

CAROLINE TIEMI YAMAGUISHI

**PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A OBTENÇÃO CALDO DE  
FEIJÃO EM PÓ**

CURITIBA

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CAROLINE TIEMI YAMAGUSHI

## **PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A OBTENÇÃO CALDO DE FEIJÃO EM PÓ**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol.**

**Co-orientador: Prof. Dr. José Luis Parada.**

CURITIBA

2008

## RESUMO

Os legumes em geral, fazem parte da dieta de todo o mundo, devido ao seu conteúdo protéico, que é superior ao encontrado nos cereais. No entanto, a presença de fatores antinutricionais, muitas vezes, limita a disponibilidade de nutrientes desses legumes. Além disso, a ingestão desses alimentos pode resultar no aparecimento das doenças inflamatórias do intestino, que são caracterizadas por dor ou desconforto abdominal, seguido de diarreia e constipação. A ocorrência da flatulência é geralmente atribuída aos oligossacarídeos da família rafinose, e seus efeitos se devem a má digestibilidade desses açúcares, devido a ausência da enzima  $\alpha$ -galactosidase em humanos e animais. O feijão preto faz parte da alimentação diária da população brasileira e seu consumo tem sido limitado devido a dificuldade na digestão do grão. Este trabalho tem como objetivo a aplicação de um processo biotecnológico na produção de um feijão em pó, visando disponibilizar um produto sem os oligossacarídeos da Família Rafinose, causadores da flatulência. O microrganismo usado foi o *Lactobacillus agilis* LPB 56 que mostrou capacidade de sobrevivência no caldo de feijão previamente padronizado. As variáveis estudadas no processo fermentativo foram temperatura, agitação, uso de agente regulador de acidez ( $\text{CaCO}_3$ ) e taxa de inóculo, sendo que os melhores resultados para o consumo da estaquiose foram a fermentação a  $37^\circ\text{C}$ , utilizando 10% de inóculo e 1% de  $\text{CaCO}_3$ . A agitação não foi significativa para o processo. Testes estão sendo feitos para definir a metodologia e tempo de secagem e teor de umidade do produto final.

Palavras-chave: feijão; Oligossacarídeos da Família Rafinose; flatulência;  $\alpha$ -galactosidase.

## ABSTRACT

Legumes in general, are used in diets all over the world, because of their level of protein, which is higher than cereals. However, the presence of antinutritional factors, many times, limits the availability of nutrients of these legumes. Besides, the ingestion of these foods can result in the emergence of irritable bowel syndromes (IBS), which are characterized by abdominal pain or discomfort, associated with diarrhea and constipation. The occurrence of flatulence is usually attributed to the raffinose family oligosaccharides (RFOs), and their effects are bad digestibility of these sugars, caused by absence of enzyme  $\alpha$ -galactosidase in humans and animals. The black beans are used in daily meals of the Brazilian population and its consumption has been limited because the difficulty of digestion of the grain. This project aims the application of a biotechnology process on production of a powder beans, pointing to available a product without the Raffinose Family Oligosaccharides, responsible by flatulence. The microorganism used was *Lactobacillus agilis* LPB 56 that was able to survive on beans broth previously standardized. The variables analised on fermentative process were temperature, agitation, use of reducing agent of acidity ( $\text{CaCO}_3$ ) and inoculum rate, where better results for stachyose consumption were the fermentation to  $37^\circ\text{C}$ , using 10% of inoculum and 1% of  $\text{CaCO}_3$ . The agitation weren't significant for the process. Tests are in progress to set the methodology and dry time and moisture content of the final product.

Key words: beans; Raffinose Family Oligosaccharides; flatulence;  $\alpha$ -galactosidase.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – PRODUÇÃO NACIONAL DE FEIJÃO POR REGIÃO NO ANO DE 2004.....	12
FIGURA 2 - RELAÇÃO ESTRUTURAL DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE.....	15
FIGURA 3 - VOLUME DE GASES PRODUZIDOS POR 16 VOLUNTÁRIOS DURANTE 4 HORAS.....	18
FIGURA 4 - MECANISMO DE PRODUÇÃO DE E CONSUMO DE GASES.....	19
FIGURA 5 - CULTIVO DO <i>L. agilis</i> EM CONCENTRAÇÕES DE CALDO DE FEIJÃO DE 10 E 15% A 37°C.....	31
FIGURA 6 - VARIAÇÃO DO PH DO MEIO CALDO DE FEIJÃO INOCULADO COM <i>L. agilis</i> COM CONCENTRAÇÕES DE 10 E 15%.....	31
FIGURA 7 - CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS PARA AVALIAÇÃO DA ADAPTAÇÃO DO <i>L. agilis</i> EM CALDO DE FEIJÃO.....	32
FIGURA 8 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO <i>Lactobacillus agilis</i> EM MEIO MRS.....	33
FIGURA 9 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO <i>L. agilis</i> EM CALDO DE FEIJÃO.....	34
FIGURA 10 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO <i>L. agilis</i> EM MEIO MRS A 30 E 37°C.....	35
FIGURA 11 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO E DA AGITAÇÃO SOBRE O CONSUMO ESTAQUIOSE.....	38
FIGURA 12 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO E DO USO DE $\text{CaCO}_3$ SOBRE O CONSUMO DA ESTAQUIOSE.....	39
FIGURA 13 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO E DA TEMPERATURA SOBRE O CONSUMO DA ESTAQUIOSE.....	39
FIGURA 14 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO E DA AGITAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO.....	41
FIGURA 15 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO E DO USO DE $\text{CaCO}_3$ SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO.....	42
FIGURA 16 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO E DA TEMPERATURA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO.....	43
TABELA 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FEIJÃO COMUM ( <i>Phaseolus vulgaris</i> , L.), cultivar IAC-Carioca.....	11
TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS CARBOIDRATOS DIETÉTICOS.....	14
TABELA 3 – PRINCIPAIS ALIMENTOS CAUSADORES DA FLATULÊNCIA.....	20
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DO FEIJÃO PRETO COMERCIAL USADO MARCA ZAELI.....	26
TABELA 5 – RESULTADOS DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL $2^4$ COMPLETO REALIZADO PARA ESTUDAR A CONCENTRAÇÃO DE ESTAQUIOSE.....	36
TABELA 6 – ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL $2^4$ PARA O ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ESTAQUIOSE.....	36

TABELA 7 – ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>4</sup> PARA O ESTUDO DO CONSUMO DA ESTAQUIOSE.....	37
TABELA 8 – RESULTADOS DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>4</sup> COMPLETO REALIZADO PARA ESTUDAR A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO.....	40
TABELA 9 – ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>4</sup> PARA O ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO.....	41
TABELA 10 - COMPARAÇÃO DE DUAS METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO PARA OLIGOSSACARÍDEOS.....	44
TABELA 11 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR <i>L. agilis</i> CULTIVADO EM CALDO DE FEIJÃO (15%).....	45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>3 REVISAO DA LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
3.1 O FEIJÃO .....	11
3.1.1 O consumo do feijão.....	12
3.1.2 Digestibilidade do Feijão.....	13
3.2 OLIGOSSACARÍDEOS.....	14
3.2.1 Oligossacarídeos da Família Rafinose.....	14
3.3 PRODUÇÃO DE GASES E FLATULÊNCIA.....	16
3.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL).....	20
3.4.1 Produção da enzima $\alpha$ -galactosidase por bactérias ácido láticas.....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA CEPA.....	23
4.2 PREPARO DO MEIO CALDO DE FEIJÃO.....	23
4.3 ELABORAÇÃO DO INÓCULO.....	23
4.4 FERMENTAÇÃO EM CALDO DE FEIJÃO.....	24
4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	24
4.6 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR.....	24
4.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	25
4.7.1 Determinação de proteínas.....	25
4.7.2 Determinação de lipídios.....	25
4.7.3 Determinação da umidade.....	25
4.7.4 Determinação das cinzas.....	25
4.7.5 Determinação dos sólidos totais.....	25
4.7.6 Determinação dos carboidratos totais.....	26
4.7.7 Determinação de açúcares solúveis.....	26
4.7.8 Determinação do pH.....	26
4.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	26
4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	26
4.10 SECAGEM DO CALDO FERMENTADO.....	27
4.11 ENSAIOS PARA REIDRATAÇÃO DO PRODUTO.....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
5.1 PREPARO DO MEIO CALDO DE FEIJÃO.....	28
5.1 AJUSTE DO PH.....	30
5.1.1 Uso do carbonato de cálcio.....	30
5.2 DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO.....	30
5.3 ELABORAÇÃO DO INÓCULO.....	32
5.4 FERMENTAÇÃO EM CALDO DE FEIJÃO.....	33
5.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	34
5.5.1 Efeito da temperatura.....	34
5.5.2 Planejamento fatorial.....	35



5.5.2.1 Consumo da estaquiose.....	36
5.5.2.2 Produção do ácido láctico.....	40
5.6 ANÁLISE DO CONSUMO DE OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE E LÁTICO.....	43
5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE....	45
<b>6 CONCLUSÕES PARCIAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os legumes desempenham um papel importante na dieta tradicional do mundo todo e seu consumo é associado ao fato de terem baixo conteúdo de gordura e serem excelentes fontes de proteínas, fibras e uma variedade de micronutrientes e fitoquímicos (MESSINA, 1999).

De acordo com Oboh (1998) as leguminosas contêm duas vezes mais proteínas em comparação com os cereais, entretanto o valor biológico desses alimentos é limitado pela presença de fatores antinutricionais. Dentre as comumente consumidas estão o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*) e feijão de corda (*Vigna unguiculata*).

A ingestão de alimentos com baixa digestibilidade freqüentemente é a causa das doenças inflamatórias do intestino ou "irritable bowel syndrome (IBS), que são caracterizadas por dores ou desconfortos intestinais, seguidos de diarréia ou constipação (WALD, 1999; BLANCHARD et al., 2007). Segundo Wald (1999) e Horwitz e Fisher (2001) as IBS afetam duas vezes mais mulheres do que homens.

Alguns antinutrientes comumente encontrados em alimentos vegetais são as saponinas, os taninos e o ácido fítico, que diminuem a disponibilidade de nutrientes, podendo contribuir para o fenômeno da flatulência. Outros podem ser tóxicos, como os alcalóides e as lectinas, tantos para seres humanos como para animais (LUSE, 1975).

Nas sementes de leguminosas o ácido fítico representa aproximadamente 70% do conteúdo de fosfato (ZHOU; ERDMAN, 1995). Segundo Torre, Rodriguez, Saura-Calixto (1991) sob condições fisiológicas, o ácido fítico é fortemente ionizado podendo interagir com proteínas e íons metálicos. Muitos desses complexos formados são insolúveis e biologicamente indisponíveis. Além disso, o fósforo no fitato é considerado indisponível devido a limitada capacidade de espécies monogástricas de hidrolisarem esse composto no intestino delgado (MUZQUIZ et al., 1999). Já os taninos, fenóis condensados, são potenciais inibidores devido à sua complexação com proteínas enzimáticas (NACZK et al., 1994), diminuindo, dessa forma, a digestibilidade das proteínas das leguminosas.

Os oligossacarídeos estão presentes nas leguminosas em pequenas quantidades e são responsáveis pelos efeitos da flatulência, que é ocasionada pela

falta de atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase, necessária para hidrolisar as ligações  $\alpha$ -1,6 desses açúcares (SÁNCHEZ-MATA et al., 1998; SLOMINSKI, 1994). Esses oligossacarídeos quando ingeridos, passam pelo intestino grosso e são anaerobicamente fermentados, produzindo gases como hidrogênio, dióxido de carbono e metano. Esses gases, além da flatulência, causam em humanos e animais, diarreia e dor abdominal (SÁNCHEZ-MATA et al., 1998).

O consumo do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é verificado em muitos países e representa uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras e micronutrientes (ACEVEDO; VELASQUE-CORONADO; BRESSANI, 1994). Entretanto, a presença de fatores antinutricionais acaba limitando a absorção desses nutrientes.

Estudos realizados por Onyenekwe, Njoku, e Ameh (2000) mostraram que os tratamentos usados no processamento do feijão-de-corda tiveram efeitos significativamente maiores que a variedade de feijões com respeito ao nível de oligossacarídeos inicial. De acordo com Calloway, Hickey e Murphy (1971) operações como a extração aquosa ou alcoólica, mudanças no pH, umidade ou temperatura, no preparo de legumes, podem diminuir a ocorrência da flatulência. Entretanto, as práticas tradicionais utilizadas (maceração, cozimento e germinação) são ineficientes para remover os oligossacarídeos, visto que estes são extremamente termoestáveis (SINGH, 1988).

Visto que é crescente a demanda por produtos naturais que substituam as funções conferidas às proteínas de origem animal, este trabalho tem como propósito estudar a aplicação de um processo biotecnológico no processamento de uma leguminosa, visando melhorar sua qualidade nutricional e mostrando-se como uma alternativa para melhorar a aceitabilidade e os efeitos causados pela sua ingestão.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo biotecnológico para produzir um pó de feijão fermentado que não contenha os oligossacarídeos da Família Rafinose, responsáveis pelo fenômeno da flatulência.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sobrevivência de uma bactéria ácido láctica em caldo de feijão.
- Estabelecer uma metodologia para a elaboração do inóculo, procurando adaptá-lo ao caldo de feijão.
- Definir a formulação do meio caldo de feijão.
- Realizar ensaios para otimizar parâmetros como concentração de grãos do meio, temperatura de incubação, taxa de inóculo e uso de agitação.
- Analisar o consumo de açúcares (estaquiiose e rafinose) e produção de ácido do lático através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).
- Avaliar as alterações físico-químicas e a qualidade microbiológica do produto fermentado e final.
- Estudar diferentes métodos para a secagem do caldo fermentado, considerando sua viabilidade econômica.
- Estabelecer a melhor relação temperatura/tempo para a reidratação do produto seco.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O FEIJÃO

Segundo pesquisadores a origem do feijão foi no Continente Americano. O feijão era também cultivado no Antigo Egito e na Grécia, onde recebia homenagens, por ser considerado símbolo da vida. Os antigos romanos usavam o feijão nas festas e até mesmo como forma de pagamento para as apostas. A explicação da disseminação dessa leguminosa é atribuída às grandes guerras, visto que o feijão era parte fundamental da dieta dos guerreiros (CIF, 2007<sup>a</sup>).

