



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá
Brasil

Lopes Junior, Carlos de Oliveira; Pinheiro Amorim, Aline Cristina; Santana de Souza, Mariana Wanessa; Medeiros Silva, Viviane Dias; Ramalho Silva, Mauro; Coelho Silvestre, Marialice Pinto

Otimização da extração enzimática da proteína do feijão

Acta Scientiarum. Technology, vol. 32, núm. 3, 2010, pp. 319-325

Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226528010>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Otimização da extração enzimática da proteína do feijão

Carlos de Oliveira Lopes Junior, Aline Cristina Pinheiro Amorim, Mariana Wanessa Santana de Souza, Viviane Dias Medeiros Silva, Mauro Ramalho Silva e Marialice Pinto Coelho Silvestre*

Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: malice@farmacia.ufmg.br

RESUMO. Considerando-se a importância do feijão na dieta do brasileiro e, ainda, que este alimento não é permitido na alimentação de fenilcetonúricos, é fundamental promover a extração de suas proteínas, visando à posterior remoção de fenilalanina. No intuito de se otimizar a extração proteica do feijão, dois métodos enzimáticos foram, inicialmente, empregados. Para aquele que produziu o maior rendimento de extração proteica (REP), foi realizado um estudo do efeito de diversos parâmetros, tais como velocidade de centrifugação, tempo de reação, pH inicial e tipo de enzima (uma de *Bacillus licheniformis*, duas de *Bacillus subtilis*, uma de *Aspergillus sojae* e uma de *Papaya carica*). Os resultados indicaram que o melhor método foi o que empregou uma concentração de matéria-prima de 1:10 (p v^{-1}), pH inicial de 10,5, temperatura de 50°C, e ausência de agitação em ultraturrax. Com relação aos parâmetros testados, o maior REP (93,1%) foi obtido ao se utilizar a enzima de *Bacillus licheniformis*, na velocidade de centrifugação de 10.640 $\times \text{g}$, tempo de reação de 3h e pH inicial de 10,5.

Palavras-chave: feijão, proteínas, enzimas, tempo de reação, pH.

ABSTRACT. Optimization of enzymatic protein extraction from beans.

Considering the importance of beans in the Brazilian diet and the fact that it is forbidden in phenylketonuric feeding, it is relevant to promote the extraction of its proteins, for phenylalanine removal. Aiming for the optimization of protein extraction from beans, two enzymatic methods were initially employed. For the one that produced the highest protein extract yield (PEY), a study was conducted to assess the effect of several parameters, such as centrifugation velocity, reaction time, initial pH and type of enzyme (one of *Bacillus licheniformis*, two of *Bacillus subtilis*, one of *Aspergillus sojae* and one of *Papaya carica*). The results showed that the best method was the one that employed a concentration of raw material of 1:10 (w v^{-1}), initial pH of 10.5, temperature of 50°C, in the absence of ultraturrax treatment. With regard to the parameters tested, the largest PEY (93.1%) was obtained by using the enzyme from *Bacillus licheniformis*, the centrifugation velocity of 10,640 $\times \text{g}$, the reaction time of 3h and initial pH of 10.5.

Key words: beans, proteins, enzymes, reaction time, pH.

Introdução

O feijão é uma das principais leguminosas presentes na dieta dos brasileiros e ocupa lugar essencial na nutrição humana, principalmente por possuir elevados teores de proteína (20-40%) e complementar, nutricionalmente, outros alimentos, como o arroz. O feijão não contém quantidades expressivas de prolaminas e de glutelinas, no entanto, apresenta elevados teores de globulinas e albuminas (SGARBIERI, 1996; BROUGHTON et al., 2003).

A maioria das proteínas dos vegetais é usualmente fracionada com base em suas diferentes solubilidades em água (fração albumina) e em solução salina (fração globulina) e, segundo SGARBIERI (1996), cerca de 80% das proteínas dos

grãos de feijão podem ser extraídas em solução 0,3 N de NaCl.

