

ANA PAULA RODRIGUES BRASIL

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E NUTRICIONAL DE FARINHA DE SOJA
PROCESSADA ENZIMATICAMENTE PARA REMOÇÃO DOS
OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

ANA PAULA RODRIGUES BRASIL

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E NUTRICIONAL DE FARINHA DE SOJA
PROCESSADA ENZIMATICAMENTE PARA REMOÇÃO DOS
OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE**

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

APROVADA: 12 de julho de 2007.

**Prof^a. Maria do Carmo Gouveia
Pelúzio (Co-Orientadora)**

**Prof^a. Flávia Maria Lopes Passos
(Co-Orientadora)**

Prof^a. Ana Cláudia Peres Rodrigues

Prof. José Humberto de Queiróz

**Prof^a. Valéria Monteze Guimarães
(Orientadora)**

Ao meu marido Marcelo
Aos meus pais Paulo Rubens e Dirma
Aos meus irmãos Aline e Paulo Rubens

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar e me proteger e permitir que com esforço realize meus sonhos.

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

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Valéria Monteze Guimarães pela orientação na realização deste trabalho, pela confiança, paciência e carinho.

À Professora Maria do Carmo Gouveia Pelúzio por ter me orientado durante a realização dos experimentos.

Ao Professor Sebastião Tavares de Rezende pela colaboração e sugestões.

À Professora Neuza Maria Brunoro Costa pelas sugestões apresentadas e pelo consentimento para utilização das instalações e equipamentos do Laboratório de Nutrição Experimental onde o ensaio biológico foi realizado.

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

Ao meu amor Marcelo Santos de Oliveira, por me compreender, ajudar, ouvir, incentivar, trocar idéias e principalmente pelo seu amor. Essa conquista é sua também!

À amiga Camila Rocha da Silva pelo apoio, amizade e por saber que podia contar com você para me ajudar na realização deste trabalho.

À amiga Angélica Pataro Reis pelos ensinamentos, pela troca de experiências e pelo carinho.

À amiga Fabrícia Queiroz Mendes pela ajuda, pelos ensinamentos e apoio durante a realização dos experimentos.

Agradeço a todos os amigos e colegas dos Laboratórios do BIOAGRO: Daniel, Maira, Eleonice, Solange, Pollyanna, Joana, Lílian, Liliane, Lílian, Anderson.

Ao funcionário Eduardo Rezende Pereira (DQI-UFV) pela atenção, pelo exemplo de trabalho, e por estar sempre pronto a ajudar.

Aos funcionários do BIOAGRO e do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus pais Paulo Rubens e Dirma, pelo exemplo, pelo amor incondicional e por acreditarem que a educação é um bem muito valioso.

Aos meus irmãos Aline e Paulo Rubens, pelo carinho e amizade.

Aos meus sogros, Genézio Paulo de Oliveira e Maria Antônia Santos de Oliveira, pelo carinho e conselhos.

Enfim a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Ana Paula Rodrigues Brasil, filha de Paulo Rubens Vinhosa Brasil e Dirma Rodrigues Brasil, nasceu em Itaperuna, Rio de Janeiro, em 06 de julho de 1979.

Em junho de 2002, graduou-se em Farmácia e Bioquímica, pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais.

No período de março de 2003 a março de 2005, cursou residência em Análises Clínicas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

No período de agosto de 2003 a agosto de 2004, cursou especialização *Latu sensu*, em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em agosto de 2005, iniciou o curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, no dia 12 de julho de 2007.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo Geral	2
1.2. Objetivos Específicos	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Qualidade nutricional da soja e sua utilização na alimentação	4
2.2. Processamento industrial da soja	6
2.3. Biossíntese e papel fisiológico dos Oligossacarídeos de rafinose (RO)	7
2.4. Oligossacarídeos de rafinose e distúrbios intestinais	9
2.5. Processos para redução dos oligossacarídeos de rafinose em produtos derivados de soja	10
2.6. α -Galactosidases: definição e importância comercial	12
2.7. α -Galactosidases de leveduras	14
2.8. Considerações sobre a levedura <i>Debaryomyces hansenii</i>	15
2.9. Avaliação nutricional de produtos de soja com baixos teores de oligossacarídeos de rafinose	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Microrganismo e manutenção da cultura	20
3.2. Cultivo de <i>Debaryomyces hansenii</i> em meio YPD	20
3.3. Determinação das condições para o tratamento da suspensão de farinha de soja desengordurada com células viáveis de <i>Debaryomyces hansenii</i>	20

3.4. Tratamento da suspensão de farinha de soja desengordurada com células viáveis de <i>Debaryomyces hansenii</i>	21
3.5. Produção de farinha de soja desengordurada tratada e não tratada com células viáveis de <i>Debaryomyces hansenii</i>	22
3.6. Preparo da farinha de soja integral variedade UFVTN 105	23
3.7. Avaliação do índice de urease da farinha de soja integral	23
3.8. Produção da preparação enzimática de α -galactosidase extracelular pelo cultivo de <i>Debaryomyces hansenii</i> em meio apropriado.....	24
3.9. Hidrólise dos RO na farinha de soja integral	24
3.10. Produção de farinha de soja integral tratada e não tratada com a preparação enzimática de α -galactosidase de <i>D. hansenii</i>	25
3.11. Determinação da atividade de α -galactosidase	25
3.12. Determinação da atividade de invertase	26
3.13. Extração de RO	26
3.14. Determinação do teor de RO por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	27
3.15. Determinação da composição centesimal das farinhas de soja tratada e não tratada	27
3.15.1. Determinação do teor de proteínas	27
3.15.2. Determinação do teor lipídico	28
3.15.3. Determinação de umidade	28
3.15.4. Determinação do conteúdo de cinzas	28
3.15.5. Determinação do teor de carboidratos totais	28
3.16. Ensaio biológico	28
3.16.1. Preparo das dietas	29
3.16.2. Animais	30
3.16.3. Coeficiente de Eficácia Protéica (PER)	31
3.16.4. Razão Protéica Líquida (NPR)	31
3.16.5. Digestibilidade verdadeira	31

3.16.6. Extração e determinação da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta	32
3.17. Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. <i>Experimento 1</i>	34
4.1.1. Preparo e caracterização das farinhas de soja utilizadas no ensaio biológico	34
4.1.1.1. Tratamento da farinha de soja desengordurada com células viáveis de <i>Debaryomyces hansenii</i> e remoção dos oligossacarídeos de rafinose	34
4.1.1.2. Composição das farinhas de soja desengordurada utilizadas no preparo das dietas.....	37
4.1.2. Efeito do processamento enzimático no valor nutricional das farinhas de soja desengordurada	38
4.1.2.1. Efeito do processamento enzimático nos valores de digestibilidade verdadeira	38
4.1.2.2. Efeito do processamento enzimático nos valores de ganho de peso, Coeficiente de Eficácia Protéica (PER) e Razão Protéica Líquida (NPR)	38
4.1.2.3. Efeito da remoção dos oligossacarídeos de rafinose na produção de ácidos graxos de cadeia curta	40
4.2. <i>Experimento 2</i>	41
4.2.1. Preparo e caracterização das farinhas de soja utilizadas no ensaio biológico	41
4.2.1.1. Efeito dos tratamentos térmicos no índice de urease da farinha de soja integral	41

4.2.1.2. Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose na farinha de soja integral usando a preparação enzimática de α -galactosidase de <i>Debaryomyces hansenii</i>	41
4.2.1.3. Composição das farinhas de soja integral utilizadas no preparo das dietas	43
4.2.2. Efeito do processamento enzimático no valor nutricional das farinhas de soja	45
4.2.2.1. Efeito do processamento enzimático nos valores de digestibilidade verdadeira.....	45
4.2.2.2. Efeito do processamento enzimático nos valores de ganho de peso, Coeficiente de Eficácia Protéica (PER) e Razão Protéica Líquida (NPR)	45
4.2.2.3. Efeito do processamento enzimático na produção de ácidos graxos de cadeia curta ..	46
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Absorbância
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNS	Dinitrossalicilato
DP	Desvio padrão
EC	Enzyme Commission
FAO	Food and Agriculture Organization
GS	Galactinol sintase
K_M	Constante de Michaelis-Menten
NPR	Razão Protéica Líquida
NPRR	Razão Protéica Líquida Relativa
OMS	Organização Mundial de Saúde
p/v	Peso/volume
PER	Coeficiente de Eficácia Protéica
PERR	Coeficiente de Eficácia Protéica Relativa
RO	Oligossacarídeos de Rafinose
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade de atividade enzimática
YPD	Yeast Peptone Dextrose
ρ -NP	ρ -nitrofenol
ρ -NP- α -Gal	ρ - nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo

RESUMO

BRASIL, Ana Paula Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Avaliação bioquímica e nutricional de farinha de soja processada enzimaticamente para remoção dos oligossacarídeos de rafinose.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Co-orientadores: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio, Flávia Maria Lopes Passos e Sebastião Tavares de Rezende.

Os oligossacarídeos de rafinose (RO), presentes em altas concentrações na soja ou em seus produtos derivados, são considerados um fator antinutricional, uma vez que podem interferir na absorção dos nutrientes da dieta, além de serem os principais responsáveis pela indução de flatulência em humanos e outros animais. Vários estudos indicam que a ingestão de produtos de soja livres ou com teores reduzidos desses açúcares pode melhorar a digestão dos nutrientes. Nesse sentido, pesquisas sugerem que a hidrólise enzimática dos RO presentes em produtos derivados de soja parece ser uma estratégia eficiente para reduzir o conteúdo desses açúcares e aumentar o valor nutricional desses produtos. O objetivo deste trabalho foi a elaboração de farinhas de soja livres de RO, através do tratamento enzimático com α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV-1, e a avaliação nutricional do produto obtido por meio de ensaio biológico com ratos Wistar. Foram realizados dois experimentos. No primeiro foi realizada a verificação da atividade de α -galactosidase e a hidrólise dos RO na suspensão de farinha de soja desengordurada (1:10 p/v) adicionada de células viáveis de *D. hansenii*. Foi observado que a atividade enzimática aumentou com o tempo de incubação da levedura na suspensão de farinha de soja, e que a redução total dos RO foi observada após 36 h. No segundo experimento foram determinadas as condições para o tratamento da suspensão de farinha de soja integral (1:10 p/v) com uma preparação enzimática de *D.hansenii* UFV-1 para hidrólise dos RO. Foi

verificado que a preparação enzimática na concentração de 1,2 U/g de farinha apresentou atividade sobre os oligossacarídeos e a hidrólise total desses açúcares ocorreu após 20 h de tratamento. Após preparo das farinhas de soja desengordurada e integral, com e sem oligossacarídeos, a composição química centesimal foi determinada, assim como o conteúdo de RO presente antes e após os tratamentos. Para avaliação nutricional das farinhas obtidas após cada tratamento, verificou-se o efeito da eliminação dos RO nos parâmetros de digestibilidade, ganho de peso, consumo protéico, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR). Houve melhora significativa ($p \leq 0,05$) na digestibilidade verdadeira das dietas contendo farinhas de soja sem RO, em relação as suas correspondentes não tratadas. Porém, a remoção dos oligossacarídeos de rafinose das farinhas de soja desengordurada e integral não promoveu melhora significativa nos valores de ganho de peso, PER e NPR. A produção de ácidos graxos de cadeia curta também não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) para os animais alimentados com dieta contendo farinha de soja desengordurada ou integral com e sem oligossacarídeos de rafinose.

ABSTRACT

BRASIL, Ana Paula Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007. **Biochemical and nutritional evaluation of enzymatically processed soy flour for removal of raffinose oligosaccharides.** Adviser: Valéria Monteze Guimarães. Co-advisers: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio, Flávia Maria Lopes Passos and Sebastião Tavares de Rezende.

The raffinose oligosaccharides (RO), present in high concentrations in soy and its derivatives are considered an antinutritional factor, since they can interfere in the absorption of the diet's nutrients. In addition to that, they are most responsible for the induction of flatulence in humans and other animals. Several studies indicate that the ingestion of soy products free or with low level of these sugars can bring benefits, improving the digestion of these nutrients. Researches in this way suggest that the enzymatic hydrolysis of RO in soy derivatives seems to be an efficient strategy in reducing the content of these sugars and increasing the nutritional value of these products. The objective of this work was the production of RO-free soybean flour, using the enzymatic treatment with *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidase, and the nutritional evaluation of this product through biological assays using Wistar rats. In order to do that, two experiments were realized. In the first one, it was accomplished the verification of the activity of α -galactosidase and the hydrolysis of RO in the suspension of defatted flour (1:10 w/v) added of viable cells of *D. hansenii*. It was observed that the enzymatic activity increased with time of incubation of the yeast in the suspension of soybean flour, and the total reduction of RO was achieved after 36 h. In the second experiment, the conditions for treatment of suspension of whole soybean flour (1:10 w/v) were determined using an enzymatic preparation of *D. hansenii* UFV-1 for the RO hydrolysis. It was verified that the enzymatic preparation (1,2 U/g of flour) showed activity on the oligosaccharides and that the total hydrolysis of these sugars occurred

after 20h of treatment. After the preparation of the defatted and whole soybean flours, with and without oligosaccharides, its centesimal chemical composition was determined, as well as the RO content present after treatment. For the nutritional evaluation of the obtained flours after each treatment, it was verified the effect of the RO reduction in parameters of digestibility, weight gain, protein consumption, protein efficiency ratio (PER) and net protein ratio (NPR). It was observed a significant enhancement ($p \leq 0,05$) in true digestibility of RO-free soybean flours in relation to its non-treated correspondents. However, the withdrawal of raffinose oligosaccharides from the defatted and whole flours did not promote significant enhancement in the values of weight gain, PER and NPR. The production of short-chain fatty acids also did not statistically differ ($p \leq 0,05$) between the animals fed with defatted flour or with whole flour, with or without the raffinose oligosaccharides.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glicine max*, L.) é uma planta da família das leguminosas, com origem na China, sendo um dos produtos mais antigos cultivados pelo homem. O grão de soja contém cerca de 40% de proteína apresenta características similares às dos produtos protéicos de alto valor nutritivo, como o leite de vaca, por conter quantidade suficiente de quase todos os aminoácidos indispensáveis.

Por possuir uma fração protéica significativa a soja é utilizada na alimentação animal, principalmente na forma de farelo, e na alimentação humana na forma de farinha de soja, concentrados protéicos de soja e isolados protéicos de soja. A fração óleo é utilizada na indústria de alimentos para a produção de margarina, óleo de cozinha, agentes emulsificantes e vários outros produtos.

Além das qualidades nutricionais, estudos sugerem que a soja pode ter outros aspectos benéficos, incluindo propriedades antineoplásicas devido à presença de fitoquímicos.

Como consequência, a demanda pela soja e seus produtos derivados tem crescido e a área destinada ao seu cultivo no mundo vem aumentando a cada ano. A produção mundial total de soja, no ano safra 2005/06, foi estimada em 220 milhões de toneladas (USDA, 2007).

Entretanto, a soja também contém uma variedade de fatores antinutricionais que limitam o seu consumo, dentre os quais se destacam: inibidores de proteases, lectinas, taninos, proteínas alergênicas e pouco digeríveis, as lipoxigenases, os oligossacarídeos de rafinose (RO) e outros. A presença de açúcares não digeríveis (oligossacarídeos de rafinose) é a principal responsável pela ocorrência de flatulência, desconforto abdominal e diarreia, resultante do metabolismo anaeróbico destes açúcares.

Várias pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de reduzir ou eliminar os conteúdos de rafinose e estaquiose nas sementes de soja e em seus produtos derivados. Isto poderá ser conseguido pela manipulação de genes importantes para síntese de componentes da via de síntese dos RO ou pela hidrólise enzimática desses açúcares presentes na soja. Esta última parece ser a estratégia mais viável e eficaz uma vez que os RO exercem papel fisiológico importante durante o desenvolvimento das sementes.

A hidrólise enzimática desses açúcares pode ser catalisada pela α -galactosidase ou invertase ou ambas. A enzima α -galactosidase (α -D-galactosídeo galactohidrolase; E.C. 3.2.1.22) é encontrada em plantas, microrganismos e animais e as enzimas isoladas de fungos têm se mostrado bastante adequadas para aplicações biotecnológicas. Em vista disso, há um grande interesse no uso de α -galactosidases de leveduras para aplicação em processos industriais.

A levedura *Debaryomyces hansenii* é freqüentemente encontrada em produtos fermentados ricos em proteínas e estudos têm mostrado sua capacidade de secretar várias enzimas de interesse industrial.

Desta forma, o uso de α -galactosidases de leveduras para reduzir ou eliminar os RO presentes em produtos derivados de soja se mostra como uma alternativa racional para melhorar a qualidade nutricional destes produtos, tornando mais viável o uso da soja como fonte protéica para o consumo humano e animal.

1.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi produzir de farinhas de soja livres ou com teores reduzidos de oligossacarídeos de rafinose, através do tratamento enzimático com α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV-1, e avaliar bioquímica e nutricionalmente o produto obtido.

1.2. Objetivos Específicos

- Verificar a atividade de α -galactosidase de células viáveis de *Debaryomyces hansenii* adicionadas à suspensão de farinha de soja desengordurada (1:10 p/v);
- Obter α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii* pelo cultivo em meio contendo lactose como fonte de carbono;
- Determinar as condições para o tratamento enzimático da farinha de soja integral utilizando uma preparação enzimática de α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii*;
- Extrair e determinar os teores de rafinose e estaquiose por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas farinhas de soja tratada e não tratada enzimaticamente;
- Avaliar bioquimicamente a composição das farinhas de soja através da determinação de proteínas, lipídios, carboidratos totais, cinzas, umidade e oligossacarídeos;
- Preparar as dietas contendo farinha de soja tratada e não tratada como fonte de proteína, para avaliação por meio de ensaio biológico;
- Avaliar a qualidade protéica das farinhas tratada e não tratada, por meio de ensaio biológico com ratos, determinando-se o ganho de peso, consumo protéico, digestibilidade verdadeira, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR);
- Determinar o perfil de ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal dos animais submetidos aos tratamentos citados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Qualidade nutricional da soja e sua utilização na alimentação

A soja constitui excelente fonte de proteína para alimentação humana e animal, pois além de conter cerca de 40 % de proteína em seus grãos, estas são de elevado valor nutritivo (SGARBIERI, 1996). A composição de aminoácidos indispensáveis, quando comparada com o padrão da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO/OMS, 1985), conforme Tabela 1, indica que, com exceção dos aminoácidos sulfurados, a proteína da soja apresenta teores de aminoácidos devidamente balanceados (DE, 1971).

Tabela 1 – Padrões de aminoácidos de referência, composição em aminoácidos de proteína de soja (mg/g) e escore químico.