O feijão, ainda hoje, é considerado um dos alimentos tradicionais consumidos na dieta da população brasileira, tendo importância por seu conteúdo energético e protéico. No Brasil, três espécies de feijão são cultivadas: o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), o feijão conhecido como “feijão-de-corda” (*Vigna unguiculata*) e o feijão-guandu (*Cajanus cajan*), encontrado mais no Nordeste (WIKIPEDIA, 2007). Contudo, existem ainda outras espécies plantadas no país como por exemplo, o feijão-azuki (*Vigna angularis*), cultivados pelos imigrantes japoneses; o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), usado como adubo verde; e o feijão fava (*Phaseolus lunatus* L.), consumido como grãos verdes (CIF, 2007<sup>a</sup>).

A Tabela 1 mostra a composição do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade (g/100g)</b>
Umidade	9,4
Proteínas	18,4
Lipídeos totais	2,3
Cinzas	0,6
Fibras	4,6
Carboidratos	64,7
Rafinose	0,4
Estaquiose	3,23
Verbascose	0,12

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivar IAC-Carioca (Adaptado de OLIVEIRA et al., 2001)

Muzquiz et al. (1999) avaliaram a influência do meio ambiente e da variedade de feijões cultivados em duas áreas da Espanha e notaram marcadas diferenças na concentração de  $\alpha$ -galactosídeos totais, fosfato inositol e lectinas.

### 3.1.1 O consumo do feijão

O feijão é um importante legume por ser considerado uma fonte barata de proteínas e fibras dietéticas, além de conter uma quantidade considerável de vitaminas e minerais (VIDAL-VALVERDE et al., 1993).

O Brasil destaca-se como maior produtor mundial de feijão, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor nacional, com aproximadamente 15% do total produzido. É também o maior consumidor de feijão, com consumo estimado em 16 Kg/ano (CIF, 2007<sup>a</sup>).

A Figura 1 mostra a produção nacional de feijão no ano de 2004.

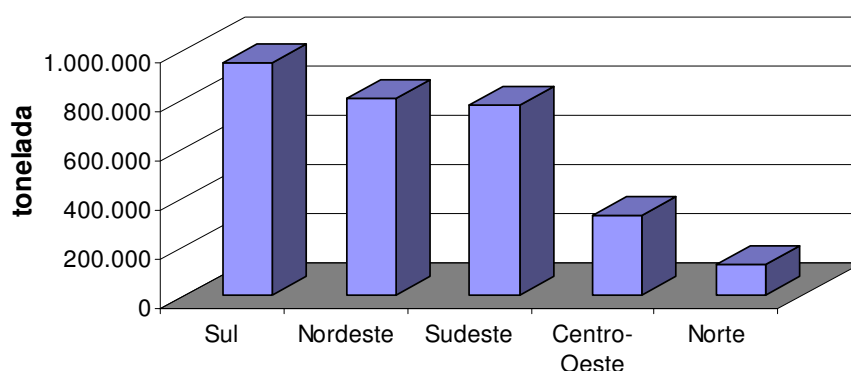


FIGURA 1 – PRODUÇÃO NACIONAL DE FEIJÃO POR REGIÃO NO ANO DE 2004 (Adaptado de CIF, 2007<sup>b</sup>)

Entretanto, de acordo com Ferreira, Del Peloso e Faria (2002) o consumo de feijão vem diminuindo nos últimos quarenta anos, passando de 20 Kg/habitante na década de 70 para 16 Kg/habitante na década de 90.

Estudos avaliando o consumo do feijão afirmam que a ingestão de média a alta quantidade de feijão pode ajudar a reduzir o desenvolvimento de doenças como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e neoplasias. O efeito benéfico é associado a presença de metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos e os flavonóides que se apresentam em maiores concentrações (WIKIPEDIA, 2007).

### 3.1.2 Digestibilidade do Feijão

Os grãos de feijão possuem em média de 20 a 35% de proteína, dependendo do cultivo e do cultivar. Contudo, os teores de aminoácidos essenciais das proteínas do feijão são baixos como por exemplo, os aminoácidos sulfurados, metionina, cisteína, cistina e triptofano (SGARBIERI, 1996).

A digestibilidade das proteínas do feijão é inferior quando comparada à qualidade das proteínas de origem animal. Estudos *in vitro* avaliando a digestibilidade de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) demonstraram que esta situou-se entre 76,8 e 84,1%. O aumento na pigmentação do grão ocasionou uma diminuição na digestibilidade. Isso pode ser atribuído ao fato de que os pigmentos são, em geral, compostos fenólicos, os quais podem interagir com proteínas do feijão, interferindo na sua biodisponibilidade (AW; SWANSON, 1985).

A dificuldade na digestão do grão também pode ser associada a presença de substâncias de natureza antinutricional como os inibidores de proteases, de amilases, lectinas, taninos, fitatos, oligossacarídeos tipo rafinose, estaquiose e verbascose. As ligações  $\alpha$ -galactosídicas desses açúcares impedem a sua digestão, possibilitando às bactérias do trato intestinal humano fermentar esses açúcares, com produção de dióxido de carbono, hidrogênio e metano, e conseqüente ocorrência de meteorismo e flatulência (IYER et al., 1980; VIDAL-VALVERDE; FRIAS; VALVERDE, 1993). Outros sintomas decorrentes dessa não digestão são náuseas, câimbras, dores abdominais (CRISTOFARO; MATTU; WUHRMANN, 1974).

Um dos processos utilizados para melhorar a digestibilidade do feijão é o tratamento térmico, que tem a função de inativar os inibidores das proteases do feijão (ANTUNES et al., 1995).

### 3.2 OLIGOSSACARÍDEOS

Os oligossacarídeos podem ser definidos como carboidratos que contêm entre 3 e 10 moléculas sacarídicas. São solúveis em água e cerca de 0,3 a 0,6 vezes mais doces que a sacarose. A doçura está relacionada á estrutura química, grau de polimerização dos oligossacarídeos presentes e conteúdo de mono e dissacarídeos na mistura. Eles também possuem propriedades umectantes e alteram a temperatura de congelamento de alimentos congelados. Não se ligam a minerais e são facilmente incorporados em alimentos processados (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996).

#### 3.2.1 Oligossacarídeos da Família Rafinose

Os oligossacarídeos da família rafinose fazem parte de um grupo de carboidratos dietéticos reconhecidos como oligossacarídeos não digeríveis (ONDs). Nesse grupo estão incluídos os fruto-oligossacarídeos derivados da sacarose (mais conhecidos por inulina), galactosil-sacaroses derivados da soja e galacto-oligossacarídeos derivados da lactose, xilo-oligossacarídeos e lactulose (PLAYNE; CRITTENDEN, 1996). A Tabela 2 apresenta a classificação dos principais carboidratos.

<b>Maiores classes (Grau de polimerização)</b>	<b>Sub-grupos (tipos de monossacarídeos e ligações <math>\alpha</math> e <math>\beta</math>)</b>
Açúcares (1-2)	1) Monossacarídeos: glicose, frutose 2) Dissacarídeos: sacarose, maltose, trealose, lactose 3) Açúcares alcoólicos: sorbitol, maltitol, lactitol, xilitol
Oligossacarídeos (3-10)	1) Malto-oligossacarídeos ( $\alpha$ -glucano) 2) Outros oligossacarídeos (ONDs): fruto-oligossacarídeos galacto-oligossacarídeos
Polissacarídeos (>10)	1) Amido ( $\alpha$ -glucanos) polissacarídeos não amiláceos



TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS CARBOIDRATOS DIETÉTICOS segundo Cummings et al (1997)

A fonte natural mais comum de oligossacarídeos são os grãos. Na maioria deles, o oligossacarídeo mais encontrado é a estaquiose, seguido da rafinose e verbascose, sendo que, a distribuição desses açúcares varia de acordo com o grão (PETTERSON; MAKINTOSH, 1994).

Os açúcares rafinose e estaquiose são  $\alpha$ -galactosídeos da sacarose com três e quatro unidades monoméricas, respectivamente (TSANGALIS; SHAH, 2004). Na estrutura dos oligossacarídeos a sacarose pode conter um ou mais grupos  $\alpha$ -D-galactopiranosil ( $\alpha$ -D-Gal), sendo que as unidades de  $\alpha$ -galactosil estão sempre do lado esquerdo da sacarose, ligado à molécula de glicose (SILVA et al., 1992) (Figura 2).

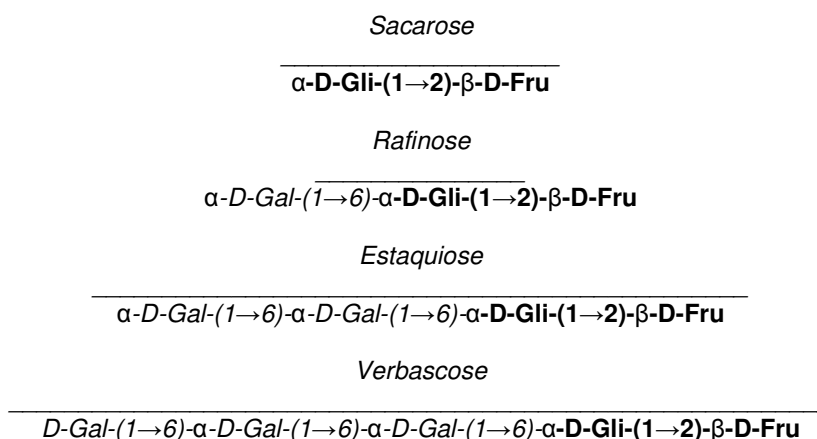


FIGURA 2 - RELAÇÃO ESTRUTURAL DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE segundo Silva et al. (1992)

Oligossacarídeos da família rafinose, especialmente a rafinose e a estaquiose são considerados os maiores fatores de flatulência após a ingestão da soja ou outros legumes (DEY; PRIDHAM, 1972).

A fermentação dos oligossacarídeos leva a produção de ácidos graxos de cadeia curta e gases como dióxido de carbono e hidrogênio. Tais gases podem causar desconforto, náusea e flatulência em suínos (KRAUSE; EASTER; MACKIE, 1994). Alguns autores relataram que 5 gramas de rafinose podem produzir 300 ml de gases no colo humano (DIBOFORI; OKOH; ONIGBINDE, 1994; FLEMING, 1981).

Nos estudos de Tomlin, Lowis e Read (1991) 10 pacientes saudáveis foram avaliados quanto a manifestação da flatulência. Quando à dieta normal foi acrescentado 200 gramas de feijão assado, esses indivíduos apresentaram um aumento no volume de gases de 476 ml para 1491 ml por dia (média = 705ml/24 horas).

Kuriyama e Mendel (1917) já associavam a ingestão de galacto-oligosacarídeos (GOS) ao aumento na incidência de diarreia em ratos. Esse fato foi confirmado por Liying et al. (2003) onde uma dieta suplementada com 2% de estaquiose purificada aumentou a ocorrência de diarreia em porcos quando comparados a dieta controle.

Os carboidratos dietéticos que passam pelo estômago e não são digeridos, são os principais responsáveis pelo crescimento bacteriano no cólon (CUMMINGS, 1983). Segundo Cummings e Macfarlane (1991) estima-se que cerca de 10 a 60 gramas por dia de carboidratos chegam ao cólon, sendo que, aproximadamente 2 a 8 gramas seriam correspondentes aos oligossacarídeos.

No entanto, uma hidrólise desses oligossacarídeos pode ocorrer pela atividade da  $\alpha$ -galactosidase, invertase ou ambas. A  $\alpha$ -galactosidase cliva a ligação  $\alpha$ -1,6 liberando galactose e sacarose, enquanto a invertase hidrolisa a ligação  $\alpha$ -1,2, produzindo melibiose e frutose (DEY; PRIDHAM, 1972).

Alguns processos como maceração, cozimento, germinação, tratamentos com irradiação gama e  $\alpha$ -galactosidasas microbianas ou de plantas são alternativas que vêm sendo usadas para reduzir o conteúdo de oligossacarídeos em legumes (GUIMARÃES et al., 2001; MACHAIAH; PEDNEKAR, 2002).

Açúcares, como a rafinose e a estaquiose, podem ser encontrados no leite de soja, podendo este ser utilizado como meio de crescimento para bífidobactérias, visto a capacidade de fermentação desses açúcares por bactérias pertencentes a esse gênero (DESJARDINS; ROY; GOULET, 1990).

### 3.3 PRODUÇÃO DE GASES E FLATULÊNCIA

O volume de gases produzidos no trato gastrointestinal é maior que 200 mL, sendo que, uma média de 600 a 700 mL são liberados diariamente após consumo de uma dieta padrão contendo 200 gramas de feijão cozido (TOMLIN; LOWIS; READ, 1991). Após as refeições, estima-se que os homens liberam gases 14 vezes

por dia. Os gases mais associados à flatulência são o nitrogênio, oxigênio, dióxido de carbono, hidrogênio e metano (SUAREZ et. al, 1997), sendo aqueles produzidos pela fermentação de nutrientes ingeridos e glicoproteínas endógenas por bactérias colonizadoras (hidrogênio, metano e dióxido de carbono) responsáveis por 74% da ocorrência da flatulência. Os odores liberados na forma de gases podem ser correlacionados às concentrações de sulfato de hidrogênio, ou outros gases contendo enxofre, como por exemplo, metanodiol e dimetil sulfato (SUAREZ; SPRINGFIELD; LEVITT, 1998).

