



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DAFNE GARCIA PEREIRA

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS
PROTEÍNAS DO OKARA E AVALIAÇÃO DOS
HIDROLISADOS OBTIDOS EM DIFERENTES GRAUS DE
HIDRÓLISE**

Londrina
2016

DAFNE GARCIA PEREIRA

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS
PROTEÍNAS DO OKARA E AVALIAÇÃO DOS
HIDROLISADOS OBTIDOS EM DIFERENTES GRAUS DE
HIDRÓLISE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Louise Emy Kurozawa.
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Elza Louko Ida.

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P436o Pereira, Dafne Garcia.

Otimização da hidrólise enzimática das proteínas do okara e avaliação dos hidrolisados obtidos em diferentes graus de hidrólise / Dafne Garcia Pereira. - Londrina, 2016.
89 f.: il.

Orientador: Louise Emy Kurozawa.

Coorientador: Elza Iouko Ida.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.

Inclui bibliografia.

1 Soja - Produtos - Teses. 2. Hidrolisados de proteína - Teses. 3. Antioxidante - Teses. 4. Hidrólise - Teses. I. Kurozawa, Louise Emy. II. Ida, Elza Iouko. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 664.6/.7

DAFNE GARCIA PEREIRA

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO
OKARA E AVALIAÇÃO DOS HIDROLISADOS OBTIDOS EM
DIFERENTES GRAUS DE HIDRÓLISE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Louise Emy Kurozawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Elza louko Ida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Sandra Regina Georgetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Thais de Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de setembro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais Adoica e José Carlos, ao meu irmão Mateus e ao meu namorado Matheus por todo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por abençoara minha vida e por permitir que eu alcance essa conquista.

A minha orientadora professora Dr^aLouise EmyKurozawa pela orientação, ensinamentos, esclarecimentos, sugestões, atenção, compreensão, paciência e amizade.

A minha co-orientadora Dr^a. Elza Lokolda, pela atenção, por todos os ensinamentos e por sempre estar disponível.

A professora Dr^a. Thaís de Souza Rocha, pela atenção, auxílio, ensinamentos e colaboração na realização da eletroforese.

Ao professor Dr. Fábio Yamashita, pelo ensinamento e colaboração na realização da análise estatística.

A professora Dr^a. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira e a aluna Natália Harumi Niguma pelo auxílio e doação das cepas de bactérias usadas neste trabalho.

A professora Dr^a Wilma Aparecida Spinosa pela atenção, disposição e amizade.

Ao departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por todo auxílio.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa.

A empresa COCAMAR, pela doação do okara.

A empresa Tovani Benzaquen, pela doação das enzimas

Aos meus pais Adoica e José Carlos e meu irmão Mateus que mesmo distantes, se fazem presentes, pelo amor, carinho e por sempre me apoiar e incentivaram em todas as minhas escolhas.

Ao meu namorado Matheus, por todo o amor, apoio, compreensão e por sempre ter acreditado em mim.

A minha “irmã científica” Ariana Justus, pela paciência, compreensão, amizade e por todo o auxílio na realização das análises de atividade antimicrobiana e da “saga” de eletroforese.

A minha outra “irmã científica” Bruna Raquel Bögere a “vizinha científica” Talita Kato, por sempre estarem disponíveis a tirar minhas dúvidas, pela amizade e por todo o auxílio neste trabalho.

As meninas que me acompanham desde o PET e aos novos amigos que fiz no laboratório pelo auxílio, e momentos de descontração.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

PEREIRA, Dafne Garcia. **Otimização da hidrólise enzimática das proteínas do okara e avaliação dos hidrolisados obtidos em diferentes graus de hidrólise.** 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A soja possui grande destaque para o mercado alimentício devido ao seu alto valor nutricional. Dentre os seus componentes, tem-se as isoflavonas, fosfolipídios, vitaminas, fibras e as proteínas, com comprovada ação benéfica para a saúde humana. Na elaboração do extrato aquoso de soja e do tofu, após a etapa de extração dos compostos solúveis em água, ocorre a formação de um resíduo insolúvel denominado okara. Este resíduo possui quantidades substanciais de proteínas, fibras e óleo, sendo pouco aproveitado como alimento ou sub-utilizado como ração animal. Assim, há um grande desperdício de nutrientes, pois o okara apresenta um grande potencial para ser utilizado. Uma alternativa para o aproveitamento deste sub-produto seria a concentração e a hidrólise enzimática das proteínas para a obtenção de hidrolisados proteicos. Estes são fragmentos específicos de proteína de tamanhos variados, que possuem propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a hidrólise das proteínas concentradas do okara pela ação combinada de duas proteases comerciais, a endopeptidase Alcalase e a exopeptidase Flavourzyme, e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos hidrolisados obtidos em diferentes graus de hidrólise. Primeiramente, as proteínas do okara foram extraídas e concentradas por precipitação isoelétrica. Para a etapa de otimização da hidrólise enzimática, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), de modo a verificar o efeito da temperatura, pH, razão enzima:substrato e razão Alcalase:Flavourzyme sobre o grau de hidrólise. Nas condições ótimas, foram obtidos hidrolisados em diferentes graus de hidrólise (GH, 6, 12, 18, 22 e 24%) e uma amostra controle não-hidrolisada GH 0%. A eletroforese confirmou a hidrólise proteica, pelo aparecimento de bandas difusas e menores que 26 kDa. Pelo perfil de aminoácidos totais, as amostras com GH 22 e 24% apresentaram um bom escore de todos os aminoácidos essenciais. As amostras hidrolisadas também apresentaram 2,3 e 2,7 vezes maior atividade na eliminação de radicais ABTS e poder antioxidante na redução do íon férrico FRAP, respectivamente, do que a proteína intacta. Entretanto, No entanto, todas as amostras não apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella*. Como conclusão, foi possível otimizar a hidrólise enzimática, na qual a melhor condição para se obter maior GH foi temperatura de 40°C, razão enzima:substrato de 5%, pH 7,1 e razão das enzimas Alcalase/Flavourzyme de 90/10 (%/%). No presente trabalho, foi possível obter hidrolisados com elevada atividade antioxidante, baixo peso molecular e boa qualidade nutricional na composição total de aminoácidos. Assim, uma possível aplicação desses hidrolisados deve estar relacionada com a sua boa atividade antioxidante.

Palavras-chave: Clivagem proteica. Alcalase. Flavourzym. Atividade antioxidante. FRAP.

PEREIRA, DAFNE GARCIA. **Optimization of enzymatic hydrolysis of okara's protein hydrolysates and evaluation of different degrees of hydrolysis.** 2016. 89 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Soybean has significant importance on the food industry due to its high nutritional value. Among its components, isoflavones, phospholipids, vitamins, fiber and protein have beneficial effects on human health. During the preparation of the soymilk and tofu, there is formation of an insoluble residue called okara. This residue has substantial quantities of protein, fiber and oil with little use as food or under-utilized as animal feed. Thus there is a significant waste of valuable nutrients, since the okara has great potential for use. An alternative to the use of this by-product is the concentration and enzymatic hydrolysis to obtain protein hydrolysates. These are specific protein fragments of several sizes, which antioxidant and/or antimicrobial properties. In this way, the objective of this work was to optimize the enzymatic hydrolysis of protein concentrate of the okara by action of combination of two commercial proteases: endopeptidase Alcalase and exopeptidase Flavourzyme, and evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of the hydrolysates with several degrees of hydrolysis. First, proteins were extracted from okara and concentrated by isoelectric precipitation. For the optimization of enzymatic hydrolysis process, a central composite rotatable design (CCRD) was carried out in order to verify the effect of temperature, pH, enzyme:substrate ratio and Alcalase:Flavourzyme ratio on the degree of hydrolysis. Under the optimum conditions, five protein hydrolysates with different degrees of hydrolysis (DH, 6, 12, 18, 22 and 24%) and non-hydrolyzed control sample DH 0% were obtained and evaluated. The electrophoretic profiles confirmed the protein hydrolysis, by the appearance of diffuse bands with molecular weight lower than 26 kDa. For total amino acid profile, samples with DH 22 and 24% had a good score of all essential amino acids. Hydrolyzed samples had 2.3 and 2.7-fold higher ABTS radical scavenging activity and ferric reduction antioxidant power FRAP, respectively, than the intact protein. However, all samples did not show antimicrobial activity against bacteria *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella*. As conclusion, the enzymatic hydrolysis of okara proteins was optimized in which the best condition for greater DH was 40°C, enzyme:substrate ratio of 5% , pH of 7.1 and Alcalase/Flavourzyme ratio of 90/10 (%/%). In the current work, protein hydrolysates with high antioxidant activity, low molecular weight and good nutritional quality with respect to total amino acid composition were obtained. Thus, a possible application of these hydrolysates could be related to their good antioxidant activity.

Keywords: Protein cleavage. Alcalase. Flavourzyme. Antioxidant activity. FRAP.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO A

- Figura 1** – Cinética das hidrólises enzimáticas das proteínas do okara: (a) ensaios fatoriais 1 a 8, referentes ao bloco1; (b) ensaios fatoriais 9 a 18, referentes ao bloco 1; (c) ensaios axiais 19 a 28, referentes ao bloco 2; (d) ensaios 29 a 32, referentes ao bloco 3.....52
- Figura 2** – Efeito da temperatura (T), razão enzima:substrato (E/S), pH e razão Alcalase:Flavourzyme (A/F) sobre o grau de hidrólise (GH).....55
- Figura 3** – Parâmetro de desejabilidade estimado na condição de máximo grau de hidrólise (GH).....57
- Figura 4** – Eletroforese em gel de SDS-PAGE Tris-HCl para a amostra de okara concentrado (Conc.) e em SDS-PAGE Tris-Tricina para a amostra de hidrolisado com 22% de grau de hidrólise60
- Figura 5** – Resultado das placas com o teste da atividade antimicrobiana do hidrolisado e concentrado proteicos do okara. As letras nas imagens se referem a qual microorganismo/amostra que foram testados, sendo: (a) - *E. coli*/concentrado proteico de okara (CONC); (b) -*E. coli*/Hidrolisado; (c) -*S. aureus*/CONC; (d) - *S.aureus*/Hidrolisado (e)– *Salmonella*/CONC; (f)– *Salmonella*/Hidrolisado.....64

ARTIGO B

- Figura 1** – Cinética da hidrólise enzimática do hidrolisado com grau de hidrólise de 24%78
- Figura 2** – Eletroforese em gel de SDS-PAGE Tris-HCl para a amostra com grau de hidrólise (GH) de 0%, e em SDS-PAGE Tris-Tricina para as amostras com GH 6,12,18 e 24%80
- Figura 3** – Resultado das placas com o teste da atividade antimicrobiana do hidrolisado com GH 24%. As letras nas imagens se referem ao microorganismo, sendo: (a) - *E. coli* (b) - *S. aureus* (c) – *Salmonella*.....84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento composto central rotacional para a hidrólise enzimática das proteínas do okara, variáveis independentes reais e codificados	26
--	----

ARTIGO A

Tabela 1 – Delineamento compostos central rotacional para a hidrólise enzimática das proteínas do okara, variáveis independentes reais e codificados e a função resposta grau de hidrólise (GH).....	45
Tabela 2 – Composição centesimal do okara seco e desengordurado e concentrado proteico liofilizado.....	50
Tabela 3 – Coeficientes das variáveis independentes sobre o grau de hidrólise (GH).....	54
Tabela 4 – Composição total de aminoácidos no hidrolisado protéico	61
Tabela 5 – Atividade antioxidante do concentrado e hidrolisado proteico de okara (grau de hidrólise 22%) pelos métodos de ABTS e FRAP	63

ARTIGO B

Tabela 1 – Teores de umidade e proteínas das amostras em diferentes graus de hidrólise (GH).....	79
Tabela 2 – Atividade antioxidante pelos métodos de ABTS e FRAP.....	81
Tabela 3 – Composição total de aminoácidos no hidrolisado protéico	83

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	OBJETIVO GERAL	14
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3.	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1.	SOJA	15
3.1.1.	PROTEÍNAS DA SOJA.....	16
3.2.	OKARA	17
3.3.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PROTEICA	18
3.4.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	21
3.5.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1.	MATERIAL	23
4.2.	MÉTODOS	23
4.2.1.	Caracterização do Okara.....	23
4.2.2.	Pré-tratamento, Extração e Concentração das Proteínas do Okara.....	23
4.2.3.	Hidrólise Enzimática do Concentrado Proteico do Okara	24
4.2.3.1.	Planejamento Experimental.....	25
4.2.3.2.	Grau de Hidrólise.....	27
4.2.4.	Avaliação do Hidrolisado Proteico Obtido na Condição Otimizada	28
4.2.4.1.	Perfil Eletroforético	29
4.2.4.2.	Determinação da Atividade Antioxidante Utilizando o Radical ABTS	29
4.2.4.3.	Determinação da Atividade Antioxidante Utilizando FRAP – Método de Redução do Ferro.....	30
4.2.4.4.	Conteúdo de Aminoácidos totais	31
4.2.4.5.	Determinação da atividade antimicrobiana por difusão por cavidade em ágar	31
4.2.4.6.	Análise estatística.....	32

REFERÊNCIAS.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. ARTIGO CIENTÍFICO A: OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEINAS DO OKARA PELA AÇÃO DA MISTURA DE ENZIMAS COM ESPECIFICIDADES DISTINTAS.....	40
5.2. ARTIGO CIENTÍFICO B: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADOS PROTEICOS DO OKARA COM DIFERENTES GRAUS DE HIDRÓLISE	70
6. CONCLUSÃO	89

1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes vêm mostrando a importância do suprimento de novas matérias-primas para as indústrias alimentícias, visando à produção de alimentos com alto valor nutricional e/ou funcionais. Desta forma, novos produtos a partir de resíduos industriais vêm sendo desenvolvidos e utilizados em substituição a outros ingredientes, por proporcionar ao setor agregação de valor ao produto, aproveitamento de nutrientes e diminuição de gastos com o tratamento destes resíduos (BARBOSA et al. 2011).

A soja possui grande destaque para o mercado alimentício devido ao seu alto valor nutricional, pois, dentre os seus componentes, tem-se as isoflavonas, fosfolipídios, vitaminas, fibras e proteínas, com comprovada ação benéfica para a saúde humana. O consumo de soja e de seus derivados contribui para uma melhoria na qualidade de vida, por reduzir o colesterol e os riscos de doenças crônicas degenerativas e alguns tipos de câncer (BOWLES e DEMIATE, 2006). A soja apresenta um bom perfil e uma boa qualidade nutricional, é rica em aminoácidos variados, sendo deficiente em apenas dois aminoácidos sulfurados, a metionina e cistina (TASHIMA e CARDELLO, 2003). Por isso, é importante o estudo de alternativas para introduzir os benefícios da soja na alimentação humana, seja como um ingrediente, aditivo, ou como componente de uma mistura em um sistema alimentar em que a soja poderá repassar seus benefícios.