Aminoácidos	FAO/OMS (1985) 2-5 anos (mg/g proteína)	Soja* (mg/g)	Escore Químico
Isoleucina	28	46	1,64
Leucina	66	78	1,18
Lisina	58	64	1,10
Metionina + Cisteína	25	26	1,04
Fenilalanina + Tirosina	63	88	1,40
Treonina	34	39	1,15
Triptofano	11	14	1,27
Valina	35	46	1,31
Histidina	19	26	1,37

*Fonte: SOY PROTEIN COUNCIL, 1987.

Os aminoácidos metionina e cisteína são limitantes na proteína da soja assim como em todas as leguminosas. Mas, a proteína da soja é rica em lisina, e este aminoácido é limitado nos cereais, os quais geralmente são ricos em aminoácidos sulfurados, o que a torna uma fonte protéica ideal para complementar os cereais (LIU, 1997). Para a população do futuro, a soja

pode ser considerada um dos principais alimentos, pelas suas qualidades nutricionais, sua facilidade de cultivo, adaptação a quase todas as regiões de cultivo e alta produção (BELLAVÉR e SNIZEK, 1999).

Na economia brasileira a soja ocupa lugar de destaque. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial, produzindo cerca de 57 milhões de toneladas, no ano safra 2005/06, ficando atrás somente dos Estados Unidos que produziram 83 milhões de toneladas (USDA, 2007).

Segundo Antunes e Sgarbieri (1980) o valor da soja se deve, principalmente, às suas propriedades como alimento protéico e fonte de óleo de boa qualidade. Esta leguminosa é notável por seu conteúdo relativamente alto em lipídios. A maioria das leguminosas tem menos de 10 % de lipídios; em contraste, a soja tem aproximadamente 20 %. O ácido linoléico contribui com aproximadamente 53 % do conteúdo total dos ácidos graxos no óleo de soja, enquanto o ácido graxo essencial linolênico contribui com aproximadamente 7 a 8 % (LIU, 1997).

A fração protéica da soja tem sido utilizada também para alimentação humana na forma de farinha de soja, concentrados protéicos de soja e isolados protéicos de soja contendo respectivamente, 50 %, 70 % e 90-97 % de proteínas (MOREIRA, 1999). O extrato hidrossolúvel de soja é outro produto protéico que vem sendo utilizado particularmente como substituto ao leite de vaca e tem apresentado alta aceitabilidade em programas de nutrição infantil (MOREIRA, 1999). Tal uso é indicado para pessoas portadoras de intolerâncias ao leite de origem animal, e de algumas deficiências genéticas, como a ineficiência em metabolizar a lactose (DE LUMEN, 1992).

De acordo com Hymowitz *et al.* (1972), cerca de 8 % do total de açúcares dos grãos de soja correspondem aos açúcares livres, sendo que destes 60 % correspondem à sacarose, 4 % à rafinose e 36 % à estaquiose.

Algumas substâncias encontradas na soja estão sendo reconhecidas por sua poderosa capacidade em prevenir câncer e outras doenças em humanos. Segundo Liu (1997), a soja é uma fonte rica em fitoquímicos, muitos dos quais têm efeitos benéficos importantes na saúde humana e animal. Estes incluem compostos que são encontrados na soja em concentrações muito maiores do que em outros alimentos, como os

isoflavonóides, e compostos que são importantes na prevenção de doenças crônicas, como a vitamina E. A soja é indicada no tratamento de vários problemas de saúde da mulher no período pré e pós-menopausa, como na prevenção e tratamento de osteoporose, em algumas doenças renais, fibrose cística, doenças inflamatórias, doenças imunes, câncer e hipertensão (BARNES *et al.*, 1999).

2.2. Processamento industrial da soja

Processos industriais convertem grãos integrais de soja em produtos como tofu, miso, condimento, molho, algumas farinhas crocantes, leite de soja e outros. Esses grãos são selecionados, limpos, secos e quebrados para remoção da casca ou tegumento. Após remoção da casca, os processadores convertem os grãos de soja em flocos contendo óleo. Os flocos podem ser usados em alimentação animal, ou podem ser processados em farelo contendo óleo, que são utilizados em vários alimentos comerciais para uso humano (LIMA, 1999).

Flocos contendo óleo são imersos em solvente para extração de óleo que é então degomado para separação da lecitina. Lecitina é um agente emulsificante, que depois de processada é usada em produtos lácteos e alimentos instantâneos. O óleo extraído da soja é usado para produzir óleo de cozinha, margarina e outros. Após extração do óleo, o solvente é removido e reciclado e os flocos são secos, produzindo um produto com alto teor protéico e essencialmente livre de óleo, conhecido como flocos de soja desengordurados. Esses flocos são triturados produzindo o farelo de soja que é usado em ração animal, principalmente para aves domésticas, suínos, gado e culturas aquáticas (LIMA, 1999).

Os flocos desengordurados também podem ser processados, sendo moídos e peneirados, produzindo a farinha de soja desengordurada. Farinha de soja contém proteína, melhora a cor e aumenta o prazo de armazenamento de produtos de panificação (MOREIRA, 1999). A farinha de soja pode ser utilizada para produção de concentrados protéicos de soja que são usados em bebidas protéicas, como base para sopas e molhos, contém aproximadamente 70 % de proteína, e mantém a maioria das fibras. A

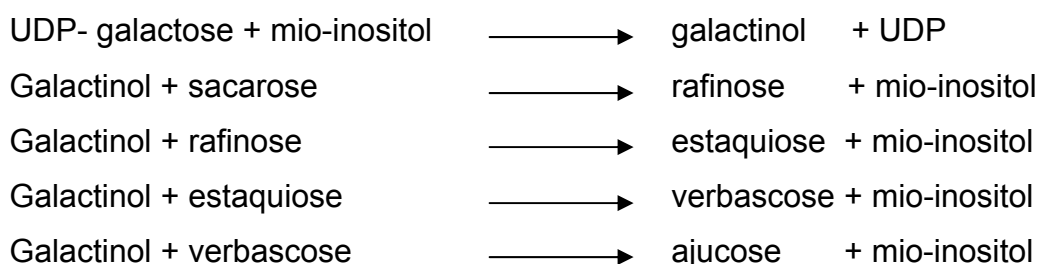
farinha de soja pode também ser processada produzindo os isolados protéicos de soja, que contêm em torno de 90 % de proteína, baixa umidade, fornece textura para produtos como carne de soja e são usados por suas qualidades emulsificantes em muitos produtos incluindo queijo e leite, sobremesas congeladas e outros. Isolados protéicos são também a fonte protéica primária em uma variedade de bebidas dietéticas (GOLBITZ, 2003).

O teor de RO é bastante elevado, principalmente nos produtos de soja produzidos a partir dos grãos integrais como leite de soja e tofu. Produtos mais processados como farelo e farinha de soja também apresentam altas concentrações. Um subproduto importante da indústria de processamento de soja é o melaço de soja, que é rico em isoflavonas, mas não é consumido devido ao elevado teor desses oligossacarídeos (NIELSEN, 1996).

2.3. Biossíntese e papel fisiológico dos oligossacarídeos de rafinose

Os oligossacarídeos são a fonte primária de energia e substratos para a síntese de outros compostos durante a germinação das plantas (JIMÉNEZ *et al.*, 1985). Entre estes, os oligossacarídeos de rafinose (RO) são amplamente encontrados no reino vegetal em uma variedade de sementes, nas quais são componentes dos carboidratos de reserva, sendo os segundos carboidratos solúveis mais abundantes nas plantas (MINORSKY, 2003).

Os RO são sintetizados durante a formação das sementes, e hidrolisados durante o processo de germinação (KANDLER e HOLF, 1980; SARAVITZ *et al.*, 1987). De acordo com Dey (1985), a via metabólica de síntese dos RO pode ser representada como se segue:



Um esquema da via de síntese dos oligossacarídeos, bem como das

enzimas envolvidas, está representado na Figura 1.

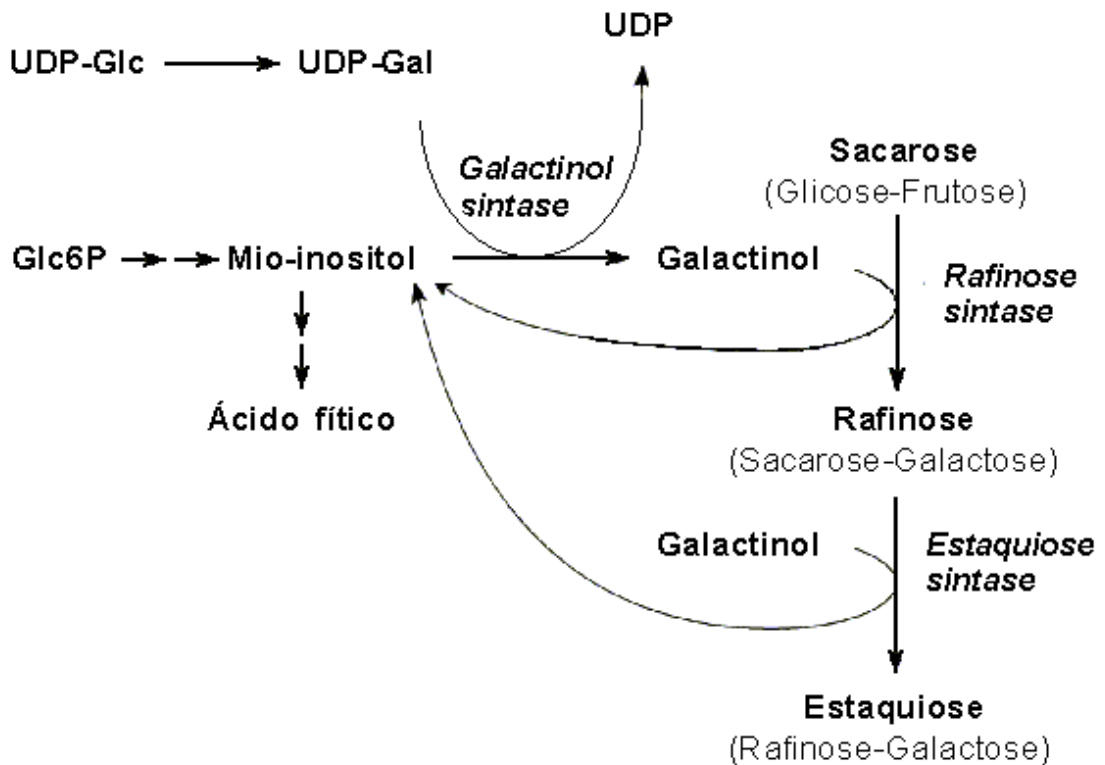


Figura 1- Esquema da via metabólica de síntese dos oligossacarídeos de rafinose. Fonte: SUAREZ *et al.* (1999).
 UDP-Glc: uridina difosfato-glicose; UDP-Gal: uridina difosfato-galactose; UDP: uridina difosfato; Glc-6P: glicose- 6 –fosfato.

A enzima galactinol sintase (GS) (UDP- α -D-gal:1-L-mio-inositol-1-O- α -D-galactopiranosiltransferase, E.C. 2.4.1.123), que requer Mn^{+2} para sua atividade, catalisa a primeira reação na via de síntese dos RO, produzindo galactinol a partir de UDP-galactose e mio-inositol (LIU *et al.*, 1995). A atividade de GS, em folhas e sementes, correlaciona-se positivamente com os níveis de RO e esta enzima parece regular os níveis de oligossacarídeos de reserva em partes específicas das plantas (CASTILLO *et al.*, 1990). Subseqüente à primeira reação, sintases específicas catalisam a síntese de cada oligossacarídeo da série por meio da transferência do galactinol para a sacarose, a rafinose, a estaquiase e a verbascose, com a produção de α -1,6-galactosídeos, tri, tetra, penta e hexassacarídeos de rafinose (RIBEIRO, 2001).

Durante o desenvolvimento da planta a rafinose acumula-se nos órgãos de reserva. Ocorre um aumento na concentração de rafinose nas

sementes em maturação devido à perda de água durante este processo (DEY, 1985). Este açúcar por sua vez é degradado em galactose e sacarose durante a germinação. A estaquiose é um dos mais abundantes tetrassacarídeos em plantas (DEY, 1985) e é reconhecida como o maior açúcar de reserva e transporte em leguminosas. Verbascose e ajucose são os penta e hexassacarídeos, respectivamente. Estes oligossacarídeos coexistem com rafinose e estaquiose na maioria das leguminosas e estão presentes em órgãos de reserva (DEY, 1985).

Os RO têm importantes funções nas plantas servindo como metabólitos de transporte em muitas leguminosas e desempenhando papel protetor contra o frio. Além disso, conferem tolerância à dessecação durante a maturação da semente, sendo que estas respostas a estresses são ocasionadas pelo resultado da ação dos RO como agentes protetores das proteínas de membrana (JONES *et al.*, 1999).

2.4. Oligossacarídeos de rafinose e distúrbios intestinais

A ingestão de soja e seus produtos derivados pode resultar em flatulência, náuseas, desconforto abdominal e diarreia, devido ao alto conteúdo de oligossacarídeos de rafinose (WAGNER *et al.*, 1976). Isto ocorre, pois a mucosa do intestino delgado de humanos e de outros animais monogástricos é desprovida das α -1,6-galactosidases, enzimas necessárias à conversão dos RO em açúcares mais simples. Assim, 100 % dos RO não sofrem degradação e são conduzidos à parte posterior do intestino, onde são fermentados por bactérias anaeróbias com a liberação de grande quantidade de CO₂, H₂ e CH₄ fenômeno este conhecido como flatulência intestinal e que está associado com cólicas, diarreia, dispepsia e constipação (DE LUMEN, 1992; SUAREZ *et al.*, 1999; KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2005).

Vários estudos sugerem que a conversão enzimática dos RO presentes no leite de soja e outros derivados parece ser a estratégia mais eficaz para reduzir os RO e aumentar seu valor nutricional (CRUZ e PARK, 1982; GUIMARÃES *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2005; VIANA *et al.*, 2006). Experimentos realizados, principalmente com animais monogástricos,

demonstraram que o uso de α -galactosidase em dietas a base de soja melhora o ganho de peso e a digestibilidade das proteínas e reduz a flatulência (BAUCELLS *et al.*, 2000; SMIRICKY *et al.*, 2002).

2.5. Processos para redução dos oligossacarídeos de rafinose em produtos derivados de soja

Vários processos têm sido empregados na tentativa de 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; VIANA *et al.*, 2005), processos de fermentação (MITAL e STEINKRAUS, 1975) e extração dos oligossacarídeos com água (KU *et al.*, 1976). Técnicas como ultrafiltração do extrato hidrossolúvel de soja para remoção destes oligossacarídeos de rafinose (OMOSAIYE *et al.*, 1978), e de extração desses açúcares com etanol a partir da farinha de soja (LESKE *et al.*, 1991) também foram testadas. Entretanto os processamentos tradicionais dos produtos derivados de soja e de outras leguminosas não eliminam esses oligossacarídeos termoestáveis (NACZK *et al.*, 1997).

A hidrólise dos oligossacarídeos de rafinose pode ser catalisada pelas α -galactosidase ou invertase, ou ambas. A primeira enzima catalisa a hidrólise de ligações α -1,6 produzindo D-galactose e sacarose e, as invertases (β -D- frutofuranosídeo frutohidrolase, E.C. 3.2.1.26) hidrolisam ligações β -1,2 produzindo melibiose e D-frutose ou D-glicose e D-frutose (Figura 2). Existem vários relatos na literatura sobre a utilização de α -galactosidase de origem vegetal e microbiana na degradação dos oligossacarídeos presentes no leite de soja e em farinhas obtidas de soja (MULIMANI *et al.*, 1997; GUIMARÃES *et al.*, 2001).

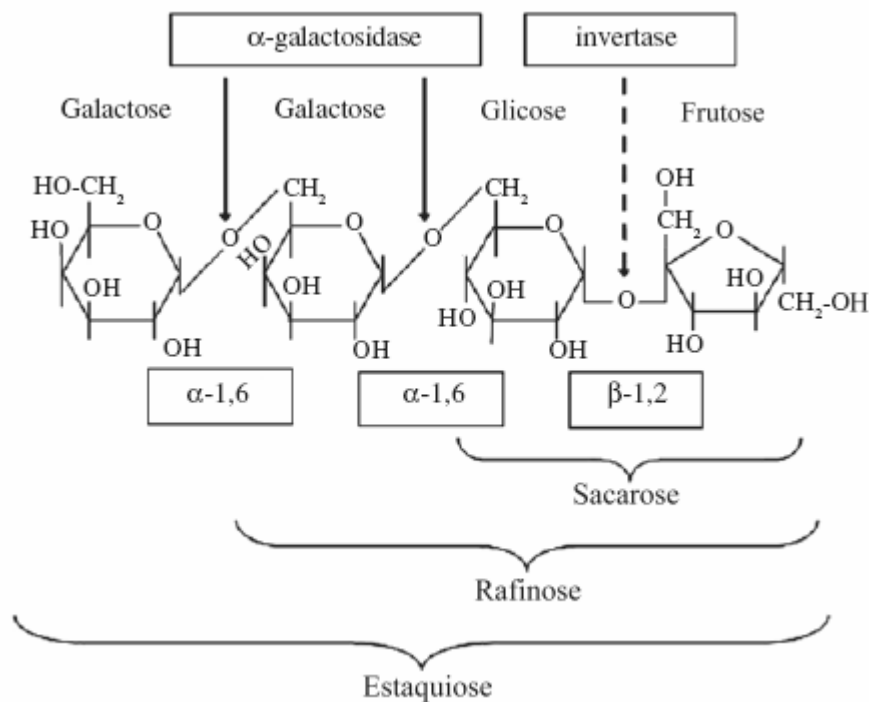


Figura 2- Oligossacarídeos de rafinose e sítios de clivagem das enzimas hidrolíticas. Fonte: LEBLANC *et al.* (2004b).

Processos para o tratamento enzimático do leite de soja utilizando α -galactosidases fúngicas foram propostos por Sugimoto e Van Bauren (1970) que usaram preparações comerciais de α -galactosidases de *Aspergillus saitoi* e verificaram a hidrólise desses açúcares após 3 h de incubação com a enzima. Thananunkul *et al.* (1976) utilizaram micélios de *Mortierella vinacea* imobilizados em gel de poliacrilamida como fonte de α -galactosidase para remoção dos RO do leite de soja. Posteriormente, Mulimani *et al.* (1995) avaliaram a capacidade de hidrólise dos RO do leite de soja pela α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi*. O efeito de α -galactosidases extracelulares produzidas por *Lactobacillus plantarum* na qualidade nutricional do leite de soja e derivados também foi avaliado por Sanni *et al.* (1997). Scalabrini *et al.* (1998) testaram a fermentação do leite de soja por cepas de *Bifidobacterium* e avaliaram a capacidade de redução dos RO. A produção de α -galactosidase pelo fungo *Aspergillus fumigatus* foi estudada por de Rezende (1998). Viana *et al.* (2006) observaram completa redução no conteúdo de rafinose e estaquiose no leite de soja após

incubação com α -galactosidase extracelular da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1.

