

**CAMILA ROCHA DA SILVA**

**REMOÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS EM MELAÇO DE SOJA  
PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE INTERESSE INDUSTRIAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – Brasil  
2010**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586r  
2010

Silva, Camila Rocha da, 1978-

Remoção de galactooligossacarídeos em melaço de soja  
para obtenção de produtos de interesse industrial / Camila  
Rocha da Silva. – Viçosa, MG, 2010.

xi, 60f. : il. ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Debaryomyces hansenii*. 2. Oligassacarídeos. 3. Alfa-  
galactosidase. 4. Etanol. 5. Melaço. I. Universidade Federal  
de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.7

**CAMILA ROCHA DA SILVA**

**REMOÇÃO DE GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS EM MELAÇO DE SOJA  
PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE INTERESSE INDUSTRIAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**APROVADA: 30 de abril de 2010.**

---

**Profª. Maria do Carmo G. Peluzio  
(Co-Orientadora)**

---

**Prof. Luciano Gomes Fietto**

---

**Prof. José Humberto de Queiroz**

---

**Profª. Ana Cláudia P. Rodrigues**

---

**Profª. Valéria Monteze Guimarães  
(Orientadora)**

**Aos meus pais Hélio e Maria  
À minha irmã Carolina**

*O Senhor está comigo entre aqueles que me ajudam; pelo  
que verei cumprido o meu desejo sobre os que me aborrecem.*

*Salmo 118*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza, meu suporte, meu refúgio, minha inspiração, enfim minha existência.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Nutrição e Saúde por disponibilizar os laboratórios onde parte deste trabalho foi realizada.

Aos Laboratórios de Análises Bioquímicas e Enzimologia do BIOAGRO, onde a maior parte dos experimentos foi realizada.

À Prof<sup>a</sup> Valéria Monteze Guimarães pela orientação na realização deste trabalho, pela confiança, pelo profissionalismo e experiências trocadas. Muito obrigada!

À Prof<sup>a</sup> Maria do Carmo G. Pelúzio pela co-orientação, pela confiança, pela participação efetiva na realização deste trabalho.

Ao Prof. Luciano Gomes Fietto pela colaboração e sugestões.

Aos Profs. José Humberto Queiroz e Ana Cláudia Peres Rodrigues por terem aceitado a contribuir por este trabalho participando da banca de defesa.

Aos servidores, laboratoristas meu sincero agradecimento.

Aos meus queridos e amados amigos, meu muito obrigado. Vocês foram fundamentais na construção dessa obra.

Aos meus pais Hélio e Maria, tudo que sou tudo, que almejo ser tenho vocês, incansáveis ao meu lado. Meu amor, minha admiração, o meu bem maior. A vitória é de vocês.

A minha irmã Carolina, conselheira, guerreira, companheira, sem sua ajuda, sua força, seu exemplo de vida nada disso teria concretizado. Minha admiração eterna.

À minha família Rocha e Silva, tenho orgulho, admiração dessa linda família que pertencço.

À Galerinha e Floquinho por divertir a casa e a madrugada também.

A todos que com seus singelos gestos me ajudaram a concretizar este trabalho. OBRIGADA!!

## BIOGRAFIA

Camila Rocha da Silva, filha de Hélio Augusto da Silva e Maria Rocha da Silva, nasceu em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, em 15 de setembro de 1978.

Em janeiro de 2004, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

Em abril de 2006, concluiu o curso de Mestrado em Produção Vegetal, no Departamento de Produção Vegetal, na Universidade Estadual Norte-Fluminense “Darcy Ribeiro”, Rio de Janeiro.

Em maio de 2006, iniciou o curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Doctor Scientiae*, no dia 30 de abril de 2010.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO 1 – Remoção de galactoligossacarídeos em melaço de soja e avaliação nutricional em ratos.....	
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Objetivo Geral.....	7
1.2. Objetivos Específicos.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1. Origem e evolução do agronegócio da soja ( <i>Glycine max</i> ).....	8
2.2. Melaço de soja.....	9
2.3. $\alpha$ -Galactosidases: definição e importância comercial.....	10
2.4. $\alpha$ -Galactosidases microbianas.....	11
2.5. Oligossacarídeos de rafinose e distúrbios intestinais.....	12
2.6. Redução dos oligossacarídeos de rafinose em produtos derivados de soja.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Microrganismo e manutenção da cultura.....	15
3.2. Determinação das condições de tratamento do melaço de soja com células viáveis de <i>D. hansenii</i> .....	15
3.3. Determinação da atividade de $\alpha$ -galactosidase.....	16
3.4. Extração dos RO.....	16
3.5. Determinação do teor de RO por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	17
3.6. Determinação da composição centesimal do melaço de soja tratado e não tratado.....	17
3.6.1. Determinação do teor de proteínas.....	18
3.6.2. Determinação do teor lipídico.....	18
3.6.3. Determinação do conteúdo de cinzas.....	18
3.6.4. Determinação do teor de carboidratos totais.....	18
3.7. Ensaio biológicos.....	18
3.7.1. Preparo das dietas.....	19

3.7.2. Animais.....	20
3.7.3. Coeficiente de eficácia protéica (PER).....	20
3.7.4. Razão protéica líquida (NPR).....	21
3.7.5. Digestibilidade verdadeira.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Determinação das condições cultivo <i>D. hansenii</i> UFV-1 no melaço de soja para remoção dos oligossacarídeos de rafinose.....	22
4.2. Composição do melaço de soja dietas.....	28
4.3. Efeito do processamento enzimático no valor nutricional do melaço de soja tratado e não tratado utilizados na dieta de ratos Wistar.....	29
4.3.1. Efeito das dietas nos valores de digestibilidade verdadeira	30
4.3.2. Efeito do processamento enzimático nos valores de ganho de peso, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR).....	33
5. CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CAPÍTULO 2 – Increase in ethanol production from soy molasses by treatment with <i>Debaryomyces. hansenii</i> UFV-1 $\alpha$ -galactosidase.....	
ABSTRACT.....	47
1. INTRODUCTION.....	48
2. MATERIALS AND METHODS.....	49
2.1. Microorganisms and Culture Maintenance.....	49
2.2. Conditions of $\alpha$ -galactosidase Production.....	50
2.3. Partial Purification of $\alpha$ -galactosidase.....	50
2.4. $\alpha$ -galactosidase Assay.....	50
2.5. Determination of Protein Concentration.....	51
2.6. Determination of the Biochemical Composition of the Soy Molasses.....	51
2.7. Enzymatic Hydrolysis of Oligosaccharides in Soy Molasses.....	51
2.8. HPLC Analysis of Soluble Sugars.....	51
2.9. Fermentations Tests.....	52
2.10. Determination of Ethanol Concentration.....	52
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	52
3.1. Partial Purification of $\alpha$ -galactosidase.....	52
3.2. Characterization of Soy Molasses.....	54

3.3. Enzymatic Hydrolysis of Oligosaccharides in Soy Molasses.....	55
3.4. Fermentation Tests.....	56
4. CONCLUSIONS.....	57
ACKNOWLEDGEMENT.....	58
REFERENCES.....	58

## RESUMO

SILVA, Camila Rocha da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2010.

**Remoção de galactooligossacarídeos em melaço de soja para obtenção de produtos de interesse industrial.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Co-orientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Sebastião Tavares de Rezende e Flávia Maria Lopes Passos.

O melaço de soja é um subproduto do beneficiamento da soja e fonte concentrada de açúcares fermentáveis e não fermentáveis, dentre eles os oligossacarídeos rafinose e estaquiose. Os oligossacarídeos de rafinose (RO) são considerados fatores antinutricionais, pois interferem na absorção de nutrientes da dieta em humanos e animais monogástricos uma vez que estes não possuem a enzima  $\alpha$ -galactosidase capaz de hidrolisar esses açúcares. O presente trabalho teve como objetivos estabelecer condições tecnológicas para a obtenção de um melaço de soja livre de oligossacarídeos de rafinose, através do tratamento enzimático com  $\alpha$ -galactosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1; e estabelecer um processo eficiente para melhorar a produção de etanol através da fermentação do melaço de soja. Foi avaliado o crescimento *D. hansenii* e produção de  $\alpha$ -galactosidases nas concentrações de 10-100% de melaço de soja incubados com 1, 2 e 5% de inóculo contendo células viáveis da levedura, a 30 °C, 200 rpm. O uso do melaço de soja 10% e do inóculo 2% promoveu as melhores condições para crescimento da levedura. A atividade de  $\alpha$ -galactosidase aumentou com o tempo de incubação e a redução total dos RO foi verificada após 24 h. Os ratos foram alimentados com dietas preparadas com melaço de soja tratado, sem RO, e não tratado, com RO. Os parâmetros digestibilidade verdadeira, ganho de peso, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR) foram avaliados durante os períodos de 0 a 14 e 14 a 28 dias de experimento. Foi observada uma melhora significativa na digestibilidade verdadeira para a dieta contendo o melaço soja tratado em relação à dieta com melaço não tratado, nos dois períodos experimentais. Nos primeiros 14 dias de experimento, as dietas contendo o melaço de soja com e sem RO apresentaram valores de ganho de peso, PER e NPR

significativamente menores em relação à dieta controle. Já no período de 14 a 28 dias, as dietas experimentais não diferiram estatisticamente da dieta controle em relação aos parâmetros ganho de peso, PER e NPR. No experimento de verificação da produção de etanol, o tratamento do melaço de soja com  $\alpha$ -galactosidase a 60 °C, 100 rpm, por 12 h, promoveu um aumento na concentração de sacarose e de açúcares redutores de 22 e 82 %, respectivamente. O melaço de soja a 5 °Brix foi fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* LBM-51 a 30 °C, 100 rpm. A máxima produção de etanol para o melaço de soja tratado e não tratado foi de 15,0 e 11,4 g/L, respectivamente, após 8 h de fermentação. Um aumento de 24 % na produtividade de etanol foi obtido para a fermentação do melaço de soja tratado em comparação ao melaço de soja não tratado.

## ABSTRACT

SILVA, Camila Rocha da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2010.  
**Removal galactooligosaccharide soy molasses for obtaining of products of industrial interest.** Adviser: Valéria Monteze Guimarães. Co-advisers: Maria do Carmo Gouveia Peluzio, Sebastião Tavares de Rezende and Flávia Maria Lopes Passos.

Soy molasses is a byproduct of soybean processing and concentrated source of fermentable and non fermentable sugars, as oligosaccharides raffinose and stachyose. The raffinose oligosaccharides (RO) are considered antinutritional factors, interfering in the absorption of diet's nutrients in humans and monogastric animals, since they lack the enzyme  $\alpha$ -galactosidase able to hydrolyze these sugars. The objective this work were to establish technological conditions for obtaining a free soy molasses oligosaccharides raffinose from enzymatic treatment with *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidase, and to establish an efficient process to improve the ethanol production from soy molasses fermentation. Concentrations of 10-100% soy molasses were inoculated with 1, 2 and 5% inoculum containing cells of the yeast, at 30 °C, 200 rpm. The use of 10% soy molasses and 2% inoculum showed best conditions for the grown of the yeast. The  $\alpha$ -galactosidase activity increased with the incubation time and the total reduction of RO was observed after 24 h. The rats were fed with diets prepared with no treated soy molasses and treated. The parameters true digestibility, weight gain, PER and NPR were evaluated in the periods 0-14 and 14-28 days. It was observed a significant improve in the true digestibility from diet containing soy molasses treated in compared to diet no treated. In the first 14 days experiment, the diets containing soy molasses treated and no treated presented values weight gain, PER and NPR significantly lower in compared to control diet. However, in the period of 14-28 days the experimental diets no different of control diet. In the experiment from ethanol production, soy molasses treatment with  $\alpha$ -galactosidase at 60 °C, 100 rpm, for 12 h, promoted an increase in sucrose and reducing sugars concentrations of 22 and 82 %, respectively. Soy molasses at 5 °Brix was

fermented by *Saccharomyces cerevisiae* LBM-51 at 30 °C, 100 rpm. The maximum ethanol production for treated and no treated soy molasses was of 15.0 and 11.4 g/L, respectively, after 8 h fermentation. The increase of 24 % in ethanol productivity was obtained from treated soy molasses fermentation compared to no treated soy molasses.

## INTRODUÇÃO GERAL

A soja constitui um dos produtos de maior importância na economia brasileira ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país. Estima-se uma produção de 65,2 milhões de toneladas na safra de 2009/2010, o que representará cerca de 30% da produção mundial (IBGE 2010).

O melaço de soja é um subproduto da indústria processadora de soja, rico em carboidratos, tais como sacarose, frutose, glicose, pinitol e os oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose (QURESHI et al., 2001). Pequena parte do melaço de soja produzido tem sido usada como suplemento para ração animal, mas a grande maioria é descartada. Entretanto, o melaço de soja é uma atraente matéria-prima de baixo valor agregado, e poderia ser usado para reduzir custos de produção em vários processos industriais (BRAUNEGG et al., 2004). Pesquisas têm sugerido o uso das  $\alpha$ -galactosidases na hidrólise dos oligossacarídeos presentes no melaço de soja, minimizando assim seus efeitos antinutricionais, caso seja utilizado como suplemento em rações animais (VIANA et al., 2007). Também tem sido proposto o uso do melaço de soja em processos fermentativos, devido à sua alta concentração de açúcares (MONTELONGO et al. 1993; QURESHI et al. 2001; SOLAIMAN et al. 2006; SIQUEIRA et al., 2008).

Nas últimas décadas tem havido um crescente uso da soja e de seus derivados na alimentação humana e animal, atingindo aumento de 53 % no consumo anual *per capita* (GOLBITZ, 2003). Entretanto, o consumo da soja e derivados é ainda limitado, devido à presença de diversos fatores antinutricionais, dentre os quais se destaca os oligossacarídeos de rafinose (RO). Os RO são considerados os principais responsáveis pela indução do fenômeno de flatulência, diarreia, cólicas e náuseas, associada ao consumo de produtos de soja (WAGNER et al., 1976; de LUMEN, 1992). Em sementes de soja na maturidade fisiológica, aproximadamente 12% do peso seco são carboidratos não estruturais, sendo os mais abundantes, sacarose (41-68%), estaquiose (12-35%) e rafinose (5-16%) (NIELSEN, 1996).

Vários processos têm sido empregados na tentativa de eliminar ou reduzir os conteúdos de rafinose e estaquiose em produtos de soja. Entretanto,

diversas pesquisas sugerem que a hidrólise enzimática dos RO parece ser a estratégia mais eficiente para reduzir esses açúcares não digeríveis, aumentando seu valor nutricional (GUIMARÃES et al., 2001, VIANA et al., 2007, BRASIL et al. 2010). A hidrólise dos RO pode ser catalisada pelas  $\alpha$ -galactosidases ( $\alpha$ -D-galactosídeo galactohidrolase, E.C. 3.2.1.22) ou pelas invertases ( $\beta$ -D- frutofuranosídeo frutohidrolase, E.C. 3.2.1.26), ou ambas.

$\alpha$ -Galactosidases intracelular e extracelular ocorrem em microrganismos, plantas e animais. Uma vantagem do uso de leveduras em indústria de alimentos e farmacêutica é que muitas delas são classificadas como GRAS (*Generally Regarded as Safe*), status conferido às cepas que não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade (HENSING et al., 1995). *Debaryomyces hansenii* é a espécie de levedura mais frequentemente encontrada em produtos fermentados ricos em proteínas como salsicha e queijos (PETERSEN et al., 2002). Estudos demonstraram que essa levedura secreta  $\alpha$ -galactosidases capazes de hidrolisar RO, melhorando os valores nutricionais de produtos da soja (VIANA et al., 2007, BRASIL et al., 2010).

