se mostrou influenciada pelo pH do meio de reação, sua atividade reduz significativamente em condições de pH próximas da neutralidade e mostrou-se estável quando mantida em pH alcalino durante o período de teste (3 horas).

Na seleção do pH de hidrólise deve-se ter em mente os efeitos prejudiciais que os altos valores de pH podem ter sobre as proteínas da soja, tais como destruição e racemização de aminoácidos e formação de ligações cruzadas. Como descrito no Capítulo 2, seção 2.8.2, pH 8 e 9 causam pouco ou nenhum dano às proteínas.

As condições selecionadas foram validadas nas hidrólises das proteínas do Concentrado Proteico de Soja. Além do grau de hidrólise, verificou-se a distribuição de tamanho dos peptídeos produzidos. Para tanto, fez-se necessário um estudo prévio de metodologias cromatográficas disponíveis na literatura. Nos próximos Capítulos (4 e 5) são apresentados os resultados desses estudos.

## 4. DETERMINAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DO CONCENTRADO PROTEICO DE SOJA HIDROLISADO

### 4.1 Introdução

O valor nutricional de um hidrolisado proteico depende do valor biológico da proteína utilizada, do método de hidrólise e dos tamanhos das cadeias peptídicas formadas (GRIMBLE *et al.*, 1986; SILVESTRE *et al.*, 1994a,b). Portanto, a avaliação da qualidade nutricional dos hidrolisados proteicos deve envolver a análise dos seus perfis peptídicos. Existem diversas técnicas para o fracionamento dos peptídeos de hidrolisados proteicos, como por exemplo, eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), cromatografia de exclusão molecular, capilar e de troca iônica (BIASUTTI, 2007). Neste trabalho optou-se pela utilização do método de fracionamento por cromatografia de exclusão molecular relatado por Souza Jr. *et al.* (2003).

Além dos diversos métodos de fracionamento, diferentes autores utilizam diferentes metodologias de detecção e tratamento dos resultados gerados nos cromatogramas. Gupta (1983) considerou que, ao levantar o cromatograma de uma amostra, um determinado percentual de área do cromatograma é diretamente proporcional à concentração dos peptídeos. Assim, é necessário conhecer o tempo de retenção de padrões (proteínas/peptídeos de massa molecular conhecida) para estabelecer a faixa de tamanho molecular de cada fração no cromatograma da amostra. Sousa Jr. *et al.* (2003) verificaram que a inclinação da função linear que relaciona a área cromatográfica com a concentração do analito aumenta proporcionalmente com o aumento do tamanho molecular da proteína ou peptídeo analisado e propôs um modelo que relaciona o tempo de retenção, o tamanho molecular, a área cromatográfica e a concentração. Silvestre *et al.* (1994a,b) desenvolveram um modelo que corrige a interferência de resíduos de aminoácidos aromáticos na área cromatográfica obtida por absorção em ultravioleta. Segundo Silvestre *et al.* (1994a,b), essa correção é necessária, pois amostras diferentes contendo a mesma massa de peptídeos podem apresentar diferentes áreas cromatográficas devido à presença de resíduos de aminoácidos aromáticos em diferentes proporções. Assim, a concentração de peptídeos pode ser superestimada em amostras contendo elevado número de resíduos de aminoácidos aromáticos.

A extensão da proteólise pode também ser avaliada pelo grau de hidrólise (GH), referente ao percentual de clivagem das ligações peptídicas de uma proteína. A

avaliação do GH pode ser feita por três maneiras: pelo teor de nitrogênio liberado na hidrólise da proteína, na presença de um agente precipitante; pela determinação de grupos amino livres e pela titulação de prótons liberados (WANG e WANG, 2001). O GH e o perfil peptídico podem ser relacionados, no entanto, tal relação variará de acordo com a natureza da proteína e com o método de quantificação utilizado.

Neste capítulo, serão avaliados os métodos propostos por Gupta (1983), Sousa Jr. *et al.* (2003) e Silvestre *et al.* (1994a,b) utilizando amostras de concentrado proteico de soja (SPC) com diferentes graus de hidrólise. Os resultados obtidos pelos diferentes métodos serão confrontados com os resultados medidos através de coleta das frações peptídicas separadas por cromatografia de exclusão e quantificação do teor de proteínas de cada uma das frações pelo método de Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 2007). Para que tal avaliação fosse possível, primeiramente foi realizado um estudo de métodos de solubilização das proteínas do SPC.

## **4.2 Materiais e Métodos**

As amostras de SPC foram cedidas pela Imcopa – Imp. Exp. Ind. Óleos S.A. e são comercializados com a denominação Imcosoy 60<sup>®</sup> e Imcosoy 70<sup>®</sup>, com teores de proteína bruta de 65 e 70% (massa seca) respectivamente. Os SPCs hidrolisados foram escolhidos conforme seus graus de hidrólise a partir de um banco de hidrolisados da Imcopa – Imp. Exp. Ind. Óleos S.A. Os reagentes OPA (o-Ftaldialdeído), tetraborato dissódico decahidratado, dodecil sulfato de sódio (SDS), ditiotretitol (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol (solução 13 M), padrões de serina, tirosina e triptofano e marcadores de massa molecular foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich.

### **4.2.1 Solubilização das proteínas do SPC**

Os ensaios de solubilidade da proteína do SPC foram realizados com amostras de Imcosoy 60<sup>®</sup>, Imcosoy 70<sup>®</sup> e Imcosoy 70<sup>®</sup> com 3,5% de grau de hidrólise. Pesou-se 2,0 g de amostra seca e moída em moinho analítico, adicionou-se 100 mL de solução de extração, conforme a Tabela 4.1, em frascos erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram mantidos em mesa agitadora orbital a 200 rpm nas temperaturas de 25 e 40°C por 1 ou 2 horas conforme especificado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Ensaios de solubilização das proteínas do concentrado proteico de soja

Solução de extração	pH	Temperatura	Tempo	Amostra testada		
				Imcosoy 60 <sup>®</sup>	Imcosoy 70 <sup>®</sup>	Imcosoy 70 <sup>®</sup> hidrolisado
Água deionizada	6,5	25°C	2 h	X	X	X
		40°C	2 h	X		
Tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio	7,2	25°C	2 h	X	X	X
		40°C	2 h	X		
Tampão fosfato sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio preparado em solução etanólica 30%	7,2	25°C	2 h	X		
		40°C	2 h	X		
Ácido fórmico 50 mM	2,5	25°C	2 h	X		
		40°C	2 h	X		
Hidróxido de potássio 0,2% (m/v)	12,5	25°C	2 h	X	X	X
		40°C	2 h	X		
Tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio com 20mL/L de β-mercaptoetanol	7,2	25°C	2 h		X	X
Tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio com 20mL/L de β-mercaptoetanol e 40g/L de SDS	7,2	25°C	2 h		X	X
Hidróxido de potássio 0,2% (m/v) com 20mL/L de β-mercaptoetanol e 40g/L de SDS	8,72	25°C	2 h		X	X
Água deionizada com ajuste de pH da suspensão de SPC para 12 com NaOH	12	25°C	2 h		X	X
Tampão carbonato de sódio 2%	10	25°C	2 h		X	
	12	25°C	2 h		X	
Tampão TrisHCl 1 M pH 6,8 com 20mL/L de β-mercaptoetanol e 40g/L de SDS	6,8	25°C	2 h		X	X
Tampão TrisHCl 1 M pH 6,8 com 7,15mL/L de β-mercaptoetanol e 40g/L de SDS	6,8	25°C	2 h		X	X
Tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio com 40g/L de SDS e 1 g/L de DTT	7,2	25°C	1 h		X	X
			2 h		X	X
Tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio com 40g/L de SDS e 2 g/L de DTT	7,2	25°C	1 h		X	X
			2 h		X	X
Tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio com 40g/L de SDS e 3 g/L de DTT	7,2	25°C	1 h		X	X
			2 h		X	X

Os solventes de extração inicialmente testados foram água deionizada; tampão fosfato salino pH 7,2, por ser o tampão utilizado na solubilização de hidrolisados proteicos segundo o método proposto por Souza Jr. *et al.* (2003); ácido fórmico 50 mM, por ser o solvente de solubilização dos hidrolisados no método proposto por Silvestre *et al.* (1994a,b);

hidróxido de potássio 0,2%, por ser o solvente utilizado no método de análise de Solubilidade Proteica comumente utilizado em produtos proteicos de soja (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 2007). O etanol no tampão fosfato salino foi utilizado como agente caotrópico na tentativa de aumentar a solubilidade das proteínas dos SPCs no meio aquoso. Agentes caotrópicos são compostos que causam desnaturação proteica em concentrações elevadas, no entanto, podem favorecer a solubilização de porções hidrofóbicas da proteína em solução aquosa quando em concentrações reduzidas (FONSECA *et al.*, 2006). Os solventes citados foram testados em duas condições de temperatura: 25 e 40°C.

Koppelman *et al.* (2004) estudou a solubilidade de SPCs e definiu a extração em pH12 com ajuste por hidróxido de sódio como a melhor condição para obtenção de proteínas nativas em solução, logo este método também foi testado. Foi avaliada também a solubilidade em tampão carbonato de sódio nos pHs 10 e 12.

O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um tensoativo comumente utilizado para a estabilização de proteínas em solução; o  $\beta$ -mercaptoetanol e o ditioneitol (DTT) são agentes redutores utilizados no preparo de amostra para eletroforese desnaturante. Estes reagentes foram testados em diversas proporções com diferentes solventes conforme a Tabela 4.1.

Após o período de solubilização as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos para remoção da maior parte de sólidos suspensos e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo para remoção dos sólidos suspensos difíceis de decantar. As frações líquidas foram encaminhadas para análise de proteína bruta por Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 2007) no laboratório de controle de qualidade da Imcopa. A solubilidade proteica das amostras foi calculada conforme equação 4.1.

$$SOLUBILIDADE\ DA\ PROTEÍNA(\%) = \frac{M_{SOLUÇÃO} \times P_{SOLUÇÃO}}{M_{AMOSTRA} \times P_{AMOSTRA}} \times 100 \quad (4.1)$$

onde  $M_{solução}$  é a massa de solução de proteínas que neste caso foi considerada 100 gramas;  $P_{solução}$  é o teor de proteínas quantificado na solução em porcentagem;  $M_{amostra}$  é a massa de amostra solubilizada que foi 2,0 gramas e  $P_{amostra}$  é o teor de proteínas analisado na amostra inicial.

#### 4.2.2 Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

Para determinação do grau de hidrólise das amostras de SPC foi utilizado o método proposto por Nielsen et al. (2001). O grau de hidrólise é definido como a porcentagem de ligações peptídicas clivadas em relação às ligações peptídicas totais existentes na proteína original e é calculado conforme a equação 4.2.

$$GH = \frac{\text{número de ligações peptídicas clivadas}}{\text{número total de ligações peptídicas}} \times 100 = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (4.2)$$

Onde  $h_{tot}$  é o número total de ligações peptídicas por grama de proteína e é função do tipo de material utilizado;  $h$  é definido como *hidrólise equivalente*, é a concentração em miliequivalentes por grama de proteína de  $\alpha$ -amino grupos formados durante a hidrólise, podendo ser expresso como uma função de miliequivalente de serina-NH<sub>2</sub> conforme a equação 4.3.

$$h = (\text{serina-NH}_2 - \beta)/\alpha \quad (4.3)$$

Onde  $\alpha$  e  $\beta$  são os coeficientes angular e linear, respectivamente, da correlação entre *leucina-NH<sub>2</sub>* e  $h$  para proteína de soja, obtidos experimentalmente por Adler-Nissen (1979). Nielsen *et al.* (2001) utilizou para a reação com OPA a mesma correlação definida por Adler-Nissen (1979) para a determinação do grau de hidrólise de proteínas por reação com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS). Em seu trabalho, Nielsen *et al.* (2001) compararam os resultados de GH obtidos para os dois métodos, TNBS e OPA, e obtiveram resultados muito semelhantes.

Para muitas proteínas alimentares, a massa molar média dos aminoácidos é em torno de 125 g/mol, isto faz com que  $h_{tot}$  seja em torno de 8 g equivalentes por kg de proteína. Valores para  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $h_{tot}$  para as proteínas alimentares mais comuns foram relatados por Adler-Nissen (1986) e estão mostrados na Tabela 4.2.

O princípio do método é que para cada ligação peptídica clivada, um grupo  $\alpha$ -amino livre é formado. Este, por sua vez, reage com o OPA (o-Ftaldialdeído) e forma um complexo amarelo. A densidade óptica é medida espectrofotometricamente a 340 nm.



**Tabela 4.2 Valores de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $h_{tot}$  para as proteínas alimentares mais comuns.**

<b>Proteína</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>\beta</math></b>	<b><math>h_{tot}</math> (meqv/g)</b>
Soja	0,970	0,342	7,8
Gluten*	1,00	0,40	8,3
Caseína	1,039	0,383	8,2
Soro*	1,00	0,40	8,8
Gelatina	0,796	0,457	11,1
Carne*	1,00	0,40	7,6
Peixe*	1,00	0,40	8,6

\*Quando o material não foi examinado  $\alpha$  e  $\beta$  são estimados em 1.00 e 0.40, respectivamente. (Adler-Nissen, 1086).

Para o preparo do reagente OPA, diluiu-se 7,62 g de tetraborato dissódico decahidratado e 0,2 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 150 mL de água deionizada. Depois de totalmente dissolvidos, adicionou-se 0,160 g de OPA previamente dissolvido em 4mL de etanol. Posteriormente, adicionou-se 0,176 g de ditiotreitol (DTT). Por fim, o volume final da solução foi completado para 200 mL com água deionizada. O reagente deve ser preparado no dia da análise devido a sua baixa estabilidade (MAY e BROWN, 1989).

As amostras devem ser lidas contra padrão de serina preparado dissolvendo-se 50 mg de serina em 500 mL de água deionizada. Obtêm então uma solução de serina 0,1 mg/mL ou 0,9516 meqv/L.

As proteínas das amostras de SPC foram solubilizadas em solução 4% (m/v) de SDS e 3,0 g/L de DTT, preparado em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2 com 0,25 M de NaCl, por duas horas em agitador orbital a 25°C. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm em centrífuga de microtubos e o sobrenadante foi reservado para análise.

A reação foi realizada em tubos de ensaio contendo 3,0 mL de reagente OPA e 400  $\mu$ L de amostra. O tudo foi agitado em agitador tipo vórtex e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 340 nm após dois minutos de reação.

O padrão ( $DO_{padrão}$ ) foi lido contra reação com água deionizada ( $DO_{branco\ padrão}$ ) e as amostras de SPC ( $DO_{amostra}$ ) foram lidas contra a reação com a solução na qual foram extraídas ( $DO_{branco\ amostra}$ ). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

O cálculo é realizado conforme equação 4.4.

$$SerinaNH_2 = \frac{DO_{amostra} - DO_{branco amostra}}{DO_{padrão} - DO_{branco padrão}} \times 0,9516 \text{ meqv/L} \times \frac{0,1 \times 100}{M \times P} \text{ L/g proteína} \quad (4.4)$$

O último termo da equação 4.4 é o ajuste para a concentração de proteína presente na amostra reagida.  $M$  é a massa de amostra diluída em 100 mL de solução e  $P$  é a porcentagem de proteína da amostra.

O valor calculado em 4.4 é inserido na equação 4.3 e o valor de  $h$  obtido é inserido na equação 4.2 para obtenção do  $GH$ .

### 4.2.3 Separação Cromatográfica

Para avaliação das metodologias de perfil peptídico foram utilizadas amostras de SPC (Imcosoy 60<sup>®</sup>) com graus de hidrólise distintos e, portanto, contendo proteínas de diferentes tamanhos moleculares. Foi avaliado o farelo comercial, sem hidrólise; um hidrolisado produzido em planta piloto com GH de 6,7% e um hidrolisado produzido em laboratório com GH de 10,6%.

Os cromatogramas e o fracionamento das amostras foram realizados em cromatógrafo líquido marca Shimadzu modelo LC-6AD, em coluna de exclusão de tamanho Superdex 200 (GE Helthcare) com fase móvel tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2 e fluxo de 0,4 mL/min. Para obter frações do analito (peptídeos e proteínas) com faixa de tamanho molecular definida, 400 µL da amostra foram injetados na coluna e o eluente (contendo o analito) foi coletado automaticamente em intervalos de tempo previamente definidos com o auxílio de marcadores de massa molecular. Cada amostra foi corrida 10 vezes para obtenção de amostra de proteína suficiente para a análise por Kjeldahl. Foi utilizada detecção por UV com comprimento de onda de 214 nm na maior parte das análises, exceto para o método proposto por Silvestre *et al.* (1994a,b), conforme será mostrado a seguir.