A Figura 3 mostra o volume de gases que passam pelo reto de 16 voluntários saudáveis por um período de 4 horas. Os gases encontrados em maior quantidade foram o hidrogênio ( $H_2$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ), metano ( $CH_4$ ), oxigênio ( $O_2$ ) e nitrogênio ( $N_2$ ) (A). Gases contendo enxofre apresentam-se em menor quantidade como sulfato de hidrogênio ( $H_2S$ ), metanodiol (MES) e dimetil sulfato (DMS) (B) (SUAREZ et al., 1997).

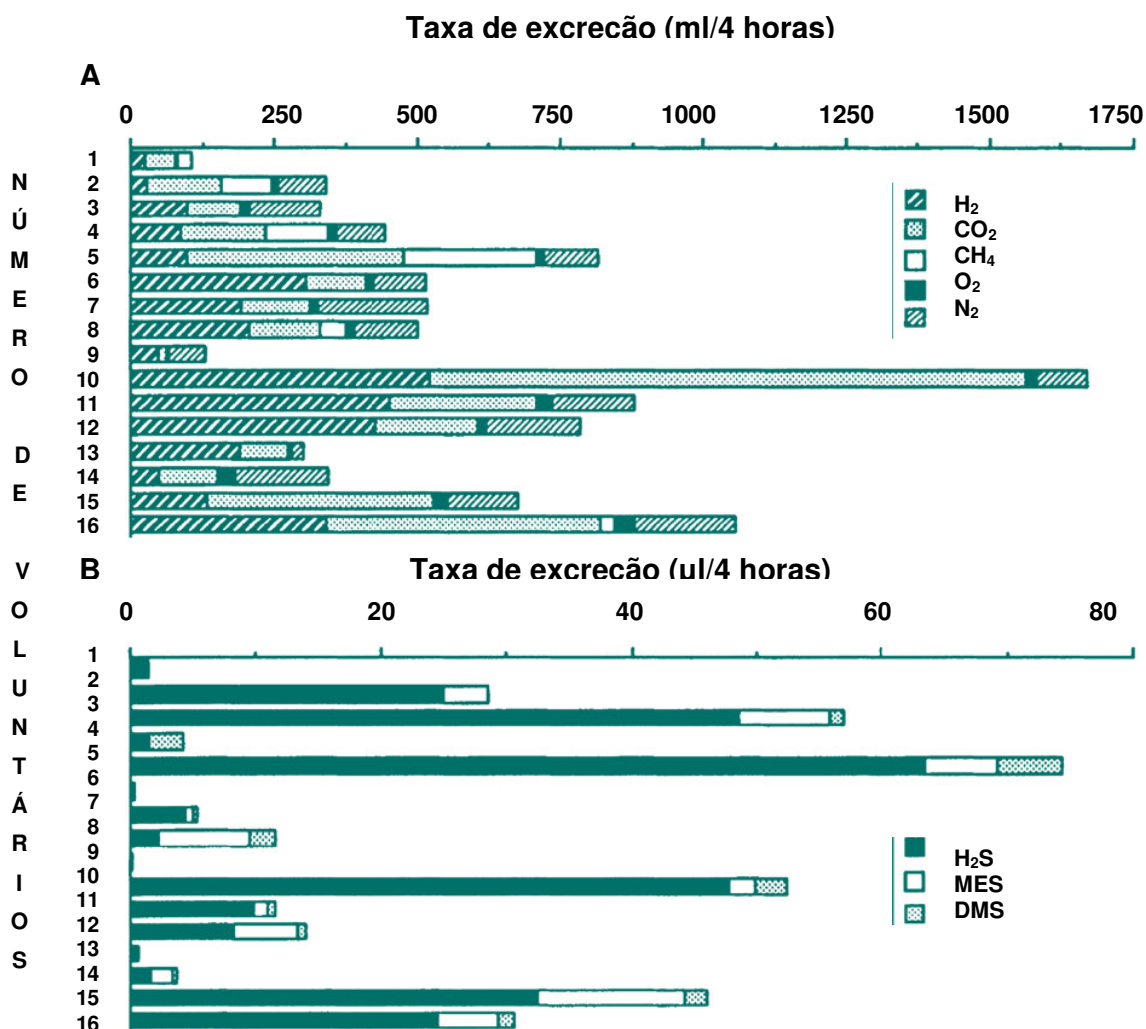


FIGURA 3 - VOLUME DE GASES PRODUZIDOS POR 16 VOLUNTÁRIOS DURANTE 4 HORAS

A palavra flatulência deriva-se do latim *flatus* e é um fenômeno fisiológico que acontece pela ação de bactérias do cólon, que fermentam os substratos produzindo gases. Tal produção de gás se deve a degradação de hidratos de carbono não digeridos no intestino grosso, provenientes de oligossacarídeos de frutas e legumes, amido e fibras alimentares (PEYRIN-BIROULET; BIGARD, 2005). Segundo Levitt et al. (1987) esses substratos são a origem da maior parte das reações de fermentação que acontecem no cólon. Os açúcares rafinose e estaquiose são os oligossacarídeos mais associados a produção de flatulência (DE LUMEN, 1992).

A Figura 4 mostra os mecanismos de produção e consumo de gases no aparelho digestivo humano.

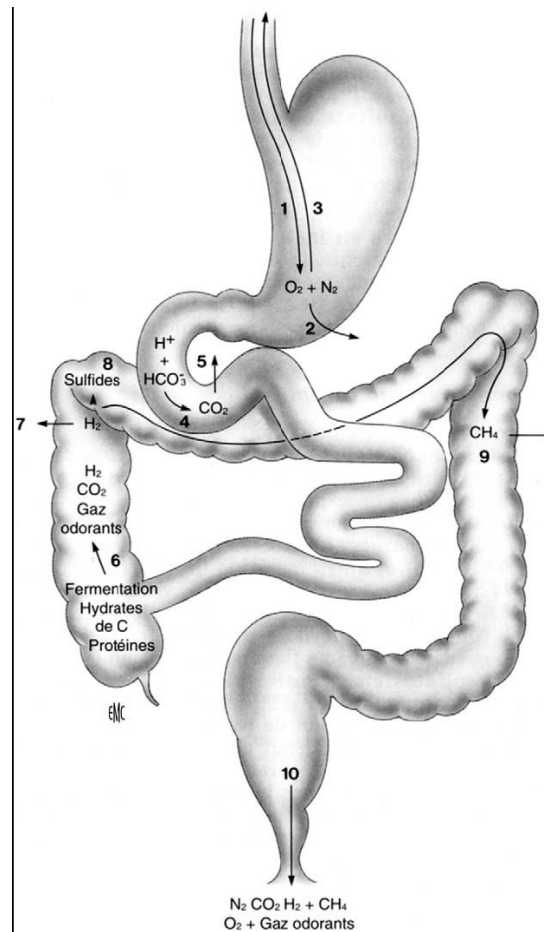


FIGURA 4 - MECANISMO DE PRODUÇÃO DE E CONSUMO DE GASES (PEYRIN-BIROULET; BIGARD, 2005)

O gás metano e hidrogênio são os principais produtos do cólon e se difundem através do lúmen intestinal, sendo absorvidos. O gás carbônico é absorvido pela mucosa digestiva do duodeno e do cólon. Já os gases nitrogênio e oxigênio são absorvidos no estômago e difundem-se para o sangue devido a uma diferença de pressão de aproximadamente 60 mmHg. A difusão do nitrogênio do estômago para o sangue e do sangue para o intestino e cólon gera a produção excessiva de gases como  $H_2$ ,  $CH_4$  e  $CO_2$  (PEYRIN-BIROULET; BIGARD, 2005).

Na Tabela 3 a seguir encontram-se alguns alimentos responsáveis pelo fenômeno da flatulência.

<b>Hidratos de carbono (glicídios)</b>	
Frutose	Trigo, cebola, pêra, refrigerante, frutas
Lactose	Leite, queijo, sorvete, molhos de salada, margarina
Rafinose	Legumes (feijão, ervilha), grãos inteiros, aspargo, couve
Sorbitol	Maçã, pêra, pêssego, ameixa, goma de mascar
Amido	Pão branco, massas, batata, milho
Fibras alimentares	Trigo, aveia, legumes, frutos secos (damascos, passas, ameixas), couve, cenoura, aspargo, brócolis, beterraba
<b>Lípidios</b>	Carnes gordas, molhos, queijos com mais de 25% de gordura, fritura, bacon, pastel
<b>Alimentos aerados</b>	Refrigerantes, soufflés, merengues

TABELA 3 – PRINCIPAIS ALIMENTOS CAUSADORES DA FLATULÊNCIA  
(Adaptado de PEYRIN-BIROULET; BIGARD, 2005)

### 3.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)

Bactérias ácido láticas são microrganismos sem motilidade, não esporulados, Gram-positivos, catalase negativos, anaeróbios aerotolerantes. (AQUARONE et al., 2001). No que diz respeito às necessidades para o crescimento, as bactérias láticas precisam de aminoácidos, vitamina B e bases púricas e pirimídicas. Embora a maioria delas seja mesofílica, algumas podem crescer em temperaturas abaixo de 5°C e outras acima de 45°C. com relação ao pH, a maioria cresce entre 4,0 e 4,5; porém algumas são capazes de crescer abaixo de pH 3,2 e outras acima de pH 9,6 (STAMER, 1976).

Morfologicamente, as bactérias láticas podem estar distribuídas em cocos medindo entre 0,5 e 2 µm (exemplos: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*,

*Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Tetragenococcus*), ou bastões regulares que têm diâmetro variável entre 0,5 e 2  $\mu\text{m}$  e comprimento maior que 10  $\mu\text{m}$  (exemplos: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) (DE ROISSART; LUQUET, 1994).

Com relação aos produtos finais de metabolismo da glicose as bactérias ácido lácticas podem ser classificadas em **homofermentativas** e **heterofermentativas**. Aquelas que produzem o ácido láctico como único ou principal produto de fermentação da glicose são chamadas de **homofermentativas**. Já, as que produzem a mesma quantidade molar de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir das hexoses são denominadas **heterofermentativas** (JAY, 2005).

### 3.4.1 Produção da enzima $\alpha$ -galactosidase por bactérias ácido lácticas

A enzima  $\alpha$ -galactosidase está bem distribuída em microrganismos (DE REZENDE; FELIX, 1999), plantas e animais (DEY; PRIDHAM, 1972). De um modo geral, ela é capaz de hidrolisar uma variedade tanto de  $\alpha$ -D-galactosídeos simples como moléculas mais complexas, como oligossacarídeos e polissacarídeos (GUIMARÃES et al., 2001). Trata-se de uma exoglicosidase que quebra ligações  $\alpha$ -1,6 de resíduos de galactosil em galacto-oligossacarídeos e galactomananas (FUJIMOTO et al., 2003). A aplicação biotecnológica da  $\alpha$ -galactosidase se dá na indústria de açúcar de beterraba, para remover a rafinose de melão de beterraba e para aumentar o rendimento da sacarose (SHIBUYA et al., 1995). Além disso, ela pode ser usada para melhorar as propriedades geleificantes de galactomananas utilizadas como espessantes (BULPIN; GIDLEY; JEFFCOAT, 1990) e para degradar açúcares da família rafinose em alimentos ou produtos como o farelo de soja ou leite de soja (GUIMARÃES et al., 2001).

Bactérias ácido lácticas como os *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* e *L. reuteri*) são capazes de hidrolisar os  $\alpha$ -galactooligossacarídeos em fermentações vegetais devido a atividade da  $\alpha$ -galactosidase (LeBLANC et al., 2005).

Estudos relatam a produção de variados níveis da enzima  $\alpha$ -galactosidase por cepas do gênero *Bifidobacterium*, a qual metaboliza os oligossacarídeos  $\alpha$ -galactosil em leite de soja (SCALABRINI et al., 1998). Nos estudos realizados por DONKOR et al. (2007) *Lactobacillus acidophilus* (La4962 e L10), *Bifidobacterium lactis* B94 e *Bifidobacterium longum* BI536, *Lactobacillus casei* Lc279 e *Lactobacillus casei* L26,

*Streptococcus thermophilus* St1342 e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Lb1466 exibiram variáveis atividades da enzima  $\alpha$ -galactosidase. A redução da rafinose em leite de soja foi de 77,4%, 64,5% e 55,9% utilizando *B. lactis* B94, *S. thermophilus* St1342 e *L. acidophilus* La4962, respectivamente.

LeBLANC et al. (2004 e 2005) desenvolveram duas estratégias para remover os oligossacarídeos em leite de soja. Eles verificaram que o *L. fermentum* CRL 722 teve alto nível de produção de  $\alpha$ -galactosidase quando cultivado em leite de soja. A mesma cepa foi usada então num estudo posterior como veículo para liberar a  $\alpha$ -galactosidase no intestino delgado de roedores. Como resultados, eles concluíram que houve uma significância estatística, no estômago e duodeno, quando os ratos receberam extratos com a enzima ou o *L. fermentum* CRL 722 em relação ao grupo controle.

Contudo, é importante considerar, que a atividade da  $\alpha$ -galactosidase pode ser inibida ou reduzida por vários componentes presentes no trato digestivo, como as enzimas digestivas e os sais biliares, que podem afetar também a sobrevivência das cepas produtoras dessa enzima (LeBLANC et al., 2005).

Alguns estudos têm sido feitos com a aplicação direta da  $\alpha$ -galactosidase em leguminosas, a fim de degradar os açúcares da família rafinose, presentes nesses alimentos (THIPPESWAMY; MULIMANI, 2002).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DA CEPA

A cepa utilizada para os estudos de fermentação foi o *Lactobacillus agilis* LPB 56 do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná. A cepa foi conservada em meio MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960) com 10% de glicerol a temperatura de -20°C. A reativação da bactéria foi feita pela inoculação da cultura pura em caldo MRS e incubação a 37°C por 24 horas.