Estudos sobre a utilização de α -galactosidases de vegetais na hidrólise dos RO em produtos derivados de soja, também têm sido desenvolvidos. Cruz e Silva (1986) testaram a redução dos RO no leite de soja pela adição de pequenas proporções de grãos de soja germinados na formulação do produto, mas não observaram decréscimo substancial de rafinose e estaquiose. Utilizando sementes em germinação de *Cassia sericea* Sw., como fonte de α -galactosidases para hidrólise dos RO, Bhaskar *et al.* (1990) demonstraram que melibiose e rafinose eram hidrolisadas, entretanto a hidrólise de estaquiose não pôde ser detectada. A utilização de α -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* para redução dos RO também foi avaliada por Mulimani *et al.* (1997) que concluíram que o tratamento de farinha de soja com extrato bruto contendo α -galactosidase foi eficiente na redução de rafinose e estaquiose. Guimarães *et al.* (2001) demonstraram redução dos RO do leite de soja após tratamento com α -galactosidase purificada de sementes de soja germinadas. Viana *et al.* (2005) observaram que α -galactosidase parcialmente purificada de sementes de soja em germinação reduziram o conteúdo de estaquiose e rafinose, no leite de soja, em 72,3 e 89,2 %, respectivamente, após incubação por 6 h a 40 °C.

Em vista disso, várias pesquisas então sugerem que a hidrólise enzimática dos RO presentes no leite de soja e outros derivados parece ser a estratégia mais eficiente para reduzir o conteúdo desses açúcares e aumentar o valor nutricional desses produtos (GUIMARÃES *et al.*, 2001), uma vez que os tratamentos enzimáticos são extremamente específicos, causando menor alteração nas proporções dos demais componentes dos derivados de soja (VIANA, 2005).

2.6. α -Galactosidases: definição e importância comercial

As α -galactosidases estão amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais (KIM *et al.*, 2002). Estas enzimas pertencem à classe das hidrolases e constituem um grupo de

exoglicosidases que catalisam a clivagem hidrolítica de resíduos terminais de D-galactose em ligação alfa (α). Estas enzimas hidrolisam D-galactosídeos simples, bem como moléculas complexas como oligo e polissacarídeos, glicoproteínas e outros derivados (MANZANARES *et al.*, 1998). Os genes de α -galactosidases estão classificados em 3 famílias distintas de glicosil hidrolases, baseado na similaridade da estrutura primária e análise de *clusters* hidrofóbicos. A família 27 de glicosil hidrolases é muito conservada, incluindo α -galactosidases eucarióticas de plantas, animais, leveduras e fungos filamentosos, que são geralmente menores ou até mesmo monômeros (ADEMARK *et al.*, 2001). A família 36 contém principalmente α -galactosidases bacterianas, mas também algumas α -galactosidases eucarióticas que se caracterizam por serem enzimas grandes com estrutura tetramérica (HENRISSAT e BAIROCH, 1993; MARGOLLES-CLARK *et al.*, 1996). A família 4 é caracterizada por conter, até o momento, somente α -galactosidases bacterianas. As diferenças estruturais entre essas enzimas podem contribuir para diferenças na atividade (LUONTERI *et al.*, 1998).

As α -galactosidases são enzimas que têm uma grande importância comercial devido a 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. α -Galactosidases promovem a conversão de galactoligossacarídeos não digeríveis, considerados fatores antinutricionais indutores de flatulência, presentes em várias leguminosas, em açúcares digeríveis (GUIMARÃES *et al.*, 2001). Produtos de soja hidrolisados com as α -galactosidases, como farinha e leite de soja, apresentam melhores propriedades nutricionais e não induzem o fenômeno de flatulência, 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 galactoligossacarídeos (DE REZENDE e GUIMARÃES, 2004).

Além da utilização das α -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 α -galactosidases de eucariotos são capazes de remover resíduos de galactose com ligação α -1,3 terminal de glucanas, o que representa 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). Na indústria de papel e celulose, as α -galactosidases vêm sendo utilizadas em alguns processos, principalmente para hidrólise enzimática de hemiceluloses como galactomananas (BULPIN *et al.*, 1990), em substituição ao uso de agentes químicos, para redução da poluição ambiental. Outra aplicação industrial de α -galactosidases é na usina açucareira, onde pequenas quantidades de rafinose são convertidas em sacarose, pois a presença do açúcar rafinose afeta a cristalização da sacarose (KOBAYASHI e SUZUKI, 1972).

Diversos estudos vêm sendo realizados para identificação de novas fontes de α -galactosidases e também sugerem futuras aplicações dessas enzimas nativas ou recombinantes em vários outros processos biotecnológicos.

2.7. α -Galactosidases de leveduras

A α -galactosidase é uma enzima largamente distribuída na natureza e dentre os microrganismos que a produzem incluem-se bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, caracteristicamente esféricos ou ovais. Dentre as leveduras que produzem α -galactosidase as dos gêneros *Torulaspóra*, *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* são as mais utilizadas (DE REZENDE e GUIMARÃES, 2004). A produção dessa enzima consiste no crescimento do microrganismo em meio de cultura seletivo, geralmente meio líquido contendo uma fonte de carbono indutora da atividade enzimática. Açúcares como galactose, melibiose, rafinose e estaquiose já foram descritos como indutores da atividade de α -galactosidase. Outras fontes de carbono mais complexas

como galactomananas e até farelo de trigo também induziram a atividade desta enzima (DE REZENDE, 1998).

Leveduras como *Debaryomyces castellii* IFO 1359, *Debaryomyces nepalensis* IFO 1428, *Pichia guillermondii* IFO 10106, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1997 e *Schwanniomyces occidentalis* var. *occidentalis* IFO 1839 apresentam α -galactosidases intra e extracelulares, enquanto que apenas α -galactosidase intracelular foi produzida por *Candida guillermondii* IFO 0566 e *Lipomyces starkeyi* IFO 10383 (YOSHIDA *et al.*, 1997). Segundo Viana *et al.* (2006) a levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-1 produz α -galactosidases intra e extracelulares quando cultivada em meio contendo galactose.

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).

2.8. Considerações sobre a levedura *Debaryomyces hansenii*

A levedura *Debaryomyces hansenii* é a espécie mais freqüentemente encontrada em produtos fermentados ricos em proteínas como: salsichas e queijo (COOK, 1995; ENCINAS *et al.*, 2000; PETERSEN *et al.*, 2002) e junto com *S. cerevisiae* metabolizam ácidos orgânicos e aminoácidos, regulando a acidez de produtos fermentados e também possuem atividades lipolíticas e proteolíticas, contribuindo assim para o desenvolvimento do *flavor* (COOK, 1995).

Esta levedura é capaz de converter D-xilose em xilitol sendo este produto de grande interesse para as indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica (ROSEIRO *et al.*, 1991; PARAJÓ *et al.*, 1995; SAMPAIO *et al.*, 2005).

D. hansenii é capaz de utilizar misturas de pentoses e hexoses (glicose-manose, xilose-arabinose, glicose-xilose) como fonte única de carbono (NOBRE *et al.*, 1999).

Em estudos realizados por Viana (2005), para a seleção de fontes microbianas produtoras de α -galactosidases, foi observado que a levedura *D. hansenii* foi capaz de crescer em diferentes meios de cultura contendo hexoses, di e trissacarídeos. O açúcar lactose foi o que induziu maior atividade de α -galactosidase extracelular nos diferentes meios. Rafinose, melibiose e galactose também induziram a atividade da α -galactosidase extracelular.

Este autor utilizou galactose, como fonte de carbono, para promover o crescimento de *D. hansenii* e a indução da atividade das enzimas α -galactosidases intra e extracelulares, para posterior purificação e caracterização enzimática. A alta atividade das α -galactosidases foi detectada utilizando o substrato *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (*p*-NP- α Gal), tanto no sobrenadante da cultura quanto nas células previamente permeabilizadas. As atividades máximas das α -galactosidases extracelulares de *D. hansenii* foram detectadas em pH 5,0 e a 60 °C. Os valores da K_M da enzima extracelular para *p*-NP- α Gal, melibiose, estaquiose e rafinose foram de 0,30, 2,01, 9,66, 16 mM, respectivamente. A seqüência N-terminal da α -galactosidase extracelular de *D. hansenii* foi determinada como YENGLNLVPQMGWN. Tanto a enzima extracelular quanto as células permeabilizadas contendo a α -galactosidase intracelular foram capazes de hidrolisar os RO presentes em produtos de soja.

2.9. Avaliação nutricional de produtos de soja com baixos teores de oligossacarídeos de rafinose

A performance nutricional de animais alimentados com produtos à base de soja é influenciada pela presença de fatores antinutricionais, como os RO (LIENER, 1981; ANDERSON e WOLF, 1995). Fatores antinutricionais são substâncias complexas que, quando presentes em alimentos, podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de

nutrientes interferindo negativamente no desempenho produtivo e reprodutivo do animal (SILVA e SILVA, 2000). Nesse sentido, a ação antinutricional dos RO está relacionada com o fato desses açúcares serem responsáveis pelo 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 de produtos de soja contendo oligossacarídeos de rafinose também pode resultar em flatulência, náuseas, desconforto abdominal e diarreia (WAGNER *et al.*, 1976). Liying *et al.* (2003) reportaram um aumento na incidência de diarreia e um decréscimo de 0,08 Kg/dia no ganho de peso corporal em porcos quando 2 % de estaquiose foi adicionada à dieta. Smiricky-Tjardes *et al.* (2003) avaliando os efeitos da presença de RO na dieta de porcos verificaram uma redução de 5 % na digestibilidade de nitrogênio quando 3,5 % desses açúcares foi adicionado à dieta.

Vários estudos têm mostrado que a ingestão de produtos de soja livres ou com teores reduzidos desses açúcares solúveis traz efeitos benéficos, reduzindo a viscosidade do bolo alimentar e melhorando a digestão de nutrientes (SMIRICKY *et al.*, 2002; LESKE *et al.*, 1991; COON *et al.*, 1990).

Suarez *et al.* (1999) relataram a ocorrência de menor flatulência em humanos quando estes ingeriam farinha de soja derivada de sementes com baixos teores de RO. Parsons *et al.* (2000) observaram que o valor da energia líquida metabolizável da dieta foi maior quando frangos de corte foram alimentados com farinha de soja contendo baixas concentrações de oligossacarídeos (2.931 Kcal/Kg) comparada a farinha de soja convencional (2.739 Kcal/Kg). Resultados semelhantes foram encontrados por Leske *et al.* (1991). Coon *et al.* (1990) observaram que a redução dos RO da farinha de soja, usada na dieta de aves, aumentou o valor da energia metabolizável em 20 %.

Entre os vários processos para redução ou eliminação dos RO visando aliviar os efeitos antinutricionais desses açúcares estão a

suplementação da dieta com α -galactosidases (IGBASAN *et al.*, 1997; SMIRICKY *et al.*, 2002) ou a fermentação de produtos de soja por microrganismos produtores dessa enzima (LEBLANC *et al.*, 2004a; DONKOR *et al.*, 2007).

Veldman *et al.* (1993) e Gdala *et al.* (1997) relataram que quando a dieta de porcos foi suplementada com α -galactosidase a digestibilidade ileal da rafinose aumentou levando a uma maior absorção de monossacarídeos no intestino. Baucells *et al.* (2000) relataram que o uso de α -galactosidase em dietas a base de soja melhorou o ganho de peso e a digestibilidade das proteínas e reduziu a flatulência em porcos. Resultados obtidos por LeBlanc *et al.* (2004a) mostraram que ratos alimentados com leite de soja fermentado por *Lactobacillus fermentum* CRL 722 apresentaram uma redução no peso do ceco e no metabolismo microbiano confirmando que a fermentação dos produtos de soja por microrganismos produtores de α -galactosidase reduz a quantidade de RO e conseqüentemente a produção de gases.

Entretanto a remoção dos RO dos produtos de soja ainda tem resultados controversos, pois alguns autores não relatam efeitos benéficos no valor nutricional da soja decorrente deste processamento. Irish *et al.* (1995) não observaram nenhum efeito na digestibilidade ileal das proteínas quando, à dieta de frangos, foi adicionada a enzima α -galactosidase. Resultados obtidos por Smiricky *et al.* (2002) mostraram que a digestibilidade da maioria dos aminoácidos em suínos alimentados com dieta à base de farinha de soja não foi melhorada pela adição de α -galactosidase. Nestes casos os autores sugeriram que essas variações nos resultados podem ter sido devido a diferenças nas fontes produtoras e na atividade das enzimas utilizadas.

Alguns autores até mesmo relataram um efeito benéfico dos RO atuando com prébióticos por aumentar a concentração de bactérias benéficas (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e diminuir a população de enterobactérias no intestino (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2005).

Em vista disso, um melhor entendimento do efeito da presença dos RO em produtos derivados de soja pode levar a uma melhora no valor nutricional e até mesmo a um maior aproveitamento dos mesmos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Enzimologia e de Análises Bioquímicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

Os reagentes rafinose, estaquiose, p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p -NP- α Gal) foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

Da Merck S.A. Indústrias Químicas foram obtidas os seguintes reagentes: p -nitrofenol (p -NP), sacarose, glicose, lactose, ácido meta fosfórico.

Da RHOSTER – Indústria e Comércio Ltda. foram adquiridos os seguintes componentes das dietas experimentais: caseína, amido dextrinizado, celulose, mistura salínica, mistura vitamínica, L-cistina, bitartarato de colina.

Sacarose, óleo de soja e amido de milho foram adquiridos no comércio local.

Os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho apresentavam procedência e grau de pureza analíticos.

A variedade de soja UFVTN 105, sem lipoxigenases, foi fornecida pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO).

A farinha de soja desengordurada (PS 60) foi fornecida pela empresa BUNGE Alimentos S.A., Esteio-RS, Brasil.

3.1. Microrganismo e manutenção da cultura

A fonte de α -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 e foi isolada de ambiente de laticínios da região da Zona da Mata, Minas Gerais. Esta levedura foi 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 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. Cultivo de *Debaryomyces hansenii* em meio YPD

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. Após esse período, o meio foi centrifugado a 4000 g, por 5 min, 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com água peptonada 0,1 % (p/v) para serem então inoculadas em suspensão de farinha de soja desengordurada ou em outro meio apropriado para indução da síntese de α -galactosidase.

3.3. Determinação das condições para o tratamento da suspensão de farinha de soja desengordurada com células viáveis de *Debaryomyces hansenii*

Para determinação da concentração inicial de células da levedura a serem inoculadas na suspensão de farinha de soja desengordurada, a farinha de soja desengordurada foi ressuspensa em dois erlenmeyers de 250 mL, em água destilada na proporção de 1:10 (p/v), homogeneizada em

agitador magnético por 10 min e estas suspensões foram autoclavadas a 121 °C por 15 min. As células de *D. hansenii*, obtidas conforme descrito no item 3.2, foram então inoculadas (concentração inicial equivalente a A_{600} de 0,1 e 0,5, em cada erlenmeyer) nessas suspensões. Cada erlenmeyer contendo aproximadamente 5 g da farinha de soja desengordurada reconstituída foi incubado em Incubator Shaker Series 25D New Brunswick a 200 rpm, 30 °C por 72 h. Alíquotas de 2 mL foram retiradas de 12 em 12 h, para determinação da atividade de α -galactosidase. O experimento foi realizado em triplicata.

Foi determinada também a condição de aeração no erlenmeyer contendo a suspensão de farinha de soja desengordurada inoculada com células viáveis da levedura, para otimizar a hidrólise dos RO. Para isto, a farinha de soja desengordurada foi ressuspensa, em dois erlenmeyers de 2000 mL, em água destilada na proporção de 1:10 (p/v), homogeneizada em agitador magnético por 10 min e estas suspensões foram autoclavadas a 121 °C por 15 min. As células de *D. hansenii*, obtidas conforme descrito no item 3.2, foram então inoculadas (concentração inicial equivalente a A_{600} de 0,2) nessas suspensões. Um erlenmeyer continha aproximadamente 500 mL da suspensão de farinha de soja desengordurada inoculada com a levedura e o segundo continha aproximadamente 1000 mL. Esses erlenmeyers foram incubados em Incubator Shaker Series 25D New Brunswick a 200 rpm, 30 °C por 72 h. Alíquotas de 2 mL foram retiradas de 12 em 12 h, para determinação da porcentagem de hidrólise dos RO. As alíquotas foram liofilizadas em liofilizador Edwards Super Modulyo e os RO extraídos de 20-30 mg do pó obtido. A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes na suspensão de farinha de soja, em função do tempo de incubação com a levedura. O experimento foi realizado em triplicata.

3.4. Tratamento da suspensão de farinha de soja desengordurada com células viáveis de *Debaryomyces hansenii*

A farinha de soja desengordurada foi ressuspensa, em erlenmeyer de 250 mL, em água destilada na proporção de 1:10 (p/v), homogeneizada

em agitador magnético por 10 min e esta suspensão foi autoclavada a 121 °C por 15 min. As células de *D. hansenii*, obtidas conforme descrito no item 3.2, foram então inoculadas (concentração inicial equivalente a A_{600} de 0,2) nessa suspensão. Cada erlenmeyer contendo aproximadamente 5 g da farinha de soja desengordurada reconstituída foi incubado em Incubator Shaker Series 25D New Brunswick a 200 rpm, 30 °C por 72 h. Alíquotas de 2 mL foram retiradas de 12 em 12 h, para determinação da atividade de α -galactosidase e da porcentagem de hidrólise dos RO. O experimento foi realizado em triplicata. As alíquotas foram liofilizadas em liofilizador Edwards Super Modulyo e os RO extraídos de 20-30 mg do pó obtido. A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes na suspensão de farinha de soja, em função do tempo de incubação com a levedura.

3.5. Produção da farinha de soja desengordurada tratada e não tratada com células viáveis de *Debaryomyces hansenii*

Cerca de 50 g de farinha de soja desengordurada foram ressuspendidas, em erlenmeyers de 2000 mL, em água destilada na proporção de 1:10 (p/v) e homogeneizada em agitador magnético por 10 min. Em seguida esta suspensão foi autoclavada a 121 °C por 15 min para esterilização e inativação de outros fatores antinutricionais como os inibidores de protease (FLEMING e LEE, 1983). A suspensão de farinha de soja autoclavada foi inoculada com cultura ativa de *D. hansenii* resultando numa concentração inicial equivalente a A_{600} de 0,2 e foi em seguida incubada em Incubator Shaker Series 25D New Brunswick a 200 rpm, 30 °C por 36 h. Após esse tempo o conteúdo dos erlenmeyers foi congelado a -80 °C e posteriormente liofilizado em liofilizador Edwards Super Modulyo para obtenção da farinha de soja desengordurada tratada (farinha de soja desengordurada sem oligossacarídeos) para ser usada como fonte protéica da dieta (D1) utilizada no ensaio biológico. A produção foi realizada num total de 4000 mL.