Embora o processo fermentativo para produção de etanol seja bem conhecido, os custos de produção de etanol a partir de biomassa e de resíduos industriais ainda constituem impedimento para o amplo uso do etanol como combustível. Assim, o desenvolvimento de processos usando fontes de carbono econômicas é importante para a produção de etanol em escala comercial (CAZETTA et al., 2007). A utilização de substratos de baixo custo oriundos de fontes agrícolas renováveis como material lignocelulósico, bagaço de cana-de-açúcar e melaço de soja são estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, A.P.R., DE REZENDE, S.T., PELÚZIO, M.C.G., GUIMARÃES, V.M. Removal of oligosaccharides in soybean flour and nutritional effects in rats. *Food Chemistry* 118:251–255, 2010.

BRAUNEGG, G., BONA, R., KOLLER, M. Sustainable polymer production. *Polym.-Plant. Technol.* 43:1779-1793, 2004.

CAZETTA, M.L., CELLIGOI, M.A., BUZATO, J.B., SCARMINO, I.S. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Biores. Technol.* 98:2824–2828, 2007.

GOLBITZ, P. Whole soybeans as ingredient. A soytech study. **Soytech**, Inc, 2003.

GUIMARÃES, V.M., DE REZENDE, S.T., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G., FELIX, C.R. Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry*, 58:67-73, 2001.

HENSING, M.C.M., BANGMA, K.A., RAAMSDONK, L.M., HULSTER, E., van DIJEN, J.P., PRONK, J.T. Effects of cultivation conditions on the production of heterologous  $\alpha$ -galactosidase by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 43:58-64, 1995.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (online). [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200912comentarios.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200912comentarios.pdf). (acessado em 08.01.2010).

de LUMEN, B.O. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legumes: A review. *Food Structure*, 11:33-46, 1992.

MONTELONGO, J.L., CHASSY, B.M., MCCORD, J.D. *Lactobacillus salivarius* for conversion of soy molasses into lactic acid. *Journal of Food Science*, 58:863-866, 1993.

NIELSEN, N.C. Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. D.P.S. Verma and R.C. Shoemaker (Editors), Cab International, Wallingford, U.K., 1996.

PETERSEN, K.M., WESTALL, S., JESPERSEN, L. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surface-ripened cheeses. *Journal Dairy Science*, 85:478-486, 2002.

QURESHI, N., LOLAS, A., BLASCHEK, H.P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA 101. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26:290-295, 2001.

SOLAIMAN, D., ASHBY, R., HOTCHKISS, A., FOGLIA, T. Biosynthesis of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. Biotechnol Lett., 28:57-162, 2006.

SIQUEIRA, P.F., KARP, S.G., CARVALHO, J.C., STURM, W., RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A., THOLOZAN, J.L., SINGHANIA, R.R., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. Biores.Technol. 99:8156-8163, 2008.

VIANA, P.A., DE REZENDE, S.T., FALKOSKI, D.L., LEITE, T.A., JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M.A.; GUIMARÃES, V.M. Hidrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidases. Food Chemistry, 103:331-337, 2007.

WAGNER, J.R., BECKER, R., GUMBMANN, R., OLSON, A.C. Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose, oligosaccharides-free bean residue. Journal Chemistry Technology Biotechnology, 56:3-13, 1976.

## **CAPÍTULO 1**

### **Remoção de galactooligossacarídeos em melaço de soja e avaliação nutricional em ratos**

## 1. INTRODUÇÃO

A intensificação do uso de enzimas tem ocorrido principalmente pela tendência mundial de estabelecer novos processos industriais, especialmente os biotecnológicos mais específicos, de menor consumo energético e menos agressivos ao ambiente. Apesar do Brasil utilizar significativamente enzimas, nossa produção interna é ainda extremamente reduzida. Portanto, a produção de enzimas tem relevante importância estratégica, pois poderá atender a demanda interna bem como promoverá economia de divisas, com a substituição das importações.

Atualmente, o Brasil ocupa posição de destaque entre os principais países produtores de soja; e a utilização dos grãos de soja e de seus derivados na alimentação humana e animal vêm crescendo e novas tecnologias têm de ser desenvolvidas para atender esta demanda. Entretanto, o aumento no consumo de soja e derivados é limitado pela presença de fatores antinutricionais, dentre os quais se destaca os oligossacarídeos de rafinose (RO). Esses açúcares não são hidrolisados por humanos e animais monogástricos, uma vez que estes não possuem enzimas capazes de hidrolisar as ligações  $\alpha$ -1,6 presentes nesses açúcares. Diversas pesquisas sugerem que a hidrólise enzimática dos RO parece ser a estratégia mais eficaz para reduzir esses açúcares e aumentar seu valor nutricional.

As  $\alpha$ -galactosidases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases e catalisam a clivagem hidrolítica de resíduos terminais de D-galactose em ligação  $\alpha$ . Elas têm sido aplicadas em processos biocatalíticos para melhorar a qualidade dos produtos destinados à nutrição humana; e também como componentes em dietas animais, aumentando a digestibilidade e reduzindo a fermentação dos açúcares não digeríveis. Há uma grande vantagem na utilização de  $\alpha$ -galactosidases de leveduras na alimentação, pois algumas são classificadas como GRAS, não apresentando toxicidade e patogenicidade.

A indústria de alimentos, especialmente o setor de derivados da soja, tem grande interesse nos processos de redução dos oligossacarídeos de rafinose, que são resistentes ao calor, não sendo inativados durante o processamento convencional. O melaço de soja, um subproduto da indústria

processadora de soja, é uma fonte concentrada de açúcares. Ele é produzido em quantidade significativa, sendo um material de baixo custo comercial, podendo tornar-se uma atraente reserva alimentar. Porém seu elevado teor de RO restringe sua utilização na suplementação de rações animais. A utilização de preparações comerciais de  $\alpha$ -galactosidases propicia uma melhora na absorção dos nutrientes. Este fato é evidenciado por pesquisas que demonstraram um aumento significativo no peso e digestibilidade dos animais. Portanto, a utilização de  $\alpha$ -galactosidases na hidrólise dos RO presentes no melaço de soja poderá favorecer o seu uso como suplemento alimentar.

### **1.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo geral estabelecer condições tecnológicas para a obtenção de um melaço de soja livre de oligossacarídeos de rafinose, através do tratamento enzimático com  $\alpha$ -galactosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1, e avaliar nutricionalmente o produto obtido em ratos.

### **1.2. Objetivos Específicos**

- Estabelecer as condições de cultivo da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em melaço de soja;
- Estudar a fermentação direta do melaço de soja pela levedura *D. hansenii* UFV-1;
- Determinar o teor dos RO no melaço de soja tratado e não tratado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinar a composição do melaço de soja tratado e não tratado pela quantificação de proteínas, lipídios, carboidratos e minerais;
- Avaliar a qualidade protéica-energética do melaço de soja tratado e não tratado, por meio de ensaio biológico com ratos Wistar, determinando o ganho de peso, consumo protéico, digestibilidade verdadeira, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Origem e evolução do agronegócio da soja (*Glycine max*)

A soja (*Glycine max*) pertence a família das leguminosas, com origem na China, é um dos mais antigos produtos cultivados pelo homem, embora o seu potencial para uso na alimentação humana e animal tenha sido evidenciado somente após a Segunda Guerra Mundial para o ocidente. A soja pode ser considerada um dos principais alimentos para a população do futuro, devido suas qualidades nutricionais, facilidade de adaptação a quase todas as regiões, alta produção e facilidade de cultivo (BELLAVÉR & SNIZEK, 1999).

A soja constitui um dos produtos de maior importância na economia brasileira, ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país. Esta leguminosa foi trazida pelos primeiros imigrantes japoneses em 1908 e sua expansão ocorreu nos anos 70, com um crescente interesse na indústria de óleo e na demanda do mercado internacional. Porém, até 1975, toda a produção brasileira de soja utilizava cultivares e técnicas importadas dos Estados Unidos, motivo este que levou os estados do Sul do país a conseguirem boa produtividade em nível de escala comercial, em função das semelhanças climáticas. Em 1975, criou-se o centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja) onde pesquisadores desenvolveram a primeira cultivar brasileira. Esse fato permitiu que a soja fosse produzida em regiões tropicais (Cerrados) onde antes a planta não se desenvolvia. A soja viabilizou a implantação de indústrias de óleo, fomentou o mercado de sementes e deu estabilidade à exploração econômica das terras onde antes existiam matas e cerrados (CHIAPPA, 2007).

No começo de 2000, apoiado pelos serviços nacionais de pesquisa, ensino e extensão, o Brasil passou a ocupar lugar de destaque no cenário mundial do agronegócio da soja, como grande produtor e exportador. Tendo características de grandes propriedades, constituiu-se na maior cultura nacional em termos de área. Em estimativas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para safra 2009/2010, o Brasil alcançará valores próximos a 65,2 milhões de toneladas que representará cerca de 30%

da produção global de soja, onde ocupa segundo lugar no quadro dos principais produtores mundiais (IBGE, 2010).

## **2.2. Melaço de soja**

O melaço de soja é um subproduto da indústria processadora de soja, rico em carboidratos. O melaço é produzido concomitantemente com a obtenção do concentrado protéico de soja através de uma extração alcoólica (60-70% etanol aquoso) dos açúcares a partir do farelo de soja desengordurado. O resultado de todos esses processos de extração e concentração resulta na obtenção de um xarope marrom escuro, rico em carboidratos (JOHNSON et al., 1992). Por se tratar de um resíduo agroindustrial com elevado volume de geração, o melaço de soja é um material de baixo custo comercial que impõem problemas de descarte ambiental.

Um dos principais constituintes do melaço de soja são os carboidratos, que representam cerca de 60 % do total dos sólidos solúveis encontrados nesse produto (CHAJUSS, 2004). Destes, os açúcares digeríveis representam 58 % e incluem a sacarose, glicose, frutose, e galactose. Os açúcares não digeríveis, representam cerca de 42 % e incluem a rafinose, estaquiase e verbascose (QURESHI et al., 2001; LOLAS, 1999)

O melaço de soja tem se tornado uma reserva alimentar energética atraente e de baixo custo (BRAUNEGG, et al., 2004). Sua principal aplicação tem sido na indústria de alimentos animal, como um ingrediente calórico de baixo preço (BERK, 1992, QURESHI, et al., 2001; SIQUEIRA, et al., 2008). Entretanto, a limitação da utilização do melaço de soja como suplemento energético em ração animal se dá em grande parte pela presença de tri e tetrassacarídeos como a rafinose e estaquiase, respectivamente (SNYDER & KWON, 1987). Esses açúcares são digeridos pobremente por animais e indigeríveis por humanos, devido à incapacidade de sintetizar as  $\alpha$ -galactosidases, enzimas que hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 presentes nos RO. Assim os RO promovem aumento da viscosidade do bolo alimentar, interferindo na digestão dos nutrientes por reduzir sua interação com enzimas digestivas no intestino (SMITS e ANNISON, 1996). Além disso, a presença de altas concentrações desses açúcares na dieta pode resultar na retenção de fluidos,

acelerando o fluxo digestivo, afetando a utilização e absorção de nutrientes (WIGGINS, 1984). A ingestão dos RO também pode resultar em flatulência, náuseas, desconforto abdominal e diarreia.

A indústria de alimentos, especialmente o setor de derivados de soja, tem grande interesse na redução desses oligossacarídeos, que são resistentes ao calor e desta forma não são inativados durante o processamento convencional para tratamento dos demais fatores antinutricionais (SAID e PIETRO, 2004).

Vianna, et al., (2007) relataram a eficiência da enzima  $\alpha$ -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 para hidrolisar os açúcares rafinose e estaquiose presentes no melaço de soja. As  $\alpha$ -galactosidases vem sendo indicadas para aplicação em processos biocatalíticos, visando melhorar o valor nutricional de produtos de soja destinados à nutrição humana e também como componente na dieta de animais, promovendo aumento na digestibilidade e no ganho de peso.

### **2.3. $\alpha$ -Galactosidases: definição e importância comercial**

$\alpha$ -Galactosidases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases. São exoglicosidases que catalisam a clivagem hidrolítica de resíduos terminais de D-galactose em ligação  $\alpha$ . Estas enzimas hidrolisam D-galactosídeos simples, bem como moléculas complexas como oligo e polissacarídeos, glicoproteínas e outros derivados (MANZANARES, et al., 1998). As  $\alpha$ -galactosidases ( $\alpha$ -D-galactosídeo galactohidrolase, E.C. 3.2.1.22) estão amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais.

As  $\alpha$ -galactosidases estão classificados em 3 famílias distintas de glicosil hidrolases, baseados na similaridade da estrutura primária e análise de "clusters" hidrofóbicos. A família 27 de glicosil hidrolases é muito conservada, incluindo  $\alpha$ -galactosidases eucarióticas de plantas, animais, leveduras e fungos filamentosos. A família 36 contém principalmente  $\alpha$ -galactosidases bacterianas, mas também algumas  $\alpha$ -galactosidases eucarióticas (HENRISSAT e BAIROCH, 1993; MARGOLLES-CLARK, et al, 1996). A família 4 é caracterizada por conter, até o momento, somente  $\alpha$ -galactosidases bacterianas. A maioria das  $\alpha$ -galactosidases pertencentes à família 36 são

enzimas maiores, com uma estrutura tetramérica. As  $\alpha$ -galactosidases pertencentes à família 27 são geralmente menores e algumas são monômeros (ADEMARK, et al., 2001). As diferenças estruturais entre essas enzimas podem contribuir para diferenças na atividade (LUONTERI, et al., 1998). Em adição à atividade hidrolítica, algumas  $\alpha$ -galactosidases apresentam também atividade de transgalactosilação.

As  $\alpha$ -galactosidases são enzimas de grande importância comercial devido à sua utilização em vários processos biocatalíticos. Na indústria de alimentos, estas enzimas constituem uma ferramenta muito útil, uma vez que participam em diferentes processos para a hidrólise de açúcares contendo resíduos de galactose.  $\alpha$ -Galactosidases promovem a conversão de RO não digeríveis, indutores de flatulência, presentes em várias leguminosas, em açúcares digeríveis (GUIMARÃES, et al., 2001). Produtos de soja hidrolisados com as  $\alpha$ -galactosidases, como farinha e leite de soja, apresentam melhores propriedades nutricionais, o que contribui para ampliação do mercado consumidor de soja e derivados. Essa enzima também é usada como aditivo em ração animal à base de leguminosas para reduzir o teor dos RO. No processo de produção de açúcar de beterraba e mel de abelha, as  $\alpha$ -galactosidases hidrolisam a rafinose presente nos respectivos xaropes, contribuindo para cristalização dos produtos (KOBAYASHI e SUZUKI, 1972).

Além da utilização das  $\alpha$ -galactosidases pelas indústrias alimentícias, essas enzimas são de grande interesse para a indústria farmacêutica, onde participam na biocatálise de vários compostos ativos. Estudos indicam que esta enzima tem uma possível aplicação na biocatálise de oligossacarídeos complexos, utilizados nas pesquisas médicas e biológicas. Algumas  $\alpha$ -galactosidases de eucariotos são capazes de remover resíduos de galactose com ligação  $\alpha$ -1,3 terminal de glucanas, o que apresenta um potencial uso médico em terapia de transfusão, na conversão de sangue do grupo B para sangue do grupo O (ZHU e GOLDSTEIN, 1994; VARBANETS, et al., 2001).

#### **2.4. $\alpha$ -Galactosidases microbianas**

Certos microrganismos apresentam a vantagem de produzir  $\alpha$ -galactosidases com alto rendimento. As  $\alpha$ -galactosidases fúngicas são

indicadas para aplicações tecnológicas devido a sua localização extracelular, atividade em pH ácido e boa estabilidade (MANZANARES, et al., 1998). Essas enzimas são produzidas principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Streptomyces*.

Dentre as leveduras que produzem essas enzimas, as dos gêneros *Torulasporea*, *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* são as mais utilizadas. Uma grande vantagem do uso de leveduras é que muitas delas são classificadas como GRAS (*Generally Regarded as Safe*), especialmente *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. Organismos com “status” GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica (HENSING et al, 1995).