Os padrões de massa molecular utilizados estão mostrados na tabela 4.3. As frações coletadas foram liofilizadas e estocadas para posterior análise.

**Tabela 4.3 Padrões utilizados para o estudo de diferentes métodos para a determinação do perfil peptídico em farelo de soja.**

<b>Padrão</b>	<b>Massa Molecular (kDa)</b>
Tyr-Tyr-Tyr	507
Bovine adrenal medula dodecapeptide	1424
Aprotinin from bovine lung	6.512
Cytochrome c from equine heart	12.000
Albumina	66.000
$\beta$ -amylase	200.000

#### **4.2.4 Dosagem de proteína das frações coletadas na separação cromatográfica**

A dosagem do teor de proteínas das frações obtidas na separação cromatográfica foi realizada pelo método de Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 2007).

As amostras liofilizadas foram diluídas em 3,0 mL de água ultrapura e adicionadas ao tubo de digestão juntamente com 1,0 g de catalisador ( $\text{CuSO}_4:\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1:3) e 10 mL de ácido sulfúrico. A mistura foi mantida no bloco digestor por 2,5 horas e à temperatura aproximada de 250°C. Em seguida, adicionou-se hidróxido de sódio 32% (m/v) ao tubo contendo a amostra digerida e a amônia liberada foi absorvida em um frasco contendo 100 mL de ácido bórico 2% (m/v) e indicador misto.

A quantificação do nitrogênio total nas amostras foi realizada titulando-se a amônia absorvida com ácido clorídrico 0,01 M. Para cada 10 mL de HCl (0,01 M) consumido há 0,0014 g de nitrogênio, logo, foi possível determinar a quantidade total de nitrogênio (em g) em uma determinada quantidade de amostra, multiplicando-se o volume total de HCl consumido por 0,0014. Em seguida, considerando que cada 100 g de proteína contêm aproximadamente 16 g de nitrogênio, foi possível estimar a massa de proteína na amostra. Ou seja, multiplicando-se a massa de nitrogênio por um fator de 6,25 obtém-se a massa de proteína na amostra.

#### 4.2.5 Análise dos Cromatogramas pelo Método das Áreas Cromatográficas

Este método, descrito por Gupta (1983) consiste em considerar a área do cromatograma diretamente proporcional à concentração de proteínas e peptídeos presentes na amostra. Assim, o perfil peptídico é determinado simplesmente dividindo o cromatograma em várias regiões (limitadas pelo tempo de retenção de marcadores de massa molecular) e calculando-se o percentual de cada fração de área cromatográfica em relação à área total do cromatograma. Conhecendo-se a concentração total de proteínas na amostra, supõe-se que o percentual em área é equivalente ao percentual em massa de proteínas e/ou peptídeos.

#### 4.2.6 Análise dos Cromatogramas pelo Método Sousa Jr.

O método Sousa Jr. (SOUSA JR. *et al*, 2003) consiste em levantar curvas de calibração a partir de padrões (concentração e massa molecular conhecidas) e correlacionar a área cromatográfica e tempo de retenção com a concentração do analito.

Primeiramente analisou-se a separação cromatográfica de vários marcadores de massa molecular (padrões) na condição padrão de análise. Construiu-se um gráfico de  $\log_{10}(\text{massa molecular})$  versus tempo de retenção (tr) em minutos e obteve-se uma equação do tipo:

$$\log_{10}(\text{MM}) = -\alpha \times (\text{tr}) + \beta \quad (4.5)$$

Onde  $\alpha$  e  $\beta$  são respectivamente os coeficientes angular e linear.

Para cada marcador de massa molecular foi construído um gráfico de concentração (g/L) versus área do cromatograma. A partir da regressão linear para cada conjunto de pontos foram determinados os coeficientes angulares para cada padrão (CA, concentração/área), os quais foram correlacionados com as respectivas massas moleculares, construindo-se um gráfico de CA versus  $\log_{10}(\text{MM})$ . A análise por regressão linear destes dados gerou a equação abaixo:

$$\text{CA} = \log_{10}(\text{MM}) + \text{coeficiente linear} \quad (4.6)$$

Substituindo-se a equação (4.5) na equação (4.6), temos:

$$CA = -\alpha \times (tr) + \beta + \text{coeficiente linear} \quad (4.7)$$

que pode ser escrita como:

$$\text{Concentração (g/L)} = [-\alpha \times (tr) + \beta + \text{coeficiente linear}] \times \text{área} \quad (4.8)$$

A equação (4.8) permite determinar a concentração de proteínas de uma amostra a partir da área cromatográfica e do tempo de retenção. A consideração do tempo de retenção no cálculo da concentração é uma maneira de corrigir o efeito do tamanho molecular na absorvidade dos peptídeos e proteínas.

#### 4.2.7 Análise dos Cromatogramas pelo Método Silvestre

O método de Silvestre (SILVESTRE *et al.*, 1994 a,b), uma modificação do método das áreas cromatográficas, consiste em corrigir a área cromatográfica devido a absorção de resíduos de aminoácidos aromáticos (tirosina e triptofano). Esta correção é feita subtraindo-se o valor de área cromatográfica, obtida a 230 nm, resultante da absorção desses resíduos.

Primeiramente, determina-se a área cromatográfica de padrões de tirosina e triptofano, ambos a concentração de 0,5 g/L, a 230, 280 e 300 nm. A amostra a ser analisada também é lida nos três comprimentos de onda. Então, determina-se os fatores de correção utilizando as equações 4.9 e 4.10.

$$A'_{230} = A_{230} - A''_{230} \quad (4.9)$$

$$A''_{230} = A_{230}^{trip} + A_{230}^{tiro} \quad (4.10)$$

Em que,  $A'_{230}$  é a área cromatográfica da amostra em 230 nm corrigida,  $A_{230}$  é a área cromatográfica da amostra em 230 nm,  $A''_{230}$  é a área cromatográfica devida ao triptofano e a tirosina na amostra em 230 nm,  $A_{230}^{trip}$  é a área do triptofano na amostra em 230 nm e  $A_{230}^{tiro}$  é a

área da tirosina na amostra em 230 nm. A área do triptofano da amostra em 230 nm por sua vez é calculada segundo a equação 4.11.

$$A_{230}^{trip} = A_{300}^{trip} \times \frac{A_{230}^{trip,p}}{A_{300}^{trip,p}} \quad (4.11)$$

Em que  $A_{300}^{trip}$  é a área do triptofano na amostra em 300 nm,  $A_{230}^{trip,p}$  é a área do triptofano no padrão em 230 nm e  $A_{300}^{trip,p}$  é a área do triptofano no padrão em 300 nm. O fator de conversão da área de triptofano a 300 nm para a correspondente área a 230 nm é:

$$\frac{A_{230}^{trip,p}}{A_{300}^{trip,p}} = 11,56 \quad (4.12)$$

Para o cálculo da tirosina na amostra em 230 nm, são utilizadas as seguintes equações:

$$A_{230}^{tiro} = A_{280}^{tiro} \times \frac{A_{230}^{tiro,p}}{A_{280}^{tiro,p}} \quad (4.13)$$

Em que,  $A_{230}^{tiro}$  é a área da tirosina na amostra em 230 nm,  $A_{280}^{tiro}$  é a área da tirosina na amostra em 280 nm,  $A_{230}^{tiro,p}$  é a área da tirosina no padrão em 230 nm e  $A_{280}^{tiro,p}$  é a área da tirosina no padrão em 280 nm. O fator de conversão da área de tirosina a 280 nm para a correspondente área a 230 nm é:

$$\frac{A_{230}^{tiro,p}}{A_{280}^{tiro,p}} = 3,44 \quad (4.14)$$

Para se calcular a área da tirosina na amostra em 280 nm, utiliza-se a equação (4.15).

$$A_{280}^{tiro} = A_{280} - A_{280}^{trip} \quad (4.15)$$

Em que  $A_{280}^{tiro}$  é a área da tirosina na amostra em 280 nm,  $A_{280}$  é a área da amostra em 280 nm e  $A_{280}^{trip}$  é a área do triptofano na amostra em 280 nm.

Toda a área cromatográfica observada a 280 nm na amostra deve-se a absorção por tirosina e triptofano. Pode-se calcular a área do triptofano na amostra em 280 nm como mostra a equação (4.16).

$$A_{280}^{trip} = A_{300}^{trip} \times \frac{A_{280}^{trip,p}}{A_{300}^{trip,p}} \quad (4.16)$$

Em que  $A_{280}^{trip}$  é a área do triptofano na amostra em 280 nm,  $A_{300}^{trip}$  é a área do triptofano na amostra em 300 nm,  $A_{280}^{trip,p}$  é a área do triptofano no padrão em 280 nm e  $A_{300}^{trip,p}$  é a área do triptofano no padrão em 300 nm. O fator de conversão da área de triptofano a 300 nm para a correspondente área a 280 nm é:

$$\frac{A_{280}^{trip,p}}{A_{300}^{trip,p}} = 10,03 \quad (4.17)$$

#### 4.2.8 Estudo comparativo dos métodos de análise

Para facilitar a comparação dos métodos avaliados, foi calculado o desvio, em relação ao método de referência, de cada uma das frações peptídicas das amostras analisadas pelos diferentes métodos, conforme a equação 4.18, e os desvios médios referentes a cada amostra analisada (Equação 4.19).

$$Desvio = X - REF \quad (4.18)$$

Onde  $X$  é o resultado obtido pelos métodos sob avaliação de uma determinada fração peptídica de uma determinada amostra;  $REF$  é o resultado obtido para a mesma fração peptídica da mesma amostra com o método de referência, no caso, o Kjeldahl. A Tabela 4.4 mostra os intervalos de tempo de cada faixa de tamanho molecular obtida através de calibração por padrões de tamanhos moleculares conhecidos.

**Tabela 4.4 Dados do fracionamento de proteínas e peptídeos usando Superdex 200. Fase móvel: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,2. Fluxo = 0.40 mL/min. Leitura a 214 nm.**

Fração	Faixa de tamanho molecular (Da)	Intervalo de tempo (min)
1	> 200.000	19 – 27,4
2	66.000 – 200.000	27,4 – 32,9
3	12.000 – 66.000	32,9 – 41,4
4	6.000 – 12.000	41,4 – 47,8
5	1.000 – 6.000	47,8 – 52,1
6	500 – 1.000	52,1 – 57,8
7	< 500	57,8 – 73,0

### 4.3 Resultados e Discussão

A Tabela 4.5 mostra os resultados de solubilidade das proteínas das amostras de concentrado proteico nas diversas soluções extratantes. A solubilidade em água das proteínas presentes nas amostras de Imcosoy 60<sup>®</sup> e 70<sup>®</sup> foram 4,2 e 4,6% respectivamente. Após o processo de hidrólise, a solubilidade do Imcosoy 70<sup>®</sup> aumentou de 4,6 para 27,9%. O aquecimento a 40°C mostrou pouca ou nenhuma melhora para a solubilidade das proteínas do Imcosoy 60<sup>®</sup> nas condições em que esta temperatura foi testada. Resultados muito semelhantes à solubilidade em água foram encontrados para o tampão fosfato salino (tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio). A presença de etanol como agente caotrópico não foi eficiente no aumento da solubilidade das proteínas do SPC. Os melhores resultados de solubilidade foram encontrados quando se utilizou altos valores de pH, confirmando os estudos feitos por KOPPELMAN *et al.* (2004) que obtiveram solubilidades proteicas para amostras de SPCs de diferentes fabricantes entre 52 e 67% quando extraídos em pH 12. Ao utilizarmos o ajuste de pH para 12 com hidróxido de sódio obteve-se recuperação de 54,5% das proteínas do farelo não hidrolisado e 80,2% para o farelo hidrolisado. A recuperação foi ainda maior ao utilizar-se hidróxido de potássio 0,2%, solução extratante utilizada para análise de Solubilidade da Proteína em KOH (Seção 2.3-Capítulo 2), alcançando valores de aproximadamente 68 e 90% de recuperação para as amostras não hidrolisada e hidrolisada, respectivamente. O tampão carbonato de sódio, pHs 10 e 12, teve eficiência muito abaixo das obtidas para os hidróxidos de sódio e potássio.



Tabela 4.5 Resultados de solubilidade das proteínas das amostras de concentrado proteico de soja.

Solução de extração	pH	Temperatura	SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA (%)		
			Imcosoy 60®	Imcosoy 70®	Imcosoy 70® hidrolisado
Água deionizada	6,4	25°C	4,2±0,8	4,6±1,1	27,9±0,3
		40°C	4,6±0,4	-	-
Tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio	7,2	25°C	4,5±1,2	5,5±1,0	28,1±0,2
		40°C	9,1±1,0	-	-
Tampão fosfato sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio preparado em solução etanólica 30%	7,2	25°C	3,0±0,8	-	-
		40°C	6,0±0,7	-	-
Ácido fórmico 50 mM	2,5	25°C	3,4±0,8	-	-
		40°C	2,1±0,5	-	-
Hidróxido de potássio 0,2% (m/v)	12,5	25°C	68,3±3,0	68,7±6,9	89,8±2,0
		40°C	53,5±5,2	-	-
Tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio com 20mL/L de β-mercaptoetanol	7,2	25°C	-	13,7±4,2	33,1±0,0
Tampão fosfato de sódio 20 mM com 0,25 M de cloreto de sódio com 20mL/L de β-mercaptoetanol e 40g/L de SDS	7,2	25°C	-	66,3±4,5	89,5±2,0
Hidróxido de potássio 0,2% (m/v) com 20mL/L de β-mercaptoetanol e 40g/L de SDS	8,72	25°C	-	84,3±5,4	94,0±2,1
Água deionizada com ajuste de pH da suspensão de SPC para 12 com NaOH	12	25°C	-	54,5±4,9	80,2±4,4
Tampão carbonato de sódio 2%	10	25°C	-	8,1±0,6	-
	12	25°C	-	12,9±3,1	-
Tampão TrisHCl 1 M pH 6,8 com 20mL/L de β-mercaptoetanol e 40g/L de SDS	6,8	25°C	-	61,7±7,9	94,0±2,3
Tampão TrisHCl 1 M pH 6,8 com 7,15mL/L de β-mercaptoetanol e 40g/L de SDS	6,8	25°C	-	69,0±3,6	92,3±0,3

Apesar de se ter obtido altos valores de solubilidade para extrações em pH alto, tais condições não são convenientes de serem utilizadas para preparo de amostras para cromatografia, pois as colunas cromatográficas não são resistentes a tais valores de pH e ao se neutralizar as amostras as proteínas precipitam tornando-se insolúveis novamente. O ácido fórmico 50 mM, utilizado como fase móvel para o fracionamento de peptídeos pelo método proposto por Silvestre *et al.* (1994a,b), não foi capaz de dissolver as proteínas do concentrado proteico, por este motivo, a metodologia de fracionamento de peptídeos utilizada por Silvestre *et al.* não pode ser aplicada na determinação do perfil de tamanho molecular das proteínas do SPC e seus hidrolisados. Sousa Jr. *et al.* (2003) utilizou tampão fosfato salino como fase móvel e este solvente também não foi eficiente na solubilização das proteínas do SPC,

entretanto, ao utilizarmos tal solvente na presença de um detergente aniônico e um agente redutor forte, como o SDS e o  $\beta$ -mercaptoetanol, conseguiu-se valores de solubilidade muito próximos aos obtidos com KOH 0,2%.

O SDS e o  $\beta$ -mercaptoetanol, assim como o ditioneitol (DTT), são comumente utilizados no preparo de amostras para eletroforese desnaturante juntamente com tampão TrisHCl pH 6,8, no qual obteve-se rendimentos de extração um pouco superiores aos obtidos com tampão fosfato, no entanto, o Tris-base interferiu na leitura em espectrofotômetro a 340 nm, comprimento utilizado para a análise de grau de hidrólise (Seção 4.2.2). A extração das proteínas teve o maior rendimento quando se utilizou o SDS e o  $\beta$ -mercaptoetanol em conjunto com o KOH 0,2%, entretanto, como foi comentado anteriormente, optou-se pela utilização do tampão fosfato salino em condições de pH próximas da neutralidade.

O DTT foi avaliado como substituto do  $\beta$ -mercaptoetanol devido ao fato de este último ter odor muito forte e desagradável. Os resultados de solubilidade obtidos para o DTT estão mostrados na Tabela 4.6. A concentração de DTT de 3,0 g/L foi utilizada inicialmente por ser a concentração utilizada no tratamento de amostras para eletroforese desnaturante. Foram testadas também as concentrações de 1,0 e 2,0 g/L durante os tempos de extração de 1 e 2 horas.