A utilização de condições alcalinas e/ou salinas de reação, comumente empregadas na extração de proteínas de sementes e grãos, apresenta uma série de inconvenientes (WANG et al., 1999), portanto, pode-se lançar mão de métodos enzimáticos, empregando-se diversas proteases. Este procedimento tem sido utilizado por vários autores na obtenção de extratos proteicos de soja, arroz e trigo (FISCHER et al., 2001; WANG; WANG, 2004; AGBOOLA et al., 2005). Alguns estudos foram realizados no mesmo laboratório do presente trabalho, em que foram empregados métodos enzimáticos para se extrair as proteínas de fubá de

milho (CAPOBIANGO et al., 2007) e de farinha de arroz (SILVESTRE et al., 2009), e os resultados de rendimento de extração variaram de 72 a 87% e de 29 a 64%, respectivamente. Essa etapa de extração proteica corresponde à primeira na obtenção de alimentos com teor reduzido de fenilalanina, para ser introduzido na dieta de fenilcetonúricos.

O presente trabalho teve como objetivos utilizar dois métodos enzimáticos para a extração das proteínas do feijão, assim como avaliar o efeito de diversos parâmetros no rendimento deste processo.

Material e métodos

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) foi adquirido no comércio de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil. Foram utilizados três pacotes de 1 kg do mesmo lote do feijão carioca tipo 1 (PINK, Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil). As proteases do *Bacillus licheniformis* (Protemax® 580 L) e a do *Bacillus subtilis* (Protemax® N200) foram gentilmente fornecidas pela Prozyn (São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil). Outra protease do *Bacillus subtilis* (Corolase® 7089), uma do *Aspergillus sojae* (Corolase® LAP) e uma de origem vegetal (*Papaya carica* - Corolase® L10) foram gentilmente doadas pela AB Enzymes Brasil Comércio Ltda. (Barueri, Estado de São Paulo, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico. Algumas características dessas enzimas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características das proteases comerciais utilizadas na extração das proteínas do feijão.

Nome comercial	Origem	Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)	Estabilidade	
			pH	T (°C)
Protemax® 580 L ¹	<i>Bacillus licheniformis</i>	29	9,5	25 < T < 75
Protemax® N200 ¹	<i>Bacillus subtilis</i>	20	7,0 a 7,5	50 < T < 55
Corolase® 7089 ²	<i>Bacillus subtilis</i>	82	7,0	45 < T < 55
Corolase® LAP ²	<i>Aspergillus sojae</i>	63	9,0	55 < T < 70
Corolase® L10 ²	<i>Papaya carica</i>	32	3,0 a 9,0	50 < T < 70

Fontes: ¹Prozyn (2005); ²AB Enzymes (2001, 2002, 2003). (U mL⁻¹): quantidade de enzima que produz o equivalente a 1 µg de tirosina por minuto, em pH 9,0, a 37°C e a 275 nm.

Preparo da amostra

Inicialmente, preparou-se um lote dos três pacotes de feijão, que, em seguida, foi moído (moinho da marca Marconi – TE 020, série 870348, Piracicaba, Estado de São Paulo) e passado em tamis de 42 Mesh, para se obter uma farinha homogênea. Esta amostra foi, então, acondicionada em potes de vidro, hermeticamente fechados, e mantida sob refrigeração até o momento de uso.

Determinação da composição química do feijão

A composição química do feijão foi determinada, segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995), sendo todas as análises realizadas em triplicata. O grau de umidade foi determinado por dessecação em estufa ventilada (Quimis Q-314M242 série 020, Diadema, Estado de São Paulo) a 105°C até peso constante; o teor de proteína, pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando-se 6,25 como fator de conversão de nitrogênio total para proteína total (GREENFIELD; SOUTHGATE, 1992); os lipídeos, por extração com éter etílico, pelo método de Soxhlet modificado (Quimis Q-308G26, série 018, Diadema, Estado de São Paulo); os minerais, por incineração em mufla a 550°C. O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteínas, lipídeos totais e cinzas e inclui a fibra alimentar total.

Extração enzimática das proteínas do feijão

Para a extração proteica do feijão, foram testados dois métodos enzimáticos previamente utilizados no mesmo laboratório do presente trabalho por Capobianco et al. (2007) e Silvestre et al. (2009), para a extração das proteínas do fubá de milho e farinha de arroz, respectivamente. Desses dois métodos testados, o que levou ao maior rendimento de extração proteica (REP) foi utilizado para se avaliar os demais parâmetros.