Leveduras como *Debaryomyces castellii* IFO 1359, *D. nepalensis* IFO 1428, *Pichia guillermondii* IFO 10106, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1997 e *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis* IFO 1839 apresentam  $\alpha$ -galactosidases intra e extracelulares (YOSHIDA et al., 1997). Viana et al. (2006) purificaram e caracterizaram  $\alpha$ -galactosidases secretadas por *Debaryomyces hansenii* UFV-1, cultivada em meio contendo galactose como fonte de carbono. Falkoski et al. (2006) descreveram a purificação e caracterização de  $\alpha$ -galactosidases de sementes de soja, dos fungos *Aspergillus terreus* e *Penicillium griseoroseum*; além da hidrólise de farinha de soja e melão de soja utilizando essa enzima.

## **2.5. Oligossacarídeos de rafinose e distúrbios intestinais**

Os produtos da soja têm uma excelente reputação, devido ao seu elevado conteúdo protéico e alta qualidade de seus aminoácidos. Entretanto, o consumo humano desses produtos é ainda limitado devido à presença de oligossacarídeos de rafinose (RO) presente nos grãos de soja, que não são eliminados pelo processamento tradicional (LESKE et al., 1991). A rafinose e estaquiase são açúcares compostos por uma ou duas unidades de galactose unidas à sacarose por ligações  $\alpha$ -1,6, respectivamente.

Os RO não digeríveis são melhores definidos como “carboidratos com um grau de polimerização de dois ou mais resíduos de galactose, que são

solúveis em etanol 80% e não susceptíveis a digestão pancreática e nem por enzimas da borda em escovas” (QUIGLEY et al. 1999).

A degradação dos RO ocorre na parte posterior do intestino, onde são fermentados por bactérias anaeróbicas com a liberação de grande quantidade de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> (PRICE et al., 1988), causando desconforto intestinal, cólicas, flatulência, diarreia e colite em humanos, além de diarreia severa em animais como suínos e outros (de LUMEN, 1992). Isto ocorre porque a mucosa do intestino de animais superiores, incluindo humanos, não possui a enzima  $\alpha$ -galactosidase, necessária à hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,6. Este fato impossibilita a conversão dos RO em açúcares mais simples e digeríveis. A presença desses açúcares, rafinose e estaquiose, na dieta alimentar pode resultar na retenção de fluidos, aumento o fluxo digestivo, afetando a utilização e absorção de nutrientes (WIGGINS, 1984).

Pesquisas mostram que procedimentos como embebição das sementes de leguminosas, cocção, extração com solventes, etc, podem reduzir os RO da dieta. Entretanto os processamentos tradicionais dos produtos derivados de soja e de outras leguminosas não eliminam esses  $\alpha$ -galactosídeos termoestáveis (NACZK et al., 1997). Experimentos, principalmente com animais monogástricos, demonstraram que a digestão intestinal desses oligossacarídeos pode ser aumentada se a dieta animal for suplementada com  $\alpha$ -galactosidase exógena. Assim sendo, o tratamento enzimático desses produtos, utilizando  $\alpha$ -galactosidasas, tem demonstrado ser a forma mais promissora para eliminação ou redução dos RO da dieta (ARANDA et al., 2001; FALKOSKI et al., 2006; SOUZA JÚNIOR et al., 2009; BRASIL et al., 2010).

## **2.6. Redução dos oligossacarídeos de rafinose em produtos derivados de soja**

As indústrias alimentícias têm explorado comercialmente o potencial energético-protéico da soja, estimulando sua produção em larga escala. Além do óleo que é destinado principalmente ao consumo humano, a fração protéica é comumente empregada na fabricação da ração animal.

Embora sejam indiscutíveis as vantagens do emprego da soja e de outras leguminosas na alimentação humana e animal, o uso da soja e

derivados tem sido limitado pela necessidade de tratamentos para inativação dos diversos componentes antinutricionais. Tentativas têm sido feitas para eliminar ou reduzir os conteúdos de rafinose e estaquiose em produtos de soja como: embebição das sementes (KAWAMURA e TADA, 1967), embebição e germinação (KIM et al., 1973), processos de fermentação (MITAL et al., 1975) e extração dos oligossacarídeos com água (KU et al., 1976). Técnicas como ultrafiltração do extrato hidrossolúvel de soja para remoção dos oligossacarídeos de rafinose (OMOSAIYE et al., 1978), e de extração desses açúcares com etanol a partir de farinha de soja (LESKE et al., 1991; IRISH et al., 1995) também foram testadas.

Entretanto, diversas pesquisas sugerem que a hidrólise enzimática dos RO presentes na soja e seus derivados parece ser a estratégia mais eficaz para reduzir esses açúcares e aumentar seu valor nutricional (CRUZ e PARK, 1982; SANNI, et al., 1997), uma vez que os tratamentos enzimáticos são extremamente específicos, causando menor alteração nas proporções dos demais componentes dos derivados de soja (VIANA, 2005).

Viana, et al. (2007) descreveram a aplicação de  $\alpha$ -galactosidase extracelular livre e imobilizada, além de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 contendo  $\alpha$ -galactosidase intracelular no tratamento de leite e melaço de soja com o objetivo de reduzir a concentração de RO nesses produtos. Prashanth e Mulimani (2005) relataram uma redução de 93% no teor de RO presente no extrato hidrossolúvel de soja após 12 h de incubação com  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae*.

$\alpha$ -Galactosidases vegetais também têm sido utilizadas na hidrólise dos RO em produtos derivados de soja. Guimarães, et al. (2001) demonstraram que uma forma de  $\alpha$ -galactosidase purificada de sementes de soja em germinação reduziu em 73% e 41% os teores de rafinose e estaquiose, respectivamente, após incubação do extrato hidrossolúvel de soja com apenas 2 U (unidades) da enzima por 8h a 30°C.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismo e manutenção da cultura

A fonte de  $\alpha$ -galactosidase do presente trabalho foi a cepa de *Debaryomyces hansenii*, codificada como UFV-1, que pertence à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos-BIOAGRO-UFV. Esta cepa foi isolada em ambiente de laticínios da região da Zona da Mata, Minas Gerais, e identificada pelo Instituto de Identificação de Leveduras, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, Holanda como *D. hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij var. *fabryi* Nakase & Suzuki.

A levedura, mantida a -80 °C em glicerol 20 % e YPD (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona e 2 % de glicose), foi estriada em placas contendo meio YPD (1,5 % ágar) e incubada por 36 h a 30 °C. As placas foram mantidas a 4 °C e este estoque foi repicado mensalmente e utilizado para inóculo.

#### 3.2. Determinação das condições de tratamento do melão de soja com células viáveis de *D. hansenii*

A levedura *Debaryomyces hansenii*, mantida em placas a 4 °C, foi ativada em meio YPD líquido, em erlenmeyers de 250 mL, incubada em Incubator Shaker Series 25D New Brunswick a 30 °C, 200 rpm, por 12-15 h.

Para determinação das melhores condições para crescimento da levedura e secreção das  $\alpha$ -galactosidases, concentrações iniciais de 1, 2 e 5 % (v/v) do inóculo, contendo células viáveis de *D. hansenii*, foram misturadas ao melão de soja, fornecido pela empresa BUNGE Alimentos S.A., Esteio-RS, Brasil. O melão de soja foi diluído com água destilada e utilizado nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 % (v/v).

As suspensões de melão de soja foram adicionadas em erlenmeyer de 250 mL, homogeneizadas e esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 minutos. As células da levedura foram inoculadas nas suspensões de melão de soja, e os erlenmeyers foram incubados em Incubator Shaker Series 25D New Brunswick a 200 rpm, 30 °C por 72 h. Os controles negativos foram

preparados como descrito, exceto a inoculação da levedura que não foi feita no melaço de soja.

Alíquotas foram coletadas nos tempos de 0, 12, 18, 24, 48 e 72 h, para determinação da atividade de  $\alpha$ -galactosidase e da porcentagem de hidrólise dos RO. As alíquotas foram liofilizadas e os RO extraídos de 20-30 mg de pó obtido. A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes nas diferentes concentrações de melaço de soja, em função do tempo de incubação com a levedura.

### **3.3. Determinação da atividade de $\alpha$ -galactosidase**

Atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi estimada, determinando-se as taxas de hidrólise do substrato sintético  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $p$ NPGal). Para o ensaio com o substrato  $p$ NPGal, a mistura de reação foi composta de 650  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, 250  $\mu$ L  $p$ NPGal 2 mM, 100  $\mu$ L de solução de enzima. A reação foi conduzida por 15 minutos em banho-maria a 40 °C e interrompida pela adição de 1 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M. A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 410 nm. Os valores de absorbância em 410 nm foram transformados em  $\mu$ moles de  $p$ -nitrofenolato ( $p$ NP), utilizando uma curva padrão. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de produto por minuto, nas condições do ensaio.

### **3.4. Extração dos RO**

O melaço de soja tratado e não tratado com células de *D. hansenii* UFV-1 foi liofilizado e os RO extraídos de acordo com a metodologia proposta por Guimarães et al. (2001).

Aproximadamente 20-30 mg das amostras liofilizadas foram pesadas em tubos tipo eppendorf e usadas para o processo de extração dos açúcares solúveis. Os açúcares foram extraídos com 1 mL por ciclo de etanol 80 % num total de três ciclos em banho fervente por 5 min. Após cada ciclo de extração a

mistura foi submetida à centrifugação, em centrífuga modelo Eppendorf 5415C, 14.000 rpm por 5 minutos. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C por 12-15 h e após este procedimento os açúcares foram ressuspensos em 1 mL de etanol 80 % e congelados a -20 °C. Após 24 h as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições já descritas, filtradas em filtro Millipore de 0,45 micra de diâmetro e armazenadas a -20 °C, para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

### **3.5. Determinação do teor de RO por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Os RO extraídos do melão de soja tratado e não tratado foram analisados por CLAE em cromatógrafo Shimadzu série 10A, equipado com detector de índice de refração e coluna em aço inox (25 x 0.465 cm) contendo o grupo aminopropil (-NH<sub>2</sub>) como fase estacionária. A fase móvel constituiu-se de uma mistura acetonitrila:água (80:20) em condições isocráticas. As análises foram realizadas a 35 °C sob um fluxo de 1 mL/min e todo o processo foi controlado por um computador acoplado ao sistema.

O método foi padronizado para determinar quantitativamente os açúcares solúveis presentes no melão de soja. A partir de uma solução estoque formada pela mistura dos açúcares frutose, glicose, sacarose, rafinose e estaquiose nas concentrações 4, 4, 4, 8 e 8 % (p/v), respectivamente, foram feitas diluições para obtenção das soluções padrão. Cada solução foi injetada no cromatógrafo líquido para obtenção das curvas padrão, correlacionando a área do pico com a concentração do açúcar na solução. As retas foram obtidas por regressão linear. Um volume de 20 µL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada açúcar presente foi identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenção e concentrações dos açúcares nas soluções padrão. Todos os cálculos foram feitos pelo computador acoplado ao sistema de CLAE equipado com o programa LC-10 versão 2.2 para Windows<sup>®</sup>.

### **3.6. Determinação da composição centesimal do melão de soja tratado e não tratado**

### **3.6.1. Determinação do teor de proteínas**

O teor de nitrogênio foi determinado, em duplicata, pelo método de Kjeldahl descrito pela *Association of Official Analytical Chemists - AOAC* (1997). Para o cálculo da conversão do nitrogênio em proteína foi utilizado o fator 6,25.

### **3.6.2. Determinação do teor lipídico**

O teor de lipídeos foi determinado, em duplicata, utilizando aparelho extrator Soxhlet e éter de petróleo como solvente, com refluxo por 24 h, de acordo com a AOAC (1997).

### **3.6.3. Determinação do conteúdo de cinzas**

A determinação do conteúdo de cinzas foi conduzida, em duplicata, por meio da calcinação das amostras a 550 °C em mufla, segundo método descrito pela AOAC (1997).

### **3.6.4. Determinação do teor de carboidratos totais**

O teor de carboidratos foi determinado por diferença percentual, considerando os teores de proteínas, lipídeos e cinzas.

## **3.7. Ensaio biológicos**

O melaço de soja tratado e não tratado foram utilizados como fonte calórica para o preparo de dietas que foram avaliadas por meio de ensaios biológicos com ratos. Os animais experimentais foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério de Experimentação do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As dietas experimentais foram elaboradas no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde/UFV, adaptadas à composição da dieta de acordo com a recomendação AIN-93G. Os procedimentos experimentais foram julgados pela

Comissão de Ética em Experimentação Animal do Departamento de Veterinária/UFV.

### 3.7.1. Preparo das dietas

Foram preparadas as dietas aprotéica, com sacarose (controle) e as dietas experimentais D1 e D2 (Tabela 1). Para o preparo da dieta D1 foi utilizado o melaço de soja tratado liofilizado (sem oligossacarídeos de rafinose). Para o preparo da dieta D2 foi usado o melaço de soja não tratado liofilizado (com oligossacarídeos de rafinose).

**Tabela 1** - Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura) – AIN-93G\*.

Ingredientes	Dietas			
	Aprotéica	Sacarose	D1	D2
Caseína	-	11,74	9,95	10,76
Amido dextrinizado <sup>1</sup>	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,0 <sup>2</sup>	10,0 <sup>2</sup>	10,0	10,0
Óleo de soja <sup>2</sup>	7,00	7,00	7,00	7,00
Fibra <sup>1</sup> (celulose)	5,00	5,00	5,00	5,00
Mistura Mineral <sup>1</sup>	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura Vitamínica <sup>1</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
Bitartarato de colina <sup>1</sup>	0,25	0,25	0,25	0,25
L-cistina <sup>1</sup>	0,30	0,30	0,30	0,30
Amido de milho <sup>2</sup>	59,75	48,01	49,80	48,99

D1-Dieta contendo melaço de soja sem oligossacarídeos (MST)

D2-Dieta contendo melaço de soja com oligossacarídeos (MSNT)

<sup>1</sup>Obtido da RHOSTER – Indústria e Comércio Ltda.

\*Segundo Reeves *et al.* (1993).

<sup>2</sup>Obtido no comércio de Viçosa, MG.

A composição das dietas experimentais foi baseada na dieta AIN-93G, segundo Reeves *et al.* (1993), com o teor de proteínas ajustado para 9 a 10 %. Após o preparo, a concentração protéica de cada dieta foi determinada, em triplicata, pelo método semimicro Kjeldahl, usando-se o fator 6,25 para a

obtenção do teor de proteína. As dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno devidamente rotulados e armazenados em refrigerador a 4 °C.

As quantidades dos componentes, óleo de soja, amido de milho, fibra alimentar, amido dextrinizado e sacarose foram ajustados, conforme a composição das fontes protéicas, de modo a obter dietas isocalóricas e isoprotéicas.

### **3.7.2. Animais**

Foram utilizados ratos machos da raça Wistar, recém-desmamados, com média de 28 dias de idade, peso variando de 50 a 60 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os animais foram subdivididos em quatro grupos com seis animais/grupo. Após pesagem, os animais foram distribuídos de modo que a diferença entre as médias dos pesos e os grupos não excedesse a 5 g. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, onde receberam água e as dietas experimentais *ad libitum* por 28 dias. As condições de temperatura ( $22 \pm 3$  °C) e luminosidade (fotoperíodo de 12 h) foram controladas, sendo o monitoramento do consumo alimentar feito semanalmente.

Os animais foram submetidos à eutanásia por inalação com gás carbônico, e foram determinados os valores de ganho de peso, consumo protéico, digestibilidade verdadeira, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR).

### **3.7.3. Coeficiente de eficácia protéica (PER)**

O PER relaciona o ganho de peso dos animais do grupo teste com o consumo de proteína do grupo teste.