### 4.2 PREPARO DO MEIO CALDO DE FEIJÃO

Feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) tipo preto da marca comercial Zaeli foi macerado por 16 horas a temperatura de 20 a 25°C, de acordo com metodologia adotada em Oliveira et al. (2001) na proporção de 10 e 15 gramas de feijão cru para 100 mL de água destilada (10 e 15%). O cozimento foi feito em autoclave a 121°C/15psi durante 30 minutos baseado na metodologia adotada por Sat e Keles (2002). Os grãos cozidos com a água de maceração foram triturados em liquidificador doméstico. Carbonato de cálcio foi adicionado como agente regulador de acidez na proporção de 1% (peso/volume) e o pH foi ajustado para 6,5, segundo o estudo realizado por Gote et al. (2004). Os meios foram esterilizados a 121°C por 15 minutos.

### 4.3 ELABORAÇÃO DO INÓCULO

Um estudo foi feito para avaliar o tempo de adaptação da cepa em caldo de feijão, com o objetivo de definir o número de repicagens necessárias para a elaboração do inóculo para os testes de fermentação. Este foi realizado inoculando-se 10% (v/v) de um cultivo de *L. agilis* crescido em caldo MRS (aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml) a 37°C por 12 horas, em caldo de feijão com 10% de grãos. Foram realizadas contagens de células viáveis no tempo inicial (zero) e após 24 horas de incubação a 37°C. Uma alíquota de 10% foi retirada e novamente inoculada em caldo de feijão com a mesma concentração. O cultivo foi incubado a 37°C e

contagens foram feitas após período de 24 horas. As contagens de células viáveis foram realizadas pelo método *drop plate* (VINCENT, 1970). Os testes foram feitos em duplicata.

#### 4.4 FERMENTAÇÃO EM CALDO DE FEIJÃO

Os primeiros ensaios de fermentação foram realizados para definir a melhor concentração de grãos crus/100 mL de água para o crescimento da cepa. As concentrações utilizadas foram de 10 e 15%, usando inóculo de 10% ( $10^8$ UFC/mL) a temperatura de 37°C, sem agitação. Contagens de células viáveis foram feitas segundo Vincent (1970) no tempo inicial (zero), 24 e 48 horas de fermentação. Os testes foram realizados em duplicata.

#### 4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

As condições de cultivo foram estudadas seguindo um planejamento fatorial  $2^n$  no qual as variáveis importantes envolvidas no processo (taxa de inóculo, temperatura, uso de agente regulador de acidez -  $\text{CaCO}_3$  - e uso de agitação) foram testadas. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram analisados pela Metodologia de Superfície de Resposta (BARROS; SCARMINO; BRUNS, 2005).

#### 4.6 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR

Definida a melhor condição de cultivo, de acordo com os resultados obtidos na etapa anterior, será realizada uma fermentação em reator de 10 litros, com a retirada de amostra a cada 3 horas. As amostras serão extraídas com água destilada na proporção de 1/5 e deixadas a temperatura de 50°C por 4 horas (KIM; KIM; HWANG, 2003). Após serão centrifugadas a rotação de 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante será filtrado em membrana da marca Millipore com diâmetro de 0,22  $\mu\text{m}$ . A análise de açúcares solúveis e ácidos orgânicos será feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - High Performance Liquid Chromatography). O cromatógrafo usado será o da marca Shimadzu, fase móvel  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5mM, vazão 0,35 mL/min, 45°C, volume de injeção 20  $\mu\text{L}$ , coluna Aminex HPX 87H.

## 4.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Serão realizadas análises físico-químicas dos grãos de feijão cru, feijão macerado por 16 horas, caldo de feijão estéril (usado como meio de cultivo), caldo de feijão fermentado e caldo de feijão em pó (seco).

### 4.7.1 Determinação de proteínas

As proteínas serão determinadas pelo nitrogênio total, utilizando o método de Kjeldahl e o fator de 6,25 para conversão em proteína, conforme método 955.04C descrito pela AOAC (2000).

### 4.7.2 Determinação de lipídios

O extrato etéreo (lipídios) será determinado por extração com éter etílico durante cinco horas em extrator de Soxhlet, conforme método 920.39C da AOAC (2000).

### 4.7.3 Determinação da umidade

A umidade será determinada em estufa com circulação forçada de ar a temperatura de 55-60°C durante 12 horas, ou até peso constante, conforme método 925.10 da AOAC (2000).

### 4.7.4 Determinação das cinzas

As cinzas serão determinadas pela calcinação em mufla a 550-600°C durante cinco horas de acordo com o método 900.02A (AOAC, 2000).

### 4.7.5 Determinação dos sólidos totais

Os sólidos totais (matéria seca) serão calculados pela diferença entre 100 e a umidade.

#### 4.7.6 Determinação dos carboidratos totais

Os carboidratos totais serão calculados pelo método fenol-sulfúrico segundo Dubois et al. (1956).

#### 4.7.7 Determinação de açúcares solúveis

As amostras foram preparadas e analisadas conforme os procedimentos descritos no item 4.6.

#### 4.7.8 Determinação do pH

O pH foi determinado por peagâmetro da marca Hanna Instruments HI 9321.

### 4.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Análises microbiológicas do produto fermentado e produto seco fermentado serão realizadas de acordo com a resolução RDC nº 12 da Anvisa (BRASIL, 2001). Os padrões estabelecidos serão para outros produtos vegetais, estáveis a temperatura ambiente, com análise de coliformes fecais, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* sp.

### 4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A metodologia adotada para a determinação da atividade da  $\alpha$ -galactosidase será baseada em Oliveira et al. (2005). Tal atividade é determinada pela medida da taxa de conversão do substrato sintético pNPGal ( $p$ -nitrofenil-  $\alpha$ -D-galatopiranosídeo).

As amostras serão centrifugadas por 10 minutos a rotação de 12000 rpm e o sobrenadante será diluído 1/5 em água deionizada, sendo 1 mL usado para a determinação da atividade. Para os ensaios será utilizado um volume final de 1,0 ml, composto de 650  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250  $\mu$ L de solução 2 mM de pNPGal, 100  $\mu$ L da preparação enzimática (0-0,03 mg de proteína). A reação será conduzida por 15 minutos em banho-maria a 40°C e

interrompida pela adição de 1,0 ml de solução 0,5 M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Os valores de absorvância serão lidos no comprimento de onda de 410 nm e transformados em  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenolato (pNP), utilizando uma curva padrão construída com 0-0,20  $\mu\text{moles}$  de pNP a partir de uma solução estoque de concentração 2  $\mu\text{mol/ml}$ . Uma unidade de enzima será definida como sendo a quantidade de proteína necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por minuto nas condições de ensaio.

#### 4.10 SECAGEM DO CALDO FERMENTADO

A secagem do caldo fermentado será feita em estufa tradicional a 60, 80 e 100°C e estufa com pressão reduzida a 60°C. A determinação do tempo final de secagem será feita mediante a monitoração da perda de umidade na balança determinadora de umidade por infravermelho (Top Ray) a temperatura de 105°C e a atividade de água final do produto medida no aparelho Aqualab CX-2.

#### 4.11 ENSAIOS PARA REIDRATAÇÃO DO PRODUTO

Ensaio serão feitos reidratando o pó em água deionizada por 5 minutos a temperatura ambiente (entre 20 a 25°C) e aquecendo a 100°C; reidratando e aquecendo direto a 100°C e reidratando a temperatura ambiente (entre 20 a 25°C). A medida da reidratando do pó será feita mediante a medição na balança determinadora de umidade descrita no item anterior. A proporção água/pó e a relação tempo/temperatura de reidratação serão definidos com base na obtenção de um caldo viscoso, semelhante a uma sopa de feijão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PREPARO DO MEIO CALDO DE FEIJÃO

Os valores nutricionais do feijão preto usado, segundo o fabricante, estão na Tabela 4.

<b>Composição</b>	<b>Quantidade por 100 g</b>
Valor energético	272 Kcal ou 1140 KJ
Carboidratos	45 g
Proteínas	22 g
Gorduras totais	2 g
Gorduras saturadas	0 g
Gorduras trans	0 g
Fibra alimentar	20 g
Sódio	0 mg

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO DO FEIJÃO PRETO COMERCIAL USADO MARCA ZAELI

A etapa de maceração visou uma extração dos oligossacarídeos presentes nos grãos e uma diminuição no tempo de cozimento. O cozimento realizado em autoclave foi feito visando um processo industrial. Ambos os procedimentos adotados visaram uma redução no conteúdo de oligossacarídeos. Estudos de Barampama e Simard (1994 e 1995) demonstraram que existe uma importante diminuição em oligossacarídeos tipo rafinose, amido e outros fatores antinutricionais em feijão cozido e feijão macerado e cozido. Onyenekwe, Njoku, e Ameh (2000) constataram que a etapa de maceração do feijão-de-corda até 16 horas reduziu os níveis de rafinose e estaquiose.

Somiari e Balogh (1993) e Silva e Braga (1982) sugeriram que, além do processo de lixiviação, o conteúdo de oligossacarídeos sofre uma diminuição devido a ativação de enzimas como  $\alpha$ -galactosidases e invertases, similar ao processo de brotamento, resultando na degradação desses açúcares. Oliveira et al. (2001) discutem o uso da maceração apoiando-se nos estudos de Baldini, Draetta e Yong (1985), que demonstraram a existência da enzima  $\alpha$ -galactosidase em feijão comum

(*Phaseolus vulgaris*, L., cv. Carioca 80), relatando que com esta etapa existiriam condições para a clivagem das ligações  $\alpha$ -1,6-galactosídicas.

Vidal-Valverde, Frias e Valverde (1993) verificaram alterações na composição do feijão comum após o processo de maceração e cozimento. Eles constataram uma redução considerável de monossacarídeos e oligossacarídeos, particularmente, quando a água de maceração e cozimento era drenada. Entretanto, alguns autores ressaltam que a etapa de maceração causa a perda de nutrientes solúveis por lixiviação, como por exemplo proteínas, vitaminas e minerais (KATARIA; CHAUHAN; PUNIA, 1992; BARAMPAMA; SIMARD, 1995).

O cozimento de feijão comum por 60 minutos causou a redução de 42 a 47% no conteúdo dos  $\alpha$ -galactosídeos segundo Abdel-Gawad (1993). A maior porcentagem de eliminação da estaquiose junto a rafinose que Onyenekwe, Njoku, e Ameh (2000) conseguiram foi de 39,25%, quando o feijão-de-corda foi cozido por 40 minutos. Quando três variedades de feijão-de-corda foram cozidas por 50 minutos, Somiari e Balogh (1993) constataram uma diminuição de 28,6% para estaquiose e 44% para a rafinose.

Anisha e Prema (2008) verificaram que o cozimento de dois tipos de feijão – das espécies *Vigna radiata* e *Macrotyloma uniflorum* - por 60 minutos, resultou no decréscimo de 49,6% e 46,3% para rafinose e 24,3% e 20,1% para a estaquiose, respectivamente.

A não eliminação da água de maceração foi uma prática adotada nesse estudo com o objetivo de simplificar o processo, e fornecer maior quantidade de nutrientes para a etapa posterior de fermentação, a qual é fundamental para a eliminação dos fatores de flatulência, visto que, a maceração e o cozimento, ainda não são suficientes para causar uma redução significativa dos oligossacarídeos, segundo Price et al. (1988).

O uso do cozimento sob pressão 121°C–15psi foi utilizado baseado nos resultados obtidos por Sat e Keles (2002), onde o cozimento sob pressão por 30 minutos foi mais efetivo na degradação dos açúcares que o cozimento em ebulição por 60 minutos.

## 5.1 AJUSTE DO PH

O pH inicial do meio foi ajustado a 6,5, de acordo com o meio sintético usado para o cultivo de *Lactobacillus* (meio MRS). Gote et al. (2004) obtiveram uma melhor atividade e estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase produzida por *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) a pH 6,5 a 7,0. De acordo com Ulezlo e Zaprometava (1982), de um modo geral, as  $\alpha$ -galactosidas bacterianas têm um pH ótimo numa faixa ligeiramente alcalina (6,5-7,0).

### 5.1.1 Uso do carbonato de cálcio

O uso do carbonato de cálcio objetivou a manutenção da concentração de ácido láctico livre, prevenindo a inibição da bactéria. Seu uso é permitido pela legislação como regulador de acidez em quantidades necessárias para se obter o efeito desejado.

Contudo, observou-se que a adição do inóculo, crescido em meio sintético (MRS) e adaptado em meio de feijão, baixou o pH, deixando os caldos com valores de pH em torno de 6,0 no início da fermentação.

## 5.2 DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO CALDO DE FEIJÃO

As concentrações de feijão adotadas para a confecção dos meios foram feitas experimentalmente, de modo que a maior concentração usada (20% de grãos crus) não permitiu um manuseio satisfatório. Por isso, optou-se pela concentração de 15% sendo esta a melhor concentração operacional, para os ensaios de fermentação. Para a elaboração do inóculo utilizou-se uma concentração menor de 10%. Os meios foram preparados mais concentrados (15,55%), de forma que, após a adição do inóculo (10% v/v), atingissem a concentração de 15%.

A fim de avaliar as diferenças das duas concentrações testadas, contagens de células viáveis foram feitas e os valores estão representados na Figura 5.