O okara é um resíduo do processamento do extrato de soja e do tofu. Quantidades substanciais dos nutrientes da soja ficam retidas no okara, sendo, até 20% das proteínas e 11% do óleo presentes inicialmente nos grãos de soja. Também, há uma quantidade significativa de resíduo gerado, uma vez que, com 1 kg de grãos de soja, é possível obter até 1,1 kg de okara úmido (O'TOOLE, 1999). Apesar de seu baixo valor de mercado, o okara tem alto valor nutritivo, por ser rico em fibras (10-12%), lipídios (17%), carboidratos (25,2-30,0%) e proteínas (27-38%), sendo estas com um ótimo perfil de aminoácidos essenciais e alta digestibilidade *in vitro*. Mesmo com todas essas qualidades nutricionais, na maioria das vezes o okara é sub-utilizado na formulação de ração animal (DANELUZ, 2009). Pesquisas demonstram que sua elevada qualidade nutricional torna possível sua aplicação na

nutrição humana, visando enriquecer a formulação de produtos alimentícios (CHAN; MA, 1999; SHIMIZU, 2002; BOWLES; DEMIATE, 2006).

A concentração de proteínas envolve várias operações unitárias, como extração, precipitação isoeletrica ou de sais, termocoagulação e ultra filtração. Devido às diversas etapas empregadas, é possível que algumas proteínas do extrato bruto sejam perdidas. Mesmo considerando essas perdas, os concentrados proteicos possuem diversas aplicações na indústria de alimentos (DAMODARAM, 2010). Além disso, a partir do concentrado proteico, pode-se realizar o processo de hidrólise enzimática das proteínas, que consiste na clivagem das ligações peptídicas, liberando assim uma mistura de polipeptídios de pesos moleculares variados, e com isso podem melhorar as propriedades funcionais dessas proteínas (DAMODARAM, 2010).

Alguns estudos verificaram como a extração prévia das proteínas de um sistema alimentício favoreceu sua hidrólise. Sbroggio et al. (2016) e Figueiredo (2015) estudaram o processo de hidrólise enzimática com a protease Alcalase no okara bruto e no concentrado proteico obtido dele, respectivamente. Valores semelhantes no grau de hidrólise (GH) foram obtidos em ambos os trabalhos nas mesmas condições de temperatura e pH, sendo 35,5% para o concentrado proteico e 33,6% para o okara bruto. Entretanto, para o concentrado proteico foi utilizada uma menor concentração de enzima (5,0%) do que a usada na hidrólise do okara bruto (10%). Estes resultados demonstram que provavelmente tipo de matriz pode influenciar na reação enzimática. Como reportado por Preece et al. (2014), quantidade significativa de proteínas do okara está localizada no interior das células vegetais, limitando o acesso da enzima. Desta forma, é preferível previamente realizar as etapas de extração e concentração das proteínas antes da hidrólise.

O controle das condições de hidrólise enzimática (temperatura, pH, tempo e concentração de substrato) e a escolha adequada da enzima e sua concentração, permitem a obtenção de produtos com características desejadas a uma dada aplicação na formulação de alimentos. É importante conhecer quais destes fatores são críticos, uma vez que a otimização dos parâmetros de processo de hidrólise enzimática é essencial para o desenvolvimento de um processo ótimo e econômico (ADLER-NISSEN, 1985). As enzimas proteolíticas podem ser provenientes de diferentes fontes, como animal, vegetal e microbiana, sendo as

enzimas microbianas de maior interesse para a produção de hidrolisados, uma vez que os métodos para a sua obtenção já estão bem estabelecidos e em escala industrial (CORRÊIA, 2013).

Os hidrolisados proteicos têm diversas aplicações na indústria de alimentos. Podem ser usados em alimentos especiais para fins geriátricos e infantis, por serem mais disponíveis biologicamente para serem absorvidos, ou em suplementos e bebidas para alimentação esportiva. Também possuem melhores propriedades funcionais como emulsificação e formação de espumas se comparados com a proteína intacta (DAMODARAM, 2010). Os hidrolisados também podem exercer atividade antioxidante e antimicrobiana. Diferentes tipos de fontes proteicas estão sendo estudadas para a obtenção de hidrolisados, como leite ovino (CORRÊIA, 2013), soja (ZHANG et al. 2010), carne de frango (KUROZAWA et al. 2008), dentre outras, porém, o potencial das proteínas do okara para a obtenção de hidrolisados ainda não foi investigado.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar a hidrólise das proteínas extraídas e concentradas do okara pela ação combinada de duas proteases comerciais, a endopeptidase Alcalase® e a exopeptidase Flavourzyme®, e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos hidrolisados obtidos em diferentes graus de hidrólise.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição centesimal do okara seco e desengordurado;
- Obter o concentrado proteico do okara e caracterizá-lo quanto à composição centesimal e perfil de eletroforese das proteínas;
- Realizar um planejamento experimental para obter um modelo matemático preditivo do grau de hidrólise em função da temperatura, pH, razão enzima:substrato e razão das enzimas Alcalase:Flavourzyme sobre o grau de hidrólise;
- Otimizar a hidrólise enzimática através da função desejabilidade para obtenção de maior grau de hidrólise;
- Caracterizar quanto ao teor de umidade, proteínas e perfil de eletroforese das proteínas dos hidrolisados com diferentes graus de hidrólise;
- Avaliar os hidrolisados obtidos em diferentes graus de hidrólise quanto a sua atividade antioxidante pelos métodos de FRAP e ABTS, atividade antimicrobiana e conteúdo de aminoácidos totais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. SOJA

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa conhecida e cultivada pelos chineses há cerca de cinco mil anos, sendo que nos Estados Unidos começou a ser cultivada apenas no século XX (CALLOU, 2009). Nas últimas décadas, a produção de soja no mundo é uma das atividades econômicas que mais tem crescido. Tal fato se deve ao desenvolvimento e estruturação de um sólido mercado da soja no Brasil e internacionalmente, por ser uma importante fonte de proteína vegetal e pela geração de novas tecnologias para a exploração dos grãos (HIRAKURI; LAZZAROTO; 2011). Segundo dados da safra de 2014/2015, a produção mundial de soja foi de 317.253 milhões de toneladas. Os Estados Unidos são os maiores produtores de soja em grãos, com uma produção de 108.014 milhões de toneladas e o Brasil segue em segundo lugar com uma produção de 95.070 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2016).

A composição química da soja apresenta componentes importantes como proteínas, carboidratos, lipídios, minerais e vitaminas. Destacam-se as proteínas da soja que, entre as do reino vegetal, têm um melhor balanço de aminoácidos essenciais, possuindo qualidade comparável às proteínas de origem animal (PEREIRA et al., 2009). A soja e os seus derivados vêm sendo amplamente estudados, uma vez que suas proteínas exercem ação moduladora em determinados mecanismos fisiológicos, e devido às suas propriedades funcionais desejadas pela indústria de alimentos (CIABOTTI et al., 2006). No Brasil, o consumo de grãos de soja está fortemente associado a essa manutenção da boa saúde e a redução do risco de doenças. Esse consumo é principalmente devido às isoflavonas, por possuírem propriedades biológicas consideradas benéficas (FANTE et al. 2011). Desta forma, é altamente recomendável a inclusão de soja, assim como também a de seus derivados, na dieta (JÚNIOR et al., 2006).

O valor comercial dos grãos de soja pode ser determinado por seu conteúdo de proteínas e óleo. Por exemplo, o farelo de soja pode ser classificado em três categorias de acordo com seu conteúdo de proteína: HyPro (alto conteúdo de proteínas, >48%), normal (46%) e LowPro (baixo conteúdo de proteínas,

<43,5%). Para ser considerada como normal e HyPro, a soja deve conter acima de 41,5 e 43% de proteína nos grãos, respectivamente, com base na matéria seca (MORAES et. al. 2006).

3.1.1. PROTEÍNAS DA SOJA

A palavra proteína vem da palavra grega *protos* que significa “a primeira” ou “a mais importante”. As proteínas são as macromoléculas mais abundantes das células, ocorrem em diferentes pesos moleculares sendo desde peptídeos, que são relativamente pequenos em peso molecular até polímeros que podem possuir pesos moleculares na faixa de milhões Da. Toda proteína é formada por uma diferente combinação ou sequência de aminoácidos ligados covalentemente. Existem ao todo apenas 21 aminoácidos diferentes, que são formados por um grupo carboxila e um amino, ligados ao mesmo átomo de carbono. O que os difere é a cadeia lateral, ou genericamente chamadas de grupo R, que variam em estrutura, tamanho, carga elétrica e solubilidade em água. O resultado das diversas combinações de aminoácidos são produtos com atividades totalmente diferentes como enzimas, hormônios, anticorpos, transportadores, músculos, entre outras (LEHNINGER, 1995).

A composição das proteínas da soja pode variar de acordo com fatores genéticos, condições climáticas, tipos de solo, entre outros. As proteínas presentes nos grãos se encontram armazenadas principalmente no corpo proteico do cotilédone (MARTINEZ et al., 2011). Grãos de variedades cultivadas de soja contêm aproximadamente 40% de proteína e 20% de óleo em base seca. Glicinina e β -conglucina, lipoxigenases, inibidor de tripsina Kunitz, inibidores de protease de baixo peso molecular, lecitina e urease são as proteínas presentes em maior quantidade nos grãos de soja (MORAES et al. 2006).

Em dissolução em água com pH ligeiramente alcalino e posterior ultra centrifugação, as proteínas da soja são separadas em quatro frações, cujos coeficientes de sedimentação S (unidades Svedberg, a 20 °C em água) são 2, 7, 11 e 15S (BADLEY et al., 1975). A primeira fração 2S corresponde a 22% das proteínas extraídas em água e é composta principalmente pelos inibidores de tripsina. A segunda fração de sedimentação é a fração 7S que corresponde a 37% das

proteínas extraídas em água e contém hemaglutininas, lipoxigenases, β -amilase e globulinas 7S, também denominada de β -conglucina. Esta fração é considerada uma proteína glicosilada trimérica, contendo três subunidades diferentes, α , α' e β , com massa molar de 62, 65 e 47 kDa, respectivamente. A terceira fração é a 11S, que são 31% das proteínas extraídas em água e é composta unicamente pela globulina 11S ou glicinina, que é um hexâmero de monômeros composto por polipeptídeos ácidos e básicos de massas molares de 36 a 40 kDa e de 18-20 kDa, respectivamente (RENKEMA et al., 2002; SINGH; MOHAMED, 2007). A quarta e última fração é a 15S, correspondente a 11% das proteínas extraídas em água, e apresenta-se como dímero de glicinina estável a força iônica superior a 0,5 M (WOLF, NELSEN; 1996).

Quando se considera a porcentagem de cada aminoácido na proteína da soja e os diferentes teores de proteínas nas cultivares de grãos de soja, há uma significativa diferença na composição dos aminoácidos, como foi observado por Moraes et al. (2006) ao estudar duas linhagens melhoradas de soja. Os autores observaram que houve alteração na proporção de todos os aminoácidos, exceto para glicina, alanina, metionina, cisteína e tirosina. Considerando que metionina e cisteína são aminoácidos limitantes na proteína da soja, os autores concluíram que não houve redução do valor nutricional em relação a esses aminoácidos nas linhagens estudadas.

3.2. OKARA

O extrato de soja é considerado um dos derivados da soja mais conhecidos. Obtido a partir da extração aquosa da soja, este produto é ideal para os indivíduos que tenham intolerância ou restrição a lactose e é também indicado em dietas com ingestão de colesterol reduzido. O okara, que é o subproduto do processamento do extrato de soja, tem grande potencial para a utilização nos alimentos. Porém, ainda é pouco utilizado nas indústrias alimentícias. Durante a produção do extrato de soja, somente 3 a 5% da matéria seca são lixiviadas para o extrato de soja, ou seja, aproximadamente 95% dos sólidos do grão de soja permanecem no okara. Com isto, pode-se afirmar que as maiores porcentagens de nutrientes da soja apresentam-se no okara, sendo um indicativo do alto valor deste

subproduto (PERUSSELLO, 2008). Além disso, Jackson et al. (2001) concluíram que aproximadamente um terço do conteúdo de isoflavonas da soja fica retido no okara, apresentando desta forma um grande potencial para ser utilizado como fonte deste nutrientes.

O okara tem baixo valor de mercado e alto valor nutritivo, por ser rico em proteínas com ótimo perfil de aminoácidos essenciais e alta digestibilidade *in vitro*. Mesmo com todas essas qualidades nutricionais, na maioria das vezes o okara é sub-utilizado na formulação de ração animal (DANELUZ, 2009). Segundo Larosa et al. (2006), com o processamento de 1 kg do grão de soja, obtém-se de 6 a 9 litros de extrato de soja e cerca de 700 g do subproduto okara seco. Já Cantuária et al. (2008) cita em seu trabalho que, em média, cada 1 kg de soja em grãos gera 0,6 kg de okara seco.

Devido ao elevado conteúdo de fibras e proteínas, o okara pode ser aplicado em áreas como na panificação na produção de pães, biscoitos e bolos, e na área de carnes, sendo uma alternativa saudável e de baixo custo para aumentar o rendimento dos alimentos e também a sua qualidade nutricional (LAROSA et al., 2006). Yoshida et al (2014) testaram diferentes proporções de okara na produção de um biscoito tipo *cookies*. O okara também foi utilizado na produção de pães do tipo francês, pães de queijo e hambúrgueres (BOWLES; DEMIATE, 2006; APLEVICZ, DEMIATE, 2007; SANTOS; MIGUEL; LOBATO, 2010).

3.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PROTEICA

A hidrólise de proteínas consiste na clivagem química ou enzimática de moléculas de proteínas em polipeptídeos de tamanhos diversos e, eventualmente, em aminoácidos livres. As hidrólises químicas, ácida ou alcalina, possuem como desvantagens: o difícil controle durante o processo; os produtos formados pela hidrólise são inespecíficos; e pode ocorrer a perda de valor nutricional, por destruir aminoácidos como triptofano, lisina e treonina (CLEMENTE, 2000; ADLER-NISSEN, 1985). O procedimento mais utilizado para a hidrólise de proteínas é o método enzimático, na qual as enzimas proteolíticas podem ser endógenas ou exógenas, tendo um enorme campo de aplicação na geração de produtos de alto valor nutritivo e funcional (DÍAZ, 2011). A hidrólise enzimática é

mais indicada que os métodos químicos para a produção de hidrolisados com aplicações nutricionais. A adição de enzimas, ao invés de reagentes químicos, oferece muitas vantagens por permitir o controle do processo, melhorando assim as propriedades do produto final. Além disso, o processo de hidrólise enzimática é eficiente e envolve condições alcalinas moderadas que não destroem as proteínas (SCHMIDT, SALAS-MELLAD, 2009).

