



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS
OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA
(*Glycine max*) SEM SOLVENTE**

ÂNGELA ANGELONI ROVARIS

**Florianópolis
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Ângela Angeloni Rovaris

**CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS
OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA
(*Glycine max*) SEM SOLVENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edna Regina Amante

Florianópolis

2011

Ângela Angeloni Rovaris

**CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS
OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA
(*Glycine max*) SEM SOLVENTE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 03 de junho de 2011.

Prof^ª. Roseane Fett, Dr^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª. Edna Regina Amante, Dra.
Orientadora

Prof^ª. Valéria Reginatto Spiller, Dra.

Prof^ª. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dra

Prof^º. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.

DEDICATÓRIA

*A Deus,
meu companheiro inseparável!*

*Aos meus pais Silvio e Isolete
porque não medem esforços,
e acreditam em mim!*

*Ao meu namorado Handersen,
meu braço direito,
meu conselheiro, meu amor!*

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para realização dessa etapa de minha vida, meu sincero reconhecimento e agradecimento, em especial:

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela estrutura física e profissional durante minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos.

À Professora Dr^a. Edna Regina Amante, minha orientadora, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela amizade. Sempre com uma palavra certa, na hora certa!

À Professora Dr^a. Ana Carolina de Oliveira Costa, Dr^o. Gustavo A. Micke e ao doutorando Marcel Piovezan pela disposição em ajudar com as análises de aminoácidos.

À Professora Dr^a. Ana Carolina Arisi por disponibilizar o laboratório e equipamentos para a eletroforese em gel.

À Professora Dr^a. Alicia de Francisco pela paciência e ensinamentos com a microscopia.

À Professora Dr^a. Carmem L. O. Petkowicz pela ajuda com as análises de açúcares.

Às Professoras Dr^a. Rejane Maria Cirra Scaff e Iria Pedroso da Cunha pela ajuda em disponibilizar o laboratório de técnicas histológicas.

Ao técnico Gilberto, do Laboratório de Técnicas Histológicas – MOR/UFSC – pela elaboração das lâminas. Sempre bem humorado e disposto a ajudar!

À técnica Chirle Ferreira do Laboratório FluorBeg/UFSC – pela análises de microscopia de fluorescência.

À Dr^a. Maria Janete Angeloni Marcon, pelo apoio e ajuda nas correções.

Às minhas amigas Rossana Podestá e Manoela Alano Vieira, que mesmo ausentes fisicamente, estiveram presentes em todos os momentos, minhas grandes incentivadoras!

À minha estagiária Carolinne Odebrecht Dias, muito dedicada. Obrigada pela ajuda!

Aos novos amigos João Gustavo Provesi, Ana Paula Prudêncio, Aureanna Nairne Negrão Murakami, Paula Heidy Aguilera Fuentes, Isabella Regina da Silva, Geisi Mello Balsamo, Ana Cristina Tanello, Ana Cristina Pinheiro do Prado, Daiana Oliveira, Ana Carolina Moura de Sena Aquino pelo apoio e companheirismo. Amizades para toda a vida!

Ao projeto SoyLife, pelo amparo financeiro.

Aos professores das disciplinas, muito obrigada pelos ensinamentos.

Rovaris, Ângela Angeloni. **Caracterização dos resíduos sólidos e líquidos obtidos a partir da extração do óleo de soja (*Glycine max*) sem solvente. 2011.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

A extração aquosa de óleo via enzimática está se tornando uma alternativa interessante em função da segurança ambiental, uma vez que as condições de processo são mais brandas. Os resíduos sólidos e líquidos originados nesse tipo de extração deverão receber um destino de acordo com suas características. Assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar os resíduos sólidos e líquidos gerados durante a extração aquosa enzimática do óleo de soja. Quatro sistemas foram estudados, utilizando a associação de enzimas Alcalase®/Celluclast® e Alcalase®/Viscozyme® L, sob duas condições: com e sem controle de pH. Os resíduos líquidos foram analisados quanto à composição centesimal e monossacarídica, açúcares redutores e aminoácidos. E os resíduos sólidos foram avaliados quanto à composição centesimal e monossacarídica e caracterização das propriedades físicas. As alterações estruturais na matéria prima, provocadas pela ação dos sistemas enzimáticos foram analisadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de fluorescência. O controle do pH aumentou a eficiência no processo de extração do óleo, independente do sistema enzimático utilizado. Os resultados de composição centesimal dos resíduos líquidos apresentaram altas concentrações de proteínas, carboidratos e cinzas. Nos sistemas hidrolisados com Viscozyme® L, os valores de açúcares redutores foram superiores que nas demais amostras, e o pH influenciou significativamente no teor de sólidos solúveis encontrados. Os monossacarídeos neutros foram analisados por Cromatografia Líquida Gasosa (CLG) e as maiores concentrações encontradas nas amostras líquidas foram de galactose, glicose e arabinose. Os aminoácidos foram quantificados por eletroforese capilar (EC) destacando a presença de metionina em todas as amostras dos resíduos líquidos analisadas. A avaliação do tamanho dos peptídeos dos resíduos líquidos, foi realizada através da cromatografia em gel (SDS-PAGE). Quanto aos resultados obtidos nos resíduos sólidos, a composição centesimal apresentou altos teores de proteínas, fibras e carboidratos totais o que justificariam estudos para novos alimentos.

Dentre os monossacarídeos neutros encontrados nesses resíduos, a galactose apresentou a maior concentração, seguida de glicose e arabinose. Os resíduos apresentaram boa capacidade de ligação ao óleo. Através da análise de MEV e fluorescência foi possível visualizar a atuação enzimática e sua contribuição para processo de extração do óleo de soja sem solvente.

Palavras-chaves: Enzimas. Extração. Óleo. *Glycine max*. Resíduos.

Rovaris, Ângela Angeloni. **Characterization of solid and liquid wastes obtained from the extraction of soybean (*Glycine max*) oil without solvent.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

The enzymatic extraction of oil has become an interesting alternative in the environmental point of view, since the process conditions are milder. The waste generated in this type of process should receive a destination according to their characteristics. Therefore, to characterize the wastes generated in the aqueous enzymatic extraction, solids and liquids, was the objective of this work. Four systems were studied with the combination of enzymes Alcalase®/Celluclast® and Alcalase®/Viscozyme® L, each under two conditions: with and without pH control. The liquid wastes were analyzed for chemical composition, monosaccharide, reducing sugars and amino acids. The solid wastes were evaluated for chemical composition and physical properties. Changes in the structure of raw materials caused by the action of enzyme systems were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and fluorescence. The pH control enabled a better extraction of oil, regardless of the enzyme system. The liquid waste presented high levels of protein, carbohydrate and ash. Viscozyme® L systems presented higher values of reducing sugars, and pH significantly influenced in the Brix. The neutral monosaccharides were analyzed by liquid-gas chromatography (LGC) and the highest levels were galactose, glucose and arabinose. Amino acids were analyzed by capillary electrophoresis (CE) highlighted the presence of methionine in all samples. The evaluation of formed peptides sizes was through gel chromatography (SDS-PAGE). As for the chemical composition, the solid waste presented levels of protein, fiber and carbohydrates, in significant quantities for studies on new foods. The neutral monosaccharides were analyzed by LGC, galactose showed the highest concentration, followed by glucose and arabinose. The waste had good binding capacity of the oil. Through the analysis of SEM and fluorescence was possible to visualize a performance of enzymes for the process of extraction of soybean oil without solvent.

Keywords: Enzymes. Oil extraction. *Glycine max*. Wastes.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Processo de extração convencional de óleo combinando extração por prensagem e solvente.	30
--	----

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Fluxograma da obtenção das amostras dos resíduos da extração do óleo de soja (<i>Glycine max</i>) com enzimas e sem utilização de solventes.	49
Figura 2 - Perfil de eluição das amostras líquidas ACLpH e ACL resultantes da extração do óleo de soja via enzimática por HPSEC-MALLS/RI.	60
Figura 3 - Perfil de eluição das amostras líquidas AVLpH e AVL resultantes da extração do óleo de soja via enzimática por HPSEC-MALLS/RI.	60
Figura 4 - Perfil de eluição da amostras líquidas ACLpH e ACL resultantes da extração do óleo de soja via enzimática por CLAE. ACLpH – Alcalase® e Celluclast® com controle de pH; ACL – Alcalase® e Celluclast® sem controle de pH.....	61
Figura 5 - Perfil de eluição da amostras líquidas AVLpH e AVL resultantes da extração do óleo de soja via enzimática por CLAE.....	62
Figura 6 - Eletroforegrama da amostra sem tratamento (Branco)..	65
Figura 7 - Eletroforegramas dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja (<i>Glycine max</i>), via enzimática..	66
Figura 8A - Perfil em 12% SDS-PAGE de proteína total dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja, via enzimática com controle de pH.	67
Figura 8B - Perfil em 12% SDS-PAGE de proteína total dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja, via enzimática, sem controle de pH	66

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Fluxograma da obtenção das amostras dos resíduos da extração do óleo de soja (<i>Glycine max</i>) com enzimas e sem utilização de solventes.....	80
Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura do grão de soja <i>in natura</i> (A, B, C) e grão de soja expandido (D, E, F).....	93
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura dos resíduos sólidos após extração do óleo via enzimática.....	94
Figura 4 - Microscopia de fluorescência dos grãos <i>in natura</i> (A) e soja expandida (B) para visualização das organelas protéicas, corados com ANS, utilizando filtro azul e aumento de 40X.....	95
Figura 5 - Micrografia de fluorescência do grão de soja <i>in natura</i> (filtro verde) e soja expandida (filtro azul) corados com azul de nilo, utilizando aumento de 40X para visualização da organela lipídica.....	96
Figura 6 - Micrografia de fluorescência do grão <i>in natura</i> e soja expandida para visualização dos polissacarídeos estruturais, utilizando filtro verde e aumento de 40X.....	96
Figura 7 - Micrografia de fluorescência dos vacúolos de proteína nos resíduos sólidos da extração do óleo de soja, sem solvente com fluorocromo ANS, utilizando filtro azul e aumento de 40X.....	97
Figura 8 - Micrografia de microscopia de fluorescência dos resíduos sólidos para visualização da presença de óleo nos resíduos através da utilização de fluorocromo azul de nilo, com filtro verde e aumento de 40X.....	98
Figura 9 - Micrografia dos resíduos sólidos utilizando laranja de acridina e filtro verde com aumento de 40X, mostrando os danos causados nos polissacarídeos estruturais.....	99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Extração aquosa X extração via solventes, vantagens, desvantagens e possíveis alternativas para melhorias. 35

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Composição centesimal e valor calórico dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja (*Glycine max*), via enzimática, nos diferentes sistemas 55

Tabela 2 - Conteúdo de açúcares redutores e sólidos solúveis (°Brix) dos resíduos líquidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*), via enzimática, em diferentes sistemas enzimáticos. 56

Tabela 3 - Composição de monossacarídeos dos resíduos líquidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*), via enzimática, em diferentes sistemas enzimáticos..... 58

Tabela 4 - Composição aminoacídica (em mg L⁻¹) dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja (*Glycine max*) sem solventes, nos diferentes sistemas utilizados..... 64

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Rendimento de extração de óleo de soja (*Glycine max*) com a utilização dos diferentes sistemas enzimáticos. 85

Tabela 2 - Composição centesimal e valor calórico dos resíduos sólidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*) via enzimática, nos diferentes sistemas..... 87

Tabela 3 - Composição monossacarídica dos resíduos sólidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*), via enzimática. 89

Tabela 4 - Características físicas dos resíduos sólidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*) sem solvente, em diferentes sistemas enzimáticos. 91

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	24
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
1.1 SOJA (<i>Glycine max</i>).....	26
1.2 PRODUTOS DA SOJA	28
1.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA.....	29
1.4 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA AQUOSA DO ÓLEO DE SOJA	31
1.5 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE X PROCESSO DE EXTRAÇÃO AQUOSA ENZIMÁTICA	34
1.6 REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS RESÍDUOS LÍQUIDOS DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA (<i>Glycine max</i>) SEM SOLVENTE.....	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
1 INTRODUÇÃO.....	46
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 Material	47
2.2 Métodos.....	47
2.2.1 Extração de óleo de soja e produção de resíduos do processamento.....	47
2.2.2 Composição centesimal	49
2.2.3 Análises de aminoácidos.....	50
2.2.3.1 Equipamento.....	50
2.2.3.2 Reagentes e Soluções	50
2.2.3.3 Preparo das amostras.....	50
2.2.3.4 Procedimento	51
2.2.4 Análise de açúcares redutores	51
2.2.5 Determinação monossacarídica.....	51
2.2.6 Perfil de massas moleculares	52
2.2.7 Extração de proteínas totais de soja.....	53

2.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	53
2.2.9 Análise estatística.....	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1 Composição centesimal.....	54
3.2 Análise de açúcares redutores.....	56
3.3 Composição monossacarídica	57
3.4 Análise de aminoácidos.....	62
3.5 Perfil eletroforético	66
4 CONCLUSÃO	70
5 REFERÊNCIAS	71

CAPÍTULO 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO SÓLIDO E EFEITO DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO SOBRE A MICROESTRUTURA DA SOJA (*Glycine*

<i>max</i>).....	76
RESUMO	76
ABSTRACT	77
1 INTRODUÇÃO	78
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
2.1 Material.....	79
2.2 Métodos.....	79
2.2.1 Extração de óleo de soja e produção de resíduos do processamento	79
2.2.2 Composição centesimal.....	81
2.2.3 Análise monossacarídica	81
2.2.4 Avaliação das propriedades físicas.....	82
2.2.4.1 Capacidade de ligação de água e óleo no resíduo sólido da extração de óleo de soja via enzimática.....	82
2.2.4.2 Capacidade de retenção de água (CRA).....	82
2.2.4.3 Capacidade de expansão (CE).....	82
2.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	83
2.2.6 Microscopia de fluorescência	83
2.2.7 Análise Estatística	84
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1 Extração do óleo de soja	84

3.2 Composição Centesimal	85
3.3 Composição monossacarídica	88
3.4 Caracterização das fibras do resíduo sólido da extração do óleo de soja via enzimática	90
3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura e Fluorescência	92
4 CONCLUSÃO	100
5 REFERÊNCIAS	101
CONCLUSÃO GERAL	106

INTRODUÇÃO

A produção mundial de óleos vegetais ocorre predominantemente por extração com solventes orgânicos derivados do petróleo. Porém, a demanda pela melhor qualidade ambiental e, também, pela segurança nas operações industriais sustentam novos processos baseados em tecnologias preventivas, que minimizam a exploração de matérias primas não renováveis, os danos ambientais e asseguram a expectativa dos consumidores por produtos mais saudáveis.

A substituição das tecnologias tradicionais prescinde da comprovação de que os novos processos apresentam vantagens ambientais, tanto na operação principal, como na aplicação de toda a matéria prima, objetivando para a minimização do impacto ambiental.

O Brasil está em uma fase áurea da produção de soja (*Glycine max*), dados da safra 2009/2010 apontam uma produção de 68,7 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2011) e no ano de 2010, a produção de óleo de soja chegou a 1.564 toneladas (ABIOVE, 2011). Com esses números o país compete com os Estados Unidos pela primeira posição mundial, onde as pesquisas sobre esta oleaginosa são realizadas de forma incomparável ao Brasil. No entanto, estas duas nações diferentes em nível de desenvolvimento, apresentam um problema tecnológico em comum, quando se trata do processo de produção do óleo de soja, ambas utilizam o n-hexano, solvente derivado do petróleo, representando risco como matéria prima não renovável e aos manipuladores durante o processo industrial.

Novos processos estão surgindo (McGLONE; CANALES; CARTES, 1986; CAETANO et al., 1999; SANTOS; FERRARI, 2005) com o objetivo de substituir a extração por solvente pelo sistema aquoso com a utilização de enzimas. Assim, como o sistema de extração por solventes resulta em inúmeros derivados importantes para o setor, o processo enzimático deverá prever também a utilização dos seus derivados e subprodutos.

Tanto a valorização de matérias primas quanto a minimização de resíduos, representam processos preventivos para a redução de danos ao meio ambiente e paralelamente, o aumento de renda das empresas. Considerando os subprodutos gerados durante o processamento de alimentos vegetais, considerados hoje, um problema econômico e ambiental, poderão tornar-se uma fonte promissora de compostos

funcionais (REDONDO-CUENCA; VILLANUEVA-SUÁREZ; MATEOS-APARICIO, 2008). No entanto, para a aplicação de novos ingredientes alimentares é necessária a caracterização química, bem como o estudo de suas propriedades funcionais. Assim, os resíduos resultantes das extrações enzimáticas do óleo de soja poderão representar mais um problema ambiental ou uma nova fonte nutricional.

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar os resíduos sólidos e líquidos obtidos a partir da extração do óleo de soja sem solvente.

Atendendo a esse objetivo, o presente trabalho está apresentado na forma de capítulos:

1º Capítulo – Revisão Bibliográfica.

2º Capítulo - Características químicas dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja (*Glycine max*) sem solvente.

3º Capítulo - Composição química do resíduo sólido e efeito da extração enzimática de óleo sobre a microestrutura da soja (*Glycine max*)

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 SOJA (*Glycine max*)

A soja (*Glycine max*), nativa da Ásia, pertence à família das leguminosas (COSTA, 1996). Sua cultura foi introduzida no Ocidente em meados do século XVI e chegou ao Brasil no século XIX. Na safra de 2009/2010 a produção mundial ultrapassou 259,7 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos o principal responsável com 91,4 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2001).

O Brasil é o segundo maior produtor, com 68,7 milhões de toneladas, plantados em uma área de 23,6 milhões de hectares, o estado do Mato Grosso participa com aproximadamente 27% da produção do país, seguido do Paraná com 20% (EMBRAPA, 2011).

O Brasil processou entre 2009/2010, 5.963 mil toneladas de óleo de soja sendo 4.518 mil toneladas destinadas ao consumo interno, e o restante à exportação (ABIOVE, 2011). Praticamente todo o óleo produzido é extraído por solventes e uma pequena parcela utiliza extração mecânica (WAN; WAKELYN, 1997; CAMPBELL; GLATZ, 2009; JUNG, 2009).

Antigamente o interesse na produção de soja estava relacionado somente com a produção de óleo e de proteínas, hoje é dada atenção a todos os outros componentes e fitoquímicos que ela fornece. A soja é considerada um alimento funcional, devido as suas características benéficas a saúde. Estudos comprovam o controle de disfunções características de doenças crônicas como, controle do colesterol plasmático, prevenção do câncer, diabetes, obesidade e doenças degenerativas (FRIEDMAN; BRANDON, 2001; MEJIA; LUMEN, 2006).

A composição do grão de soja apresenta cerca de 20% de lipídeos, 30% de carboidratos, 40% de proteínas (OAKENFULL, 2001; LUKACZER et al., 2006), isoflavonas, fitatos, saponinas, fitosteróis, vitaminas do complexo B e minerais, importantes componentes sob o ponto de vista bioativo (FRIEDMAN; BRANDON, 2001; OAKENFULL, 2001; LUKACZER et al., 2006; ZARKADAS et al., 2007).

A fração lipídica subdivide-se em gordura saturada, poliinsaturada e monoinsaturada, representando 15%, 61% e 24%, respectivamente (USDA, 1979 apud CEDERROTH; NEF, 2009). O óleo é composto por 110 g/kg de ácido palmítico, 30 g/kg de ácido esteárico, 240 g/kg de ácido oleico, 550 g/kg de ácido linoleico e 70 g/kg de ácido linolênico (PATIL et al., 2007). Na soja, os triacilgliceróis são estabilizados por uma camada externa de fosfolípideos e proteínas básicas, chamadas oleosinas. Essas são abundantes na superfície lipídica, com pesos moleculares variando de 18 a 24 kDa (CHABRAND et al., 2008; JUNG, 2009).

A proteína de soja é composta por uma mistura de albuminas e globulinas, sendo que 90% das proteínas de reserva possuem estrutura globular, principalmente 7S e 11S globulinas (THANH; SHIBASAKI, 1977; STASWICK; HERMEDSON; NIELSEN, 1984; HOU; CHANG, 2004; MORAES et al., 2006; DEVANI et al., 2009). A 7S globulina (β -conglícinina) é um trímero formado por quatro subunidades (α , α' , β , δ) com massa molar de 150-200 kDa. As subunidades α (72 kDa), α' (68 kDa) e β (52 kDa) são mais importantes do que a δ (com a massa molecular similar a β). Todas essas subunidades possuem uma sequência de aminoácidos similar e são pobres em cisteína, metionina e triptofano. A β -conglícinina é uma glicoproteína com 5% de carboidratos em peso, e resíduos de asparagina. A 11S globulina (glicinina) é um hexâmero de peso molecular de 300 a 380 kDa e suas cinco maiores subunidades foram identificadas e classificadas em dois grupos, com base na identidade da sequência de aminoácidos, sendo Grupo I ($A_{1a}B_{1b}$, A_2B_{1a} e $A_{1b}B_2$) e o Grupo II (A_3B_4 , $A_5A_4B_{1b}$). Cada subunidade constituinte é composta por um polipeptídeo ácido e um polipeptídeo básico, com peso molecular de ~ 32 kDa e ~ 20 kDa, respectivamente, unidos por ligações dissulfeto (THANH; SHIBASAKI, 1977; STASWICK; HERMEDSON; NIELSEN, 1984; MUJOO; TRINH; NG, 2003; ZARKADAS et al., 2007; AGUIRRE; MARISA; DE GIORI, 2008; DEVANI et al., 2009).

Os carboidratos representam 30% do grão (GRIESHOP; FAHEY, 2001) e 40% do farelo de soja em peso seco (KARR-LILIENTHAL et al., 2005). Aproximadamente metade desses carboidratos são não estruturais, incluindo açúcares de baixo peso molecular (galactose, glicose, frutose e sacarose), oligossacarídeos, e pequenas quantidades de amido (1% do grão), e a outra metade são polissacarídeos estruturais (KARR-LILIENTHAL et al., 2005).