**Tabela 4.6 Resultados de solubilidade das proteínas dos SPCs em tampão fosfato 20 mM, NaCl 0,25 M, SDS 40g/L e DTT em diferentes concentrações.**

Amostra	Concentração de DTT (g/L)	Tempo de agitação (h)	Solubilidade da proteína (%)
Imcosoy 70 <sup>®</sup>	1	1	58,80±5,3
	1	2	69,56±3,5
	2	1	63,85±5,9
	2	2	73,74±3,2
	3	1	69,01±3,6
	3	2	75,95±4,0
Imcosoy 70 <sup>®</sup> hidrolisado	1	1	89,50±2,2
	1	2	92,98±0,5
	2	1	89,18±2,1
	2	2	93,25±1,5
	3	1	89,56±1,0
	3	2	94,66±2,3

As diferentes concentrações de DTT não alteraram significativamente a eficiência de extração das proteínas do SPC. O aumento do tempo de extração de 1 para 2 horas aumentou significativamente a extratabilidade das proteínas, principalmente na amostra

de SPC não hidrolisado. Com base nos resultados apresentados, definiu-se a utilização de tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 0,25 M, 40 g/L de SDS e 1,0 g/L de DTT como solução de extração de proteínas de amostras de concentrado proteico de soja com e sem hidrólise para posterior análise seja de grau de hidrólise, pelo método OPA, seja de perfil peptídico, pelo método Sousa Jr.

Após definida a metodologia de solubilização as amostras foram analisadas para definição do grau de hidrólise. Os GH obtidos para as amostras de Imcosoy 60<sup>®</sup>, Imcosoy 70<sup>®</sup> e Imcosoy 70<sup>®</sup> hidrolisado utilizadas nos testes de solubilidade foram de 0,5; 0,26 e 3,48% respectivamente.

A Tabela 4.7 mostra a distribuição de massa molecular obtida para a amostra de Imcosoy 60<sup>®</sup> não hidrolisada, analisada pelos três métodos de análise de dados avaliados e por Kjeldahl, método de referência. A maior parte das proteínas solubilizadas da amostra não hidrolisada foi encontrada na fração correspondente a proteínas de tamanho molecular acima de 200 kDa. O teor de peptídeos abaixo de 6 kDa foi de aproximadamente 13% das proteínas solubilizadas, considerando que, para esta amostra, a solubilização das proteínas foi em torno de 75%.

**Tabela 4.7 Distribuição da massa molecular do Imcosoy 60<sup>®</sup> não hidrolisado e desvios dos resultados em relação ao Kjeldahl.**

		% MASSA DE PEPTÍDEO (DESVIO EM RELAÇÃO AO MÉTODO DE REFERÊNCIA)			
Fração	Faixa de tamanho molecular (kDa)	Método das áreas Cromatográficas	Sousa Jr.	Silvestre	Kjeldahl (Referência)
1	> 200	29,1 (-14,9)	36,6 (-7,4)	23,0 (-21,0)	44,0
2	66 – 200	20,4 (-6,3)	23,7 (-3,0)	20,4 (-6,3)	26,7
3	12 – 66	19,8 (+7,8)	19,7 (+7,7)	7,8 (+4,2)	12,0
4	6– 12	7,7 (+3,2)	7,2 (+2,7)	4,5 (0,0)	4,5
5	1– 6	5,1 (+1,2)	4,4 (+0,5)	12,1 (+8,2)	3,9
6	0,5 – 1	1,9 (-1,4)	1,4 (-1,9)	3,0 (-0,3)	3,3
7	< 0,5	15,9 (+10,3)	7,2 (+1,6)	29,2 (+23,6)	5,6

Os dados entre parênteses ao lado de cada resultado mostra o desvio calculado em relação ao resultado obtido para o método de referência, Kjeldahl. A Tabela 4.8 mostra os resultados obtidos para o hidrolisado com 6,7% de grau de hidrólise analisado pelos quatro

diferentes métodos. Os resultados obtidos para a amostra com 19,7% de GH estão mostrados na Tabela 4.9.

**Tabela 4.8 Distribuição da massa molecular de proteínas do Imcosoy 60® com GH de 6,7% hidrolisado e desvios dos resultados em relação ao Kjeldahl.**

		% MASSA DE PEPTÍDEO (DESVIO EM RELAÇÃO AO MÉTODO DE REFERÊNCIA)			
Fração	Faixa de tamanho molecular (kDa)	Método das áreas Cromatográficas	Sousa Jr.	Silvestre	Kjeldahl (Referência)
1	> 200	18,4 (+5,5)	24,6 (+11,7)	16,9 (+4,0)	12,9
2	66 – 200	9,4 (-2,0)	11,6 (+0,2)	7,5 (-3,9)	11,4
3	12 – 66	12,9 (-0,8)	13,6 (-0,1)	8,7 (-5,0)	13,7
4	6– 12	21,0 (+2,9)	20,8 (+2,7)	16,1 (-2,0)	18,1
5	1– 6	21,9 (-0,8)	19,8 (-2,9)	16,5 (-6,2)	22,7
6	0,5 – 1	5,4 (-4,9)	4,2 (-6,1)	5,9 (-4,4)	10,3
7	< 0,5	10,7 (0,0)	5,1 (-5,6)	28,2 (+17,5)	10,7

**Tabela 4.9 Distribuição da massa molecular do Imcosoy 60® com GH de 19,7% hidrolisado e desvios dos resultados em relação ao Kjeldahl.**

		% MASSA DE PEPTÍDEO (DESVIO EM RELAÇÃO AO MÉTODO DE REFERÊNCIA)			
Fração	Faixa de tamanho molecular (kDa)	Método das áreas Cromatográficas	Sousa Jr.	Silvestre	Kjeldahl (Referência)
1	> 200	0,6 (-1,7)	1,0 (-1,3)	2,7 (+0,4)	2,3
2	66 – 200	0,0 (-6,0)	0,0 (-6,0)	0,0 (-6,0)	6,0
3	12 – 66	0,7 (-3,3)	0,9 (-3,1)	0,8 (-3,2)	4,0
4	6– 12	16,8 (+6,3)	21,0 (+10,5)	12,9 (+2,4)	10,5
5	1– 6	28,4 (-21,7)	32,6 (-17,5)	53,2 (+3,1)	50,1
6	0,5 – 1	32,4 (+13,9)	32,1 (+13,6)	18,0 (-0,5)	18,5
7	< 0,5	20,0 (+14,0)	12,1 (+6,1)	11,2 (+5,2)	6,0

O método das Áreas cromatográficas apresentou desvios altos para as amostras de 0,5 e 19,7% de GH. A amostra de 6,7% de GH teve bons resultados quando analisada por este método. Analisando-se os desvios por fração peptídica observam-se os maiores erros para

as frações F1, F5 e F6 e F7, o que indica que o método das Áreas cromatográficas pode ser utilizado para se estimar o perfil de tamanho de uma mistura de proteínas de 6 a 66 kDa.

O método Sousa Jr. mostrou desvio significativamente alto quando analisou-se a amostra com 19,7% de GH. Para este método os maiores desvios foram observados nas frações F1, F5 e F6 sendo, portanto, adequado para se estimar o perfil de tamanho molecular de proteínas entre 6 e 200 kDa.

O método Silvestre mostrou desvios significativamente altos para as amostras de 0,5 e 6,7% de GH mostrando bons resultados para a amostra de 19,7% de GH. Os maiores desvios foram observados nas frações F1 e F7. Contudo, o método Silvestre pode ser utilizado para a estimativa de perfil de tamanho molecular de misturas de proteínas e peptídeos entre 1 e 200 kDa sendo, portanto, mais abrangente que os demais métodos avaliados.

Nota-se que todos os métodos apresentam respostas pouco exatas nas frações das extremidades (F1, F6 e F7), provavelmente devido a interferências de materiais não proteicos que absorvem em 214 nm. Entretanto, no intervalo de frações 2 a 5, praticamente todos os métodos acompanham bem o perfil peptídico determinado pelo método de Kjeldahl.

As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 mostram as distribuições dos desvios para os três métodos analisados. Analisando-se os gráficos, não se pode observar um comportamento sistemático dos desvios.

**Figura 4.1 – Distribuição dos desvios para o método das Áreas Cromatográficas.**

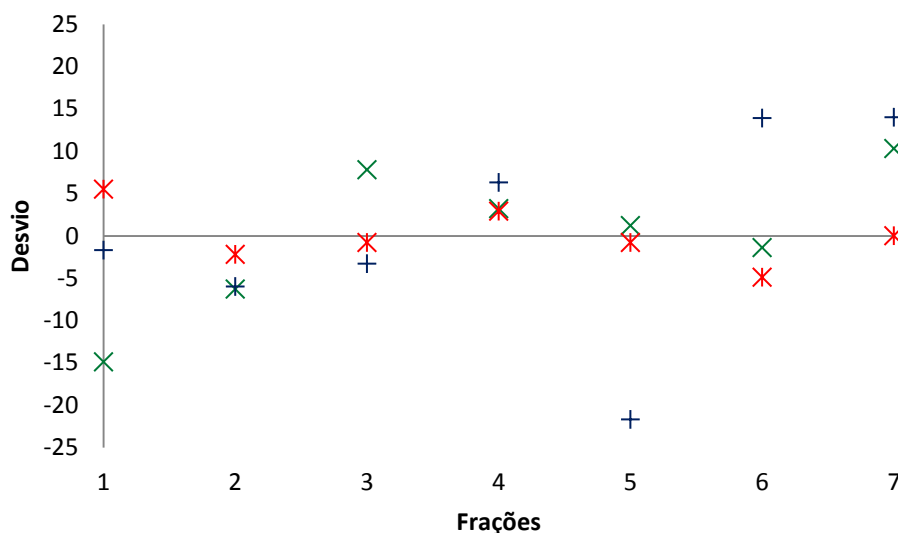


Figura 4.2 - Distribuição dos desvios para o método Sousa Jr.

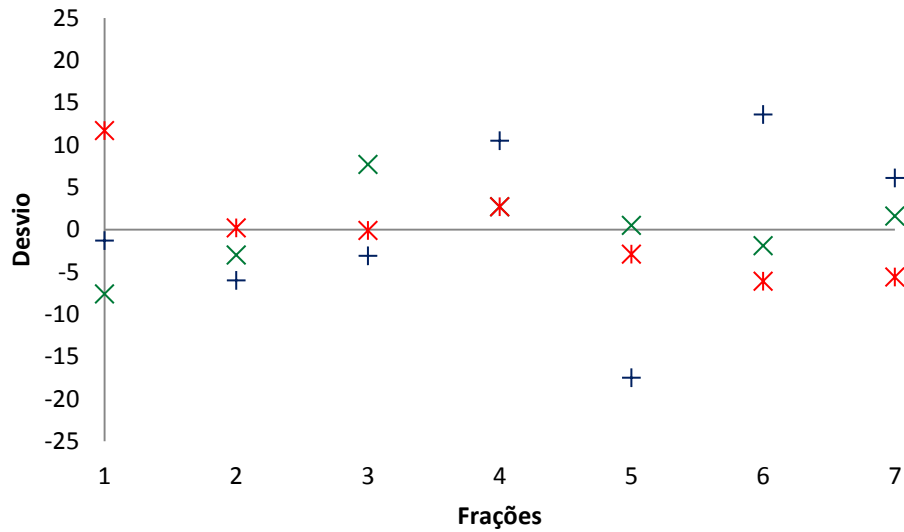
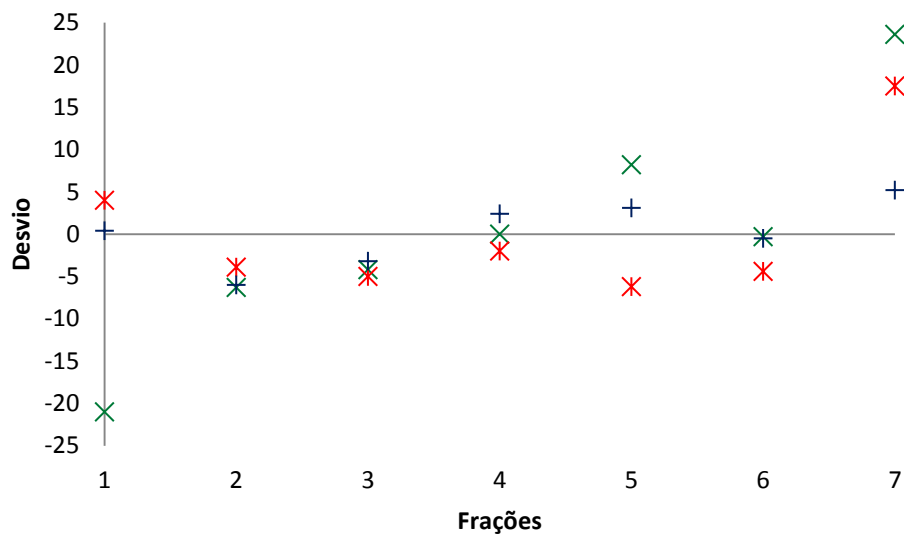


Figura 4.3 - Distribuição dos desvios para o método Silvestre.



#### 4.4 Conclusão

Por meio dos perfis peptídicos obtidos, pode-se concluir que os métodos investigados neste trabalho podem ser utilizados para se estimar o perfil de tamanho molecular de proteínas e peptídeos derivados do concentrado proteico de soja. Quando comparados com os resultados de dosagem de proteínas de cada fração, os três métodos apresentaram desvios maiores nas frações extremas, ou seja, para as proteínas de tamanho molecular muito alto e para os peptídeos de tamanho molecular muito baixo.

O método Sousa Jr. apresentou bons resultados no levantamento de perfis peptídicos de amostras de proteínas não hidrolisadas e hidrolisadas com baixo grau de hidrólise. Para hidrolisados com alto grau de hidrólise, o método Silvestre aproximou-se mais do perfil peptídico obtido com o método de referência, enquanto que o método das Áreas Cromatográficas foi o mais preciso na análise do hidrolisado com baixo grau de hidrólise. Portanto, a escolha do método de tratamento dos dados de separação cromatográfica de peptídeos deve levar em consideração o grau de hidrólise da amostra analisada.

O método das Áreas cromatográficas, apesar de ter mostrado os maiores desvios em relação à referência, é o mais interessante do ponto de vista prático, pois é o mais simples de ser executado.

Definidas as metodologias analíticas de avaliação do processo de hidrólise de proteínas do SPC, pôde-se realizar os ensaios de otimização do processo de hidrólise enzimática do SPC, tema que será abordado no Capítulo 5.

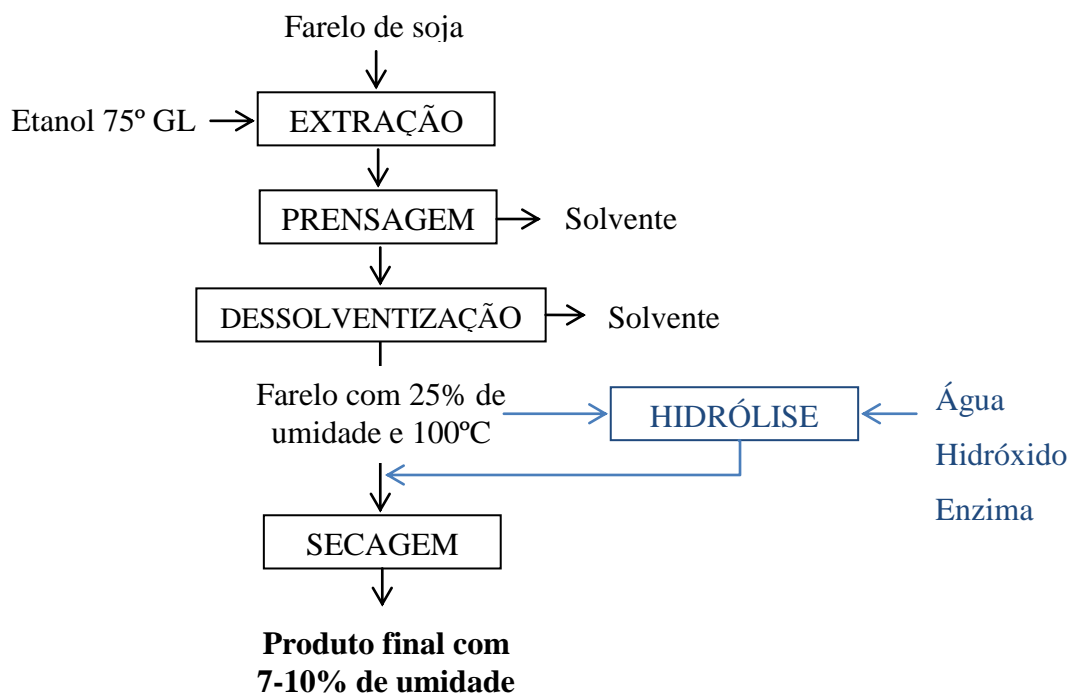
## 5. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CONCENTRADO PROTEICO DE SOJA

### 5.1 Introdução

Conforme foi especificado na Introdução Geral, o objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de um produto de proteína de soja hidrolisada, com o menor custo de produção possível, para viabilizar a sua utilização como substituto dos concentrados proteicos comuns em dietas animais que requerem fontes proteicas de alta qualidade nutricional, como *aquafeed*, *pet-food* e substitutos de leite para bezerros e leitões em desmame.