Ao se utilizar o método de Capobianco et al. (2007), o feijão moído foi suspenso em água na proporção de 1:5 (p v⁻¹). A suspensão foi agitada em ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) a 19.000 rpm por 5 min., e a protease de *Bacillus licheniformis* adicionada na relação enzima:substrato (E:S) de 1:10. Utilizou-se pH de 9,5, temperatura de 55°C e tempo de reação de 5h. O ajuste do pH foi realizado com solução de NaOH a 3 mol L⁻¹ e a temperatura controlada em banho de vaselina líquida, sobre agitador magnético. Após 5h de reação sob agitação constante, a suspensão foi resfriada a 25°C e centrifugada por 15 min. a 1.700 x g. O extrato proteico do feijão foi recolhido em um recipiente e o resíduo foi, então, lavado duas vezes com água destilada, repetindo-se a etapa de centrifugação entre as lavagens e recolhendo-se sempre o extrato no mesmo recipiente. O resíduo foi pesado e submetido à determinação do teor de proteína.

No método de Silvestre et al. (2009), que utiliza a mesma enzima, o processo foi semelhante, diferenciando-se por empregar o pH inicial de 10,5, a temperatura de 50°C, a suspensão em água na proporção 1:10 (p v⁻¹) e por não empregar agitação em ultraturrax.

Avaliação do efeito de alguns parâmetros sobre o rendimento da extração proteica

Após se determinar qual dos métodos foi o mais eficiente para a extração das proteínas do feijão, os parâmetros velocidade de centrifugação, tempo, pH e o emprego de diferentes tipos de protease foram avaliados, visando-se otimizar o processo e aumentar o rendimento de extração proteica (REP).

Velocidade de centrifugação

Utilizando-se a condição em que se obteve o maior REP ao final da extração proteica, verificou-se que, mesmo após a centrifugação, ocorreu precipitação do EPF. Visando-se eliminar ou diminuir essa precipitação, variou-se a velocidade de centrifugação em 425, 1.700, 3.800, 6.800 e 10.640 x g. Em seguida, os extratos proteicos foram colocados em frascos iguais e guardados na geladeira. Após um período de tempo (seis dias), a altura do precipitado formado foi medida com régua, sendo a velocidade de centrifugação em que se formou o menor precipitado considerada a melhor.

Tempo de reação

Para se estudar o efeito do tempo de reação sobre a extração enzimática das proteínas do feijão, foi utilizada a melhor condição obtida e variou-se o tempo de reação em 2, 3, 5 e 6h.

pH inicial

Para se avaliar este parâmetro, foram testados diferentes valores de pH inicial (9,0; 9,5; 10,0; 10,5 e 11,0), utilizando-se o tempo de reação em que se obteve o maior REP. Os valores de pH dos extratos obtidos foram medidos após o término da extração.

Efeito da utilização de diferentes proteases

Definidos os parâmetros acima, foram testadas cinco enzimas, sendo quatro de origem microbiana (uma de *Bacillus licheniformis*, duas de *Bacillus subtilis* e uma de *Aspergillus sojae*) e uma de origem vegetal (*Papaya carica*). Todas as enzimas foram testadas na mesma relação E:S (10:100).

Determinação do rendimento da extração proteica

O rendimento da extração proteica (REP) foi determinado, conforme a Equação 1:

$$REP = \frac{[(A \times B) - (C \times D)]}{(A \times B)} \times 100 \quad (1)$$

em que:

A = Teor de proteína no feijão (g 100 g de feijão⁻¹);

B = Quantidade de feijão utilizado na extração (g);

C = Peso do resíduo obtido na extração (g);

D = Teor de proteína no resíduo (g 100 g⁻¹ de resíduo).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em três repetições e as análises foram realizadas em triplicata. Para se comparar o REP em relação à variação dos parâmetros empregados na extração enzimática das proteínas do feijão, utilizou-se a análise de variância (Anova fator único) e o teste de Duncan para comparação de médias, ambos a 5% de probabilidade (PIMENTEL-GOMES, 2000).