Os polissacarídeos da parede celular compõem 12% dos cotilédones da soja em peso seco (STOMBAUGH et al., 2000) e podem

ser divididos em celulose, pectina e hemicelulose. Os principais polissacarídeos na parede celular são a celulose e as arabinoxilanas que são unidas a β -glucanas (1-3, 1-4), xiloglucanas, xilanas, rhamnogalacturonanas, arabinogalactanas. Esses carboidratos são poucos digeridos pelas enzimas gástricas, mas a ruptura dessas estruturas por processo de expansão ou degradação enzimática pode aumentar a utilização desses nutrientes (OUHIDA; PEREZ; GASA, 2002).

A principal característica das células dos cotilédones das oleaginosas é a presença de organelas celulares onde estão armazenados a maior parte do óleo e da proteína do grão (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

As reservas proteicas variam em tamanho e dependem do tipo de oleaginosa. O tamanho médio dos corpos proteicos é de 8-10 μm , e são responsáveis por armazenar aproximadamente de 60 a 70% das proteínas totais das sementes (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

As organelas responsáveis pelo armazenamento de lipídeos (esferossomos ou oleossomos) são as principais reservas nesse tipo de sementes. Suas dimensões possuem de 1 a 2 μm de diâmetro, com uma variação de 0,2 a 0,5 μm , no caso da soja. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) é possível a visualização dos corpos lipídicos presos em uma espécie de rede citoplasmática provavelmente composta de proteínas. Ao redor dessas células encontra-se estruturas compostas de celulose, hemicelulose, lignina e pectina. No processo convencional de extração de óleo à base de solvente, o grão está na forma de flocos, com a parede celular rompida, assim o óleo fica exposto e facilita a percolação de solventes (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

1.2 PRODUTOS DA SOJA

O aumento do consumo de soja está atribuído a vários fatores: benefícios para a saúde do consumidor, novos hábitos alimentares, aumento das tecnologias dos produtos da soja e aumento da produção mundial de soja (RIAZ, 2001; KUMAR et al., 2002).

A soja possui muitas aplicações na indústria de alimentos, incluindo proteínas cárnicas processadas, bebidas nutritivas e fórmulas infantis (CHOVE; GRANDISON; LEWIS, 2007). A proteína de soja entra na composição de ingredientes de panificação, massas, produtos de

carne, cereais, bebidas, formulações infantis, alimentos dietéticos e temperos para saladas (LIU, 2000; SINGH; SINGH; CHANHAN, 2000; EMBRAPA, 2009), e como matéria prima do tofu, bebidas e carne protéica (LIU, 2000; SINGH; SINGH; CHANHAN, 2000). Recentemente, tornou-se matéria prima de uma fonte alternativa de combustível, o chamado biodiesel (EMBRAPA, 2009).

A farinha de soja desengordurada é o primeiro produto obtido após a prensagem dos grãos para a extração do óleo. Esse produto contém aproximadamente 50% de proteínas e 30-35% de carboidratos. O concentrado protéico de soja é obtido da farinha desengordurada através da lavagem alcoólica (etanol 60-80%), água acidificada (pH 4,5) ou água fervente, não pode conter menos que 65% de proteínas. Nesse processo de lavagem os componentes são arrastados deixando as proteínas e os polissacarídeos. O isolado protéico é preparado a partir da farinha desengordurada por solubilização das proteínas e carboidratos usando uma solução aquosa (pH 7,0-10). A fração insolúvel é removida por centrifugação, seguida por precipitação das proteínas, através do ponto isoelétrico (pH 4,5). Este produto possui aproximadamente 90% de proteínas (FERNANDEZ-QUINTELA et al., 1993; LIU et al., 2007).

A baixa aceitabilidade dos produtos da soja é geralmente atribuída aos fatores antinutricionais, como os inibidores de protease, lectina, fitatos e taninos (PEÑA-RAMOS; XIONG; ARTEAGA, 2004; BAJPAI; SHARMA; GUPTA, 2005). Eles são geralmente inativados ou diminuídos pelo tratamento térmico utilizado durante o processamento. Porém, o excesso pode diminuir parâmetros sensoriais e valores nutricionais dos produtos (PEÑA-RAMOS; XIONG; ARTEAGA, 2004) e também ocasionar a formação de aminoácidos não naturais como o fructosil-lisina originado em reações de aquecimento, e a lisoalanina (FRIEDMAN, 1999) e D-aminoácidos formados pela elevação do pH (FRIEDMAN; LIARDON, 1985; FRIEDMAN, 1996a; FRIEDMAN, 1999).

1.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA

Os dois processos mais utilizados para a extração de óleos de oleaginosas são a prensagem hidráulica e a extração por solventes orgânicos. Em matérias primas com concentração de óleo acima de 35% como a linhaça, girassol, nozes, sementes de algodão e gérmen de trigo, é comum a utilização de duas etapas: a primeira por prensagem e em

seguida a extração com solventes (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

A prensagem hidráulica é um método antigo, surgiu nos países europeus em 1795, porém, seu uso está diminuindo consideravelmente. A sua principal vantagem é a possibilidade de associação com outros métodos quando os diretos não se mostram eficientes, além de diminuir o volume do solvente utilizado (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

Na Figura 1, um fluxograma básico representa uma combinação da extração por prensagem e por solvente, típica para oleaginosas com alto teor de óleo.

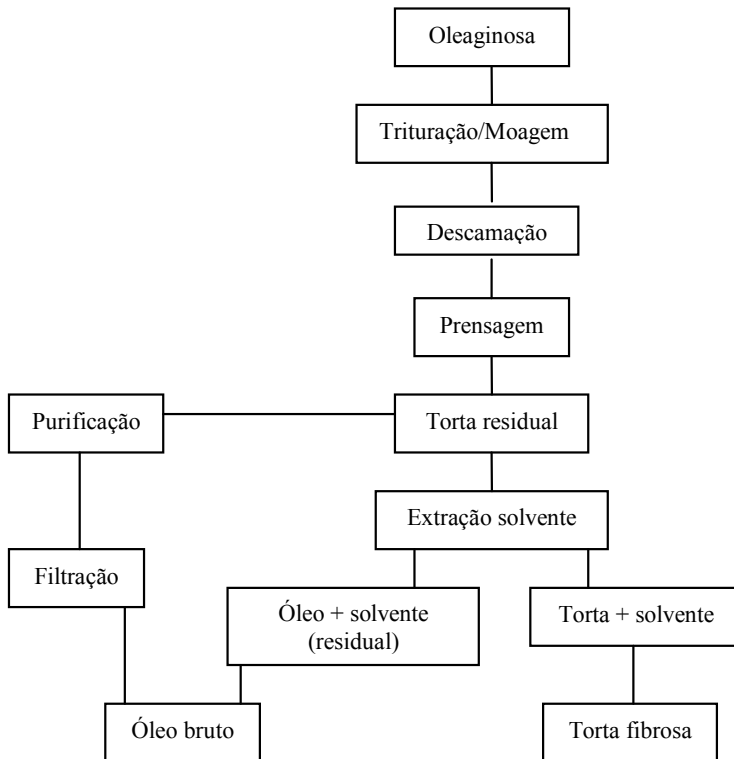


Figura 1 - Processo de extração convencional de óleo combinando extração por prensagem e solvente.

Fonte: Rosenthal; Pyle e Niranjan (1996).

A extração com solventes surgiu nos anos 90 (LAWHON et al., 1981; ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996) e consiste de sucessivas lavagens contracorrente do solvente com o material previamente triturado, em flocos ou prensado (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

Posteriormente, algumas modificações foram adicionadas ao processo, como a utilização de calor e a expansão, ambos aplicados como pré tratamento a fim de facilitar o acesso às organelas lipídicas (BARGALE; SOSULSKI; SOSULSKI, 2000).

A extração com solventes apresenta-se como o mais rentável método para a extração do óleo de soja (WU; JOHNSON; JUNG, 2009). E pode ser descrita em três fases: 1) penetração do solvente nos grãos de soja; 2) solubilização do óleo no solvente; 3) evaporação do solvente extrator (WAN; WAKELYN, 1997). Os solventes normalmente utilizados são derivados do petróleo, o n-hexano é o mais usado. Ele extrai 95% do total de óleo e possui boa recuperação, deixando um teor residual menor do que 1% (CHABRAND et al., 2008). As desvantagens com relação ao solvente é que o n-hexano é altamente inflamável, tóxico e responsável pela emissão de compostos orgânicos voláteis (COV), esses estão no grupo de compostos destruidores da camada de ozônio. As preocupações com o meio ambiente, segurança e saúde dos trabalhadores e consumidores promoveram a necessidade da substituição do processo de extração de óleo de oleaginosas por outros mais seguros, rentáveis e ecologicamente corretos (DOMINGUEZ; NUNEZ; LEMA, 1995; ROSENTHAL et al., 2001).

1.4 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA AQUOSA DO ÓLEO DE SOJA

O processo de extração aquosa de óleos vegetais começou a ser estudado como uma alternativa mais segura e saudável, por volta de 1950. A utilização de enzimas no processo de extração por solventes ou através do sistema de prensa hidráulica foi inicialmente descrita por Sherba et al. (1972) e Adler-Nissen et al. (1986) apud Rosenthal; Pyle e Niranjana (1996) como um pré-tratamento para aumentar o rendimento de obtenção do óleo (FREITAS; HARTMAN; COURI, 1996) e foi, em seguida, testado para outras oleaginosas de importância comercial.

Diferentemente da extração por solvente, onde o óleo é dissolvido e extraído pelo solvente, na extração aquosa o óleo não apresenta afinidade química pelo meio extrator, a água. Portanto, não há potencial químico para dissolução do óleo e a diferença de densidade é utilizada

para separação (LUSAS; LAWHON; RHEE, 1982; ERICKSON, 1983; DOMINGUEZ; NUNEZ; LEMA, 1995; ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1998; ROSENTHAL et al., 2001; LAMSAL; MURPHY; JOHNSON, 2006). As operações básicas para o processo de extração sem solvente consistem de moagem, separação sólido-líquido, centrifugação, desemulsificação e secagem (LUSAS; LAWHON; RHEE, 1982). A centrifugação divide os extratos aquosos em óleo, fase sólida e fase líquida. O óleo recuperado depois de ter quebrado a emulsão é normalmente de alta qualidade (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

A associação de enzimas no processo de extração aquosa melhora o rendimento através da diminuição das barreiras, pois quebram as proteínas constituintes das paredes celulares e das pseudo-membranas que envolvem as gotas de óleo (SMITH et al., 1993; ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996). É um processo que consome pouca energia, reduz a aplicação de solventes orgânicos e fornece óleo de maior qualidade associado à qualidade superior da proteína da torta, mais segura para o consumo humano (SANTOS; FERRARI, 2005). Trabalhos utilizando enzimas no processamento de oleaginosas foram publicados por Dominguez; Nunez e Lema (1993), Rosenthal; Pyle e Niranjana (1996), Kashyap et al. (1997) e Wu; Johnson e Jung (2009).

A extração aquosa enzimática que aplica a associação de enzimas apresenta-se mais efetiva. As pesquisas que utilizaram somente enzimas proteolíticas para a extração de óleo de soja obtiveram um rendimento de 86% contra 62% encontrado para uma extração sem a utilização de enzimas (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

O processo de expansão facilita a ação das enzimas, comparativamente ao grão moído (rendimento inferior a 15%). Pois elimina a necessidade do uso de solventes para a quebra da emulsão, aumenta a quantidade de fosfatídeos hidratáveis e propicia a obtenção de um óleo de melhor qualidade para refino (FREITAS et al., 1996, CHABRAND et al., 2008).

Todas as pesquisas que tratam da extração aquosa via enzimática, utilizam diferentes enzimas e condições, como pH, temperatura e tamanho do grão, com resultados específicos para cada estudo (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996). Por isso, a comparação dos resultados apresentados por diferentes estudos e a seleção da combinação de enzimas para o melhor rendimento é dificultada, pois cada enzima atua em seu substrato específico e degrada diferentes componentes celulares.

A extração de óleo utilizando enzimas é conhecida para matérias primas como côco (McGLONE; CANALES; CARTES, 1986; TANO-DEBRAH; OHTA, 1997), soja, girassol (DOMINGUEZ; NUNEZ; LEMA, 1993; KASHYAP et al., 1997; ROSENTHAL et al., 2001) e abacate (BUENROSTRO; LOPEZ-MUNGUIA, 1996).

Na extração enzimática de óleos vegetais são utilizados vários tipos de enzimas entre elas a pectinase, celulase e hemicelulases, chamadas genericamente de carboidrases. Tais enzimas utilizadas no processo de extração via enzimática, atuam na lise das moléculas polissacarídicas constituintes da parede celular. A escolha da melhor enzima é feita após entender e conhecer a complexidade dos polissacarídeos formadores da parede celular. A parede celular primária da maioria de plantas superiores possui muitas características em comum e uma estrutura muito semelhante, composta de fibras de celulose unindo as hemiceluloses. No entanto, as preparações comerciais contendo essas enzimas são frequentemente incapazes de hidrolisar componentes específicos, por exemplo, complexos polissacarídeos encontrados na parede celular de plantas não lenhosas (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996). As carboidrases degradam os carboidratos que estão intimamente ligados ao valor nutricional dos grãos. Esse é limitado pelo teor de polissacarídeos não amiláceos insolúveis (celulose) e polissacarídeos não amiláceos solúveis (predominantemente β -glucanas e arabinoxilanas) (FIREMAN; FIREMAN, 1998).

Dentre as carboidrases comerciais a Viscozyme® L é um complexo multi-enzimático que inclui arabanase, celulase, β -glucanase, hemicelulase e xilanase. É produzida a partir do *Aspergillus aculeatus* e possui atividade sobre substâncias similares à pectina com cadeias ramificadas, encontradas nas paredes celulares da soja (SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009).

Outra enzima comercial é a Celluclast® 1,5L, é uma carboidrase, produzida por fermentação submersa de cepas selecionadas do fungo *Trichoderma reesei*. Ela catalisa a degradação de celulose em glicose, celobiose e polímeros com alto teor de glicose (SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009).

A ação das proteases está ligada a hidrólise das membranas celulares e também à sua capacidade emulsificante. Alguns estudos mostraram que a capacidade emulsificante de algumas proteínas aumenta durante a proteólise. Por isso, a utilização dessas pode ter impacto negativo ou positivo sobre o processo, dependendo do grau de hidrólise protéica (HAMADA; MARSHALL, 1989). As enzimas proteolíticas hidrolisam as proteínas nas membranas celulares, bem

como dentro do citoplasma e também as membranas lipídicas. Elas podem afetar a rede citoplasmática, estrutura que envolve grande parte das proteínas no caso da soja e algumas outras sementes oleaginosas, tornando a estrutura interna menos compactada e permite a fácil remoção de proteínas e lipídeos da célula (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

A Alcalase® é uma protease alcalina produzida comercialmente por fermentação submersa de uma espécie selecionada de *Bacillus licheniformis*. Possui especificidade e forte capacidade de hidrólise, principalmente para as proteínas vegetais (YANG et al., 2011). O principal componente da enzima, Subtilisina A (= *Subtilisin Carlsberg*) é uma endoproteínase. Sua temperatura ótima é em torno de 60°C e o pH entre 6,5 e 8,5 (SCHMIDT; SALAS-MELLADO, 2009). Por ser uma endoproteínase, a Alcalase® é capaz de quebrar as ligações peptídicas e, com isso, diminuir o peso molecular e melhorar as propriedades funcionais de proteínas, além da formação de aminoácidos livres em hidrolisados proteicos (YANG et al., 2011).

1.5 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE X PROCESSO DE EXTRAÇÃO AQUOSA ENZIMÁTICA

Os principais aspectos que envolvem a extração de óleo por solvente são ambientais, econômicos, de segurança e qualidade. As enzimas por suas características atuam em condições brandas, promovem um menor impacto ambiental, reduzem o consumo de energia e aumentam a qualidade do produto final (FREITAS et al., 1996).

A preocupação ambiental é ligada a utilização de solventes derivados do petróleo. O n-hexano é responsável pela produção de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) que em contato com outros compostos poluentes, por exemplo, o óxido de nitroso, formam espécies contaminantes, conhecidas como oxidantes fotoquímicos. Seu uso é também preocupante sob o ponto de vista de segurança, pois é altamente inflamável e tem sérios riscos de explosões (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996; CHABRAND, et al., 2008; JUNG, 2009).

O processo de extração aquosa permite a inativação ou remoção de compostos antinutricionais e outras substâncias indesejáveis, que estão presentes em algumas oleaginosas e podem reduzir a qualidade global dos produtos ou o valor biológico das proteínas (DOMINGUEZ; NUNEZ; LEMA, 1995; ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996;

CHABRAND et al., 2008; JUNG, 2009). Além de evitar a perda de aminoácidos essenciais resultante do aquecimento excessivo, visto na extração convencional. O aminoácido mais prejudicado é a lisina, devido à ocorrência da reação Maillard entre os grupos amino das proteínas e a carbonila dos açúcares. Sendo a qualidade global da proteína determinada pela disponibilidade biológica de cada aminoácido, o efeito da reação Maillard não somente danifica os aminoácidos como também o valor biológico (DOMINGUEZ; NUNEZ; LEMA, 1995; ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

Na Tabela 1 são apresentadas as principais características que afetam a extração aquosa e com solvente.

Tabela 1 - Extração aquosa X extração via solventes, vantagens, desvantagens e possíveis alternativas para melhorias.

Aspectos	Vantagens	Desvantagens	Possíveis intervenções
Econômico	Extração simultânea de óleo e proteína	Baixo rendimento do óleo	Utilização de enzimas
	Não utilização de solventes orgânicos	Grande quantidade de resíduos	Otimização do processo/ Reciclagem da água
	Não emissão de Composto Orgânicos Voláteis (COVs)	Preço das enzimas Emulsificação	Otimização e utilização de métodos Alternativos para desemulsificação
Ambiental	Não emissão de COVs		
Segurança	Menor possibilidade de explosões		
Qualidade	Qualidade do óleo Proteínas de alto valor biológico Produtos sem fatores antinutricionais.		

Fonte: Rosenthal, Pyle e Niranjana (1996).

Alguns autores consideram ainda como desvantagem da extração enzimática aquosa de sementes oleaginosas a quantidade de enzimas necessárias para o processo de hidrólise, superior a 1% em relação ao peso da matéria prima, e que, devido ao custo das enzimas comerciais limita o uso desta tecnologia (SANTOS; FERRARI, 2005).

Além disso, a emulsificação ocorre frequentemente devido à presença de proteínas, e também, principalmente, de fosfolipídeos, particularmente a lecitina que é um excelente emulsificante. Estes compostos atuam como surfactantes e participam da formação e estabilização desta emulsão (AOKI; TANEYAMA; INAMI, 1980). Os principais componentes fosfolipídicos são: fosfatidilcolina, fosfatidiletanoamina, fosfatidilinositol e estão presentes na soja em uma razão de 47:23:20 (WANG; HAMMOND; FEHR, 1997). A estabilidade da emulsão formada durante a extração aquosa pode ser devida à presença de multicamadas emulsionantes de proteínas de alto peso molecular. A presença de fosfolipídeos no creme proporciona estabilidade adicional a emulsão, porém seu comportamento não está totalmente esclarecido. Os carboidratos podem também influenciar na estabilidade da emulsão pois seu funcionamento está associado às proteínas, na formação de estruturas interfaciais complexas (CHABRAND et al., 2008).

1.6 REFERÊNCIAS

ABIOVE – Associação Brasileira de Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em: www.abiove.com.br. Acesso no dia 14 de março de 2011.

AGUIRRE, L.; MARISA, S. G.; DE GIORI, G. S. Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 111, p. 976–982, 2008.

AOKI, H.; TANEYAMA, O.; INAMI, M. Emulsifying properties of soy proteins: characteristics of 7S and 11S proteins. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 534–546, 1980.

BARGALE, P. C.; SOSULSKI, K.; SOSULSKI, F. W. Enzymatic hydrolysis of soybean for solvent and mechanical oil extraction. **Journal of Food Process Engineering**, v. 23, p. 321-327, 2000.

BAJPAI, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour. **Food Chemistry**, v. 89, p. 497–501, 2005.

BUENROSTRO, M.; LOPEZ-MUNGUIA, C. A. Enzymatic Extrac Mustard Seed and Rice Bran. **Journal of American Oil Chemistis Society**, v. 73, p. 687–692, 1996.

CAMPBELL, K. A.; GLATZ, C. E. Mechanisms of Aqueous Extraction of Soybean Oil, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 10904–10912, 2009.

CHABRAND, R. M.; KIM, H. J.; ZHANG, C. E.; JUNG, S. Destabilization of the emulsion formed during aqueous extraction of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemistis Society**, v. 85, p. 383–390, 2008.

CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 304, p. 30-42, 2009.

COSTA, J. A. **Cultura da Soja**. Evangraf: Brasil. 1996.

CHOVE, B. E.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Some functional properties of fractionated soy protein isolates obtained by microfiltration. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1379–1388, 2007.

DENAVI, G.; TAPIA-BLACIDO, D. R.; AÑO, N. M. C.; SOBRAL, P. J. A.; MAURI, A. N.; MENEGALLI, F. C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 341–349, 2009.

DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; LEMA, J. M. Oil Extractability from Enzymatically Treated Soybean and Sunflower: Range of Operational Variables. **Food Chemistry**, v. 46, p. 277–284, 1993.

DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; LEMA, J. M. Aqueous processing of sun flower kernels with enzymatic technology. **Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 427–434, 1995.

ERICKSON, D. R. Soybean oil: up date on number one. **Journal American Oil Chemistry Society**, n. 60, v. 2, p. 303A–8A, 1983.