O cálculo é feito pela seguinte equação (Hegsted, 1977):

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso do grupo-teste (g)}}{\text{proteína consumida pelo grupo-teste (g)}}$$

### 3.7.4. Razão protéica líquida (NPR)

Método original de Bender e Doell (1957). Verifica a capacidade da proteína de manter o peso do animal e de promover o crescimento deste, servindo para o crescimento e manutenção. O cálculo é realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso grupo-teste(g)} + \text{perda de peso grupo aprotéico(g)}}{\text{proteína consumida pelo grupo-teste(g)}}$$

### 3.7.5. Digestibilidade verdadeira

É um método que mede a proporção de nitrogênio absorvido após a digestão. Para a determinação da digestibilidade verdadeira, as dietas foram marcadas com índigo carmim na proporção de 200 mg/100 g de dieta e oferecidas aos animais no 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia. As fezes foram coletadas do 8<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup> dia e acondicionadas em recipientes individuais para cada animal, sendo mantidas sob refrigeração a 4 °C.

As fezes foram, posteriormente, secas em estufa com circulação de ar a 105 °C, por 24 h. Após o resfriamento, as fezes foram pesadas e moídas em moinho de navalha para determinação do teor de nitrogênio pelo método semimicro Kjeldahl, com amostras em triplicata, segundo a AOAC (1997).

A determinação da digestibilidade verdadeira foi possível pelo emprego de um grupo de seis animais com dieta aprotéica. O cálculo foi realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Digestibilidade} = \frac{I - (F - FK) \times 100}{I}$$

em que:

I = nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste;

F = nitrogênio fecal do grupo com dieta teste;

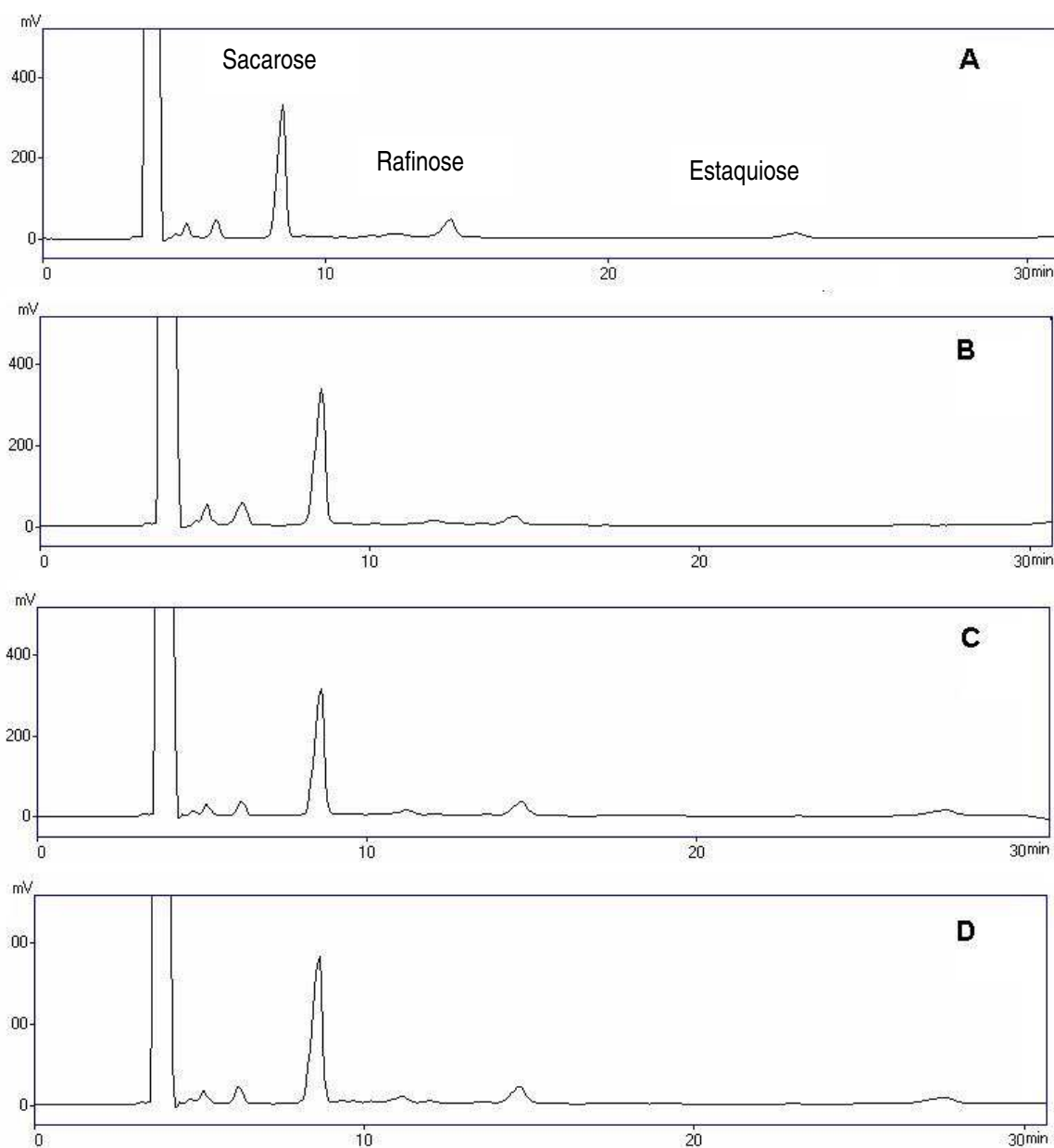
FK = nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Determinação das condições de cultivo de *D. hansenii* UFV-1 no melaço de soja para remoção dos oligossacarídeos de rafinose

No presente trabalho, diferentes concentrações de melaço de soja (10, 20, 40, 60, 80 e 100 %) e volumes do inóculo (1, 2 e 5 %) contendo as células de *D. hansenii* foram avaliadas com o objetivo de determinar as melhores condições para o cultivo da levedura no melaço, produção da enzima  $\alpha$ -galactosidase e conseqüente remoção dos RO presentes no melaço de soja. As condições que promoveram as melhores taxas de remoção dos RO do melaço de soja foram obtidas quando o melaço foi usado em menores concentrações (10 e 20 %) e com volume de inóculo de 2 %.

Com o volume de inóculo correspondendo a 1 % (v/v), foram observados os picos de rafinose (8,52%) e de estaquiose (4,96 %), mesmo após 24 h de inoculação da levedura no melaço de soja a 20 % (Figura 1A). Entretanto, após 48 h, estaquiose foi completamente hidrolisada, porém o pico de rafinose ainda foi detectado (3,94 %) (Figura 1B). Quando o melaço de soja a 40 % foi misturado com 1 % do inóculo, foram detectados os picos referentes à rafinose (6,86 %) e estaquiose (6,10 %) após 24 h (Figura 1C). Após 48 h de incubação, as concentrações de rafinose e de estaquiose foram praticamente iguais aquelas observadas com 24 h de tratamento (Figura 1D). Esses resultados sugerem que concentrações do melaço de soja acima de 40 % podem causar inibição do crescimento da levedura e da produção das  $\alpha$ -galactosidases, não havendo desta maneira hidrólise dos RO. Entretanto, a concentração inicial das células da levedura (inóculo de 1 %) pode ter sido um fator limitante, contribuindo para a não eficiência de hidrólise dos RO.



**Figura 1** - Cromatogramas comparativos da hidrólise dos RO no melaço de soja na concentração de 20 % (A e B) e 40 % (C e D) com tempo de incubação de 24 h (A e C) e 48 h (B e D), utilizando 1 % de inóculo contendo células viáveis da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1.

Nesse sentido, um inóculo de 2 %, contendo células de *D. hansenii*, foi misturado com melaço de soja em três diferentes concentrações: 10, 20 e 40 %, para avaliação da hidrólise dos RO presentes no melaço em função do tempo de cultivo. Também foi avaliada a atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase secretada na cultura durante esse tempo (Tabela 2).

**Tabela 2** - Atividade de  $\alpha$ -galactosidase (U/mL) no sobrenadante da cultura de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 (inóculo de 2 %) em diferentes concentrações de melação de soja.

Tempo de incubação (h)	Atividade de $\alpha$ -galactosidase (U/mL)		
	Concentração Melação de soja (%)		
	10	20	40
0	0,0	0,0	0,0
24	0,09 $\pm$ 0,0032	0,01 $\pm$ 0,0017	0,0
48	0,12 $\pm$ 0,0047	0,05 $\pm$ 0,0015	0,0
72	0,15 $\pm$ 0,0028	0,10 $\pm$ 0,0028	0,0

1U: 1  $\mu$ mol de p-NP formado por minuto  
Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão

Quando o melação de soja foi usado na concentração de 10 % foi detectada maior atividade de  $\alpha$ -galactosidase, seguido pelo melação a 20 %. Já no melação de soja a 40 % não foi detectada a atividade de  $\alpha$ -galactosidase. Estes resultados sugerem que a presença de concentrações elevadas de açúcares (sacarose, rafinose e estaquiose) no meio pode inibir o crescimento da levedura e a síntese da enzima.

A máxima atividade de  $\alpha$ -galactosidase (0,15 U/mL), verificada no melação de soja a 10 %, ocorreu após 72 h de incubação. No mesmo intervalo de tempo foi observada, para o melação de soja a 20 %, uma atividade de 0,10 U/mL. Entretanto, no melação de soja a 10 % após 24 de incubação com a levedura, a atividade de  $\alpha$ -galactosidase (0,09 U/mL) foi semelhante aos valores de atividade enzimática observados para o melação de soja a 20 %, após 72 h de incubação com a levedura. Esses dados sugerem que concentrações mais diluídas do melação de soja oferecem melhores condições para o desenvolvimento da levedura *D. hansenii* UFV-1 e produção da  $\alpha$ -galactosidase.

Os dados da redução da concentração dos RO no melação de soja 10 % em função dos tempos de incubação com o inóculo 2 % estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Concentração de RO no melão de soja 10 % em função do tempo de incubação com o inóculo 2 % contendo células viáveis da levedura *D. hansenii* UFV-1.

Tempo de incubação (h)	Concentração de açúcares (%)	
	Rafinose	Estaquiose
0	6,38 ± 0,37	9,87 ± 0,99
12	8,39 ± 1,15	2,11 ± 0,14
18	0,80 ± 0,01	0,0
24	0,0	0,0
48	0,0	0,0
72	0,0	0,0

Os resultados foram calculados a partir de cromatogramas obtidos pela análise por CLAE. Valores expressos como média ± desvio padrão.

Observou-se redução de 78,62 % de estaquiose após 12 h de incubação do melão com as células da levedura. Neste mesmo período foi observado um aumento de 31,50 % de refinose, provavelmente devido ao acúmulo de refinose que ocorre após a hidrólise da estaquiose. A remoção total de refinose e estaquiose somente foi verificada após um período de 24 h de incubação. Quando o melão de soja a 20 % foi misturado com o inóculo a 2 %, após 24 h de incubação, o teor de estaquiose se igualou a zero, entretanto 79.9 % da concentração inicial de refinose foram mantidas. Estes dados indicam que para utilização do inóculo a 2 %, a concentração do melão de soja a 10 % promoveu a maior produção da  $\alpha$ -galactosidase pela levedura e conseqüentemente a remoção mais rápida (24 h) dos RO do melão de soja. Também a utilização do inóculo correspondente a concentração de 2 % promoveu melhor desempenho da levedura em relação a produção da  $\alpha$ -galactosidase e eficiência na remoção dos RO do melão, quando comparada com a concentração de 1 %.

Em termos industriais, para que este processo usando o cultivo direto da levedura no melão de soja, seja eficiente para remoção dos RO, seria interessante que o melão pudesse ser usado em concentrações mais elevadas, evitando a etapa de diluição do melão. Assim, para avaliar a produção da  $\alpha$ -galactosidase pela levedura cultivada em concentrações mais elevadas do melão, um inóculo equivalente a 5 % foi utilizado para cultivo no melão a 20, 40, 60, 80 e 100 % (Tabela 4).

**Tabela 4** - Atividade de  $\alpha$ -galactosidase (U/mL) no sobrenadante da cultura de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 (inóculo de 5 %) em diferentes concentrações de melão de soja.

Tempo de incubação (h)	Atividade de $\alpha$ -galactosidase (U/mL)				
	Concentração Melão de soja (%)				
	20	40	60	80	100
0	0	0	0	0	0
24	0,14 $\pm$ 0,161	0	0	0	0
48	0,38 $\pm$ 0,009	0	0	0	0

1U: 1 $\mu$ mol de p-NP formado por minuto  
Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão

Como demonstrado anteriormente, concentrações do melão de soja acima de 40 % inibiram a produção da  $\alpha$ -galactosidase. Atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi detectada apenas no meio contendo melão de soja a 20 % e esta atividade foi maior em comparação as atividades observadas anteriormente, nos tempos de 24 e 48 h de cultivo.

Entretanto, a hidrólise total de rafinose e estaquiose, utilizando a concentração de 5 % de inóculo, somente foi verificada após 48 h de cultivo. Com 24 h de cultivo, a concentração de estaquiose foi nula, mas a concentração de rafinose foi de 3,85 %. Estes resultados sugerem que apesar da maior atividade da  $\alpha$ -galactosidase, detectada no meio contendo melão de soja a 20 % e maior concentração inicial de células da levedura (5 %), esta condição não foi eficiente para promover completa hidrólise dos RO no tempo de 24 h.

Desta forma, a condição de cultivo da levedura que promoveu a maior eficiência de hidrólise dos RO foi aquela utilizando concentração de 10 % do melão de soja e 2 % de inóculo.

O uso de  $\alpha$ -galactosidase de *D. hansenii* UFV-1 na hidrólise de RO presentes na farinha de soja desengordurada foi também relatado por Brasil et al. (2010), que verificou a completa redução dos açúcares rafinose e estaquiose, após 36 h de inoculação da suspensão com a levedura. Scalabrini et al (1998) avaliando o crescimento de *Bifidobacterium*, relataram que a maior atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi verificado no intervalo de 12-24 h de cultivo; e que esse período corresponderia a fase exponencial de crescimento.

No presente estudo, devido à acentuada coloração do melaço de soja usado como meio de crescimento para a *D. hansenii*, as leituras de  $A_{600}$  foram prejudicadas, não sendo possível construir uma curva de crescimento microbiano. Entretanto, foi observada uma boa correlação entre a produção de  $\alpha$ -galactosidase com o aumento da turbidez do meio, indicativo de crescimento celular, e com a hidrólise dos RO. Observações semelhantes foram citadas por Garro et al. (2004), Yoon e Hwang (2008) e Brasil et al. (2010).

Neste trabalho, não foi detectada atividade de  $\alpha$ -galactosidase, quando a levedura foi cultivada no melaço de soja mais concentrado. Semelhantemente, Liu e Lin (2000) demonstraram que a adição de 1 % de glicose ou lactose no meio contendo extrato hidrossolúvel de soja causou um decréscimo na atividade de  $\alpha$ -galactosidase de bactérias ácido-láticas e leveduras identificadas em grãos de kefir. Segundo Mabinya et al. (2004), a taxa mínima de crescimento microbiano e de atividade de  $\alpha$ -galactosidase observada na presença de açúcares simples, pode ser causada devido a um efeito de repressão catabólica pela fonte de carbono. Viana et al. (2006) relataram que as  $\alpha$ -galactosidases de *D. hansenii* UFV-1 apresentam distinta sensibilidade a açúcares simples, sendo parcialmente inibidas quando cultivadas na presença de D-galactose e melibiose. Em cepas de *Leuconostoc mesenteriodes* e *Lactobacillus curvatus* cultivadas em meios suplementados com frutose e glicose houve inibição do crescimento com consequente inibição da atividade de  $\alpha$ -galactosidases (YOON e HWANG, 2008). No presente trabalho, com o aumento da concentração de melaço de soja, os teores de galactose, frutose e glicose também foram aumentados, uma vez que esses açúcares fazem parte da composição do melaço e desta forma podem ter contribuído negativamente para o crescimento da levedura e produção da enzima.