Resultados e discussão

Composição química do feijão

Os dados referentes à composição química do feijão (*Phaseolus vulgaris*) estão apresentados na Tabela 2. De forma geral, os resultados obtidos assemelham-se aos valores encontrados na literatura. Algumas diferenças encontradas podem ser explicadas pelo fato de que diferentes cultivares apresentam diferenças em sua composição química e que fatores ambientais afetam a composição do grão.

Observa-se que os valores encontrados para proteínas, lipídeos e carboidratos foram muito próximos aos encontrados por Antunes et al. (1995) e aos relatados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006). Considerando-se que ambos utilizaram a mesma cultivar, essas diferenças podem ser por efeitos de fatores ambientais e condições de cultivo, pois, segundo Sgarbieri (1996), a composição química do feijão depende do cultivo e da cultivar. Os valores obtidos são também semelhantes aos valores da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TBCA (USP, 2005). As diferenças entre os valores encontrados e os relatados nesta tabela podem ser justificadas pelo fato de estes últimos representarem não apenas a cultivar carioca, mas valores obtidos de diversos tipos de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Tabela 2. Composição química do feijão utilizado no presente trabalho e de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Componentes (% em base seca)	Cultivares			
	Carioca ¹	Carioca ²	Carioca ³	Diversos ⁴
Proteínas	23,7	23,4	23,2	21,1
Lipídeos	1,7	1,4	1,5	1,5
Cinzas	3,4	4,2	4,1	4,1
Carboidratos	71,2	71,0	71,2	73,3

¹Feijão utilizado neste trabalho. ²Antunes et al. (1995). ³Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006). ⁴USP (2005). Valores referentes a diversos tipos de feijão.

Eficiência da extração enzimática das proteínas do feijão Efeito do método de extração proteica

Na Figura 1, estão apresentados os percentuais de rendimento da extração das proteínas do feijão, obtidos pelos métodos utilizados por Capobianco et al. (2007) e Silvestre et al. (2009), em trabalhos realizados no mesmo laboratório do presente trabalho.

Pode-se observar que ambos os métodos avaliados foram eficientes na extração das proteínas do feijão, entretanto, o utilizado por Silvestre et al. (2009) foi mais eficiente e significativamente diferente do que o empregado por Capobianco et al. (2007).

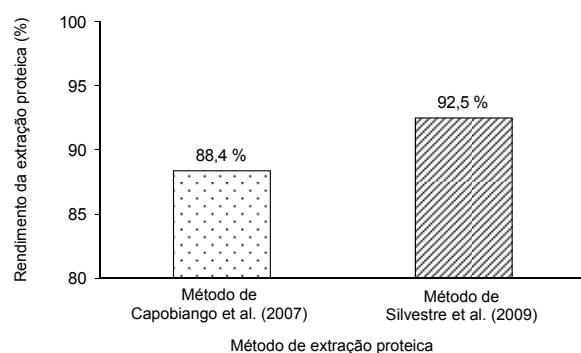


Figura 1. Efeito de dois métodos sobre o rendimento da extração proteica do feijão. Os valores diferem entre si a 5% de probabilidade pela análise de variância (ANOVA fator único).

Apesar de os dois métodos utilizarem a mesma enzima proveniente de *Bacillus licheniformis* (Protemax® 580 L) e a mesma relação E:S (10:100), a utilização de um maior valor de pH inicial, maior volume de água e, ainda, menor temperatura de reação e ausência da agitação em ultraturrax, no método de Silvestre et al. (2009), levaram a um aumento no REP do feijão de 88,4 para 92,5%.

A maior eficiência obtida ao se utilizar o método de Silvestre et al. (2009) pode ser explicada pela composição das proteínas do feijão. Segundo Sgarbieri (1996), o feijão praticamente não possui prolaminas, proteínas solúveis em soluções alcoólicas (70 a 80% de etanol); apresenta teor relativamente baixo de glutelinas, as quais são solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas; predominando as globulinas, solúveis em soluções salinas diluídas e depois as albuminas, solúveis em água. De acordo com Marquez e Lajolo (1981), as proteínas do feijão são constituídas de 52,3% de globulinas, 31,5% de albuminas e 24% de glutelina.

Assim, o fato de o método de Silvestre et al. (2009) utilizar maior valor de pH inicial e maior proporção de água em relação à matéria-prima pode

ter levado à maior solubilização, respectivamente, das frações glutelina e albumina e, conseqüentemente, à maior extração destas frações, aumentando o REP com relação ao método de Capobianco et al. (2007).