EMBRAPA, 2009. Disponível em: www.cnpso.embrapa.br. Acesso em: 12 de novembro de 2009.

EMBRAPA, 2011. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17. Acesso em: 14 de março de 2011.

FERNANDEZ-QUINTELA, A.; LARRALDE, J.; MACARULLA, M. T.; MARCOS, R.; MARTÍNEZ, J. A. Leguminosas y concentrados de proteínas: nuevas perspectivas y aplicaciones. **Alimentaria**, p. 59-63, 1993.

FIREMAN, F. A. T.; FIREMAN, A. K. B. A. T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 173-178, 1998.

FREITAS, S. P.; HARTMAN, L.; COURI, S. Alternativa biotecnológica ao uso de solventes orgânicos na extração de óleos vegetais. **Óleos e Grãos**, p. 29-32, set-out 1996.

FRIDMAN, M. Nutritional value of food proteins from different food sources. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 6 – 29, 1996a.

FRIDMAN, M. Chemistry, nutrition and microbiology of D-amino acids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 3457-3479, 1999.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1069-1086, 2001.

FRIEDMAN, M.; LIARDON, R. Racemization kinetics of amino acid residues in alkali treated soybean proteins. **Journal Agriculture of Food Chemistry**, v. 33, p. 666-672, 1985.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY, G. C. Comparison of Quality Characteristics of Soybeans from Brasil, China, and the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2669-2673, 2001.

HAMADA, I. S.; MARSHALL, W. E. Preparation and functional properties of enzymatically deamidated soy proteins. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 598-635, 1989.

HOU, H. J.; CHANG, K. C. Structural characteristics of purified glycinin from soybeans stored under various conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 3792-3800, 2004.

KARR-LILIENTHAL, L. K.; KADZERE, C. T.; GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR. G. C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock Production Science**, v. 97, p.1 –12, 2005.

KASHYAP, M. C.; AGRAWAL, Y. C.; SARKAR, B. C.; SINGH, B. P. N. Response Surface Analysis of Enzyme Aided Extraction of Soybean. **Journal of Food Science and Technology**, v. 34, p. 386–390, 1997.

KUMAR, R.; CHOUDHARY, V.; MISHRA, S.; VARMA, I. K.; MATTIASON, B. Adhesives and plastics based on soy protein products. **Industrial Crops and Products**, v. 16, p. 155-172, 2002.

LAMSAL, B. P.; MURPHY, P. A.; JOHNSON, L. A. Flaking and extrusion as technical treatments for enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybeans. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 83, n. 11, p. 973-9, 2006.

JUNG, S. Aqueous extraction of oil and protein from Soybean and lupin: a comparative study, **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, p. 547-559, 2009.

LAWHON, J. T.; MANAK, L. J.; RHEE, K. C.; LUSAS, E. W. Combining aqueous extraction and membrane isolation techniques to recover protein and oil from soybeans. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 46, n. 3, p. 912-916, 1981.

LIU, Y.; GRIFFITH, E.; HIGGINS, M.; OVERCASH, M. Life cycle assessment of soybean oil production. **Journal Food Process Engineering**, v. 4, n. 429-450, 2006.

LIU, K. Expanding soybean food utilization. **Food Technology**, v. 54, p. 46-58, 2000.

LIU, C.; WANG, H.; CUI, Z.; HE, X.; WANG, X.; ZENG, X.; MA, H. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1310-1316, 2007.

LUSAS, E. W.; LAWHON, J. T.; RHEE, K. C. Producing edible oil and protein from oilseeds by aqueous processing. **Oil Mill Gazer**, v. 4, p. 28-34, 1982.

LUKACZER, D.; LISKA, D. J.; LERMAN, R. H.; DARLAND, G.; SCHILTZ, B.; TRIPP, M.; BLAND, J. S. Effect of soy protein and phytosterols on CVD risk factor in postmenopausal women. **Nutrition**, v. 22, p. 104-113, 2006.

McGLONE, O. C.; CANALES, A. L.; CARTES, J. V. Coconut oil Extraction by a New Enzymatic Process. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 3, p. 695-697, 1986.

MEJIA, E.; LUMEN, B. O. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic diseases. **Sexually, Reproduction e Menopause**, v. 4, n. 2, 2006.

MORAES, R. M. A.; JOSE, I. C.; RAMOS, F. G.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 725-729, 2006.

MUJOO, R.; TRINH, D. T.; NG, P. K. W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. **Food Chemistry**, v. 82, p. 265-273, 2003.

OAKENFULL, D. Soy protein, saponins and plasma cholesterol. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2971–2972, 2001.

OUHIDA, I.; PEREZ, J. F.; GASA, J. Soybean (*Glycine max*) cell wall composition and availability to feed enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1933-1938, 2002.

PATIL, A.; TAWARE, S. P.; OAK, M. D.; TAMHANKAR, S. A.; RAO, V. S. Improvement of Oil Quality in Soybean (*Glycine max* L. *Merrill*) by Mutation Breeding. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 84, p. 1117-1124, 2007.

PEÑA-RAMOS, A.; XIONG, W. Y.; ARTEAGA, G. E. Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1908–1918, 2004.

REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. J.; MATEOS-APARICIO, I. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods, **Food Chemistry**, v. 108, p.1099–1105, 2008.

- RIAZ, M. N. Uses and benefits of soy fiber. **Cereal Foods World**, v. 46, n. 3, p. 98-100, 2001.
- ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Aqueous and Enzymatic Processes for Edible Oil Extraction. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 19, p. 402-420, 1996.
- ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Simultaneous aqueous extraction of oil and protein from soybean: mechanisms for process design. **Trans I Chem E**, v. 76, Part C, p. 224-230, 1998.
- ROSENTHAL, A.; PYLEB, D. L.; NIRANJAN, K.; GILMOUR, S.; TRINCA, L. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 499-509, 2001.
- SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.1, p. 32-138, 2005.
- SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas Alcalase® e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1144-1150, 2009.
- SMITH, D. D.; AGARWAL, Y. C.; SARKAR, B. C.; SINGH, B. P. N. Enzymatic hydrolysis pretreatment for mechanical expelling of soybeans. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 70, p. 885-889, 1993.
- STASWICK, P.; HERMEDSON, M.; NIELSEN, N. Identification of the cysteines which link acidic and basic components of the glycinin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 13431-13435, 1984
- SINGH, R.; SINGH, G.; CHANHAN, G. S. Nutritional evaluation of soy-fortified biscuits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p.162 164, 2000.
- STOMBAUCH, S. K.; JUNG, H. G.; ORF, J. H.; SOMERS, D. A. Genotypic and environmental variation in soybean seed cell wall polysaccharides. **Crop Science**, v. 40, p. 408-412, 2000.

TANO-DEBRAH, K.; OHTA, Y. Aqueous Extraction of Coconut Oil by an Enzyme Assisted Process. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 74, p. 497–502, 1997.

THANH, V.; SHIBASAKI, K. b-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical of the monomeric forms. **Biochimic aet Biophysica Acta**, v. 490, p. 370–376, 1977.

WANG, T.; HAMMOND, E. G.; FEHR, W. Phospholipid fatty acid composition and stereospecific distribution of soybeans with a wide range of fatty acid composition. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 74, p. 1587–94, 1997.

WAN, P. J.; WAKELYN, P. J. Technology and Solvents for Extracting Oil seeds and Non petroleum Oils. p. 36–37, **AOCS**, Press, Champaign, IL 1997.

WU, J.; JOHNSON, L. A.; JUNG, S. Demulsification of oil-rich emulsion from enzyme assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 527–533, 2009.

YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chemistry**, v. 124, p. 551–555, 2011.

ZARKADAS, C. G.; GAGNON, C.; GLEDDIE, S.; KHANIZADEH, S.; COBER, E. R.; GUILLEMETTE, R. J. D. Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two- dimensional electrophoresis. **Food Research International**, v. 40, p. 129–146, 2007.

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS RESÍDUOS LÍQUIDOS DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA (*Glycine max*) SEM SOLVENTE

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar as características químicas do resíduo líquido da extração do óleo de soja, via enzimática, tendo como variáveis o sistema enzimático (Alcalase®/Celluclast® ou Alcalase®/Viscozyme® L) e o controle do pH (com e sem controle do pH). Os resíduos líquidos apresentaram elevados teores de proteínas, aproximadamente 35% e 52% com e sem controle de pH, respectivamente e carboidratos em torno de 40%. Os teores de cinzas foram influenciados pela presença de solução tampão utilizada para o controle de pH. Os resíduos dos sistemas com Viscozyme® L apresentaram maiores valores de açúcares redutores (~15%), o controle de pH influenciou significativamente os valores encontrados para a determinação do Brix. Os monossacarídeos predominantes foram galactose ($29,05 \pm 2,76$ a $36,70 \pm 0,57$ Mol%) e glicose ($51,10 \pm 0,14$ a $59,65 \pm 2,47$ Mol%). E as concentrações de metionina encontradas foram entre 23 e 66 mg L⁻¹. Os resultados do perfil eletroforético de proteínas totais mostrou a presença de vários peptídeos com peso molecular inferior a 25 kD quando a extração enzimática foi realizada em pH 4,5.

Palavras chaves: Caracterização química. Extração. Enzimas. *Glycine max*. Resíduos.

CHEMICAL CHARACTERISTICS OF LIQUID WASTES FROM THE EXTRACTION OF SOYBEAN (*Glycine max*) OIL WITHOUT SOLVENT

ABSTRACT

The aim of this work was the chemical characterization of the liquid residue from the extraction of soybean oil, through enzyme processing, being as main variables the enzyme system (Alcalase®/Celluclast® or Alcalase®/Viscozyme® L) and the control of pH (with pH adjustment and without pH adjustment). The liquid waste had high levels of protein content, approximately 35% with pH adjustment and 52% without pH control, and carbohydrate totals around 31%. The ash contents were influenced by the addition of pH buffer. Residues from systems with Viscozyme® L showed higher reducing sugars (~15%), while Brix values regardless of the enzyme system, with pH adjustment, was found higher values. The monosaccharide residues are prevalent in galactose (29.05 ± 2.76 to 36.7 ± 0.57 Mol%) and glucose (51.1 ± 0.14 to 59.65 ± 2.47 Mol%). The methionine concentrations of liquid waste were among 23 and 66 mg L⁻¹. Results from eletrophoretic profile of total protein showed the presence of several peptides with MW lower than 25 kD when enzymatic extraction was carried out at pH 4,5.

Keywords: Chemical characterization. Extraction. Enzymes. *Glycine max*. Waste.

1 INTRODUÇÃO

Os processos industriais empregados na produção de óleo de soja utilizam solventes derivados do petróleo, que extraem além do óleo, outros constituintes da matéria prima, sendo necessário refinar antes da comercialização do produto. Outra alternativa para a indústria é a obtenção do óleo de soja por processo de prensagem, porém não é condizente com a escala e com o consumo mundial de óleo. Nestes dois processos, os resíduos estão amplamente explorados e estudados. O beneficiamento da soja, na produção do óleo resulta, em importantes matérias primas para a produção de ração animal, humana e também ingredientes para muitos setores industriais.

Os movimentos internacionais para a minimização do consumo de derivados do petróleo, melhoria da saúde do consumidor e redução de resíduos, justificaram a busca por processos tecnológicos de extração de óleo, sem solventes derivados do petróleo. O uso de enzimas no processo de extração por solventes ou no sistema de prensa hidráulica foi descrito em 1972, por Sherba e colaboradores apud Rosenthal; Pyle e Niranjana (1996), como um pré tratamento, pois a quebra dos constituintes do grão facilitaria a extração do óleo.

Na década de 90, surgiram os primeiros trabalhos com extração de óleo de soja via enzimática (DOMINGUEZ; NUNEZ; LEMA, 1994; ROSENTHAL; PYLE; NIRANJANA, 1996; KASHYAP et al., 1997; WU; JOHNSON; JUNG, 2009), onde a extração acontece pela diferença de densidade entre o óleo e o meio extrator, a água (ERICKSON, 1983; LUSAS; LAWHON; RHEE, 1982; DOMINGUEZ; NUNEZ; LEMA, 1995; LAMSAL; MURPHY; JOHNSON, 2006). Porém, esses trabalhos consideram o processo de extração do óleo e não as características dos seus derivados.

A utilização de enzimas é conhecida por gerar produtos de boa qualidade, reduzir os subprodutos e evitar as condições operacionais proporcionadas pelos solventes. O processo enzimático já foi estudado para extrair o óleo de oleaginosas como abacate (BUENROSTRO; LOPEZ-MUNGUIA, 1986), côco, (MCGLONE; LOPEZ-MUNGUIA; CARTER, 1986), milho (KARLOVIC et al., 1994), canola (SARKER et al., 1998), soja, girassol (DOMINGUEZ; NUNEZ; LEMA, 1993; KASHYAP et al., 1997; ROSENTHAL et al., 2001).

As enzimas mais utilizadas são as carbohidrases que, atuam nos polissacarídeos constituintes da parede celular. A associação com proteases, facilita o acesso aos vacúolos e aumenta o rendimento da extração (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJANA, 1996). Outro aspecto

importante a ser considerado é a diferença entre a ação das carbohidrases (pectinases, celulasas e hemicelulasas), que atuam especificamente sobre a parede celular e das proteases, que estão ligadas a hidrólise de oleossomos e na redução da emulsificação (HAMADA; MARSHALL, 1989).

Todas as pesquisas que tratam da extração aquosa de óleo, via enzimática, utilizam diferentes enzimas. Cada uma atuando em determinados substratos e com diferentes formas de degradar os componentes celulares, e diferentes condições de pH, de temperatura, de tamanho de partículas do grão, dificultando a comparação dos resultados e seleção da melhor condição para o melhor rendimento (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996).

No presente trabalho empregou-se enzimas que hidrolisam proteínas e carboidratos para extração de óleo de soja sem o uso de solventes. Os resíduos líquidos foram caracterizados com o objetivo de fundamentar futuras sugestões de uso, que justificariam algumas diferenças no rendimento da extração do óleo, comparativamente às tecnologias tradicionais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Grãos de soja expandidos foram doados pela empresa Bunge Alimentos (Gaspar, Santa Catarina, Brasil), e as enzimas Alcalase® 2,4 L (2,4 UG/g), Celluclast® 1,5 L (700 EGU/g) e Viscozyme® L (100 FBG/g), pela empresa Tovani Benzaquen (São Paulo, Brasil), representante da Novozymes. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Os padrões de aminoácidos mais frequentemente encontrados na soja L-asparagina, L-histidina, L-glicina, L-alanina, L-ácido glutâmico, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-triptofano, L-fenilalanina, L-leucina, L-lisina e L-cisteína (WOLF, 1970; KARR-LILIENTHAL et al., 2005; AGUIRRE; GARRO; DE GIORI, 2008) foram adquiridos da Sigma Co. (*St. Louis, MO, USA*).

2.2 Métodos

2.2.1 Extração de óleo de soja e produção de resíduos do processamento

Os resíduos líquidos da extração do óleo de soja sem solvente foram obtidos por quatro sistemas enzimáticos. Primeiro: 200 g de soja expandida e 400 mL de solução tampão fosfato pH 8,0 foram adicionados da enzima proteolítica Alcalase® na concentração de 1% (m/m) e levados ao banho-maria a 60°C por 4 horas, com agitação lenta a cada hora. Este meio foi acidificado com HCl 0,1 mol/L até pH 4,5, e em seguida adicionado 200 mL de solução tampão citrato pH 4,5 juntamente com a enzima Celluclast®, na mesma concentração, e levado ao banho-maria a 60°C por 2 horas. Ao final, o pH do hidrolisado foi reduzido até aproximadamente 3,0 para inativação das enzimas, e centrifugado a 2 500 rpm por 25 minutos (centrífuga *Janetzki, modelo S60*). Houve a formação de 3 fases: líquida, sólida e oleosa. A fase líquida (ACLpH) e sólida (ACSpH) foram separadas, congeladas a -30°C e liofilizadas (liofilizador *Terroni, série LD*) e a fase oleosa foi descartada. O material foi acondicionado em embalagens de polipropileno, seladas a vácuo e mantidas a -18 °C até o momento das análises.

Segundo sistema: a enzima Celluclast® foi substituída pela Viscozyme® L, utilizando o mesmo procedimento do primeiro sistema e obtenção das amostras da fase líquida (AVLpH) e sólida (AVSpH). Terceiro e quarto sistemas: repetiu-se as enzimas utilizadas no primeiro e segundo sistema, porém não houve o controle do pH durante a hidrólise, para isso utilizou-se água destilada em substituição as soluções tampão, e obteve-se as amostras líquidas (ACL) e (AVL) e as sólidas (ACS) e (AVS). Em todos os sistemas houve a inativação enzimática com adição de HCl 0,1 mol/L para o abaixamento do pH.

Uma amostra branco (Br), sem tratamento, foi processada seguindo os mesmos procedimentos, porém sem a adição de enzimas.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Na Figura 1 encontra-se o esquema da obtenção das amostras.

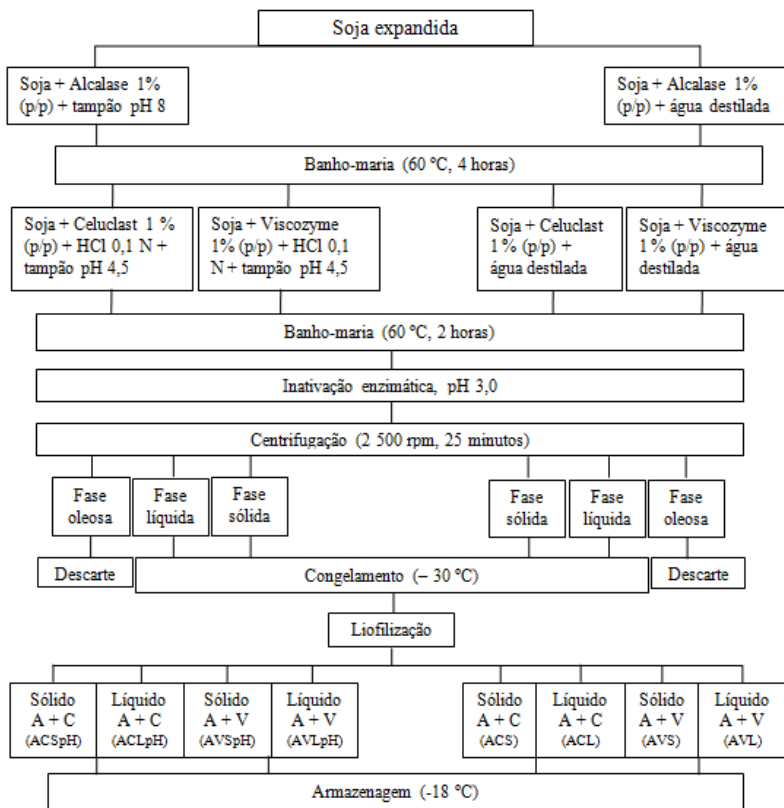


Figura 1 - Fluxograma da obtenção das amostras dos resíduos da extração do óleo de soja (*Glycine max*) com enzimas e sem utilização de solventes.

2.2.2 Composição centesimal

As amostras líquidas liofilizadas foram analisadas quanto ao teor de cinzas (AOAC 923.03), lipídeos totais (AOAC 920.85), nitrogênio total (AOAC 920.87) (N X 5,75) (AOAC, 2005), sendo os resultados expressos em g/100g (peso seco). Carboidratos foram calculados por diferença. Valores de energia (kcal) foram obtidos pela aplicação dos fatores 4, 9 e 4 para cada grama de proteína, lipídeo e carboidrato, respectivamente (WATT; MERRILL, 1999).

2.2.3 Análises de aminoácidos

2.2.3.1 Equipamento

Os procedimentos analíticos para determinação de aminoácidos nos resíduos líquidos foram realizados em equipamento de Eletroforese Capilar (EC) Agilent Technologies, modelo 7100 (*Palo Alto, CA, E.U.A.*), equipado com detector de arranjo de diodos e sistema de refrigeração do capilar através de circulação de ar. Para a separação eletroforética foi utilizado capilar de sílica fundida (*Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.*) com dimensões de 75 μm de diâmetro interno e 48,0 cm de comprimento total (L_{tot}) sendo 39,5 cm até a janela de detecção (L_{det}). Para aquisição e tratamento dos dados foi utilizado o software Chemstatio (*rev. A.06.01*).

2.2.3.2 Reagentes e Soluções

Soluções estoques de cada aminoácido foram preparadas com água destilada a 50 ppm e estocadas sob refrigeração.

O eletrólito de corrida utilizado foi constituído de 20 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio (TBS) e 50 mmol L⁻¹ de dodecil sulfato de sódio (SDS) em pH 9,0.

2.2.3.3 Preparo das amostras

Foi preparado uma solução aquosa a 10 mg/mL de cada resíduo líquido liofilizado. Em seguida, as amostras foram hidrolisadas com HCl 8 mol/L, por 24 h/110°C. Após arrefecer o tubo, uma alíquota de 200 μL do hidrolisado foi transferida para um microtubo e adicionado 1200 μL de NaOH 1 mol/L (amostra hidrolisada). As amostras hidrolisadas e não hidrolisadas foram analisadas no equipamento de EC após o procedimento de derivatização.

Para o procedimento de derivatização, adicionou-se a 50 μL da amostra (hidrolisada e não hidrolisada), 50 μL de tampão borato a 20 mM, 50 μL de KCN a 10 mM e 50 μL de ninidrina (NDA) a 10 mM. A cor fluorescente amarelo-esverdeado do produto AA-NDA (aminoácido-ninidrina) apareceu em alguns minutos. Adicionou-se 300 μL de água deionizada e após 30 minutos a solução resultante foi analisada no EC (HSIEH; CHEN, 2007). Esse procedimento de derivatização foi também aplicado as soluções padrões dos aminoácidos mais frequentemente encontrados na soja.