A Figura 5.1 mostra o processo atual de produção do concentrado proteico da Imcopa – Imp. Exp. Ind. Óleos S.A. (Araucária-PR) e as alterações que deverão ser feitas para a produção do farelo hidrolisado.

**Figura 5.1 Diagrama de blocos do processo de produção do SPC e alterações necessárias para a produção do produto hidrolisado (azul).**





Os principais custos envolvidos no processo de hidrólise são: custo da enzima, do hidróxido e custos energéticos (eletricidade e vapor). O custo de eletricidade é difícil de ser estimado sem a definição do modelo de equipamento utilizado na homogeneização do meio de reação. O custo de vapor é dependente do teor de umidade no qual a hidrólise é realizada, ou seja, quanto maior a quantidade de água adicionada para a hidrólise maior será a quantidade de água que deverá ser evaporada na secagem.

Contudo, este capítulo tem o objetivo de estudar a hidrólise enzimática das proteínas do SPC, pela enzima Novo-Pro D<sup>®</sup>, para avaliação do comportamento do processo frente às variáveis: pH, temperatura, relação enzima/substrato, velocidade de agitação e teor de sólidos do meio de reação. Conhecido o comportamento do processo frente às variações citadas torna-se possível delinear a estratégia mais viável economicamente de obtenção do produto com a especificação desejada.

## **5.2 Materiais e Métodos**

As hidrólises foram realizadas em amostra de SPC Imcosoy 62<sup>®</sup> (Imcopa - Imp. Exp. Ind. Óleos S.A.) e as enzimas Novo-Pro D<sup>®</sup> e Alcalase<sup>®</sup> foram gentilmente cedidas pela Novozymes Latin America Ltda.

A composição do farelo utilizado nos testes de bancada foi analisada no laboratório Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda.

### **5.2.1 Relação Enzima/Substrato**

Para definição da melhor relação enzima/substrato para o processo de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D<sup>®</sup>, variou-se a concentração mássica do preparado enzimático comercial em relação à concentração mássica de proteínas (teor de nitrogênio total multiplicado por 6,25). Os valores testados foram: 0,25%; 0,50%; 1,0% e 1,5% (m/m).

A hidrólise foi realizada a 55°C e pH 8,0 em titulador automático modelo 718 Stat Titrimo (Metrohm Ltda., Suíça) com 100 mL de suspensão de SPC a 10% de sólidos (m/m). Os resultados de grau de hidrólise foram obtidos conforme metodologia descrita no item 3.2.4.

### **5.2.2 Influência da velocidade de agitação**

Por apresentar alta capacidade de absorção de água, a suspensão de SPC apresenta alta viscosidade e, portanto, julgou-se necessário avaliar a influência da velocidade de agitação do meio de reação.

Foi utilizado agitador mecânico marca IKA, modelo RW20, nas velocidades de 200, 300, 400, 500 e 600 rpm.

A hidrólise foi realizada a 55°C e pH 8,0 em titulador automático modelo 718 Stat Titrimo (Metrohm Ltda., Suíça) com 100 mL de suspensão de SPC a 10% de sólidos (m/m) e relação enzima/substrato de 0,5% (massa de enzima/massa de proteína). Os resultados de grau de hidrólise foram obtidos conforme metodologia descrita no item 3.2.4.

### **5.2.3 Condições de pH e Temperatura**

Para definição das condições de pH e temperatura ótimas para o processo de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D<sup>®</sup> foram realizados experimentos variando-se, primeiramente, a temperatura (45, 55 e 65°C) em pH 7 e, após escolhida a melhor temperatura, experimentou-se os valores de pH 8,0; 9,0 e 10. As hidrólises foram realizadas por 3 horas em titulador automático modelo 718 Stat Titrimo (Metrohm Ltda., Suíça) com 100 mL de suspensão de SPC a 10% de sólidos (m/m) e relação enzima/substrato de 0,5% (massa de enzima/massa de proteína). Os resultados de grau de hidrólise foram obtidos conforme metodologia descrita no item 3.2.4.

Nos ensaios com variação de pH, avaliou-se também o consumo de hidróxido de sódio pela suspensão de SPC na ausência de enzima.

### **5.2.4 Comparação da Novo-Pro D<sup>®</sup> com a Alcalase 2.4L<sup>®</sup>**

Para validar a escolha da enzima Novo-Pro D<sup>®</sup>, realizou-se experimentos de hidrólise com a Alcalase 2.4L<sup>®</sup> nas condições otimizadas para a Novo-Pro D<sup>®</sup> e também para a relação enzima/substrato de 1,0% (m/m). As hidrólises foram realizadas por 3 horas em titulador automático modelo 718 Stat Titrimo (Metrohm Ltda., Suíça) com 100 mL de suspensão de SPC a 10% de sólidos. Os resultados de grau de hidrólise foram obtidos conforme metodologia descrita no item 3.2.4.

### 5.2.5 Aumento de escala e variação do teor de sólidos no meio de reação

Os testes de hidrólise em escala piloto foram realizados em bateadeira industrial modelo BP50 fabricada por Conserli Indústria e Comércio de Máquinas Ltda. (São Paulo-SP) com capacidade para 50 litros e dotada de sistema de aquecimento elétrico em camisa de água. O controle de pH foi realizado com o auxílio de um módulos de controle e de bombas peristálticas do biorreator TEC-BIO (TECNAL Equipamento para Laboratórios Ltda.) conforme está mostrado na Figura 5.2.

**Figura 5.2 - Sistema piloto para hidrólise do SPC composto por : (1) bateadeira industrial e (2) módulo de controle TEC-BIO.**



Os testes foram realizados a  $55 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 9 \pm 0,2$  e 0,5% de Novo-Pro D<sup>®</sup> (massa de enzima/massa de proteína) com agitação de 40 rpm. Foi variada a relação sólidos/umidade do meio de reação, as concentrações avaliadas foram de 10, 20 e 30% de sólidos mantendo-se a massa final da mistura em torno 40kg.

A hidrólise foi realizada durante 3 horas durante as quais foram retiradas amostras para avaliação do GH. As amostras retiradas foram aquecidas em micro-ondas por 5

minutos para inativação da enzima e secas em estufa de circulação de ar a 80°C por 48 horas. Após secagem, as amostras foram resfriadas em dessecador e moídas em moinho analítico para as análises de umidade e proteína bruta que foram realizadas no laboratório de controle de qualidade da Imcopa – Imp., Exp., Ind. de Óleos S.A. Em seguida as amostras foram solubilizadas e seus respectivos graus de hidrólise foram determinados conforme método descrito no item 4.2.2.

O processo foi realizado também na ausência de enzima para a verificação de possíveis alterações no GH das proteínas devido às condições de pH, temperatura e agitação.

### **5.2.6 Determinação dos perfis peptídicos de amostras com diferentes graus de hidrólise**

A avaliação de perfil de tamanho molecular dos peptídeos e proteínas dos SPCs foi realizada no laboratório de cromatografia da Imcopa – Imp. Exp. Ind. De Óleos S.A. por SE-HPLC (cromatografia por exclusão de tamanho) em cromatógrafo da Agilent Technologies Série 1100, utilizando coluna BIO-SIL SEC-125 300x7,8mm da Bio-Rad Laboratories, tampão fosfato de sódio 50mM com 0,25M de NaCl como fase móvel a 1,0 mL/min. e 20uL de volume de injeção lido em detector UV a 214nm. A distribuição dos peptídeos foi obtida com auxílio do software Agilent GPC Data Analysis para ChemStation.

As amostras foram extraídas em solução 40 g/L de SDS e 3,0 g/L de DTT, pesando-se 2,0g de amostra seca e moída para 100 mL de solução. A extração foi realizada por 2 horas em agitador orbital mantido a 25°C. As misturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e em seguida filtradas em membrana de 0,45 µm. As eficiências de extração foram determinadas conforme detalhado na Seção 4.2.1 utilizando a Equação 4.1.

### **5.2.7 Avaliação da solubilidade proteica em água de farelos com diferentes graus de hidrólise**

Amostras de diferentes graus de hidrólise obtidas ao longo das curvas de hidrólise em escala piloto (a 10 e 30% de sólidos), após secagem e moagem, foram submetidas à extração em água deionizada para avaliação da solubilidade em água. Foram dissolvidos 2,0 gramas de amostra em 100 mL de água deionizada e o pH da mistura foi neutralizado com ácido sulfúrico 15% (v/v). A determinação da solubilidade foi realizada conforme detalhado na Seção 4.2.1 utilizando a Equação 4.1.

### 5.2.8 Comparação entre os resultados de GH obtidos pelos métodos pHStat e OPA

Para a verificação da diferença dos resultados de grau de hidrólise obtidos pelos dois diferentes métodos utilizados neste trabalho, realizou-se uma curva de hidrólise do SPC a 10% de sólidos, 55°C, 0,5% de massa de enzima/massa de proteína em titulador automático modelo 718 Stat Titrino (Metrohm Ltda., Suíça) com 100 mL de suspensão e mantida em pH 9,0. Foram retiradas amostras em tempos estratégicos para obtenção de amostras com GH de 2, 4, 7, 9, 11, 14 e 17%. As amostras foram incubadas em banho-maria em temperatura de ebulição por 5 minutos para inativação da enzima.

Em seguida, as amostras foram extraídas em solução 40 g/L de SDS e 3,0 g/L de DTT por 2 horas em agitador orbital mantido a 25°C. A diluição foi realizada de maneira que a concentração final de sólidos na mistura extratante fosse de aproximadamente 2g/100mL. Após a extração, as misturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram analisados pelo método OPA descrito no item 4.2.2.

### 5.3 Resultados e Discussão

A Tabela 5.1 mostra os resultados das análises de composição centesimal e a Tabela 5.2 mostra os resultados de composição de aminoácidos do SPC utilizado em todos os testes em escala de bancada.

**Tabela 5.1 Composição centesimal do SPC utilizado nos testes em escala de bancada. Analisado do Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda.**

ANÁLISE	RESULTADO (%)
Umidade	7,86
Proteína	61,17
Lipídeos totais	1,2
Cinzas	5,64
Fibra alimentar insolúvel	17,7
Fibra alimentar solúvel	3,0
Fibra alimentar total	20,7
Fibra bruta	3,4

**Tabela 5.2 Composição de aminoácidos do SPC utilizado nos testes em escala de bancada. Analisado do Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda.**

AMINOÁCIDO	RESULTADO (g/100g de amostra)
Ácido aspártico	7,24
Ácido glutâmico	11,5
Alanina	2,74
Arginina	4,66
Fenilalanina	3,24
Glicina	2,63
Histidina	1,67
Isoleucina	3,00
Leucina	4,86
Lisina	3,82
Prolina	3,36
Serina	3,18
Tirosina	2,35
Treonina	2,51
Valina	3,14
Triptofano	0,824
Metionina	0,814
Cisteína + Cistina	0,848

O gráfico da Figura 5.3 mostra as curvas de hidrólise do SPC submetido a hidrólise pela Novo-Pro D<sup>®</sup> em quatro concentrações distintas. Observa-se que ao aumentarmos a concentração de enzima no meio de reação não ocorre um ganho proporcional em termos de grau de hidrólise. O gráfico da Figura 5.4 mostra a variação das velocidades iniciais de reação por unidade de atividade enzimática ( $V_0/E$ ) em cada um dos experimentos em que se variou a concentração de enzima, nota-se que quanto maior a dosagem de enzima menor a atividade por unidade enzimática. Apesar de não ser a condição em que se obteve a maior eficiência da enzima, escolheu-se 0,50% a relação enzima/substrato mais adequada para os ensaios futuros, pois quando dobramos a concentração de 0,50 para 1,0% não obtivemos ganho, em termos de grau de hidrólise, proporcional ao obtido quando a relação foi aumentada de 0,25 para 0,50%.

Figura 5.3 - Curvas de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D® a 55°C, pH 8,0 com (■) 0,25% (massa de enzima/massa de proteína); (♦) 0,5% (massa de enzima/massa de proteína); (▲) 1,0% (massa de enzima/massa de proteína) e (●) 1,5% (massa de enzima/massa de proteína). Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico.

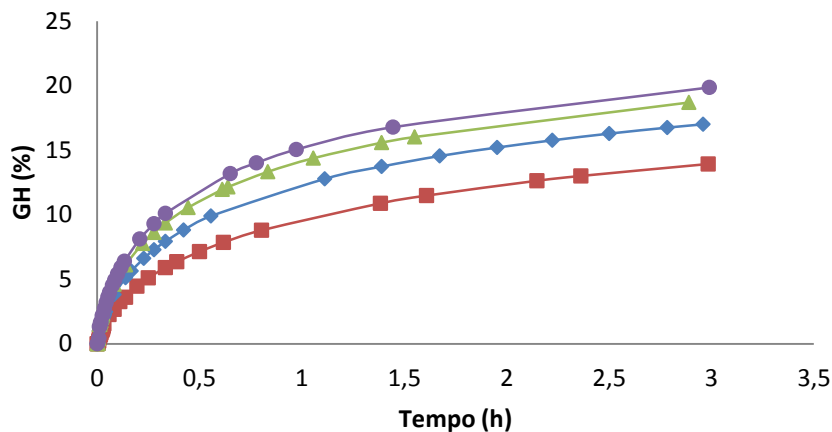
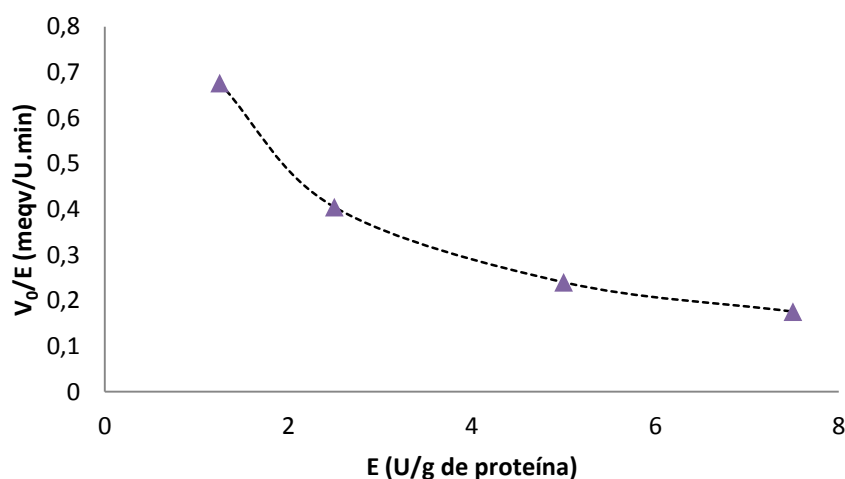


Figura 5.4 – Velocidades iniciais por unidade de atividade enzimática em diferentes relações enzima/substrato.



Não foi verificada alteração significativa no processo quando se variou a agitação de 200 a 600 rpm indicando que a velocidade de agitação de 200 rpm foi suficiente para manter a homogeneidade do meio de reação com 10% de sólidos. Os resultados estão ilustrados no gráfico da Figura 5.5.

A Figura 5.6 mostra as curvas de hidrólise obtidas a 45, 55 e 65°C. Conforme discutido no Capítulo 3, a Novo-Pro D® inativa-se na temperatura de 65°C e teve velocidades iniciais de reação de aproximadamente 0,048 e 0,019 meq/g.min. para os processos a 55 e 45°C respectivamente, ou seja, a velocidade inicial de reação foi cerca de 2,5 vezes maior a 55° quando comparado ao processo a 45°C.