Não foram encontrados na literatura dados sobre o rendimento da extração enzimática das proteínas do feijão, empregando-se um método enzimático. Por outro lado, diversos autores, utilizando processos químicos de extração com o emprego de soluções salinas diluídas (NaCl, sulfito de sódio e citrato de sódio), obtiveram rendimentos de extração que variaram de 62 a 88,4% (MARQUEZ; LAJOLO, 1981; SHEHATA; THANNOUM, 1981). Utilizando também processos químicos de extração, porém dessa vez com o emprego de ácidos e bases (HCl e NaOH), de forma isolada ou sequencial, Shehata e Thannoum (1981) alcançaram rendimentos que variaram de 77,6 a 88,5%.

Observa-se que o rendimento de extração das proteínas do feijão obtido pela utilização do método otimizado por Capobianco et al. (2007) (88,4%) encontra-se entre os valores mais altos citados na literatura, enquanto o REP, obtido com o método otimizado por Silvestre et al. (2009) (92,5%), foi superior aos rendimentos obtidos pelos autores consultados. Os métodos utilizados, além de terem apresentado porcentagens de extração proteica igual ou superior às alcançadas pelos autores acima citados, apresentam a vantagem de serem métodos enzimáticos, o que diminui a possibilidade de ocorrência de reações secundárias e a formação de compostos com potencial toxicidade, que levariam à diminuição do valor nutricional das proteínas (WANG et al., 1999).

Efeito da variação da velocidade de centrifugação sobre a precipitação do extrato proteico

Ao se utilizar as velocidades de centrifugação de 425, 1.700, 3.800, 6.800 e 10.640 x g, as alturas dos precipitados formados foram de 0,7; 0,6; 0,5; 0,45 e 0,3 cm, respectivamente. Observa-se que quanto maior a velocidade empregada, menor foi o valor da altura obtido para o extrato proteico. Esse resultado está associado ao fato de que ao se utilizar valores mais elevados para a velocidade de centrifugação, obtém-se maior separação da fração solúvel (na qual se encontram as proteínas extraídas) da insolúvel. Portanto, a velocidade de centrifugação passou a ser de 10.640 x g e não mais de 1.700 x g como citado no método de Silvestre et al. (2009).

Efeito do tempo de reação

A influência do tempo de reação sobre o rendimento da extração das proteínas do feijão está apresentada na Figura 2.

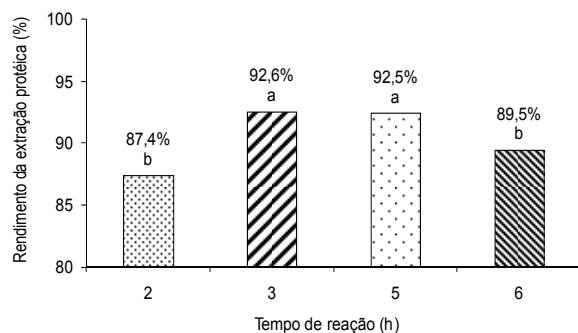


Figura 2. Efeito do tempo de reação sobre o rendimento da extração das proteínas do feijão. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Pode-se observar que o emprego de um tempo de reação mais elevado não levou a um aumento linear do rendimento de extração das proteínas do feijão. O maior rendimento foi obtido após os tempos de 3 e 5h de reação (92,6 e 92,5%, respectivamente) para os quais não houve diferença significativa, vindo, em seguida, o obtido após 6h (89,5%) e 2h (87,4%), os quais também não apresentaram diferença significativa entre si.

O aumento do REP observado neste trabalho, ao se comparar 2 com 3h de reação, está de acordo com o esperado teoricamente. Segundo Fischer et al. (2001), maior tempo de ação enzimática é necessário para se elevar o rendimento da reação, pois produz hidrólise mais acentuada das moléculas proteicas, originando peptídeos de cadeias mais curtas, os quais são mais solúveis. Entretanto, esse efeito não foi observado ao se empregar um tempo de reação ainda maior (comparando-se 3 com 5h). Possivelmente, a fração proteica não extraída após 3h de reação estava constituída de proteínas que não são hidrolisadas, seja pela ausência de um sítio de atuação para a enzima ou por impedimento estérico, como pode ocorrer com as glicoproteínas (lectinas e grande parte das globulinas do feijão), pela presença do resíduo de carboidrato na molécula. Portanto, mesmo com o emprego de um maior tempo de reação, o rendimento de extração se mantém inalterado.