2.2.3.4 Procedimento

O condicionamento inicial do capilar foi realizado com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (15 minutos), seguido de água deionizada (15 minutos), e eletrólito de corrida (15 minutos), a uma pressão de 940 mbar. No intervalo entre as corridas, o capilar foi lavado com o eletrólito (90 segundos) para condicionamento, e ao término das análises o capilar foi limpo com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} (15 minutos) e água deionizada (15 minutos).

Os aminoácidos foram analisados seguindo a metodologia de Harris (2004). As amostras e as soluções padrão foram injetadas hidrodinamicamente a pressão de 50 mbar por 3 segundos. O sistema de eletroforese foi operado com polaridade normal, tensão constante de 23 kV e a temperatura do capilar foi mantida a 25°C . O comprimento de onda utilizado foi 420 nm, com detecção direta.

2.2.4 Análise de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi feita de acordo com Miller et al. (1959) com modificações, em todas as amostras líquidas liofilizadas.

2.2.5 Determinação monossacarídica

A determinação dos açúcares neutros nas amostras dos resíduos líquidos foi feita por cromatografia líquido-gasosa (GLC) após derivatização a acetato de alditóis através da hidrólise ácida.

As amostras foram hidrolisadas com ácido trifluoroacético 1 mol/L , durante 5 horas a 100°C . Ao término da hidrólise, o excesso de ácido foi removido por evaporação (BIERMANN, 1989). Após a hidrólise ácida total, os monossacarídeos foram solubilizados com água destilada e reduzidos pela adição de cerca de 10 mg de borohidreto de sódio, por 16 horas a 4°C (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Posteriormente, foi adicionado resina catiônica fortemente ácida para remoção dos íons Na^{+} . As soluções foram filtradas e o solvente evaporado a vácuo. Foi adicionado 1 mL de metanol para remoção do ácido bórico e, o borato de metila formado foi evaporado a vácuo. Este processo foi repetido por três vezes. Os alditóis formados foram acetilados pela adição de 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina, em tubos vedados, permanecendo durante 12 horas à temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). A reação foi

interrompida pela adição de gelo. A seguir foi procedida a extração dos acetatos de alditóis, através da adição de clorofórmio e posterior eliminação da piridina em tratamentos sucessivos com sulfato de cobre 5% e água destilada.

Os acetatos de alditóis resultantes foram submetidos a GLC utilizando um cromatógrafo gasoso Trace GC Ultra (*Thermo Electron Corporation*) equipado com uma coluna capilar DB-225 (0,25 mm x 30 m). As temperaturas do injetor e do detector por ionização de chama (FID) foram de 250 e 300°C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada de 100 a 215°C a uma taxa de aquecimento de 40°C/min. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a um fluxo de 1,0 mL/min.

Para dosagem de ácidos urônicos foi utilizado o método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), tendo como solução padrão ácido galacturônico nas concentrações de 10-100 µg/mL e leitura em 520 nm.

2.2.6 Perfil de massas moleculares

As amostras solúveis foram analisadas quanto ao perfil das massas molares por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detector de espalhamento de luz laser de multiângulos e detector diferencial de índice de refração (HPSEC-MALLS/RI) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para as análises em HPSEC-MALLS/RI as amostras foram solubilizadas na concentração de 1,5 m/m na solução do eluente e filtradas em membranas de acetato de celulose, com poro de 0,22 µm. A seguir foram injetadas em um equipamento constituído por uma bomba HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (*Waters 515*), injetor, 4 colunas de ultrahydrogel – 120, 250, 500 e 2000 – com limites de exclusão 5.10^3 , 8.10^4 , 4.10^5 e 7.10^6 respectivamente, DAWN DSP *Light Scattering* (*Wyatt Technology*) e um detector de índice de refração diferencial modelo 2410 (*Waters*). O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo 200 ppm de NaN_3 .

O mesmo preparo foi utilizado para as amostras submetidas às análises em cromatografia líquida. Um equipamento Shimadzu (*Japão*) equipado com unidade de controle CBM-10A, forno CTO-10A, bomba LC-10AD, detector de índice de refração RID-10^a e uma coluna Supelcogel Pb (*Supelco - USA*), 30 cm x 7,8 mm e pré-coluna Supelcogel Pb, 5 cm x 4,6 mm. A temperatura de análise foi de 80°C, fluxo de 0,1 mL/min e o eluente foi a água destilada.

2.2.7 Extração de proteínas totais de soja

Foi adicionado 20 mg do resíduo líquido a 550 μ L de tampão 0,03 mol/L Tris [Tris(hidroximetil)aminometano] (pH 8,0) contendo 0,01 mol/L β -mercaptoetanol (β -ME) e agitado a cada 10 minutos durante 1 hora. As amostras foram centrifugadas por 20 min a 11,000 X g, em temperatura ambiente (MUJOO; TRING; NG, 2003).

2.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a separação do extrato protéico, foi realizada a separação dos peptídeos por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes Mini-Protean II (*Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA*). A concentração de proteínas foi determinada usando o método proposto por Bradford (1976) e albumina sérica bovina como padrão. O extrato protéico foi diluído a 10 mg/mL com água destilada, e 20 μ L desse extrato diluído foi adicionado a 20 μ L de tampão de carga (0,15mol/L Tris-HCl, pH 6,8, 4% p/v SDS, 5% v/v β -mercaptoetanol) e aquecido a 96°C por 5 min. Foi adicionado 20 μ L da solução contendo 100 μ g de proteína, a temperatura ambiente, no gel submetido a 15 V por 15 min e em seguida 30 V por 4 horas. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,05%, p/v) e descorados em solução metanol ácido acético e água destilada (25: 10: 65 v/v/v) (MUJOO; TRING; NG, 2003). Para estimar as massas moleculares dos polipeptídeos foi utilizado o padrão de 250 kD – 10 kD (*Precision Plus Protein Standards - Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA*).

2.2.9 Análise estatística

Os resultados desses ensaios foram obtidos a partir de quatro sistemas, tendo como principais variáveis o sistema enzimático (Alcalase®/Celluclast® ou Alcalase®/Viscozyme® L) e o pH (com e sem o controle do pH).

As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, e testes de comparação de médias, quando necessário.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição centesimal

A obtenção dos resíduos líquidos dos sistemas testados para a produção do óleo de soja, via enzimática, ocorre em uma proporção aproximada de 1 litro de resíduo líquido/Kg de soja. Eles poderiam representar um resíduo industrial, no entanto, de acordo com suas características químicas, podem ser utilizados como matérias primas para novos produtos. No presente trabalho, os resíduos líquidos foram inicialmente caracterizados quanto ao teor de sólidos totais e, posteriormente liofilizados para a avaliação de sua composição (Tabela 1).

Em todos os parâmetros analisados da composição centesimal dos resíduos líquidos foi observado relação com o controle de pH.

O teor de sólidos totais foi significativamente superior nas amostras obtidas com o controle do pH, devido ao emprego de solução tampão. Esse fator foi também significativo na determinação de resíduo mineral fixo (cinzas), já que nos sistemas onde não houve o controle do pH, o conteúdo de cinzas foi praticamente reduzido a metade.

A concentração de extrato etéreo nas amostras foi baixa, considerando o teor de gordura da matéria prima (soja expandida) em torno de $25,06 \pm 0,52 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$, e o controle do pH foi um fator significante. Durante a extração enzimática grande parcela do óleo fica emulsificada e, esta fração não foi considerada no resíduo líquido original, uma vez que a desemulsificação poderia contribuir para o rendimento em óleo no processo produtivo. Não foram encontrados na literatura, trabalhos semelhantes, identificando as perdas em óleo nos resíduos da extração do óleo de soja sem solvente, por via enzimática. O teor do extrato etéreo das amostras com controle de pH foi significativamente inferior ao das amostras sem controle de pH, evidenciando que o pH é fator decisivo na extração do óleo pela ação das enzimas, bem como na separação do óleo.

Tabela 1 - Composição centesimal e valor calórico dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja (*Glycine max*), via enzimática, nos diferentes sistemas

Composição g.(100g) ¹	ACLpH	AVLpH	ACL	AVL
Sólidos Totais ¹	9,67 ± 0,01 ^a	9,76 ± 0,17 ^a	4,76 ± 0,01 ^b	4,74 ± 0,03 ^b
Cinzas ²	17,29 ± 0,61 ^a	16,49 ± 0,75 ^a	7,10 ± 0,14 ^b	6,91 ± 1,21 ^b
Extrato etéreo ²	1,19 ± 0,22 ^b	1,19 ± 0,15 ^b	1,66 ± 0,25 ^a	1,50 ± 0,31 ^a
Proteína (N x 5,75) ²	32,53 ± 3,20 ^b	38,63 ± 1,20 ^b	52,84 ± 0,58 ^a	53,16 ± 1,16 ^a
Carboidratos* ²	42,99 ± 3,32 ^a	43,69 ± 0,70 ^a	38,38 ± 0,53 ^b	38,39 ± 1,68 ^b
Valor calórico (kcal/100g) ²	333,21 ± 2,58 ^b	336,40 ± 3,14 ^b	374,91 ± 0,87 ^a	375,35 ± 5,16 ^a

Valores médios na mesma linha seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Resultados são médias ± desvios padrões de três determinações (n=3). * Calculado por diferença; 1 – resultados em peso úmido; 2 – resultados em peso seco; ACLpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; AVLpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; ACL – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; AVL – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH.

Nas determinações de proteínas e do valor calórico as diferenças foram significativas em função do controle do pH. Os diferentes sistemas enzimáticos utilizados para extração do óleo não influenciaram nessas determinações. Há uma maior concentração de proteínas nos sistemas onde o pH não foi controlado, assim como para o valor calórico. Os carboidratos foram determinados por diferença e apresentaram diferenças significativas entre os sistemas em função do pH. Nas amostras em que o pH foi controlado, os teores de carboidratos foram maiores. Esta determinação corresponde a uma informação generalizada sobre a fração carboidratos, não havendo discriminação entre quais compõem esta fração na composição centesimal dos resíduos analisados. Por se tratar de um resíduo líquido da extração do óleo de soja sem solvente, nunca antes analisado, não há bibliografia disponível para comparação.

Em função dos valores de proteínas, o consumo de aproximadamente 1 g do resíduo liofilizado representa 57% do requerimento diário médio para proteínas para um adulto de 70 kg (0,8 a 1 g/kg/dia), recomendado pela *Dietary Reference Intakes* (DRI, 2001). Dessa forma, esse resíduo poderia representar uma fonte proteica para

portadores de necessidades especiais, como idosos, gestantes e atletas, uma vez analisados os parâmetros de biodisponibilidade.

3.2 Análise de açúcares redutores

Foram observadas diferenças significativas entre as amostras analisadas ($p \leq 0,05$) quanto ao conteúdo de açúcares redutores (Tabela 2). As amostras hidrolisadas com as enzimas Alcalase® e Celluclast® tiveram uma menor concentração de açúcares redutores, independente do pH de hidrólise. Foram observados também que no mesmo sistema enzimático, com controle de pH, os teores de açúcares foram significativamente inferiores.

Nos resíduos originados com as enzimas Alcalase® e Viscozyme® L, o teor de açúcares redutores foi em torno de duas vezes superior, possivelmente devido à presença da enzima Viscozyme® L. Ela é um complexo multi-enzimático formada por várias carbohidrases, como arabinanases, celulase, β -glucanase, hemicelulases e xilanase; também possui atividade hidrolítica para substâncias similares à pectina com cadeias ramificadas encontradas nas paredes celulares da soja (NOVOZYMES, 2009).

Ao contrário do que foi observado na determinação de sólidos solúveis onde o fator pH foi significativo, nas amostras ACL e AVL a concentração de sólidos solúveis foi praticamente a metade quando comparada as amostras ACLpH e AVLpH, o que indica a contribuição do controle do pH para a hidrólise.

Tabela 2 - Conteúdo de açúcares redutores e sólidos solúveis (°Brix) dos resíduos líquidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*), via enzimática, em diferentes sistemas enzimáticos.

	Açúcares redutores g.(100) ⁻¹	Brix (%)
ACLpH	4,81 ± 0,26 ^d	10,3 ± 0,06 ^a
AVLpH	11,73 ± 1,07 ^b	10,27 ± 0,06 ^a
ACL	7,51 ± 0,52 ^c	5,33 ± 0,01 ^b
AVL	15,13 ± 0,09 ^a	5,23 ± 0,06 ^b

*Valores médios na mesma coluna seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Resultados são médias ± desvios padrões de três determinações (n=3). ACLpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; AVLpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; ACL – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; AVL – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH.

O controle do pH contribuiu para melhorar a eficiência da hidrólise nos dois sistemas enzimáticos, o que foi observado com o aumento do teor de sólidos solúveis quando há o controle do pH para a faixa ótima de atuação das enzimas, enquanto fora do controle do pH, a eficiência do processo compromete a extração do óleo.

3.3 Composição monossacarídica

Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foram encontradas quanto aos açúcares neutros e ácido urônico nos resíduos líquidos resultantes da extração do óleo de soja sem solvente (Tabela 3). O teor de rammose e ácido urônico mostrou que a interação dos sistemas enzimáticos e pH foi significativa. As concentrações de fucose e xilose não apresentaram diferenças, enquanto para a arabinose somente a amostra ACLpH apresentou-se significativamente diferente das demais. Na determinação de manose e glicose a diferença se deu entre os sistemas enzimáticos, já para a galactose a diferença estatística apareceu entre os quatro sistemas.

No resíduo líquido proveniente do tratamento com Viscozyme® L com controle de pH os teores de rammose, arabinose, manose e galactose foram superiores ao resíduo líquido obtido por tratamento com Celluclast®. A presença destes monossacarídeos em maior quantidade comprova a ação das diferentes glicosidases presentes na enzima Viscozyme® L.

Os principais monossacarídeos neutros encontrados nos resíduos líquidos da extração do óleo de soja por via enzimática foram glicose (> 50%) e galactose (> 30%). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Huisman, Schols e Voragen (1998), que citam como principais componentes da farinha de soja livre de amido e açúcares de baixa massa molar, a galactose (28%) e a glicose (21%) seguidos de arabinose (19%) e ácidos urônicos (18%).

Tabela 3 - Composição de monossacarídeos dos resíduos líquidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*), via enzimática, em diferentes sistemas enzimáticos.

Monossacarídeo	ACLpH	AVLpH	ACL	AVL
	Mol %			
Ramnose	0,40 ± 0,21 ^c	0,65 ± 0,07 ^a	0,50 ± 0,00 ^{b,c}	0,60 ± 0,00 ^{a,b}
Fucose	0,25 ± 0,07 ^a	0,30 ± 0,00 ^a	0,30 ± 0,00 ^a	0,40 ± 0,14 ^a
Arabinose	1,65 ± 0,35 ^b	2,95 ± 0,07 ^a	2,60 ± 0,14 ^a	2,95 ± 0,07 ^a
Xilose	0,40 ± 0,14 ^a	0,55 ± 0,07 ^a	0,40 ± 0,00 ^a	0,40 ± 0,00 ^a
Manose	5,75 ± 0,49 ^b	6,90 ± 0,57 ^a	6,80 ± 0,14 ^b	7,35 ± 0,07 ^a
Galactose	33,8 ± 1,98 ^c	36,7 ± 0,57 ^a	29,05 ± 2,76 ^d	34,15 ± 0,21 ^b
Glicose	57,05 ± 1,91 ^a	51,1 ± 0,14 ^b	59,65 ± 2,47 ^a	53,35 ± 0,35 ^b
Ácido urônico	0,8 ± 0,00 ^{a,b}	0,85 ± 0,07 ^b	0,70 ± 0,00 ^a	0,80 ± 0,00 ^{a,b}

*Valores médios na mesma linha seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Resultados são médias ± desvios padrões de três determinações ($n=3$). ACLpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; AVLpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; ACL – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; AVL – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH.

Nos resultados da Tabela 3, além dos monossacarídeos provenientes da hidrólise dos polissacarídeos estruturais da parede celular, componentes de moléculas de baixa massa molar e amido também estão presentes. De acordo com a literatura, os principais carboidratos de baixa massa molar presentes na farinha de soja são a sacarose e galactoligossacarídeos (KARR-LILIENTHAL et al., 2005). O amido é encontrado em pequenas quantidades ($< 1\%$) e os polissacarídeos da parede celular correspondem a $\sim 50\%$ dos carboidratos da farinha de soja (principalmente celulose, pectinas, mananas, galactanas e xiloglucanas) (KARR-LILIENTHAL et al., 2005).

A presença de ramnose, arabinose, galactose e ácidos urônicos entre os monossacarídeos apresentados na Tabela 3 se deve a hidrólise das pectinas da farinha de soja, que podem ser tanto provenientes da ação enzimática quanto da solubilização destes componentes durante o processo de extração. De acordo com Nakamura et al. (2000), os polissacarídeos solúveis da soja consistem de homogalacturonanas e ramnogalacturonanas contendo cadeias laterais neutras de arabinose e galactose.

Os monossacarídeos xilose, fucose e parte da glicose e galactose foram provavelmente liberados de xiloglucanas. Além da xiloglucana, a manana é outra hemicelulose cujos monômeros foram detectados nos resíduos líquidos analisados.

A glicose apresentou o maior teor dentre os monossacarídeos, devido a hidrólise das cadeias de glucana β (1 \rightarrow 4) promovida pela celulase presente tanto na Celluclast® quanto na Viscozyme® L. Futuros trabalhos com os resíduos sólidos poderão comprovar a eficiência das enzimas empregadas neste processo.

O perfil de eluição das amostras por HPSEC (Figuras 2 e 3) apresenta apenas picos em elevados tempos de eluição indicando que os resíduos líquidos contêm apenas material de baixa massa molar. A ausência de sinal no MALLS também confirma a ausência de polímeros de alta massa molar. Os perfis de eluição dos resíduos obtidos por tratamento enzimático usando diferentes preparações enzimáticas sem controle de pH foram semelhantes, apresentando os mesmos picos, porém com diferentes intensidades. Em ambos os casos o pico eluindo entre 50 e 55 minutos que corresponderia ao material de maior massa presente nas amostras é praticamente eliminado quando os sistemas enzimáticos foram utilizados com controle de pH. Nas amostras dos resíduos líquidos das extrações enzimáticas com controle de pH os tempos de eluição também foram muito semelhantes, mas algumas diferenças podem ser observadas nas intensidades, em parte, causadas pelas diferenças dos conteúdos de açúcares de cada amostra.

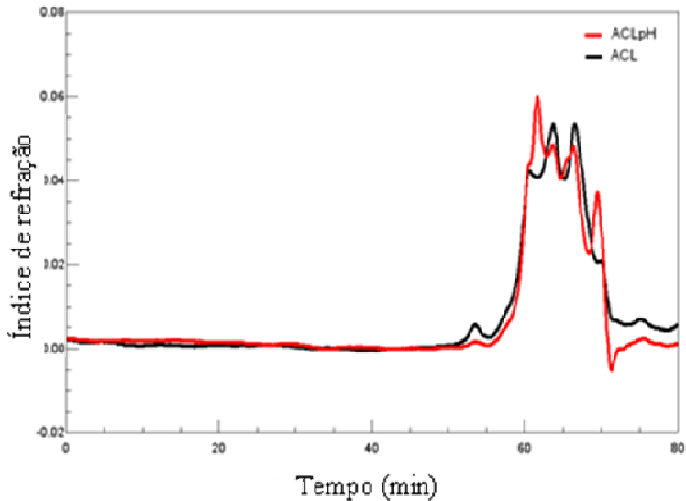


Figura 2 - Perfil de eluição das amostras líquidas ACLpH e ACL resultantes da extração do óleo de soja via enzimática por HPSEC-MALLS/RI. ACLpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; ACL – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH.

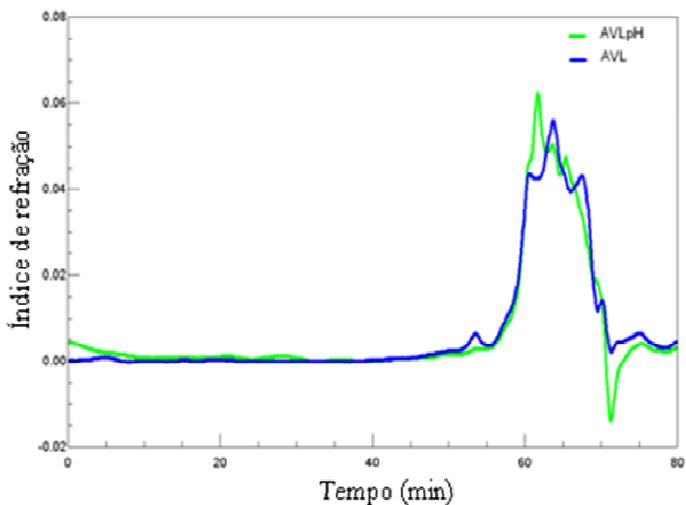


Figura 3 - Perfil de eluição das amostras líquidas AVLpH e AVL resultantes da extração do óleo de soja via enzimática por HPSEC-MALLS/RI. AVLpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; AVL – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH.

Quando analisados por CLAE para comparação dos perfis de eluição dos compostos de baixa massa molar (Figuras 4 e 5), novamente observa-se que os componentes das amostras provenientes dos tratamentos enzimáticos sem controle de pH eluíram nos mesmos tempos, mas apresentaram diferenças importantes quanto à intensidade, refletindo diferenças na quantidade dos produtos de hidrólise.