Figura 5.5 Curvas de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D a 0,50%, 55°C, pH 8,0 com diferentes velocidades de agitação: (♦) 300; (■) 400; (▲) 500 e (X) 600 rpm. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico.

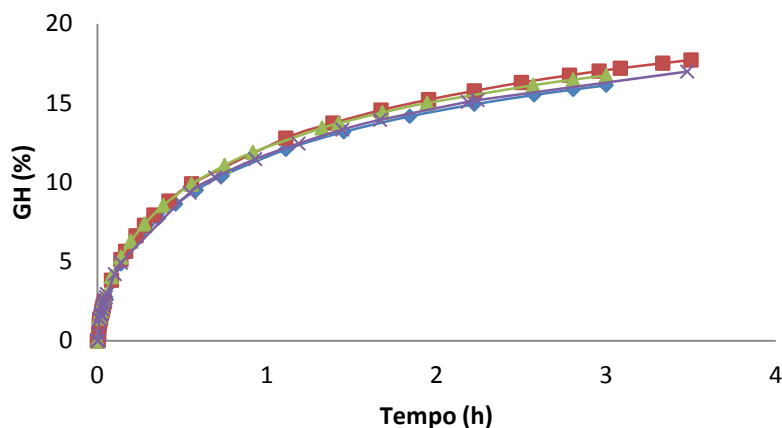
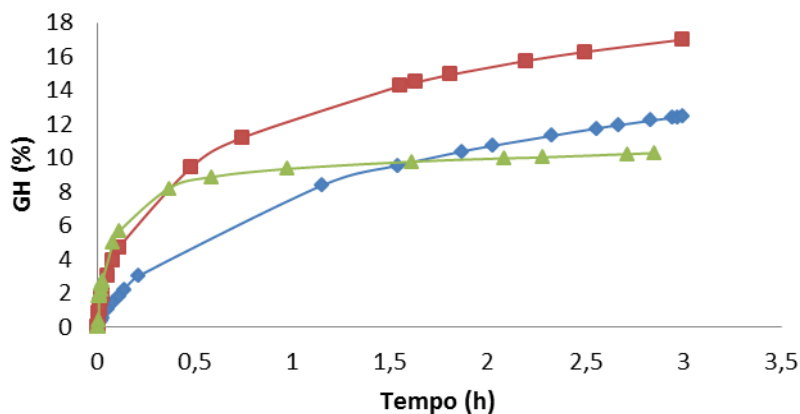


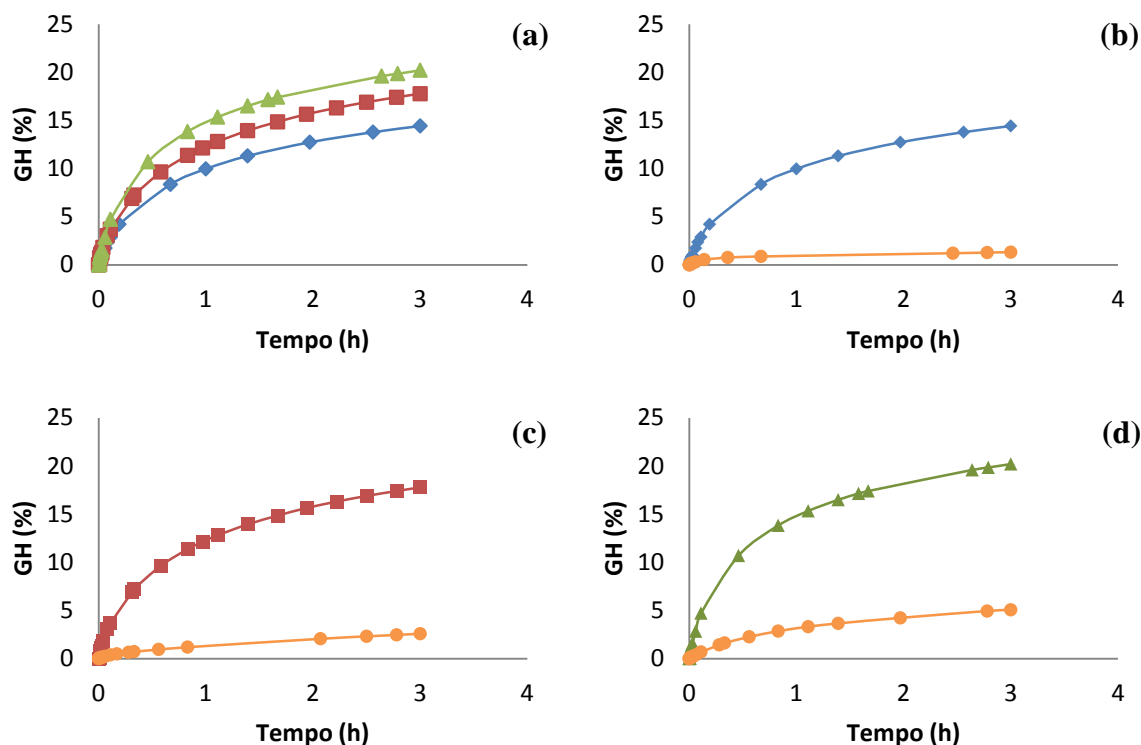
Figura 5.6 Curvas de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D a 0,50%, pH 8,0 nas temperaturas de (♦) 45°C; (■) 55°C e (▲) 65°C. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico.



Os gráficos da Figura 5.7 mostram o comportamento das curvas de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D<sup>®</sup> nos valores de pH 8,0; 9,0 e 10. Os graus de hidrólise obtidos para as amostras de SPC ao final de 3 horas de reação foram, respectivamente, 14,42; 17,76 e 20,21% (Figura 5.7a). As amostras de SPC foram submetidas aos pHs de teste durante 3 horas na ausência da enzima, verificando-se consumo de hidróxido de sódio para manutenção do pH que foi maior quanto maior o valor de pH a ser mantido (Figura 5.7b, c e d). Quando subtraímos os volumes de hidróxido de sódio para o processo sem enzima dos resultados finais dos hidrolisados, os GHs passam a ser 13,11; 15,18 e 15,15% para os pHs 8, 9 e 10, respectivamente.



Figura 5.7 (a) Curvas de hidrólise do SPC pela Novo-Pro D® a 0,50%, 55°C em (♦) pH 8,0; (■) pH 9,0 e (▲) pH 10. (b) pH 8,0 (♦) com enzima e (●) sem enzima. (c) pH 9,0 (■) com enzima e (●) sem enzima. (d) pH 10 (▲) com enzima e (●) sem enzima. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico.

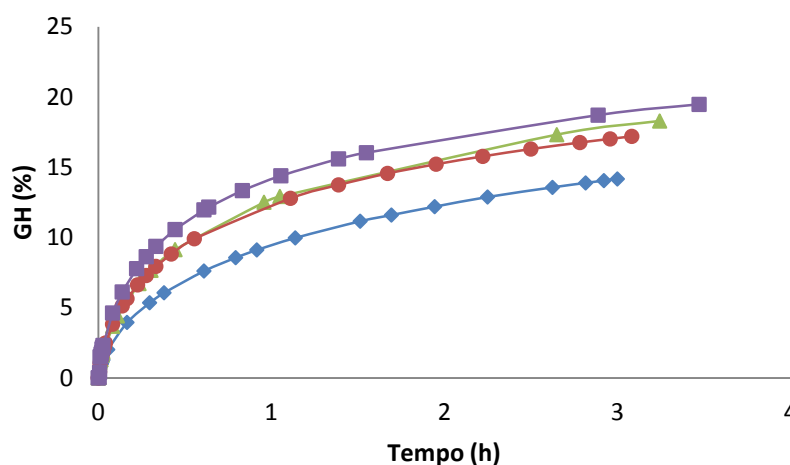


Uma possível explicação para o consumo constante de hidróxido de sódio pelo SPC na ausência de protease é a baixa solubilidade das proteínas constituintes e o fato de esta solubilidade ser maior em valores altos de pH. Ou seja, as proteínas do concentrado proteico são gradativamente solubilizadas no meio aquoso devido as condições de pH e temperatura, ao serem solubilizadas liberam íons  $H^+$  provenientes principalmente dos resíduos de ácido aspártico e glutâmico que, como visto na Tabela 5.3, são os mais abundantes na matéria-prima utilizada. Por consequência, o pH tende a diminuir levando à dosagem constante de hidróxido de sódio pelo titulador.

Ao avaliarmos os GHs reais dos hidrolisados em diferentes pHs, observamos que houve melhora significativa quando aumentamos o pH de 8,0 para 9,0. No entanto, este efeito não foi observado ao aumentarmos o pH para 10. Contudo, é possível concluir que em pH 9,0 obtém-se as melhores eficiências de hidrólise das proteínas do SPC pela Novo-Pro D®, sem os efeitos prejudiciais de altos valores de pH sobre as proteínas de soja, tais como racemização e destruição de aminoácidos e ligações cruzadas entre aminoácidos.

Definidas as condições ideais de hidrólise das proteínas do SPC pela Novo-Pro D<sup>®</sup>, realizou-se um teste comparativo com a Alcalase<sup>®</sup> nas mesmas condições otimizadas para a Novo-Pro D<sup>®</sup> e também nas mesmas condições de temperatura e pH otimizadas com o dobro de concentração enzimática das duas enzimas. Os resultados estão ilustrados na Figura 5.8.

**Figura 5.8** Curvas de hidrólise do SPC a 55°C e pH 9 utilizando (◆) 0,5% de Alcalase 2.4L<sup>®</sup>; (●) 0,5% de Novo-Pro D<sup>®</sup>; (▲) 1,0% de Alcalase 2.4L<sup>®</sup> e (■) 1,0% de Novo-Pro D<sup>®</sup>. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico.

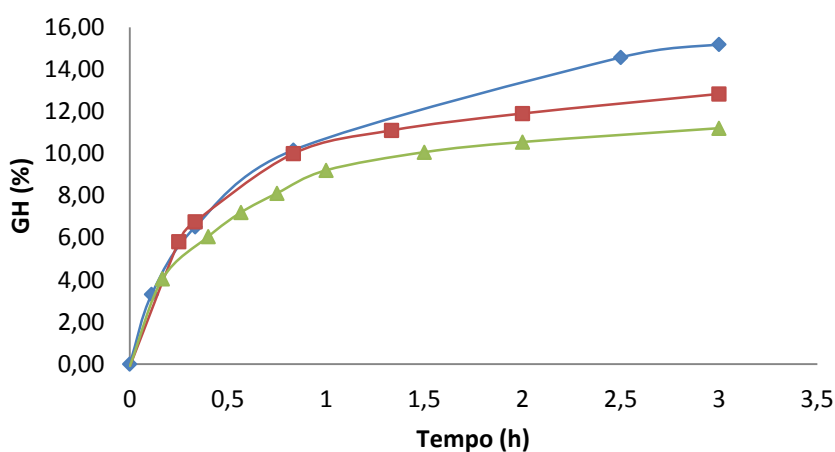


Os GHs finais obtidos para cada uma das curvas foram: 14% para a Alcalase<sup>®</sup> a 0,5%; 17% para a Novo-Pro D<sup>®</sup> a 0,5%; 18% para a Alcalase<sup>®</sup> a 1,0% e 19% para a Novo-Pro D<sup>®</sup> a 1,0%. Os resultados são muito próximos entre si, com exceção da Alcalase<sup>®</sup> 0,5% que foi significativamente inferior. Conforme já discutido no início deste capítulo, muito pouca melhora se obtém ao dobrarmos a concentração da Novo-Pro D<sup>®</sup> no meio. O contrário se observa quando comparamos as diferentes relações enzima/substrato para a Alcalase<sup>®</sup>, o aumento de concentração enzimática melhorou efetivamente a processo de hidrólise. As curvas de hidrólise obtidas para a Novo-Pro D<sup>®</sup> a 0,5% e para a Alcalase<sup>®</sup> 1,0% quase se sobrepõem. Portanto, pode-se concluir que a atividade da Alcalase<sup>®</sup> tem maior dependência da relação E/S nas faixas de concentração testadas e, portanto, a Novo-Pro D<sup>®</sup> tenderá a apresentar melhores resultados, em comparação com a Alcalase<sup>®</sup>, quanto menor forem as concentrações enzimáticas utilizadas. Quanto maiores as relações E/S utilizadas, menor será a diferença de resultado obtido pelas duas enzimas.

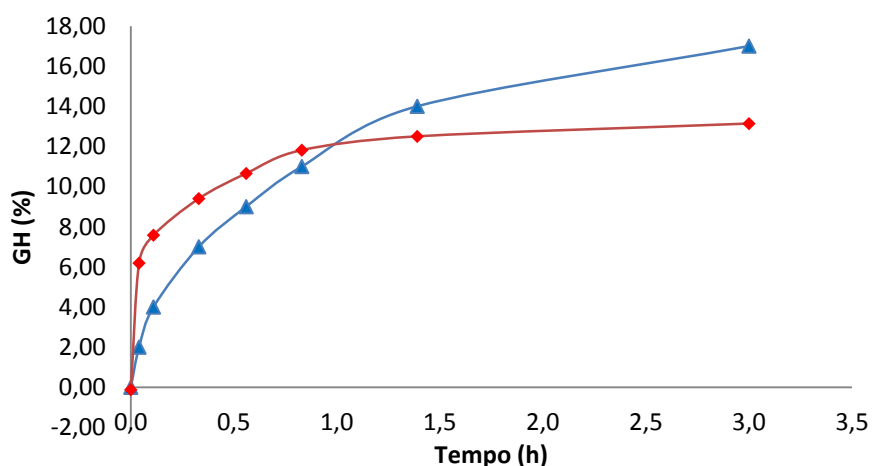
A Figura 5.9 mostra as curvas de hidrólise obtidas para os testes em escala piloto a 10 e 30% de sólidos e também, para efeito de comparação, de uma curva de hidrólise

obtida em escala de bancada a 10% de sólidos. Observa-se que as curvas obtidas para os processos, de bancada e piloto, a 10% de sólidos se sobrepõem no período de 0-1 hora, após este período as curvas se afastam gradativamente e, ao final do período de três horas, os GHs obtidos são 15,19 e 12,83% para os processos de bancada e piloto respectivamente. As alternativas mais prováveis que podem explicar tal diferença no resultado final são: a menor precisão nos controles de pH e temperatura para o processo em maior escala e a diferença entre os métodos analíticos de obtenção do GH para os dois processos. A Figura 5.10 mostra o comparativo de uma curva de hidrólise analisada pelo método pHStat e por OPA.

**Figura 5.9** Curvas de hidrólise do SPC com Novo-Pro D<sup>®</sup> 0,5%, 55°C e pH 9 (◆) em escala de bancada com 10% de sólidos; (■) em bateadeira industrial com 10% de sólidos e (▲) em bateadeira industrial com 30% de sólidos. Os pontos foram ligados por linhas suaves para facilitar o entendimento do gráfico.



**Figura 5.10** – Curva de hidrólise do SPC com Novo-Pro D<sup>®</sup> 0,5%, 55°C e pH 9 (▲) analisada em pHStat; (◆) analisada por OPA.



Na Figura 5.10 observa-se que os resultados para o OPA foram maiores durante a primeira hora de reação. Isto pode ser explicado pelo fato de o pHStat analisar em tempo real e o OPA necessitar de retirada de amostra e inativação da enzima. Considerando-se que a primeira hora de reação é o período de maior atividade, durante o tempo necessário para amostragem e inativação a enzima reage em alta velocidade alterando significativamente o resultado. Nos tempos finais de hidrólise existe maior influência do consumo de NaOH devido à solubilização das enzimas, no gráfico da Figura 5.10 este efeito não foi descontado.

O processo com 30% de sólidos obteve GH final de 11,3%, apenas 1,63% abaixo do processo com 10% de sólidos. A Tabela 5.3 mostra os dados de distribuição de peptídeos para os hidrolisados após 3 horas de hidrólise. Conforme esperado, a distribuição de peptídeos para os hidrolisados com 10% de sólidos foram muito semelhantes, comprovando-se assim que as diferenças nos graus de hidrólise obtidos são devidas principalmente as diferenças das metodologias analíticas.