A farinha de soja desengordurada não tratada (farinha de soja desengordurada com oligossacarídeos), utilizada como fonte protéica da

dieta (D2), foi preparada da mesma forma como descrito anteriormente, exceto que a suspensão de farinha de soja após autoclavagem não foi adicionada de células da levedura.

3.6. Preparo da farinha de soja integral variedade UFVTN 105

Os grãos de soja variedade UFVTN 105 previamente selecionados foram limpos e submetidos a um tratamento térmico a 80 °C por 5 min em calor seco para facilitar a retirada da casca. Os grãos secos, após resfriamento, foram triturados em moinho de café e o pó resultante da moagem foi passado em peneira Granutest número 40, abertura 0,42 mm, 32 mesh para padronizar o tamanho de suas partículas. Em seguida, a farinha obtida foi submetida a um tratamento térmico a 140 °C por 20 min em calor seco para inativação de outros fatores antinutricionais presentes na soja como os inibidores de protease. Após o resfriamento, a farinha foi acondicionada em embalagens de polietileno e mantida sob refrigeração. Neste trabalho esta farinha de soja integral variedade UFVTN 105 será denominada farinha de soja integral.

3.7. Avaliação do índice de urease da farinha de soja integral

Essa metodologia consiste em medir a variação de pH provocada pela ação da urease em uma solução de uréia sob condições controladas.

Foi utilizada metodologia segundo Baker e Mustakas (1973). Para cada determinação de variação de pH foram utilizados um tubo controle e um tubo teste, ambos contendo 0,2 g ($\pm 0,001$) de amostra. Foram adicionados 10 mL da solução tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0 ao tubo branco e 10 mL de solução de uréia tamponada ao tubo teste, sendo estes devidamente tampados e acondicionados em banho-maria a 30 °C. Os tubos foram agitados a cada 5 min e retirados do banho-maria após 30 min de incubação. O conteúdo de cada tubo foi transferido para béqueres e o pH medido em potenciômetro devidamente calibrado. O índice de urease consiste na diferença de pH entre os tubos branco e teste. Para cada tratamento o teste foi realizado em duplicata.

3.8. Produção da preparação enzimática de α -galactosidase pelo cultivo de *Debaryomyces hansenii* em meio apropriado

Inicialmente, a levedura *Debaryomyces hansenii* foi ativada em meio YPD líquido conforme descrito no item 3.2.

As células de *D. hansenii* foram então inoculadas (concentração inicial equivalente a A_{600} de 0,1) em meio mineral contendo 0,62 g/L KH_2PO_4 ; 2,0 g/L K_2HPO_4 ; 1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 g/L extrato de levedura e lactose como fonte de carbono. Após incubação a 30 °C, 200 rpm por 27 h em Incubator Shaker Series 25D New Brunswick as células foram separadas por centrifugação a 4000 g, 5 min, a 4 °C e o sobrenadante contendo α -galactosidase foi congelado a -20 °C para posterior hidrólise dos RO na farinha de soja integral.

3.9. Hidrólise dos RO na farinha de soja integral

A farinha de soja integral foi ressuspensa na preparação enzimática de α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii*, contendo 0,12 U/mL, na proporção de 1:10 (p/v) e homogeneizada em agitador magnético por 10 min. Porções de aproximadamente 5 g da farinha reconstituída foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL em triplicata. Os erlenmeyers foram incubados em Incubator Shaker Series 25D New Brunswick a 100 rpm, 50 °C por 24 h. Alíquotas de 1 mL foram retiradas de 2 em 2 h, para determinação da porcentagem de hidrólise dos RO presentes na farinha de soja. As alíquotas foram liofilizadas em liofilizador Edwards Super Modulyo e os RO extraídos de 20-30 mg do pó obtido. A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes na farinha de soja, em função do tempo de incubação com a enzima.

3.10. Produção da farinha de soja integral tratada e não tratada com a preparação enzimática de α -galactosidase de *D. hansenii*

A farinha de soja integral foi ressuspensa na preparação enzimática de α -galactosidase de *D. hansenii*, contendo 0,12 U/mL, na proporção de 1:10 (p/v) e homogeneizada em agitador magnético por 10 min. Porções de 1000 mL foram transferidas para erlenmeyers de 2000 mL, sendo em seguida incubados em Incubator Shaker Series 25D New Brunswick a 100 rpm, 50 °C por 20 h. Após esse tempo o conteúdo dos erlenmeyers foi congelado a -80 °C e posteriormente liofilizado em liofilizador Edwards Super Modulyo para obtenção da farinha de soja integral tratada (farinha de soja integral sem oligossacarídeos) para ser usada como fonte protéica da dieta (D3) utilizada no ensaio biológico. A produção foi realizada num total de 4000 mL.

A farinha de soja integral não tratada (farinha de soja integral com oligossacarídeos), utilizada como fonte protéica da dieta (D4), foi preparada da mesma forma como descrito anteriormente, exceto que a farinha de soja foi ressuspensa na preparação enzimática de α -galactosidase previamente aquecida a 80 °C por 30 min para inativação da enzima.

3.11. Determinação da atividade de α -galactosidase

A atividade de α -galactosidase foi avaliada através da medida da taxa de conversão do substrato sintético p -NP- α Gal. A mistura de reação continha 650 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 μ L de solução de p -NP- α Gal 2mM e 0-100 μ L do extrato enzimático. A reação foi conduzida por 15 min em banho-maria a 40 °C e interrompida pela adição de 1 mL de solução 0,5 M de Na₂CO₃. Os valores de absorbância a 410 nm foram transformados em μ moles de p -nitrofenol (p -NP), utilizando uma curva padrão construída com 0-0,2 μ moles de p -NP a partir de uma solução estoque de concentração 2 μ moles/mL. Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de proteína necessária para produzir 1 μ mol de p -NP por minuto, nas condições de ensaio.

3.12. Determinação da atividade de invertase

Os ensaios para determinação da atividade de invertase foram realizados com o uso do reagente dinitrossalicilato (MILLER, 1956). O sistema de ensaio constituiu-se de 0-100 μ L do extrato enzimático, 250 μ L de solução de sacarose a 1% (p/v) e 650 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. O ensaio foi conduzido por 20 min, a 40 °C. Após esse período, foi acrescentado 1 mL do reagente DNS e a amostra foi fervida por 5 min. A quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando-se uma curva padrão construída com glicose. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

3.13. Extração dos RO

A extração dos RO, após liofilização, das suspensões de farinha de soja tratada e não tratada foi realizada 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. A fração óleo, presente nas amostras foi retirada em 4 extrações com 1 mL de éter de petróleo em banho-maria a 42 °C por 5 min. Os açúcares foram então extraídos em 3 etapas de tratamento com etanol 80 %, em banho fervente por 5 min. Após cada extração feita com éter de petróleo ou álcool 80 %, a mistura foi submetida à centrifugação em centrífuga modelo Eppendorf 5415C, 14.000 rpm, por 20 min. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C 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).

3.14. Determinação do teor de RO por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os RO extraídos das farinhas de soja tratada e não tratada, foram analisados por CLAE em cromatógrafo Shimadizu série 10A, equipado com detector de índice de refração e coluna em aço inox (25 x 0,465 cm) contendo o grupo aminopropil (-NH₂) 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 determinação quantitativa dos açúcares solúveis presentes nos produtos derivados da soja. A partir de uma solução estoque formada pela mistura dos açúcares frutose, sacarose, rafinose e estaquiose nas concentrações de 4, 4, 8 e 8 % (p/v), respectivamente, foram feitas diluições para obtenção das soluções padrão. Cada solução foi injetada no cromatógrafo 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 como programa LC-10 versão 2.2 para Windows[®].

3.15. Determinação da composição centesimal das farinhas de soja tratada e não tratada

3.15.1. Determinação do teor de proteínas

O teor de nitrogênio foi determinado, em triplicata, 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.

3.15.2. Determinação do teor lipídico

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

3.15.3. Determinação de umidade

O teor de umidade foi determinado, em triplicata, de acordo com a AOAC (1997) em estufa a 105 °C, até peso constante.

3.15.4. Determinação do conteúdo de cinzas

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

3.15.5. Determinação do teor de carboidratos totais

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

3.16. Ensaio biológico

As farinhas de soja tratada e não tratada foram utilizadas como fonte de proteína em dietas que foram avaliadas por meio de ensaio biológico com ratos, realizado no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária/UFV (processo nº 57/2007).

3.16.1. Preparo das dietas

Foram preparadas dieta aprotéica, dieta com caseína (padrão) e as dietas experimentais com e sem oligossacarídeos, conforme apresentado na Tabela 2. A dieta D1 continha farinha de soja desengordurada sem oligossacarídeos de rafinose decorrente da incubação com a levedura, na dieta D2 por sua vez, a fonte protéica foi farinha de soja desengordurada contendo oligossacarídeos. A dieta D3 continha farinha de soja integral sem RO resultante da incubação desta com a preparação enzimática de α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii*, enquanto a dieta D4 continha farinha de soja integral com RO.

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 ajustadas, conforme a composição das fontes protéicas, de modo a obter dietas isocalóricas e isoprotéicas.

Tabela 2- Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico (g/100g de mistura).

Ingredientes	Dietas					
	Aprotéica	Caseína	D1	D2	D3	D4
Caseína ¹	-	17,94	-	-	-	-
Farinha de soja	-	-	21,12	24,92	35,60	36,21
Amido dextrinizado ¹	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose ²	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de soja ²	7,00	7,00	7,00	7,00	-	-
Fibra ¹ (celulose)	5,00	5,00	2,80	2,80	-	-
Mistura Mineral ^{1*}	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura Vitamínica ^{1*}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Bitartarato de colina ¹	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
L-cistina ¹	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Amido de milho ²	59,75	71,68	71,75	68,01	72,01	71,41

D1-Dieta contendo farinha de soja desengordurada sem oligossacarídeos de rafinose após incubação com a levedura

D2-Dieta contendo farinha de soja desengordurada com oligossacarídeos de rafinose

D3-Dieta contendo farinha de soja integral sem oligossacarídeos de rafinose após incubação com a preparação enzimática de α -galactosidase

D4-Dieta contendo farinha de soja integral com oligossacarídeos de rafinose

¹Obtido da RHOSTER – Indústria e Comércio Ltda.

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

² Obtido no comércio de Viçosa, MG.

3.16.2. Animais

Foram utilizados ratos machos da raça Wistar, recém-desmamados, com média de 23 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 divididos em grupos de seis animais cada, de modo que a diferença entre as médias dos pesos entre os grupos não excedesse a 5 g. Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, onde receberam água e suas dietas experimentais *ad libitum* por 14 dias. Os animais foram mantidos em condições de temperatura (22 ± 3 °C) e luminosidade (fotoperíodo de

12h) controladas, sendo o monitoramento do consumo alimentar feito semanalmente.

Ao término do experimento os animais foram eutanasiados 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). Foi realizada também, a determinação da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal dos animais alimentados com as dietas contendo farinha de soja.

3.16.3. 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 foi feito pela seguinte equação (Hegsted, 1977):

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

3.16.4. Razão Protéica Líquida (NPR)

O NPR foi determinado, de acordo com método de Bender e Doell (1957), no 14^o dia do experimento, levando-se em consideração o ganho de peso do grupo teste, mais a perda de peso do grupo com dieta aprotéica, em relação ao consumo de proteína do grupo teste (HEGSTED, 1977). Foi calculado de acordo com a seguinte equação:

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

3.16.5. Digestibilidade verdadeira

Para a determinação da digestibilidade verdadeira, as dietas foram marcadas com índigo carmim na proporção de 200 mg/100 g e oferecidas

aos animais no 7^o e 10^o dias. As fezes foram coletadas do 8^o ao 11^o dia e acondicionadas em recipientes individuais para cada animal, sendo mantidas sob refrigeração a 4 °C.

Ao término do experimento, as fezes foram 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

3.16.6. Extração e determinação da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta

A extração e determinação da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) no conteúdo cecal foi realizada de acordo com técnica descrita por Smiricky-Tjardes *et al.* (2003) com modificações. As amostras de fezes foram misturadas, em tubo tipo eppendorf, a 500 µL de uma solução de ácido meta-fosfórico a 25 % e mantidas em repouso, em temperatura ambiente durante 30 min para precipitação. Após esse período, as amostras foram centrifugadas em centrífuga do tipo Eppendorf 5415C, 16.100 g, por 30 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo sendo novamente centrifugado nas mesmas condições descritas acima, mas por um tempo de 20 min. Em seguida, o

sobrenadante obtido foi congelado a -20 °C para posterior análise por Cromatografia Gasosa (CG).

Os ácidos graxos foram determinados em cromatógrafo Shimadzu série 17A, equipado com detector de ionização de chama e coluna Nukol da Supelco com 30 m de comprimento e diâmetro de 0,25 mm. Os parâmetros do equipamento foram: temperatura da coluna 100 °C por 4 min e 185 °C por 10 min, temperatura do injetor 220 °C e temperatura do detector de ionização de chama 250 °C. O fluxo da coluna foi de 1,90647 mL/min e a velocidade linear de 43,228 cm/seg. O gás de arraste utilizado foi o hélio.

O método foi padronizado para determinação quantitativa dos ácidos graxos acético, propiônico e butírico presentes no conteúdo cecal. A partir de soluções estoque de ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico nas concentrações de 3,13; 2,54 e 3,45 ng/μL respectivamente, foram feitas diluições para obtenção das soluções padrão. Cada solução foi injetada no cromatógrafo para obtenção das curvas, correlacionando a área do pico com a concentração do ácido graxo na solução. As retas foram obtidas por regressão linear. O volume de 1 μL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada ácido graxo presente foi identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenção e concentrações dos ácidos graxos nas soluções padrão. Todos os cálculos foram feitos pelo computador acoplado ao sistema de CG equipado como programa GC-10 versão 2.2 para Windows®.

3.17. Análise estatística

Procedeu-se à análise estatística (ANOVA), para determinação do valor de “F”. Para “F” significativo, utilizou-se o teste de Duncan, a 5 % de probabilidade, para comparação entre as médias. A dispersão da média foi expressa nas tabelas de resultados como desvio-padrão da média. Os cálculos foram realizados através do programa SAEG versão 9.1 (Universidade Federal de Viçosa).

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1

4.1.1. Preparo e caracterização das farinhas de soja utilizadas no ensaio biológico

4.1.1.1. Tratamento da suspensão de farinha de soja desengordurada com células viáveis de *Debaryomyces hansenii* e remoção dos oligossacarídeos de rafinose

Para o tratamento da suspensão de farinha de soja desengordurada com células viáveis da levedura *D. hansenii* foi utilizada uma concentração inicial do inóculo equivalente a A_{600} inicial de 0,2, uma vez que não foi observado diferença na produção da enzima α -galactosidase quando a concentração inicial foi equivalente a A_{600} de 0,1 e 0,5 (dados não mostrados). A Tabela 3 mostra os valores de atividade de α -galactosidase em função do tempo de incubação da suspensão de farinha de soja com a levedura.

Tabela 3 - Atividade de α -galactosidase (U/mL) no sobrenadante da suspensão de farinha de soja desengordurada inoculada com células viáveis de *Debaryomyces hansenii*.

Tempo de incubação (h)	Atividade* (U/mL)
0	0,0
12	0,15±0,01
24	0,21±0,01
36	0,31±0,01
48	0,37±0,01
60	0,42±0,01
72	0,42±0,01

1U: 1 μ mol de p-NP formado por minuto

*Valores expressos como média±desvio padrão

Foi observado que a atividade enzimática aumentou com o tempo de incubação da levedura na farinha de soja, e que a maior atividade observada ocorreu em 60 h (0,42 U/mL) e se manteve constante até 72 h, que foi o tempo máximo de incubação.

Durante a incubação da suspensão de farinha de soja desengordurada com as células da levedura houve redução no conteúdo dos RO. Os resultados estão apresentados na Figura 3 e os valores da concentração dos açúcares solúveis em função do tempo de incubação estão mostrados na Tabela 4.

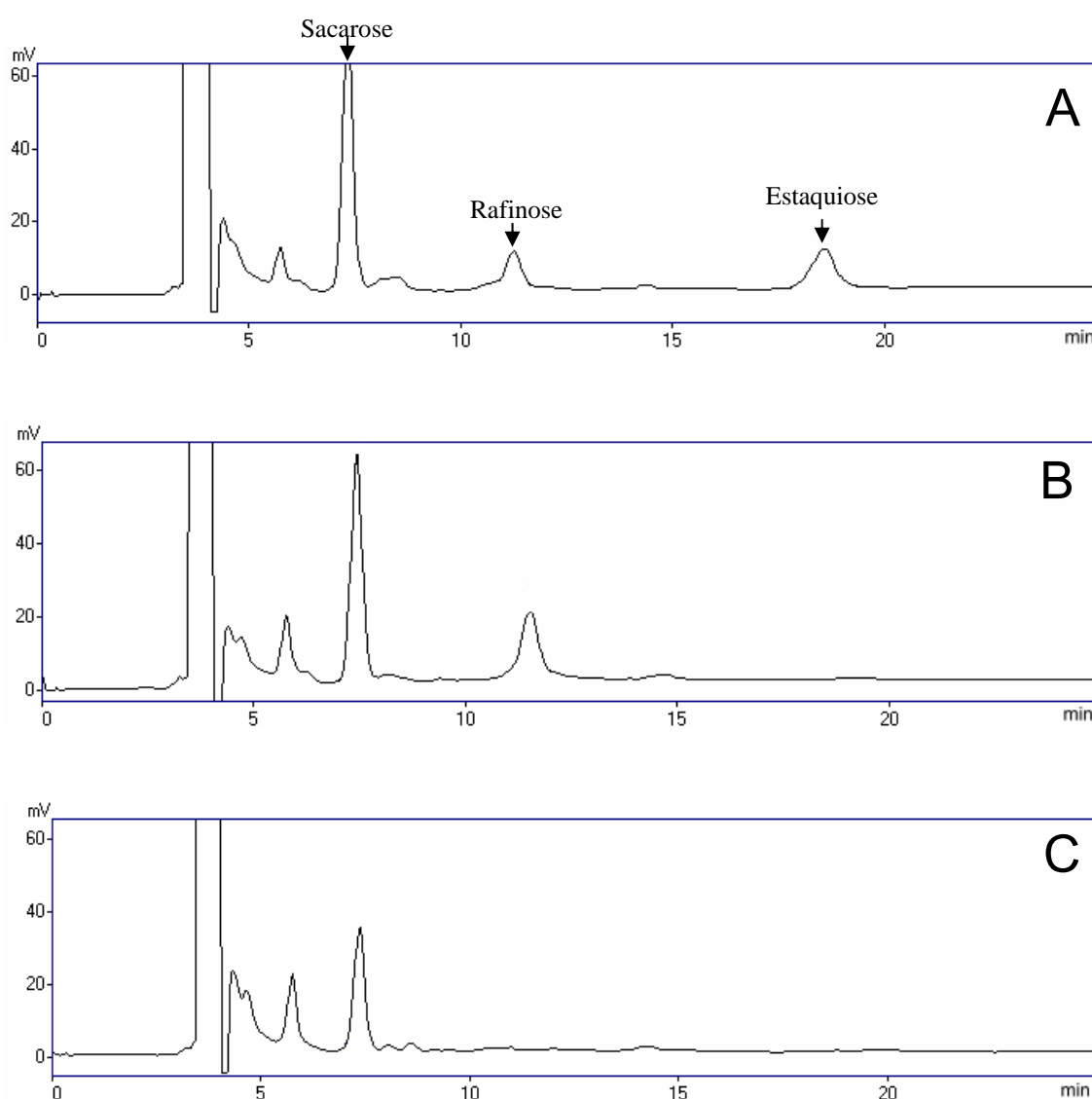


Figura 3 - Cromatogramas comparativos da hidrólise dos açúcares solúveis na farinha de soja desengordurada em função do tempo de incubação com a levedura *Debaryomyces hansenii* nos tempos 0h (A), 12h (B) e 36h (C).