Em estudo realizado, anteriormente, no mesmo laboratório, empregando-se a mesma enzima de *Bacillus licheniformis* utilizada neste trabalho, avaliou-se o efeito do tempo de reação sobre a extração das proteínas do fubá de milho. Foi observada elevação do REP ao se utilizar o tempo de reação maior (1 e 5h, 71,5 e 83,8%, respectivamente), mas não foi encontrada diferença significativa ao se comparar 5 com 15h e 15 com 24h, mostrando-se que também não houve aumento linear do REP com o aumento do tempo de reação, nos tempos estudados (CAPOBIANGO et al., 2007).

Efeito da variação do pH inicial

Observa-se na Figura 3 que os maiores rendimentos de extração foram obtidos com os ensaios realizados com pH inicial de 10,5 e 11,0 (92,6 e 93,1%, respectivamente), os quais não diferiram significativamente entre si, seguidos pelos valores obtidos com pH 9,5 (90,9%), 10,0 (89,6%) e, por último, com pH 9,0 (88,7%), os quais diferiram significativamente entre si e dos ensaios com pH 10,5 e 11,0.

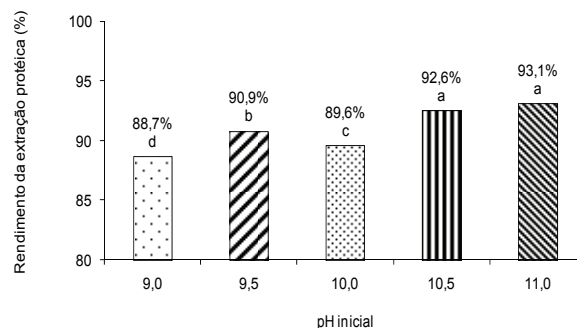


Figura 3. Efeito da variação do pH inicial no rendimento da extração das proteínas do feijão. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

A faixa de pH recomendada para a enzima utilizada (proveniente do *Bacillus licheniformis*) é de 7 a 10, com pH ótimo em 9,5 (segundo informações do fornecedor). Entretanto, o emprego de valores mais elevados de pH levou a maior rendimento na extração das proteínas. Uma das razões para esse fato pode ser a maior solubilização da fração glutelina das proteínas do feijão, as quais, segundo Sgarbieri (1996), são solúveis em soluções ácidas e alcalinas diluídas. Ou seja, a utilização de valores de pH mais alcalinos pode ter proporcionado maior solubilização da fração glutelina e, conseqüentemente, aumento do REP. Observou-se, ainda, que, ao se medir o pH ao final da reação, ocorreu uma queda durante o processo de extração enzimática (de 9,0 para 7,35; de 9,5 para 7,59; de 10,0 para 7,73; de 10,5 para 8,05 e de 11,0 para 8,41). A utilização de um valor inicial mais elevado pode também ter permitido que o pH da reação permanecesse por maior tempo próximo ao pH ótimo da enzima, favorecendo sua atuação (maior atividade enzimática) e levando a um maior rendimento de extração.

Em estudos realizados, anteriormente, no mesmo laboratório do presente trabalho, Lopes et al. (2008) e Silvestre et al. (2009) também verificaram que o emprego de valores mais elevados de pH foi benéfico para o rendimento de extração das proteínas do arroz em grãos e da farinha de arroz, respectivamente. Assim, utilizando uma pancreatina

(Corolase PP® - AB ENZYMES), Lopes et al. (2008), obtiveram aumento no rendimento de extração de 61,3 para 65,0% ao utilizar um pH mais elevado (9,0 e 12,0, respectivamente). No trabalho de Silvestre et al. (2009), ao utilizar pH de 9,5 e de 11,0, foram obtidos valores de REP de 53,5 e de 63,6%, respectivamente, empregando-se a mesma enzima de *Bacillus licheniformis* utilizada neste trabalho.