O controle das condições durante a hidrólise enzimática, como temperatura, pH, tempo, concentração de substrato e enzima, e a escolha adequada da enzima são fatores importantes a serem estudados para a obtenção de resultados desejáveis (ADLER-NISSEN, 1985). As proteases podem ter duas principais atividades, sendo as endopeptidases, tais como a Tripsina, Quimotripsina, Pepsina e Alcalase, e as exopeptidases, tais como a Carboxipeptidase, Aminopeptidase, Dipeptidases, Tripeptidases e Flavourzyme. O que diferencia essas enzimas é o seu sítio de ação no substrato, sendo que as endopeptidases clivam as ligações peptídicas que estão mais distantes do grupo terminal das proteínas, e as exopeptidases agem ao contrário, clivando ligações peptídicas que estão mais próximas dos grupamentos amino ou carboxi terminais das proteínas (RAO et al., 1998).

A protease Alcalase é uma das enzimas mais utilizadas comercialmente e é produzida por fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformise*. Esta enzima é uma endopeptidase, que possui ação catalítica nas regiões internas das cadeias polipeptídicas. Dependendo da extensão da hidrólise, a tendência dessa enzima é produzir hidrolisados de menor peso molecular. Tal enzima possui atividade entre pH 6,5 e 8,5 e uma temperatura ótima entre 55 e 70°C. Já a Flavourzyme contém ambas as atividades, mas predomina-se a atividade de exoprotease, possuindo ação sobre as ligações peptídicas nas extremidades das cadeias polipeptídicas, no N ou C terminal. Essa enzima produz hidrolisados com alto peso molecular e também aminoácidos livres. É uma protease fúngica produzida pela fermentação submersa de uma linhagem selecionada de *Aspergillus oryzae* que não foi geneticamente modificado, atuando na hidrólise sob condições neutras ou ligeiramente ácidas. (SCHMIDT, SALAS-MELLAD, 2009; SILVA-LÓPEZ, 2010; GILMARTIN, JERVIS, 2002).

A extensão da hidrólise pode ser quantificada pelo grau de hidrólise, definido como sendo o número de cadeias de hidrolisados ou de grupos α -amino livres formados durante a clivagem das cadeias. O grau de hidrólise é a medida da quebra da proteína e é a relação entre o número de ligações peptídicas clivadas e o número total das ligações da proteína intacta. Existem vários métodos para quantificar o grau de hidrólise, tais como a medida de solubilidade em ácido tricloroacético (TCA), determinação do nitrogênio amino através da titulação com formaldeído, reação com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e pH-statou método de titulação de grupos α -amino liberados em pH e temperatura constantes, pois quando uma ligação peptídica é hidrolisada a pH superior a 6,5, o grupo carboxi terminal formado contribui para o abaixamento do pH. O consumo de base (medido por titulação contínua) necessário para manter o pH constante ao longo da reação, é utilizado no cálculo do grau de hidrólise (HOLANDA, 2004, ADLER-NISSEN, 1985).

Os hidrolisados proteicos podem ser definidos como proteínas que tiveram suas cadeias rompidas e convertidas em fragmentos de tamanho variáveis. Portanto, tanto os hidrolisados como as proteínas são formados por uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. O tamanho molecular dos hidrolisados é variável, iniciando a partir da união de dois aminoácidos. A diferenciação entre um hidrolisado e uma proteína não é bem definida. Pode ser chamada de proteína aquela cadeia que contém pelo menos 50 aminoácidos (DAMODARAM, 2010).

Os hidrolisados podem ser destinados a diferentes usos, dependendo de suas características e de seu peso molecular. Para obter produtos com alto valor nutricional, os hidrolisados deverão possuir baixo peso molecular, por ser mais disponível para ser digerido pelo ser humano e com a menor quantidade de aminoácidos livres possível. Já para melhorias na funcionalidade das proteínas, os melhores resultados são verificados em hidrolisados de maior peso molecular (HOLANDA, 2004).

3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A oxidação em alimentos é uma das principais causas de deterioração, devido à produção de sabores, cor ou odores desagradáveis. Além disso, há prejuízos nutricionais, como a degradação parcial de ácidos graxos essenciais e vitaminas; e, em níveis mais avançados, pode gerar produtos que podem interagir com proteínas e causar a perda ou diminuir a absorção destas. Por isso, é importante o uso de antioxidantes, que são substâncias capazes de inibir ou retardar significativamente a oxidação. Existem antioxidantes naturais e sintéticos; porém os sintéticos estão associados a propriedades carcinogênicas e a outros efeitos negativos. Desta forma, os antioxidantes naturais têm sido mais estudados e valorizados para aplicação em produtos alimentícios (CORRÊIA, 2013).

Estudos sugerem que as proteínas dos alimentos podem ser uma potencial fonte alimentar de antioxidantes naturais. Proteínas alimentares, tais como as do leite e soja têm mostrado boa capacidade para eliminar radicais livres, reduzir ação de metais de transição e inibir a peroxidação lipídica em alimentos. Diversos trabalhos têm demonstrado que as proteínas da soja são uma importante fonte de hidrolisados com ação antioxidante. Zhang et al. (2010) produziram hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de proteína de soja, com diferentes proteases microbianas comerciais, e obtiveram bons resultados para testes de oxidação lipídica de carne moída cozida com a aplicação dos hidrolisados.

No estudo de Saito et al. (2003) é relatado como a proteína hidrolisada pode possuir maior atividade antioxidante quando comparada com a proteína intacta. Nesse estudo, a digestão enzimática das proteínas da soja, especificamente a β -conglucina e glicina, aumentou a atividade antioxidante, provavelmente ao fato de os grupos R dos aminoácidos estarem mais ativos e expostos após a hidrólise. Esses autores relataram também que os tri-peptídeos contendo resíduos de triptofano ou tirosina na posição C-terminal apresentaram elevada atividade antioxidante na eliminação de radicais livres.

A atividade antioxidante dos aminoácidos está relacionada com o mecanismo de ação dos mesmos. Aminoácidos ácidos e básicos, tais como ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, arginina e histidina, são principalmente agentes quelantes de íons metálicos. Já aminoácidos que doam elétrons e/ou prótons ou que

contenham grupamentos sulfidrilas, como a tirosina, triptofano, fenilalanina, histidina e cisteínas, apresentam a capacidade de atuarem como sequestradores de radicais livres (SAMARANAYAKA, LI-CHAN, 2011; SARMADI, ISMAIL, 2010; ELIAS, MCCLEMENTS, DECKER, 2005).

3.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os hidrolisados proteicos podem possuir ação antimicrobiana, ou trabalharem em sinergia entre si, para combater microrganismos específicos ou ainda podem contribuir para a atividade antimicrobiana com outros tipos de atividades biológicas (BARBOSA, 2008). A síntese de hidrolisados considerados antimicrobianos, por diferentes organismos, consiste de uma estratégia de defesa natural do próprio organismo. Atuam em baixas concentrações e podem ser recuperados para o emprego de ensaios em que a sua ação antimicrobiana contra fungos e/ou bactérias podem ser avaliadas (BARBOSA, 2008).

Corrêia (2013) conseguiu obter hidrolisados bioativos de caseinato ovino que apresentaram boas atividades antioxidante, anti-hipertensiva e antimicrobiana. O autor verificou que os hidrolisados apresentaram ação contra vários tipos de bactérias gram-positivas ou gram-negativas como *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, entre outras. A ação dos hidrolisados contra os microrganismos pode ser devido a vários mecanismos. De modo geral, eles atuam na membrana plasmática através de ligação eletrostática. Ao mesmo tempo, os grupos hidrofóbicos dos hidrolisados se ligam aos lipídeos da membrana, alterando a permeabilidade e/ou geração de energia, que pode até provocar a ruptura e desintegração da célula. Ou também podem se transpor para o interior da célula dos microrganismos e alterar os componentes intracelulares, interferindo nas funções vitais para a célula (BENKERROUM, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Para a realização deste trabalho, o okara foi fornecido pela Cocamar Cooperativa Agroindustrial (Maringá, PR, Brasil). As enzimas que foram utilizadas na hidrólise enzimática proteica foram a endoprotease Alcalase[®] 2.4L FG oriunda de *Bacillus licheniformis*, com atividade declarada de 2.4 AU-A/g, e a exoprotease Flavourzyme[®] 1000L, oriunda de *Aspergillus oryzae*, com atividade declarada de 1000 LAPU/g (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). Para a extração das proteínas da farinha de okara desengordurada, foi utilizado o complexo multi-enzimático (composto por celulase, hemicelulase, xilanase e a β -glucanase) Viscozyme[®] da Novozymes, oriunda de *Aspergillus aculeatus*, com atividade declarada 100 FBG/g (Fúngica Beta-Glucanase).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Caracterização do Okara

O okara foi desidratado em estufa com circulação de ar a 50 °C por 24h e moído em um moinho de facas para a obtenção da farinha de okara. A farinha foi desengordurada com n-hexano (1:10, p/v) por 2 horas em uma mesa agitadora orbital (modelo Ma-140, Marconi) à temperatura ambiente. Após a filtração a vácuo, a amostra foi armazenada em freezer doméstico até o início dos experimentos. A farinha de okara desengordurada foi caracterizada quanto à composição proximal (umidade, proteínas, cinzas, lipídeos, fibras) segundo os métodos descritos na AOAC (1997), e carboidratos calculados por diferença.

4.2.2. Pré-tratamento, Extração e Concentração das Proteínas do Okara

Previamente às etapas de extração e concentração das proteínas do okara, foi realizado um pré-tratamento da farinha de okara desengordurada com o complexo de carboidrases Viscozyme[®] visando romper a parede celular do okara e

aumentar a eficiência de extração das proteínas (FIGUEIREDO, 2015). Para isso, 10 g de amostra foram misturados com 190 mL de solução tampão de citrato-fosfato pH 6,2. Após as amostras atingirem 53°C, o complexo enzimático de carboidrases (4,0%) foi adicionado e mantido por 2 h sob agitação lenta (mesa agitadora orbital Dubnoff com controle de temperatura, modelo T-53, Tecnal, Piracicaba, Brasil).

As proteínas do okara foram extraídas de acordo com a metodologia descrita por Ma et al. (1997) com algumas modificações. Após o término do pré-tratamento enzimático, o pH foi ajustado para 9,0 com o auxílio de um pHmetro. A mistura foi mantida sob agitação em uma mesa agitadora orbital Dubnoff por 30 min a uma temperatura de 60°C e em seguida centrifugada a 14 204 xg por 30 min a 4°C em uma centrífuga refrigerada (modelo 5804-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), sendo obtidas duas fases: a precipitada (resíduo), contendo proteína não solubilizada e outros componentes, e a sobrenadante, contendo a proteína solubilizada. A proteína foi precipitada do sobrenadante pelo ajuste do pH para 4,5, recuperada por centrifugação a 14 204 xg por 30 min a 4°C e liofilizada (Liofilizador Labconco). O concentrado proteico de okara foi caracterizado quanto à composição proximal em relação ao conteúdo de umidade, proteínas, cinzas, lipídeos (AOAC, 1997) e carboidratos calculados por diferença, e perfil eletroforético em gel de poli-acrilamida SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

4.2.3. Hidrólise Enzimática do Concentrado Proteico do Okara

A hidrólise enzimática proteica foi realizada em um béquer encamisado de 250 mL com sistema de agitação e aquecimento utilizando o método pH-stat descrito por Adler-Nissen (1985). Para cada experimento de hidrólise, foi utilizado 1,5g de concentrado proteico liofilizado e 75 ml de água destilada. A mistura foi transferida para o béquer encamisado, sendo agitada por um agitador magnético, aquecida por um banho termostatizado com sistema de circulação externa a uma dada temperatura, e o pH ajustado com solução de NaOH 1N. Em seguida, a enzima foi adicionada à mistura e a reação foi monitorada, titulando-se manualmente e continuamente NaOH 0,1N, de modo a manter o pH constante durante a reação. O conteúdo de base consumido foi anotado em intervalos de 5 em 5 min na primeira hora, 10 min na segunda hora, 15 min para as duas horas

seguintes e 30 min até que as variações do consumo da base foram insignificantes. Os ensaios experimentais foram conduzidos em diferentes combinações de temperaturas, razão enzima:substrato, pH e a razão da mistura das enzimas Alcalase e a Flavourzyme conforme o planejamento experimental descrito a seguir.

4.2.3.1. Planejamento Experimental

O planejamento experimental foi utilizado para estudar os efeitos das variáveis independentes temperatura T ($^{\circ}\text{C}$), relação enzima:substrato E/S (% g enzima/100g proteína), pH e a razão entre as enzimas Alcalase:Flavourzyme A/F (%Alcalase/%Flavourzyme) na mistura enzimática sobre o grau de hidrólise dos hidrolisados. Os intervalos das variáveis foram escolhidos com base nas faixas da temperatura e pH nas quais as enzimas possuem maior atividade enzimática de acordo com o fabricante. A relação enzima:substrato foi escolhida baseada na literatura (FIGUEIREDO, 2015). Para avaliar o efeito destas variáveis sobre o grau de hidrólise da reação, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), de 32 experimentos divididos em 3 blocos (Tabela 1).