A habilidade da levedura *D. hansenii* em crescer, produzir  $\alpha$ -galactosidase e utilizar os RO no melaço de soja, indica a possibilidade da utilização direta dessa levedura para redução dos RO em produtos derivados de soja. Uma vez que esta levedura é encontrada em vários produtos alimentícios e não apresenta problemas de toxicidade e patogenicidade, a sua utilização torna-se vantajosa em termos de facilidade, redução nos custos e tempo de obtenção da enzima  $\alpha$ -galactosidase.

## 4.2. - Composição do melaço de soja

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da composição química centesimal do melaço de soja tratado e não tratado, utilizados no preparo das dietas para o ensaio biológico. O cultivo da levedura no melaço de soja (MST) promoveu aumento de 44,4 % no teor de proteínas e 14,2 % no teor de cinzas e diminuição de 12,2 % no conteúdo de carboidratos totais em relação ao melaço de soja com RO (MSNT). Este aumento pode ter sido devido à presença das células da levedura *D. hansenii*, utilizadas no tratamento do melaço. Esses dados sugerem que o tratamento do melaço de soja com células de *D. hansenii* pode ser vantajoso do ponto de vista nutricional, uma vez que elimina os RO, que são considerados fatores antinutricionais e ao mesmo tempo aumenta o conteúdo de proteínas do melaço de soja.

**Tabela 5** - Composição química centesimal dos melaços de soja tratado e não tratado\*, em base seca.

Concentração (%)	Amostras	
	MST	MSNT
Proteína	14,46 ± 0,21	8,04 ± 0,23
Lipídeos	6,44 ± 0,16	6,50 ± 0,13
Cinzas	16,63 ± 0,23	14,26 ± 0,10
Carboidratos Totais	62,47	71,20

MST - Melaço de soja tratado, sem oligossacarídeos.

MSNT - Melaço de soja não tratado, com oligossacarídeos

\*Valores expressos como média ± desvio padrão

Os valores apresentados na Tabela 5 estão de acordo com os valores médios relatados por Karp (2007), Siqueira (2006) e Ayub et al. (2002). Segundo estes autores, os lipídeos são os componentes que mais sofrem variação na composição centesimal do melaço de soja. Isso se deve a variação na etapa industrial de extração de óleo do grão de soja.

Os teores de sacarose, rafinose e estaquiase, presentes no melaço de soja tratado e não tratado são mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Conteúdo dos açúcares, sacarose, rafinose e estaquiose, presentes no melão de soja tratado e não tratado.

Amostra	Teor de Açúcares (%)		
	Sacarose	Rafinose	Estaquiose
MST	37,34 ± 1,70	0,0	0,0
MSNT	36,25 ± 0,15	8,80 ± 1.05	13,23 ± 0.25

MST - Melão de soja tratado, sem oligossacarídeos.

MSNT - Melão de soja não tratado, com oligossacarídeos

\*Valores expressos como média ± desvio padrão

No MST, como esperado, rafinose e estaquiose foram completamente hidrolisados, estando ausentes nesse produto. No MSNT os conteúdos de rafinose e estaquiose foram 8,80 e 13,23 %, respectivamente. Os teores de sacarose não diferiram acentuadamente entre os dois tratamentos, sendo de 37,34 e 36,25 % no MST e no MSNT, respectivamente.

Considerando que no melão de soja a concentração dos açúcares solúveis foi dada pelo somatório das concentrações de sacarose, rafinose e estaquiose, sacarose foi equivalente a 62 % desses açúcares enquanto os RO foram equivalentes a 38 %. De acordo com Cegla et al (2005) a composição do melão de soja é aproximadamente 65 % de mono e dissacarídeos e 35 % de oligossacarídeos. Veldman et al. (1993) citaram uma concentração média de 18 % de oligossacarídeos no melão de soja.

#### **4.3. Efeito do processamento enzimático no valor nutricional do melão de soja tratado e não tratado utilizados na dieta de ratos Wistar.**

Como o melão de soja possui uma quantidade expressiva de carboidratos digeríveis e não digeríveis, foi conduzido um ensaio biológico com ratos para avaliação da substituição da fonte calórica da dieta pelo melão, sendo utilizado o MST e o MSNT.

As dietas administradas aos animais durante o período experimental foram elaboradas em duas condições, visando avaliar os parâmetros de digestibilidade, ganho de peso, consumo protéico, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR). Na primeira condição, a fonte de sacarose que perfaz 10 % da dieta AIN-93G (Tabela 1) foi completamente substituída pelo MST e pelo MSNT, sem que houvesse correção do teor de

sacarose no melaço de soja. Assim, essa dieta foi preparada utilizando a quantidade em gramas do MST e MSNT liofilizados, equivalentes a 10 % do peso da dieta. Essa dieta foi administrada aos animais durante os primeiros 14 dias. Na segunda condição, a sacarose também foi completamente substituída pelo MST e MSNT, porém o teor de sacarose do melaço foi corrigido e complementado com sacarose comercial. Essa dieta foi administrada aos animais a partir do 15º dia até completar os 28 dias experimentais.

#### 4.3.1. Efeito das dietas nos valores de digestibilidade verdadeira

Os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 mostram os valores de digestibilidade da dieta obtidos ao final dos 14 e 28 dias de experimento.

De acordo com os dados apresentados Tabela 7, foi observada que a digestibilidade da dieta contendo melaço de soja sem oligossacarídeos (D1) não diferiu estatisticamente da dieta controle (sacarose), e D1 apresentou um valor de digestibilidade superior 93,57 % em relação à dieta contendo melaço de soja com oligossacarídeos (D2), 87,48 %.

**Tabela 7** - Digestibilidade protéica verdadeira *in vivo* absoluta e relativa das dietas contendo sacarose e melaço de soja no período de 0 - 14 dias de experimento.

Tratamento	Digestibilidade* (%)	Digestibilidade Relativa (%)
Sacarose	94,59 <sup>a</sup> ± 0,89	100
D1	93,57 <sup>a</sup> ± 0,66	98,61
D2	87,48 <sup>b</sup> ± 1,73	92,48

D1-Dieta contendo melaço de soja tratado, sem oligossacarídeos (MST)

D2-Dieta contendo melaço de soja não tratado, com oligossacarídeos (MSNT)

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

\*Valores expressos como média ± desvio padrão

Aos 28 dias de experimento (Tabela 8), foi observado o mesmo perfil de digestibilidade verificado com 14 dias. A digestibilidade da dieta D1 não diferiu estatisticamente da dieta controle, mas foi significativamente diferente da dieta D2 ( $p > 0,05$ ). A dieta D1 apresentou valor de digestibilidade verdadeira de 89,63, superior ( $p < 0,05$ ) em relação à dieta D2, 82,63%.

**Tabela 8** - Digestibilidade protéica verdadeira *in vivo* absoluta e relativa das dietas contendo sacarose e melação de soja no período de 14 - 28 dias de experimento.

Tratamento	Digestibilidade* (%)	Digestibilidade Relativa (%)
Sacarose	93,13 <sup>a</sup> ± 2,64	100
D1	89,63 <sup>a</sup> ± 2,66	96,24
D2	82,63 <sup>b</sup> ± 1,27	88,72

D1-Dieta contendo melação de soja tratado, sem oligossacarídeos (MST)

D2-Dieta contendo melação de soja não tratado, com oligossacarídeos (MSNT)

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

\*Valores expressos como média ± desvio padrão

A digestibilidade é uma característica do alimento e indica a quantidade de nutriente ingerido que se transforma pelo processo digestivo em uma forma que pode ser absorvido e utilizado pelo organismo. Ela é a medida da porcentagem das proteínas que são hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo, na forma de aminoácidos ou de qualquer outro composto nitrogenado, desde que não haja nenhuma interferência na absorção destes pelo organismo animal ou humano (SGARBIERI, 1987).

Os resultados apresentados na Tabela 7 e 8 demonstraram que a dieta D1 contendo o MST, sem os RO, mostrou valores de digestibilidade protéica superiores aqueles da dieta D2, com os RO. Esses resultados estão de acordo com alguns autores que sugeriram que a presença de oligossacarídeos e de outros carboidratos solúveis pode aumentar a viscosidade da digesta, diminuindo o tempo de retenção desta no trato gastrointestinal, causando uma redução na absorção dos nutrientes (KLASING, 1998; GRAHAM et al., 2002; PARIZA et al., 2010).

Estudos nutricionais usando preparações comerciais de  $\alpha$ -galactosidase como suplemento na alimentação de animais monogástricos demonstraram aumento significativo no peso e na digestibilidade de suínos e galinhas (SANADA et al., 2009).

Brasil et al. (2010) avaliaram os efeitos da eliminação dos RO na farinha de soja desengordurada utilizando  $\alpha$ -galactosidases de *D. hansenii*, em ratos Wistar por um período de 14 dias. Foi verificada menor digestibilidade protéica (87,14%) para os ratos alimentados com a dieta contendo RO em relação aos ratos alimentados com a dieta sem RO (91,28%).

Apesar do melaço de soja ser citado como um ingrediente de baixo custo para a alimentação animal (QURESHI et al. 2001; SIQUEIRA et al. 2008), poucos trabalhos descreveram sua efetiva utilização na suplementação de rações animais. Veldman et al. (1993) relataram o efeito da adição de 15 % de melaço de soja contendo 18 % de oligossacarídeos na dieta de suínos. Observaram que os animais que receberam dietas contendo o melaço de soja sofreram uma redução de 25 % nos valores de digestibilidade protéica comparada à dieta controle. Estes autores citaram que a adição da enzima  $\alpha$ -galactosidase melhorou a digestibilidade desses açúcares e das proteínas.

De acordo com Sangeetha et al. (2005), Manning e Gibson (2004) Bielecka et al. (2002), a fermentação dos oligossacarídeos não digeríveis no colon cecal por bactérias lá existentes, podem causar vários efeitos, dentre eles, pode-se verificar aumento no peso seco fecal excretado. Esses autores relacionaram esse fato ao aumento do número de bactérias que é resultante de uma extensa fermentação dos oligossacarídeos.

No presente estudo, foi verificado que os animais que receberam a dieta D2, com RO, por um período de 14 dias, apresentaram um valor de peso seco fecal excretado maior (2,79 g) do que os animais que ingeriram a dieta D1, sem RO (2,10 g). No período de 14-28 dias de experimento o peso seco fecal dos animais alimentados com a dieta D2 foi de 2,61 g, enquanto que nos animais alimentados com a dieta D1 este valor foi de 2,01 g.

Silva et al. (2006), observaram aumento no valor do peso seco fecal e da proteína excretada em ratos Wistar recém desmamados alimentados com grãos de soja e resíduo da soja. Os autores justificaram que a presença de fatores antinutricionais, como inibidores de proteases e RO, pode prejudicar a absorção dos nutrientes nitrogenados, levando a diminuição da digestibilidade protéica. Resultados semelhantes foram observados por Yamka et al. (2003). Esses autores avaliaram a digestibilidade protéica no intestino delgado de cães alimentados com farelo de soja e verificaram que, o aumento da concentração de farelo de soja na dieta favoreceu a redução da digestibilidade protéica no intestino delgado e aumento da digestibilidade no intestino grosso, caracterizando maior atividade microbiana nesse local, promovendo aumento do peso fecal excretado.

Portanto, podemos sugerir que a melhora na digestibilidade protéica pela remoção dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose é devido à possibilidade de redução da viscosidade da digesta, aumentando seu tempo de permanência no intestino delgado. Além disso, o processo de hidrólise dos oligossacarídeos diminui a atividade da flora microbiana devido à geração de monossacarídeos que são digeridos e absorvidos antes de atingirem o intestino grosso.

#### 4.3.2. Efeito do processamento enzimático nos valores de ganho de peso, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR)

Os resultados apresentados na Tabelas 9 e 10 referem-se aos valores de ganho de peso, avaliados durante os períodos de 14 e 28 dias experimentais, respectivamente. No período experimental de 14 dias, não houve diferença estatística ( $p > 0.05$ ) no ganho de peso para os animais alimentados com as dietas D1 e D2. Entretanto, a dieta controle (sacarose) promoveu maior ganho de peso nos animais, sendo superior ( $p < 0,05$ ) em relação às dietas D1 e D2.

**Tabela 9** - Ganho de peso e consumo protéico de ratos alimentados com dietas contendo sacarose e melão de soja no período de 0- 14 dias de experimento.

Dietas	Ganho de Peso (g)*	Consumo Protéico (g)*	Consumo Alimentar (g)*
Sacarose	60,20 <sup>a</sup> ± 8,70	24,87 <sup>a</sup> ± 1,06	256,95 <sup>a</sup> ± 10,96
D1	33,80 <sup>b</sup> ± 6,90	20,57 <sup>b</sup> ± 0,68	218,87 <sup>b</sup> ± 7,24
D2	43,20 <sup>b</sup> ± 3,56	22,80 <sup>c</sup> ± 1,51	231,24 <sup>b</sup> ± 15,31

D1-Dieta contendo melão de soja tratado, sem oligossacarídeos (MST)

D2-Dieta contendo melão de soja não tratado, com oligossacarídeos (MSNT)

As médias seguidas por uma mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

\*Valores expressos como média ± desvio padrão

Uma vez que não houve correção para a concentração de 10 % de sacarose das dietas D1 e D2 em relação à dieta controle, D1 e D2 continham reduzida concentração de sacarose comparada à dieta controle. Este fato pode explicar as diferenças no ganho de peso dos animais alimentados com as dietas experimentais em relação à dieta controle. Com relação ao consumo protéico a dieta D1, D2 e controle diferiram entre si estatisticamente. Sendo que para os animais alimentados com dieta controle o consumo protéico foi

maior seguido pela dieta D2 e D1. Pode-se sugerir que neste caso, os oligossacarídeos por não serem hidrolisados no processo de digestão, atuaram do mesmo modo que as fibras alimentares, aumentando o peristaltismo intestinal e conseqüentemente diminuindo a absorção de nutrientes. Possivelmente, foi o que ocorreu no grupo D2 quando houve redução de peso em relação ao controle. No entanto, a presença dos oligossacarídeos na dieta junto com a restrição de carboidratos pode ter dificultado a absorção dos mesmos, diminuindo também o ganho de peso. Os resultados observados estão de acordo com Sowers (2003), quando relata que a restrição de carboidratos na dieta pode ser efetiva para a perda de peso e redução do risco de doença cardiovascular.

Os resultados apresentados na tabela 10 referem-se ao período experimental de 28 dias. Podemos observar que os parâmetros, ganho de peso, consumo protéico e alimentar mantiveram perfis semelhantes aos verificados na tabela 9.

**Tabela 10** - Ganho de peso e consumo protéico de ratos alimentados com dietas contendo sacarose e melão de soja por um período de 28 dias de experimento.

Dietas	Ganho de Peso (g)*	Consumo Protéico (g)*	Consumo Alimentar (g)*
Sacarose	102,2 <sup>a</sup> ± 12,66	45,91 <sup>a</sup> ± 2,14	474,24 <sup>a</sup> ± 22,15
D1	75,80 <sup>b</sup> ± 3,96	36,29 <sup>b</sup> ± 1,08	410,05 <sup>b</sup> ± 12,22
D2	83,60 <sup>b</sup> ± 7,50	39,59 <sup>c</sup> ± 2,17	426,65 <sup>b</sup> ± 23,43

D1-Dieta contendo melão de soja tratado, sem oligossacarídeos (MST)

D2-Dieta contendo melão de soja não tratado, com oligossacarídeos (MSNT)

As médias seguidas por uma mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

\*Valores expressos como média ± desvio padrão

Entretanto, ao analisar o período de 14 - 28 dias de experimento (Tabela 11), verificou-se que o ganho de peso dos animais alimentados com a dieta controle e as dietas de melão de soja D1 e D2 não diferiram entre si estatisticamente em nível de 5 % de probabilidade. No entanto, da mesma forma que nos períodos de 14 e 28 dias, o consumo protéico foi menor no grupo D1 e D2 em relação ao controle.