A diminuição do pH, verificada ao término da reação, já havia sido observada no mesmo laboratório do presente trabalho. Capobianco et al. (2007) observaram que o pH, inicialmente ajustado para 9,5, ao final da extração se situava em torno de 7,0 e, no estudo de Silvestre et al. (2009), ocorreu queda nos valores iniciais de pH de 10,5 e 9,5 para 7,4 e de pH 11,0 para 8,2. Outros autores, ao utilizarem uma pancreatina (Pancreatina 8X – American Laboratories, Inc.), em pH 8,0, para solubilizar as proteínas do resíduo de arroz obtido após a extração do amido pela ação de α -amilase, relataram que, ao final do processo, o pH ficou entre 6,9 e 7,5 (EUBER et al., 1991). Esse efeito se deve à hidrólise enzimática das proteínas, na qual ocorre a quebra das ligações peptídicas e, consequentemente, a liberação de grupamentos terminais dos peptídeos. Em soluções aquosas, esses grupos se encontram na forma ionizável ($\text{COO}^- + \text{H}^+$), e os prótons livres neutralizam parcialmente a alcalinidade do meio (LEHNINGER et al., 2006).

Considerando-se que os valores de REP obtidos com pH inicial 10,5 e 11,0 não diferiram entre si, optou-se por utilizar o pH 10,5, pois, ao final deste ensaio, o pH se encontra mais próximo à neutralidade, o que elimina uma etapa posterior de neutralização e diminui a probabilidade de formação de compostos tóxicos, como a lisinoalanina, a ocorrência da reação de Maillard e a coprecipitação de componentes não-proteicos que poderiam diminuir o valor nutricional das proteínas e a qualidade do produto final (WANG et al., 1999).

Efeito da utilização de diferentes proteases

Os valores de REP obtidos, utilizando-se diferentes enzimas, nas mesmas condições, estão apresentados na Figura 4. Pode-se observar que o maior REP foi obtido ao se utilizar a enzima proveniente de *Bacillus licheniformis* (93,1%), seguido por *Aspergillus sojae* e *Bacillus subtilis* (AB Enzymes®) (73,2 e 73,0%, respectivamente), que não diferiram significativamente entre si; depois, o obtido pela enzima de *Papaya carica* (71,4%), que não diferiu significativamente do obtido pela enzima de *Bacillus subtilis*, e, por último, o obtido, utilizando-se a protease proveniente de *Bacillus subtilis* da Prozyne® (67,8%).

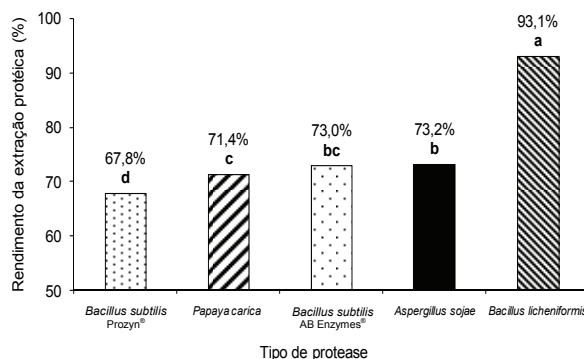


Figura 4. Efeito da utilização de diferentes proteases sobre o rendimento de extração das proteínas do feijão. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

O melhor resultado encontrado com a enzima proveniente de *Bacillus licheniformis*, pode ser justificado por ser esta, dentre as utilizadas, a enzima que possui, segundo o fornecedor, o valor de pH ótimo (9,5), mais próximo ao pH inicial utilizado (10,5), o que pode ter proporcionado maior atividade desta enzima quando comparada às demais, que possuem os valores de pH ótimo mais distantes do utilizado (*Aspergillus sojae* – 9,0; *B. subtilis* (AB ENZYMES, 2001, 2002 e 2003) – 7,0; *Papaya carica* – 3,0 a 9,0; *B. subtilis* (PROZYN, 2005) – 7,0 a 7,5).