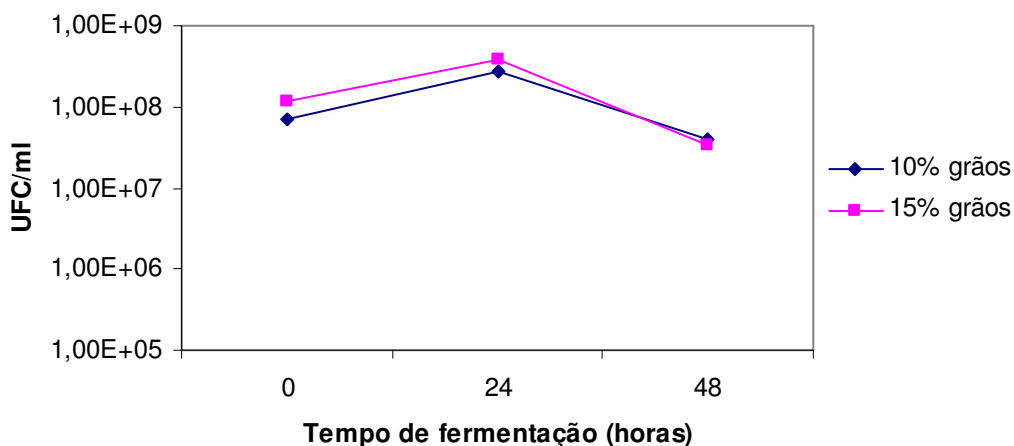


FIGURA 5 - CULTIVO DO *L. agilis* EM CONCENTRAÇÕES DE CALDO DE FEIJÃO DE 10 E 15% A 37°C

Os resultados mostraram um aumento do número de células inferior a 1 log em 24 horas de fermentação a 37°C, com pouca diferença entre as duas concentrações testadas. Quando o número de células foi avaliado ao final de 48 horas de incubação a redução verificada para 15% foi superior a de 10%, com valores próximos de células viáveis. A variação do pH do meio é mostrada na Figura 6.

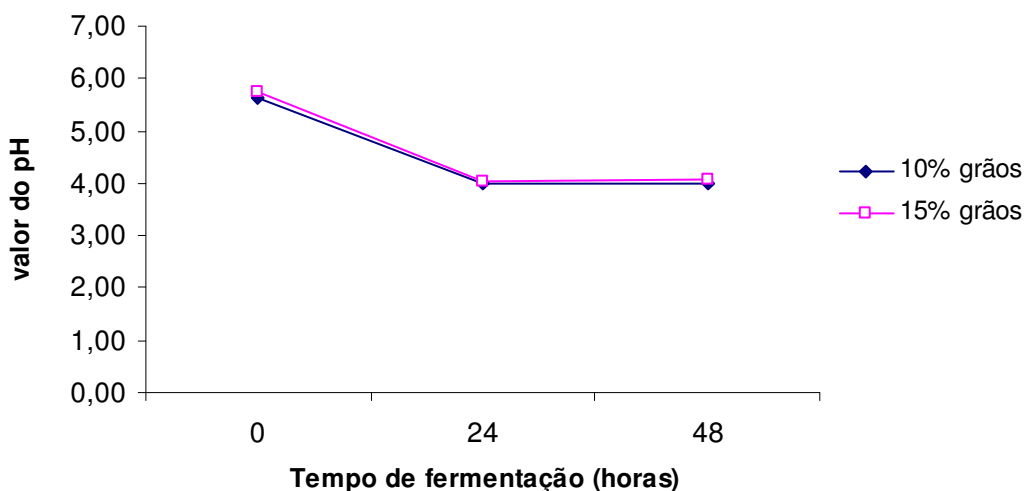


FIGURA 6 - VARIAÇÃO DO PH DO MEIO CALDO DE FEIJÃO INOCULADO COM *L. agilis* COM CONCENTRAÇÕES DE 10 E 15%

O meio caldo de feijão inicialmente ajustado a 6,5 sofre decréscimo do pH no momento da adição do inóculo, tendo para as concentrações iniciais de 10 e 15% os valores de pH de 5,65 e 5,76, respectivamente. Após 24 horas de fermentação o valor do pH diminui situando-se em torno de 4. O valor constante do pH foi verificado às 48 horas, o que poderia ser justificado por um esgotamento de fontes energéticas do meio, resultando em diminuição da população bacteriana, conforme mostra a Figura 5.

Considerando, que o crescimento em meio com 10 e 15% de grãos foi similar, escolheu-se a maior concentração (15%) para a realização dos testes de fermentação, tendo em vista que nessa concentração a quantidade de água era menor, sendo mais apropriada a etapa posterior de secagem. Já a menor concentração (10%) foi utilizada para a elaboração do inóculo, devido ao fato de ser apenas uma etapa de adaptação no qual maior quantidade de água disponível facilitaria o crescimento da célula, como também disponibilizaria de forma mais eficiente os nutrientes do meio.

### 5.3 ELABORAÇÃO DO INÓCULO

As contagens de células viáveis realizadas a fim de determinar o número de repicagens necessárias a elaboração do inóculo são mostradas na Figura 7.

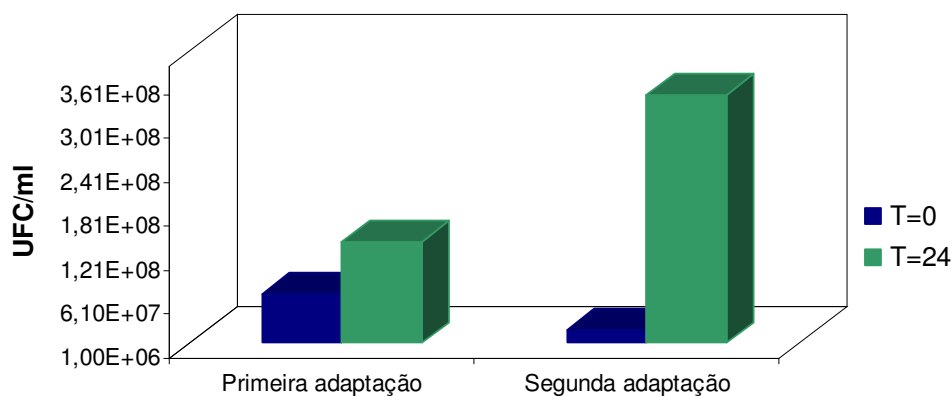


FIGURA 7 - CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS PARA AVALIAÇÃO DA ADAPTAÇÃO DO *L. agilis* EM CALDO DE FEIJÃO

Na primeira etapa de adaptação do *Lactobacillus agilis* ao caldo de feijão o aumento no número células é inferior a 0,5 log. Em comparação ao meio sintético

(MRS) o crescimento da célula no meio caldo de feijão é bem inferior, o que pode ser justificado pela maior concentração de nutrientes de mais fácil metabolização no meio sintético, gerando uma taxa de crescimento superior (Figura 8). Quando 10% do cultivo crescido em caldo de feijão foi inoculado em um novo caldo notou-se um aumento no número de células superior a 1 log, mostrando que a cepa já está adaptada para ser utilizada nos testes de fermentação. Logo, para a elaboração do inóculo a reativação da cepa foi feita inoculando-se um cultivo em caldo de feijão e deixando incubado a 37°C por 24 horas. Esta etapa foi realizada somente uma vez, visto que já estando adaptando ao caldo de feijão a bactéria cresceria de forma eficiente a utilizar os nutrientes de interesse nesse estudo.

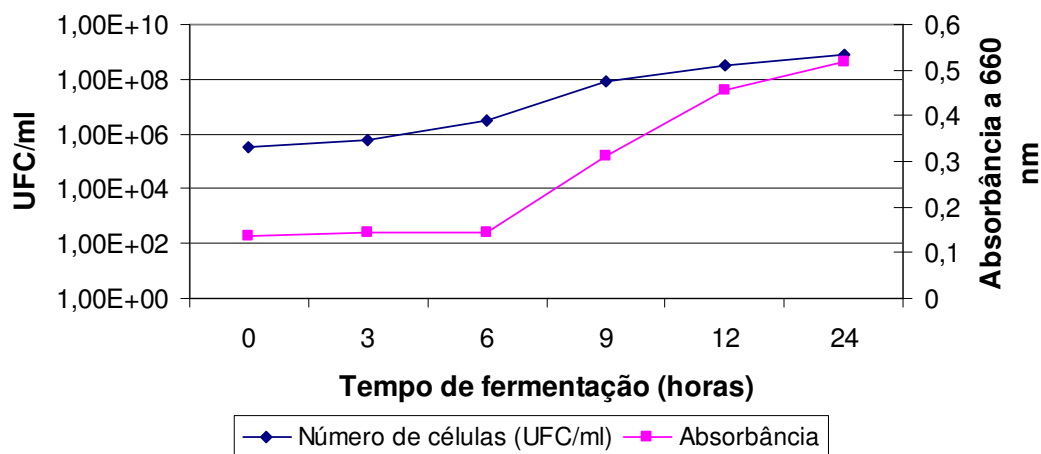


FIGURA 8 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Lactobacillus agilis* EM MEIO MRS

A Figura 8 mostra a cinética de crescimento do *Lactobacillus agilis* em meio MRS até 24 horas de incubação a 37°C. O crescimento exponencial é verificado a partir de 6 horas de fermentação até 12 horas onde o microrganismo cresce a uma velocidade menor. Em 24 horas de fermentação constatou um crescimento do número de células superior a 3 log, o que representou mais que o dobro de crescimento encontrado para o mesmo *Lactobacillus* em meio caldo de feijão.

#### 5.4 FERMENTAÇÃO EM CALDO DE FEIJÃO

A cinética de crescimento do *L. agilis* em meio com 15% de grãos foi realizada com o objetivo de avaliar a sobrevivência desse microrganismo nesse meio

a temperatura de 37°C, sem agitação. Os resultados estão representados na Figura 9.

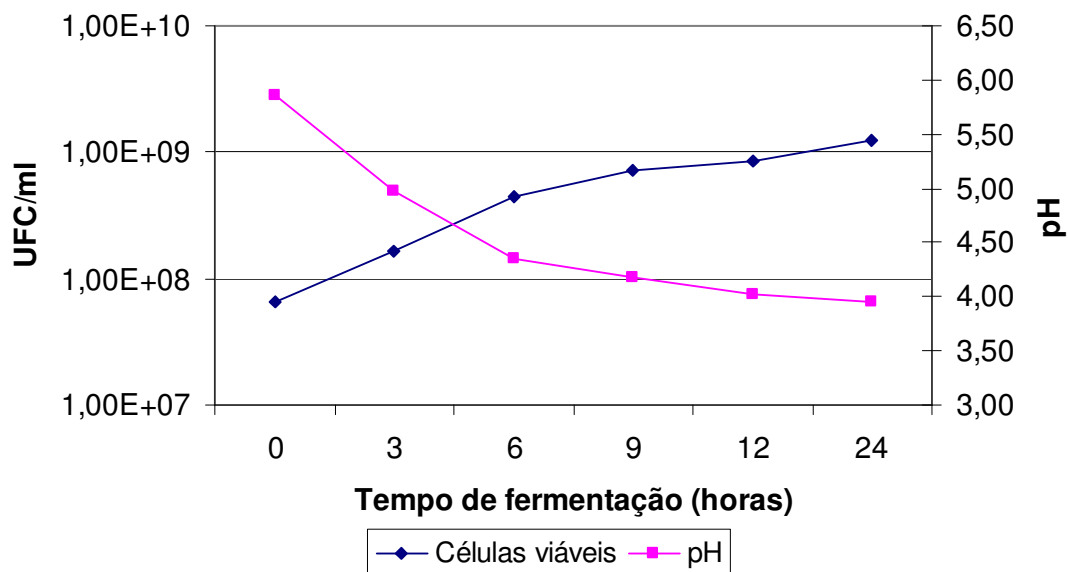


FIGURA 9 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *L. agilis* EM CALDO DE FEIJÃO

Através do gráfico pôde-se observar que até as 12 horas de incubação a bactéria teve crescimento superior a 1 log, chegando a  $1,3 \times 10^9$  ao final de 24 horas (contagem inicial de  $6,5 \times 10^7$ ). A contagem confirmou a capacidade que o *L. agilis* tem de sobreviver e crescer nesse meio, utilizando as fontes de interesse analisadas por Cromatografia Líquida (HPLC).

## 5.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

### 5.5.1 Efeito da temperatura

Para avaliar o crescimento do *L. agilis* em diferentes temperaturas foi feita uma cinética de crescimento em meio MRS utilizando as temperaturas de 30 e 37°C, conforme a Figura 10.

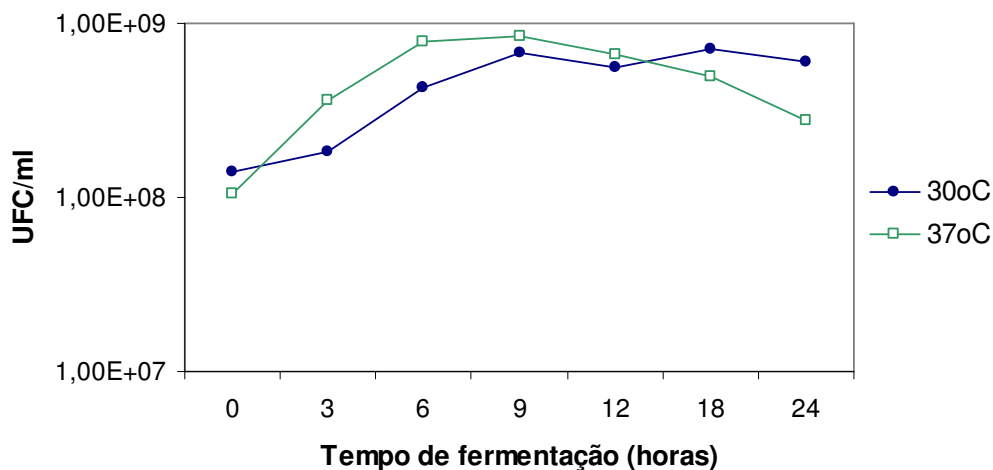


FIGURA 10 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *L. agilis* EM MEIO MRS A 30 E 37°C

Através dos resultados pôde-se verificar que o crescimento do *L. agilis* é consideravelmente mais rápido a 37°C, com maior número de em 9 horas de fermentação ( $8,4 \times 10^8$  UFC/ml). Após esse período, a excessiva acidificação do meio poderia estar inibindo o crescimento da bactéria, de forma que a viabilidade diminuiu chegando a  $2,8 \times 10^8$  UFC/ml em 24 horas de fermentação. O maior número de células a 30°C foi verificado após 18 horas de fermentação ( $7,10 \times 10^8$  UFC/ml) com decréscimo às 24 horas chegando a  $6,0 \times 10^8$  UFC/ml. Visto a capacidade desta bactéria de crescer nessas temperaturas, estas foram utilizadas no planejamento experimental que definiu as melhores condições para o consumo dos açúcares estaquiose e rafinose.