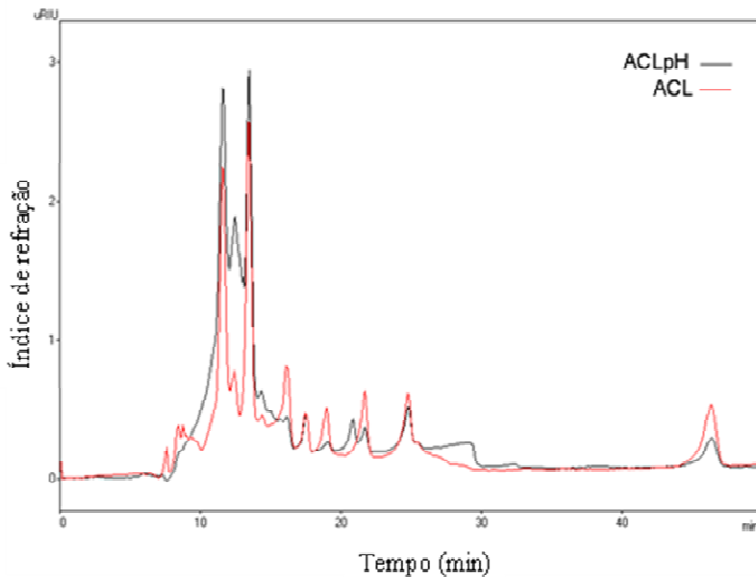


Figura 4 - Perfil de eluição da amostras líquidas ACLpH e ACL resultantes da extração do óleo de soja via enzimática por CLAE. ACLpH – Alcalase® e Celluclast® com controle de pH; ACL – Alcalase® e Celluclast® sem controle de pH.

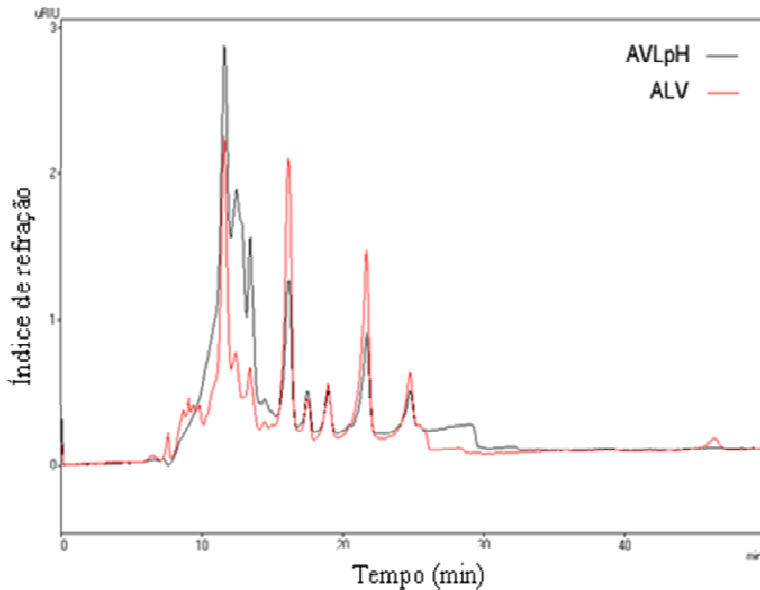


Figura 5 - Perfil de eluição da amostras líquidas AVLpH e AVL resultantes da extração do óleo de soja via enzimática por CLAE. AVLpH – Alcalase® e Viscozyme com controle de pH; AVL – Alcalase® e Viscozyme sem controle de pH.

A comparação entre os resíduos líquidos provenientes do tratamento com os diferentes sistemas enzimáticos com controle de pH confirmou a existência de diferenças nas quantidades dos principais produtos de hidrólise. O controle de pH promove alteração qualitativa e quantitativa nos perfis de eluição das amostras quando comparado aos produtos do tratamento enzimático sem controle de pH.

3.4 Análise de aminoácidos

A determinação de aminoácidos em alimentos é tradicionalmente realizada através de técnicas cromatográficas. Em publicações onde foram analisados hidrolisados de soja utiliza-se na maioria das vezes, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (PEÑA-RAMOS; XIONG; ARTEAGA, 2004; AGUIRRE; GARRO; GIORI, 2008; YANG et al., 2011). No entanto, esta técnica pode, muitas vezes, ser limitada pelo longo período de análise quando existe um grande número

de amostras e, além disso, técnicas cromatográficas consomem um grande volume de reagentes e o preparo das amostras comumente possui muitas etapas. Em contrapartida, a eletroforese capilar tornou-se cada vez mais atraente para a determinação de aminoácidos, destacando-se pela alta eficiência de separação, reduzido consumo de solventes e pequenos volumes de amostra. Com isso, torna-se possível a construção de metodologias com alta detectabilidade, seletivas e de baixo custo operacional (HSIEH; CHEN, 2007). Devido à versatilidade do método, a eletroforese capilar foi empregada neste trabalho.

A composição de aminoácidos livres encontrados nos resíduos líquidos estão apresentadas na Tabela 4. Os resultados obtidos indicam que não houve um comportamento semelhante entre os sistemas utilizados. Na amostra resultante da hidrólise com Celluclast®, sem controle de pH, foi quantificado maior número de aminoácidos do que nas amostras onde o pH foi controlado e os mesmos foram detectados em quantidades diferentes. E nas amostras hidrolisadas com Viscozyme® L, sem controle do pH, houve uma maior ocorrência de aminoácidos essenciais, o que não ocorreu no hidrolisado com esta mesma enzima, com controle de pH.

O aminoácido alanina não foi detectado na amostra hidrolisada com Viscozyme® L, com controle de pH. O ácido glutâmico é muito encontrado na soja numa concentração de 18,5% (BELITZ, 1999; ZARKADAS et al., 2007; GRIESHOP; FAHEY, 2001, YANG et al., 2011), seguido do ácido aspártico (YANG et al., 2011). O ácido glutâmico não foi detectado nas amostras hidrolisadas com Viscozyme® L, com e sem controle de pH. No entanto, nas amostras hidrolisadas com Celluclast®, com e sem controle de pH, ele foi detectado, mas em concentrações bem diferentes. Ele pode, provavelmente, ser constituinte da enzima em questão, uma vez que não foi detectado na amostra Branco (sem tratamento). Esses aminoácidos são responsáveis pelo sabor característico dos produtos fermentados derivados de soja como miso, koji e molho de soja (FUKUSHIMA, 1995; AGUIRRE; GARRO; DEGIORI, 2008).

Aminoácidos livres estão envolvidos nas características sensoriais, valor nutricional e bioatividade (YANG et al., 2011). Os aminoácidos essenciais comumente encontrados na soja são histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, e valina (WOLF, 1970; GRIESHOP; FAHEY, 2001, YANG et al., 2011) e quanto aos não essenciais aparecem a alanina, asparagina e cisteína, (WOLF, 1970; GRIESHOP; FAHEY, 2001; YANG et al., 2011). Desses, alguns não foram quantificados nos resíduos líquidos da extração do óleo, via

enzimática, porém, as concentrações encontradas de aminoácidos essenciais como valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, lisina conferem aos resíduos boa qualidade nutricional, assim como o encontrado por Yang et al. (2011) em hidrolisado protéico de molho de soja.

Um mesmo aminoácido apresentou diferentes concentrações entre as amostras. A alanina está em maior concentração nos resíduos do que na amostra Branco (sem tratamento), provavelmente por ser constituinte das enzimas utilizadas para hidrólise. No caso da valina, aminoácido essencial, sua concentração caiu a metade, nas hidrolisadas com Celluclast®, com e sem controle de pH, quando comparada a amostra Br, e não foi detectada nas amostras com Viscozyme® L.

Tabela 4 - Composição aminoacídica (em mg L⁻¹) dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja (*Glycine max*) sem solventes, nos diferentes sistemas utilizados.

Aminoácido	ACLpH	AVLpH	ACL	AVL	Br
	Média ± desvio padrão				
Alanina	18,32 ± 1,64	< LOQ	20,74 ± 1,49	19,93 ± 1,53	16,01 ± 1,79
Ácido glutâmico	11,76 ± 1,77	< LOQ	59,16 ± 1,57	< LOQ	< LOQ
Valina	28,80 ± 1,13	< LOQ	23,52 ± 1,36	< LOQ	51,42 ± 0,13
Metionina	27,38 ± 1,71	55,23 ± 0,52	22,46 ± 1,93	65,87 ± 0,06	62,60 ± 0,20
Lisina	47,75 ± 7,76	< LOQ	32,40 ± 4,58	50,82 ± 8,39	44,68 ± 7,12
Glicina	< LOQ	< LOQ	15,80 ± 0,78	21,59 ± 1,08	11,18 ± 0,53
Fenilalanina	< LOQ	< LOQ	18,95 ± 0,84	34,08 ± 0,09	16,68 ± 0,98
Isoleucina	< LOQ	53,55 ± 0,98	15,92 ± 0,65	< LOQ	< LOQ
Leucina	< LOQ	< LOQ	21,84 ± 0,93	< LOQ	< LOQ

Resultados são médias ± desvios padrões de três determinações (n=3).

ACLpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; AVLpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; ACL – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; AVL – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH. LOQ – Limite de Quantificação. Br – amostra branco (sem tratamento)

A lisina apareceu no perfil aminoacídico da maioria das amostras. Isso é um ponto interessante visto que ela é normalmente prejudicada na extração convencional, devido à ocorrência de reação de Maillard (DOMINGUEZ; NUNEZ; LEMA, 1995; ROSENTHAL; PYLE;

NIRANJAN, 1996). Segundo Wolf (1970) e Aguirre et al. (2008), a soja é deficiente em aminoácidos sulfurados como a metionina, por isso, há limitação da adição de proteína de soja para fins nutricionais, e não simplesmente pela funcionalidade. Neste trabalho, a metionina foi detectada em todas as amostras analisadas inclusive no Branco. A concentração de metionina encontrada foi duas vezes maior nas amostras hidrolisadas com Viscozyme® L e no Branco do que nas amostras com Celluclast®.

Na Figura 6 está apresentado o eletroferograma da amostra do resíduo líquido da extração do óleo Branco (sem tratamento) e na Figura 7, o dos resíduos resultantes da extração do óleo de soja via enzimática, nos diferentes sistemas enzimáticos.

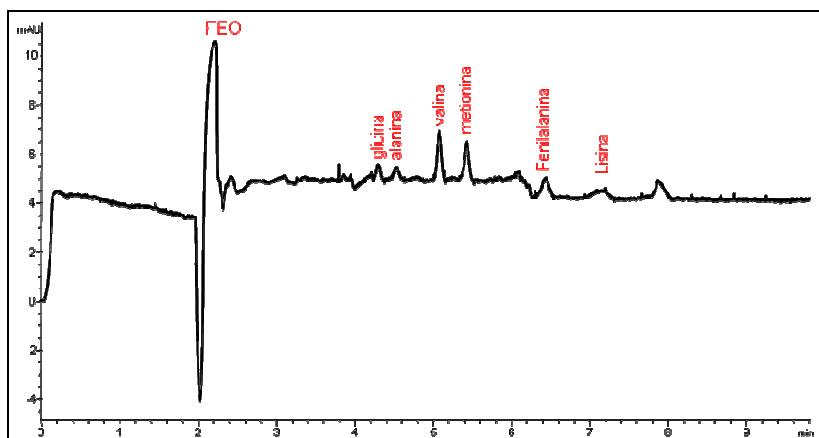


Figura 6 - Eletroferograma da amostra sem tratamento (Branco). Condições analíticas: eletrólito de corrida constituído de tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} e SDS 50 mmol L^{-1} , pH 9,0; capilar $39,5 \text{ cm L}_{\text{det}}$, $48,0 \text{ cm L}_{\text{tot}}$; $75 \mu\text{m D. I.}$; tensão aplicada $+23 \text{ kV}$; injeção hidrodinâmica 50 mbar/3 s , temperatura do capilar 25°C , detecção em 420 nm .

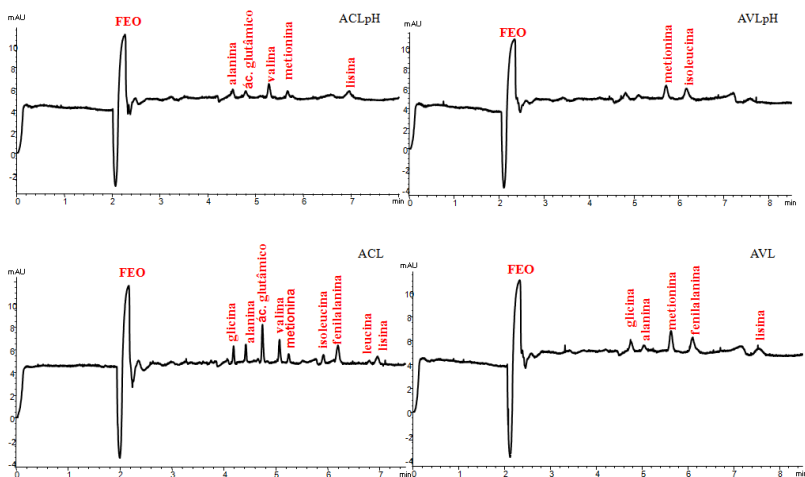


Figura 7 - Eletroforegramas dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja (*Glycine max*), via enzimática. ACLpH – Alcalase® e Celluclast® com controle de pH; AVLpH – Alcalase® e Viscozyme® L com controle de pH; ACL – Alcalase® e Celluclast® sem controle de pH; AVL – Alcalase® e Viscozyme® L sem controle de pH. Condições analíticas: idem Fig. 6.

A análise foi realizada com uma corrida de aproximadamente 7,5 minutos que possibilitou a separação de 12 aminoácidos.

Entre os aminoácidos mais encontrados na soja (WOLF, 1970; KARR-LILIENTHAL et al., 2005; AGUIRRE; GARRO; DE GIORI, 2008), o triptofano não foi detectado. Isso já era esperado, pois é normalmente destruído durante a hidrólise ácida com HCl, necessitando de outro método para detecção (BELITZ, 1999).

3.5 Perfil eletroforético

Na Figura 8A o SDS-PAGE revela que nos sistemas com controle de pH, independente das enzimas utilizadas, as proteínas foram quebradas em peptídeos de menores massas molares, as quais variaram de 10 até 37 kD.

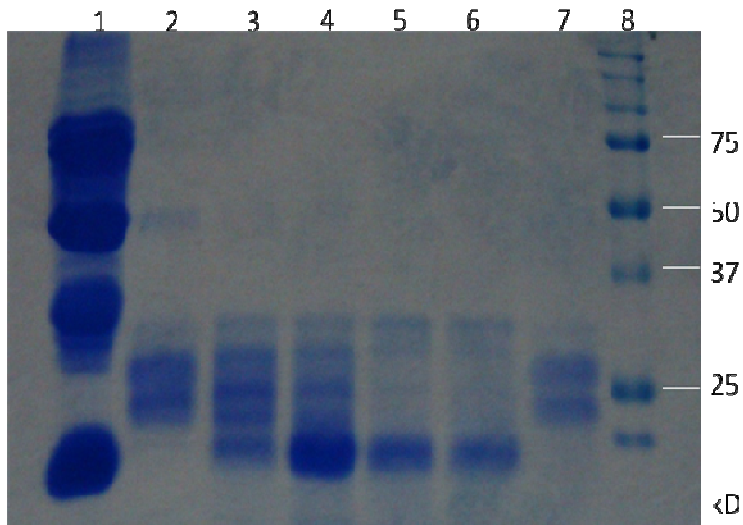


Figura 8A - Perfil em 12% SDS-PAGE de proteína total dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja, via enzimática com controle de pH, onde, a canaleta 8 corresponde ao padrão de peso molecular ; 5, 6, 7 as repetições da amostra ACLpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; 2, 3, 4 as repetições da amostra AVLpH – Alcalase® e Viscozyme L com controle do pH; linha 1 amostra branco (sem tratamento).

E, nos sistemas em que o pH não foi controlado (Figura 8B) também ocorreu a quebra das proteínas majoritárias da soja, porém, em tamanhos maiores do que a anterior. Os pesos moleculares dos peptídeos formados, sem considerar as enzimas utilizadas, apresentam-se maiores de que 25 kD.

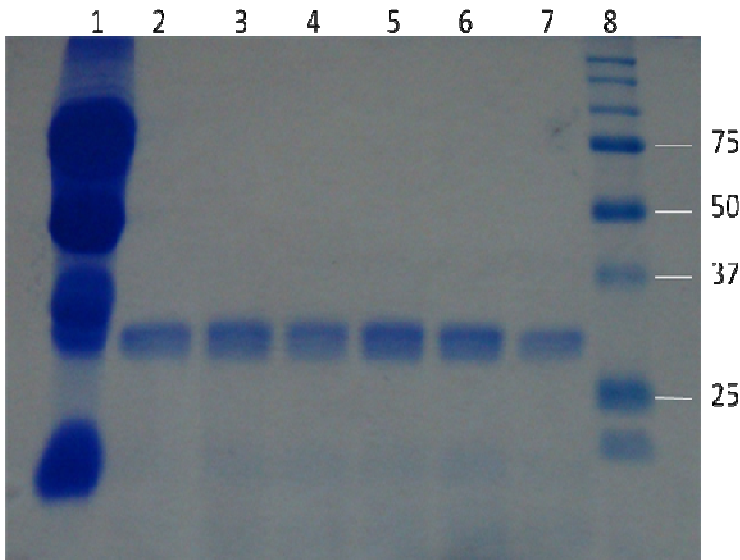


Figura 8B - Perfil em 12% SDS-PAGE de proteína total dos resíduos líquidos da extração do óleo de soja, via enzimática, sem controle de pH, onde, canaleta 8 corresponde ao padrão de peso molecular; 5, 6, 7 repetição da amostra ACL – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; 2, 3, 4 repetição da amostra AVL – Alcalase® e Viscozyme L sem controle do pH; linha 1 amostra branco (sem tratamento).

Na linha 1 de ambos géis (Figura 8A e B) encontra-se a amostra branco (sem tratamento). É possível visualizar as bandas referentes as frações α , α' , β da fração β -conglucina (11S), que possuem peso molecular de aproximadamente 80,000, 75,000 e 50,000 kD, respectivamente. As subunidades com peso molecular próximo a 36,000 kD são os polipeptídeos ácidos e próximo a 15,000 kD estão os componentes básicos da fração 11S (glicinina) (MUJOO; TRING; NG, 2003; LIU et al., 2007). A resolução dessa região não ficou clara o suficiente para detectar os vários componentes separadamente, pois a intensidade de coloração foi em geral mais baixa para as bandas de proteínas hidrolisadas, provavelmente resultado da coloração dos peptídeos menores (CHABRAND; GLATZ, 2009).

Nos sistemas em que não houve o controle de pH, percebe-se que os peptídeos formados são maiores de que no sistema onde o pH foi controlado. No gel da Figura 8B, os pesos moleculares dos peptídeos

variam entre 25 kD e 37 kD com menor variedade que no gel da Figura 8A. Com isso, é possível afirmar que as enzimas utilizadas nos sistemas para extração do óleo de soja, necessitam do pH ideal para atuação, visto que, no gel A, onde o pH do meio foi controlado, elas atuaram de uma maneira mais eficiente, confirmado pelos diferentes peptídeos formados.

4 CONCLUSÃO

Os resíduos líquidos resultantes da extração do óleo de soja, via enzimática, apresentaram características químicas e nutricionais interessantes que justificam futuros estudos para novos alimentos ou ingredientes. O pH influenciou significativamente na composição centesimal e no tamanho dos peptídeos formados. Nas hidrólises onde o pH foi controlado, houve formação de peptídeos de diferentes tamanhos, o que não foi visualizado para os tratamentos sem controle do pH.

A alta concentração protéica sugere futuros estudos destes materiais, especialmente quanto à segurança, a fim de utilizá-los como ingrediente para necessidades especiais. O aminoácido metionina, fator limitante para os produtos a base de soja, foi encontrado em todas as amostras analisadas.

5 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, L.; GARRO, M.; DE GIORI, G. S. Enzymatic hydrolysis of soy bean protein using lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 111, p. 976–982, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTIS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 18th ed. Gaithersburg, M.D, USA, 2005.

BELITZ, H. D. **Food Chemistry**, 2 ed, Springer: Germany, 1999.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and the other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, p. 27-41, 1989.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, p. 484-489, 1973.

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

BUENROSTRO, M.; LOPEZ-MUNGUÍA, C. A. Enzymatic Extraction of Avocado Oil. **Biotechnology Letters**, v. 8, p.505–506, 1986.

CHABRAND, R. M.; GLATZ, C. E. Destabilization of the emulsion formed during the enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybean flour. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 28-35, 2009.

DRI - DIETARY REFERENCE INTAKES. Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals, 2001.

DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; LEMA, J. M. Enzymatic Pretreatment to Enhance Oil Extraction from Fruits and Oilseeds: A Review. **Food Chemistry**, v. 49, p. 271–286, 1994.

DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; LEMA, J. M. Aqueous processing of sun flower kernels with enzymatic technology. **Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 427–434, 1995.

ERICKSON, D. R. Soybean oil: up date on number one. **Journal American Oil Chemistry Society**, n. 60, v. 2, p. 303A–8A, 1983.

FUKUSHIMA, D. Fermented vegetable protein and related foods of Japan and China. **Food Reviews International**, v. 1, p. 149–209, 1995.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY, G. C. Comparison of Quality Characteristics of Soybeans from Brasil, China, and the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2669–2673, 2001.

HAMADA, I. S.; MARSHALL, W. E. Preparation and functional properties of enzymatically deamidated soy proteins. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 598–635, 1989.

HARRIS, D. C. **Exploring Chemical Analysis**, 3 ed, 2004.

HSIEH, M-M.; CHEN, S-M. Determination of amino acids in tea leaves and beverages using capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection. **Talanta**, v.73, p. 326, 2007.

HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 87–95, 1998.

KASHYAP, M. C.; AGRAWAL, Y. C.; SARKAR, B. C.; SINGH, B. P. N. Response Surface Analysis of Enzyme Aided Extraction of Soybean. **Journal of Food Science and Technology**, v. 34, p. 386–390, 1997.