A diferença verificada no REP, ao se utilizar as duas enzimas de mesma origem microbiana (*Bacillus subtilis*), pode ser pelo fato de essas enzimas terem sido obtidas de diferentes fornecedores. Dessa maneira, os valores para os graus de pureza e atividade enzimática podem não ser os mesmos, o que afeta diretamente a eficiência da reação de extração proteica.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a influência do emprego de diferentes proteases na extração das proteínas do feijão. No entanto, no mesmo laboratório do presente trabalho, Silvestre et al. (2009), ao comparar diferentes tipos de proteases, uma alcalina de *Bacillus licheniformis* e outra neutra de *Bacillus subtilis*, obtiveram, respectivamente, 50,7 e 28,6% de extração para as proteínas da farinha de arroz.

Conclusão

Dentre os métodos enzimáticos de extração proteica testados, aquele que apresentou melhor performance foi o que empregou a concentração da matéria-prima de 1:10, pH inicial de 10,5, temperatura de 50°C e ausência de agitação em ultraturrax. O estudo do efeito de diversos parâmetros mostrou que o emprego de diferentes proteases e a ação do tempo de reação, do pH inicial e da velocidade de centrifugação influenciaram de

forma variada no REP. O melhor resultado (93%) foi obtido ao se empregar a protease de *Bacillus licheniformis* e utilizar o tempo de reação de 3h, pH inicial de 10,5 e velocidade de centrifugação de 10.640 x g.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapemig, Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Referências

- AB ENZYMES. Corolase LAP: description and specification. **Review Nutrition**, n. 3, p. 1-2, 2001.
- AB ENZYMES. Corolase 7089: description and specification. **Review Nutrition**, n. 2, p. 1-2, 2002.
- AB ENZYMES. Corolase L10: description and specification. **Review Nutrition**, n. 3, p. 1-2, 2003.
- AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 3, p. 283-290, 2005.
- ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; MOACIR, C.; SOARES, G. J. D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares Rico 23, Carioca, Pirata-1 e Rosinha-G2. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 1, n. 1, p. 12-18, 1995.
- AOAC-Association of Official Agricultural Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed. Arlington: AOAC International, 1995.
- BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.
- CAPOBIANGO, M.; LOPES, D. C. F.; CARREIRA, R. L.; AFONSO, W. O.; SEGALL, S. D.; SILVESTRE, M. P. C. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. **International Journal of Food Engineering**, v. 3, n. 6, p. 1-19, 2007.
- EUBER, J. R.; PUSKI, G.; HARTMAN JR., G. H. **Method for making soluble rice protein concentrate and the product produced there from**. United States Patent n. 4,990,344, 1991.
- FISCHER, M.; KOFOD, L. V.; SCHOLS, H. A. S.; PIERSMA, S. R.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4463-4469, 2001.
- GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, D. A. T. **Food composition data: production, management and use**. London: Chapman and Hal, 1992. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela/qual.asp>>. Acesso em: 31 out. 2007.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- LOPES, D. C. F.; BIZZOTTO, C. S.; CARREIRA, R. L.; AFONSO, W. O.; LOPES JR., C. O.; SILVESTRE, M. P. C. Removal of phenylalanine from protein hydrolysates prepared with rice. **Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 57-65, 2008.
- MARQUEZ, U. M. L.; LAJOLO, F. M. Composition and digestibility of albumin, globulin, and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. **American Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 1068-1074, 1981.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000.
- PROZYN: description and specification. 2005. Disponível em: <<http://www.prozyn.com>>. Acesso em: 7 out. 2007.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação**. São Paulo: Varela, 1996.
- SHEHATA, A. A.; THANNOUM, M. M. Extractability of nitrogenous constituents from iraq mung bean as affected by pH, salt type, and others factors. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 53-57, 1981.
- SILVESTRE, M. P. C.; VIEIRA, C. R.; SILVA, M. R.; LOPES JR., C. O. L.; SILVA, V. D. M. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolysing rice proteins aiming phenylalanine removal. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2009.
- TACO-Tabela Brasileira de Composição de Alimentos: versão II. 2. ed. Campinas: Unicamp/Nepa, 2006.
- USP-Universidade do Estado de São Paulo. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 2005. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>>. Acesso em: 17 set. 2007.
- WANG, L.; WANG, Y. J. Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 291-296, 2004.
- WANG, M.; HETTIARACHCHY, N. S.; QI, M.; BURKS, W.; SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 411-416, 1999.

Received on February 4, 2009.

Accepted on August 27, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.