Tabela 4 - Concentração de açúcares solúveis na farinha de soja desengordurada em função do tempo de incubação com a levedura *Debaryomyces hansenii*.

Tempo de incubação (h)	Concentração de açúcares (%) ± DP		
	Sacarose	Rafinose	Estaquiose
0	8,01±0,36	1,15±0,08	3,23±0,75
12	7,02±0,25	2,67±0,12	0,10±0,06
24	6,65±0,14	0,34±0,14	0,0
36	3,47±0,04	0,0	0,0
48	0,0	0,0	0,0
60	0,0	0,0	0,0
72	0,0	0,0	0,0

Os resultados foram calculados a partir de cromatogramas obtidos pela análise por CLAE.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, houve hidrólise de 96,2 % de estaquiose após 12 h de incubação com a levedura. A remoção total dos açúcares refinose e estaquiose foi observada após 36 h, período em que também se observa hidrólise de 43,3 % do conteúdo de sacarose. A concentração deste açúcar foi completamente reduzida após 48 h de incubação. Esses resultados são decorrentes da incubação da suspensão de farinha de soja com células da levedura em um erlenmeyer de 2000 mL contendo 500 mL de suspensão uma vez que foi verificado que esta condição de aeração foi mais eficaz para hidrólise dos RO (Tabela 5).

Tabela 5 - Influência da aeração no interior do frasco de cultura de *Debaryomyces hansenii* no tempo de hidrólise dos oligossacarídeos de refinose na suspensão de farinha de soja desengordurada.

Tempo de incubação (h)	Concentração de açúcares (%) ± DP			
	Condição A		Condição B	
	Rafinose	Estaquiose	Rafinose	Estaquiose
0	1,15±0,08	3,23±0,75	1,15±0,08	3,23±0,75
36	0,0	0,0	0,99±0,08	0,0

Condição A- Corresponde à incubação de 500 mL da suspensão de farinha de soja desengordurada com células de *D.hansenii* (concentração inicial equivalente a A_{600} inicial de 0,2) em um erlenmeyer de 2000 mL.

Condição B- Corresponde à incubação de 1000 mL da suspensão de farinha de soja desengordurada com células de *D.hansenii* (concentração inicial equivalente a A_{600} inicial de 0,2) em um erlenmeyer de 2000 mL.

4.1.1.2. Composição das farinhas de soja desengordurada utilizadas no preparo das dietas

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram o resumo da composição química centesimal das farinhas de soja desengordurada tratada e não tratada utilizadas no ensaio biológico. Pode-se notar que os valores de umidade variaram de 7,17 a 7,66 %, cinzas de 7,64 a 9,08 %, lipídios de 0,11 a 0,14 %, carboidratos de 15,81 a 27,89 % e proteínas de 57,19 a 67,31 %.

Tabela 6 - Composição química centesimal das farinhas de soja desengordurada tratada e não tratada*.

	Amostras	
	FS1	FS2
Umidade(%)	7,66±0,11	7,17±0,04
Cinzas(%)	9,08±0,01	7,64±0,13
Lipídios(%)	0,14±0,07	0,11±0,04
Proteínas(%)	67,31±0,69	57,19±0,21
Carboidratos totais(%)	15,81	27,89

FS1-Farina de soja desengordurada sem oligossacarídeos após incubação com a levedura

FS2-Farina de soja desengordurada com oligossacarídeos

*Valores expressos como média ± desvio padrão

Na Tabela 7 está apresentada a composição dos oligossacarídeos, rafinose e estaquiose, presentes nas farinhas de soja desengordurada tratada e não tratada. De acordo com os resultados, o conteúdo de rafinose e estaquiose na farinha de soja desengordurada após incubação com a levedura (FS1) foi totalmente reduzido enquanto que na farinha de soja desengordurada não submetida ao tratamento acima (FS2) foi de 1,15 e 3,23 %, respectivamente.

Tabela 7 - Conteúdo de oligossacarídeos de rafinose nas farinhas de soja desengordurada tratada e não tratada*.

Amostra	Rafinose	Estaquiose
	%	
FS1	0,0	0,0
FS2	1,15±0,08	3,23±0,75

FS1-Farina de soja desengordurada sem oligossacarídeos após incubação com a levedura

FS2-Farina de soja desengordurada com oligossacarídeos

*Valores expressos como média ± desvio padrão

4.1.2. Efeito do processamento enzimático no valor nutricional das farinhas de soja desengordurada

4.1.2.1. Efeito do processamento enzimático nos valores de digestibilidade verdadeira

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, a dieta contendo farinha de soja desengordurada sem a presença de oligossacarídeos (D1) apresentou um valor de digestibilidade superior e estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) em relação à dieta contendo farinha de soja desengordurada com oligossacarídeos (D2), 91,28 e 87,14 %, respectivamente.

Tabela 8 - Digestibilidade protéica verdadeira *in vivo* absoluta e relativa das dietas contendo caseína e farinha de soja desengordurada.

Tratamento	Digestibilidade* (%)	Digestibilidade Relativa (%)
Caseína	95,54 ^a ± 2,56	100
D1	91,28 ^b ± 2,07	95,61
D2	87,14 ^c ± 2,98	91,27

D1-Dieta contendo farinha de soja desengordurada sem oligossacarídeos após incubação com a levedura

D2-Dieta contendo farinha de soja desengordurada com oligossacarídeos

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

*Valores expressos como média ± desvio padrão

4.1.2.2. Efeito do processamento enzimático nos valores de ganho de peso, Coeficiente de Eficácia Protéica (PER) e Razão Protéica Líquida (NPR)

Os resultados, apresentados na Tabela 9, mostraram que os valores de ganho de peso foram estatisticamente semelhantes, em nível de 5 % de probabilidade, para os ratos alimentados com as dietas contendo farinha de soja desengordurada com e sem oligossacarídeos (D1 e D2). De acordo com os dados apresentados nesta tabela, foi observado também que a dieta de caseína promoveu maior ganho de peso durante os 14 dias de experimento.

Tabela 9 - Ganho de peso e consumo protéico de ratos alimentados com dietas contendo caseína e farinha de soja desengordurada.

Dietas	Ganho de Peso (g)*	Consumo Protéico (g)*
Caseína	66,00 ^a ± 12,05	17,53 ^a ± 2,17
D1	29,17 ^b ± 4,26	11,08 ^b ± 1,47
D2	33,83 ^b ± 5,49	12,46 ^b ± 1,49

D1-Dieta contendo farinha de soja desengordurada sem oligossacarídeos após incubação com a levedura

D2-Dieta contendo farinha de soja desengordurada com oligossacarídeos

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

*Valores expressos como média± desvio padrão

Na Tabela 10 estão apresentados os valores de PER, PER relativo (PERR), NPR e NPR relativo (NPRR) das dietas contendo caseína e farinha de soja desengordurada.

Tabela 10 - Coeficiente de Eficácia Protéica (PER), PER relativo (PERR), Razão Protéica Líquida (NPR) e NPR relativo (NPRR) das dietas contendo caseína e farinha de soja desengordurada.

Dietas	PER*	PERR (%)	NPR*	NPRR (%)
Caseína	3,76 ^a ± 0,39	100	4,34 ^a ± 0,46	100
D1	2,63 ^b ± 0,14	72,16	3,56 ^b ± 0,16	81,39
D2	2,71 ^b ± 0,22	70,04	3,53 ^b ± 0,22	81,94

D1-Dieta contendo farinha de soja desengordurada sem oligossacarídeos após incubação com a levedura

D2-Dieta contendo farinha de soja desengordurada com oligossacarídeos

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

*Valores expressos como média± desvio padrão

De acordo com os resultados apresentados observa-se que a dieta de caseína apresentou valores de PER, PERR, NPR e NPRR superiores e estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) aos encontrados para as dietas contendo as farinhas de soja desengordurada. Porém não houve variação significativa para esses valores entre as dietas (D1 e D2) formuladas com farinha de soja desengordurada.

4.1.2.3. Efeito da remoção dos oligossacarídeos de rafinose na produção de ácidos graxos de cadeia curta

A determinação da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal dos animais submetidos às dietas experimentais foi realizada conforme descrito no item 3.16.6, após 14 dias de experimento. A Tabela 11 mostra a concentração ($\mu\text{mol/g}$ de amostra) dos ácidos acético, propiônico e butírico.

Tabela 11 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de amostra) dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal de ratos alimentados com dietas contendo farinha de soja desengordurada com e sem oligossacarídeos de rafinose*.

Dietas	Ácido acético	Ácido propiônico	Ácido butírico
D1	5,85 ^a ±0,63	1,97 ^a ±0,20	1,95 ^a ±0,21
D2	6,59 ^a ±0,70	1,86 ^a ±0,36	3,00 ^a ±1,19

D1-Dieta contendo farinha de soja desengordurada sem oligossacarídeos após incubação com a levedura

D2-Dieta contendo farinha de soja desengordurada com oligossacarídeos

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

*Valores expressos como média± desvio padrão

A produção de ácidos graxos de cadeia curta não diferiu estatisticamente para os animais alimentados com dietas contendo farinha de soja desengordurada sem e com oligossacarídeos de rafinose (D1 e D2). As fezes dos ratos alimentados com dieta contendo farinha de soja desengordurada com oligossacarídeos apresentaram uma consistência mais líquida e um odor mais desagradável em comparação com as fezes dos animais alimentados com dieta contendo farinha de soja desengordurada sem oligossacarídeos.

4.2. Experimento 2

4.2.1. Preparo e caracterização das farinhas de soja utilizadas no ensaio biológico

4.2.1.1. Efeito dos tratamentos térmicos no índice de urease da farinha de soja integral

Nos ensaios para avaliação do índice de atividade de urease, a farinha de soja integral foi submetida a diferentes tratamentos térmicos (tempo e temperatura) e a medida da variação do pH, após cada tratamento, foi realizada conforme descrito no item 3.7.

Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Índice de urease na farinha de soja integral submetida a diferentes tratamentos térmicos.

Tratamento térmico	ΔpH^*
100 °C/30 min	1,82±0,01
130 °C/30 min	1,69±0,01
140 °C/20 min	0,11±0,01
150 °C/10 min	1,68±0,02
150 °C/20 min	0,02±0,01

*Valores expressos como média±desvio padrão

Foi observado que o binômio 100 °C/30 min apresentou o maior valor de variação de pH e, conseqüentemente, de índice de urease, seguido dos tratamentos 130 °C/30 min e 150 °C/10 min. Os resultados mostraram ainda que a combinação tempo e temperatura 140 °C/20 min e 150 °C/20 min apresentaram valores de índice de urease de 0,11 e 0,02, respectivamente.

4.2.1.2. Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose na farinha de soja integral usando a preparação enzimática de α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii*

A hidrólise dos RO presentes na farinha de soja integral foi realizada conforme descrito no item 3.9, seguida da extração de RO e análise por

CLAE (itens 3.13 e 3.14, respectivamente). A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes na farinha de soja em função do tempo de incubação com a enzima. Como controle negativo, a farinha de soja foi incubada com igual volume de água destilada nas mesmas condições.

Os valores da concentração dos açúcares solúveis em função do tempo de hidrólise estão mostrados na Tabela 13 e os cromatogramas resultantes da CLAE estão apresentados na Figura 4.

Tabela 13 - Concentração de açúcares solúveis na farinha de soja integral em função do tempo de incubação com a preparação enzimática de α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii*.

Tempo de incubação (h)	Concentração de açúcares (%) \pm DP		
	Sacarose	Rafinose	Estaquiase
0	5,01 \pm 0,16	0,93 \pm 0,08	2,90 \pm 0,16
2	5,02 \pm 0,21	1,33 \pm 0,07	1,51 \pm 0,05
8	5,27 \pm 0,22	1,37 \pm 0,05	0,58 \pm 0,03
10	4,71 \pm 0,16	1,05 \pm 0,06	0,23 \pm 0,01
12	2,45 \pm 0,07	0,66 \pm 0,10	0,0
16	0,0	0,56 \pm 0,08	0,0
20	0,0	0,0	0,0

Os resultados foram calculados a partir de cromatogramas obtidos pela análise por CLAE.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 13, a redução total na concentração dos oligossacarídeos de rafinose, na farinha de soja integral, foi verificada após 20 h de incubação com a preparação enzimática na concentração de 1,2 U/g de farinha. Nas primeiras horas de incubação ocorreu um aumento na concentração de rafinose, provavelmente devido à hidrólise do açúcar estaquiase, que foi totalmente hidrolisado após 12 h de incubação. Nesse período também foi verificado 48 % de redução na concentração do açúcar sacarose na amostra.

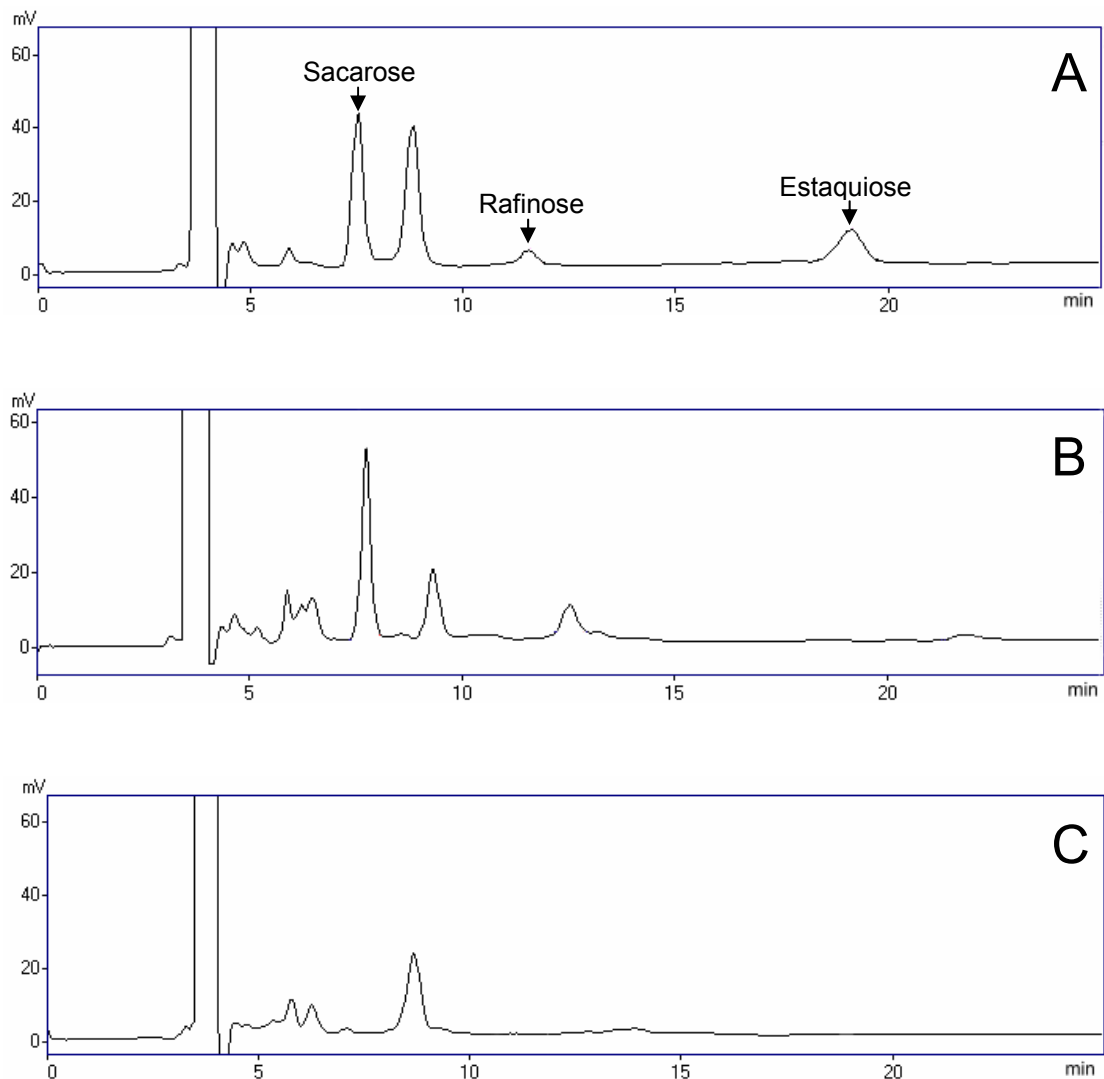


Figura 4 - Cromatogramas comparativos da hidrólise dos açúcares solúveis na farinha de soja integral em função do tempo de incubação com a preparação enzimática de α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* nos tempos 0h (A), 10h (B) e 20h (C).

4.2.1.3. Composição das farinhas de soja integral utilizadas no preparo das dietas

Os resultados apresentados na Tabela 14 mostram o resumo da composição química centesimal das farinhas de soja integral tratada e não tratada utilizadas no ensaio biológico. Pode ser observado que os valores de umidade variaram de 6,75 a 7,65 %, cinzas de 7,26 a 7,31 %, lipídios de 12,79 a 13,64 %, carboidratos de 32,33 a 32,90 % e proteínas de 39,35 a 40,02 %.

Tabela 14 - Composição química centesimal das farinhas de soja integral tratada e não tratada*.

	Amostras	
	FS3	FS4
Umidade(%)	6,75±0,10	7,65±0,10
Cinzas(%)	7,26±0,23	7,31±0,01
Lipídios(%)	13,64±0,13	12,79±0,27
Proteínas(%)	40,02±0,12	39,35±0,31
Carboidratos totais(%)	32,33	32,90

FS3-Farina de soja integral sem oligossacarídeos após incubação com a preparação enzimática de α -galactosidase

FS4-Farina de soja integral com oligossacarídeos

*Valores expressos como média \pm desvio padrão

Na Tabela 15 está apresentada a composição dos oligossacarídeos, rafinose e estaquiose, presentes nas farinhas de soja integral tratada e não tratada. De acordo com os resultados, o conteúdo de rafinose e estaquiose foi de 0,93 e 2,90 %, respectivamente para a farinha de soja integral não submetida ao tratamento enzimático (FS4), enquanto o conteúdo destes açúcares foi completamente reduzido na farinha de soja integral (FS3) após tratamento com a preparação enzimática de α -galactosidase de *D. hansenii*.