KARR-LILIENTHAL, L. K.; KADZERE, C. T.; GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR. G. C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock Production Science**, v. 97, p.1 –12, 2005.

KARLOVIC, D.; BOCEVSKA, M.; JAKOVLEVIC, J.; TURKULOV, J. Corn Germ Oil Extraction by a New Enzymatic Process. **Acta Aliment**, v. 23, p.389–400, 1994.

LAMSAL, B. P.; MURPHY, P. A.; JOHNSON, L. A. Flaking and extrusion as technical treatments for enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybeans. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 83, n. 11, p. 973–9, 2006.

LIU, C.; WANG, H.; CUI, Z.; HE, X.; WANG, X.; ZENG, X.; MA, H. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1310-1316, 2007.

LUSAS, E.W.; LAWHON, J. T.; RHEE, K. C. Producing edible oil and protein from oilseeds by aqueous processing. **Oil Mill Gazer**, v. 4, p. 28-34, 1982.

MCGLONE, O. C.; LOPEZ-MUNGUIA, C. A.; CARTER, J. V. Coconut Oil Extraction by a New Enzymatic Process. **Journal of Food Science**, v. 51, p. 695–697, 1986.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MUJOO, R.; TRINH, D. T.; NG, P. K. W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. **Food Chemistry**, v. 82, p. 265-273, 2003.

NAKAMURA, A.; FURUTA, H.; MAEDA, H.; NAGAMATSU, Y.; YOSHIMOTO, A. The structure of soluble soybean polysaccharide. **Hydrocolloids**, part 1, 2000.

NOVOZYMES. **Viscozyme food grade**, 2009.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Aqueous and Enzymatic Processes for Edible Oil Extraction. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 19, p. 402–420, 1996.

ROSENTHAL, A.; PYLEB, D. L.; NIRANJAN, K.; GILMOUR, S.; TRINCA, L. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 499–509, 2001.

PEÑA-RAMOS, A.; XIONG, Y. L.; ARTEGA, G. E. Fractionation and characterization for antioxidant of hydrolysed whey protein, **Journal of Science of Food Agriculture**, v.84, p. 1908-1918, 2004.

SARKER, B. C.; SINGH, B. P. N.; AGRAWAL, Y. C.; GUPTA, D. K. Optimization of Enzyme Pretreatment of Rapeseed for Enhanced Oil Recovery, **Journal of Food Science Technology**, v. 35, p. 183–186, 1998.

WATT, B.; MERRILL, A. L. Composition of foods: raw, processed, prepared. Maryland: US. Department of Agricultural, **Agricultural Research Service**, USDA Nutrient Data Laboratory, 1999.

WOLF, W. J. Soybean Proteins: Their Functional, Chemical, and Physical Properties. **Journal of Agriculture of Food Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 969-976, 1970.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. **Acetylation Methods Carbohydrats Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydrats Chemistry**, v. 2, p. 65-68, 1963b.

WU, J.; JOHNSON, L. A.; JUNG, S. Demulsification of oil rich emulsion from enzyme assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 527–533, 2009.

YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z.; JIANG, Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chemistry**, v.124, p. 551–555, 2011.

ZARKADAS, C. G.; GAGNON, C.; GLEDDIE, S.; KHANIZADEH, S.; COBER, E. R.; GUILLEMETTE, R. J. D. Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two- dimensional electrophoresis. **Food Research International**, v. 40, p. 129–146, 2007.

CAPÍTULO 3

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO RESÍDUO SÓLIDO E EFEITO DA EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO SOBRE A MICROESTRUTURA DA SOJA (*Glycine max*)

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar as alterações apresentadas pelos resíduos sólidos resultantes da extração do óleo de soja via enzimática. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de fluorescência possibilitaram observar as alterações na estrutura da soja entre os tratamentos. Também foram realizadas análises da composição centesimal, monossacarídica e a caracterização das propriedades físicas das fibras. Os resíduos sólidos foram obtidos da extração do óleo de soja via enzimática através de quatro sistemas enzimáticos (Alcalase®/Celluclast® e Alcalase®/Viscozyme® L) cada um em duas condições: com e sem controle de pH. O controle de pH possibilitou uma melhor extração do óleo, independente do sistema enzimático. Os teores de cinzas foram superiores nos sistemas submetidos ao controle de pH, em função das soluções tampões utilizadas. Os demais constituintes apresentaram valores semelhantes entre si. Os monossacarídeos com os maiores teores foram galactose seguido de glicose e arabinose. Na análise das propriedades físicas, os resíduos em estudo apresentaram boa capacidade de ligação ao óleo. A MEV revelou a organização dos constituintes do grão e da matéria prima, assim como as alterações sofridas após os procedimentos de extração.

Palavras-chaves: Caracterização química. Extração. Enzimas. *Glycine max*. Resíduos. Microscopia

CHEMICAL COMPOSITION OF SOLID WASTE AND EFFECT OF ENZYMATIC EXTRACTION OF OIL ON THE MICROSTRUCTURE OF SOYBEAN (*Glycine max*)

ABSTRACT

The objective of this paper was to evaluate changes presented by solid waste resulting from the extraction of soybean oil by enzymatic the analysis of scanning electron microscopy (SEM) and fluorescence enabled the evaluation of changes in the structure of soybean between treatments. Were also made analysis of chemical composition, monosaccharide and characterization of fibers and moisturizing properties. The solid waste were obtained from the extraction of soybean oil enzymatically through four enzyme systems (Alcalase®/Celluclast® and Alcalase®/Viscozyme® L) each on two conditions: with and without pH control. The pH control gave better extraction of oil, regardless of the enzyme system. The ash levels were higher in systems subjected to pH control, depending on the buffer solutions used. The others constituents presented similar values between each other. Monosaccharides with the highest levels of glucose were followed galactose and arabinose. In the analysis of physical characteristics, the waste in study showed good binding capacity of the oil. The SEM revealed the organization of the constituents of grain and raw materials, as well as the changes made after the extraction procedures.

Keywords: Microscopy. Chemical characterization. Extraction. Enzymes. *Glycine max*. Waste.

1 INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática de sementes de soja para obtenção do óleo é um processo que diminui a aplicação de solventes orgânicos, reduz o consumo de energia e fornece óleo de melhor qualidade e mais seguro para o consumo humano (SANTOS; FERRARI, 2005).

A maioria dos processos de extração aquosa utilizam enzimas para hidrolisar os polissacarídeos estruturais das sementes e as proteínas constituintes das membranas celulares dos corpos proteicos e lipídicos (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996; ROSENTHAL et al., 2001). A rigor, a escolha das enzimas ideais para hidrólise dos polissacarídeos estruturais só seria possível após o conhecimento da estrutura dos constituintes da parede celular. Entretanto, a parede celular da maioria das plantas superiores apresenta uma composição e arquitetura semelhantes. Independente do grupo botânico, a parede celular de vegetais superiores apresenta uma rede de microfibrilas de celulose interconectadas com hemiceluloses. Esta rede está embebida em uma matriz constituída por substâncias pécicas. Proteínas estruturais ou compostos fenólicos podem interagir com os polissacarídeos da rede. Por isso, é necessário preparações enzimáticas compostas de uma mistura de celulasas, hemicelulasas, pectinases e proteases capazes de atacar as paredes celulares (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996). Sineiro, Domínguez e Núñez (1998) afirmam que complexos enzimáticos com múltiplas atividades são mais eficientes do que as enzimas isoladas e, fatores como pH, temperatura, tamanho da partícula e agitação são importantes para o rendimento da extração (SANTOS; FERRARI, 2005). As enzimas proteolíticas atuam na rede citoplasmática que envolvem os vacúolos armazenadores de proteínas e lipídeos, e facilitam a retirada desses, da célula (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996). A desvantagem desse tipo de extração está na alta quantidade de enzima necessária para a hidrólise, normalmente superior a 1% em relação ao peso da matéria prima e, devido ao custo, limita o uso dessa tecnologia (SANTOS; FERRARI, 2005). Outra limitação está relacionada a dificuldade de evitar a emulsificação do óleo, citada em vários trabalhos (ROSENTHAL et al., 1998; CHABRAND et al., 2008; WU; JOHNSON; JUNG, 2009).

Os resíduos do processo industrial da extração de óleo de soja por solvente são amplamente explorados, sendo que muitos derivados da soja são obtidos tanto do farelo de soja desengordurado, quanto dos resíduos do refino. Por outro lado, da extração enzimática que ainda não corresponde à extração comercial, não existem estudos sobre os efeitos

da utilização de enzimas para a produção de óleo de soja, sobre a microestrutura da matéria prima. O objetivo deste estudo foi relacionar as alterações químicas e estruturais dos resíduos sólidos da extração do óleo de soja via enzimática utilizando diferentes sistemas de extração, visando contribuir para a definição de futuras aplicações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Grãos de soja expandidos foram doados pela empresa Bunge Alimentos, (Gaspar, Santa Catarina, Brasil), e as enzimas Alcalase® 2,4 L (2,4 UG/g), Celluclast® 1,5 L (700 EGU/g) e Viscozyme® L (100 FBG/g), pela empresa Tovani Benzaquen (São Paulo, Brasil), representante da Novozymes. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Métodos

2.2.1 Extração de óleo de soja e produção de resíduos do processamento

Os hidrolisados proteicos da soja foram obtidos por quatro sistemas enzimáticos. Primeiro: 200 g de soja expandida e 400 mL de solução tampão fosfato pH 8,0 foram adicionados da enzima proteolítica Alcalase® na concentração de 1% (m/m) e levados ao banho-maria a 60°C por 4 horas, com agitação lenta a cada hora. Após, o meio foi acidificado com HCl 0,1 mol/L até pH 4,5, e em seguida adicionado 200 mL de solução tampão citrato pH 4,5 juntamente com a enzima Celluclast®, na mesma concentração, e levado ao banho-maria a 60°C por 2 horas. Ao final, o pH do hidrolisado foi reduzido até aproximadamente 3,0 para inativação das enzimas, e centrifugado a 2 500 rpm por 25 min (centrífuga *Janetzki, modelo S60*). Houve a formação de três fases: líquida, sólida e oleosa. A fase líquida (ACLpH) e sólida (ACSpH) foram separadas, congeladas a -30°C e liofilizadas (liofilizador *Terroni, série LD*) e a fase oleosa foi descartada. O material foi acondicionado em embalagens de polipropileno, seladas a vácuo e mantidas a -18°C até o momento das análises.

Segundo sistema: a enzima Celluclast® foi substituída pela Viscozyme® L, utilizando o mesmo procedimento do primeiro sistema e obtenção das amostras da fase líquida (AVLpH) e sólida (AVSpH).

Terceiro e quarto sistemas: repetiu-se as enzimas utilizadas no primeiro e segundo sistema, porém não houve o controle do pH durante a hidrólise, para isso utilizou-se água destilada em substituição as soluções tampão e obtenção das amostras das fases líquidas (ACL) e (AVL) e das fases sólidas (ACS) e (AVS). Em todos os sistemas houve a inativação enzimática através do abaixamento do pH, com adição de HCl 0,1N.

Uma amostra branco (Br), sem tratamento, foi feita seguindo os mesmos procedimentos, porém sem a adição de enzimas.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Na Figura 1 encontra-se o esquema da obtenção das amostras.

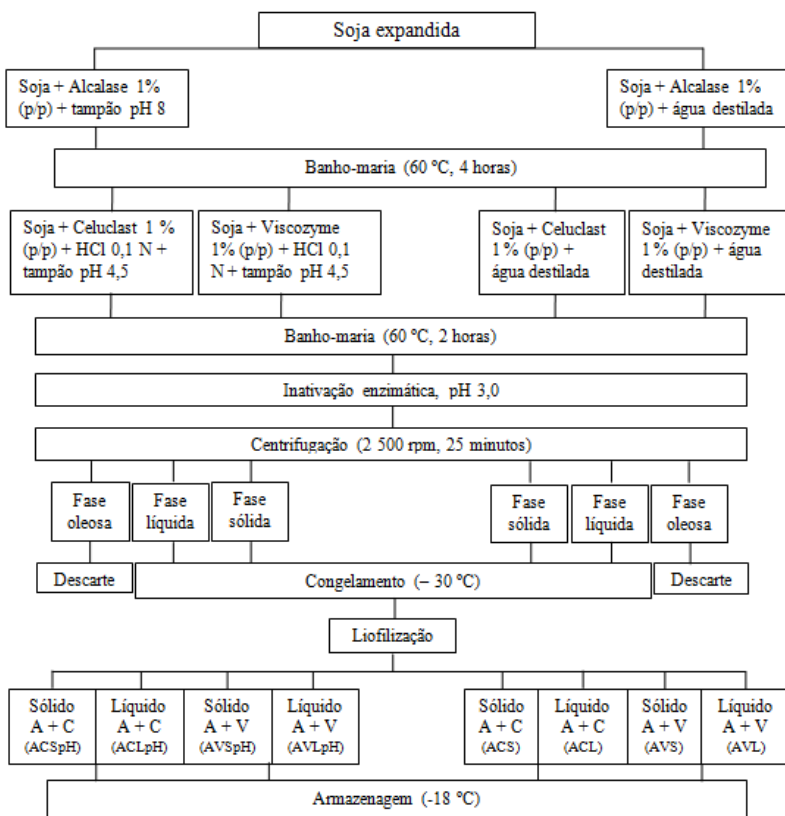


Figura 1 - Fluxograma da obtenção das amostras dos resíduos da extração do óleo de soja (*Glycine max*) com enzimas e sem utilização de solventes.

2.2.2 Composição centesimal

Os resíduos sólidos da extração do óleo de soja sem solventes, nos diferentes sistemas testados, foram analisados quanto ao teor de cinzas (AOAC 923.03), lipídeos totais (AOAC 920.85), nitrogênio total (AOAC 920.87) (N X 5,75) (AOAC, 2005), e conteúdo de fibras totais, solúveis e insolúveis pelo método enzimático gravimétrico (AACC, 1999), sendo os resultados expressos em g/100g (base peso seco). O valor energético (Kcal) foi obtido pela aplicação dos fatores de conversão 4, 9 e 4 para cada grama de proteína, lipídeo e carboidrato, respectivamente (WATT; MERRIL, 1999).

2.2.3 Análise monossacarídica

A determinação dos açúcares neutros das amostras dos resíduos sólidos foi feita por cromatografia líquido-gasosa (GLC), após derivatização a acetato de alditóis por hidrólise ácida.

Os resíduos sólidos foram hidrolisados com ácido sulfúrico 72% (m/m), durante 1 hora, em banho de gelo. A seguir foi adicionado ácido sulfúrico até diluição de 8%, a 100°C por 5 horas. Ao final da hidrólise, a amostra foi neutralizada com carbonato de bário e o sal resultante removido por filtração (BIERMANN, 1989). Após a hidrólise ácida total, os monossacarídeos foram solubilizados em água destilada e reduzidos pela adição de aproximadamente 10 mg de borohidreto de sódio por 16 horas a 4°C (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Posteriormente, foi adicionado resina catiônica fortemente ácida para remoção dos íons Na⁺. As soluções foram filtradas e o solvente evaporado a vácuo. Foi adicionado 1 mL de metanol para remoção do ácido bórico e o borato de metila formado foi evaporado a vácuo. Esse processo foi repetido três vezes. Os alditóis formados foram acetilados pela adição de 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina, em tubos vedados, permanecendo durante 12 horas à temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). A reação foi interrompida pela adição de gelo, a seguir foi procedida a extração dos acetatos de alditóis, através da adição de clorofórmio e posterior eliminação de piridina, em tratamentos sucessivos, com sulfato de cobre 5% e água destilada.

Os acetatos de alditóis resultantes foram submetidos a GLC utilizando um cromatógrafo gasoso Trace GC Ultra (*ThermoElectron Corporation*) equipado com uma coluna capilar DB-225 (0,25 mm x 30 m). As temperaturas do injetor e do detector por ionização de chama (FID) foram de 250 e 300°C, respectivamente. A temperatura do forno

foi programada de 100 a 215°C a uma taxa de aquecimento de 40°C/min. Hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL/min.

Os ácidos urônicos foram dosados pelo método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973). O ácido galacturônico foi utilizado como padrão nas concentrações de 10-100 µg/mL e leitura em 520 nm.

2.2.4 Avaliação das propriedades físicas

2.2.4.1 Capacidade de ligação de água e óleo no resíduo sólido da extração de óleo de soja via enzimática

A capacidade de ligação de água nos resíduos sólidos foi determinada em triplicata através do método proposto por Elkhalfa, Schiffler e Bernhardt (2005) onde 20 mL de água destilada foram adicionados a 2 g do resíduo sólido, em tubos Falcon de 50 mL, e deixados em repouso por 30 min/25°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (Hermle *modelo Z 200A*) a 4000 x g por 25 min.

Na determinação da capacidade de ligação de óleo, 20 mL de óleo de girassol foram adicionados a 2 g do resíduo sólido liofilizado em procedimento semelhante ao anterior. Os pesos da água ou do óleo foram determinados por diferença entre a água ou o óleo, removidos e retidos pelas amostras.

2.2.4.2 Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água foi avaliada, em triplicata, segundo método de Raghavendra et al. (2004) onde 1 g do resíduo sólido liofilizado foi hidratado com 30 mL de água destilada por 18 horas a temperatura de 25°C. O sobrenadante foi removido por filtração a vácuo. O resíduo da amostra foi seco a 105°C por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. A CRA foi determinada pela Equação 1.

$$\text{CRA (g/g)} = \frac{(\text{Peso do resíduo hidratado} - \text{Peso do resíduo seco})}{\text{Peso do resíduo seco}} \quad (1)$$

2.2.4.3 Capacidade de expansão (CE)

A capacidade de expansão (CE) foi determinada, em triplicata, de acordo com o método proposto por Robertson et al. (2000) onde 0,2 g de amostra liofilizada foi adicionada a aproximadamente 10 mL de água

destilada em um tubo de centrífuga e, mantida em hidratação, por 18 horas. O volume final foi medido para a determinação da CE e, calculado de acordo com a Equação 2.

$$\text{CE (mL/g)} = \frac{\text{Volume ocupado pela amostra}}{\text{Peso da amostra original}} \quad (2)$$

2.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O resíduo sólido liofilizado, a soja expandida e o grão de soja *in natura* foram desengordurados com éter etílico, em refluxo, por seis horas e, desidratados em estufa a 105°C por 3 horas. As amostras desidratadas foram fixadas com fita dupla-face, recobertas com ouro (350 Å de espessura) e submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio Jeol JSM-6390LV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.2.6 Microscopia de fluorescência

O grão de soja *in natura*, a soja expandida e os resíduos sólidos da extração do óleo de soja, via enzimática liofilizados foram submetidos à microscopia de fluorescência. Os materiais foram fixados com paraformaldeído 4% em solução tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0 por 24 horas, em seguida, desidratados em série etanólica (70-95%) e infiltrados em metacrilato (*Historessin, Leica*), de acordo com as recomendações do fabricante. A microscopia de fluorescência foi realizada no Laboratório de Microscopia de Fluorescência do BEG (FluorBEG) – UFSC, utilizando um microscópio Olympus (modelo *BX41*) equipado com epifluorescência e filtros azul, vermelho, verde e triplo. Sistema de captura de imagem digital colorida com 3,3 mpixel QColor 3C da Q-imaging. Foram utilizados fluorocromos específicos para cada estrutura analisada, 1-Anilino-8-naftaleno ácido sulfúrico (ANS) em solução aquosa 0,001% para proteína, azul de nilo em solução aquosa 0,01%, por 60 s, para óleo e laranja de acridina 0,02% em tampão fosfato pH 7,0 por 5 min, para polissacarídeos (DE FRANCISCO, 1989).

2.2.7 Análise Estatística

Os resultados deste experimento foram obtidos a partir de quatro sistemas, tendo como variáveis o pH (com e sem controle) e sistema enzimático (Alcalase®/Celluclast® e Alcalase®/Viscozyme® L).

As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância e, testes de comparação de médias, quando necessário.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração do óleo de soja

Os rendimentos em óleo obtidos com os diferentes sistemas enzimáticos encontram-se na Tabela 1. O sistema enzimático Alcalase®/Celluclast®, com controle do pH (ACSpH), possibilitou uma extração de 26,77% do total de óleo existente na matéria prima (soja expandida). A concentração de óleo presente na matéria prima utilizada para extração é de 25,06%, valor maior do que os citados na literatura (SANTOS; FERRARI, 2005; SILVA et al., 2006; PATIL et al. 2007). No sistema Alcalase®/Viscozyme® L, com controle do pH (AVSpH), a extração foi similar ao sistema com Celluclast®, pois foi extraído 26,49% do total de óleo presente na amostra. Nas extrações feitas com os mesmos sistemas enzimáticos, porém sem controle do pH (ACS, AVS), a percentagem de óleo extraída foi de 16,52 e 20,27%, respectivamente em relação ao total presente na amostra (25,06%). Houve uma perda no rendimento, no entanto não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. O rendimento da extração de óleo de soja varia de 65 a 75%, na extração aquosa, enquanto que o rendimento com solventes é de 95% (ROSENTHAL; PYLE; NIRANJAN, 1996), o que confirma a necessidade da utilização do pH ideal para a atuação de enzimas proteases e carbohidrases.

Tabela 1 - Rendimento de extração de óleo de soja (*Glycine max*) com a utilização dos diferentes sistemas enzimáticos.

Sistema enzimático	Rendimento de extração (%)
ACpH	26,77 ± 2,50 ^a
AVpH	26,49 ± 2,53 ^a
AC	16,52 ± 0,60 ^a
AV	20,27 ± 1,10 ^a

* Valores médios na mesma coluna seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). ACpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; AVpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; AC – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; AV – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH.