**Tabela 11** - Ganho de peso e consumo protéico de ratos alimentados com dietas contendo sacarose e melação de soja no período de 14 - 28 dias de experimento.

Dietas	Ganho de Peso (g)*	Consumo Protéico (g)*	Consumo Alimentar (g)*
Sacarose	42,00 <sup>a</sup> ± 8,72	21,03 <sup>a</sup> ± 1,28	217,29 <sup>a</sup> ± 13,25
D1	42,00 <sup>a</sup> ± 6,04	16,95 <sup>b</sup> ± 0,54	191,18 <sup>b</sup> ± 6,15
D2	40,40 <sup>a</sup> ± 7,40	18,13 <sup>b</sup> ± 0,78	195,41 <sup>b</sup> ± 8,38

D1-Dieta contendo melação de soja tratado, sem oligossacarídeos (MST)

D2-Dieta contendo melação de soja não tratado, com oligossacarídeos (MSNT)

As médias seguidas por uma mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

\*Valores expressos como média ± desvio padrão

Após 14 dias de experimentação, os animais receberam a dieta contendo o melação de soja suplementado com sacarose para correção da quantidade de carboidrato recomendada por animal. O fato de não haver diferença ( $p > 0,05$ ) quanto ao ganho de peso entre os animais que receberam a dieta D1 e D2, quando comparados aos animais que receberam a dieta controle, reforça a constatação de que o desequilíbrio de carboidratos e a presença dos oligossacarídeos podem ter provocado a perda de peso nos animais durante os primeiros 14 dias de experimento.

Nas Tabelas 12 e 13 estão apresentados os resultados de PER, PER relativo (PERR), NPR e NPR relativo (NPRR), durante os períodos de 0 - 14 e 28 dias experimentais.

O coeficiente de eficácia protéica (PER) é uma medida que avalia a capacidade da proteína em favorecer o crescimento de animais jovens; e é normalmente expresso em relação ao obtido com a caseína. Já a razão protéica líquida (NPR) avalia a capacidade da proteína em manter o peso do animal e promover o seu crescimento.

Os valores de PER e NPR para as dietas D1 e D2 não diferiram entre si estatisticamente, em nível de 5 % de probabilidade nos primeiros 14 dias de experimento. Portanto, essas dietas contendo melação de soja, que sofreram restrição calórica, apresentaram valores inferiores em relação à dieta controle (Tabela 12).

**Tabela 12** - Coeficiente de Eficácia Protéica (PER), PER relativo (PERR), Razão Protéica Líquida (NPR) e NPR relativo (NPRR) das dietas contendo sacarose e melaço de soja com 14 dias de experimento.

Dietas	PER*	PERR (%)	NPR*	NPRR (%)
Sacarose	2,42 <sup>a</sup> ± 0,26	100	3,04 <sup>a</sup> ± 0,23	100
D1	1,64 <sup>b</sup> ± 0,33	68,08	2,40 <sup>b</sup> ± 0,33	79,01
D2	1,89 <sup>b</sup> ± 0,19	78,77	2,59 <sup>b</sup> ± 0,22	85,10

D1-Dieta contendo melaço de soja tratado, sem oligossacarídeos (MST)

D2-Dieta contendo melaço de soja não tratado, com oligossacarídeos (MSNT)

As médias seguidas por uma mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

\*Valores expressos como média ± desvio padrão

No período de 28 dias de experimento, foi verificado que os valores de PER e NPR para as dietas D1, D2 e controle não diferiram estatisticamente entre si, em nível de 5 % de probabilidade (Tabela 13).

**Tabela 13** - Coeficiente de Eficácia Protéica (PER), PER relativo (PERR), Razão Protéica Líquida (NPR) e NPR relativo (NPRR) das dietas contendo sacarose e melaço de soja com 28 dias de experimento.

Dietas	PER*	PERR (%)	NPR*	NPRR (%)
Sacarose	2,22 <sup>a</sup> ± 0,20	100	2,56 <sup>a</sup> ± 0,20	100
D1	2,09 <sup>a</sup> ± 0,06	93,93	2,52 <sup>a</sup> ± 0,05	98,25
D2	2,11 <sup>a</sup> ± 0,10	94,89	2,51 <sup>a</sup> ± 0,09	97,71

D1-Dieta contendo melaço de soja tratado, sem oligossacarídeos (MST)

D2-Dieta contendo melaço de soja não tratado, com oligossacarídeos (MSNT)

As médias seguidas por uma mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

\*Valores expressos como média ± desvio padrão

No atual estudo, foi realizada a substituição da fonte calórica, mantendo a mesma fonte protéica. Porém observamos que nos diferentes períodos experimentais (14 e 28 dias) os parâmetros PER e NPR se comportaram diferentemente. Observamos que a utilização do melaço de soja com e sem RO nos primeiros 14 dias de experimentação, influenciaram negativamente na absorção e utilização dos compostos nitrogenados, uma vez que os valores de PER e NPR foram inferiores aos valores da dieta controle. Neste período os ratos necessitam de uma maior eficiência protéica para que eles possam crescer e manter seu peso. Além disso, esses animais necessitam de uma

maior biodisponibilidade de aminoácidos sulfurados nesse período, por exemplo, sua utilização em vias de formação e manutenção dos pêlos.

Já no período de 28 dias, foi verificado que as dietas foram capazes de manter o crescimento e o peso dos animais, uma vez que as exigências protéicas são menores em comparação com as dos primeiros 14 dias.

Deste modo, podemos inferir que o equilíbrio dos nutrientes na dieta experimental é de extrema importância nos primeiros dias de vida do animal, independente da fonte protéica. Mesmo havendo uma quantidade adequada de proteínas, se não houver quantidade adequada de carboidrato ou mesmo uma boa disponibilidade, além da existência de fatores intrínsecos que influenciam na absorção nutricional, o crescimento e manutenção do animal ficarão comprometidos.

## 5. CONCLUSÕES

- A levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 foi capaz de crescer, produzir  $\alpha$ -galactosidase e hidrolisar os oligossacarídeos de rafinose presentes no melaço de soja. A utilização direta dessa levedura em preparações alimentícias torna-se vantajosa em termos de redução de custo e tempo para obtenção da enzima  $\alpha$ -galactosidase, além da segurança por se tratar de uma levedura que não apresenta problemas de toxicidade e patogenicidade.
- A hidrólise total dos RO foi observada após 24 h de incubação do melaço de soja a 10 % com 2 % de inóculo contendo células da levedura *D. hansenii* UFV-1. Essa condição experimental foi a que proporcionou melhor eficiência no processo de redução dos RO.
- Concentrações mais diluídas (10 e 20 %) do melaço de soja promoveram melhores condições para desenvolvimento da levedura *D. hansenii* UFV-1 e produção das  $\alpha$ -galactosidases; entretanto, concentrações do melaço acima de 40 % inibiram completamente a produção de enzima.
- A digestibilidade protéica verdadeira avaliada nos períodos de 14 e 28 dias de experimento demonstrou que a dieta contendo melaço de soja sem RO apresentou uma digestibilidade significativamente melhor do que a dieta contendo melaço de soja com RO.
- As dietas experimentais promoveram um menor ganho de peso aos animais em comparação com a dieta controle, nos primeiros 14 dias de experimentos. Entretanto, no período de 14 – 28 dias não foi verificada diferença significativa entre as dietas experimentais em relação à dieta controle.
- Nos primeiros 14 dias de experimento, a presença dos RO na dieta contendo melaço de soja influenciou negativamente nos valores de PER e NPR.

- No período de 14 – 28 dias de experimento, após efetuado o balanceamento de sacarose das dietas experimentais estas não diferiram significativamente em relação à dieta controle para os valores de PER e NPR.
- Melhoria da ração para uso do melaço de soja para alimentação animal

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMARK, P., LARSSON, M., TJERNELD, F., STALBRAND, H. Multiple  $\alpha$ -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 441-448, 2001.

ARANDA, P., DOSTOLOVA, J., FRIAS, J., LOPEZ JURADO, M., KOZLOWSKA, H., POKORNY, J., URBANO, G., VIDAL-VALVERDE, C., ZDYUNEZYK, Z. Nutrition. In: CL Hedley Ed. *Carbohydrates in grain legume seeds. Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics*. CAB International, Wallingford, UK, pp 61-87, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16 ed., v.2, Maryland, 1997.

AYUB, M. A. Z. et al. Conversão de resíduos agroindustriais da soja em etanol e outros solventes orgânicos. Relatório parcial PSPPG, processo 520712/99-4, 2002. Disponível em: [http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/Projetos%20Plano%20Sul/ufrgs\\_relatorio2002.htm](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/Projetos%20Plano%20Sul/ufrgs_relatorio2002.htm). Acesso em: 21/ 8/ 2008.

BELLAVER, C.; SNIZEK, J.P.N. Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, PR. Anais. EMBRAPA-SPI. p.183-199, 1999.

BENDER, A.E., DOELL, B.H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. *British Journal Nutrition*, 11:138-143, 1957.

BERK, Z. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. In: *FAO Agricultural Services Bulletin Number 97*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 186p, 1992.

BIELECKA, M. BIEDRZYCKA, E. MAJKOWSKA, A. JUSKIEWICZ, J., WRÓBLEWSKA, M. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. *Food research International*, 35:139-144, 2002.

BRASIL, A.P.R., DE REZENDE, S.T., PELÚZIO, M.C.G., GUIMARÃES, V.M. Removal of oligosaccharides in soybean flour and nutritional effects in rats. *Food Chemistry* 118:251–255, 2010.

BRAUNEGG, G., BONA, R., KOLLER, M. Sustainable polymer production. *Polym.-Plant. Technol.* 43:1779-1793, 2004.

CEGLA, U.G., SHUSTER, M. Process for the production of soybean sugars and the product produced thereof. UNITED STATES PATENT 6,913,771, July 5, 2005.

CHAJUSS, D. Soy Molasses: Processing and Utilization as a Functional Food, in KeShun Liu, Editor, Soybeans as Functional Foods and Ingredients, AOCS Press, Champaign. Ill., USA, pp. 201-208, 2004.

CHIAPPA, A. da C. Crédito agrícola, produção e exportação de soja. Agronline.com.br. Disponível em: <http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=1>. Acesso em: 18 de junho de 2007.

CRUZ, R., PARK, Y.K. Production of  $\alpha$ -galactosidase and its application to hydrolysis of galactosaccharides in soybean milk. Journal of Food Science 47:1973-1975, 1982.

FALKOSKI, D.L., GUIMARAES, V.M., CALLEGARI, C.M., REIS, A.P., BARROS, E.G., de REZENDE, S.T. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial  $\alpha$ -galactosidases. J. Agric, Food Chem. 54:10184-10190, 2006.

GARRO, M.S., DE VALDEZ, G.F., OLIVER, G., DE GIORI, G.S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. Food Microbiol. 21:511-518, 2004.

GRAHAM, K.K., KERLEY, M.S., FIRMAN, J.D., ALLEE, G.L. The effect of enzyme treatment of soybean meal on oligosaccharide disappearance and chick growth performance. Poultry Science 81:1014-1019, 2002.

GUIMARÃES, V.M., DE REZENDE, S.T., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G., FELIX, C.R. Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. Phytochemistry 58:67-73, 2001.

HENRISSAT, B., BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochemistry Journal 293:781-788, 1993.

HENSING, M.C.M., BANGMA, K.A., RAAMSDONK, L.M., HULSTER, E., van DIJKEN, J.P., PRONK, J.T. Effects of cultivation conditions on the production of heterologous  $\alpha$ -galactosidase by *Kluyveromyces lactis*. Applied Microbiology Biotechnology 43:58-64, 1995.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (online). [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200912comentarios.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200912comentarios.pdf). Acessado em 08 de janeiro de 2010.

IRISH, G.G., BARBOUR, G.W., CLASSEN, H.L. Removal of the  $\alpha$ -galactosides of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous  $\alpha$ -galactosidase and broiler performance. Poultry Science 74:1484-1494, 1995.

JOHNSON, L.A., MYERS, D.J., BURDEN, D.J. Soy Protein's History, Prospectis in Food, Feed. Inform 3:429-444, 1992.

KARP, S.G. Production of L-lactic acid from the soybean vinasse. Master dissertation, Federal University of Paraná/Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brazil/France, 2007.

KAWAMURA, S., TADA, M. Isolation and determination of sugars from the cotyledon, hull, and hypocotyl of soybean by carbon column chromatography. Tech. Bull. Fac. Agric. Kagawa Univ. 18:138-141, 1967.

KIM, W.J., SMITH, C.J.B., NAKAYAMA, T.O.M. The removal of oligosaccharides from soybeans. Lebensm. – Wiss. Technol. 6:201-204, 1973.

KLASING, K.C. Comparative Avian Nutrition. CAB International, Wallingford, UK, 1998.

KOBAYASHI, H., SUZUKI H. Studies on the decomposition of raffinose by  $\alpha$ -galactosidase of mold. II. Formation of mold pellet and its enzyme activity. Journal Fermentation Technology, 50:625-632, 1972.

KU, S., WEI, L.S., STEIMBERG, M.P., NELSON, A.L., HYMOWITZ, T. Extraction of oligosaccharides during cooking of whole soybean. Journal Food Science 41:361-364, 1976.

LESKE, K.L., AKAVANICHAN, O., CHENG, T.K., COON, C.N. Effect of ethanol extraction on nitrogen-corrected true metabolizable energy for soybean meal with broilers and roosters. Poultry Science 70:892-895, 1991.

LIU, J.R., LIN, C.-W. Production on kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. J. Food Sci. 65:716–719, 2000.

LOLAS, A. Examination of soy molasses as a fermentation substrate for growth and butanol production by hyperbutanol-producing *Clostridium beijerinckii* BA101. MS Thesis, University of Illinois Urbana, IL, USA, 1999.

de LUMEN, B.O. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legumes: A review. Food Structure 11:33-46, 1992.

LUONTERI, E., TENKANEN, M., VIKARI, L. Substrate specificities of *Penicillium simplicissimum*  $\alpha$ -galactosidases. Enzyme and Microbial Technology 22:192-198, 1998.

MABINYA, L.V., BRAND, J.M., MUYIMA, N.Y.O., PIRONCHEVA, G.L. Kinetic properties of  $\alpha$ -galactosidase and the localization of total proteins in *Erwinia chrysanthemi*. Food Technol. Biotechnol. 42:23–26, 2004.

MANNING, T.S., GIBSON, G.R. Prebiotics. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 18:287-298, 2004.

- MANZANARES, P., GRAAFF, L.H., VISSER, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity. *Enzyme and Microbial Technology* 22:383-390, 1998.
- MARGOLLES-CLARK, E., TENKANEN, M., LUONTERI, E., PENTILÄ, M. Three  $\alpha$ -galactosidases genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *European Journal Biochemistry* 240:104-111, 1996.
- MITAL, B.K., STEINKRAUS, K.H. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soy milk. *Journal Food Science* 40:114-118, 1975.
- NACZK, M., AMAROWICZ, R., SHAHIDI, F.  $\alpha$ -galactosides of sucrose in foods: composition, flatulence causing effects, and removal, in Fereidoom Shahidi (Ed.). *Antinutrients and Phytochemicals in Food* 127-151, 1997.
- OMOSAIYE, O., CHERYAN, M., MATHEWS, M.E. Removal of oligosaccharides from soybean water extracts by ultrafiltration. *Journal of Food Science* 43:354-360, 1978.
- PARIZA, M.W., COOK, M. Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 5: 332–342, 2010.
- PRASHANTH, S.J., MULIMANI, V.H. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase immobilized in calcium alginate. *Process Biochemistry* 40:1199–1205, 2005.
- QUIGLEY, M.E., HUDSON, G.J., ENGLYST, H.N. Determination of resistant short-chain carbohydrates (non-digestible oligosaccharides) using gas-liquid chromatography. *Food Chemistry* 65:381-390, 1999.
- QURESHI, N., LOLAS, A., BLASCHEK, H.P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 290-295, 2001.
- REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY, G. C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76. A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123:1939-1955, 1993.
- SAID, S., PIETRO, R.C.L.R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- SANADA, C.T.N., KARP, S.G., SPIER, M.R., PORTELLA, A.C., GOUVÊIA, P.M., YAMAGUISHI, C.T., VANDENBERGHE, L.P.S., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Utilization of soybean vinasse for  $\alpha$ -galactosidase production. *Food Research International* 42:76–483, 2009.