Tabela 1 – Delineamento composto central rotacional para a hidrólise enzimática das proteínas do okara

Ensaio	Blocos	T (°C)	E/S (%)	pH	A/F (%/%)
1	1	-1 (47,5)	-1 (2,0)	-1(7,1)	-1(30/70)
2	1	1(62,5)	-1 (2,0)	-1 (7,1)	-1(30/70)
3	1	-1(47,5)	1 (4,0)	-1 (7,1)	-1(30/70)
4	1	1(62,5)	1 (4,0)	-1 (7,1)	-1(30/70)
5	1	-1 (47,5)	-1 (2,0)	1 (8,4)	-1(30/70)
6	1	1(62,5)	-1 (2,0)	1 (8,4)	-1(30/70)
7	1	-1 (47,5)	1 (4,0)	1 (8,4)	-1(30/70)
8	1	1 (62,5)	1 (4,0)	1 (8,4)	-1(30/70)
9	1	-1 (47,5)	-1 (2,0)	-1 (7,1)	1 (70/30)
10	1	1 (62,5)	-1 (2,0)	-1 (7,1)	1 (70/30)
11	1	-1 (47,5)	1 (4,0)	-1 (7,1)	1 (70/30)
12	1	1 (62,5)	1(4,0)	-1 (7,1)	1 (70/30)
13	1	-1 (47,5)	-1 (2,0)	1 (8,4)	1 (70/30)
14	1	1 (62,5)	-1 (2,0)	1 (8,4)	1 (70/30)
15	1	-1 (47,5)	1 (4,0)	1 (8,4)	1 (70/30)
16	1	1 (62,5)	1 (4,0)	1 (8,4)	1 (70/30)
17	1	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)
18	1	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)
19	2	-2 (40)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)
20	2	2 (70)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)
21	2	0 (55)	-2 (1,0)	0 (7,75)	0 (50/50)
22	2	0 (55)	2 (5,0)	0 (7,75)	0 (50/50)
23	2	0 (55)	0 (3,0)	-2 (6,5)	0 (50/50)
24	2	0 (55)	0 (3,0)	2 (9,0)	0 (50/50)
25	2	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	-2 (10/90)
26	2	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	2 (90/10)
27	2	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)
28	2	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)
29	3	-2 (40)	2 (5,0)	0 (7,75)	2 (90/10)
30	3	-2 (40)	2 (5,0)	-1 (7,1)	2 (90/10)
31	3	-1 (47,5)	2 (5,0)	-1 (7,1)	2 (90/10)
32	3	-1 (47,5)	2 (5,0)	0 (7,75)	2 (90/10)

T = temperatura, E/S = relação enzima:substrato, A/F = razão Alcalase:Flavourzyme. As variáveis

correspondem ao valor codificado. Valores entre parênteses correspondem aos valores reais.

Para a elaboração dos modelos, foi utilizado o software Statistica 10.0 (Statsoft, Tulsa, EUA), com a finalidade de assegurar a validade dos coeficientes dentro de um nível de confiança de 90%, através de análises estatísticas apropriadas. Após a análise estatística dos coeficientes, foi realizada análise de variância (ANOVA), que consiste na avaliação do coeficiente de determinação (R^2) e do teste F, verificando se o modelo apresenta um ajuste adequado dos dados experimentais.

Assim, com base no modelo, foi encontrada a condição ótima de temperatura, razão enzima:substrato, pH e relação entre as enzimas (Alcalase/Flavourzyme). Nessa condição, os hidrolisados foram obtidos em cinco diferentes GH (6, 12, 18, 22 e 24%) e com GH de 0%, referente ao concentrado proteico sem sofrer hidrólise proteica (amostra controle), que foi obtida nas mesmas condições que as amostras anteriores, sem a adição das enzimas. A reação enzimática foi finalizada pela inativação da enzima por aquecimento a 90°C por 10 minutos, seguida de resfriamento a temperatura ambiente, as amostras foram armazenadas em freezer a -22 °C até o momento das análises. Posteriormente, os hidrolisados obtidos em cada um dos diferentes graus de hidrólise foram avaliados quanto as suas propriedades antioxidantes e antimicrobiana.

4.2.3.2. Grau de Hidrólise

O processo de hidrólise foi monitorado através da determinação do grau de hidrólise, que pode ser obtido pelo método pH-stat ou método de titulação de grupos α -amino liberados em pH e temperatura constantes. Segundo Adler-Nissen (1985), para a maioria das proteínas, equivalentes de hidrólise (h_{total}) corresponde a 8 moles equiv/kg de proteína, estimado com base na composição de aminoácidos:

$$GH(\%) = \frac{h}{h_{total}} \times 100 = \frac{V_{NaOH} \times N_b}{MP \times \alpha \times h_{total}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: h é o número de ligações peptídicas (moles equiv/kg);

V_{NaOH} é o volume da base consumida durante a hidrólise para manter o pH

constante (ml);

N_b é a normalidade da base;

MP é a massa de proteína (g, determinado em $N \times$ fator de Kjeldahl);

e α é o grau de dissociação.

Quando uma ligação peptídica é hidrolisada a pH superior a 6,5, o grupo carboxi terminal formado contribui para o abaixamento do pH. O consumo de base (medido por titulação contínua), necessário para manter o pH constante ao longo da reação, é utilizado no cálculo do GH. Considerando que o pK médio dos grupos amino seja constante, deverá existir uma proporcionalidade entre a liberação de prótons (igual ao consumo de base) e a quantidade de ligações peptídicas clivadas. O fator de proporcionalidade é o grau de dissociação dos grupos α -amino (α):

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: pH é constante e pK varia com a temperatura na qual a reação é conduzida.

O valor de pK, de acordo com Steinhart & Beychok (1964 apud KRISTINSSON; RASCO, 2000), pode ser estimado através da equação (3):

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \quad (\text{Eq. 3})$$

4.2.4. Avaliação do Hidrolisado Proteico Obtido na Condição Otimizada

Os hidrolisados proteicos foram caracterizados quanto ao conteúdo de proteínas pelo método de Kjeldahl, umidade por estufa a 105°C até peso constante (AOAC, 1997), eletroforese, atividades antioxidante e antimicrobiana, e conteúdo de aminoácidos. Visando avaliar o efeito de hidrólise, tais análises também foram realizadas para o concentrado proteico.

4.2.4.1. Perfil Eletroforético

A determinação do perfil eletroforético das proteínas concentradas do okara foi feita de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), utilizando gel tris-HCl com 20% de acrilamida e gel de empilhamento de 4%. A amostra do concentrado foi diluída em uma solução tampão contendo 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol, de modo a obter uma concentração de proteína de 0,4%. A amostra foi aquecida a 95 °C por 4 min. Após, alíquotas de 10 μ L de amostra foram aplicadas no gel com 2% de SDS e 20% de glicerol. As análises foram realizadas em um sistema Mini-protein II (Electrophoresis Power Supply Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil), e o gel correu a 120 V. O perfil de massa molecular das proteínas foi determinado utilizando-se o padrão Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA).

Os perfis eletroforéticos dos hidrolisados proteicos com diferentes valores de GH foram feitos de acordo com a metodologia de Schagger, Jagow (1987). Utilizando gel de separação Tris-Tricina com 10% de acrilamida e gel de empilhamento de 4%. As amostra dos hidrolisados foram diluídas em uma solução tampão contendo 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol, de modo a obter uma concentração de proteína de 2% e foram aquecidas à 37°C por 15 min. Após, alíquotas de 10 μ L de cada amostra foram aplicadas no gel. As análises foram realizadas em um sistema Mini-protein II (Electrophoresis Power Supply Loccus Biotecnologia). O gel correu inicialmente a 30 V até todas as amostras entrarem no gel de empilhamento, aumentando a voltagem a cada 15 min para 50 V, 100 V, 150 V e 190 V. Esta última foi mantida até que o marcador azul atingisse 1 cm da borda inferior do gel, aumentando a voltagem para 240 V. A voltagem foi então aumentada para 270 V quando o marcador azul atingiu 0,5 cm da borda inferior do gel e mantido até o final. O perfil de massa molecular das proteínas foi determinado utilizando o padrão de polipeptídeos (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA).

4.2.4.2. Determinação da Atividade Antioxidante Utilizando o Radical ABTS

A capacidade antioxidante dos hidrolisados e do concentrado proteico frente ao radical livre ABTS⁺ foi realizada de acordo com Sánchez-Gonzales

et al. (2005) com modificações. A solução ABTS foi preparada em meio aquoso. O cátion $ABTS^+$ foi produzido reagindo a solução estoque ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM, e foi armazenado em frasco escuro e em temperatura ambiente por 16 h antes do uso. A solução $ABTS^+$ foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4) para uma absorbância de 0,700 em 730 nm. As amostras de concentrado e de hidrolisado foram diluídas em 4 mL da solução $ABTS^+$, e as leituras de absorbância a 730 nm foram realizadas após 6 min de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (1,25, 2,5, 4, 5, 7,5 e 10 μ Mol/L) foram usadas para calibração. O ensaio foi realizado em triplicata, e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos como μ M de Trolox equivalente (TE) por grama de amostra líquida.

4.2.4.3. Determinação da Atividade Antioxidante Utilizando FRAP – Método de Redução do Ferro

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP, foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. Foram preparadas soluções estoque de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-striazine) 10 mM em HCl 40 mM, cloreto de ferro hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 20 mM e tampão acetato (100 mM; pH 3,6). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, misturando 25 mL de tampão acetato (100 mM; pH 3,6), 2,5 mL de solução estoque de TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine; 10mM) e 2,5 mL de solução estoque de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20mM), exatamente nesta ordem. A solução foi incubada a 37°C durante 30 min. Para a reação, foram adicionados 30 μ L de amostra e 70 μ L de água destilada a 900 μ L de reagente FRAP recentemente preparado. Para o branco, foram adicionados 900 μ L de reagente FRAP em 100 μ L de água destilada. A reação ocorreu no escuro, mantendo a temperatura em 37 °C durante 30 min. Terminado o tempo de reação, leituras de absorbância foram feitas a 593 nm em um espectrofotômetro UV-visível. Os resultados foram correlacionados com uma curva padrão de Trolox constituída com soluções de concentrações variadas de 50 a 500 μ M preparados a partir da solução padrão de Trolox (10mM). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados de capacidade antioxidante foram

expressos como μM de Trolox equivalente (TE) por grama de amostra líquida.

4.2.4.4. Conteúdo de Aminoácidos totais

A composição de aminoácidos do hidrolisado proteico obtido nas melhores condições foi determinada por digestão em HCl 6 N/0,1% de fenol a 110 °C durante 20 h, de acordo com o método Pico-Tag descrito por White et al. (1986). Após hidrólise ácida, a derivatização da amostra foi iniciada por adição de uma solução de etanol:água: trietilamina: fenilisotiocianato (7:1:1:1, v/v), que foi misturada com o auxílio de um misturador de vórtice e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 20 min. A identificação dos aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) utilizando uma coluna LUNA C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). A qualidade nutricional dos hidrolisados foi avaliada pelo escore de aminoácido totais, que compara os níveis de aminoácidos essenciais na amostra com o padrão de proteínas, recomendado pela FAO / WHO (1991).

4.2.4.5. Determinação da atividade antimicrobiana por difusão por cavidade em ágar

A atividade antimicrobiana do concentrado e dos hidrolisados proteicos (GH 0, 6, 12, 18, 22 e 24%) foram determinadas pelo método de difusão por cavidade em ágar (MUFANDAEDZA et al., 2006) com algumas modificações. As cepas bacterianas, de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) foram reativadas em caldo BHI e incubados a 35 °C por 18 a 24 h. A concentração de cada inóculo foi padronizada pelo ajuste da densidade óptica na escala 0,5 de Mc Farland (correspondente a $1,5 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹), em água peptonada 0,1%. Uma alíquota de 100 μL das suspensões foi semeada em ágar Mueller-Hinton com o auxílio de uma pipeta automática com a ponteira estéril e espalhadas até completa absorção pelo meio com o auxílio de uma alça de Drigalski. Foram feitos poços de 8 mm, aos quais foram adicionados 15 μL do caldo concentrado com 5% de proteínas de cada amostra. As placas foram mantidas a 4 °C por 3 h para permitir a difusão do caldo concentrado

no meio de cultura antes do crescimento das cepas patogênicas, depois as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Para a determinação da atividade antimicrobiana das amostras, os halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro.

4.2.4.6. Análise estatística

Para a elaboração dos modelos, foi utilizado o *software* Statistica 10 (Statsoft, Tulsa, EUA), com a finalidade de assegurar a validade dos coeficientes dentro de um nível de confiança de 90%, através de análises estatísticas apropriadas. Após a análise estatística dos coeficientes, foi realizada análise de variância (ANOVA), que consiste na avaliação do coeficiente de determinação (R^2) e do teste F, verificando se o modelo apresenta um ajuste adequado dos dados experimentais. Os resultados das demais análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey com 95% de confiança, utilizando o mesmo software.

REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.
- AOAC. **Official methods of analysis**. 16^a ed., 3^a rev. Gaithersburg: Published by AOAC International. v.2, cap. 32, p.1-43, 1997.
- APLEVICZ, K; DEMIATE, I. M. Análises físico-químicas de pré-misturas de pães de queijo e produção de pães de queijo com adição de okara. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1416-1422, set/out. 2007.
- BADLEY, R.A.; , D.HAUSER, H.OLDANI,D.; GREEN, J.P. STUBBS, J.M. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdan, v.412, n.213-228, dec,1975.
- BARBOSA, J. R; BELTRAME, S. C.; BRAGATTO, M. M. ; DÉBIA, P. J. G.; BOLANHO, B. C.; DANESI, E. D. G. Avaliação da composição e dos parâmetro tecnológicos de farinhas produzidas a partir de subprodutos agroindustriais. in: V SIMPÓSIO DE ENGENHARIA, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Revista Tecnológica**, p. 21-28. 2011.
- BARBOSA, M. de O. **Prospecção de hidrolisados antimicrobianos de soja (Glycinemax) utilizando ferramentas proteômicas**. 2008. 117 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.
- BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. **A review. International Journal of Dairy Technology**, v.63, l 3. p.320-338, ago. 2010.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 239: p.70-76, jul, 1996.
- BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. Caracterização físico-química de okara e aplicação em pães do tipo francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP. v.26, n. 3, jul./set. 2006.
- CALLOU, Kátia R. de A. **Teor de isoflavonas e capacidade antioxidante de bebidas à base de soja**. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.
- CANTUÁRIA, C. M DE; RIBEIRO, S. DA C. A.; RIBEIRO, C. DE F. A.; PARK, K. J.; ARAÚJO, E. A. F. Perfil sensorial de pães de forma enriquecidos com okara. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.10, n.2, p.111-120, dez, 2008.

CHAN, W. M.; MA, C. Y. Acid modification of proteins from soymilk residue (*okara*). **Food Research International**, London: Elsevier, v. 32, p.119-127, mar, 1999.

CIABOTTI, S. et. al. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 920-929, set./out., 2006.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science e Technology**. Cambridge, v.11, p.254-262, jul, 2000.

CORRÊIA, A. P. F. **Obtenção de hidrolisados bioativos a partir da hidrólise enzimática de caseinato ovino e soro de queijo ovino**. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, hidrolisados e proteínas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 5, p. 180 -262.

DANELUZ, D. ; CUNHA, M. A. A . Produção de biscoitos formulados com farinhas de berinjela (*Solanum melongena*, L.) e okara. In: XIV Seminário de Iniciação Científica da UTFPR, 2009, Pato Branco. **Anais do XIV SICITE**. v. 1. p. 1-4. Pato Branco 2009.