A utilização de um complexo multi-enzimático (Viscozyme® L) ao invés de uma única enzima deveria fornecer melhores resultados tendo em vista as características desuniformes das paredes celulares (SANTOS; FERRARI, 2005), no entanto, no presente trabalho isso não foi confirmado. O rendimento obtido na extração utilizando a enzima Viscozyme® L não foi superior. A Viscozyme® L apresenta atividade enzimática principal de glucanase e atividades secundárias de celulase e hemicelulase. Tendo em vista o caráter heterogêneo dos componentes das paredes celulares enzimas com diferentes especificidades podem ser requeridas para uma degradação mais efetiva dos polissacarídeos e consequente aumento no rendimento da extração do óleo.

3.2 Composição Centesimal

Os resíduos sólidos provenientes dos tratamentos com Alcalase seguido de Celluclast ou Viscozyme® L com controle de pH foram identificados como ACSpH e AVSpH, respectivamente. Os mesmos tratamentos, porém sem controle de pH, originaram as frações nomeadas como ACS e AVS, respectivamente. A composição centesimal e o valor calórico dos resíduos sólidos da extração do óleo de soja via enzimática, nos diferentes sistemas estudados estão apresentados na Tabela 2. Nos sistemas ACSpH e AVSpH, os teores de proteínas foram menores do que os encontrados em ACS e AVS. No entanto, em todos os resíduos a concentração protéica foi inferior ao encontrado por Silva et al. (2006) para resíduo de soja de extração convencional (por solvente) (46,7%) e por Garcia et al. (1998) para farinha de soja (46%) e proteína texturizada

de soja (47%). De acordo com Silva et al. (2006), o resíduo da extração convencional possui 5,20% de cinzas, 1,76% de lipídeos, 4,97% de fibras totais, 33,10% de carboidratos e 334,10 kcal/100g de valor calórico, todos inferiores aos encontrados nos resíduos dos diferentes sistemas enzimáticos utilizados para extração do óleo, com exceção dos valores de cinzas para os sistemas ACS e AVS que foram inferiores (4,86 e 5,01 respectivamente).

Os carboidratos dos resíduos resultantes da hidrólise com Viscozyme® L (AVSpH e AVS) não apresentaram diferenças estatísticas comparados as amostras hidrolisadas com Celluclast® (ACSpH e ACS). Esses valores estão em conformidade com Karr-Lilienthal et al. (2005) que analisaram a composição de carboidratos na soja (35%). Os valores encontrados para conteúdo energético foi alto e está relacionado com a elevada concentração lipídica praticamente igual ao teor verificado na matéria prima (soja expandida) ($25,03 \pm 0,52$ g/100g). Isso é devido à reduzida eficiência do processo, uma vez que grande parte do óleo emulsifica devido à presença de fosfolipídeos e poderosos emulsificantes, como a lecitina. A análise da pureza do óleo de soja obtido da extração enzimática resultou em produto isento de fosfolipídeos, o que não ocorre no óleo obtido por prensagem, que embora tenha maior rendimento em óleo há ocorrência dos mesmos (SOYLIFE, 2010). Assim, provavelmente, os fosfolipídeos da matéria prima ficam nos resíduos sólidos e líquidos do processo de extração enzimática, o que pode justificar a emulsificação de parte do óleo, comprometendo a sua extração. Este fato deve sustentar futuros estudos para a desemulsificação, contribuindo para o aumento do rendimento da extração de óleo via enzimática.

Os teores de cinzas nos sistemas com controle de pH foram significativamente superiores provavelmente devido a utilização de soluções tampão durante o processo de hidrólise.

Os resíduos sólidos da extração do óleo, nos diferentes sistemas, apresentaram teores de fibras solúveis e insolúveis inferiores ao encontrado no grão de soja (3,5% e 20,86%, respectivamente) e no *okara* (subproduto da produção de leite de soja e tofu) 4,71% e 50,77%, respectivamente (REDONDO-CUENCA; VILLANUEVA-SUÁREZ; MATEOS-APARICIO, 2008).

Tabela 2 - Composição centesimal e valor calórico dos resíduos sólidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*) via enzimática, nos diferentes sistemas.

Composição g.(100g) ⁻¹	ACSpH	AVSpH	ACS	AVS
	Média ± desvio padrão			
Cinzas	7,93 ± 1,39 ^a	7,50 ± 2,01 ^a	4,86 ± 0,92 ^b	5,01 ± 0,17 ^b
Lipídeos	22,51 ± 3,21 ^a	23,41 ± 1,81 ^a	22,61 ± 3,22 ^a	23,80 ± 1,35 ^a
Proteínas	31,24 ± 4,13 ^a	32,34 ± 2,21 ^a	36,43 ± 1,30 ^b	35,09 ± 1,19 ^b
Fibras solúveis	0,54 ± 0,24 ^b	1,17 ± 0,30 ^b	2,87 ± 0,96 ^a	1,03 ± 0,05 ^b
Fibras insolúveis	10,47 ± 1,08 ^{a,b}	12,73 ± 0,57 ^a	10,45 ± 1,50 ^{a,b}	9,17 ± 0,7 ^b
Fibras totais	10,82 ± 0,81 ^b	13,91 ± 0,34 ^a	13,32 ± 1,22 ^a	10,20 ± 0,74 ^b
Carboidratos*	27,49 ± 3,44 ^a	22,85 ± 0,98 ^a	22,78 ± 1,81 ^a	25,88 ± 0,41 ^a
Valor calórico (kcal/100g)	370,03 ± 9,20 ^c	361,17 ± 7,88 ^b	372,50 ± 3,39 ^b	386,74 ± 4,12 ^a

Valores médios na mesma linha seguido de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Resultados são médias ± desvios padrões de três determinações ($n=3$). * Calculados por diferença. ACSpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; AVSpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; ACS – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; AVS – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH.

Os valores de fibras solúveis variam de $0,54 \pm 0,24$ (ACSpH) até $2,87 \pm 0,96$ g/100g (ACS), e podem ser comparados à farinha de trigo ($1,61 \pm 0,01$ g/100g) e ao sorgo ($1,42 \pm 0,01$ g/100g) (RAGAE; ABDEL-AAL; NOAMAN, 2006). No entanto, para ser considerada boa fonte de fibras solúveis, devem possuir níveis de aproximadamente $2,56 \pm 0,03$ g/100g como encontrado na cevada (RAGAE; ABDEL-AAL; NOAMAN, 2006), valor encontrado na amostra ACS.

Os teores de fibras insolúveis variaram de $9,17 \pm 0,7$ g/100g (AVS) a $12,73 \pm 0,57$ g/100g (AVSpH), e nas amostras onde o pH foi controlado, foram verificados os maiores índices. Em farinhas de grãos integrais esses valores variam de $13,50 \pm 0,32$ g/100g para farinha de milho até $22,07 \pm 0,41$ g/100g na farinha de cevada. No entanto, as farinhas de trigo durum e mole apresentam valores de fibras insolúveis de respectivamente $2,98 \pm 0,01$ g/100g e $1,87 \pm 0,01$ g/100g (RAGAE; ABDEL-AAL; NOAMAN, 2006) inferiores aos observados nas amostras em estudo.

Na análise de fibras totais, as amostras AVSpH e ACS apresentaram os maiores valores. A recomendação de ingestão diária

média de fibras totais para um homem adulto é de 38g/dia e mulher adulta 25g/dia, segundo a *Dietary Reference Intakes* (DRI, 2001). O resíduo sólido em estudo apresenta uma média de 12g/100g de fibras totais além de boa qualidade química nutricional como fonte de carboidratos (> 30%), minerais (> 4%) e proteínas (> 30%). No entanto, embora elevado, o teor de proteína, determinado como nitrogênio total, necessita ser investigado quanto à natureza dos aminoácidos presentes, visando uma melhor indicação destes resíduos.

3.3 Composição monossacarídica

A contribuição da hidrólise dos carboidratos da soja, facilitando a liberação do óleo pode ser considerada mais eficiente para os sistemas onde houve o controle do pH, independente do sistema enzimático utilizado.

A soja contém 35% de carboidratos totais divididos em estruturais e não estruturais. Os não estruturais são formados por oligossacarídeos e amido e compreendem aproximadamente a metade dos carboidratos da soja. A outra metade é formada pelos carboidratos estruturais, que são constituintes da parede celular representados pela celulose, hemicelulose e pectina (KARR-LILIETHAL et al., 2005). O efeito da extração enzimática sobre esta estrutura pode ser acompanhado pela caracterização dos teores de monossacarídeos e ácidos urônicos nos resíduos sólidos (Tabela 3).

Os polissacarídeos totais não amiláceos são a soma dos insolúveis e solúveis (KARR-LILIETHAL et al., 2005). Estes últimos seriam solubilizados juntamente com os carboidratos não estruturais durante o tratamento enzimático e estariam presentes nos resíduos líquidos. Em um estudo comparativo usando cotilédones de fava, ervilha e soja Brillouet e Carre (1983) observaram que durante o tratamento enzimático prévio para isolamento da parede celular, a maior solubilização de polissacarídeos ocorreu na soja. O conteúdo de polissacarídeos solubilizados a partir da soja durante o tratamento enzimático foi cerca de cinco vezes superior ao observado para a fava. O principal constituinte dos resíduos sólidos foi a galactose (36,3 - 40,0%), seguida da glicose (29,2 - 31,4%), arabinose (13,2 - 14,0%) e xilose (6,4 - 7,6%). Manose, ramnose, fucose e ácidos urônicos foram encontrados em menores quantidades. Os teores de ramnose, fucose, arabinose, xilose, galactose e glicose encontrados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 3 - Composição monossacarídica dos resíduos sólidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*), via enzimática.

Monossacarídeo	ACSpH	AVSpH	ACS	AVS
	Mol %			
Ramnose	2,35 ± 0,21 ^a	2,40 ± 0,28 ^a	2,25 ± 0,35 ^a	2,50 ± 0,14 ^a
Fucose	1,75 ± 0,07 ^a	1,45 ± 0,49 ^a	1,65 ± 0,35 ^a	1,85 ± 0,21 ^a
Arabinose	14,05 ± 0,63 ^a	13,60 ± 0,70 ^a	13,25 ± 0,35 ^a	14,00 ± 0,28 ^a
Xilose	7,10 ± 0,99 ^a	6,45 ± 1,06 ^a	7,60 ± 1,98 ^a	6,55 ± 1,06 ^a
Manose	4,95 ± 0,21 ^b	5,35 ± 0,07 ^{a,b}	6,60 ± 0,56 ^a	4,95 ± 0,49 ^b
Galactose	39,10 ± 2,68 ^a	40,00 ± 0,99 ^a	36,30 ± 1,27 ^a	39,40 ± 0,85 ^a
Glicose	29,25 ± 0,49 ^a	29,50 ± 1,70 ^a	31,35 ± 0,21 ^a	29,65 ± 0,35 ^a
Ácido urônico	1,45 ± 0,07 ^a	1,25 ± 0,07 ^{a,b}	1,00 ± 0,00 ^{b,c}	1,10 ± 0,00 ^c

Valores médios na mesma linha seguido de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Resultados são médias \pm desvios padrões de três determinações ($n=3$). ACSpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; AVSpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; ACS – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; AVS – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH.

Brillouet e Carre (1983) também encontraram a galactose como principal componente da parede celular dos cotilédones da soja. Outros monossacarídeos encontrados em altos percentuais pelos mesmos autores foram arabinose, glicose e ácidos urônicos. No presente trabalho, arabinose e glicose também foram encontrados em altas quantidades nos resíduos sólidos provenientes dos tratamentos enzimáticos. Entretanto, os teores de ácidos urônicos foram baixos, indicando que os principais polissacarídeos ácidos, as pectinas, foram solubilizadas nas condições experimentais e/ou degradadas pelas enzimas utilizadas nos tratamentos.

Ouhida et al. (2002) também observaram que os principais constituintes da farinha de soja eram a glicose, galactose e arabinose. Quando estes autores analisaram o tegumento e o endosperma isoladamente, verificaram que os mesmos monossacarídeos eram os componentes da fração polissacarídica que não era extraída com água. O resíduo da extração aquosa dos cotilédones era composto por 30% de galactose, 28% de glicose e 13% de arabinose. Huisman et al. (1998) avaliaram a composição da fração polissacarídica insolúvel em água proveniente da farinha de soja e os principais monossacarídeos

encontrados foram: galactose (29%), glicose (21%), arabinose (19%) e xilose (8%). Estes valores se assemelham aos valores encontrados no presente trabalho para os resíduos sólidos dos tratamentos enzimáticos sugerindo que a maior parte dos polissacarídeos remanescentes nos resíduos é proveniente dos cotilédones.

De acordo com Ouhida et al. (2002), a fração polissacarídica do tegumento da soja que não é extraída com água contém glicose como componente majoritário (66%), seguido de xilose (13%). Assim, a presença de até 8% de xilose nos resíduos sólidos dos tratamentos enzimáticos pode ser atribuída a presença de xilanas provenientes do tegumento. Segundo a literatura, o tegumento das sementes de soja contém xilanas não ramificadas e arabinoxilanas (OUHIDA et al., 2002). Embora a Viscozyme® L apresente atividade secundária de xilanase, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Isto se deve provavelmente a associação das xilanas de parede secundária a lignina e celulose dificultando o acesso da enzima ao seu substrato.

3.4 Caracterização das fibras do resíduo sólido da extração do óleo de soja via enzimática

As propriedades de hidratação determinam os níveis ideais de utilização de fibras em alimentos para obtenção da textura desejável. As propriedades de hidratação podem ser medidas através de capacidade de retenção de água, capacidade de ligação de água, expansão e solubilidade (THEBAUDIN et al., 1997).

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da avaliação das características físicas dos resíduos sólidos obtidos a partir da extração do óleo de soja sem solvente.

A capacidade de ligação com a água é definida como a quantidade de água retida pela estrutura da fibra após a aplicação de forças externas, como pressão ou centrifugação (THEBAUDIN et al., 1997; ELKHALIFA; SCHIFFLER; BERNHARDT, 2005). A origem das fibras e o tamanho de sua partícula afetam essa característica (THEBAUDIN et al., 1997). A amostra ACSpH apresentou capacidade de ligação com a água significativamente menor do que as demais amostras. Embora não tenha sido detectada diferença significativa entre as amostras AVSpH, ACS e AVS, a amostra AVSpH também apresentou menor ligação com água. Portanto, o controle de pH influenciou na capacidade de ligação com água.

Tabela 4 - Características físicas dos resíduos sólidos obtidos na extração do óleo de soja (*Glycine max*) sem solvente, em diferentes sistemas enzimáticos.

Característica	ACSpH	AVSpH	ACS	AVS
Ligação a água (%)	1,76 ± 0,38 ^b	3,41 ± 0,47 ^a	3,74 ± 0,41 ^a	3,76 ± 0,67 ^a
Ligação ao óleo (%)	6,55 ± 0,40 ^a	6,42 ± 0,42 ^a	5,52 ± 0,88 ^b	5,42 ± 0,95 ^b
Expansão (%)	44,6 ± 1,51 ^a	47,89 ± 0,95 ^b	45,45 ± 0,64 ^a	47,85 ± 1,28 ^b
Retenção de água (%)	5,97 ± 2,49 ^a	9,30 ± 3,25 ^a	7,34 ± 1,11 ^a	8,99 ± 0,28 ^a

Valores médios na mesma linha seguido de letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Resultados são médias ± desvios padrões de três determinações ($n=3$). ACSpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; AVSpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; ACS – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; AVS – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH.

A capacidade de ligação ao óleo é uma característica importante na formulação de alimentos (ELKHALIFA; SCHIFFLER; BERNHARDT, 2005), pois as fibras insolúveis são capazes de reter até cinco vezes sua massa em óleo. Característica tecnologicamente explorada por aumentar a retenção de calor e rendimento tecnológico (THEBAUDIN et al., 1997). Nas amostras com controle de pH (ACSpH e AVSpH) foram observados maiores teores de fibras insolúveis e conseqüentemente, ligação ao óleo significativamente superior. Nos sistemas com controle de pH houve uma maior extração do óleo, porém, devido a baixa eficiência do processo o óleo extraído não foi totalmente separado e ficou retido nos resíduos sólidos. Nas amostras ACS e AVS foi observada uma menor tendência de ligação ao óleo.

A capacidade de expansão é a medida do volume de uma massa de fibras quando obtido o equilíbrio pelo excesso de solvente, geralmente a água (THEBAUDIN et al., 1997). Essa característica está relacionada com as fibras insolúveis devido à capacidade de ligação com a água e inchamento, elas influenciam na textura dos alimentos (THEBAUDIN et al., 1997, KARR-LILIENTHAL et al., 2005). Os resíduos da extração com a enzima Viscozyme® L, com e sem controle do pH, apresentaram resultados estatisticamente superiores, gerando produtos com maior expansão. Isso também é comprovado pela maior retenção de água nestes dois sistemas.

A capacidade de retenção de água não apresentou diferença estatística entre os resíduos analisados. Ela é a quantidade de água retida

pela estrutura da fibra sem a aplicação de forças externas, exceto a força gravitacional e pressão atmosférica (THEBAUDIN et al., 1997; RAGHAVENDRA et al., 2004). É medida através da quantidade de água absorvida nos poros da amostra por ação capilar ou por tensão de vapor (THEBAUDIN et al., 1997).

Raghavendra et al. (2004) apresentaram resultados de caracterização de fibra de coco após extração do óleo por solvente. Essas fibras apresentaram melhores resultados de retenção de água, ligação com a água e expansão quando comparado com outras fibras dietéticas, como farelo de soja, aveia e cevada. A extração do óleo com solvente fez reduzir a concentração de óleo em 2%, e isso contribuiu para melhorar as capacidades de hidratação. Nesse contexto, as propriedades de hidratação dos resíduos sólidos estudados nesse trabalho não apresentaram bons resultados, provavelmente devido a presença de óleo residual. No entanto, com os resultados obtidos, eles podem ser aplicados na formulação de alimentos, devido, dentre outras razões, à capacidade de ligação ao óleo, importante característica tecnológica que influencia no rendimento e no sabor.

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura e Fluorescência

As técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência foram utilizadas para observar as alterações ocorridas na microestrutura da soja em função dos diferentes tratamentos utilizados para extração do óleo via enzimática.

O grão de soja *in natura*, expandido e os resíduos sólidos resultantes da hidrólise enzimática desengordurados foram analisados com microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Figura 2 A, em menor resolução, é possível observar as paredes celulares e os corpos protéicos dos grãos de soja *in natura*, onde são estocadas as proteínas. As mesmas organelas são visualizadas, em maior resolução, na Figura 2B e 2C. Além dos corpos protéicos, os esferosomos estão visíveis, organela responsável pelo armazenamento de lipídeos na soja. Na Figura 2D e 2E (soja expandida) observa-se que o processo de expansão provoca um inchamento dos grânulos protéicos e o rompimento de algumas paredes celulares, o que facilita o acesso às organelas, seja para uma extração convencional ou para a extração aquosa e enzimática. Na Figura 2F, é possível visualizar as depressões resultantes do depósito dos esferosomos, antes da ruptura pela expansão (WOLFER; BAKER, 1975).

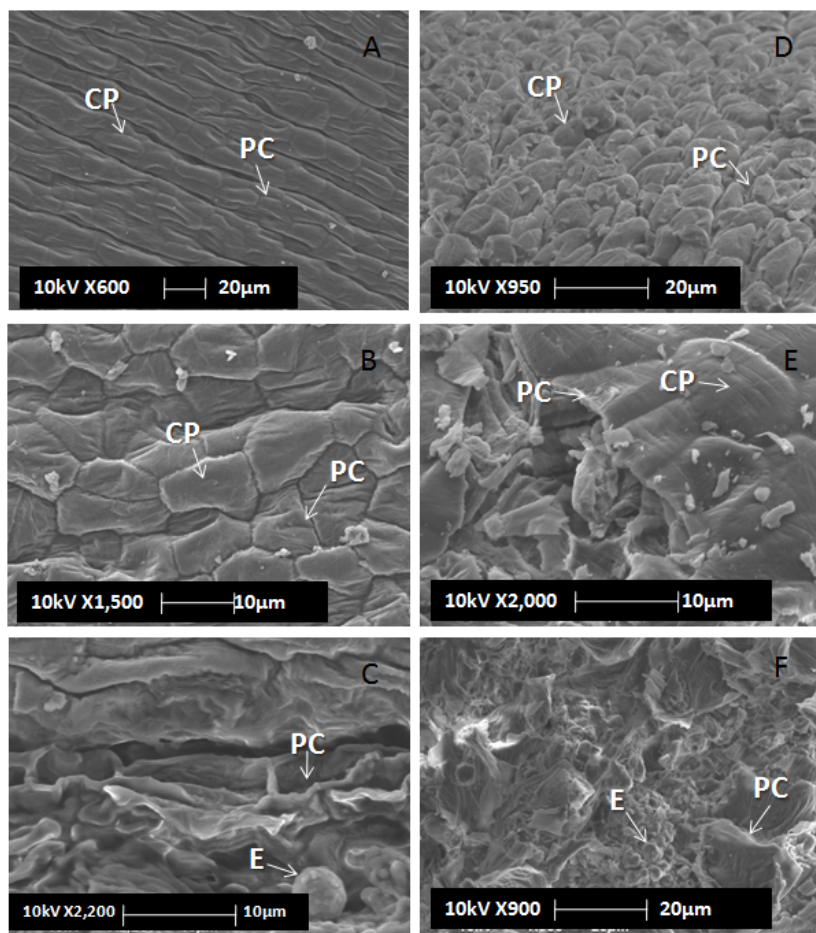


Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura do grão de soja *in natura* (A, B, C) e grão de soja expandido (D, E, F). (CP – corpo protéico; PC – parede celular; E – esferossomo).