Tabela 15 - Conteúdo de oligossacarídeos de rafinose nas farinhas de soja integral tratada e não tratada*.

Amostra	Rafinose	Estaquiose
	%	
FS3	0,0	0,0
FS4	0,93±0,08	2,90±0,16

FS3-Farina de soja integral sem oligossacarídeos após incubação com a preparação enzimática de α -galactosidase

FS4-Farina de soja integral com oligossacarídeos

*Valores expressos como média \pm desvio padrão

4.2.2. Efeito do processamento enzimático no valor nutricional das farinhas de soja

4.2.2.1. Efeito do processamento enzimático nos valores de digestibilidade verdadeira

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 16, a dieta contendo farinha de soja integral sem a presença de oligossacarídeos (D3) apresentou um valor de digestibilidade superior e estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) em relação à dieta contendo farinha de soja integral com oligossacarídeos (D4), 81,42 e 75,91 %, respectivamente.

Tabela 16 - Digestibilidade protéica verdadeira *in vivo* absoluta e relativa das dietas contendo caseína e farinha de soja integral.

Tratamento	Digestibilidade (%) [*]	Digestibilidade Relativa (%)
Caseína	95,47 ^a ± 1,04	100
D3	81,42 ^b ± 1,37	85,28
D4	75,91 ^c ± 5,38	79,50

D3-Dieta contendo farinha de soja integral sem oligossacarídeos após incubação com a preparação enzimática de α -galactosidase

D4-Dieta contendo farinha de soja integral com oligossacarídeos

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

*Valores expressos como média ± desvio padrão

4.2.2.2. Efeito do processamento enzimático nos valores de ganho de peso, Coeficiente de Eficácia Protéica (PER) e Razão Protéica Líquida (NPR)

Os resultados apresentados na Tabela 17 mostraram que os valores de ganho de peso foram estatisticamente semelhantes, em nível de 5 % de probabilidade, para os animais alimentados com as dietas contendo farinhas de soja integral com e sem oligossacarídeos (D3 e D4). De acordo com os dados apresentados nesta tabela, foi observado também que a dieta de caseína promoveu maior ganho de peso durante os 14 dias de experimento.

Tabela 17 - Ganho de peso e consumo protéico de ratos alimentados com dietas contendo caseína e farinha de soja integral.

Dietas	Ganho de Peso (g)*	Consumo Protéico (g)*
Caseína	61,66 ^a ± 9,83	17,25 ^a ± 0,70
D3	22,33 ^b ± 5,71	12,11 ^b ± 1,47
D4	17,66 ^b ± 7,00	11,44 ^b ± 2,03

D3-Dieta contendo farinha de soja integral sem oligossacarídeos após incubação com a preparação enzimática de α -galactosidase

D4-Dieta contendo farinha de soja integral com oligossacarídeos

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

*Valores expressos como média ± desvio padrão

Os valores de PER, PER relativo (PERR), NPR e NPR relativo (NPRR) das dietas contendo caseína e farinha de soja integral estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Coeficiente de Eficácia Protéica (PER), PER relativo (PERR), Razão Protéica Líquida (NPR), NPR relativo (NPRR) das dietas contendo caseína e farinha de soja integral.

Dietas	PER*	PERR (%)	NPR*	NPRR (%)
Caseína	3,56 ^a ± 0,47	100	4,15 ^a ± 0,46	100
D3	1,82 ^b ± 0,14	51,28	2,67 ^b ± 0,25	64,47
D4	1,50 ^b ± 0,43	42,30	2,41 ^b ± 0,36	58,21

D3-Dieta contendo farinha de soja integral sem oligossacarídeos após incubação com a preparação enzimática de α -galactosidase

D4-Dieta contendo farinha de soja integral com oligossacarídeos

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

*Valores expressos como média ± desvio padrão

De acordo com os resultados apresentados, foi observado que a dieta de caseína apresentou valores de PER, PERR, NPR e NPRR superiores e estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) aos encontrados para as farinhas de soja integral utilizadas. Porém não houve variação significativa para esses valores entre as dietas formuladas com farinha de soja integral (D3 e D4).

4.2.2.3. Efeito do processamento enzimático na produção de ácidos graxos de cadeia curta

A determinação da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal dos animais submetidos às dietas experimentais foi

realizada conforme descrito no item 3.16.6, após 14 dias de experimento. A Tabela 19 mostra a concentração ($\mu\text{mol/g}$ de amostra) dos ácidos acético, propiônico e butírico.

Tabela 19 - Concentração ($\mu\text{mol/g}$ de amostra) dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal de ratos alimentados com dietas contendo farinha de soja integral com e sem oligossacarídeos de rafinose*.

Dietas	Ácido acético	Ácido propiônico	Ácido butírico
D3	9,74 ^a ±2,06	3,76 ^a ±0,77	3,02 ^a ±0,44
D4	11,90 ^a ±3,33	4,85 ^a ±1,80	3,60 ^a ±0,78

D3-Dieta contendo farinha de soja integral sem oligossacarídeos após incubação com a preparação enzimática de α -galactosidase

D4-Dieta contendo farinha de soja integral com oligossacarídeos

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

*Valores expressos como média± desvio padrão

A produção de ácidos graxos de cadeia curta não diferiu estatisticamente para os animais alimentados com dieta contendo farinha de soja integral sem e com oligossacarídeos de rafinose (D3 e D4). Apesar disso, foi verificada uma diferença na consistência e no odor das fezes dos animais alimentados com dieta contendo farinha de soja integral com e sem oligossacarídeos. As fezes dos ratos alimentados com dieta contendo farinha de soja integral com oligossacarídeos apresentaram uma consistência mais líquida e um odor mais desagradável em comparação com as fezes dos animais alimentados com dieta contendo farinha de soja integral sem oligossacarídeos.

5. DISCUSSÃO

Preparo e caracterização das farinhas de soja utilizadas no ensaio biológico

Várias pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de reduzir ou eliminar os conteúdos de rafinose e estaquiose nas sementes de soja e em seus produtos derivados, uma vez que esses açúcares são considerados um fator antinutricional. O tratamento enzimático destes produtos com a enzima α -galactosidase parece ser a alternativa mais viável para a hidrólise enzimática desses açúcares, melhorando a qualidade nutricional desta leguminosa (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

No presente trabalho foram realizados dois experimentos.

No primeiro experimento, inicialmente foi realizada a verificação da atividade α -galactosidase na suspensão de farinha de soja desengordurada adicionada de células viáveis da levedura *D. hansenii*.

Foi observado (Tabela 3) que a atividade enzimática aumentou com o tempo de incubação da levedura na farinha de soja, e que o maior valor ocorreu em 60 h (0,42 U/mL) e se manteve constante até 72 h, que foi o tempo máximo de incubação. Scalabrini *et al.* (1998) relataram que, durante o crescimento de diversas cepas de *Bifidobacterium*, a maior atividade de α -galactosidase ocorria nas primeiras 12-24 h de cultivo, o que correspondia à fase exponencial de crescimento baseado em dados da absorbância da cultura a 600 nm (A_{600}), e na maioria dos casos esta atividade diminuía durante a fase estacionária. Mas, algumas cepas como *B. infantis* MB258 e *B. longum* MB201 mantinham alta atividade de α -galactosidase durante 48 h, o que levou os autores a sugerirem que a produção da enzima pode não ser dependente da fase de crescimento microbiano. No caso da incubação de *D. hansenii* em farinha de soja, as leituras da A_{600} foram prejudicadas

devido à alta turbidez da suspensão de farinha de soja, o que não permitiu a construção da curva de crescimento microbiano. Dessa forma, o crescimento da levedura foi estimado pela medida da atividade enzimática e da hidrólise de RO no meio de cultura.

Durante o cultivo do microrganismo houve redução no conteúdo dos RO. De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, houve hidrólise de 96,2 % de estaquiose após 12 h de incubação com a levedura. A redução total dos açúcares foi observada após 36 h, o que indica que *D. hansenii* foi capaz de crescer na suspensão de farinha de soja e utilizar os RO como fonte de carbono. Isto foi possível, provavelmente devido ao fato da farinha de soja ser rica em fatores estimuladores de crescimento tais como, oligossacarídeos, aminoácidos e peptídeos (BEZKOROVAINY, 2001).

Donkor *et al.* (2007) relataram redução no conteúdo de rafinose e estaquiose em 77,4 e 63,5 %, respectivamente, após 48 h de cultivo de *B. lactis* B94 no leite de soja. LeBlanc *et al.* (2004a) observaram que *Lactobacillus fermentum* CRL 722 foi capaz de crescer em leite de soja e reduzir a concentração inicial de estaquiose em aproximadamente 90 % após 10 h de incubação, tempo no qual também foi verificado maior atividade de α -galactosidase. O consumo de rafinose e estaquiose por cepas de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium longum* foram estudados por Scalabrini *et al.* (1998) que observaram redução total da rafinose e redução de 68 %, 73 % e 35 %, respectivamente, no conteúdo de estaquiose após 48 h de incubação desses microrganismos no leite de soja.

O conteúdo médio de sacarose, rafinose e estaquiose na farinha de soja desengordurada, utilizada neste experimento, foi de 8,01; 1,15 e 3,23 % respectivamente. Pode-se verificar pelos dados apresentados na Tabela 4, que o açúcar estaquiose foi mais rapidamente utilizado que a rafinose, verificando sua redução quase total já nas primeiras 12h de incubação. Esta diferença pode ter sido causada pelo acúmulo de rafinose no meio, que é formada durante a hidrólise da estaquiose, por clivagem da ligação α -1,6 e remoção de um resíduo de galactose.

Pelo fato da levedura produzir e secretar α -galactosidases, como já discutido anteriormente, foi possível a utilização desses oligossacarídeos presentes no meio. Porém em um estudo recente, Viana *et al.* (2007) relataram a ocorrência de hidrólise de RO por células de *D. hansenii* permeabilizadas contendo α -galactosidase intracelular. Entretanto neste trabalho não foi realizado o ensaio para verificação da atividade intracelular, que, se presente, também pode ter contribuído para redução dos níveis de RO, caso exista algum transportador que carregue esses açúcares para o interior da célula.

Foi observada também uma redução no conteúdo de sacarose com o tempo (Figura 3C e Tabela 4). Isto poderia ser explicado pelo fato de, apesar de não haver atividade de invertase no meio extracelular (dados não mostrados), esta enzima pode estar presente intracelularmente, e devido a presença de algum transportador, esse açúcar poderia estar sendo carregado para o meio intracelular e utilizado pela levedura.

Esses resultados mostram que a levedura *D. hansenii* foi capaz de crescer e utilizar os RO presentes na suspensão de farinha de soja desengordurada. Além disso, neste trabalho, após a incubação da suspensão de farinha de soja desengordurada com a levedura houve uma melhora no aroma da mesma, o que sugere que o tratamento com células da levedura pode contribuir para desenvolvimento do *flavor*. Uma vez que esta levedura é encontrada em vários produtos alimentícios como queijos, vinhos e embutidos (SALDANHA-DA-GAMA *et al.*, 1997), sua utilização no processamento de derivados de soja, poderia não apresentar problemas de segurança. Dessa forma, *D. hansenii* demonstra ter grande potencial para utilização na redução dos RO em produtos como a farinha de soja, visando o aumento da qualidade nutricional desse produto.

No segundo experimento realizado, foram determinadas as condições para o tratamento enzimático de uma farinha de soja integral usando uma preparação enzimática de α -galactosidase de *D. hansenii*, para hidrólise dos RO. A farinha utilizada neste experimento foi preparada no próprio laboratório, utilizando soja da variedade UFVTN 105, sem lipoxigenases, cedida pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do

BIOAGRO/UFV. Esta variedade foi escolhida por não conter em suas sementes a enzima lipoxigenase que também se constitui em um fator antinutricional, sendo responsável pelo *beany flavor*.

Como uma das etapas para a produção da farinha de soja integral, esta foi submetida a vários tratamentos térmicos a fim de se avaliar as melhores condições para inativação de outros fatores antinutricionais termolábeis como os inibidores de protease e lectinas. Em indústrias de soja, o índice de urease é muito utilizado com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento térmico na qualidade nutricional, uma vez que a urease e os inibidores de tripsina apresentam um padrão similar de inativação (QIN *et al.*, 1996). Nesse sentido, trabalhos realizados por Dale (1991) verificam uma correlação direta entre a atividade ureática e inibidores de tripsina, indicando que a utilização da atividade ureática, como medida indireta da inativação destes fatores antinutricionais é bastante eficiente.

Os resultados da avaliação do índice de atividade de urease (Tabela 12) na farinha de soja submetida aos diferentes tratamentos térmicos mostraram que o binômio 100 °C/30 min apresentou o maior valor de variação de pH e conseqüentemente de índice de urease, seguido dos tratamentos 130 °C/30 min e 150 °C/10 min. Entretanto, estes valores de índice de urease se encontraram fora da faixa considerada para inativação da enzima que é de 0,05-0,2 (OLGUIN *et al.*, 2003). Os resultados indicaram que a combinação tempo e temperatura mais eficaz para inativação da urease foi 140 °C/20 min, que apresentou uma variação de pH de 0,11.

Neste processo de inativação térmica dos fatores antinutricionais, o calor aplicado não deve ser muito severo, o que pode implicar na redução da digestibilidade, em razão de reações químicas que ocorrem com alguns aminoácidos como, por exemplo, a reação do grupo amino da lisina com aldeídos (LJOKJEL *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 2000; CAFÉ *et al.*, 2000). Parsons (1992) relata que o índice de urease não deve ser inferior a 0,05, para assegurar que o farelo de soja não seja superaquecido. Em vista disso, o tratamento térmico a 150 °C/20 min foi excessivo o que pode prejudicar a qualidade nutricional da farinha de soja.

Com o objetivo de reduzir ou eliminar os oligossacarídeos de rafinose presentes nesta farinha de soja integral foi realizada a hidrólise desses

açúcares utilizando uma preparação enzimática de α -galactosidase da levedura *D. hansenii*. De acordo com os dados observados na Tabela 13, a preparação enzimática apresentou atividade sobre os RO, o que tornou possível seu uso para hidrólise desses açúcares e produção da farinha de soja integral livre de RO. O conteúdo médio de rafinose e estaquiose na farinha de soja integral utilizada era de 0,93 e 2,90 %, respectivamente. Pode-se verificar pelos dados apresentados nesta tabela, que a concentração de estaquiose decresceu com o tempo de incubação, enquanto houve um aumento na concentração de rafinose até o tempo de incubação de 8 h. Este acréscimo de rafinose provavelmente foi decorrente do acúmulo desse açúcar no meio, o qual é formado a partir da hidrólise da estaquiose, por clivagem da ligação α -1,6 e remoção de um resíduo de galactose.

Foi verificada hidrólise total dos oligossacarídeos na suspensão de farinha de soja integral após 20 h de incubação com a preparação enzimática na concentração de 1,2 U/g de farinha. Viana *et al.* (2006) testando a capacidade de hidrólise dos RO no leite de soja, com α -galactosidase extracelular purificada de *D. hansenii*, verificou completa redução no conteúdo desses açúcares após 4 h de incubação com 2,1 U/mL de leite. Após incubação por 6 h, a 40 °C, da farinha de soja com α -galactosidase parcialmente purificada de sementes de soja germinadas (5 U/g farinha), Viana *et al.* (2005) observaram redução de 72,3 e 89,2 % nos conteúdos de rafinose e estaquiose, respectivamente. Mulimani *et al.* (1997), utilizando extrato bruto de sementes de guar contendo α -galactosidase (12,8 U/g farinha), conseguiram obter uma hidrólise de 90,4 % da rafinose e 91,9 % da estaquiose na farinha de soja, após incubação por 4 h. Callegari (2003), trabalhando com α -galactosidase semipurificada de soja var. Monarca, observou redução dos teores de rafinose e estaquiose de 100 e 53 %, respectivamente, após 8 h de incubação da farinha de soja desengordurada com α -galactosidase (16 U/g farinha), a 40 °C. Guimarães *et al.* (2001) conseguiram reduzir os teores de rafinose e estaquiose em 67 e 53 %, respectivamente, após tratamento do leite de soja com α -

galactosidase purificada de sementes de soja em germinação por 12 h, a 30 °C, utilizando 1,2 U/mL de leite de soja.

Comparando com os dados da literatura, neste trabalho foi necessário um tempo maior para hidrólise total dos RO. Entretanto, a quantidade de enzima utilizada foi menor em relação aos trabalhos citados. Provavelmente, o uso de uma quantidade maior de enzima poderia reduzir a concentração de oligossacarídeos mais rapidamente.

Como mostrado na Tabela 13 e Figura 4C, houve uma completa redução do conteúdo de sacarose no tempo de 20 h de incubação da enzima com a farinha de soja. Entretanto, o extrato enzimático utilizado para hidrólise dos RO não apresentou atividade de invertase (dados não mostrados). A redução da sacarose no tempo de 20 h de hidrólise poderia ser explicada devido a possível atividade de transgalactosilação da α -galactosidase. Muitas glicosidases exibem atividade de transglicosilação em adição à atividade hidrolítica, dependendo da concentração de substratos e produtos. Na transglicosilação, a parte glicosil do substrato é transferida para compostos hidroxilados diferentes da água, que podem ser álcoois simples, produtos de hidrólise, açúcares ou uma molécula que seja um segundo substrato (DE REZENDE e GUIMARÃES, 2004). A atividade de transgalactosilação foi primeiro observada em α -galactosidase de leveduras que catalisavam a transferência de um resíduo de galactose de uma molécula do dissacarídeo melibiose para uma segunda molécula de melibiose como aceptora, formando o trissacarídeo maninotriose (DEY, 1972). Outros trabalhos também relataram atividade de transgalactosilação de α -galactosidases de diferentes fontes como sementes de café (KOIZUMI *et al.*, 1995), da levedura *Candida guilliermondii* (HASHIMOTO *et al.*, 1995), dos fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus* (PUCHART e BIELY, 2005) e *Talaromyces flavus* CCF 2686 (SIMERSKÁ *et al.*, 2006). No caso da α -galactosidase de *D. hansenii*, com períodos de tempo maiores de hidrólise dos RO na farinha de soja, provavelmente houve aumento considerável nas concentrações de galactose e sacarose, o que poderia ter induzido a atividade de transgalactosilação.

Após preparo das farinhas de soja desengordurada e integral com e sem oligossacarídeos estas tiveram a composição química centesimal determinada, assim como a concentração de RO presentes após os tratamentos. Pelos dados das Tabelas 6 e 14 observou-se que os valores de umidade encontrados foram um pouco menores que os relatados por Lima (1999) e Monteiro *et al.* (2003) (10 a 12 %) e que são encontrados para a maioria das farinhas de soja. Esses valores, encontrados no presente trabalho, podem ser devido ao fato de que após o tratamento enzimático, as suspensões de farinha de soja foram liofilizadas para retirada da água e preparo das dietas.