#### 5.5.2 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial foi realizado a fim de definir as melhores condições para o consumo da estaquiose. As variáveis envolvidas no processo foram a taxa de inóculo, uso de agitação, uso de carbonato de cálcio e temperatura de incubação.

## 5.5.2.1 Consumo da estaquiose

As variáveis do processo e seus níveis estão na Tabela 5.

<b>Fator</b>		-	+
<b>1</b>	Inóculo	10	15
<b>2</b>	Agitação	0	120
<b>3</b>	CACO <sub>3</sub>	0	1
<b>4</b>	Temperatura	30	37

TABELA 5 – RESULTADOS DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>4</sup> COMPLETO REALIZADO PARA ESTUDAR O RESULTADO DA CONCENTRAÇÃO DE ESTAQUIOSE.

A Tabela 6 mostra as interações da variáveis analisadas e o consumo da estaquiose que inicialmente apresentou valor igual a 7,46 g/L.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	Consumo
Ensaio	[Inóculo]	[Agitação]	[CACO <sub>3</sub> ]	temperatura	Estaquiose (g/L)
1	-	-	-	-	3,91
2	+	-	-	-	4,39
3	-	+	-	-	4,68
4	+	+	-	-	6,05
5	-	-	+	-	6,38
6	+	-	+	-	6,96
7	-	+	+	-	6,96
8	+	+	+	-	6,96
9	-	-	-	+	6,16
10	+	-	-	+	6,82
11	-	+	-	+	5,71
12	+	+	-	+	6,96
13	-	-	+	+	6,96

**Continua**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	Consumo
Ensaio	[Inóculo]	[Agitação]	[CaCO <sub>3</sub> ]	temperatura	Estaquiouse (g/L)
14	+	-	+	+	6,96
15	-	+	+	+	7,46
16	+	+	+	+	7,46

TABELA 6 – ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>4</sup> PARA O ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ESTAQUIOSE

Na Tabela 7 estão os valores das variáveis que explicam a influência negativa ou positiva sobre os resultados.

Média = 6,305	<b>12</b> = 0,100
<b>1</b> = 0,530	<b>13</b> = -0,385
<b>2</b> = 0,475	<b>14</b> = -0,078
<b>3</b> = 1,415	<b>23</b> = -0,080
<b>4</b> = 1,038	<b>24</b> = -0,278
	<b>34</b> = -0,643
<b>123</b> = -0,2450	<b>1234</b> = 0,1225
<b>124</b> = 0,0225	
<b>134</b> = -0,0675	
<b>234</b> = 0,3828	

TABELA 7 – ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>4</sup> PARA O ESTUDO DO CONSUMO DA ESTAQUIOSE

A análise dos efeitos mostrou que a concentração de CaCO<sub>3</sub> e temperatura foram as variáveis mais significativas no consumo de estaquiouse. A interação entre as variáveis não foi significativa, existindo apenas uma fraca interação entre as variáveis agitação, CaCO<sub>3</sub> e temperatura. Os efeitos combinados do inóculo e da agitação são mostrados na Figura 11.

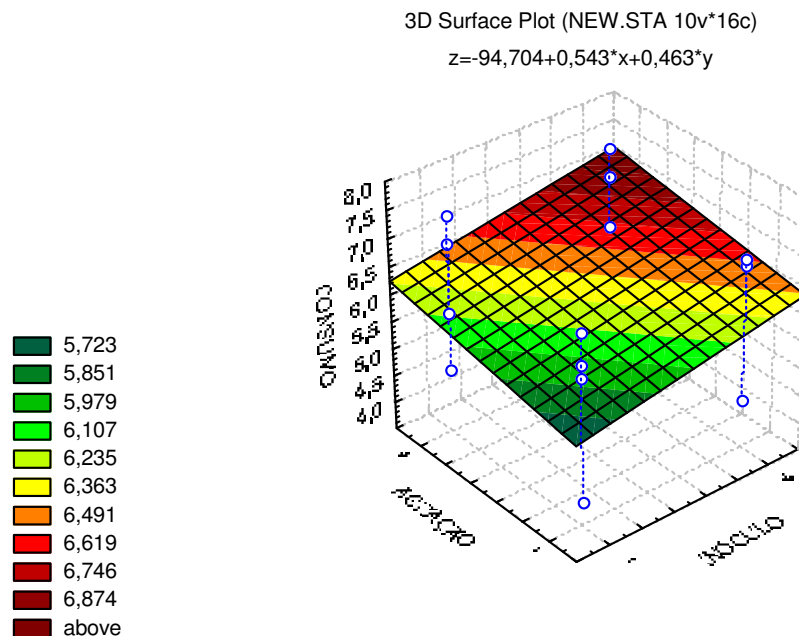


FIGURA 11 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (10%,15%) E DA AGITAÇÃO (0,120) SOBRE O CONSUMO DE ESTAQUIOSE, E RESPECTIVA EQUAÇÃO MATEMÁTICA, ONDE X = PERCENTUAL DE INÓCULO, Y = AGITAÇÃO E X.Y = INTERAÇÃO ENTRE O PERCENTUAL DE INÓCULO E A AGITAÇÃO

Ao comparar o consumo diante da concentração de inóculo em seu nível mais elevado (15%) e o uso de agitação (120) temos um maior consumo de estaquiose verificado, sendo superior em 9%, em relação aos níveis mais baixos destas variáveis. O uso da agitação representou 7,6% no aumento do consumo da estaquiose.

A concentração de inóculo em seu maior nível (15%) e o uso de  $\text{CaCO}_3$ , é altamente significativo para o consumo de estaquiose. A variável  $\text{CaCO}_3$  foi responsável pelo aumento de 25,6% do consumo de estaquiose, embora a interação entre elas não seja significativa, podendo ser analisadas separadamente os efeitos de seus níveis. O consumo de estaquiose foi melhor quando utilizou-se a concentração mais alta do inóculo (15%) e o  $\text{CaCO}_3$  (Figura 12).



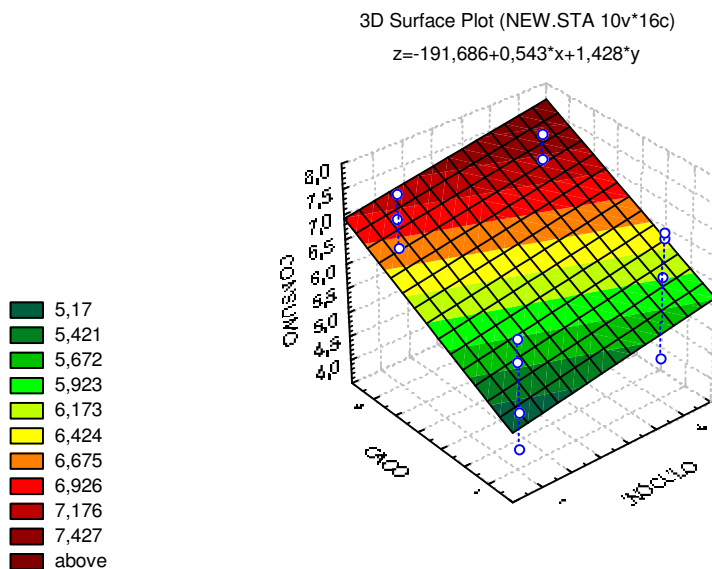


FIGURA 12 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (10%,15%) E DO USO DE  $\text{CaCO}_3$  SOBRE O CONSUMO DA ESTAQUIOSE, E RESPECTIVA EQUAÇÃO MATEMÁTICA, ONDE X = PERCENTUAL DE INÓCULO, Y = USO DE  $\text{CaCO}_3$  E X.Y = INTERAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E O USO DE  $\text{CaCO}_3$

Os níveis mais altos de inóculo (15%) e de temperatura ( $37^\circ\text{C}$ ) também favoreceram o consumo de estaquiose, como pode ser visto na Figura 13. Quando a temperatura de  $30^\circ\text{C}$  foi elevada para  $37^\circ\text{C}$ , o consumo de estaquiose aumentou 17,71 %.

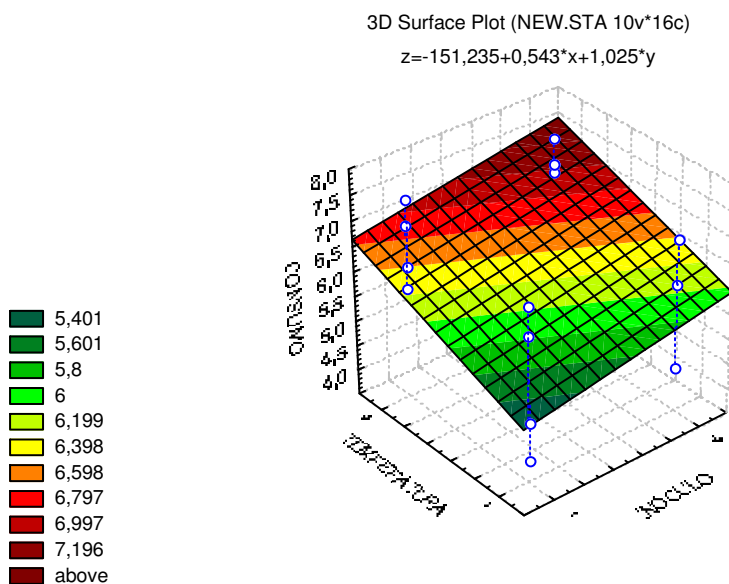


FIGURA 13 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (10%,15%) E DA TEMPERATURA (30,37°C) SOBRE O CONSUMO DA ESTAQUIOSE, E RESPECTIVA EQUAÇÃO MATEMÁTICA, ONDE X = PERCENTUAL DE INÓCULO, Y = TEMPERATURA E X.Y = INTERAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E A TEMPERATURA

#### 5.5.2.2 Produção do ácido láctico

A Tabela 8 mostra as interações das variáveis analisadas e a produção de ácido láctico cuja concentração inicial era 3,3 g/L.

Ensaio	1 [Inóculo]	2 [Agitação]	3 [CaCO <sub>3</sub> ]	4 temperatura	Concentração Ácido láctico
1	-	-	-	-	8,9835
2	+	-	-	-	9,6575
3	-	+	-	-	9,022
4	+	+	-	-	8,3255
5	-	-	+	-	12,659
6	+	-	+	-	13,162
7	-	+	+	-	9,013
8	+	+	+	-	9,079
9	-	-	-	+	11,12
10	+	-	-	+	11,996
11	-	+	-	+	10,972
12	+	+	-	+	9,2635
13	-	-	+	+	12,571
14	+	-	+	+	12,676
15	-	+	+	+	10,3455
16	+	+	+	+	7,9435

TABELA 8 – RESULTADOS DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>4</sup> COMPLETO REALIZADO PARA ESTUDAR A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

Na Tabela 9 estão os valores das variáveis que explicam a influência negativa ou positiva sobre os resultados encontrados para a produção de ácido láctico.

Média = 10,423	<b>12</b> = -0,8624
<b>1</b> = - 0,323	<b>13</b> = -01091
<b>2</b> = -2,358	<b>14</b> = -0,4595
<b>3</b> = 1,014	<b>23</b> = -1,3141
<b>4</b> = 0,8733	<b>24</b> = -0,1020
	<b>34</b> = -0,9675
<b>123</b> = 0,1264	<b>1234</b> = - 0,1070
<b>124</b> = -0,4105	
<b>134</b> = -0,2570	
<b>234</b> = 0,2948	

TABELA 9 – ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^4$  PARA O ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

Os fatores inóculo e agitação não contribuem para a melhoria na produção do ácido láctico (Figura 14 e 15). O melhor desempenho é obtido com a utilização de  $\text{CaCO}_3$  e a variação da temperatura em seus níveis máximo e mínimo (30 e 37 °C).

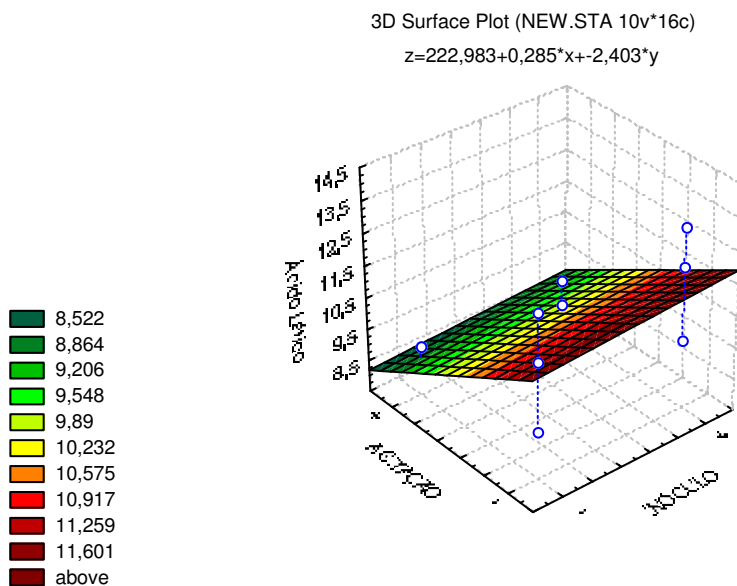


FIGURA 14 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (10%,15%) E DA AGITAÇÃO (0,120) SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO, E RESPECTIVA EQUAÇÃO MATEMÁTICA, ONDE X = PERCENTUAL DE INÓCULO, Y = AGITAÇÃO E X.Y = INTERAÇÃO ENTRE O PERCENTUAL DE INÓCULO E A AGITAÇÃO

O uso de  $\text{CaCO}_3$  e do inóculo em sua concentração máxima contribuiu para a produção de ácido lático em 10,22 %. (Figura 15).