**Tabela 5.3 Distribuição de peptídeos dos produtos finais de hidrólise (3 horas) para o processo em escala de bancada e piloto.**

Faixa de tamanho (Da)	Tempos (min)	Escala Piloto 30% de sólidos	Escala Piloto 10% de sólidos	Escala de bancada
> 66.000	0 - 56,1	5,57	3,96	2,50
65999 - 29.000	56,2 - 65,9	7,29	6,56	5,87
28999 - 14.175	66 - 68,5	2,70	2,45	2,23
14174 - 5.733	68,6 - 74,1	14,98	13,89	12,84
5732 - 238	74,2 - 84,7	61,00	63,55	67,33
> 237	84,8 - 105	8,46	9,59	9,24

Os resultados obtidos com o aumento do teor de sólidos no meio de reação foram bastante animadores tendo-se em vista que a redução da quantidade de água na mistura é fator determinante para a viabilidade econômica do processo. Deve-se salientar que ao se trabalhar com 30% de sólidos, a viscosidade do meio aumenta de tal maneira que a medida das variáveis controladas (pH e temperatura) se tornam difíceis devido ao acúmulo de material nos sensores. A Figura 5.11 mostra o aspecto da mistura de hidrólise a 30% de sólidos. Os menores GHs com SPC 30% devem-se, provavelmente, à maior viscosidade do meio dificultando os controles de pH e temperatura. Além disso, em meios mais viscosos pode haver limitações de transferência de massa enzima-farelo.

O requerimento de hidróxido de sódio pode ser calculado através das curvas de hidrólise dispensando a necessidade de medição do pH. A manutenção da temperatura pode ser refinada no dimensionamento de um equipamento específico para o processo. Estas

medidas certamente reduziriam a perda de eficiência do processo de hidrólise em meio composto por altos teores de sólidos insolúveis.

Para o processo com 20% de sólidos ocorreu formação excessiva de espuma e aumento do volume ocupado pelo farelo úmido a pH 9 havendo transbordamento antes mesmo da dosagem da enzima. O processo foi repetido com a metade da massa de mistura utilizada inicialmente, no entanto, a formação de espuma foi muito desvantajosa, pois além do excessivo aumento de volume, as transferências de massa e calor foram prejudicadas em maior grau que no processo com 30% de sólidos. Houve, portanto, grande dificuldade nas manutenções das condições de pH e temperatura ocasionando em grandes variações. Por este motivo, os resultados obtidos não foram confiáveis e os testes foram desprezados. A figura 5.12 mostra o aspecto físico da mistura obtida usando-se 20% de sólidos.

**Figura 5.11** Hidrólise do SPC com 30% de sólidos. (a) após mistura do farelo com água e correção do pH; (b) após dosagem da enzima; (c) no final do processo de hidrólise.



**Figura 5.12** Hidrólise do SPC com 20% de sólidos.



#### **5.4 Conclusão**

Foram estudadas, no desenvolvimento deste trabalho, as condições de operação que maximizam a eficiência da hidrólise das proteínas do SPC pela enzima comercial Novo-Pro D<sup>®</sup>. As condições otimizadas foram: relação enzima/substrato de 0,50% (m/m); temperatura de 55°C e pH 9,0. As curvas de hidrólise construídas fornecem informações suficientes para o desenvolvimento de um processo adequado às especificações do produto que se deseja obter.

É importante salientar que a especificação dita “desejada”, em termos de grau de hidrólise e/ou perfil peptídico do produto hidrolisado, só poderá ser definida avaliando-se a resposta *in vivo* de diferentes amostras com diferentes especificações. O capítulo 6 aborda a resposta *in vivo* do produto hidrolisado.

## **6. ESTUDO DE DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E METABOLIZABILIDADE ENERGÉTICA DO SPC HIDROLISADO EM CÃES E PERUS**

### **6.1 Introdução**

Os cães representam importante papel na vida dos seres humanos, desse modo, busca-se lhes fornecer alimentos de alta qualidade, que atendam suas necessidades nutricionais e promovam sua saúde e longevidade. O segmento brasileiro de alimentos para animais de companhia tem apresentado expressivo crescimento nos últimos anos, em virtude disso, surge no mercado ampla variedade de alimentos para cães, contemplando diferentes marcas e segmentos de mercado (FÉLIX, 2011).

Dentre os ingredientes proteicos utilizados em alimentos comerciais para cães, os derivados de soja tem se destacado nos últimos anos, em função do alto teor (36,0% a 90,0%) e qualidade da proteína destes. Além disso, por apresentarem alta relação proteína:minerais (7:1 a 20:1), sua combinação a coprodutos de origem animal na formulação, tem possibilitado a ponderação entre os níveis proteicos e os macrominerais das dietas comerciais para cães. Apesar disso, o fato dos ingredientes de origem vegetal serem reconhecidos como menos palatáveis para cães, em comparação aos de origem animal, somado a presença de fatores antinutricionais, tem limitado seu uso na alimentação de cães (FÉLIX, 2011).

O Brasil é destaque mundial na produção de frangos de corte, figurando entre os maiores produtores e exportadores do setor. Neste contexto, a produção de perus de corte vem sendo impulsionada principalmente e pelo apelo saudável de seus produtos. A alimentação dessas aves representa uma grande parcela dos custos totais de produção, principalmente por conta das altas inclusões de farelo de soja, decorrentes das altas exigências proteicas dos perus. Dentro disso, uma série de estudos vem sendo desenvolvidos objetivando o aumento do desempenho e a redução dos custos de formulação (SANTOS, 2011).

Este capítulo tem o objetivo de avaliar o efeito da hidrólise enzimática na digestibilidade de nutrientes e metabolizabilidade da energia de cães adultos e perus em fase inicial, com a finalidade de verificar a potencialidade do processo de hidrólise enzimática em agregar valor ao concentrado proteico de soja e inseri-lo em mercados que requerem fontes proteicas de alta qualidade.



## 6.2 Materiais e Métodos

Para os testes em animais utilizou-se o Concentrado Proteico de soja (SPC) Imcosoy 62<sup>®</sup> produzido pela Imcopa – Imp. Exp. Ind. Óleos S.A. e a enzima Novo-Pro D<sup>®</sup> foi gentilmente cedida pela Novozymes Latin America Ltda.

### 6.2.1 Produção e caracterização dos produtos proteicos testados em animais

Para a produção de amostra suficiente de concentrado proteico hidrolisado para realização de testes em animais, foi utilizado um secador industrial do tipo feixe de tubos (VetterTec). A hidrólise foi realizada com 50% de umidade e 0,5% (m/m) de enzima de Novo-Pro D<sup>®</sup> nas condições naturais de pH do farelo (aproximadamente 6,5). O equipamento foi ajustado para manter a temperatura da mistura entre 55 e 60°C. A mistura foi recirculada dentro do equipamento com o auxílio de roscas transportadoras durante 4 horas. Após a hidrólise o farelo foi seco no mesmo equipamento.

Amostras de concentrado proteico com e sem hidrólise foram encaminhadas para laboratórios externos para avaliação da segurança toxicológica e microbiológica, definição da composição centesimal e avaliações de alterações das características físico-químicas da proteína e do farelo como um todo. As análises microbiológicas e de solubilidade proteica em KOH foram realizadas por CBO Acessoria & Análise; As análises de composição centesimal foram realizadas pela Fundação ABC; os índices de solubilidade e dispersibilidade da proteína foram analisados pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos – ITAL; as análises toxicológicas, de fibras alimentares, pH e inibidor de tripsina foram feitas pela Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda.; a distribuição de tamanho molecular das proteínas e peptídeos das amostras de concentrado foram determinadas no Laboratório de Modelagem e Simulação de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da UFSCar e a determinação do grau de hidrólise foi realizada conforme metodologia descrita no item 4.2.3 no laboratório de P&D da Imcopa – Imp. Exp. Ind. Óleos S.A.

### 6.2.2 Avaliação dos produtos proteicos em cães

O teste em cães foi contratado pela Imcopa - Imp. Exp. Ind. Óleos S.A. e realizado pela estudante de doutorado Msc. Ananda Portella Félix sob orientação do professor Dr. Alex Maiorka no Laboratório de Estudos de Nutrição Canina - Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná (Curitiba-PR). Foram utilizados 20 cães adultos da raça Beagle alojados em gaiolas conforme mostrado na Figura 6.1.

**Figura 6.1** Cães alojados em gaiolas para avaliação de digestibilidade dos produtos proteicos de soja.



Utilizou-se metodologia descrita por Matterson *et al.* (1965). Os animais foram divididos em quatro grupos com cinco animais cada grupo. Um dos grupos foi alimentado apenas pela ração Referência e os demais com a ração Referência com 30% de substituição pelo produto testado. Todas as rações foram extrusadas. A quantidade de ração diária oferecida aos animais é calculada segundo a equação 6.1 (NRC, 2006). A Tabela 6.1 mostra a composição da ração Referência.

$$\text{Ração (g/dia)} = 130 \times \text{PC}^{0,75} \quad (6.1)$$

Onde PC é o peso corporal do animal.

**Tabela 6.1 ingredientes e composição química da dieta referência utilizada nos testes em cães adultos.**

<b>Ingredientes</b>	<b>(%)</b>
Milho	59,08
Farinha de vísceras de frango	26,14
Glúten de milho 60	5,71
Gordura industrial	5,00
Hidrolizado de frango	1,86
Propionato de cálcio	0,17
Sorbato de potássio	0,03
Suplemento mineral-vitamínico <sup>1</sup>	1,30
Sal comum	0,71
<b>Composição química (% na matéria seca)</b>	
Matéria seca	90,97
Proteína bruta	24,62
Extrato etéreo em hidrólise ácida	11,01
Fibra bruta	1,35
Fibra em detergente neutro	8,55
Fibra em detergente ácido	2,39
Matéria mineral	7,00
Cálcio	1,43
Fósforo total	1,02
Extrativos não nitrogenados <sup>2</sup>	56,00
Energia metabolizável (kcal kg-1) <sup>3</sup>	4.020,25

<sup>1</sup>Enriquecimento/ kg de alimento: Vit. A – 20000UI; Vit. D – 2000UI; Vit. E – 48mg; Vit. K – 48mg; Vit. B1 – 4mg; Vit. B2 – 32mg; Ácido Pantotênico – 16mg; Niacina – 56mg; Colina – 800mg; Zinco – 150mg; Ferro – 100mg; Cobre – 15mg; Iodo – 1,5mg; Manganês – 30mg; Selenio – 0,2mg e antioxidante 240mg.

<sup>2</sup>ENN (%) = 100 – (MMi% + PB% + EE% + FB%), na matéria seca.

<sup>3</sup>Estimado segundo o NRC (2006).

O teste teve duração de 10 dias sendo os 5 primeiros de adaptação e 5 de coleta total das fezes. As fezes coletadas foram pesadas e congeladas para posterior análise de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MMi), extrato etéreo por hidrólise ácida (EE), fibra bruta (FB) e energia bruta (EB). Os extrativos não nitrogenados (ENN, %) foram estimados segundo a equação:

$$\text{ENN (\%)} = 100 - (\text{umidade\%} + \text{PB\%} + \text{EE\%} + \text{FB\%} + \text{MMi\%}) \quad (6.2)$$

As mesmas análises foram realizadas nas rações para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente e energia metabolizável.

Além das avaliações de digestibilidade e energia metabolizável, os derivados proteicos de soja foram também avaliados de acordo com a qualidade das fezes geradas pelos animais. Para avaliação da consistência das fezes produzidas pelos cães, adotou-se o método do score de fezes e a determinação do teor de matéria seca. Segundo Sa-Fortes (2005) pode-se atribuir pontuação de um a cinco as fezes, sendo: 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3 = fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4 = fezes bem formadas e consistentes e que não aderem ao piso; 5 = fezes bem formadas, duras e secas. Assume-se que as fezes produzidas encontram-se dentro do ideal (não muito moles ou muito duras) quando a pontuação se enquadra dentro de três a quatro. Além da avaliação de consistência foram também determinados o teor de amônia e pH das fezes.

### **6.2.3 Avaliação dos produtos proteicos em perus em fase inicial**

O teste em perus foi contratado pela Imcopa - Imp. Exp. Ind. Óleos S.A. e realizado pelo estudante de mestrado Fábio Luís de Paula Valle sob orientação do professor Dr. Alex Maiorka no Laboratório de Estudos e Pesquisa em Nutrição de Animais Não Ruminantes - Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná (Curitiba-PR).

Foram utilizados 240 perus da linhagem BTU-9 com 1 dia de idade (Figura 6.2).

As dietas foram formuladas conforme requerimentos nutricionais das aves para cada fase de acordo com o manual Aviagen Turkeys (2007).

**Figura 6.2** Perus em fase inicial utilizados nas avaliações de digestibilidade, metabolizabilidade da energia e desempenho dos derivados proteicos de soja.



Utilizou-se metodologia descrita por Matterson et al. (1965). O teste consistiu em 4 tratamentos de 6 repetições de 10 animais alimentados com ração pelletizada e triturada. Um dos tratamentos recebeu apenas a ração referência e os demais foram alimentados com a ração referência com 30% de substituição pelo produto testado. O teste teve duração de 28 dias, sendo que todos os animais foram tratados com a mesma ração de 1 a 14 dias de idade e com a ração teste de 14 a 21 dias de idade.

Foram realizadas análises de matéria seca, proteína bruta extrato etéreo e energia bruta nos alimentos e nas fezes excretadas pelos animais. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e a energia metabolizável (EM) foram calculados conforme mostrado a seguir.

## 6.2.4 Cálculos e análise estatística

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes da dieta (CDdieta) referência (CDrr) e da ração teste (CDração teste) e dos ingredientes teste (CDing) pelo método da substituição proposto por Matterson *et al.*, (1965), segundo as equações:

$$CDdieta\% = [(g \text{ nutriente ingerido} - g \text{ nutriente excretado}) / g \text{ nutriente ingerido}] \times 100 \quad (6.3)$$

$$CDing\% = CDrr\% + [(CDração \text{ teste}\% - CDrr\%) / (\% \text{Substituição ing}/100)] \quad (6.4)$$

A energia metabolizável (EM) foi estimada de acordo com a AAFCO (2004):

$$EM \text{ (kcal/g)} = \{ \text{kcal/g EB ingerida} - \text{kcal/g EB excretada nas fezes} - \quad (6.5) \\ [(g \text{ PB ingerida} - g \text{ PB excretada nas fezes}) \times 1,25 \text{ kcal/g}] \} / g \text{ ração ingerida}$$

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## 6.3 Resultados e Discussão

### 6.3.1 Caracterização dos farelos proteicos utilizados nos testes em animais

Os resultados de grau de hidrólise analisados por OPA para as duas amostras foram de -0,89% para o não hidrolisado e 3,31% para o hidrolisado. Apesar de se ter obtido um farelo com GH muito baixo as características de solubilidade da proteína sofreram alterações significativas. A Tabela 6.2 mostra os resultados das análises físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas dos concentrados proteicos hidrolisado e não hidrolisado.

A solubilidade da proteína em KOH aumentou de 53,13 para 71,32% com a hidrólise, a solubilidade em água aumentou de 4,54 para 23,7% e a dispersibilidade foi de 9,02 para 51,58% com a hidrólise. A Tabela 6.3 mostra a distribuição de tamanho molecular das duas amostras. Na amostra original, cerca de 70% da proteína solubilizada se encontrava

com tamanho molecular acima de 12 kDa, na amostra hidrolisada este valor foi reduzido para aproximadamente 27%.

**Tabela 6.2 Resultados de análises físico-químicas, toxicológicas e microbiológicas dos produtos proteicos testados na determinação de digestibilidade e metabolizabilidade em cães e perus.**

<b>Análise</b>	<b>Unidade</b>	<b>Imcosoy 62<sup>®</sup></b>	<b>Imcosoy 62<sup>®</sup> hidrolisado</b>
Umidade	% (m/m)	10,94	9,46
Proteína Bruta	% (m/m)	60,82	62,52
Óleo	% (m/m)	1,14	1,0
Cinzas	% (m/m)	5,54	5,59
Fibra bruta	% (m/m)	4,54	4,65
Proteína solúvel em KOH	% (m/m)	53,13	71,32
Índice de solubilidade proteica	% (m/m)	4,59	23,7
Índice de dispersibilidade da proteína	% (m/m)	9,02	51,58
Fibra alimentar total	% (m/m)	20,4	18,3
Fibra alimentar solúvel	% (m/m)	1,6	1,5
Fibra alimentar insolúvel	% (m/m)	18,8	16,8
Capacidade de retenção de água	g/100g	175	170
pH	-	6,86	6,68
Inibidor de tripsina	TIU/g	<2000	<2000
Aflatoxina B1	µg/kg	<1,4	<1,4
Aflatoxina B2	µg/kg	<0,4	<0,4
Aflatoxina G1	µg/kg	<1,4	<1,4
Aflatoxina G2	µg/kg	<0,4	<0,4
Fumonisina B1	µg/kg	<100,0	<100,0
Fumonisina B2	µg/kg	<100,0	<100,0
Bolores e leveduras	UFC/g	4,5.10 <sup>4</sup>	4,0.10 <sup>4</sup>
Coliformes totais	NMP/g	2,4.10 <sup>2</sup>	4,3.10 <sup>1</sup>
Salmonella	-	Ausente em 25g	Ausente em 25g
Contagem total de mesófilas	UFC/g	5,7.10 <sup>5</sup>	6,4.10 <sup>4</sup>

Apesar de as alterações ocorridas nas proteínas do farelo serem significativas, a eficiência da hidrolise foi muito inferior a esperada. Muitos fatores podem explicar o ocorrido, pois o equipamento utilizado não era apropriado, sendo assim, as eficiências de mistura farelo/água/enzima e controle da temperatura foram duvidosas. Sabe-se também que a atividade da Novo-Pro D<sup>®</sup> é muito baixa em torno de pH 6,5.