A Figura 3 apresenta as micrografias dos resíduos sólidos. A hidrólise com Alcalase® e Celluclast®, com controle de pH (Figura 3A) e sem controle de pH (Figura 3C) provocou a quebra das paredes celulares pela ação da celulase. A hidrólise da celulose resulta em perda da arquitetura da parede celular, onde as hemiceluloses encontram-se fortemente associadas às cadeias de celulose por ligações de hidrogênio. Entretanto, o efeito do tratamento com Alcalse e Celluclast foi mais

discreto do que os observados na Figura 3B e 3D onde foi utilizado Viscozyme® L, com e sem controle do pH, respectivamente. Os resultados indicam que as misturas de enzimas e complexos com atividade múltipla são mais eficientes para a degradação da parede celular do que as enzimas isoladas. As diferenças observadas nas condições, com e sem controle de pH, comprovam a necessidade de manter as condições ideais de pH para a melhor eficiência do processo (SANTOS; FERRARI, 2005).

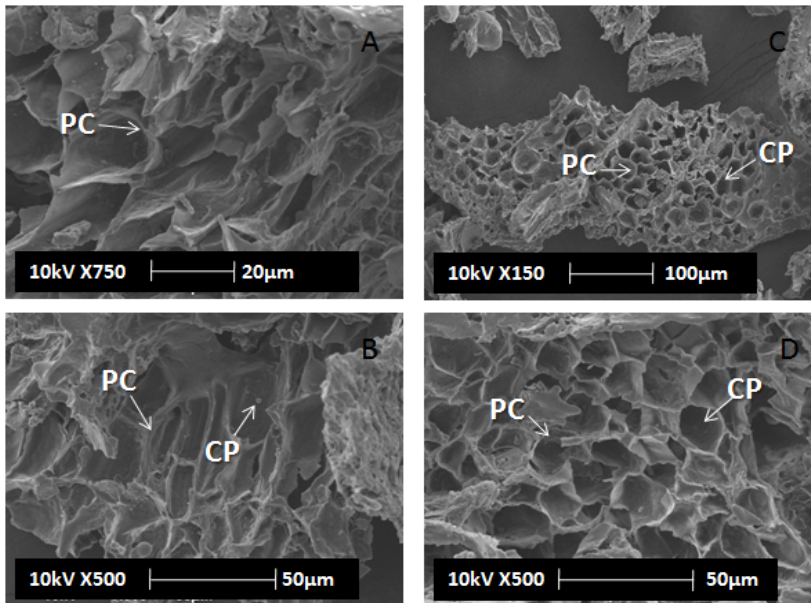


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura dos resíduos sólidos após extração do óleo via enzimática. A - ACSpH – Alcalase® e Celluclast® com controle do pH; B - AVSpH – Alcalase® e Viscozyme com controle do pH; C - ACS – Alcalase® e Celluclast® sem controle do pH; D - AVS – Alcalase® e Viscozyme sem controle do pH. (CP – corpo proteico; PC – parede celular; E – esferossomo).

A MEV revela alguns detalhes da organização dos vacúolos de reserva lipídica e protéica do grão de soja *in natura* e expandido. Mas, a microscopia de fluorescência possibilita uma melhor visualização das organelas (Figura 4, 5, 6) assim como o dano causado pelas enzimas utilizadas para extração do óleo (Figura 7, 8, 9).

O ANS, fluorocromo específico para proteínas de reserva, possibilita a análise da organização dos vacúolos protéicos no grão *in natura* (Figura 4A) e também na soja expandida (Figura 4B), matéria prima utilizada para extração do óleo, tanto no modo convencional (por solventes) como no sistema enzimático. É possível verificar que após o tratamento físico de expansão, as organelas protéicas ficaram desorganizadas o que facilita a extração do óleo e das proteínas.

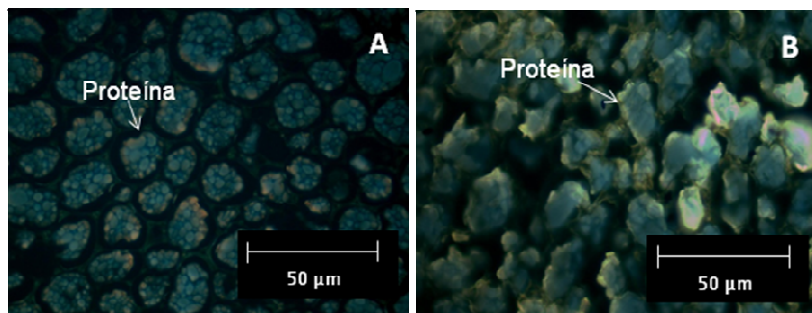


Figura 4 - Microscopia de fluorescência dos grãos *in natura* (A) e soja expandida (B) para visualização das organelas protéicas, corados com ANS, utilizando filtro azul e aumento de 40X. (A – grão de soja *in natura*; B - soja expandida).

Na Figura 5A e 5B, é possível verificar as diferenças entre os vacúolos lipídicos do grão de soja *in natura* e da soja expandida. O azul de nilo permite a visualização de lipídeos após o processo de expansão. Percebe-se o rompimento de algumas organelas lipídicas e o óleo disperso, portanto, mais disponível à extração. Estas diferenças também podem ser percebidas na Figura 6A e 6B, onde o marcador laranja de acridina foi usado para corar polissacarídeos estruturais.

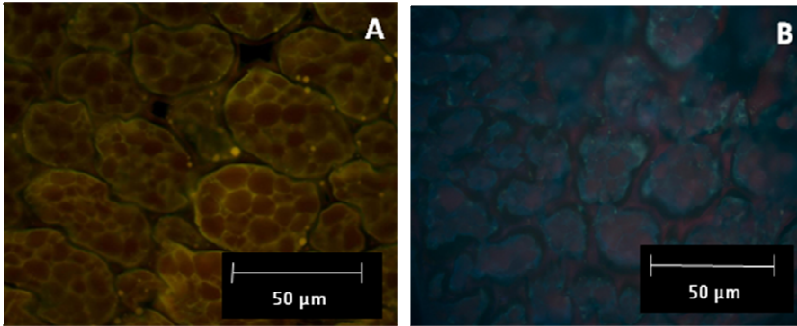


Figura 5 - Micrografia de fluorescência do grão de soja *in natura* (filtro verde) e soja expandida (filtro azul) corados com azul de nilo, utilizando aumento de 40X para visualização da organela lipídica. (A – grão *in natura*; B – soja expandida).

Na Figura 6A as paredes celulares e os componentes estruturais, corados de alaranjado, estão íntegros e é possível visualizar o amido (verde fluorescente) dentro das organelas celulares. Após o processo de expansão, Figura 6B, as paredes celulares foram danificadas e ficaram desorganizadas.

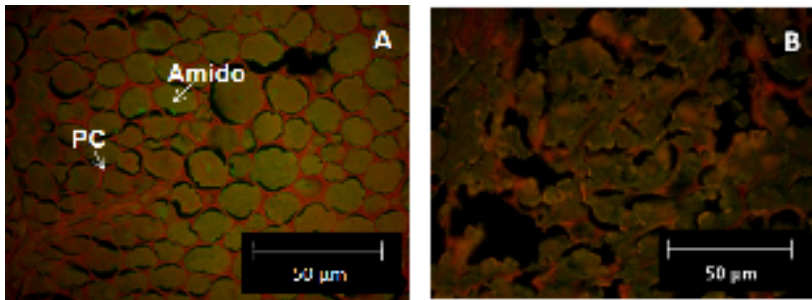


Figura 6 - Micrografia de fluorescência do grão *in natura* e soja expandida para visualização dos polissacarídeos estruturais, utilizando filtro verde e aumento de 40X. (A – grão *in natura*; B – soja expandida).

Os diferentes tratamentos utilizados para extração do óleo de soja via enzimática responderam de diferentes maneiras, quanto ao percentual de óleo extraído e sobre as características dos resíduos gerados. O ANS (Figura 7) mostrou a ação da enzima Alcalase®,

utilizada em todos os sistemas, sobre as membranas protéicas. Apesar do controle do pH ser um fator importante para a atuação enzimática e, conseqüentemente, para melhor extração do óleo, nas Figura 7C e 7D, sem controle de pH, é possível visualizar uma maior quebra das membranas protéicas circundantes dos vacúolos armazenadores de proteínas assim como das de reserva do que nas Figuras 7A e 7B. Isso justifica a maior concentração protéica encontrada nos resíduos líquidos resultantes da extração sem controle de pH.

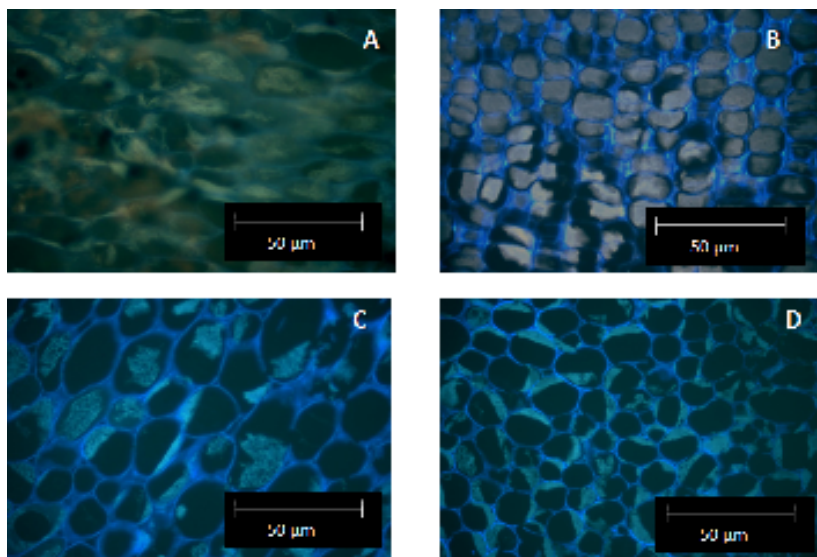


Figura 7- Micrografia de fluorescência dos vacúolos de proteína nos resíduos sólidos da extração do óleo de soja, sem solvente com fluorocromo ANS, utilizando filtro azul e aumento de 40X. (A – AVSpH; B - AVSpH; C – ACS; D - AVS)

Através da coloração com o azul de nilo os resultados da composição centesimal foram confirmados com relação à grande quantidade de óleo aderido aos resíduos sólidos. O fluorocromo se liga ao óleo e emite uma coloração variando do amarelo ao vermelho quando submetido a excitação (λ) 490 nm. Na Figura 8 pode-se visualizar a grande quantidade de óleo livre aderido aos resíduos.

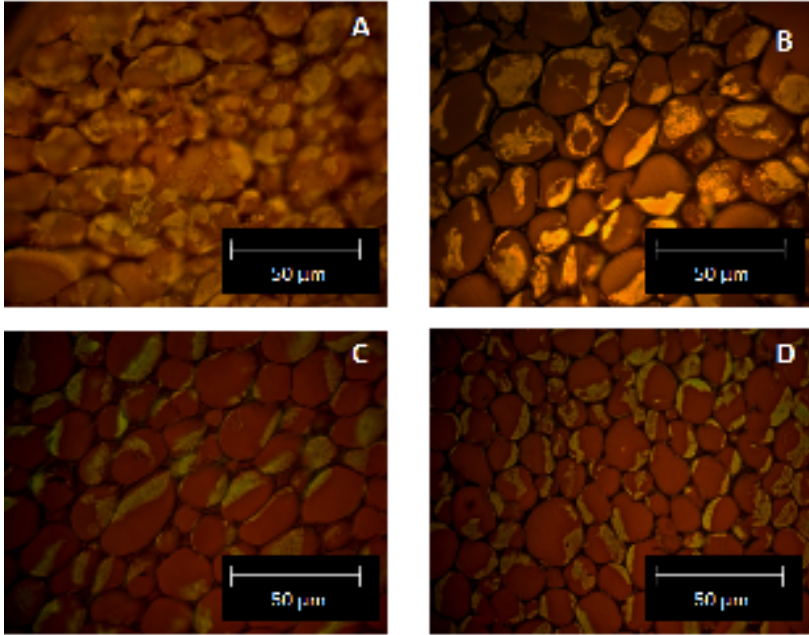


Figura 8 - Micrografia de microscopia de fluorescência dos resíduos sólidos para visualização da presença de óleo nos resíduos através da utilização de fluorocromo azul de nilo, com filtro verde e aumento de 40X. (A – ACSpH; B - AVSpH; C – ACS; V - AVS).

O laranja de acridina utilizado para corar substâncias pécicas, mostra que nos resíduos com controle de pH (Figura 9A e 9B) as estruturas mais danificadas de que naqueles onde o pH não foi controlado (Figura 9C e 9D).

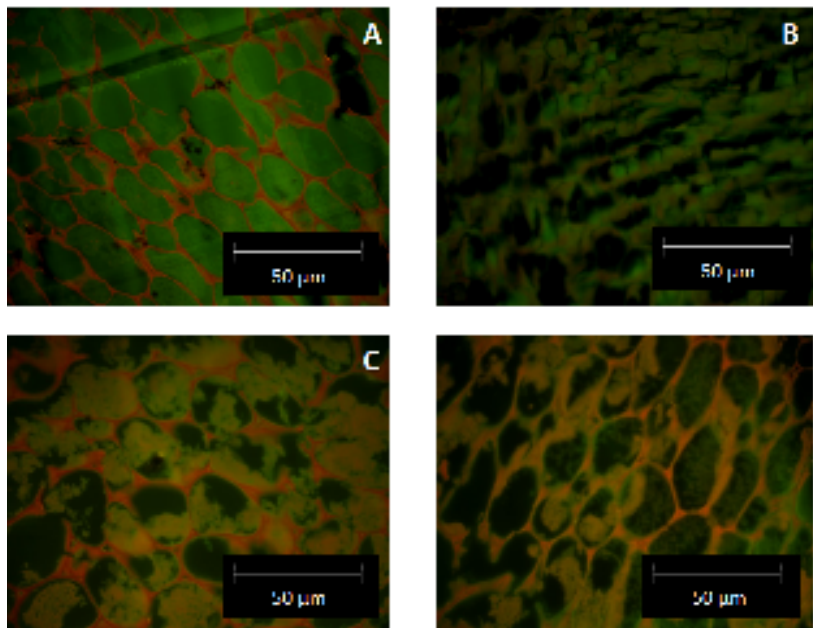


Figura 9 - Micrografia dos resíduos sólidos utilizando laranja de acridina e filtro verde com aumento de 40X, mostrando os danos causados nos polissacarídeos estruturais. (A – AVSpH; B - AVSpH; C – ACS; D - AVS).

Através da análise de microscopia de fluorescência foi possível observar discretas diferenças entre os tratamentos, não permitindo afirmar qual foi o tratamento mais eficiente.

4 CONCLUSÃO

Os sistemas enzimáticos utilizados alteraram as composições químicas da matéria prima, tanto no sistema enzimático quanto na utilização do pH. Essas mudanças foram visualizadas com o auxílio da MEV, microscopia de fluorescência e também através das determinações realizadas.

O controle do pH possibilitou melhor extração do óleo independentemente do sistema enzimático utilizado. O sistema Alcalase® e Celluclast® com controle de pH apresentou o melhor resultado quanto à eficiência do processo de extração.

Os resíduos sólidos mostraram-se interessantes como fonte de carboidratos, proteínas, fibras totais e minerais. As fibras foram caracterizadas e apresentaram bons resultados quanto a capacidade de ligação ao óleo, qualidade importante para a tecnologia de alimentos. O elevado teor protéico e mineral dos resíduos sólidos possibilita sua utilização para agregar valor nutricional em produtos com baixo valor protéico. Entretanto, há necessidade de investigação quanto a natureza dos aminoácidos presentes e demais propriedades de uso para estes novos materiais.

5 REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS – AACC. Approved Methods 9 ed. St. Paul, Minnesota, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 18th ed. Gaithersburg, M.D, USA, 2005.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and the other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, p. 27-41, 1989.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, p. 484-489, 1973.

BRILLOUET, J. M.; CARRÉ, B. Composition of cell walls from cotyledons of pisum, vicia faba and glycine max. **Phytochemistry**, v. 22, p. 841-847, 1983.

CHABRAND, R. M.; KIM, H. J.; ZHANG, C. E.; JUNG, S. Destabilization of the emulsion formed during aqueous extraction of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 85, p. 383–390, 2008.

DE FRANCISCO, A. Fluorochromes: wavelengths, recipes and applications. In: MUNCK, L. **Fluorescence analysis in foods**. New York: Longman Scientific and Technical, p. 268-277, 1989.

DRI - DIETARY REFERENCE INTAKES. Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals, 2001.

ELKHALIFA, A. E. O.; SCHIFFLER, B.; BERNHARDT, R. Effect of fermentation on the functional properties of sorghum flour. **Food Chemistry**, v. 92, p.1-5, 2005.

HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 87–95, 1998.

GARCIA, M. C; MARINA, M. L.; LABORDA, F.; TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 325-331, 1998.

KARR-LILIENTHAL, K. L.; KADZERE, C. T.; GRIESHOP, P.; FAHEYJR, C. G. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to non ruminants: A review. **Livestock Production Science**, v. 97, p. 1–12, 2005.

OUHIDA, I.; PEÑ REZ, J. F.; GASA, J. Soybean (*Glycine max*) Cell Wall Composition and Availability to Feed Enzymes, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, 1933-1938, 2002.

PATIL, A.; TAWARE, S. P.; OAK, M. D.; TAMHANKAR, S. A.; RAO, V. S. Improvement of Oil Quality in Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Mutation Breeding. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 84, p. 1117-1124, 2007.

RAGAEI, S.; ABDEL-AAL, E. S. M.; NOAMAN, M. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. **Food Chemistry**, v. 98, p. 32–38, 2006.

RAGHAVENDRA, S. N.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; THARANATHAN, R. N. Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. **European Food Research Technology**, v. 218, n. 6, p.563-567, 2004.

REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M. J.; MATEOS-APARICIO, I. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. **Food Chemistry**, v. 108, p.1099–1105, 2008.

ROBERTSON, J. A.; MONREDON, F. D.; DYSSSELER, P.; GUILLON, F.; AMADO, R.; THIBAUT, J. F. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a european collaborative study. **Lebensm-Wiss u-Technology**, v. 33, p.72-79, 2000.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Aqueous and Enzymatic Processes for Edible Oil Extraction. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 19, p. 402–420, 1996.

ROSENTHAL, A.; PYLE, D. L.; NIRANJAN, K. Simultaneous aqueous extraction of oil and protein from soybean: mechanisms for process design. **Trans I Chem E**, v. 76, Part C, p. 224-230, 1998.

ROSENTHAL, A.; PYLEB, D. L.; NIRANJANB, K.; GILMOURC, S.; TRINCA, L. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 499–509, 2001.

SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 132-138, 2005.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição Química e Valor proteico do resíduo de soja em relação ao Grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006.

SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J. Influencia del tratamiento enzimático en la calidad de aceites vegetales. **Grasas y Aceites**, v. 49, n. 2, p. 191-202, 1998.

SOYLIFE. **Inovações Tecnológicas para a Valorização dos Derivados da Soja: Extração Ecológica, Derivados Poliméricos e Margarina com Probióticos**. Relatório final de projeto FINEP nº 5158/06, fevereiro de 2010, 107 páginas (Acesso restrito, Bunge/UFSC).

STOMBAUGH, S. K.; JUNG, H. G.; ORF, J. H.; SOMERS, D. A. Genotypic and Environmental Variation in Soybean Seed Cell Wall Polysaccharides. **Crop Science**, v. 40, p. 408–412, 2000.

THEBAUDIN, J.Y.; LEFEBVRE, A. C.; HARRINGTON, M.; BOURGEOIS, C.M. Dietary fibres: Nutritional and technological interest. **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, p. 41-48, 1997.

WATT, B.; MERRILL, A.L. Composition of foods: raw, processed, prepared. Maryland: US. Department of Agricultural. **Agricultural Research Service**, USDA Nutrient Data Laboratory, 1999.

WOLFER, W. J.; BAKER, F. L. Scanning electron microscopy of soybeans, soy flours, protein concentrates, and protein isolates. **American Association of Cereal Chemistry**, v. 51, p. 387-396, 1975

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-68, 1963b.

WU, J.; JOHNSON, L. A.; JUNG, S. Demulsification of oil-rich emulsion from enzyme assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 527–533, 2009.

CONCLUSÃO GERAL

Os resíduos sólidos e líquidos resultantes da extração do óleo via enzimática apresentaram características promissoras sob o ponto de vista nutricional. Ambos apresentaram elevadas concentrações de proteínas, carboidratos, fibras e minerais. Por isso, deve-se atentar sobre a possibilidade de uma investigação mais específica, com relação ao valor nutricional e toxicológico, para que esses resíduos passem a ser matéria prima para produção de alimentos para necessidades especiais, desde que cumpram determinações específicas.

As fibras encontradas nos resíduos sólidos apresentaram características importantes para a formulação de alimentos funcionais. Os açúcares resultantes dos processos estudados, por exemplo, no resíduo líquido podem representar uma grande contribuição para os ajustes de sabor no desenvolvimento de novas bebidas a partir deste hidrolisado.

Os processos com controle do pH levaram a produção de peptídeos com maiores variações da massa molecular (aproximadamente 37 a 10 kD) enquanto os processos não controlados geraram peptídeos com menores variações de massas moleculares (entre 37 a 25 kD).

Os aminoácidos identificados por eletroforese capilar, foram correspondentes aos aminoácidos da matéria prima, com o destaque para o aminoácido lisina normalmente perdido durante a extração convencional e a metionina, aminoácido sulfurado importante para fins nutricionais. Desse modo, esse resíduo líquido poderia ser utilizado como enriquecedor. O tamanho das moléculas dos peptídeos gerados, pode representar maior biodisponibilidade para a elaboração de produtos para dietas especiais, contendo significativas concentrações dos aminoácidos essenciais.

Trabalhos futuros fazem-se necessários, tanto para explorar os resíduos da produção enzimática quanto para aumentar a eficiência do processo de extração do óleo.