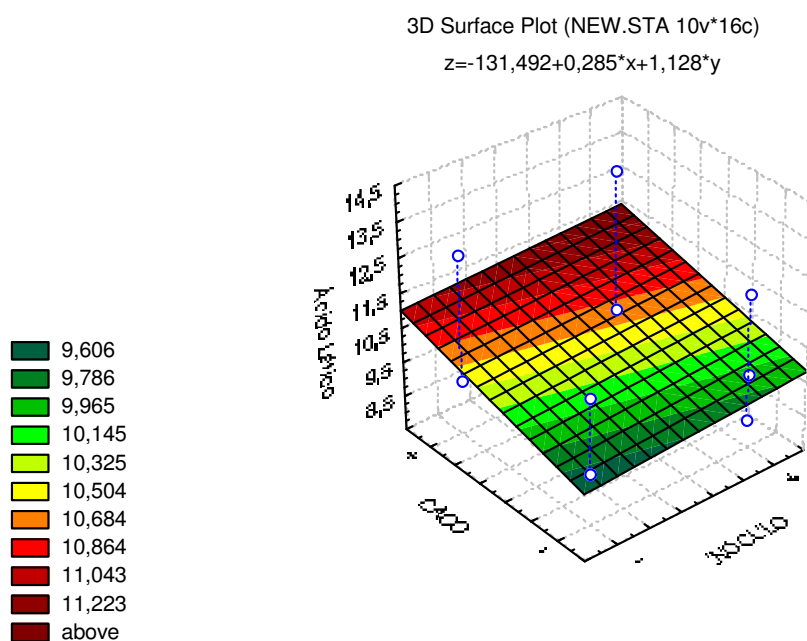


FIGURA 15 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (10%,15%) E DO USO DE  $\text{CaCO}_3$  SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO, E RESPECTIVA EQUAÇÃO MATEMÁTICA, ONDE X = PERCENTUAL DE INÓCULO, Y = USO DE  $\text{CaCO}_3$  E X.Y = INTERAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E O USO DE  $\text{CaCO}_3$

O efeito da temperatura contribuiu com 7,8% na obtenção de ácido lático (Figura 16).

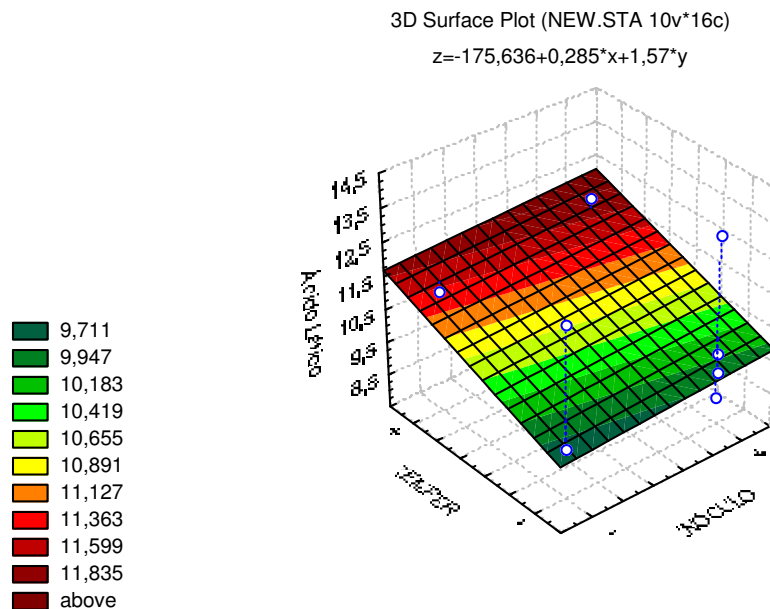


FIGURA 16 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO (10%,15%) E DA TEMPERATURA (30,37°C) SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO, E RESPECTIVA EQUAÇÃO MATEMÁTICA, ONDE X = PERCENTUAL DE INÓCULO, Y = TEMPERATURA E X.Y = INTERAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E A TEMPERATURA

Pôde-se considerar os modelos satisfatórios, pois o gráfico dos resíduos contra as respostas, teve uma aparência aleatória. Da mesma forma, o gráfico normal dos resíduos teve uma aparência mais ou menos retilínea.

## 5.6 ANÁLISE DO CONSUMO DE OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE E PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO

A metodologia de extração utilizada para a análise de açúcares solúveis, visando estudar o consumo de oligossacarídeos da família rafinose foi baseada em Kim, Kim e Hwang (2003) onde a amostra foi diluída 1/5 em água deionizada e extraída em banho-maria a 50°C por 4 horas. Lee, Jung e Rhee (1987) relataram que a efetividade da extração de oligossacarídeos aumentou quando maior temperatura e tempo de extração foram usados, com temperaturas de extração variando de 10 a 50°C. Temperaturas de extração maiores que 50°C reduzem a

quantidade de oligossacarídeos extraídos de farelo de soja desengordurado devido a desnaturação de proteínas solúveis pelo calor que acabam dificultando a extração dos oligossacarídeos (KIM; KIM; HWANG, 2003).

No entanto foi feita uma extração desses oligossacarídeos a temperatura de 10°C por 12 horas e constatou-se pouca diferença entre a extração desses açúcares (Tabela 10). Numa temperatura intermediária, de 20 a 25°C, a extração desses açúcares também poderia ser feita de forma eficiente. Considerando o gasto de energia despendido na primeira metodologia e a necessidade de refrigeração da segunda, concluiu-se que a forma de extração a temperatura ambiente (20 a 25°C) poderia ser o método mais interessante.

<b>Método de extração</b>	<b>Concentração de estaquiose</b>	<b>Concentração de ácido láctico</b>
50°C por 4 horas	7,1 g/l	3,4 g/l
10°C por 12 horas	7,5 /l	3,3 g/l

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DE DUAS METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO PARA OLIGOSSACARÍDEOS

Kennedy, Mwandemele e McWhirter (1985) relataram que uma solução de etanol 80% facilitou a extração de oligossacarídeos da soja devido a inativação enzimática. Estudos realizados avaliando o conteúdo de oligossacarídeos da família rafinose (RFOs) plantas revelaram que as menores concentrações de etanol são mais eficientes na extração desses açúcares, em produtos como concentrados de soja (SHUKLA, 1987) e sementes de legumes maduros (KOSSON, 1992).

De acordo com Johansen, Glitso e Knudsen (1996) a extração de RFOs é mais efetiva com etanol 50% devido a maior polaridade dos RFOs em menores concentrações de etanol. Em concordância, o metanol, sendo mais hidrofílico que o etanol, tem sido considerado o solvente mais eficiente. Além disso, concentrações de 80% de etanol podem desnaturar algumas proteínas e possivelmente precipitados formados se difundem para a solução de etanol.

A metodologia de extração aplicada foi definida com base em condições de operação do laboratório e colocou-se neste trabalho como uma alternativa eficiente e barata contrastando com a maioria dos trabalhos que utilizam o etanol para a extração desses açúcares solúveis.

Quanto aos resultados obtidos pôde-se verificar que as operações para a preparação do caldo resultaram em um produto que teve aproximadamente 7,3 g/l de estaquiose, 4,2 g/l de glicose e 3,4 g/l de ácido láctico. Rafinose, frutose e galactose não foram detectados.

Os resultados dos ensaios de fermentação mostraram um consumo de 100% no conteúdo do açúcar estaquiose, com conseqüente produção do ácido láctico. A concentração de glicose mantém-se praticamente estável, o que pode ser explicado pela quebra das moléculas de estaquiose, gerando moléculas de glicose e contrabalanceando as moléculas que são consumidas no processo. Esses resultados podem ser apoiados nos estudos de Wang et al. (2003) onde o *Lactobacillus acidophilus* cultivado em leite soja reduziu os níveis de estaquiose e rafinose de 6,02 e 1,42 mmol.l<sup>-1</sup> para 4,15 e 1,29 mmol.l<sup>-1</sup>, respectivamente, após 24 horas de fermentação a 37°C. O aumento no conteúdo de monossacarídeos também foi encontrado por Wang et al. (2003), o que foi justificado pela hidrólise de estaquiose e rafinose e sacarose.

## 5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA $\alpha$ -GALACTOSIDASE

A atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase foi determinada de acordo com Oliveira et al. (2005) e resultou nos valores mostrados na Tabela 11.

Variações	Valor da atividade da $\alpha$ -galactosidase (em U/ml)		
	Tempo inicial (zero)	Tempo 24 horas de fermentação	Tempo 48 horas de fermentação
Uso de agitação (120 rpm) e CaCO <sub>3</sub>	0	0,045	0,361
Uso de agitação (120 rpm)	0	0	0
Sem agitação (120 rpm) e com CaCO <sub>3</sub>	0	0,057	0,557

**Continua**

Variações	Valor da atividade da $\alpha$ -galactosidase (em U/ml)		
	Tempo inicial (zero)	Tempo 24 horas de fermentação	Tempo 48 horas de fermentação
Sem agitação (120 rpm)	0	0	0

TABELA 11 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA  $\alpha$ -GALACTOSIDASE PRODUZIDA POR *L. agilis* CULTIVADO EM CALDO DE FEIJÃO (15%)

Notou-se que apenas as amostras com carbonato de cálcio apresentaram valores de atividade da enzima. Isso confirma os valores encontrados no planejamento experimental onde o consumo da estaquiose para as amostras sem carbonato é menor, devido provavelmente a falta da atividade da  $\alpha$ -galactosidase. A perda da atividade da enzima pode ser explicada por uma possível desnaturação ocasionada pelo decréscimo do pH, o que é confirmado pelos valores finais encontrados que se situam em torno de 4. Apesar da atividade aumentar às 48 horas, o critério para definir o tempo máximo de fermentação será o tempo necessário para a hidrólise total da estaquiose. A atividade da enzima confirma esse processo de metabolização desse oligossacarídeo.

Segundo Roy; Chevalier; Savoie (1991), para bactérias do gênero *Bifidobacterium*, a máxima atividade enzimática ocorre entre 12 e 24 horas de fermentação, tendo um decréscimo, na maioria dos casos, durante a fase estacionária.

Nos estudos de Gdala et al. (1997) quando porcos foram alimentados com uma dieta suplementada com a  $\alpha$ -galactosidase, a digestibilidade da rafinose, estaquiose e verbascose no intestino delgado foi de até 97%, sendo que na não suplementação da enzima 80% dos galactosídeos de sementes de *Lupinus Luteus* L. foram digeridos.



## **6 CONCLUSÕES PARCIAIS**

Com base nos resultados encontrados verificou-se um consumo satisfatório do açúcar causador de flatulência estaquiase em até 24 horas de fermentação. O uso do carbonato de cálcio mostra-se como coadjuvante importante do processo e sua influência nas alterações sensoriais no produto final deve ser levada em consideração. A temperatura também foi uma variável significativa no processo. Testes ainda estão sendo realizados para otimizar a fermentação em bioreator e ensaios para a secagem do produto estão em desenvolvimento.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-GAWAD, A. S. Effect of domestic processing on the oligosaccharide content of some dry legumes seeds. **Food Chemistry**, n. 46, p. 25–31, 1993.
- ACEVEDO, E.; VELASQUE-CORONADO, L.; BRESSANI, R. Change in dietary fiber content and its composition as affected by processing of black beans (*Phaseolus vulgaris*, Tamazulapa variety). **Plant Foods for Human Nutrition**, Dorchecht, v.46, n.2, p.139-145, 1994.
- ANISHA, G. S.; PREMA, P. Reduction of non-digestible oligosaccharides in horse gram and green gram flours using crude  $\alpha$ -galactosidase from *Streptomyces griseoalbus*. **Food Chemistry**, n. 106, p. 1175–1179, 2008.
- ANTUNES, P. L. *et al.* G. J. D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, pirata-1 e rosinha-G2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 12-18, jan./abr. 1995.
- AOAC**. Official Methods of Analysis. 17 ed. Gaithersburg, Maryland, USA, AOAC International, 2000.
- AQUARONE, E. *et al.* **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1 ed. São Paulo : Edgard Blücher Ltda, 2001, v. 2.
- AW, T. L; SWANSON, B. G. Influence of tannin on *Phaseolus vulgaris* protein digestibility and quality. **J Food Sci**, v. 1, n. 50, p. 67-71, 1985.
- BALDINI, V. L. S.; DRAETTA, I. S.; YONG, K. P. Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from bean *Phaseolus vulgaris*. **J Food Sci**, v. 6, n. 50, p. 1766-1767, 1985.
- BARAMPAMA, Z; SIMARD, R. E. Oligosaccharides, antinutritional factors and protein digestibility of dry beans as affected by processing. **J Food Sci**, v. 4, n. 59, p. 833-838, 1994.
- BARAMPAMA, Z; SIMARD, R. E. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, in-vitro starch digestibility and nutritive value of common beans. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 4, n. 48, p. 349-365, 1995.
- BARROS, B.; SCARMINO, S. I.; BRUNS, E. R. Planejamento e otimização de experimentos. **Unicamp**, Campinas, p. 299, 1995.
- BLANCHARD, E. B. *et al.* A controlled evaluation of group cognitive therapy in the treatment of irritable bowel syndrome. **Behaviour Research and Therapy**, n. 45, p. 633-648, 2007.