SANGEETHA, P.T., RAMESH, M.N., PRAPULLA, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. Trends in Food Science & Technology, 16:442-457, 2005.

SANNI, A.I., ONILUDE, A.A., OGUNDOYE, O.R. Effect of bacterial galactosidase treatment on the nutritional status of soybean seeds and its milk derivatives. Nahrung 41:18-21, 1997.

SCALABRINI, P., ROSSI, M., SPETTOI, P., MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. International Journal of Food Microbiology 39:213-219, 1998.

SGARBIERI, V.C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: SGARBIERI, V.C. Alimentação e Nutrição - Fator de Saúde e Desenvolvimento. São Paulo, Almed, 250-261, 1987.

SILVA, M.S., NAVES, M.M.V., OLIVEIRA, R.B., LEITE, O.S.M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. Ciênc. Tecnol. Aliment., 26:571-576, 2006.

SIQUEIRA, P.F. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Master dissertation. Federal University of Paraná/ Universities of Provence and of the Mediterranean Sea, Brazil/France, 2006.

SIQUEIRA, P.F., KARP, S.G., CARVALHO, J.C., STURM, W., RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A., THOLOZAN, J.L., SINGHANIA, R.R., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. Biores.Technol. 99:8156-8163, 2008.

SMITS, C.H.M., ANNISON, G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition- towards a physiologically valid approach to their determination. World's Poultry Science Journal, 52:204-221, 1996.

SOUZA JÚNIOR, W.C., DE REZENDE, S.T., VIANA, P.A., FLAKOSKI, D.L., REIS, A.P., MACHADO, S.G., BARROS, E.G., GUIMARÃES, V.M. Treatment of soy milk with *Debaryomyces hansenii* cells immobilised in alginate. Food Chemistry 114:589-593, 2009.

SOWERS, J.R. Obesity as a cardiovascular risk factor. Am. Jour. Med. 115:37S-41S, 2003.

SNYDER, H.E., KWON, T.W. Soybean utilization. New York: AVI Book 346p, 1987.

VARBANETS, L.D., MALANCHUK, V.M., BUGLOVA, T.T., KUHLMANN, R.A. *Penicillium* sp. 23 alpha-galactosidase: purification and substrate specificity. Carbohydrate Polymers 44:357-363, 2001.

VELDMAN, A., VEEN, W.A.G., BARUG, D., VAN PARIDON, P.A. Effect of  $\alpha$ -galactosides and  $\alpha$ -galactosidase in feed on ileal piglet digestive physiology. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 69:57–65, 1993.

VIANA, S.F., GUIMARÃES, V.M., JOSÉ, I.C., OLIVEIRA, M.G.A., COSTA, N.M.B., BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., REZENDE, S.T. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean  $\alpha$ -galactosidase. *Food Chemistry* 93:665-670, 2005.

VIANA, P.A., de REZENDE, S.T., MARQUES, V.M., TREVIZANO, L.M., PASSOS, F.M.L., OLIVEIRA, M.G.A., BEMQUERER, M.P., OLIVEIRA, J.S., GUIMARAES, V.M. Extracelular  $\alpha$ -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 54:2385-2391, 2006.

VIANA, P.A., DE REZENDE, S.T., FALKOSKI, D.L., LEITE, T.A., JOSÉ, I.C.; MOREIRA, M.A.; GUIMARÃES, V.M. Hidrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidases. *Food Chemistry*, 103:331-337, 2007.

WIGGINS, H.S. Nutritional value of sugars and related compounds undigested in the small gut. *Proceedings of the Nutrition Society* 43:69-75, 1984.

YAMKA, R.M., JAMIKORN, U., TRUE, A.D., HARMON, D. Evaluation of soyabean meal as a protein source in canine foods. *Animal Feed Science and Technology*, 109:121–132, 2003.

YOON, M.Y., HWANG, H.J. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of  $\alpha$ -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiology* 25:815– 823, 2008.

YOSHIDA, S., TAN, C.H., SHIMOKAWA, T., TURAKAINEN, H., KUSAKABE, I. Substrate specificities of  $\alpha$ -galactosidases from yeasts. Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61:359-361, 1997.

ZHU, A., GOLDSTEIN, J. Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. *Gene (Amst.)*. 140:227-231, 1994.

## **CAPÍTULO 2**

**Artigo: Increase in ethanol production from soy molasses by treatment with *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidase**

## **Increase in ethanol production from soy molasses by treatment with *Debaryomyces hansenii* UFV-1 $\alpha$ -galactosidase**

Camila Rocha da Silva<sup>a</sup>, Sebastião Tavares de Rezende<sup>a</sup>, Daniel Luciano Falkoski<sup>a</sup>, Luciano Gomes Fietto<sup>a</sup>, Valéria Monteze Guimarães<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO – Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs s/n Campus Universitário, 36570-000 Viçosa MG, Brazil.

\* Corresponding author. Tel +55 31 3899 2952; fax +55 31 3899 2373  
E-mail adress: vmonteze@ufv.br

Abbreviated title: Increase in ethanol production from soy molasses.

### **Abstract**

The objective of this work was to establish an efficient process to improve ethanol production from soy molasses via fermentation. This cheap agro-industrial waste contains a high sucrose concentration (38 %), but also presents raffinose (8.7 %) and stachyose (21.5 %), which are not fermentable by several microorganisms without the presence of  $\alpha$ -galactosidase. The enzymatic conversion of these oligosaccharides may be a rational alternative to improve the amount of fermentable sugar in soy molasses. *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidase was submitted to an ion exchange chromatography procedure, which resulted in a purification factor of 12.04 and a 71.73% recovery of the  $\alpha$ -galactosidase activity. Soy molasses then treatment with  $\alpha$ -galactosidase at 60 °C for 12 h, promoted total reduction of raffinose and stachyose contents, and increased sucrose and reducing sugar concentrations by approximately 22 and 82 %, respectively. Soy molasses at a concentration of 5 °Brix both treated and untreated with  $\alpha$ -galactosidase was fermented by *Saccharomyces cerevisiae* LBM-51. The maximum ethanol production from treated soy molasses (15.0 g/L) was detected after 8 h of fermentation, while the fermentation of untreated soy molasses yielded 11.4 g/L of ethanol. Ethanol

productivity could thus be increased by 24 % when treating soy molasses with  $\alpha$ -galactosidase prior to fermentation.

*Keywords:*  $\alpha$ -galactosidase; ethanol production; raffinose oligosaccharides; *Debaryomyces hansenii* UFV-1; soy molasses

## **1. Introduction**

The use of biofuels has become an increasingly important topic in worldwide discussions on energy resources. Bio-ethanol is one of the most important renewable fuels contributing to the reduction of negative environmental impacts generated by use of fossil fuels [1].

Global bio-ethanol production reached approximately 81.1 billion liters in 2008, of which 25 billion liters were produced from Brazilian sugarcane [2], and 18 billion liters were produced from maize in the United States [3]. According to a recent report released by the Brazilian Ministry of Mines and Energy, Brazilian ethanol production was 26.7 billion liters in 2009, of which 5.16 billion liters were exported [4]. It is estimated that ethanol production in Brazil will be roughly 104 billion liters in 2025 [5]. Ethanol produced from sugarcane is highly competitive due to low production costs and high agricultural and industrial productivity levels [6].

For large-scale biological production of fuel ethanol, low-cost and abundant substrates are needed. When ethanol is produced from maize or sugarcane, raw materials constitute about 40–70% of the production cost; thus by using waste products from forestry, agriculture and industry, feedstock costs may be reduced [7]. Ethanol production by biotechnological means has been acquiring considerable importance. In this context, ethanol produced from renewable and low-cost agro-industrial waste provides an alternative for utilization and bioconversion of waste into a high value product.

Brazilian soybean production is estimated at 65.2 million tons (2009/2010) which represents roughly 30% of global production [4]. Soy molasses, a byproduct of the soybean processing, is generated in the production of protein-concentrate soybean meal and contains about 57% of carbohydrates (dry mass). Soy molasses has also been used as an inexpensive animal feed [8].

Sucrose corresponds to 58% of total sugar present in soy molasses, and the oligosaccharides raffinose [ $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1,6)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranoside] and stachyose [ $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1,6)- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1,6)- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranoside] correspond to 10 and 28 %, respectively [9]. Soy molasses could be used as an inexpensive fermentation substrate, in processes to produce industrial chemicals such as lactic acid [10], butanol [11], sophorolipids [12], poly(hydroxyalkanoates) [13] and ethanol [8]. However, the galacto-oligosaccharides present in soy molasses are not fermentable by many microorganisms due to the presence of  $\alpha$ -1,6 bonds [14].

The enzyme  $\alpha$ -galactosidase ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase, E.C 3.2.1.22) catalyzes the hydrolysis of terminal  $\alpha$ -1,6-linked D-galactose residues present in oligosaccharides such as raffinose and stachyose, producing galactose and sucrose [15]. This enzyme purified from a *Debaryomyces hansenii* UFV-1 culture was highly efficiency for hydrolysis of raffinose and stachyose present in heavy and light soy molasses [9]. The enzymatic conversion of these oligosaccharides may be a rational alternative to improve the amount of fermentable sugar in soy molasses.

The objective of this work was to determine an economic and efficient process for ethanol production from soy molasses treated with partially purified *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidases.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Microorganisms and Culture Maintenance**

The *Debaryomyces hansenii* UFV-1 strain used in this study was isolated from a dairy environment in Minas Gerais, Brazil, and kept in the culture collection of the Microbiology Department, Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brazil). Taxonomic identification was carried out by the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, as *D. hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger-van Rij var *fabryi* Nakase & Suzuki. *D. hansenii* UFV-1 stored at -80 °C in glycerol and YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) was streaked on a YPD agar surface (1.5% agar)

and kept in an incubation chamber at 30 °C for 36 h. The plates were maintained at 4 °C and this stock was restreaked monthly.

The *Saccharomyces cerevisiae* LBM-51 strain was isolated from a fuel ethanol production plant in Minas Gerais, Brazil, and maintained in the culture collection of the Molecular Biotechnology Laboratory, Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brazil). The same procedure described above was carried out for maintenance of the *S. cerevisiae* strain culture.

## **2.2. Conditions for $\alpha$ -Galactosidase Production.**

*D. hansenii* UFV-1 was activated in YPD liquid medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 1% glucose) and incubated for 12–15 h at 30 °C and agitation of 200 rpm. An aliquot of the cells obtained after centrifugation (4000 x *g* for 5 min at 4 °C) was transferred to YP medium containing 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone and 10 g/L lactose as the carbon source to give a OD<sub>600nm</sub> of 0.2 (0.053 mg/mL). After incubation at 30 °C, 200 rpm for 27 h, the biomass was separated by centrifugation (4000 x *g* for 5 min at 4 °C) and the supernatant containing  $\alpha$ -galactosidase was stored at 4 °C.

## **2.3. Partial Purification of $\alpha$ -Galactosidase**

The enzymatic sample stocked at 4 °C was concentrated 10-fold by the use of an Amicon ultrafiltration cell model 8400 (Bedford, MA) with a 30 kDa molecular cutoff PM 30 Amicon membrane. The concentrated fraction was loaded in a DEAE-Sepharose (Amersham Biosciences) column (25 cm x 2.5 cm) equilibrated with 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5. Proteins were eluted at a flow rate of 60 mL/h, using a linear gradient formed with 250 ml of the sodium acetate buffer and 250 ml of the same buffer containing 1.0 M NaCl. Purification was then performed at 4 °C and the fractions were collected, where those containing  $\alpha$ -galactosidase activity were pooled.

## **2.4. $\alpha$ -Galactosidase Assay**

The enzyme was assayed using a reaction system containing 650  $\mu$ L of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0), 100  $\mu$ L of the enzyme preparation and 250  $\mu$ L of 2 mM *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-galactopyranoside (pNPGal). The reaction was conducted for 15 min at 40 °C and stopped by the addition of 1 ml of 0.5 M

sodium carbonate. The amount of  $\rho$ -nitrophenol ( $\rho$ NP) released was determined at 410 nm. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of protein required to produce 1  $\mu$ mol of  $\rho$ -nitrophenol per minute.

## **2.5. Determination of Protein Concentration**

The protein concentration in the enzymatic extract was determined by the Coomassie Blue binding method with bovine serum albumin (BSA) as the standard [16].

## **2.6. Determination of the Biochemical Composition of the Soy Molasses**

Determination of the protein, lipid and ash concentrations in the soy molasses were performed according to the AOAC method [17]. The reducing sugar concentration present in soy molasses was encountered using the 3,5-dinitro salicylic acid (DNS) reagent [18], and sucrose, raffinose and stachyose were quantified by HPLC, as described in section 2.8.

## **2.7. Enzymatic Hydrolysis of Oligosaccharides in Soy Molasses**

Soy molasses samples were mixed with the enzymatic extract at a proportion of 1:4 v/v. In this mixture, 1 mL of soy molasses was incubated either with 4 U of partially purified  $\alpha$ -galactosidase (1 U/mL) or the same volume (4 mL) of denatured enzyme (100 °C for 10 min), corresponding to 5 °Brix. In the second mixture, 4 mL of soy molasses were mixed with 1 mL of the concentrated  $\alpha$ -galactosidase extract (20 U) or the same volume of denatured enzyme, corresponding to 20 °Brix. The preparations were incubated for 12 h under agitation (100 rpm) at 60 °C, and then the reaction mixtures were collected and the soluble sugars were analyzed by HPLC.

## **2.8. HPLC Analysis of Soluble Sugars**

Initially, the samples of soy molasses untreated and treated with  $\alpha$ -galactosidase were filtered using a hydrophilic PTFE membrane (0.45  $\mu$ m pore size, 13 mm diameter, Millipore). The individual soluble sugars of sucrose, raffinose and stachyose present in soy molasses were quantified by HPLC on a Shimadzu series 10A chromatograph (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). For this purpose, an analytical column [aminopropyl (-NH<sub>2</sub>)] was used, eluted

with an acetonitrile-water isocratic mixture (80:20 v/v) at 35 °C with a flow rate of 0.7 mL/min, according to Guimarães et al. [15]. The individual sugars were automatically identified and quantified by comparing the retention times of standard sugar concentrations. Gentiobiose was used as an internal standard because it does not interfere with other sugars and is not found in soybean molasses.

## **2.9. Fermentation Tests**

The percentage (w/v) of soluble solids (° Brix) present in soy molasses was determined with a portable refractometer for sugar – Pocket Refractometer PAL 1 (ATAGO).

For fermentation assays, the *S. cerevisiae* LBM-51 strain was previously cultivated in YP medium containing 1% sucrose as a carbon source for 12 h. A culture volume (10 % v/v) was added to Erlenmeyer flasks containing the soy molasses suspension and incubated in a shaker (New Brunswick Scientific series 25D) at 30 °C and 100 rpm for 12 h. Aliquots were collected at time intervals of 2 h, centrifuged (5000 x g for 5 min) and the supernatant was filtered using an hydrophilic PTFE membrane (0.45 µm pore size, 13 mm diameter, Millipore). The fermentative process was evaluated by determination of the ethanol concentration using HPLC.