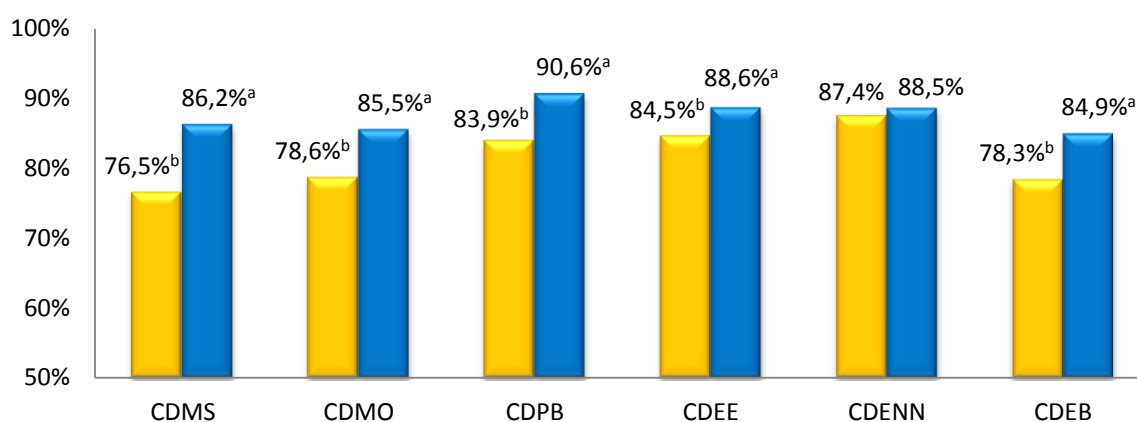
Tabela 6.3 Distribuição de tamanho das proteínas e peptídeos dos farelos utilizados nos testes de digestibilidade e energia metabolizável.

Fração	Faixa de tamanho molecular (Da)	% Área	
		Imcosoy 62 <sup>®</sup>	Imcosoy 62 <sup>®</sup> hidrolisado
1	> 200.000	19,0	5,3
2	66.000 – 200.000	20,4	4,5
3	12.000 – 66.000	28,8	16,9
4	6.000 – 12.000	9,6	24,4
5	1.000 – 6.000	3,7	26,4
6	500 – 1.000	2,3	9,6
7	< 500	16,2	13,0

### 6.3.2 Avaliação dos produtos proteicos em cães

A Figura 6.3 mostra os coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) para os nutrientes dos SPCs hidrolisado e não hidrolisado. Nota-se que praticamente todas as digestibilidades foram maiores para o farelo hidrolisado em comparação com o farelo não hidrolisado. O farelo hidrolisado atingiu 90,6% de digestibilidade da proteína frente a 83,9% para o SPC comum.

Figura 6.3 Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS), da matéria orgânica (CDMO), da proteína bruta (CDPB), do extrato etéreo (CDEE), dos extrativos não nitrogenados (CDENN) e da energia bruta (CDEB) dos SPCs em cães adultos (■) SPC não hidrolisado; e (■) SPC hidrolisado. <sup>a,b</sup>Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

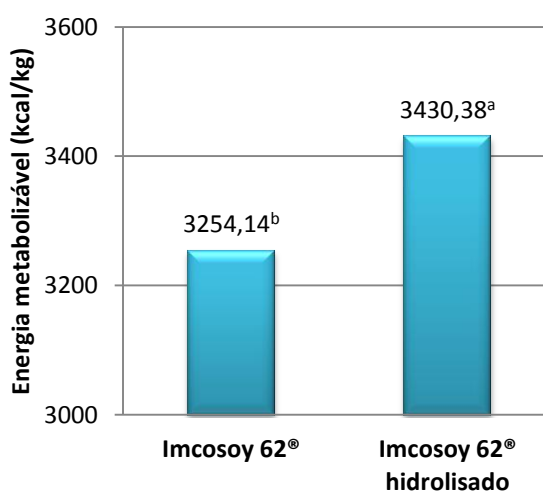




O processo hidrólise também aumentou a energia metabolizável do concentrado proteico em aproximadamente 5%, a Figura 6.4 mostra uma comparação entre os resultados obtidos.

A produção de fezes foi 24% maior para o farelo hidrolisado quando comparado com a referência, no entanto, foi 17% menor em comparação com farelo não hidrolisado (Figura 6.5). O teor de amônia das fezes não foi significativamente maior indicando que a dieta contendo os SPCs não apresentaram alterações de odor nas fezes. No entanto, os SPCs resultaram em fezes com valores de pH menores e menor teor de matéria seca em relação à referência, indicando fermentação no intestino grosso. Todos os escores ficaram dentro dos padrões de normalidade (Tabela 6.4).

**Figura 6.4 Resultados energia metabolizável do concentrado proteico com e sem hidrólise em cães adultos.**  
<sup>a,b</sup>Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

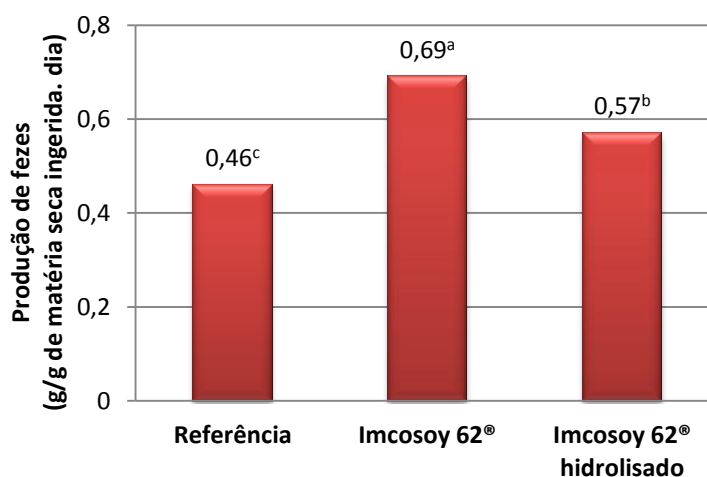


**Tabela 6.4 Características das fezes de cães adultos tratados com a dieta referência, com a dieta referência com 30% de substituição pelo concentrado proteico e com a dieta referência com 30% de substituição pelo concentrado proteico hidrolisado.**

	Amônia (%m/m)	pH	Matéria seca (%m/m)	Escore
Referência	0,25	7,04 <sup>a</sup>	42,17 <sup>a</sup>	4,12
Imcosoy 62 <sup>®</sup>	0,26	6,64 <sup>b</sup>	29,83 <sup>b</sup>	3,21
Imcosoy 62 <sup>®</sup> hidrolisado	0,26	6,51 <sup>b</sup>	30,86 <sup>b</sup>	3,25

<sup>a,b</sup>Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

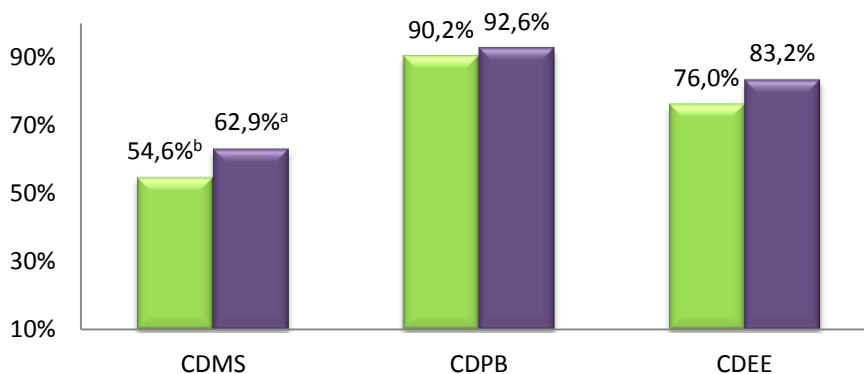
**Figura 6.5** Produção de fezes (em gramas de fezes úmida produzida por grama de ração seca ingerida por dia) de cães adultos tratados com a dieta referência, com a dieta referência com 30% de substituição pelo concentrado proteico e com a dieta referência com 30% de substituição pelo concentrado proteico hidrolisado. <sup>a,b,c</sup>Letras distintas diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



### 6.3.3 Perus em fase inicial

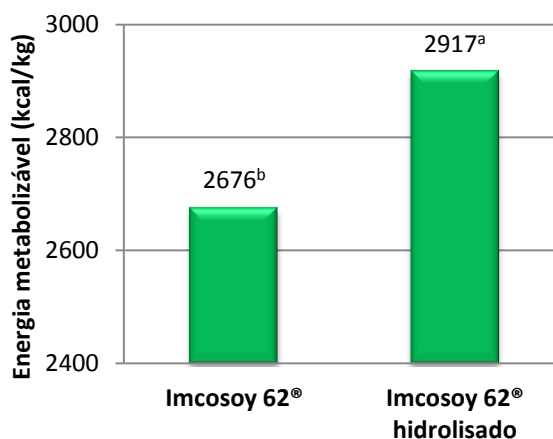
A Figura 6.6 mostra os resultados de CDAs em perus em fase inicial de crescimento para os SPCs com e sem hidrólise. A hidrólise melhorou a digestibilidade da matéria seca de 54,6 para 62,9%. A diferença entre as digestibilidades da proteína e do extrato etéreo não foram significativas, ambos os concentrados apresentaram alta digestibilidade proteica.

**Figura 6.6** Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDMS), da proteína bruta (CDPB) e do extrato etéreo (CDEE) do concentrado proteico (■) hidrolisado e (■) não hidrolisado em perus em fase inicial. <sup>a,b</sup>Letras distintas diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



A Figura 6.7 mostra os resultados de energia metabolizável. A hidrólise aumentou a energia metabolizável do SPC em 9%

**Figura 6.7** Resultados energia metabolizável do concentrado proteico com e sem hidrólise em perus em fase inicial de crescimento. <sup>a,b</sup>Letras distintas diferem pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



#### 6.4 Conclusão

O processo de hidrólise enzimática das proteínas do SPC, mesmo sendo o grau de hidrólise de apenas 3,3% resultou em alterações significativas nas estruturas das proteínas presentes no farelo. Estas alterações puderam ser notadas no aumento de solubilidade proteica e na distribuição de tamanho molecular das proteínas e peptídeos. Tais alterações melhoraram significativamente o aproveitamento de nutrientes das dietas, tanto em cães como em perus, ou seja, a hidrólise se mostrou promissora no melhoramento das digestibilidades dos nutrientes do SPC mesmo tendo sido utilizada uma amostra com baixo grau de hidrólise.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

O processo de hidrólise enzimática das proteínas do SPC se mostrou uma alternativa promissora no melhoramento das qualidades nutricionais e consequente aumento do valor agregado deste produto. A enzima Novo-Pro D<sup>®</sup> (Novozymes Latin America Ltda.) foi eficientemente utilizada para tal finalidade, podendo substituir a Alcalase<sup>®</sup>, protease mais utilizada no processamento de hidrolisados proteicos alimentícios, com rendimentos superiores dependendo das condições de reação utilizadas.

Foram estudadas, no desenvolvimento deste trabalho, as condições operacionais que maximizaram a eficiência da hidrólise do SPC pela Novo-Pro D<sup>®</sup>. As condições otimizadas foram: relação enzima/substrato de 0,50% (m/m); temperatura de 55°C e pH 9,0. A avaliação do teor de água no meio de reação foi um indicativo de que a hidrólise pode ser realizada em condições de umidade relativamente baixas, aproximadamente 70%, sem prejudicar a eficiência do processo de hidrólise pela enzima mesmo trabalhando-se em condições de alta viscosidade. As curvas de hidrólise construídas fornecem informações suficientes para o desenvolvimento de um processo adequado às especificações do produto que se deseja obter.

É importante salientar que a especificação dita “desejada”, em termos de grau de hidrólise e/ou perfil peptídico do produto hidrolisado, só poderá ser definida avaliando-se a resposta *in vivo* de diferentes amostras com diferentes especificações. Neste trabalho, realizou-se o estudo das digestibilidades *in vivo* em duas espécies animais distintas, cães e perus, com apenas um nível de hidrólise do SPC, sendo ainda um produto com grau de hidrólise muito baixo. No entanto, os resultados obtidos foram muito motivadores no sentido de se dar continuidade a este estudo.

## 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Produção de amostras com graus de hidrólise conhecidos e em vários níveis para testes *in vivo* em diferentes espécies animais e verificação da composição ideal, em termos de grau de hidrólise, do produto proteico requerido para cada espécie;
- Avaliação do ganho financeiro de utilização dos produtos hidrolisados para definição do valor de mercado;
- Viabilidade econômica do processo;
- Testes adicionais em escala piloto para viabilização econômica;
- Colocação do novo produto no mercado.

## 9. REFERÊNCIAS

AASLYNG M.D., et al. Chemical and Sensory Characterization of Hydrolyzed Vegetable Protein, a Savory Flavoring. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 481-489, 1998.

ADIBI, S. A. Absorption of Products of Protein Digestion. In: FINLEY, J.W.; HOPKINS, D.T. **Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds**. St. Paul: AACC Inc., 1985. p. 285-293.

ADIBI, S.A.; MERCER, D.W. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. **The Journal of Clinical Investigation**, Pittsburgh, v. 52, p. 1586-1594, jul. 1973.

ADIBI, S.A.; MORSE, E.L. Enrichment of glycine pool in plasma and tissues by glycine, di-, tri-, and tetraglycine. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, Pittsburgh, v. 243, n. 5, p. E413-E417, nov.1982.

ADLER-NISSEN, J. Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology**, Bagsvaerd, v.34, n. 3, p. 215-222, set. 1984.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Agricultural and Food Chemistry**, Bagsvaerd, v. 27, n. 6, p. 1256-1262, nov./dez. 1979.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Londres: Elsevier Applied Science, 1986. 426 p.

ADLER-NISSEN, J. L. **Hydrolysis of Soy Protein**. Patente dos Estados Unidos 4,100,024. Jul. 1978.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY – AOCS. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 5ª edição. Champaign: AOCS, 2004.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, Aligarh, v. 64, n. 3, p. 175-183, jun. 1998.

ASKAR, A. Faba beans (*Vicia faba L.*) and their role in the human diet. **Food and Nutrition Bulletin**, Tokyo, v.8, n.3, p.15-24, set. 1986.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO. **Dog and cat nutrient profiles**. Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. AAFCO, Oxford, IN, USA, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18ª edição, Revisão 2. Gaithersburg: AOAC International, 2007.

AVIAGEN TURKEYS. B.U.T. **Commercial Turkeys management guide**. West Virginia, USA: Aviagen Turkeys Inc., 2007. 36p.

BELOHLAWEK, L. **Process and product of making a vegetable protein hydrolysate food seasoning**. United States Patent 4,798,736, 17, jan. 1989.

BIASUTTI, E.A.R. **Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos**: Utilização da Subtilisina e da pancreatina. 2006. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v.72, p. 248-254, 1976.

BOGRACHEVA, T.Y.; BESPALOVA, N.Y.; LEONTEV, A.L. Isolation of 11S and 7S Globulins from Seeds of *Glycine max*. **Applied Biochemistry Microbiology**, Moscou, v. 32, p. 429-433, 1996.

BOZA, J. J. et al. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. **European Journal of Nutrition**, Lausanne, v. 39, p. 237-243, 2000.

BRADY, P.G.; VANNIER, A.M.; BANWELL, J.G. Identification of the dietary lectin, wheat germ agglutinin, in human intestinal contents. **Gastroenterology**, Filadelfia, v.75, n.2, p.236-239, 1978.

BUSATO JUNIOR, F.J. **Processo industrial de produção de farelo concentrado de soja e melão de soja**. PI0704670-6 A2, 28, set. 2009. 31 p.