DÍAZ, J.C. R. **Secagem de hidrolisado protéico de pele de cação por atomização: Otimização do processo de hidrólise e avaliação das características físico-químicas do pó**. 2011. 169 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual De Campinas. Campinas, 2011.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números (safra 2014/2015)**. Disponível em : <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> Acesso em: 19 de maio de 2016.

FANTE, C. A.; GOULART, P. DE F. P.; ALVES, J. D.; HENRIQUE, P. DE C.; FRIES, D. D. Isoflavone and protein content in soybeans grains submitted to flooding at different stages of development. **Ciência Rural**, v.41, n.12, dez, 2011.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Evaluation of protein quality. **Joint FAO/WHO report**. Rome: FAO Food Nutrition. 1991

FIGUEIREDO, V, R, G. **Concentração e hidrólise enzimática das proteínas do okara**. 2015. 113f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 2015.

GILMARTIN, L; JERVIS, L. Production of Cod (*Gadus morhua*) Muscle Hydrolysates. Influence of Combinations of Commercial Enzyme Preparations on Hydrolysate Peptide Size Range. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 50, No. 19, sep, 2002.

HIRAKURI, M. H; LAZZAROTTO, J. J. Evolução e Perspectivas de Desempenho Econômico Associadas com a Produção de Soja nos Contextos Mundial e Brasileiro. **Documentos 319**. EMPRAPA SOJA. ISSN 2176-2937 Outubro, 2011.

HOLANDA, H. D. **Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas (*xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos.**2004. 162 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.Campinas, 2004.

JACKSON, C. J.; DINI J.P.; LAVANDIER, C; RUPASINGHE H.P.V.; FAULKNERA H.; POYSA V.; D BUZZELL, DEGRANDIS,S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**. v.37, n.10, p.1117-1123, may. 2001.

JÚNIOR, M. S. S.; OLIVEIRA, W. M.; CALIARI, M.; VERA, R.; Otimização da formulação de pães de forma preparados com diferentes proporções de farinha de trigo, fécula de mandioca e okara.**Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 221-248, jan./jun. 2006.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Kinetics of the hydrolysis of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, Oxford, v.36, n.1, p.131-139, sep, 2000.

KUROZAWA, L.E.; PARK, K.J.; HUBINBER, M.D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. **Journal Food Science**, v.73, p.405-412, jun, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v. 227, n. 15, p. 685-689, aug,1970.

LAROSA, G; ROSSI, E. A; BARBOSA, J. C; CARVALHO, M. R. B. Aspectos sensoriais, nutricionais e tecnológicos de biscoito doce contendo farinha de 'okara'. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. v.17, n.2, p.151-157, abr./jun. 2006.

LEHNINGER, A.L., et al. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. Sao Paulo: Sarvier, 839p.1995.

MA, C.-Y.;LIU, W.-S.; KWOK, K.C.; KWOK, F. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**, vol. 29, n. 8, p. 799-805. Dec. 1997.

YOSHIDA, B. Y.;PEREIRA, D. G.; CASTILHO, S. P. G.; SEIBEL, N. F.Produção e caracterização de cookies contendo farinha de okara.**Alimentos e Nutrição**. v. 25(1): p. 49-54 Jan-Mar, 2014.

MARTINEZ, P.C.; SOUZA, M.C.; BRAZACA, S.G.C. Alterações químicas em grãos de soja com germinação. **Ciência tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.31, p.23-30, jan/mar, 2011.

ELIAS, R.J.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and tryptophan, and methionine residues in continuous phase β -Lactoglobulin in Oil-in-Water Emulsions, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v 53 (26), pp 10248–10253. Nov, 2005.

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

MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B. C.; FERESU, S. B.; GADAGA, T. H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic Escherichia coli and Salmonella enteritidis strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 147-152, apr, 2006.

O'TOOLE, D. K. Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production- a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 363-371, feb.1999.

PEREIRA, M. O. BAMPI, M.; RODRIGUES, F. T.; SANTA, O. R. D.; SANTA, H. S. D. RIGO M. Elaboração de uma bebida probiótica fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja com sabor de frutas. **Ambiência Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais** V. 5 N. 3 Set./Dez. 2009.

PERUSSELLO, C. A. **Estudo dos parâmetros de processo e modelagem numérica da secagem do resíduo sólido da produção do extrato hidrossolúvel de soja (okara)**. 2008. 129 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica) Pontifícia Universidade Católica. Curitiba. 2008.

PREECE, K.E.; DROST, E.; HOOSHYAR, N.; KRIJGSMAN, A.; COX, P.W.; ZUIDAM, N.J. Confocal imaging to reveal the microstructure of soybean processing materials. **Journal of Food Engineering** v.147 n.2015, p. 8–13, 2014.

RAO, M. B.; APARNA, M. T.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology Reviews**. 62:597-635, sep.1998.

RENKEMA, J. M. S.; GRUPPEN, H.; VAN VLIET, T. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6064-6071, oct. 2002.

SAITO, K; JIN, DH; OGAWA, T; MURAMOTO, K; HATAKEYAMA, E; YASUHARA, T; NOKIHARA K. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 3668–74, 2003.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**. v. 3, n. 4, p 229-254, out. 2011.

SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v. 90, p.133-139, apr. 2005.

SANTOS, C. G. P dos; MIGUEL, D. P.; LOBATO, F. M. Processamento de “hambúrgueres” à base de resíduo de soja “okara”: análise físico – química sensorial e microbiológica. in: **IX JORNADA CIENTÍFICA DA FAZU 25 A 29 de outubro de 2010.**

SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidantive peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v.31,n.10, p.1949-1956, oct.2010.

SBROGGIO, M. F.; GEORGETT S. R.; MONTILHA, M. S.; FIGUEIREDO, V. R. G.; KUROZAWA, L. E. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology**. vol.36 no.2 Campinas Apr./June 2016.

SCHAGGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, São Diego, v. 166, n. 2, p. 368-379; Feb.1987.

SCHMIDT, C. G; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, Vol. 32, No. 5. p. 1144-1150. Mai. 2009.

SHIMIZU, H. Manufacture of water-soluble soybean polysaccharide from soybean food by – product (*okara*). **Foods Food Ingredients**. Japan, n. 201, 2002.

SIGMA ALDRICH. Alcalase® CLEA. Disponível em :
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=alcalase&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product>> Acesso em 07 de outubro de 2016.

SIGMA ALDRICH. Protease from *Aspergillus oryzae*. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=flavourzyme&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt®ion=BR&focus=product>> Acesso em 07 de outubro de 2016.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, Vol. 33, No. 7. P.1541 1548. Jun. 2010.

SINGH, M.; MOHAMED, A. Influence of gluten-soy protein blends on the quality of reduced carbohydrates cookies. **Food Science and Technology**. V. 40, ed. 2, P. 353–36 . Mar, 2007.

TASHIMA, E. H; CARDELLO, H. M. A. B. Perfil sensorial de extrato de hidrossolúvel de soja (Glicine Max L. Merrill) comercial adoçada com sacarose e com sucralose. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, V. 21, n. 2, p. 409-428, jul/dez. 2003.

WHITE, J. A., HART R. J., KRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. **J Journal of Automatic Chemistry**, vol 8, pp170-177, 1986.

WOLF, J. W., NELSEN, T. C. Partial purification and characterization of the 15S

globulin of soybeans, a dimer of glycinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, p.785-791, mar.1996.

ZHANG, L; LI, J; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**. V.101, 2084–2089. Apr. 2010.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de dois artigos científicos, conforme segue:

Artigo A

OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO OKARA PELA AÇÃO DA MISTURA DE ENZIMAS COM ESPECIFICIDADES DISTINTAS

Artigo B

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADOS PROTEICOS DO OKARA COM DIFERENTES GRAUS DE HIDRÓLISE

5.1. ARTIGO CIENTÍFICO A: OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO OKARA PELA AÇÃO DA MISTURA DE ENZIMAS COM ESPECIFICIDADES DISTINTAS

Dafne Garcia Pereira, Elza Louko Ida, Louise Emy Kurozawa

RESUMO

O okara é um resíduo formado durante a produção do extrato de soja com alto teor de proteínas com um elevado valor nutritivo. Apesar disso, é pouco utilizado na alimentação humana e normalmente usado como ração animal. Devido ao baixo valor de mercado, torna-se uma boa alternativa como fonte proteica para produção de isolados, concentrados ou hidrolisados proteicos. O objetivo deste trabalho foi otimizar a hidrólise das proteínas extraídas e concentradas do okara pela ação combinada de duas proteases com especificidades distintas, a endopeptidase Alcalase® e a exopeptidase Flavourzyme®, e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana do hidrolisado obtido na melhor condição de processo. Como resultado, o maior grau de hidrólise foi de 22% e as condições ótimas foram temperatura de 40°C, razão enzima/substrato de 5%, pH 7,1 e razão Alcalase/Flavourzyme de 90/10 (%/%). A análise de eletroforese confirmou a hidrólise proteica, pelo aparecimento de bandas difusas e menores que 10 kDa. Pelo perfil de aminoácidos totais, o hidrolisado apresentou um bom balanço de todos os aminoácidos essenciais. Por fim, o processo de hidrólise favoreceu a atividade antioxidante do hidrolisado, chegando a ser 2,3 vezes maior para o ABTS e 2,7 vezes no método de FRAP se comparados a proteína intacta. Entretanto, as amostras não apresentaram atividade antimicrobiana na concentração testada.

Palavras chaves: Concentrado proteico; Clivagem proteica; Alcalase; Flavourzyme; Capacidade antioxidante.

INTRODUÇÃO

A partir da produção do extrato de soja, grandes quantidades de um resíduo denominado okara são geradas. Apesar de ser considerado como um resíduo industrial, ele pode ser re-aproveitado como um subproduto e agregar valor a um determinado produto final. A cada 1 kg de grãos de soja processado, é gerado cerca de 1kg de okara úmido (KHARE, JHA E GANDHI, 1995). Embora o okara seja pouco utilizado na alimentação humana e normalmente usado como ração animal, ele tem alto teor de proteína (27 a 38g/100g) com alto valor nutritivo e ainda baixo valor de mercado (SUREL, DÍSTICO, 2005). Tal fato o torna uma boa alternativa

como fonte proteica para outros processos, tais como a produção de isolados ou concentrados proteicos.

A partir do concentrado proteico, pode-se realizar o processo de hidrólise enzimática das proteínas, que consiste na clivagem das ligações peptídicas, liberando assim uma mistura de polipeptídios de pesos moleculares variados (DAMODARAM, 2010). O controle das condições de hidrólise enzimática (temperatura, pH, tempo e concentração de substrato) e a escolha adequada da enzima, bem como a sua concentração, permitem a obtenção de produtos com características desejadas a uma dada aplicação na formulação de alimentos. É importante conhecer quais destes fatores são críticos, uma vez que a otimização dos parâmetros de processo de hidrólise enzimática é essencial para o desenvolvimento de um processo ótimo e econômico (ADLER-NISSEN, 1985).

A maioria dos estudos realiza a hidrólise enzimática utilizando as enzimas Alcalase e a Flavourzyme separadamente (BAMDAD, WU E CHEN, 2010; SBROGGIO et. al. 2016) ou uma em sequência da outra, com o uso da Alcalase seguida da aplicação da Flavourzyme (VIOQUE et al. 1999). Uma vez que não existem dados de temperatura e pH ótimos do uso da mistura das enzimas Alcalase e Flavourzyme em diferentes proporções, encontrar uma condição de processo em que seja possível utilizar as duas enzimas ao mesmo tempo, pode representar para a indústria uma economia no tempo do processo e no custo, pois entre as enzimas a Flavourzyme é mais cara se comparada com a Alcalase (SIGMA ALDRICH, 2016). O uso combinado de enzimas com diferentes especificidades e mecanismos de ação pode ser aplicado visando melhorar as propriedades funcionais e biológicas dos hidrolisados proteicos. Diferentes proporções destas enzimas para a hidrólise das proteínas irá resultar em misturas de diferentes perfis de peptídeos na qual cada um pode contribuir para uma determinada função (CASTRO e SATO, 2015).

Os hidrolisados podem exercer atividade antioxidante e antimicrobiana. Diferentes tipos de fontes proteicas estão sendo estudadas para a obtenção de hidrolisados, como soja (ZHANG et, al. 2010) e carne de frango (KUROZAWA, 2008), porém, o potencial das proteínas do okara para a obtenção de hidrolisados ainda não foi investigado e também não há estudos sobre a combinação de duas enzimas com ações catalíticas diferentes em um único processo de hidrólise. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi obter um modelo matemático preditivo das

condições ótimas da hidrólise das proteínas concentradas do okara pela ação combinada de duas proteases comerciais, a endopeptidase Alcalase® e a exopeptidase Flavourzyme®, e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana do hidrolisado obtido.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Para a realização deste trabalho, o okara foi fornecido pela Cocamar Cooperativa Agroindustrial (Maringá, PR, Brasil). As enzimas utilizadas na hidrólise enzimática proteica foram a endoprotease Alcalase® 2.4L FG oriunda de *Bacillus licheniformis*, com atividade declarada de 2.4 AU-A/g e a exoprotease Flavourzyme® 1000L, oriunda de *Aspergillus oryzae*, com atividade declarada de 1000 LAPU/g (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). Para o a extração das proteínas da farinha de okara desengordurada, foi utilizado o complexo multi-enzimático (celulase, hemicelulase, xilanase e a β -glucanase) Viscozyme® da Novozymes, oriunda de *Aspergillus aculeatus*, com atividade declarada 100 FBG/g (Fúngica Beta-Glucanase).

MÉTODOS

Composição centesimal do okara

O okara foi desidratado em estufa com circulação de ar a 50 °C por 24 h e moído em um moinho de facas para a obtenção da farinha de okara. A farinha foi desengordurada com n-hexano (1:10, p/v) por 2 horas em uma mesa agitadora orbital (modelo Ma-140, Marconi) à temperatura ambiente, após a filtração a vácuo, a amostra foi armazenada em freezer doméstico até o início dos experimentos. A farinha de okara desengordurada foi caracterizada quanto à composição centesimal (umidade, proteínas, cinzas, lipídeos, fibras) segundo os métodos descritos na AOAC (1997), e carboidratos calculados por diferença.