## **2.10. Determination of Ethanol Concentration**

Ethanol was quantified by HPLC with RI-detection on a Shimadzu series 10A chromatograph using an Aminex® Carbohydrate HPX-42C column (Bio-Rad). The operating temperature was 80 °C and ultra pure water was used as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min, according to Klinké et al. [19] with modifications. The ethanol concentrations were automatically identified and quantified by comparison with the retention time and standard ethanol concentration.

# **3. Results and Discussion**

## **3.1. Partial Purification of $\alpha$ -Galactosidase**

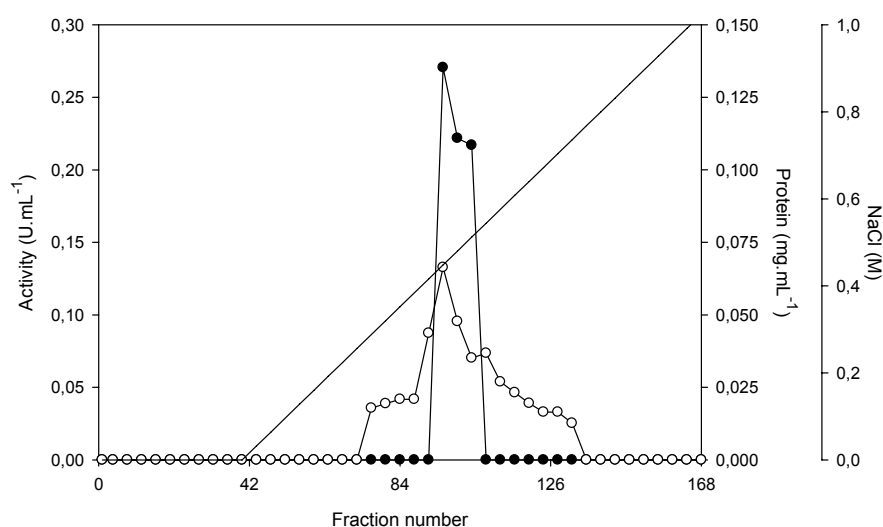
The yeast *D. hansenii* UFV-1 produced extracellular  $\alpha$ -galactosidase when grown on YP medium containing lactose as a carbon source, according to Viana et al. [20]. Results of the partial purification of  $\alpha$ -galactosidase from *D. hansenii* UFV-1 are summarized in Table 1.

**Table 1.** Summary of *D. hansenii* UFV-1 extracellular  $\alpha$ -galactosidase partial purification

Purification Step	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Activity (U/mL)	Specific Activity (U/mg protein)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	500	0.074	0.051	0.69	1.0	100.0
Ultrafiltration	40	0.56	0.63	1.12	1.6	98.8
DEAE-Sephacel	31	0.07	0.59	8.42	12.2	71.7

One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that released 1  $\mu$ mol of pNP per minute.

The culture supernatant was subjected to an ultrafiltration process in which the sample was concentrated 12.5-fold and considerable  $\alpha$ -galactosidase activity enrichment was observed (Table 1). The sample was submitted to ion exchange chromatography on a DEAE-Sephacel column where the fraction containing  $\alpha$ -galactosidase activity, eluted with 0.5 M NaCl, appeared as a single activity peak (Fig. 1).



**Figure 1.** Elution profile of  $\alpha$ -galactosidase from *D. hansenii* UFV-1 on a DEAE-Sephacel column.  $\alpha$ -Galactosidase activity ( $\bullet$ ); protein ( $\circ$ ); and gradient of NaCl ( $-$ ).

This procedure resulted in a purification factor of 12.04 and a 71.73% recovery of the original  $\alpha$ -galactosidase activity (Table 1). Similar results were reported for partial purification of *Streptomyces griseoloalbus*  $\alpha$ -galactosidase [21]. Viana et al. [20] used several steps to purify *D. hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidase and at the end of the purification process, these authors obtained a purification factor of 16.7 and activity recovery of 58.3%.

### 3.2. Characterization of Soy Molasses

The total carbohydrate concentration makes up approximately 71.16 % of soy molasses dry weight. Fermentable sugars represented about 58 % of the sugars present in soy molasses, of which the sucrose and reducing sugar contents were 38.81 % and 2.13 %, respectively (Table 2).

**Table 2.** Composition (dry basis) of soy molasses

Component	Concentration (%)
Reducing sugar	2.13 $\pm$ 0.0071
Sucrose	38.81 $\pm$ 0.0212
Raffinose	8.66 $\pm$ 0.3818
Stachyose	21.55 $\pm$ 0.7495
Total carbohydrates <sup>a</sup>	71.16
Proteins	8.04 $\pm$ 0.2263
Lipids	6.50 $\pm$ 0.1326
Ash	14.26 $\pm$ 0.0989

<sup>a</sup> Total carbohydrates (reducing sugars + sucrose + raffinose + stachyose)

The concentration of the stachyose and raffinose were 21.55 % and 8.66 %, respectively. This result showed that approximately 42 % of the sugars present in soy molasses are represented by raffinose and stachyose, which are not fermentable by the majority of microorganisms. The presence of  $\alpha$ -1,6 bonds in these galactooligosaccharides limits their utilization by many microorganisms [14]. Hydrolysis of raffinose and stachyose by  $\alpha$ -galactosidases, producing galactose and sucrose, could promote an increase in the content of fermentable sugars present in soy molasses.

### 3.3. Enzymatic Hydrolysis of Oligosaccharides in Soy Molasses

The treatment of soy molasses with partially purified  $\alpha$ -galactosidase from *D. hansenii* UFV-1 reduced the stachyose and raffinose concentrations to zero (Table 3). Nevertheless, the enzyme concentrations in the reaction mixtures, corresponding to 5 and 20 °Brix with activities of 0.8 and 4.0 U/mL, respectively, showed the ability to hydrolyze raffinose and stachyose. No oligosaccharide hydrolysis was detected in control tubes where the enzyme extracts had been replaced by denatured enzyme extracts. Since the extract showed no invertase activity, these results indicate that *D. hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidase acts on the oligosaccharides present in the soy molasses. Heavy and light soy molasses treated with 10.5 U of *D. hansenii*  $\alpha$ -galactosidase presented total hydrolysis of stachyose after 2 h of reaction, but an increase in raffinose concentration, which accumulated after stachyose hydrolysis [9]. These authors reported that after 6 h of treatment, soy molasses maintained about 50 % of its initial raffinose concentration. In the present study, the incubation time period of 12 h was necessary to achieve total reduction of raffinose and stachyose present in soy molasses, at both 5 and 20 °Brix.

**Table 3.** Hydrolysis of oligosaccharides presents in soy molasses by *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidase.

Incubation Time (h)	°Brix	Concentration (mg/mL)			
		Reducing Sugar	Sucrose	Raffinose	Stachyose
0	5	1.43 ± 0.0141	19.31 ± 0.1252	4.48 ± 0.0131	10.67 ± 0.2223
12		7.96 ± 0.0424	24.79 ± 0.0805	0	0
0	20	5.96 ± 0.0589	80.98 ± 1.4516	20.59 ± 0.1945	45.50 ± 0.1784
12		33.15 ± 0.1915	103.62 ± 0.1156	0	0

Initial concentrations of sucrose in the reaction mixtures, at 5 and 20 °Brix, were 19.31 and 80.98 mg/mL, respectively; and the concentrations of reducing sugar were 1.43 and 5.96 mg/mL, respectively. Consistently after enzymatic treatment, sucrose concentration increased approximately 22 % in both mixtures at 5 and 20 °Brix, and the content of reducing sugar increased 82 % (Table 3). On the other hand, no change in sucrose and reducing sugar

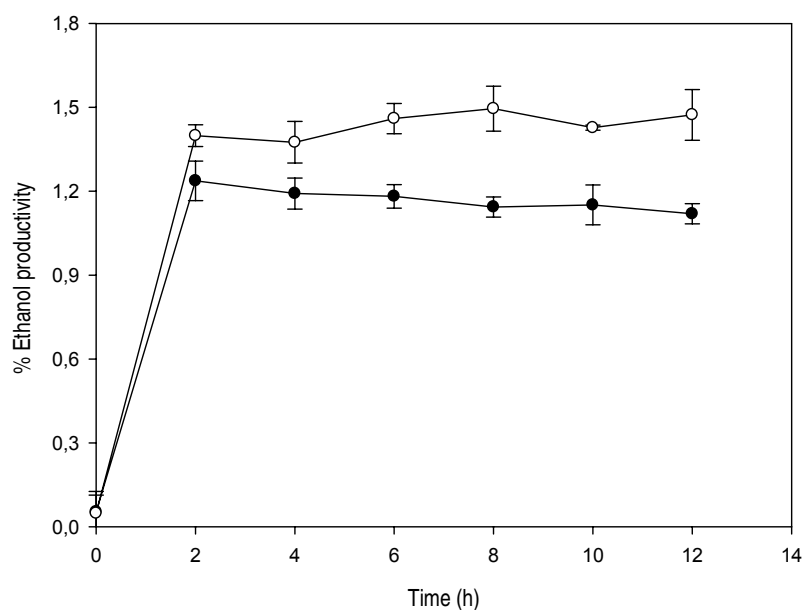
amounts were detected in the control tubes, which contained the inactive enzyme extract. Thermostable *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*  $\alpha$ -galactosidases, used to hydrolyze raffinose and stachyose in soy molasses, promoted the reduction in the oligosaccharide content by 0.6 % after incubation at 70 °C for 1 h [22].

This result showed that treatment of soy molasses with *D. hansenii*  $\alpha$ -galactosidase was efficient for increasing the concentration of fermentable sugars, and can thus improve the fermentative potential of soy molasses.

### 3.4. Fermentation Tests

Fermentation of untreated soy molasses (UTSM) and soy molasses treated with *D. hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidase (TSM) was evaluated during a period of 12 h, using the fermentative strain *S. cerevisiae* LBM-51 which does not produce  $\alpha$ -galactosidase. In this work, fermentation tests were carried out using UTSM and TSM, at 5 °Brix, measured before treatment with  $\alpha$ -galactosidase.

The profile of ethanol production during fermentation of soy molasses showed that a greater increase in ethanol concentration was obtained in the first two hours of fermentation (Fig. 2).



**Figure 2.** Ethanol productivity from fermentation of soy molasses at 5 °Brix. (●) Untreated soy molasses. (○) Treated soy molasses.

In this time, 14.0 and 12.40 g/L of ethanol were produced from TSM and UTSM, respectively. After this period, a weak increase in ethanol concentration was verified during fermentation of TSM and, the maximum ethanol production, 15.0 g/L was detected after 8 h of fermentation. On the other hand, fermentation of UTSM yielded 11.40 g/L of ethanol in the same time. An increase of 24 % in ethanol productivity was observed in TSM compared to UTSM. Trace amount of residual reducing sugars remained after fermentation of both TSM and UTSM, indicating that practically all sugars were utilized by the yeast during this process. According to Siqueira et al. [8], fermentation of soy molasses at a concentration of 20 °Brix during 20 h by *S. cerevisiae* LPB-SC, which does not produce  $\alpha$ -galactosidase, yielded 36.5 g/L. However, these authors detected high concentration of residual raffinose oligosaccharides after fermentation. Additionally the fermentation of soy molasses at 20 °Brix was tested in this study (not shown) and compared with the data obtained by Siqueira et al [8]. Fermentation of TSM at 20 °Brix, after 12 h, yielded 59.29 g/L of ethanol, 38 % greater than the result encountered by Siqueira et al [8]. However, a higher residual reducing sugar concentration remained after fermentation, indicating saturation of the process, probably due to fermentation inhibition by the high concentration of ethanol in the medium. These data suggest that improved ethanol yields can be achieved with process optimization.

The results obtained in this work indicate that hydrolysis of raffinose oligosaccharides with *D. hansenii*  $\alpha$ -galactosidase prior to fermentation was efficient to increase the amount of fermentable sugars present in soy molasses, consequently promoting greater ethanol yields.

#### **4. Conclusions**

Utilization of raffinose oligosaccharides present in soy molasses for ethanol production was possible after hydrolysis of these sugars by partially purified *D. hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidase. The enzymatic treatment of soy molasses was efficient for total removal of raffinose and stachyose, and increased the amounts of fermentable sugars. An increase in ethanol yield of 24% was obtained from fermentation of treated soy molasses when compared to untreated soy molasses.

## Acknowledgement

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG and Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Brazil.

## References

- [1] Cardona CA, Sánchez OJ. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technol* 2007;98:2415–2457.
- [2] FO Licht's World Ethanol 2009. <<http://www.sourcejuice.com/1279084/2009/11/02/Produ%C3%A7%C3%A3o-mundial-etanol-2010-crescer-11/pt/>> (accessed 17.03.2010).
- [3] RFA – Renewable Fuels Association (online). <<http://www.ethanolrfa.org/>> (accessed 29.02.08).
- [4] IBGE 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (online). <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200912comentarios.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200912comentarios.pdf)>. (accessed 08.01.2010)
- [5] Cerqueira Leite RC, Leal MRLVL, Cortez LAB, Griffin WM, Scandiffio MIG. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy* 2009;34:655–661.
- [6] Farinelli B, Carter CA, Lin C-YC, Summer DA. Import demand for Brazilian ethanol: a cross-country analysis. *J Cleaner Prod* 2009;17:S9–S17.
- [7] Quintero JA, Montoya MI, Sánchez OJ, Giraldo OH, Cardona CA. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for a Colombian case. *Energy* 2008;33:385–399.
- [8] Siqueira PF, Karp SG, Carvalho JC, Sturm W, Rodríguez-León JA, Tholozan JL, Singhania RR, Pandey A, Soccol CR. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresour Technol* 2008;99:8156-8163.
- [9] Viana PA, de Rezende ST, Falkoski DL, Leite TA, José IC, Moreira MA, Guimarães VM. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidases. *Food Chem* 2007;103:331-337.

- [10] Montelongo JL, Chassy BM, McCord JD. *Lactobacillus salivarius* for Conversion of Soy Molasses into Lactic Acid. J Food Sci 1993;58:863-866.
- [11] Qureshi N, Lolas A, Blaschek HP. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA 101. J Ind Microbiol Biotechnol 2001;26:290-295.
- [12] Solaiman DKY, Ashby, RD, Zekowski JA, Foglia TA. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. Biotechnol Lett 2007;29:1341-7.
- [13] Solaiman D, Ashby R, Hotchkiss A, Foglia T. Biosynthesis of medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) from soy molasses. Biotechnol Lett 2006;28:157-162.
- [14] Lan Y, Williams BA, Verstegen MWA, Patterson R, Tamminga S. Soy oligosaccharides in vitro fermentation characteristics and its effect on caecal microorganisms of young broiler chickens. Anim Feed Sci Technol 2007;133:286-297.
- [15] Guimarães VM, de Rezende ST, Moreira MA, Barros EG, Felix CR. Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. Phytochem 2001;58:67-73.
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
- [17] Association of Official Analytical Chemists Official methods of analysis of AOAC international. 17th ed. Maryland; 2000.
- [18] Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem 1959;31:426-429.
- [19] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on growth and ethanol production by *Thermoanaerobacter mathranii*. Appl Microbiol Biotechnol 2001;57:631-638.
- [20] Viana PA, de Rezende ST, Marques VM, Trevizano LM, Passos FML, Oliveira MGA, Bemquerer MP, Oliveira JS, Guimarães VM. Extracellular  $\alpha$ -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. J Agric Food Chem 2006;54:2385-2391.

- [21] Anisha GS, Rojan PJ, Nicemol J, Niladevi KN, Prema P. Production and characterization of partially purified thermostable  $\alpha$ -galactosidases from *Streptomyces griseoloalbus* for food industrial applications. *Food Chem* 2008;111:631–635.
- [22] King MR, White BA, Blaschek HP, Chassy BM, Mackie RI, Cann IKO. Purification and Characterization of a Thermostable  $\alpha$ -Galactosidase from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*. *J Agric Food Chem* 2002;50:5676-5682.