**BRASIL.** Anvisa. Resolução - RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em : < [http://www.fooddesign.com.br/arquivos/legislacao/resolucao\\_12\\_2001\\_microbiologia\\_de\\_alimentos.pdf](http://www.fooddesign.com.br/arquivos/legislacao/resolucao_12_2001_microbiologia_de_alimentos.pdf) >. Acesso em : 25/11/2007.

BULPIN, P. V.; GIDLEY, M. J.; JEFcoat, R. Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant  $\alpha$ -galactosidase. **Carbohydr. Polym**, n. 12, p. 155-168, 1990.

CALLOWAY, D. H.; HICKEY, C. A.; MURPHY, E. L. Reduction of intestinal gas forming properties of legumes by traditional and experimental food processing methods. **Journal of Food Science**, n. 36, p. 251-255, 1971.

<sup>a</sup>CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO (CIF). **Histórico**. Disponível em: < <http://www.cifeijao.com.br/index.php?p=historico> >. Acesso em: 20/10/2007.

<sup>b</sup>CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO (CIF). **Produção**. Disponível em: < [http://www.cifeijao.com.br/downloads/p\\_producao\\_brasileira\\_de\\_feijao\\_por\\_regiao\\_-\\_2004.pdf](http://www.cifeijao.com.br/downloads/p_producao_brasileira_de_feijao_por_regiao_-_2004.pdf) >. Acesso em: 20/10/2007.

CRISTOFARO, E.; MATTU, F.; WUHRMANN, J. J. Involvement of the raffinose family of oligosaccharide in flatulence. In: SIPPLE, H. L.; MCNATT, K. W. (Eds.), **Sugars in Nutrition**. New York, Academic Press, 1974.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, Properties and Applications of Food-grade Oligosaccharides. **Trends Food Sci. Technol.**, n. 7, p. 353-361, 1996.

CUMMINGS, J. H. Fermentation in the Human Large Intestine: evidence and implications for health. **The Lancet**, n. 206, p. 1206-1209, 1983.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. A review: The Control and Consequences of Bacterial Fermentation in the Human Colon. **J. Appl. Bacteriol.**, n. 70, p. 443-459, 1991.

CUMMINGS, J. H., *et al.* Review. A New Look at Dietary Carbohydrate: physiology and health. **Eur. J. Clin. Nutr.**, n. 51, p. 417-423, 1997.

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

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **J. Appl. Bact**, n. 23, p. 130-135, 1960.

DE REZENDE, S. T.; FELIX, C. R. Production and characterization of raffinose-hydrolysing and invertase activities of *Aspergillus fumigatus*. **Folia Microbiol.**, n. 44, p. 191-195, 1999.

DE ROSSAIRT, H. de, LUQUET, F. M. *Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologique*. Lorica, 1994, v. 2.

- DESJARDINS, M. L.; ROY, D.; GOULET, J. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. **J. Dairy Sci.**, n.73, p. 299–307, 1990.
- DEY, P.M.; PRIDHAM, J. B. Biochemistry of  $\alpha$ -galactosidases. **Adv. Enzymol.**, n. 36, p. 91–130, 1972.
- DIBOFORI, A. N.; OKOH, P. N.; ONIGBINDE, A. O. (Effects of germination on the cyanide and oligosaccharide content of lima beans (*Phaseolus lunatus*). **Food Chemistry**, n. 51, p. 133–136, 1994.
- DONKOR, O. N. *et al.*  $\alpha$ -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. **Food Chemistry**, n. 104, p.10-20, 2007.
- DUBOIS, M. **Anal. Chem.**, n. 28, p. 350–356, 1956.
- FERREIRA, C. M.; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás, 2002. Embrapa-CNPAF, documentos, 135.
- FUJIMOTO, Z. *et al.* Crystal structure of rice  $\alpha$ -galactosidase complexed with D-galactose. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 20313-20318, 2003.
- GDALA, J. *et al.* The influence of  $\alpha$ -galactosidase supplementation on the ileal digestibility of lupin seed carbohydrates and dietary protein in young pigs. **Animal Feed Science Technology**, n. 67, p. 115-125, 1997.
- GOTE, M. *et al.* Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk. **Process Biochemistry**, n. 39, p. 1723-1729, 2004.
- GUIMARÃES, V. M. *et al.* Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolyses of oligosaccharides. **Phytochemistry**, n. 58, p. 63-67, 2001.
- IYER, V. *et al.* Quickcooking beans (*Phaseolus vulgaris*, L.): II. Phytates, oligosaccharides and antienzymes. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 45-52, 1980.
- JAY, J. M. Fermentação e Produtos Lácteos Fermentados. In: MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 131-149, 2005.
- JOHANSEN, H. N.; GLITSO, V.; KNUDSEN, K. E. B. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, n. 44, p. 1470–1474, 1996.
- KATARIA, A.; CHAUHAN, B. M.; PUNIA, D. Digestibility of proteins and starch *in vitro* of amphidiploids (black gram x mung bean) as affected by domestic processing and cooking. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 42, n. 2, p.117-125, 1992.

KENNEDY, I. R.; MWANDEMELE, O. D.; MCWHIRTER, K. S. Estimation of sucrose, raffinose and stachyose in soybean seeds. **Food Chemistry**, n. 17, p. 85–93, 1985.

KIM, S.; KIM, W.; HWANG I. K. Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 38, p. 337–342, 2003.

KOSSON, R. Determination of raffinose-type sugars in seeds of leguminous plants by high pressure liquid chromatography (HPLC). **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, n. 43, v. 2, p. 179–185, 1992.

KRAUSE, D. O.; EASTER, R. A.; MACKIE, R. I. Fermentation of stachyose and raffinose by hindgut bacteria of the weanling pig. **Lett. Appl. Microbiol.**, n. 18, p. 349–352, 1994.

KURIYAMA, S; MENDEL, L. B. The physiological behavior of raffinose. **J. Biol. Chem.**, n. 31, p. 125–147, 1917.

LeBLANC, J. G.; GARRO, M. S.; SAVOY DE GIORI, G. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, alpha-galactosidase activity and fermentation products. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n. 65, p.119–123, 2004.

LeBLANC, J. G. *et al.* *Lactobacillus fermentum* CRL 722 is able to deliver active  $\alpha$ -galactosidase activity in the small intestine of rats. **FEMS Microbiology Letters**, n. 248, p. 177-182, 2005.

LEE, Y. H.; JUNG, H. O.; RHEE, C.O. Solids loss with water uptake during soaking of soybeans. **Korean Journal of Food Science and Technology**, n. 19, p. 492–498, 1987.

LEVITT, M. D. *et al.* H<sub>2</sub> excretion after ingestion of complex carbohydrates. **Gastroenterology**, n. 92 p. 383–389, 1987.

LIYING, Z. *et al.* Effects of stachyose on performance, diarrhoea incidence and intestinal bacteria in weanling pigs. **Arch. Anim. Nutr.**, n. 57, p. 1 – 10, 2003.

LUSE, R. A. The Role of Grain Legume in Tropical Nutrition. **Proc. 1st African Nutrition Congress**, 1975.

MACHAIAH, J. P.; Pednekar, M. D. Carbohydrate composition of low dose radiation-processed legumes and reduction in flatulence factors. **Food Chemistry**, n. 79, p. 293–301, 2002.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans overview of their nutritional profiles and health effects. **Am J Clin Nutr.**, n. 70, p. 439–450,1999.

MUZQUIZ, M. *et al.* The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus Vulgaris*: environmental and varietal differences. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.**, v. 4, n. 3, p. 210–216, 1999.

NACZK, M *et al.* Condensed tannins in canola hulls. **J Agric Food Chem**, v. 10, n. 42, p. 2196-2200, 1994.

OBOH, H. A. Anti-nutritional constituents of six underutilized legumes grown in Nigéria. **Journal of Chromatography A**, n. 823, p. 307–312, 1998.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* A eliminação da água não absorvida durante a maceração do feijão-comum aumentou o ganho de peso em ratos. **Ver. Nutr.**, v. 2, n. 14, p. 153-155, 2001.

OLIVEIRA, A. C. de *et al.* O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiase e verbascose. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 3, n. 51, 2001.

ONYENEKWE, P. C.; NJOKU, G. C.; AMEH, D. A. Effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) processing methods on flatus causing oligosaccharides. **Nutrition Research**, v. 20, n. 3, p. 349-358, 2000.

PETTERSON, D. S.; MAKINTOSH, J. B. The Chemical Composition and Nutritive Value of Australian Grain Legumes, Grains Research and Corporation, Brisbane, Australia, pp. 10–13, 38–41. 1994.

PEYRIN-BIROULET, L.; BIGARD, M.-A. Gas digestifs (digestive gas). **EMC-Hépatogastroentérologie**, v. 2, p. 370-387, 2005.

PLAYNE, M. J.; CRITTENDEN, R. Commercially available Oligosaccharides. **Bull. Int. Dairy Fed.**, n. 313, p. 10-22, 1996.

PRICE, K. R. *et al.* Flatulence— causes, relation to diet and remedies. **Die Nahrung**, n. 32, p. 609–626, 1988.

ROY, D.; CHEVALIER, P.; SAVOIE, L. Sugars fermented by *Bifidobacterium infantis* ATCC27920 in relation to growth and a-galactosidase activity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n.34, p. 653–655, 1991.

SÁNCHEZ-MATA, M. *et al.* Determination of mono-, di-, and oligosaccharides in legumes by high-performance liquid chromatography using an amino-bonded silica column. **J Agric Food Chem**, v. 9, n. 46, p. 3648-3652, 1998.

SAT, I. G.; KELES, F. The effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of seker a dry bean variety (*P. vulgaris, L*) grown in Turkey. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 206-208, 2002.

SCALABRINI, P. *et al.* Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, n. 39, p. 213–219, 1998.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo, Varela, p.184-229, 1996.

- SHIBUYA, H. Purification and some properties of  $\alpha$ -galactosidases from *Penicillium purpurogenum*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, n. 59, p. 2333-2335, 1995.
- SILVA, H. C.; BRAGA, G. L. Effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of dry beans (*P. vulgaris*). **J. Food Sci.**, n. 47, p. 924-925, 1982.
- SILVA, H. C. *et al.*. Oligossacarídeos da família da rafinose e flatulência. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v. 4, p.48-60, 1992.
- SINGH, U. Antinutritional factors of chick pea and pigeonpea and their removal by processing. **Plant Foods Hum Nutr**, n. 38, p. 251-61, p. 1988.
- SLOMINSKI, B. A. Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial preparations of alpha-galactosidase and beta-fructofuranose: potential for use as dietary additives. **J. Sci. Food Agricult.**, n. 65, p. 323-330, 1994.
- SOMIARI, R. I., BALOGH, E. Effect of soaking, cooking and crude alpha-galactosidase treatment on the oligosaccharide content of cowpea flours. **J. Sci. Food Agric.**, n. 61, p. 339-343, 1993.
- STAMER, J. R. Lactic acid bacteria. In FOOD MICROBIOLOGY. **Public health and spoilage aspects**. Westport, CT: AVI, , p. 404-426, 1976.
- SUAREZ, F. *et al.* Insights into human colonic physiology obtained from the study of flatus composition. **Am J Physiol**, n. 272, p. 1028-1033, 1997.
- SUAREZ, F. L.; SPRINGFIELD, J.; LEVITT, M. D. Identification of gases responsible for the odour of human flatus and evaluation of a device purported to reduce this odour. **Gut**, n. 43, p. 100-104, 1998.
- THIPPESWAMY, S.; MULIMANI, V. H. Enzymatic degradation of Raffinose family oligo-saccharides in soyamilk by immobilized  $\alpha$ -galactosidase from *Gibberella fujikuroi*. **Process Biochem**, n. 38, p. 635-640, 2002.
- TOMLIN, J.; LOWIS, C.; READ, N. W. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. **Gut**, n. 32, p. 665-669, 1991.
- TORRE, M; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 1991.
- TSANGALIS, D; SHAH, N. P. Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soymilk by probiotic bifidobacteria. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 39, p. 1-14, 2004.
- ULEZLO, I. V; ZAPROMETAVA, O. M. Microbial  $\alpha$ -galactosidase (a review). **Appl Biochem Microbiol.**, n. 18, p. 1-12, 1982.
- VIDAL-VALVERDE, C.; FRIAS, J.; VALVERDE, S. Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, n. 93, n. 5, p. 547-550, 1993.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. **IBP (Int. Biol. Prog.)**, n. 15, p. 54-58,1970.

WALD, A. Irritable bowel syndrome. **Curr Treat Options Gastroenterol.**, n. 2, p. 13-19, 1999.

WANG, Y-C. *et al.* Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 20, p. 333–338, 2003.

WIKIPEDIA: a enciclopédia livre. Disponível em: < <http://pt.wikipedia.org/wiki/Feij%C3%A3o> >. Acesso em: 25/10/2007.

ZHOU, J. R.; ERDMAN. J. W. Breadmaking properties of composite flours of wheat and faba beanprotein preparations. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 6, n. 35, p. 495-508, 1995.



## APÊNDICE

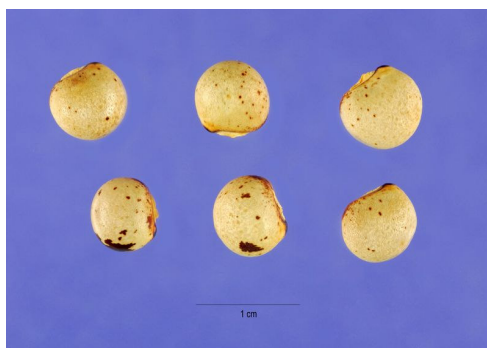
## TIPOS DE FEIJÃO CULTIVADOS NO BRASIL



Feijão comum  
(*Phaseolus vulgaris*)



Feijão-de-corda  
(*Vigna unguiculata*)



Feijão-guandu  
(*Cajanus cajan*)

Fonte: WIKIPEDIA (2007).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)