Para farinha de soja desengordurada sem oligossacarídeos (FS1) e farinha de soja desengordurada com oligossacarídeos (FS2) os teores reduzidos de lipídios caracterizam a farinha de soja desengordurada, que apresenta também elevado teor de proteína. O aumento de 10 % no valor de proteína da FS1 em relação a FS2 se deve ao fato de, no processo de produção da farinha com ausência dos RO, ter sido adicionada à suspensão, células de *Debaryomyces hansenii* que possivelmente contribuíram com nitrogênio protéico de sua composição.

Analisando as farinhas de soja integral sem e com oligossacarídeos, FS3 e FS4, respectivamente, os valores mostrados na Tabela 14, caracterizam uma farinha de soja integral e estão de acordo com os valores médios encontrados por Lima (1999) para farinha de soja com teor de proteína menor ou igual a 45 %.

De acordo com os resultados (Tabela 7), o conteúdo de rafinose e estaquiose na farinha de soja desengordurada após o cultivo da levedura (FS1) foi totalmente reduzido, enquanto que na farinha de soja desengordurada não submetida ao tratamento acima (FS2) foi de 1,15 e 3,23 %, respectivamente. Por sua vez o conteúdo de rafinose e estaquiose (Tabela 15) para a farinha de soja integral não submetida ao tratamento enzimático (FS4), foi de 0,93 e 2,90 %, respectivamente, enquanto a concentração destes açúcares foi completamente reduzida na farinha de soja integral após tratamento com a preparação enzimática de α -galactosidase de *D. hansenii* (FS3).

Os oligossacarídeos encontrados em maior quantidade na soja, e em seus produtos derivados são estaquiose e rafinose, nesta ordem, e compreendem aproximadamente 4 - 6 % do peso seco da farinha de soja (KARR-LILIENTHAL *et al.*, 2005). Parsons *et al.* (2000) encontraram uma média de 0,58 % de rafinose e 3,23 % de estaquiose em farinhas de soja convencionais que foram utilizadas para verificação do efeito desses açúcares na dieta de frangos de corte. Grieshop *et al.* (2003) verificaram concentrações médias de 4,1 a 5,7 % de estaquiose e 0,98 a 1,4 % de rafinose em farinhas de soja produzidas de diferentes variedades de soja.

Efeito do processamento enzimático no valor nutricional das farinhas de soja

A ação antinutricional dos RO está relacionada com o fato desses açúcares interferirem na digestão dos nutrientes por reduzir sua interação com enzimas digestivas no intestino (SMITS e ANNISON, 1996), além de promoverem a retenção de fluidos, acelerando o fluxo digestivo, afetando a utilização e absorção de nutrientes (WIGGINS, 1984). A ingestão de produtos de soja, contendo oligossacarídeos de rafinose, também resulta em flatulência, náuseas, desconforto abdominal e diarreia (WAGNER *et al.*, 1976). Assim, vários estudos têm mostrado que a ingestão de produtos de soja livres ou com teores reduzidos desses açúcares solúveis traz efeitos benéficos, reduzindo a viscosidade do bolo alimentar e melhorando a digestão de nutrientes (COON *et al.*, 1990; LESKE *et al.*, 1991; SMIRICKY *et al.*, 2002).

Este trabalho teve com objetivo a produção de farinhas de soja livres ou com teores reduzidos de oligossacarídeos de rafinose, através do tratamento enzimático com α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* para posterior avaliação nutricional dessas farinhas. Para isto verificou-se o efeito da eliminação dos RO nos parâmetros de digestibilidade, ganho de peso, consumo protéico, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR).

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 8 e 16, verificou-se uma melhora significativa na digestibilidade verdadeira das

dietas contendo farinhas de soja tratadas enzimaticamente (D1 e D3) em relação as suas correspondentes não tratadas (D2 e D4).

A digestibilidade 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). Constitui o primeiro fator que afeta a eficiência da utilização protéica da dieta. Quando certas ligações peptídicas não são hidrolisadas no processo digestivo, parte da proteína é excretada nas fezes ou metabolizada pelos microrganismos do intestino grosso (STIPANUK, 2000).

Os resultados mostraram que a redução do conteúdo de RO nas farinhas de soja, após tratamento enzimático, promoveu uma melhora significativa na digestibilidade das proteínas. Isto pode ser explicado com base na observação de que, um decréscimo na concentração de oligossacarídeos de rafinose pode reduzir, potencialmente, a viscosidade do bolo alimentar, levando a um aumento no tempo de retenção desta e aumentando dessa forma a ação das enzimas digestivas sobre os substratos e conseqüentemente a absorção de nutrientes na mucosa intestinal (GRAHAM *et al.*, 2002).

Smiricky *et al.* (2002) avaliando os efeitos da presença dos RO, em diferentes dietas de suínos contendo concentrados protéicos de soja, na digestibilidade verdadeira, verificaram que a presença desses açúcares promoveu uma redução significativa na digestibilidade das proteínas e de todos os aminoácidos, exceto triptofano e prolina.

A adição de 3,50 % de oligossacarídeos de rafinose da soja à dieta purificada de suínos, contendo caseína como fonte de proteína, levou a um decréscimo de 5 % na digestibilidade de proteínas (SMIRICKY-TJARDES *et al.*, 2003).

Zdunczyk *et al.* (1998) relataram que a presença de oligossacarídeos de rafinose encontrados em sementes de feijão promoveram uma redução na digestibilidade protéica em ratos alimentados com dieta contendo esta leguminosa. Sakaguchi *et al.* (1998) verificaram que a digestibilidade

verdadeira das proteínas em ratos foi menor quando RO foram adicionados à dieta de caseína.

Veldman *et al.* (1993) estudaram o efeito da adição de 15 % de melaço de soja contendo 18 % de oligossacarídeos na dieta de suínos, e observaram uma redução de 25 % nos valores de digestibilidade das proteínas na dieta com melaço, comparada à dieta controle. Estes autores também relataram que a adição da enzima α -galactosidase melhora a digestibilidade desses açúcares e das proteínas.

Segundo alguns autores a melhora na digestibilidade dos nutrientes leva a um incremento nos valores de energia metabolizável da dieta e a uma conseqüente melhora no desempenho dos animais. A adição de rafinose e estaquiose nas dietas de frangos de corte, a base de soja, reduziu significativamente os valores de energia metabolizável da dieta comparada aos controles (GRAHAM *et al.*, 2002), enquanto que a remoção desses açúcares da farinha de soja resultou em um aumento desta energia (COON *et al.*, 1990; LESKE *et al.*, 1991; LESKE e COON, 1999). Parsons *et al.* (2000) comparando o efeito de variedades de soja, com reduzidos teores de RO e convencionais, observaram que os valores médios de energia metabolizável foram 2.739 Kcal/Kg para farinha de soja convencional, enquanto que para farinha de soja com baixos teores de RO essa foi 2.931 Kcal/Kg.

Portanto, a redução dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose com o uso α -galactosidase pode melhorar a digestibilidade, tanto pela redução da viscosidade do bolo alimentar, quanto pela própria hidrólise desses açúcares em monossacarídeos digeríveis.

Porém, alguns autores relataram que a presença dos RO nas dietas ou a suplementação destas com a enzima α -galactosidase não promoveu nenhum efeito nos valores de digestibilidade dos nutrientes. Gabert *et al.* (1995) verificaram que suínos alimentados com dietas a base de farinha de soja com adição de RO não apresentaram nenhum efeito na digestibilidade ileal das proteínas e da maioria dos aminoácidos mensurados. Os autores, porém justificaram que os resultados encontrados podem ter sido devidos à reduzida concentração dos RO presentes nas dietas experimentais. Irish *et*

al. (1995) não observaram nenhum efeito na digestibilidade ileal das proteínas quando, à dieta de frangos, foi adicionada a enzima α -galactosidase. Neste caso os autores sugeriram que essas variações nos resultados podem ter sido devido a diferenças nas fontes produtoras e na atividade das enzimas utilizadas.

O efeito do processamento enzimático nos valores de ganho de peso, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR) para as dietas contendo farinha de soja são mostrados nas Tabelas 9, 10, 17 e 18. Os resultados (Tabela 9) mostraram que os valores de ganho de peso foram estatisticamente semelhantes para os animais alimentados com dieta contendo farinha de soja desengordurada com e sem oligossacarídeos (D1 e D2). Para as dietas contendo farinhas de soja integral (D3 e D4) a presença dos RO também não promoveu diferença significativa, em nível de 5 % de probabilidade (Tabela 17). Com base nesses resultados comprova-se também a melhor qualidade nutricional da caseína em relação à proteína de soja, pois a primeira promoveu maior ganho de peso durante os 14 dias de experimento.

Em estudos realizados por Graham *et al.* (2002) foi observado melhora nos valores de digestibilidade em frangos de corte alimentados com dieta de farinha de soja tratada enzimaticamente com α -galactosidase porém, a melhora no ganho de peso dos animais alimentados com esta dieta com reduzidos teores de RO não foi significativa. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos realizados por Igbasan *et al.* (1997) e Marsman *et al.* (1997) que verificaram que a suplementação de dietas com a enzima α -galactosidase não promoveu melhora nos parâmetros de ganho de peso e crescimento em frangos de corte.

De acordo com os resultados apresentados (Tabela 10 e 18) observa-se que a dieta de caseína apresentou valores de PER, PERR, NPR e NPRR superiores e estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) aos encontrados para as farinhas de soja utilizadas. Este fato demonstra que a qualidade protéica das farinhas de soja é inferior à caseína para promover crescimento e manutenção do peso de ratos. Porém não houve variação significativa para esses valores entre as dietas formuladas com farinha de soja

desengordurada (D1 e D2) e entre as dietas contendo farinha de soja integral (D3 e D4) o que indica que a presença ou não dos oligossacarídeos de rafinose nas dietas, contendo farinha de soja, estudadas não influenciaram na qualidade da proteína no que se refere a esses parâmetros citados.

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram encontrados por Zdunczyk *et al.* (1998) que, ao avaliarem o efeito da presença dos RO na dieta, relataram um decréscimo nos valores de digestibilidade desta em relação à dieta sem esses açúcares, mas os valores de PER para as duas não diferiram estatisticamente.

O aumento da digestibilidade pode levar a um aumento da quantidade de nutrientes protéicos disponíveis para serem utilizados, e dessa forma promover maior crescimento do animal (GRAHAM *et al.*, 2002). Porém além da digestibilidade deve-se levar em conta outros fatores que influem no valor nutricional das proteínas, como a sua composição e a biodisponibilidade de aminoácidos (SGARBIERI, 1996). A biodisponibilidade de aminoácidos de uma proteína é a medida dos aminoácidos absorvidos que serão utilizados na síntese protéica (MONTEIRO *et al.*, 2003). Desta forma, a melhoria da capacidade de digestão não implica necessariamente no aumento da qualidade protéica, pois os aminoácidos podem estar sendo bem absorvidos, e não estar participando da síntese protéica em virtude da deficiência de alguns aminoácidos essenciais (PEREIRA e COSTA, 2002).

Neste sentido, a composição das farinhas de soja integral, do presente trabalho, diferiu apenas na presença ou não dos oligossacarídeos de rafinose, ou seja, a composição de aminoácidos era a mesma. Isto pode ter levado a um comportamento semelhante das dietas (D3 e D4) nos parâmetros de ganho de peso, PER e NPR que pode ter sido devido à composição aminoacídica da proteína de soja que de uma forma geral é deficiente em aminoácidos sulfurados. Este fato, aliado a maior necessidade destes aminoácidos em ratos, pode subestimar a qualidade protéica desta leguminosa em promover crescimento animal.

As dietas D1 e D2 também não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nos valores de ganho de peso, PER e NPR, sugerindo que a adição de células de levedura não melhorou a

composição aminoacídica da farinha utilizada na dieta D1. Portanto, nesse caso, a melhora da digestibilidade das proteínas verificada na dieta contendo farinha de soja desengordurada tratada, não promoveu melhora no desempenho animal, provavelmente devido a sua composição aminoacídica.

Oligossacarídeos de rafinose são considerados carboidratos indigeríveis devido a sua resistência a digestão no intestino delgado (SAKAGUCHI *et al.*, 1998). Isto se deve à ausência da enzima α -galactosidase na mucosa intestinal de humanos e animais monogástricos, que faz com que esses açúcares sejam conduzidos intactos à parte posterior do intestino, onde são fermentados por bactérias anaeróbias. Um dos principais produtos dessa fermentação são os ácidos graxos de cadeia curta que são absorvidos e utilizados como fonte de energia pelas células epiteliais do intestino grosso (HENNING e HIRD, 1972; ROEDIGER, 1980).

Observando os dados apresentados nas Tabelas 11 e 19, a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) não diferiu estatisticamente para os animais alimentados com dieta contendo farinha de soja desengordurada sem e com oligossacarídeos de rafinose (D1 e D2). Resultados semelhantes foram encontrados entre os tratamentos contendo farinha de soja integral (D3 e D4).

Henninsson *et al.* (2001) investigaram a produção e a distribuição dos ácidos graxos de cadeia curta no intestino de ratos submetidos à dieta à base farinha de feijão. Estes autores verificaram que, dietas contendo farinha de feijão com reduzida concentração de RO, não promoveram diferença na produção de ácidos graxos de cadeia curta, em relação às dietas contendo altos teores desses açúcares.

Outros autores encontraram diferenças na produção de ácidos graxos de cadeia curta entre animais alimentados com dietas com e sem RO. Sakaguchi *et al.* (1998) verificaram maior produção de ácidos propiônico e butírico no ceco de ratos, quando foi adicionado RO na dieta de caseína. Smiricky-Tjardes *et al.* (2003) encontraram resultados semelhantes quando porcos foram alimentados com dieta à base de farinha de soja. Porém esses mesmos autores relataram que a fermentação dos oligossacarídeos é mais lenta quando estes estavam na matriz da leguminosa, do que quando foram adicionadas à dieta na forma purificada. Além disso, verificaram também que

a produção de gás e ácidos graxos de cadeia curta foi maior quando proveniente da fermentação do açúcar refinose. Segundo os autores, a presença de uma molécula de galactose a mais, em ligação α -1,6, no açúcar estaquiose faz com que a quebra e conseqüentemente a fermentação seja mais lenta, gerando menor concentração dos produtos dessa fermentação.

Isto pode ser um dos motivos que justificam o fato de no presente trabalho a produção de AGCC pelos animais ingerindo dieta com oligossacarídeos não ter sido alta em relação à dieta sem oligossacarídeos. Uma vez que o teor de estaquiose das farinhas com RO era quase duas vezes maior que o teor de refinose, pode ter havido uma fermentação mais lenta e a uma produção menor de AGCC durante o experimento. Levrat *et al.* (1991) observaram que em ratos alimentados com dieta à base de soja, a produção máxima de AGCC ocorreu após 16 dias de experimento, o que também pode ter influenciado os resultados encontrados neste trabalho que teve a duração de 14 dias. Provavelmente com um tempo maior de experimento seria possível verificar diferença na produção de ácidos graxos de cadeia curta pelos animais alimentados com as dietas contendo farinha de soja com e sem RO.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que o uso de farinhas de soja livres de oligossacarídeos de refinose, seja pelo tratamento com uma preparação enzimática contendo α -galactosidase ou com células de *Debaryomyces hansenii*, promoveu uma melhora nos valores de digestibilidade protéica. Isto indica que a remoção dos RO em produtos de soja pode melhorar o valor nutricional por aumentar a absorção dos nutrientes, uma vez que não exista nenhum outro fator que interfira com a utilização destes nutrientes absorvidos no organismo.

6. CONCLUSÕES

- Leveduras *Debaryomyces hansenii* viáveis foram capazes de hidrolizar os oligossacarídeos de rafinose (RO) presentes na suspensão de farinha de soja desengordurada, demonstrando seu potencial na eliminação desses açúcares e produção de farinha de soja desengordurada livre de RO.
- A atividade de α -galactosidase extracelular aumentou com o tempo de incubação da levedura na farinha de soja desengordurada, enquanto o conteúdo dos RO foi reduzido, sendo a redução total desses açúcares observada com 36 h, nas condições do experimento.
- Os RO presentes na suspensão de farinha de soja integral, tratada por 20 h com a preparação enzimática de α -galactosidase de *D. hansenii* na concentração de 1,2 U/g de farinha, foram totalmente hidrolisados, demonstrando que esta enzima pode ser usada para produção de farinha de soja integral livre de RO.
- Em ensaios biológicos com ratos alimentados por 14 dias com dietas contendo farinhas de soja com e sem RO, foi demonstrado que houve melhora significativa na digestibilidade verdadeira das dietas contendo farinhas de soja sem RO em relação as farinhas com RO.
- A maior digestibilidade não promoveu melhora significativa nos valores de ganho de peso, coeficiente de eficácia protéica (PER) e razão protéica líquida (NPR), durante o período do experimento.

- A presença ou não de RO na dieta, nas concentrações estudadas, não alterou significativamente a produção de ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal dos ratos, durante o período do experimento.

7. REFERÊNCIAS

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

ANDERSON, R. L., WOLF, W.J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **Journal of Nutrition**, v.125, p.581S-588S, 1995.

ANTUNES, P.L., SGARBIERI, V.C. Processamento e valor nutricional da soja, *Glycine max* (L.) Merrill. **AGROS**, v.15, p.65-84, 1980.

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

BAKER, E.C., MUSTAKAS, G.C. Heat Inactivation of Tripsin Inhibitor, lipoxygenase and urease in soybeans: effect of acid and base additives. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.50, p.137-141, 1973.

BARNES, S., KIM, H., XU, J. Soy in the prevention and treatment of chronic diseases. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, PR. **Anais**, EMBRAPA-SPI, p.295-308, 1999.

BAUCELLS, F., PEREZ J.F., MORALES, J., GASA, J. Effect of alpha-galactosidase supplementation of cereal-soya-bean-pea diets on the production performances, digestibility and lower gut fermentation in growing and finishing pigs. **Animal Science**, v.71, p.157-164, 2000.

BELLAVER, C., SNIZEK, J.P.N. Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding. In: 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**, v.11, p.138-143, 1957.

BEZKOROVAINY, A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.399S-405S, 2001.

BHASKAR, B., RAMACHANDRA, G., VIRUPAKSHA, T.K. Alpha-galactosidase of germinating seeds of *Cassia sericea* Sw. **Journal Food Biochemistry**, v.14, p.45-59, 1990.

BULPIN, P.V., GIDLEY, M.J., JEFFCOAT, R., UNDERWOOD, D.J. Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant α -galactosidase. **Carbohydrate Polymers**, v.12, p.155-168, 1990.

CAFÉ, M.B., SAKOMURA, N.K., JUNQUEIRA, O.M., CARVALHO, M.R.B., DEL BIANCHI, M. Determinação do valor nutricional das sojas integrais processadas para aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, p.67-74, 2000.