Pré-tratamento, extração e concentração das proteínas do okara

Previamente às etapas de extração e concentração das proteínas do okara, foi realizado um pré-tratamento enzimático da farinha de okara desengordurada com o complexo de carboidrases Viscozyme[®] visando romper a parede celular do okara e aumentar a eficiência de extração das proteínas, segundo o método descrito por (FIGUEIREDO, 2015). As proteínas do okara foram extraídas de acordo com a metodologia descrita por Ma et al. (1997) com algumas modificações que se baseia na extração das proteínas (pH 9, 60 °C, 30 min) seguido de precipitação isoelétrica das proteínas (pH 4,5) recuperada por centrifugação a 14.204 xg por 30 min a 4 °C e liofilizada (Liofilizador Labconco). O concentrado proteico de okara foi caracterizado quanto à composição centesimal em relação ao conteúdo de umidade, proteínas, cinzas, lipídeos (AOAC, 1997), carboidratos calculados por diferença, e perfil eletroforético em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

Hidrólise enzimática do concentrado proteico do okara

A hidrólise foi realizada em um béquer encamisado de 250 mL com sistema de agitação e aquecimento utilizando o método pH-stat descrito por Adler-Nissen (1985). Para cada experimento de hidrólise, foi utilizado 1,5 g de concentrado proteico e 75 ml de água destilada. A mistura foi transferida para o béquer encamisado, sendo agitada por um agitador magnético, aquecida por um banho termostatizado com sistema de circulação externa a uma dada temperatura, e o pH ajustado com solução de NaOH 1N. Em seguida, a enzima foi adicionada à mistura e a reação monitorada, titulando-se manualmente e continuamente NaOH 0,1N, de modo a manter o pH constante durante a reação. O conteúdo de base consumido foi anotado em intervalos de 5 em 5 min na primeira hora, 10 min na segunda hora, 15 min para as duas horas seguintes e 30 min até que as variações do consumo de base foram insignificantes (FIGUEIREDO, 2015). Os ensaios experimentais foram conduzidos em diferentes combinações de temperaturas, razão enzima:substrato, pH e a razão da mistura das enzimas Alcalase e a Flavourzyme. O processo de hidrólise foi monitorado através da determinação do grau de hidrólise, que pode ser obtido

pelo método pH-stat ou método de titulação de grupos α -amino liberados em pH e temperatura constantes (ADLER-NISSEN, 1985).

Planejamento experimental

O planejamento experimental foi utilizado para estudar os efeitos das variáveis independentes temperatura (40, 47,5, 55, 62,5 e 70 °C) , relação enzima:substrato E/S (1, 2, 3, 4 e 5 %, g enzima/100g proteína), pH (6,5; 7,1; 7,75; 8,4 e 9,0) e a razão entre as enzimas Alcalase:Flavourzyme (10/90, 30/70, 50/50, 70/30 e 90/10, %Alcalase/%Flavourzyme) na mistura enzimática sobre o grau de hidrólise dos hidrolisados. Para avaliar o efeito destas variáveis sobre o grau de hidrólise, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), de 32 experimentos divididos em 3 blocos (Tabela 1).

Tabela 1 – Delineamento composto central rotacional para a hidrólise enzimática das proteínas do okara, variáveis independentes reais e codificados e a função resposta grau de hidrólise (GH).

Ensaio	Bloco	T (°C)	E/S (%)	pH	A/F (%/%)	GH(%)
1	1	-1 (47,5)	-1 (2,0)	-1 (7,1)	-1(30/70)	16,58
2	1	1(62,5)	-1 (2,0)	-1 (7,1)	-1(30/70)	12,97
3	1	-1(47,5)	1 (4,0)	-1 (7,1)	-1(30/70)	18,11
4	1	1(62,5)	1 (4,0)	-1 (7,1)	-1(30/70)	14,11
5	1	-1 (47,5)	-1 (2,0)	1 (8,4)	-1(30/70)	19,74
6	1	1(62,5)	-1 (2,0)	1 (8,4)	-1(30/70)	18,34
7	1	-1 (47,5)	1 (4,0)	1 (8,4)	-1(30/70)	23,49
8	1	1 (62,5)	1 (4,0)	1 (8,4)	-1(30/70)	19,06
9	1	-1 (47,5)	-1 (2,0)	-1 (7,1)	1 (70/30)	21,42
10	1	1 (62,5)	-1 (2,0)	-1 (7,1)	1 (70/30)	16,69
11	1	-1 (47,5)	1 (4,0)	-1 (7,1)	1 (70/30)	24,74
12	1	1 (62,5)	1(4,0)	-1 (7,1)	1 (70/30)	18,79
13	1	-1 (47,5)	-1 (2,0)	1 (8,4)	1 (70/30)	20,37
14	1	1 (62,5)	-1 (2,0)	1 (8,4)	1 (70/30)	19,79
15	1	-1 (47,5)	1 (4,0)	1 (8,4)	1 (70/30)	24,74
16	1	1 (62,5)	1 (4,0)	1 (8,4)	1 (70/30)	21,36
17	1	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)	18,26
18	1	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)	19,18
19	2	-2 (40)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)	26,92
20	2	2 (70)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)	12,91
21	2	0 (55)	-2 (1,0)	0 (7,75)	0 (50/50)	20,34
22	2	0 (55)	2 (5,0)	0 (7,75)	0 (50/50)	21,79
23	2	0 (55)	0 (3,0)	-2 (6,5)	0 (50/50)	15,80
24	2	0 (55)	0 (3,0)	2 (9,0)	0 (50/50)	17,51
25	2	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	-2 (10/90)	15,94
26	2	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	2 (90/10)	20,87
27	2	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)	18,09
28	2	0 (55)	0 (3,0)	0 (7,75)	0 (50/50)	18,51
29	3	-2 (40)	2 (5,0)	0 (7,75)	2 (90/10)	23,41
30	3	-2 (40)	2 (5,0)	-1 (7,1)	2 (90/10)	24,16
31	3	-1 (47,5)	2 (5,0)	-1 (7,1)	2 (90/10)	22,39
32	3	-1 (47,5)	2 (5,0)	0 (7,75)	2 (90/10)	20,76

T = temperatura, E/S = razão enzima:substrato, A/F = razão Alcalase:Flavourzyme As variáveis correspondem ao valor codificado. Valores entre parênteses correspondem aos valores reais.

Para a elaboração dos modelos, foi utilizado o software Statistica 10.0 (Statsoft, Tulsa, EUA), com a finalidade de assegurar a validade dos coeficientes dentro de um nível de confiança de 90%, através de análises estatísticas apropriadas. Após a análise estatística dos coeficientes, foi realizada análise de variância (ANOVA), que consiste na avaliação do coeficiente de determinação (R^2) e do teste F, verificando se o modelo apresenta um ajuste adequado dos dados experimentais.

Assim, com base no modelo, foi encontrada a condição ótima de temperatura, razão enzima:substrato, pH e relação entre as enzimas (Alcalase/Flavourzyme). A reação enzimática foi finalizada pela inativação da enzima por aquecimento a 90 °C por 10 min, seguida de resfriamento a temperatura ambiente e congelamento em freezer a – 22 °C até o momento das análises. Os hidrolisados protéicos foram caracterizados quanto ao conteúdo de proteínas pelo método de Kjeldahl, umidade por estufa a 105 °C até peso constante (AOAC, 1997), eletroforese, atividades antioxidante e antimicrobiana, e conteúdo de aminoácidos. Visando avaliar o efeito da hidrólise, tais análises também foram realizadas para o concentrado proteico.

Avaliação do hidrolisado proteico obtido na condição otimizada

Perfil eletroforético

A determinação do perfil eletroforético das proteínas concentradas do okara foi feita de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), Utilizando gel tris-HCl com 20% de acrilamida e gel de empilhamento de 4%. A amostra do concentrado foi diluída em uma solução tampão contendo 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol, de modo a obter uma concentração de proteína de 0,4%. A amostra foi aquecida a 95 °C por 4 min. Após, alíquotas de 10 μ L de amostra foram aplicadas no gel com 2% de SDS e 20% de glicerol. As análises foram realizadas em um sistema Mini-protein II (Electrophoresis Power Supply Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil), e o gel correu a 120 V. O perfil de massa molecular das proteínas foi determinado utilizando-se o padrão Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA).

Os perfis eletroforéticos do hidrolisado proteico foi feito de acordo com a metodologia de Schagger, Jagow (1987), utilizando gel de separação com 10% de acrilamida e de empilhamento com 4%. As amostras dos hidrolisados foram diluídas em uma solução tampão contendo 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol, de modo a obter uma concentração de proteína de 2% e foram aquecidas à 37 °C por 15 min. Após, alíquotas de 10 μ L de cada amostra foram aplicadas no gel. As análises foram realizadas em um sistema Mini-protein II (Electrophoresis Power Supply Loccus Bioltecnologia). O gel correu inicialmente a 30 V até todas as amostras entrarem no gel de empilhamento, aumentando a voltagem a cada 15 min para 50 V, 100 V, 150 V e 190 V. Esta última foi mantida até que o marcador azul atingisse 1 cm da borda inferior do gel, aumentando a voltagem para 240 V. A voltagem foi então aumentada para 270 V quando o marcador azul atingiu 0,5 cm da borda inferior do gel e mantido até o final. O perfil de massa molecular das proteínas foi determinado utilizando o padrão de polipeptídeos (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA.)

Determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante do hidrolisado e do concentrado proteico frente ao radical livre ABTS⁺ foi realizada de acordo com Sánchez-Gonzales et al. (2005) com modificações. A solução ABTS foi preparada em meio aquoso. O cátion ABTS⁺ foi produzido reagindo a solução estoque ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM. A solução ABTS⁺ foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4) para uma absorbância de 0,700 em 730 nm. As amostras de concentrado e de hidrolisado foram diluídas em 4mL da solução ABTS⁺, e as leituras de absorbância a 730 nm foram realizadas após 6 min de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (1,25, a 10 μ Mol/L) foram usadas para calibração. O ensaio foi realizado em triplicata, e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos como μ M de Trolox equivalente (TE) por grama de amostra líquida.

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP, foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, misturando

25 mL de tampão acetato (100 mM; pH 3,6), 2,5 mL de solução estoque de TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-triazine; 10mM) e 2,5 mL de solução estoque de FeCl₃.6H₂O (20mM). Para a reação, foram adicionados 30 µL de amostra e 70 µL de água destilada a 900 µL de reagente FRAP. Para o branco, foram adicionados 900 µL de reagente FRAP em 100 µL de água destilada. A reação ocorreu no escuro, mantendo a temperatura em 37°C durante 30 min. As leituras de absorbância foram feitas a 593 nm em um espectrofotômetro UV-visível. Os resultados foram correlacionados com uma curva padrão de Trolox constituída com soluções de concentrações variadas de 50 a 500 µM preparados a partir da solução padrão de Trolox (10mM). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos como µM de Trolox equivalente (TE) por grama de amostra líquida.

Conteúdo de aminoácidos totais

A composição de aminoácidos do hidrolisado proteico obtido nas melhores condições foi determinada por digestão em HCl 6 N/0,1% de fenol a 110 °C durante 20 h, de acordo com o método Pico-Tag descrito por White et al. (1986). Após hidrólise ácida, a derivatização da amostra foi iniciada por adição de uma solução de etanol:água: trietilamina: fenilisotiocianato (7:1:1:1, v/v), que foi misturada com o auxílio de um misturador de vórtice e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 20 min. A identificação dos aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) utilizando uma coluna LUNA C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). A qualidade nutricional do hidrolisado foi avaliada pelo escore de aminoácido totais, que compara os níveis de aminoácidos essenciais na amostra com o padrão de proteínas, recomendado pela FAO/WHO (1991).

Determinação da atividade antimicrobiana por difusão por cavidade em ágar

A atividade antimicrobiana do concentrado e do hidrolisado foram determinadas pelo método de difusão por cavidade em ágar (MUFANDAEDZA et al., 2006) com algumas modificações. As cepas bacterianas, de *Escherichia coli* (ATCC

25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) foram reativadas em caldo BHI. A concentração de cada inóculo foi padronizada pelo ajuste da densidade óptica na escala 0,5 de Mc Farland (correspondente a $1,5 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹). Uma alíquota de 100µL das suspensões foi semeada em ágar Mueller-Hinton. Foram feitos poços de 8 mm aos quais foram adicionados 15 µl do hidrolisado e do concentrado com 5% de proteínas. As placas foram mantidas a 4°C por 3 h para permitir a difusão do caldo concentrado no meio de cultura antes do crescimento das cepas patogênicas, depois as placas foram incubadas por 24 h a 37°C. Para a determinação da atividade antimicrobiana das amostras, os halos de inibição se formados serão medidos com o auxílio de um paquímetro.

Análise estatística

Para a elaboração dos modelos, foi utilizado o *software* Statistica 10 (Statsoft, Tulsa, EUA), com a finalidade de assegurar a validade dos coeficientes dentro de um nível de confiança de 90%, através de análises estatísticas apropriadas. Após a análise estatística dos coeficientes, foi realizada análise de variância (ANOVA), que consiste na avaliação do coeficiente de determinação (R^2) e do teste F, verificando se o modelo apresenta um ajuste adequado dos dados experimentais. Os resultados das demais análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey com 95% de confiança, utilizando o mesmo software.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Composição centesimal do okara e do concentrado proteico.

O okara desengordurado apresentou elevados conteúdos de fibras e proteínas (Tabela 2), justificando sua utilização como uma boa fonte para a obtenção de um concentrado proteico. Visando melhorar a extração de proteínas, devido ao alto teor de fibras no okara, faz-se relevante a utilização do pré-tratamento com o complexo multi-enzimático de carboidrases, para romper as paredes celulares

do okara. Em um estudo anterior, Figueiredo (2015) verificou um aumento de 17% e 28% no conteúdo e na recuperação de proteínas, respectivamente, no okara pré-tratado com a enzima Viscozyme em comparação com a amostra controle.

Tabela 2 - Composição centesimal do okara seco e desengordurado e concentrado proteico liofilizado.

Composição	Okara desengordurado (g/100g) ± DP	Concentrado proteico do okara(g/100g) ± DP
Umidade	9,41 ± 0,07	4,27 ± 0,17
Cinzas (bs)	4,95±0,02	2,40±0,04
Lipídeos (bs)	0,91±0,13	0,64±0,32
Proteínas (bs)	33,75±0,35	77,19±0,98
Fibras (bs)	58,83±4,44	Nd
Carboidratos* (bs)	1,56±0,37	19,77±1,05

* Calculado por diferença; DP= desvio padrão; bs= base seca; Nd = Não determinado.

O conteúdo de lipídeos do okara desengordurado deste trabalho foi semelhante ao encontrado por Vishwanathan et al. (2011) para farinha de okara desengordurada e descascada (0,9g/100g), mas a composição diferenciou-se no restante dos componentes (cinzas 7,2 g/100g, proteínas 55 g/100g e carboidratos 36,7g/100g). Tais diferenças podem ser explicadas pelo fato dos autores terem utilizados soja descascada para a obtenção do okara e não quantificarem separadamente o conteúdo de fibras que foi contabilizado junto com os carboidratos. Já se comparado aos resultados obtidos por Redondo-Cuenca et. al. (2008), com exceção do conteúdo de lipídeos (9,84 g/100g), pois neste estudo a farinha de okara não foi desengordurada, todos os resultados da composição centesimal (proteínas 28,52g/100g, fibras totais 55,48g/100g, cinzas 3,61g/100g e carboidratos 2,56g/100g) foram semelhantes aos encontrados neste trabalho. As diferenças nos valores de composição centesimal do okara dependem do método que foi utilizado para a obtenção do mesmo e a variedade de soja utilizada (MA et al., 1997; SUREL; COUPLET, 2005).