CĂPRIȚĂ, R.; CĂPRIȚĂ, A.; CREȚESCU, I. Protein solubility as quality index for processed soybean. **Animal Sciences and Biotechnologies**, Timisoara, v. 43, n. 1, p. 375-378, 2010.

CATSIMPOOLAS, N.; EKENSTAM, C. Isolation of alpha, beta, and gamma conglycinins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Chicago, v. 129, n. 2, p. 490-497, fev. 1969.

CHAJUSS, D. Soy molasses: processing and utilization as a functional food. In: LIU, K. **Soybeans: as a functional foods and ingredients**. Champaign: AOCS Press, 2004. p. 201-208.

CHEFTEL J. C., CUQ J. L.; LORIENTE, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica - propiedades funcionales - valor nutricional - modificaciones químicas**. Acibria: Zaragoza, 1989, 345 p.

CHEN, L. et al. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. **Food Hydrocolloids**, Guangzhou, v. 25, n. 5, p. 887-897, jul, 2011.

COTTA, J. A. O. et al. Validação do método para determinação de nitrogênio Kjeldahl total. **Revista Analytica**, São Carlos, n. 26, jan. 2007.

DA-SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p.249-260, jul./dez. 1997.

DEAK, N.A. et al. Soy protein products, processing and utilization. In: JOHNSON, L.A.; WHITE, P.J.; GALLOWAY, R. **Soybeans: chemistry, production, processing and utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008. p. 661-724.

DEMIRHAN, E.; APAR, D. K.; ÖZBEK, B. A kinetic study on sesame cake protein hydrolysis by Alcalase. **Journal of Food Science**, Esenler/Istanbul ,v. 76, n. 1, p. C64-C67, jan./fev. 2011.

DESHPANDE, S.S. Food legumes in Human nutrition: a personal perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.32, n.4, p.333-363, 1992.

DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. Food legumes: chemistry and technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, Manhattan, v.10, p.147-241, 1990.

DIPIETRO, C.M.; LIENER, I.E. Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, St. Paul, v. 37, n. 1, p. 39-44, jan. 1989.

ETZLER, M.E. Plant lectins: molecular and biological aspects. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.209-234, 1985.

FÉLIX, A.P. **Avaliação nutricional de derivados proteicos de soja para cães**. 2011. 188p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Setor de Ciências Agrárias, UFPR, Curitiba, 2011.

FISHER, M. **Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein**. 2006. 139 p. Tese (Doutorado em Agrotecnologia e Ciência de Alimentos). Department of Agrotechnology and Food Sciences, Wageningen University, Droevendaalsesteeg, 2006.

FONSECA, L.C. et al. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, Uberlândia, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006.

FRIEDMAN, M.; ZAHNLEY, J.C.; MASTERS, P.M. Relationship between “in vitro” digestibility of casein and its content of lysinoalanine and D-amino acids. **Journal of Food Science**, Berkeley, v. 46, n. 1, p. 127–134, jan. 1981.

FUKUSHIMA, D. Structures of plant storage proteins and their functions. **Food Reviews International**, Tokio, v. 7, n. 3. p. 353-381, 1991

GARCIA, M.C. et al. Chemical Characterization of Commercial Soybean Products. **Food Chemistry**, Madri, v.62, n.3, p.325-331, jul. 1998.



GIORDANO, R. L. C. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de amido: inibição pelo produto.** 1987. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, USP, São Paulo. 203p. 1987.

GODFREY, T. Baking. In: GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology.** 2ª edição. Nova Iorque: MacMillan Press Ltd., 1996. p. 87-101.

GONÇALVES, L.R. et al. Enzymatic synthesis of amoxicillin: avoidind limitations of the mechanistic approach for reaction kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, São Carlos, v. 80, n.6, p. 622-631, dez. 2002.

GRIMBLE, G.K. et al. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. **Clinical Science**, v. 71, n. 1, p. 65-9, 1986.

GUÉRARD, F. et al. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Creac'h Gwen, v.11, n. 4-6, p. 1051-1059, jan. 2001.

GUPTA, B.B. Determination of native and denatured milk proteins by high-performance size exclusion. **Journal of Chromatography**, Bradford on Avon, v. 282, p. 463-475, dez. 1983.

HAJOS,G. et al. Effect of proteolytic modification and methionine enrichment on the nutritional value of soya albumins for rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Budapest, v. 7, n. 9, p. 481-487, set. 1996.

HILDEBRAND, D. **Plant biochemistry: Lecture Seventeen A - carbohydrate metabolism - mono & oligosaccharides, glycosides, ascorbic acid & other sugar derivatives.** Lexington: Department of Agronomy, university of Kentucky, 2010. Apostila. Disponível em: <<http://www.uky.edu/~dhild/biochem/10/lect10.html>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

HRČKOVÁ, M.; RUSŇÁKOVÁ, M.; ZEMANOVIČ, J. Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. **Czech Journal of Food Science**, Bratislava, v. 20, n. 1, p. 7–14, 2002.

HURRELL, R.F.; FINOT, P.A. Effects of food processing on protein digestibility and amino acid availability. In: FINLEY, J.W.; HOPKINS, D.T. **Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds.** St. Paul: AACC Inc., 1985. p. 233-246.

HYMOWITZ, T. The history of the soybean. In: JOHNSON, L.A.; WHITE, P.J.; GALLOWAY, R. **Soybeans: chemistry, production, processing and utilization.** Urbana: AOCS Press, 2008. p. 1-32.

JAFFÉ, W.G. Hemagglutinins. In: LIENER, I.E. **Toxics constituents of plant foodstuffs.** Nova Iorque: Academic Press, 1969. p. 69-101.

JARUNRATTANASRI, A. Aroma impact compounds of hydrolyzed vegetable protein: a review. **Naresuan Phayao Journal**, Phayao, v. 1, n. 1, p. 11-17, jan.-abr. 2008.

JENSEN, B. et al. Proteolytic cleavage of soybean Bowman-Birk inhibitor monitored by means of high-performance capillary electrophoresis. Implications for the mechanism of proteinase inhibitors. **Journal of Biochemistry and Biophysics Methods**, Duesbergweg, v. 33, n.3, p. 171-185, dez. 1996.

JOHNSON, L.A.; WHITE, P.J.; GALLOWAY, R. **Soybeans: chemistry, production, processing and utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008, 842 p.

KAMNERDPETCH, C. et al. An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. **Enzyme and Microbial Technology**, Callinstr, v. 40, n. 4, p. 508–514, mar. 2007.

KARP, S.G. et al. Application of the biorefinery concept to produce l-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource technology**. Curitiba, v. 102, n. 2, p. 1765–1772, jan. 2011.

KENNEDY, J. F. Enzyme technology. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology**. v. 7a. Weinheim: VCH, 1987. 761 p.

KOSHIYAMA, I. Distribution of the 7S proteins in soy bean globulins by gel filtration with Sephadex G-200. **Agricultural and Biological Chemistry**, Noda-sni, v. 33, n. 2, p. 281-284, fev. 1969.

KOSHIYAMA, I. Storage proteins of soybean. In: GOTTSCHALK, W. **Seed Proteins: biochemistry, genetics, nutritive value**. The Hague: Kluwer Academic Publishers, 1983. p. 427-450.

KOPPELMAN, S.J. et al. Detection of soy proteins in processed foods: literature overview and new experimental work. **Journal of AOAC International**, Zeist, v. 87, n. 6, p. 1398-1407, 2004.

KUMAR, A.; GUPTA, M. N. Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Lund, Delhi, v. 5, p. 289- 294, 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Cambridge, v. 227, p. 680–685, ago. 1970.

LAKEMOND, C.M.M. et al. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Wageningen, v. 48, n. 6, p. 1985-1990, mai. 2000.

LEE, J.; LEE, H. D.; E LEE, C. Characterization of hydrolysates produced by mild-acid treatment and enzymatic hydrolysis of defatted soybean flour. **Food Research International**, Seul, v. 34, n. 2-3, p. 217-222, mar. 2000.

LENINGHER, A. L. **Bioquímica**. v.1. Componentes Moleculares das Células. 2ª edição. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 1976.

LENINGHER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2<sup>a</sup> edição. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIENER, I.E. The nutritional significance of the plant lectins. In: ORY, R.L. **Antinutrients and natural toxicants in foods**. Westport: Food & Nutrition Press, 1981. p.143-157.

LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, St. Paul, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994

LIS, H., SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.42, p.541-574, 1973.

LIU, K. Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. In: LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York : Chapman & Hall, 1997. p. 25-99.

LUSAS, E.W.; RHEE, K.C. Soy protein processing and utilization. In: ERICKSON, D.R. **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**. St. Louis: AOCS PRESS and the United Soybean Board, 1995. p. 117-160.

LUSAS, E.W.; RIAZ, M.N. Soy protein products: processing and use. **Journal of Nutrition**, College station, v. 125, p. 573S-580S, mar. 1995.

MANDARINO, J.M.G.; ROESSING, A.C. **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 40 p.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 69, n. 12, p. 1163 - 1169, dez. 1992.

MARSMAN, G.J.P. et al. In-vitro accessibility of untreated, toasted, and extruded soybean meals for proteases and carbohydrases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Wageningen , v. 45, n. 10, p. 4088-4095, out. 1997

MATTERSON, L.D., et al. **The metabolizable energy of feed ingredients for chickens**. Storrs: The University of Connecticut, Agricultural Experiment Station, 1965, 11p. (Research Report, 7).

MAY, M.E; BROWN, L.L. Instability of orthophthalaldehyde reagent for amino acid analysis. **Analytical Biochemistry**, Nashville, v. 181, n. 1, p. 135-139, ago. 1989.

NACIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. National Academy Press: Washington, DC, USA, 2006, 426p.

NIELSEN, P.M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. **Food Chemistry and Toxicology**, Bagsvaerd, Brabrand, v. 66, n. 5, dez. 2001.

NICOLSON, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **International Review of Cytology**, New York, v.39, p.89-190, 1974.

PARKKONEN, T. et al. Changes in wheat microstructure following in-vitro digestion. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science**, Kantvik, v. 47, n. 1, p. 43-47, 1997.

PERKINS, E.G. Composition of soybeans and soybean products. In: ERICKSON, D.R. **Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization**. St. Louis: AOCS PRESS and the United Soybean Board, 1995. p. 9-28.

PETERSEN, H. E. Allergenicity of Soy Proteins. In: WORLD CONGRESS ON VEGETABLE PROTEIN UTILIZATION IN HUMAN FOODS AND ANIMAL FEEDSTUFFS, 1988, Singapura. **Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 1989. p. 204-212.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends Food Science Technology**, Cambridge, v.7, n.4, p.132-138, 1996.

PROLL, J. et al. Low nutritional quality of unconventional tropical crop seeds in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.128, n.11, p. 2014-2022, 1998.

REFSTIE, S. et al. Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Sunndalsora, v. 264, p. 331-345, 2005.

REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Produtos proteicos de soja. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole Ltda, 2006. p. 355-402.

RIBLETT, A.L. et al. Characterization of B-conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Manhattan, v.49, n.10, p.4983-4989, set. 2001.

ROMAGNOLO, D.; POLAN, C.E.; BARBEAU, W.E. Degradability of soybean meal protein fractions as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2379-2385. 1990

SAHA B. C.; HAYASHI K. Debittering of protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, Peoria, Tsukuda, v. 19, n. 5, p. 355-370, set. 2001.

SANTOS, S.A. **Efeitos da redução proteica e da suplementação com maltodextrina sobre a digestibilidade e o desempenho zootécnico de perus de corte na fase inicial**. 2011. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Setor de Ciências Agrárias, UFPR, Curitiba, 2011.

SATHE, S.K. et al. High-resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycine max L.*) seed proteins. **Cereal Chemistry**, West Lafayette, Parkville, v.64, n.6, p. 380-384. 1987.

SGARBIERI, V.C. Deterioração e modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas. In: SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: Propriedades, degradações e modificações. São Paulo : Varela, 1996. p.387-517.

SGARBIERI, V.C., WHITAKER, J.R. Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, New York, v.28, p.93166, 1982.

SHARON, N., LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, Washington DC, v.177, n.53, p.949-959, 1972.

SHOWALTER, A.M. Structure and functions of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, Athens, v.5, p.9-23, jan. 1993.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M; YVON, M. Analysis of protein hydrolysates. 1. Use of Poly(2-hydroxyelaspirtamide)-Silica column in size exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Belo Horizonte, v.42, p.2778-2782, 1994a.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M; YVON, M. Analysis of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Belo Horizonte, v.42, p.2783-2789, 1994b.

SIQUEIRA, P.F. et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**. Curitiba, v. 99, p. 8156–8163, mai. 2008.

SIQUEIRA, P.F. **Processo de queima de resíduos industriais vegetais, equipamento de queima de resíduos industriais vegetais, caldeira geradora de vapor**. PI0900363-0 A2, 26 out. 2010. 15 p.

SMITH, J.L., ARTEAGA, C.; HEYMSFIELD, S.B. Increased Ureagenesis and Impaired Nitrogen Use during Infusion of a Synthetic Amino Acid Formula — A Controlled Trial. **New England Journal of Medicine**, Atlanta, v. 306, p. 1013-1018, abr. 1982.

SOUSA JR. et al. Hybrid model for an enzymatic reactor: hydrolysis of cheese whey proteins by alcalase immobilized in agarose gel particles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, São Carlos, p. 105-108, 2003.

SOUSA JR. et al. Kinetic Model for Whey Protein Hydrolysis by Alcalase Multipoint Immobilized on Agarose Gel Particles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Carlos, v. 21, n. 02, p. 147-153, 2004

SOUZA, L.W.P. **Aspectos imunológicos e nutricionais da diarreia pós-desmame.** Disponível em: < <http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/saude/artigos/aspectos-imunologicos-nutricionais-diarreia-t620/165-p0.htm>>. Acesso em: 07 fev. 2012.

STEIN, H.H. Nutritional Properties and Feeding Values of Soybeans and Their Coproducts. In: JOHNSON, L.A.; WHITE, P.J.; GALLOWAY, R. **Soybeans: chemistry, production, processing and utilization.** Urbana: AOCS Press, 2008. p. 613- 660.

SUIDA, D. **Interação da nutrição proteica com fatores econômicos, desempenho, meio ambiente e sanidade em suínos.** Disponível em: < <http://www.lisina.com/upload/CBNA-Nov2001FINAL.pdf>>. Acesso em: 07 fev.2012.

TARDIOLI, P.W. et al., Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. **Biotechnology Progress**, São Carlos, v. 19, n.2, p. 352-360, 2003.

TARDIOLI, P.W. **Hidrólise controlada das proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase A e Alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose.** 2003. 173 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Eng. Química, UFSCar, São Carlos, 2003.

THANH, V.H.; SHIBASAKI,K. Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Sendai, v. 24, n. 6, p. 1117-1121, nov. 1976.

TORO, M.A.N; GARCÍA-CARREÑO, F.L. Evaluation of the progress of protein hydrolysis. In: WHITAKER, J. (Prefácio) **Current Protocols in Food Analytical Chemistry.** Davis: John Wiley & Sons, Inc., 2002. Unidade B2.2. 1-14.

TSOU, M.J. Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. **Food Chemistry**, Yuanlin Changhua, v. 122, n. 1, p. 243–248, set. 2010.

VELÍŠEK J.; DOLEŽAL M.; CREWS C.; DVOŘÁK T. Optical isomers of chloropropanediols: mechanisms of their formation and decomposition in protein hydrolysates. **Czech Journal of Food Science**, v. 20, n. 5, p. 161-170, 2002.

VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry.** 2ª edição. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 1361 p.

WALDRON, K.W.; PARKER, M.L.; SMITH, A.C. Plant cell walls and food quality. Comprehensive. **Reviews in Food Science and Food Safety**, Colney, v.2, n. 4, p.101-119, Out. 2003.

WANG, L.; WANG, Y.-J. Comparison of protease digestion at neutral pH with alkaline steeping method for rice starch isolation. **Cereal Chemistry**, Fayetteville, v. 78, n. 6, p.690-692, 2001.

WARD, O. P. Proteolytic enzymes. In: BLANCH, H. W.; DREW, S.; WANG, D. I. C. (Eds.). **Comprehensive biotechnology.** Oxford: Pergamon Press Ltd., 1985, v. 3, p. 789-817.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2ª edição. New York: Marcel Dekker Inc., 1994. 625 p.

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

XAVIER-FILHO, J., CAMPOS, F.A.P. Proteinase inhibitors. In: CHEEK, P.R. **Toxicants of plant origin**. Boca Raton : CRC Press, 1989. v.3: p.1-27.