CALLEGARI, C. M. Hidrólise enzimática de oligossacarídeos de rafinose em produtos de soja por α -galactosidasas. Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG. 49p. (Tese M.S), 2003.

CASTILLO, E.M., DE LUMEN, B.O., REYES, P.S., DE LUMEN, H.Z. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.38, p.351-355, 1990.

COOK, P.E. Fungal ripened meats and meat products. In: CAMPBELL-PIATT, G., COOK, P.E. (ed.). **Fermented meats**. London: Chapman e Hall; 1995. p.110-129.

COON, C. N., LESKE, K.L., AKAVANICHAN, O., CHENG, T.K. Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters. **Poultry Science**, v.69, p.787-793, 1990.

CRUZ, R., PARK, Y.K. Production of fungal α -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. **Journal Food Science**, v. 47, p.1973-1975, 1982.

CRUZ, R., SILVA, A.L. Soybean (*Glicine max*), endogenous alpha galactosidase and invertase during the germinative process. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.29, p.435-443, 1986.

DALE, N. Solubilidad de la proteina: indicador del procesado de la harina (pasta) de soya. México: **Asociación Americana de Soya**, 1991, 11p.(Buletin Técnico, 89).

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

DE REZENDE, S. T., GUIMARÃES, V. M. Galactosidases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1 ed. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa LTDA, 2004, 412p.

DE REZENDE, S.T. **Teores de oligossacarídeos de rafinose em soja, purificação e caracterização de invertases e α -galactosidases de microrganismos**. Universidade de Brasília, Brasília-DF, 157p. (Tese D.S.), 1998.

DE, S.S. Technology of production of edible flours and protein products from soybean. **Agricultural Services Bulletin**, v.11, p.1-158, 1971.

DEY, P.M. In: DEY, P.M., DIXON, R.A. **Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants**. New York: Academic Press, 1985, p.53-129.

DEY, P.M., PRIDHAM, J.B. Biochemistry of α -galactosidases. **Advances Enzimology**, v.36, p.91-130, 1972.

DONKOR, O.N., HENRIKSSON, A., VASILJEVIC, T., SHAH, N.P. α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. **Food Chemistry**, v.104, p.10-20, 2007.

ENCINAS, J.P., LOPES-DÍAZ, T.M., GARCIA-LOPEZ, A.O., MORENO, B. Yeast populations on Spanish fermented sausages. **Meat Science**, v.54, p.203-208, 2000.

FAO/OMS. INFORME DE UNA REUNIÓN CONSULTIVA CONJUNTA FAO/OMS/UNU DE EXPERTOS. **Necesidades de energia y de proteínas**. Ginebra. 1985. 220p.

FLEMING, S.E., LEE, B. Growth performance and intestinal transit time of rats fed purified and natural dietary fibers. **Journal of Nutrition**, v.113, p.592-601, 1983.

GABERT, V.M., SAUER, W.C., MOSENTHIN, R., SCHIMITZ, M., ABRENS, R. The effect of oligosaccharides and lactitol on the ileal digestibilities of amino acids, monosaccharides and bacterial populations and metabolites in the small intestine of weanling pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v.75, p.99-107, 1995.

GDALA, J., JOHANSEN, H.N., BACH KNUDSEN, K.E., KNAP, I.H., WAGNER, P., JØRGENSEN, O.B. The digestibility of carbohydrates, protein and fat in the small and large intestine of piglets fed non-supplemented and enzyme supplemented diets. **Animal Feed Science Technology**, v.65, p.15-33, 1997.

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

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**, v.81, p.1014-1019, 2002.

GRIESHOP, C.M., KADZERE, C.T., CLAPPER, G.M., FRAZIER, R.L., FAHEY JR., G.C. Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.7684–7691, 2003.

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

HASHIMOTO, H., KATAYAMA, C., GOTO, M., OKINAGA, T., KITAHATA, S. Enzymatic synthesis of α -linked galactooligosaccharides using the reverse reaction of a cell-bound α -galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.59, p.179-183, 1995.

HEGSTED, D. M. Protein quality and its determination. In: WHITAKER, J. R., TANNENBAUM, S. R. **Food proteins**. Westport, Connecticut: AVI, 1977. p. 347-362.

HENNING, S.J., HIRD, F.J.R. Ketogenesis from butyrate and acetate by the caecum and the colon of rabbits. **Biochemical Journal**, v.130, p.785–790, 1972.

HENNINSSON, A.M., MARGARETA, E., NYMAN, G.L., BJÖRCK, I.M.E. Content of short-chain fatty acids in the hindgut of rats fed processed bean (*Phaseolus vulgaris*) flours varying in distribution and content of indigestible carbohydrates. **British Journal of Nutrition**, v.86, p.379-389, 2001.

HENRISSAT, B., BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal**, v. 93, p.781-788, 1993.

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 α -galactosidase by *Kluyveromyces lactis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.43, p.58-64, 1995.

HYMOWITZ, T., COLLINS, F.I., PANCZER, J., WALKER, W.M. Relationship between the content of oil protein, and sugar in soybean seed. **Agronomy Journal**, v.64, p.613-616, 1972.

IGBASAN, F.A., GUENTER, W., SLOMINSKI, B.A. The effect of pectinase and α -galactosidase supplementation on the nutritive value of peas for broiler chickens. **Canadian Journal of Animal Science**, v.77, p.537-539, 1997.

IRISH, G. C., BARBOUR, G. W., CLASSEN, H. L., TYLER, R. T., BEDFORD, M. R. Removal of the alpha-galactosides of sucrose from soybean meal using either ethanol extraction or exogenous alpha-galactosidase and broiler performance. **Poultry Science**, v.74, p.1484-1494, 1995.

JIMÉNEZ, M.J.M., ELÍAS, L.G., BRESSANI, R., NAVARRETE, D.A., GÓMEZ-BRENES, R., MOLINA, M.R. Estudios bioquímicos y nutricionales de la semilla germinada de soya. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.35, p.480-490, 1985.

JONES, D.A., DUPONT, M.S., AMBROSE, M.J., FRIAS, J., HEDLEY, L.C. The discovery of compositional variation for the raffinose family of oligosaccharides in pea seeds. **Seed Science Research**, v.9, p.305-310, 1999.

KANDLER, O., HOLF, H. Metabolism and function of oligosaccharides. In: **Biochemistry of plants**. v.3. Carbohydrates, Press J. (ed.), New York: Academic Press, p.231-270, 1980.

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

KAWAMURA, S., TADA, M. Isolation and determination of sugars from the cotyledon, hull and hypocotyl of soybeans by carbon column chromatography. **Technical Bulletin of Faculty of Agricultural, Kagawa University**, v.18, p.138-141, 1967.

KIM, W.D., KOBAYASHI, O., KANECO, S., SAKAKIBARA, Y., PARK, G.G., KUSAKABE, I., TANAKA, H., KOBAYASHI, H. α -Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) cells. **Phytochemistry**, v.61, p.621-630, 2002.

KIM, W.J., SMITH, C.J.B., NAKAYAMA, T.O.M. The removal of oligosaccharides from soybeans. **Lebensm-Wiss. Technology**, v.6, p.201-204, 1973.

KOBAYASHI, H., SUZUKI, H. Studies on the decomposition of raffinose by α -galactosidase of mold. **Journal Fermentation Technology**, v.50, p.625-632, 1972.

KOIZUMI, K., TANIMOTO, T., OKADA, Y., HARA, K., FUJITA, K., HASHIMOTO, H., KITAHATA, S. Isolation and characterization of novel heterogeneous branched cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins) produced by transgalactosylation with α -galactosidase from coffee bean. **Carbohydrate Research**, v.278 p.129- 142, 1995.

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

LEBLANC, J.G., GARRO, M.S., SILVESTRONI, A., CONNES, C., PIARD, J.C., SESMA, F., SAVOY DE GIORI, G. Reduction of α -galactooligosaccharides in soymilk by *Lactobacillus fermentum* CRL 722: *in vitro* and *in vivo* evaluation of fermented soymilk. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.876-881, 2004a.

LEBLANC, J.G., SILVESTRONI, A., CONNES, C., JUILLARD, V., DE GIORI, G.S., PIARD, J., SESMA, F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase. **Genetics and Molecular Research**, v.3 (3), p. 432-440, 2004b.

LESKE, K. L., COON, C.N. Nutrient content and protein and energy digestibilities of ethanol-extracted, low α -galactoside soybean meal as compared to intact soybean meal. **Poultry Science**, v. 78, p.1177–1183, 1999.

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**, v.70, p.892-895,1991.

LEVRAT, M. A., BEHR, S. R., RÉMÉSY, C., DEMIGNÉ, C. Effects of soybean fiber on cecal digestion in rats previously adapted to a fiber-free diet. **Journal of Nutrition**, v.121, p.672–678, 1991.

LIENER, I. E. Factors affecting the nutritional quality of soya products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.58, p.406–415, 1981.

LIMA, G.J.M.M. Importance of the nutritional quality of soybeans and their products in the feed market: actual situation and future trends. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, PR. **Anais**, EMBRAPA-SPI, p.165-175,1999.

LIU, J.J., ODEGARD, W., DE LUMEN, B.O. Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf. Purification and N-terminal sequences. **Plant Physiology**, v.109, p.505-511, 1995.

LIU, K. **Soybeans - Chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman e Hall; 1997. 532p.

- LIYING, Z., LI, D., QIAO, S., JOHNSON, E.W., LI, B., THACKER, P.A., HAN, I.N.K. Effects of stachyose on performance, diarrhoea incidence and intestinal bacteria in weanling pigs. **Archives of Animal Nutrition**, v.57, p.1-10, 2003.
- LJOKJEL, K., HARSTAD, O. M., SKREDE, A. Effect of heat treatment of soybean meal and fish meal on amino acid digestibility in mink and dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.84, n.1-2, p.83-95, 2000.
- LUONTERI E., TENKANEN M., VIIKARI, L. Substrate specificities of *Penicillium simplicissimum* α -galactosidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p.192-198, 1998.
- MANZANARES, P., GRAAFF, L.H., VISSER, J. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger* purification of a novel α -galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.383-390, 1998.
- MARGOLLES- CLARK, E., TENKANEN, M., LUONTERI, E., PENTILLÄ, M. Three α -galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. **European Journal Biochemistry**, v. 240, p.104-111, 1996.
- MARSMAN, G.J.P., GRUPPEN, H., VAN DER POEL, A.F.B., KWAKKEL, R.P., VERSTEGEN, M.W.A., VORAGEN, A.G.J. The effect of thermal processing and enzyme treatment of soybean meal on growth performance, ileal nutrient digestibilities, and chime characteristics in broiler chicks. **Poultry Science**, v.76, p.864– 872, 1997.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31, p. 426-428, 1956.
- MINORSKY, P. The hot and the classic. **Plant Physiology**, v.131, p.1159-1160, 2003.
- MITAL, B. K., STEINKRAUS, K.H. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soy milk. **Journal Food Science**, v.40, p.114-118, 1975.
- MONTEIRO, M. R. P., MOREIRA, M. A., COSTA, N. M. B., OLIVEIRA, M. G. A, PIRES, C. V. Avaliação da digestibilidade protéica de genótipos de soja com ausência e presença do inibidor de tripsina kunitz e lipoxigenases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 99-107, 2003.
- MOREIRA, A.M. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, PR. **Anais**, EMBRAPA-SPI, p.99-104, 1999.

- MULIMANI, V.H., THIPPESWAMY, S., RAMALINGAM. Enzymatic degradation of oligosaccharides in soybean flours. **Food Chemistry**, v.59, p.279-282, 1997.
- MULIMANI V.H., RAMALINGAM. Enzymic hydrolysis of raffinose and stacchyoze in soymilk by α -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.36, p.897-905, 1995.
- NACZK, M., AMAROWICZ, R., SHAHIDI, F. α -Galactosides of sucrose in foods: composition, flatulence-causing effects, and removal. In: F. Shahidi (Ed.), **Antinutrients and Phytochemicals in Food**, 1997, p.127-151.
- NIELSEN, N.C. Soybean seed composition. In: Verma, D.P.S., Shoemaker, R.C. (eds). **Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology**. CAB International, Wallingford, 1996, p 127-164.
- NOBRE, A., LUCAS, C., LEÃO, C. Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3594-3598, 1999.
- OLGUIN, M.C., HISANO, N., D' OTTAVIO, A.E., ZINGALE, M.I., REVELANT, G.C., CALDERARI, S.A. Nutritional and antinutritional aspects of na Argentinian soy flour assessed on weanling rats. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p. 441-449, 2003.
- OMOSAIYE, O., CHERYAN, M., MATHEWS, M.E. Removal of oligosaccharides from soybean water extracts by ultrafiltration. **Journal of Food Science**, v.43, p.354-360, 1978.
- PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMINGUEZ, J.M. Production of xilytol from raw wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii* NRRLY-7426. **Bioprocess Engineering**, v. 13, p.125-131, 1995.
- PARSONS, C.M. Processamento optimo de la pasta de soya destinada al consumo animal. México: **Asociación Americana de Soya**. 1992. 8p.(Buletin Técnico, 116)
- PARSONS, C.M., YHANG, Y., ARABA, M. Nutritional evaluation of soybean meals varying in oligosaccharide content. **Poultry Science**, v. 79, p. 1127-1131, 2000.
- PEREIRA, C.A.S., COSTA, N.M.B. Proteínas de feijão preto sem casca: digestibilidade em animais convencionais e isentos de germes (*germ-free*). **Revista de Nutrição**, v.15 (1), p.5-14, 2002.
- PETERSEN, K.M., WESTALL, S., JESPERSEN, L. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surface-ripened cheeses. **Journal Dairy Science**, v.85, p. 478-486, 2002.

PUCHART, V., BIELY, P. Glycosylation of internal sugar residues of oligosaccharides catalyzed by α -galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1726, p.206-216, 2005.

QIN, G., ELST, E. R., BOSCH, M. W., van der POEL, A. F. B. Thermal processing of whole soya beans: studies on the inactivation of antinutritional factors and effects on ileal digestibility in piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p.313-324, 1996.

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**, v.123, p.1939-1955, 1993.

RIBEIRO, M. **Estabelecimento de um método colorimétrico para determinação da atividade da galactinol sintase, purificação parcial e caracterização da enzima de sementes de soja**. Universidade de Brasília, Brasília-DF, 125p. (Tese D.S), 2001.

ROEDIGER. W.E.W. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. **Gut**, v. 21, p.793-798, 1980.

ROSEIRO, J.C., PEITO, M. A., AMARAL-COLLAÇO, M.T. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. **Archives Microbiology**, v.156, p. 484-490, 1991.

SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SAKAGUCHI, E., SAKODA, C., TORAMARU, Y. Caecal fermentation and energy accumulation in the rat fed on indigestible oligosaccharides. **British Journal of Nutrition**, v.80, p.469-476, 1998.

SALDANHA-DA-GAMA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. Characterization of yeasts associated with Portuguese pork-based products. **International Journal Food Microbiology**, v.37, p.201-207, 1997.

SAMPAIO, F.C., MANTOVANI, H.C., PASSOS, F.J.V., MORAES, C.A., CONVERTI, A., PASSOS, F.M.L. Bioconversion of D-xylose to xylitol by *Debaryomyces hansenii* UFV-170: Product formation versus growth. **Process Biochemistry**, v. 40, p.3600-3606, 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**, v.41, p.18-21, 1997.

- SARAVITZ, D.M., PHARR, D.M., CARTER, T.E. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, v.83, p.185-189, 1987.
- SCALABRINI, P., ROSSI, M., SPETTOI, P., MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.213-219, 1998.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo: Varela, 1996. 517 p.
- 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, p. 250-261, 1987.
- SILVA, M.R., SILVA, M.A.A.P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, v.13, p. 3-9, 2000.
- SIMERSKÁ, P., KUZMA, M., MONTI, D., RIVA, S., MACKOVÁ, M., KREN, V. Unique transglycosylation potential of extracellular α -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p.128-134, 2006.
- SMIRICKY, M.R., GRIESHOP, C.M., ALBIN, D.M., WUBBEN, J.E., GABERT, V.M., FAHEY, G.C.J. The influence of soy oligosaccharides on apparent and true ileal amino acid digestibilities and fecal consistency in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 80, p.2433-2441, 2002.
- SMIRICKY-TJARDES, M.R., GRIESHOP, C.M., FLICKINGER, E.A., BAUER, L.L., FAHEY, G.C. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal Animal Science**, v.81, p.2535–2545, 2003.
- 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**, v.52, p.204-221, 1996.
- SOY PROTEIN COUNCIL. **Soy Protein Products: Characteristics, Nutritional Aspects and Utilization**. Soy Protein Council, Washington, D.C.1987.
- STIPANUK, M.H. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. Philadelphia: **Saunders Company**; 2000.
- SUAREZ, F.L., SPRINGFIELD, J., FURNE, J.K., LOHRMANN, T.T., KERR, P.S., LEVITT, M.D. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.135-139, 1999.

SUGIMOTO, H., VAN BAUREN, J.P. Removal of oligosaccharides from soymilk by enzyme from *Aspergillus saitoi*. **Journal Food Science**, v.35, p.655, 1970.

THANANUNKUL, D., TANAKA, M., CHIEHESTER, C.O., LI, T. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of α -galactosidase within polycrylamide gel. **Journal Food Science**, v.41, p.173-175, 1976.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA.
disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx>.
acesso em:18/06/2007.

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

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

VIANA, P. A. **Caracterização cinético-bioquímica e aplicações biotecnológicas de alfa-galactosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 174p. (Tese M.S), 2005.

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 α -galactosidases. **Food Chemistry**, v.103, p. 331-337, 2007.

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., GUIMARÃES, V.M. Extracellular α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hidrolysis of raffinose oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2385-2391, 2006.

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 α -galactosidase. **Food Chemistry**, v.93, p.665-670, 2005.

WAGNER, J.R., BECKER, R., GUMBMAN, M.R., OLSON, A.C. Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose and oligosaccharide-free bean residue. **Journal Chemistry Technology**, v.56, p.3-13, 1976.

WHITE, C. E., CAMPBELL, D. R., McDOWELL, L.R. Effects of dry matter content on trypsin inhibitors and urease activity in heat treated soya beans fed to weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, p.105-115, 2000.

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

YOSHIDA, S., TAN, C.H., SHIMOKAWA, T., TURAKAINEN, H., KUSAKABE, I. Substrate specificities of α -galactosidases from yeasts. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.359-361, 1997.

ZDUNCZYK, Z., JUSKIEWICZ, J., FREJNAGEL, S., GULEWICZ, K. Influence of alkaloids and oligosaccharides from white lupin seeds on utilization of diets by rats and absorption of nutrients in the small intestine. **Animal Feed Science Technology**, v.72, p.143–154, 1998.

ZHU, A., GOLDSTEIN, J. Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase. **Gene**, v.140, p.227-231,1994.