Após os processos de pré-tratamento enzimático, extração e concentração das proteínas do okara, foi possível obter um concentrado proteico com 77,19 g/100g de proteínas em base seca (Tabela 2). Rosset et al. (2012) também realizaram um pré-tratamento enzimático com celulases na farinha de soja

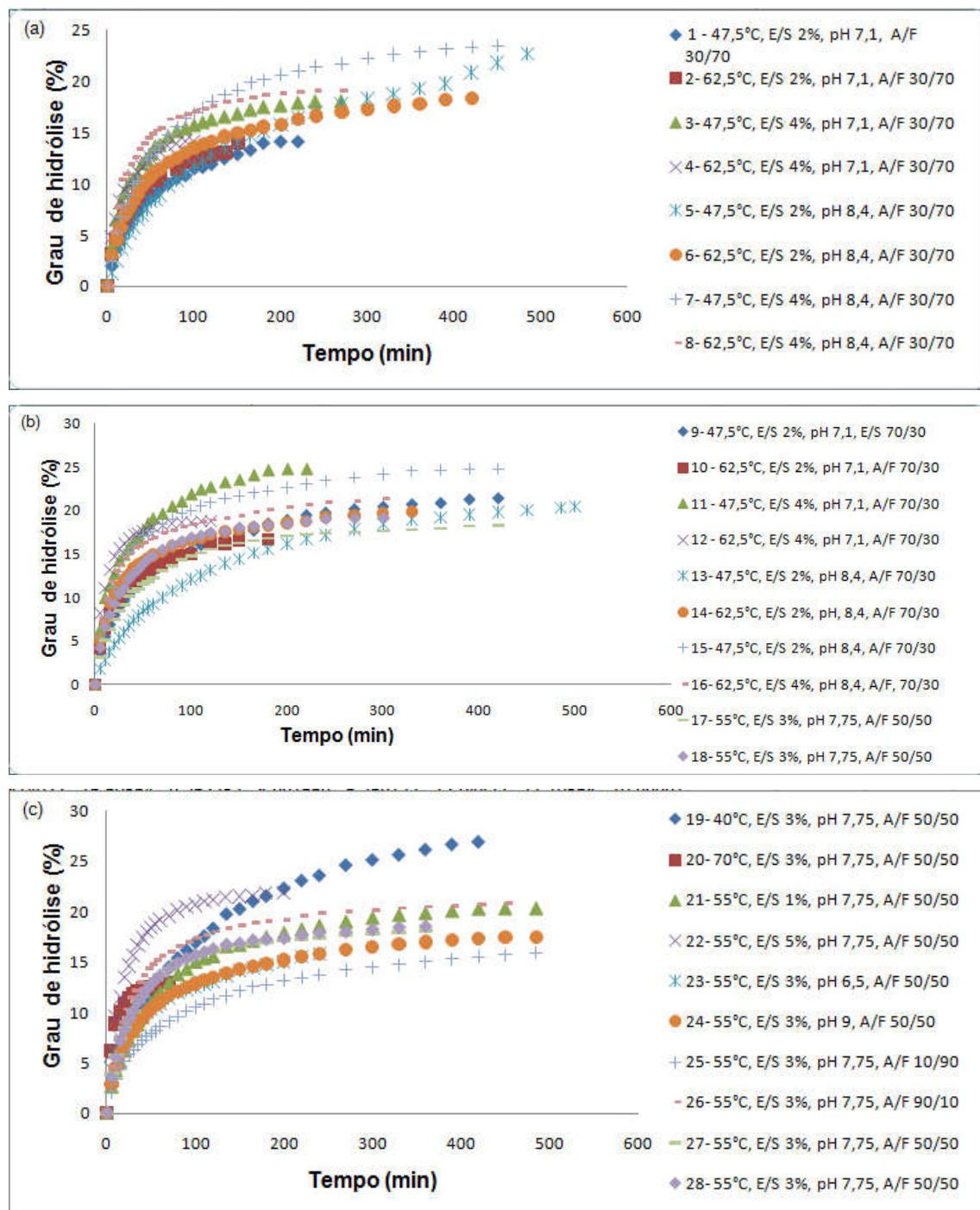
desengordurada para a extração de proteínas, e como resultado estes autores conseguiram um concentrado com 56,3% de proteínas, cujo valor é inferior ao encontrado neste trabalho.

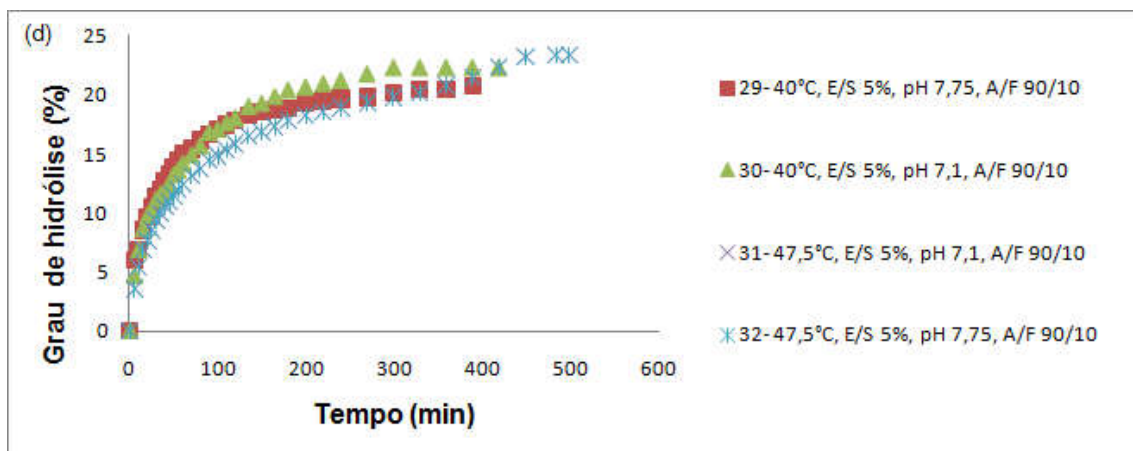
Cinética de Hidrólise enzimática do concentrado proteico do okara

Analisando as curvas de cinética (Figura 1), que relacionam o grau de hidrólise com o tempo de reação, todos os experimentos de hidrólise tiveram o mesmo padrão de comportamento. No início, houve uma alta taxa de reação, onde ocorreu uma quebra intensa das ligações peptídicas com aumento significativo do grau de hidrólise (GH), entretanto, aproximadamente após 100 min, a taxa de reação diminuiu com pequena alteração no GH, até este ficar constante. Esse perfil também foi encontrado para os processos de hidrólises de outras fontes de proteínas, tais como amendoim (JAMDAR et al., 2010), proteína de arroz (LI et al., 2016) e proteína de milho (JIN et al., 2016).

Esse comportamento pode ser explicado pela alta disponibilidade de substrato no início da reação, que estão sendo clivados rapidamente. Posteriormente, ocorre uma redução da velocidade da reação. Tal fato pode ser devido a uma possível inibição das enzimas pelos produtos da própria hidrólise (GONZÁLEZ-TELLO et al. 1994; O'MEARA, MUNRO 1984; ADLER-NISSEN, 1985). Demirhan et al. (2011) determinaram as velocidades iniciais de reação de hidrólise enzimática das proteínas de gergelim com e sem a adição de hidrolisados em diferentes proporções no início da reação. Como resultado, os autores verificaram que o aumento da quantidade de hidrolisado adicionado diminuiu a velocidade máxima de reação. Os autores concluíram que o próprio hidrolisado, que é o produto da reação enzimática, possui um papel inibidor e que o tipo de inibição deles para a Alcalase foi não-competitivo.

Figura 1– Cinética das hidrólises enzimáticas das proteínas do okara: (a) ensaios fatoriais 1 a 8, referentes ao bloco 1; (b) ensaios fatoriais 9 a 18, referentes ao bloco 1; (c) ensaios axiais 19 a 28, referentes ao bloco 2; (d) ensaios 29 a 32, referentes ao bloco 3.





Otimização da hidrólise das proteínas concentradas do okara

Para a otimização da hidrólise das proteínas do okara, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), de 32 experimentos divididos em 3 blocos, para avaliar o efeito das variáveis independentes temperatura (T), razão enzima/substrato (E/S), pH e a razão entre as enzimas Alcalase e Flavourzyme (A/F) sobre o grau de hidrólise (GH) (Tabela 1). Como pode ser observado, o GH variou entre 12,97 a 26,92%, correspondentes aos ensaios 2 e 19, respectivamente.

Após a exclusão dos parâmetros não-significativos, foi realizada a análise de variância (ANOVA) (Tabela 3), utilizando o teste F. Foi possível obter um modelo matemático preditivo (regressão significativa), uma vez que o coeficiente de determinação R^2 foi de 0,89, explicando 89% da variação dos dados observados, e o F calculado (17,17) foi maior que o F tabelado (3,29). Desta forma, o modelo pode ser considerado preditivo.

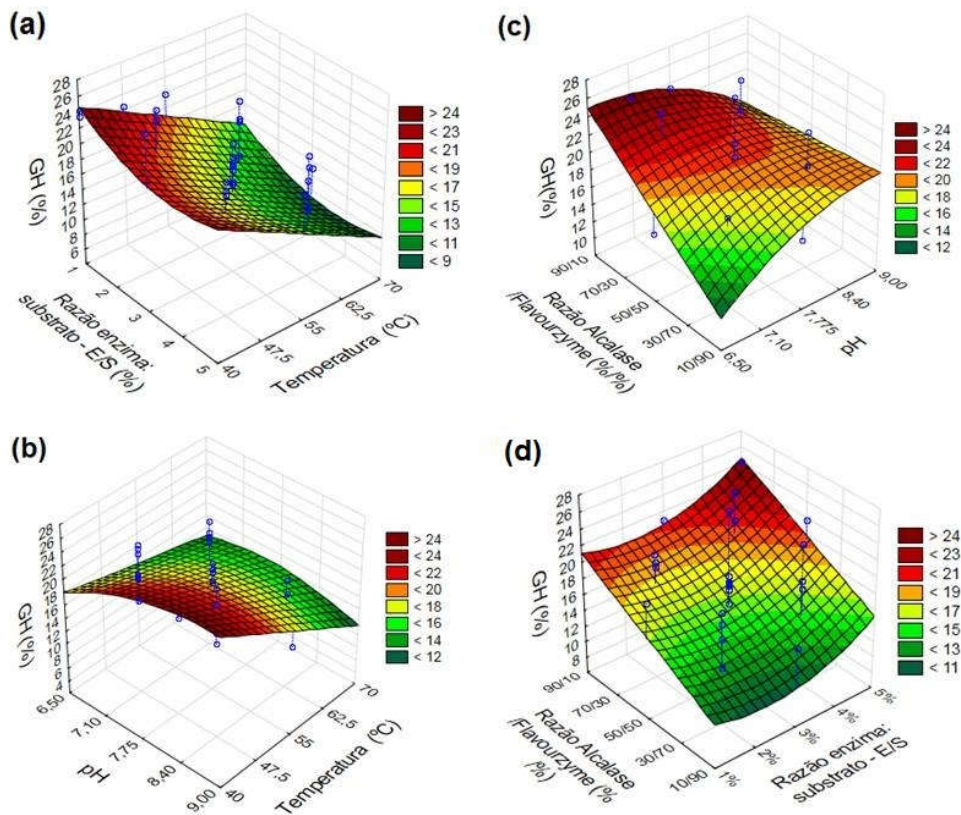
Tabela 3 – Coeficientes das variáveis independentes sobre o grau de hidrólise (GH).

Fatores	Coefficientes de regressão
Média	16,52
Bloco (3)	-4,96
Temperatura (L)	-2,32
Razão Enzima/Substrato (L)	0,89
Razão Enzima/Substrato (Q)	0,60
pH (L)	1,47
pH (Q)	-0,49
Razão Alcalase/Flavourzyme (L)	1,47
Temperatura x pH	0,52
pH x Razão Alcalase/Flavourzyme	-0,91
R²	0,89
F tabelado	3,29
F calculado	17,17

L= linear; Q= quadrático.

A partir do modelo matemático preditivo (Tabela 3), foram geradas as superfícies de resposta (Figura 2). Essas figuras expressam a interação entre duas variáveis independentes, na qual as outras duas variáveis foram mantidas nos pontos indicados pela desejabilidade (Figura 3).

Figura 2 – Efeito da temperatura (T), razão enzima:substrato (E/S), pH e razão Alcalase:Flavourzyme(A/F) sobre o grau de hidrólise (GH)



Ao avaliar os parâmetros que afetaram significativamente o GH ao nível de 90% de confiança, pode-se observar que houve efeito significativo do bloco 3, temperatura linear, razão E/S linear e quadrática, pH linear e quadrático, razão A/F linear e as interações entre temperatura x pH e pH x razão A/F sobre o GH. Através da avaliação dos coeficientes (Tabela 3), constatou-se que houve um efeito negativo do bloco3, isso significa que o GH, diminuiu quando foi realizado as análises do bloco 3 em comparação com os outros blocos. Um efeito negativo e linear também foi observado para a temperatura, o que significa que o aumento da temperatura causa uma redução no grau de hidrólise. Tal comportamento pode ser melhor visualizado nas Figuras 2 (a) e (b), onde as regiões de maior grau de hidrólise foram obtidas nas menores temperaturas, ou seja, a 40 °C, provavelmente devido à desnaturação térmica da estrutura da protease durante o longo período de reação enzimática. Entretanto, a literatura indica que a temperatura ótima das

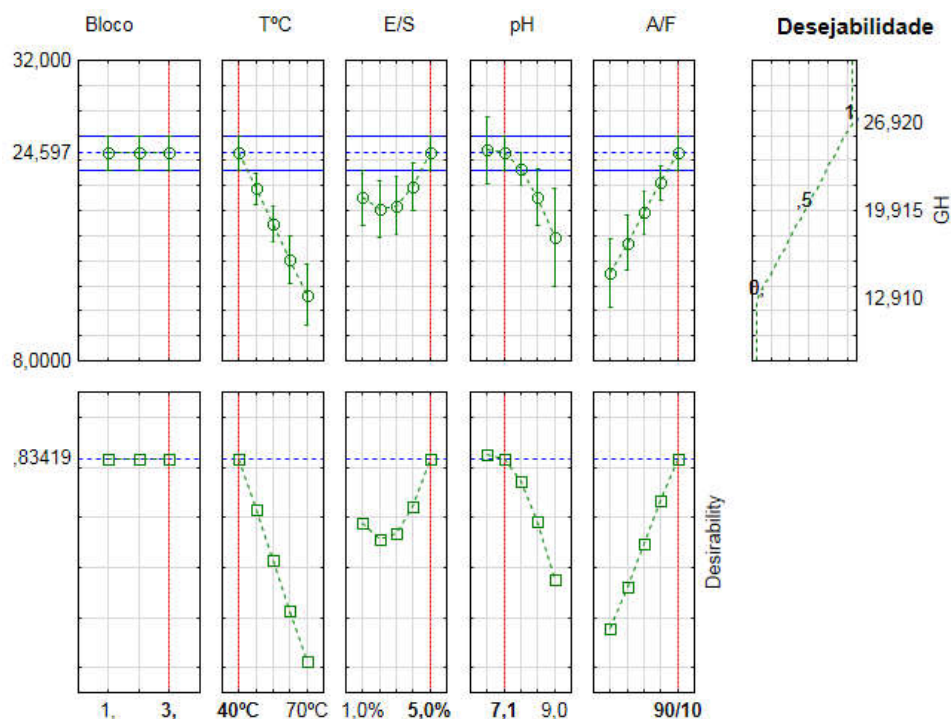
enzimas Alcalase e Flavourzyme são maiores, na faixa de 55-70 °C e 50 °C, respectivamente (GILMARTIN, e JERVIS, 2002; HOA et. al. 2014).

Com relação ao efeito da razão enzima/substrato sobre o GH, analisando a Figura 2 (a) e (d), um aumento nessa variável resultou em maiores valores de GH, conforme era esperado. Segundo Lehninger (1995), a velocidade da reação enzimática aumenta com a concentração de enzima, pois assim se mantém saturada à concentração do substrato. Isso ocorre porque ao aumentar a concentração de enzima, há um aumento na quantidade de sítios ativos disponíveis para clivar as ligações peptídicas.

A Figura 2 (b) mostra que a região com máximo GH está entre os valores de pH 7,1 e 9; porém, observando a Figura 2 (c), devido ao efeito da interação entre pH e a razão Alcalase/Flavourzyme (A/F), a região de máximo GH está ao redor de pH 7,1. Esta interação pode ser explicada, pois este pH encontra-se dentro da faixa ótima para ambas as enzimas, na qual o pH ótimo da enzima Alcalase está entre 6,5 a 8,5, e para a enzima Flavourzyme as condições ótimas são neutras ou ligeiramente ácidas.

Utilizando a função desejabilidade (Figura 3), foi otimizado o processo de hidrólise enzimática das proteínas do okara, indicado as regiões para se obter o máximo grau de hidrólise. Assim, a condição ótima encontrada foi: temperatura de 40°C, razão enzima/substrato de 5,0%, pH de 7,1 e razão Alcalase/Flavourzyme de 90% / 10%. O modelo matemático (Tabela 3) prevê que, nas condições otimizadas, o máximo grau de hidrólise é de GH 24,6%. Para validação do modelo, um experimento foi realizado nesta condição ótima e o resultado foi de 22,4%, indicando um desvio relativo médio de 9,1%, que é considerado aceitável por se tratar de um bioprocessamento envolvendo enzimas, e por estar dentro do intervalo de confiança de 90% do modelo.

Figura 3-Parâmetro de desejabilidade estimado na condição de máximo grau de hidrólise (GH).



Vioque et al. (1999) estudaram a hidrólise do isolado proteico de colza, com o uso da Alcalase seguida da Flavourzyme na temperatura de 50°C, para ambas as enzimas. Hoa et al. (2014) otimizaram a hidrólise enzimática de proteínas da soja somente com a enzima Flavourzyme e como temperatura ótima encontram 50°C. Em tais estudos, os valores ótimos encontrados para a temperatura foram diferentes ao encontrado por este trabalho uma vez que foi usada a mistura das duas enzimas, demonstrando a importância em obter as condições ótimas da ação combinada destas enzimas em diferentes proporções.

O pH também é uma variável muito importante sobre o GH, uma vez que qualquer alteração em seu valor em uma reação enzimática pode afetar a estabilidade da enzima, causando uma desnaturação irreversível em sua estrutura conformacional, ocasionando uma perda considerável da sua atividade (WHITAKER, 1994). Bamdad, Wu e Chen (2010) estudaram a hidrólise enzimática proteica de cevada, com 3 diferentes enzimas (Alcalase, Flavourzyme e Pepsina), na qual os valores de pH utilizados foram para a Alcalase pH 8 e Flavourzyme pH 7. Tal fato

mostra que, mesmo em menor quantidade, apenas 10% da enzima Flavourzyme na mistura de enzimas, alteraram significativamente a melhor condição de pH.

Sbroggio et al. (2016) estudaram a hidrólise enzimática das proteínas do okara, utilizando separadamente as enzimas Alcalase e Flavourzyme numa razão enzima:substrato de 10%. Esses autores obtiveram como resultado maior GH utilizando Alcalase (GH 33,6%), comparando com a Flavourzyme (GH 5,8%) e os hidrolisados das duas enzimas apresentaram elevada atividade antioxidante. Neste trabalho, apesar de usar uma mistura das duas enzimas, o resultado foi semelhante, pois a melhor condição para obter maior GH foi com uma maior proporção de Alcalase (90%) na mistura das enzimas. Em outro estudo Vastag et al. (2011) também observaram menor GH com a enzima Flavourzyme (37%) se comparado com a Alcalase (53%) na hidrólise do isolado proteico obtido a partir do resíduo de sementes de abóbora. Esses autores atribuíram o menor GH à atividade de exoprotease e ao aparecimento de bandas de alto peso molecular na eletroforese dos hidrolisados com a Flavourzyme, indicando uma menor atividade proteolítica dessa enzima se comparada a Alcalase. Pedroche et al.(2002) sugeriram que uma pré-hidrólise da amostra com a Alcalase aumentaria o número de sítios N-terminais e favoreceria posteriormente a atividade da enzima Flavourzyme por ser uma exoprotease. Como neste trabalho as duas enzimas foram utilizadas simultaneamente no processo de hidrólise, provavelmente dessa forma a Alcalase liberou muitos sítios ativos para a Flavourzyme, podendo ter atingido a saturação substratos para esta enzima.

A maioria dos trabalhos pesquisados utiliza as enzimas Alcalase e a Flavourzyme separadamente (BAMDAD, WU E CHEN, 2010; SBROGGIO et. al. 2016) ou uma em sequência da outra, sendo primeiro aAlcalase e depois a Flavourzyme (VIOQUE et al. 1999). Poucos trabalhos pesquisados também utilizaram uma combinação dessas duas enzimas, Gilmartin e Jervis (2002), apesar de terem hidrolisado uma proteína de origem animal, e não vegetal como a desse trabalho, esses autores conseguiram um maior GH quando utilizaram as enzimas juntas. Com os resultados desse trabalho é possível verificar a importância de um modelo matemático preditivo para obter as condições para utilizar as duas enzimas ao mesmo tempo, e assim economizar tempo de processo. Castro e Sato (2015) estudaram a ação sinérgica de enzimas proteolíticas distintas (Alcalase e

Flavourzyme) para a produção de hidrolisados de proteína de soja isolada e concluíram que o uso combinado de proteases com especificidades distintas podem libertar os peptídeos diferentes e, assim, aumentar o número de locais de clivagem para as proteínas e gerar hidrolisados com altas atividades antioxidantes.

Uma vez que o uso combinado destas enzimas com especificidades distintas podem resultar em perfis de peptídeos com diferentes propriedades funcionais e biológicas, torna-se interessante estudar diferentes graus de hidrólise e proporções A/F. Entretanto, uma vez que eram conhecidas somente as condições ótimas de cada enzima (Alcalase e Flavourzyme), o modelo matemático preditivo encontrado no presente trabalho permite calcular a temperatura e pH ótimos da mistura em diferentes proporções A/F.

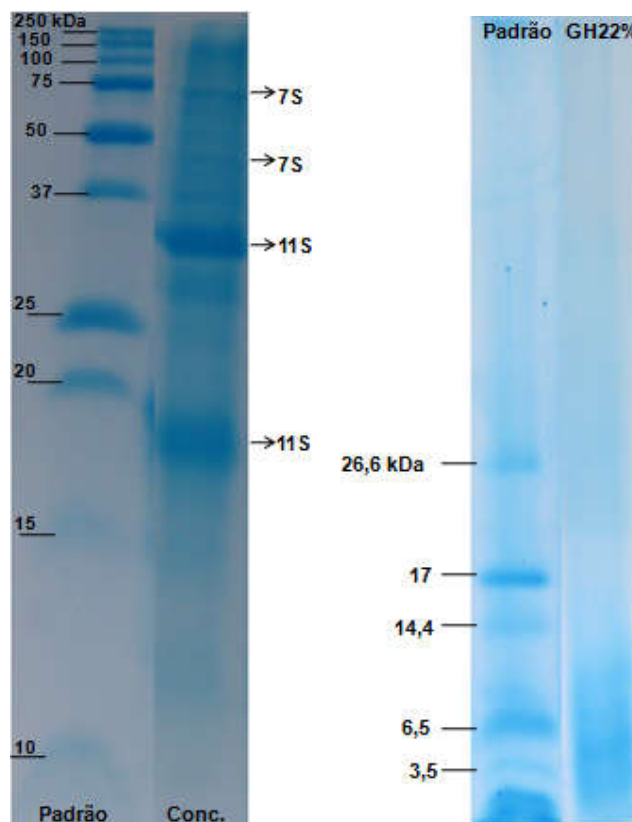
Caracterização do hidrolisado proteico obtido na condição otimizada

O hidrolisado proteico do okara com GH 22% apresentou um teor de $11,86 \pm 1,75$ g/100g de umidade e $71,12 \pm 1,26$ g/100g sólidos de proteínas. Para a caracterização do hidrolisado, foram realizadas as análises de peso molecular das proteínas por eletroforese, perfil de aminoácidos, atividades antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP e antimicrobiana. Para verificar o efeito da hidrólise enzimática proteica, o concentrado proteico também foi avaliado quanto ao seu peso molecular das proteínas por eletroforese, atividade antioxidante e antimicrobiana.

Perfil Eletroforético

Como pode ser observado na Figura 4, o concentrado proteico do okara possui duas bandas mais evidentes: uma entre 25 e 37 kDa e a segunda entre 15 kDa e 20 kDa. Estas bandas provavelmente correspondem à fração 11S das proteínas da soja, em que é composta por glicinina, e possui duas principais proteínas, que são os polipeptídios ácidos e básicos de aproximadamente 36 kDa e 20 kDa respectivamente. Possui também outras bandas menos definidas entre 75 kDa e 37 kDa, que podem ser pertencentes à fração 7S das proteínas da soja, que tem como principais pesos moleculares 62, 65 e 47 kDa (RENKEMA et al., 2002; SINGH; MOHAMED, 2007).

Figura 4 – Eletroforese em gel de SDS-PAGE Tris-HCl para a amostra de okara concentrado (Conc.) e em SDS-PAGE Tris-Tricina para a amostra de hidrolisado com 22% de grau de hidrólise (GH).



A eletroforese do hidrolisado na condição ótima GH 22% teve como resultado a presença de uma banda difusa, provavelmente devido ao processo de hidrólise, que foi capaz de clivar as proteínas presentes no concentrado em peptídeos com peso molecular inferior a 7 kDa. Ou seja, comparando a eletroforese do concentrado proteico, pode-se observar o desaparecimento das bandas de maior peso molecular no hidrolisado. O perfil eletroforético mostra que todas as proteínas foram atacadas pelas enzimas, não restando proteínas intactas após o processo, e provavelmente este perfil de proteínas do hidrolisado está mais relacionado com a atividade enzimática da enzima Alcalase, pois esta enzima é uma endopeptidase, que possui ação catalítica nas regiões internas das cadeias polipeptídicas e a tendência dessa enzima é produzir hidrolisados de menor peso molecular (GILMARTIN, JERVIS, 2002).

Conteúdo de Aminoácidos totais

A Tabela 4 mostra o perfil dos aminoácidos encontrados no hidrolisado proteico do okara. O hidrolisado apresentou baixos teores dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). Os maiores teores de aminoácidos encontrados na amostra foram de ácido glutâmico e aspártico. De acordo com Yuan et al. (2009), os polipeptídios ácidos e básicos isolados de glicinina, são ricos em ácido glutâmico e aspártico. Como pode ser confirmada na observação da eletroforese (Figura 4), a amostra de concentrado protéico do okara apresentou duas bandas mais evidentes que são correspondentes à glicinina.

Tabela 4 – Composição total de aminoácidos no hidrolisado proteico.

Aminoácidos Totais	GH22%	FAO/WHO (1991) ¹	Escore de
	g/100g de proteínas	g/100g proteínas	aminoácidos
Não essenciais			
Alanina	4,00±0,01		
Arginina	7,09±0,01		
Ác. Aspártico	12,10±0,01		
Cisteína	1,66±0,16		
Ác. Glutâmico	20,54±0,01		
Glicina	4,60±0,00		
Prolina	5,21±0,00		
Serina	5,28±0,01		
Tirosina	4,01±0,01		
Essenciais			
Histidina	2,46±0,00	1,9	1,3
Isoleucina	4,94±0,00	2,8	1,8
Leucina	7,20±0,01	6,6	1,1
Lisina	5,46±0,04	5,8	0,9
Metionina	1,30±0,00	2,5 ²	1,2
Fenilalanina	5,22±0,02	6,3 ³	1,5
Treonina	3,86±0,00	3,4	1,1
Triptofano	Nd	Nd	Nd
Valina	5,06±0,01	3,5	1,4

¹Referencia FAO/WHO (1991) Padrão de aminoácidos essenciais para a criança de 2-5 anos.

²Metionina + Cisteína

³ Fenilalanina + Tirosina

Nd = Não determinado.

O escore de aminoácidos é a razão entre a quantidade de aminoácidos essenciais que contém na amostra pela quantidade padrão recomendada pela FAO/WHO (1991). Essa pontuação do escore de aminoácidos essenciais é importante para avaliar a qualidade nutricional de uma amostra, uma vez que o organismo humano não consegue sintetizá-los em uma quantidade adequada para a manutenção do equilíbrio nitrogenado de um indivíduo (FRANCO, 2005). Uma vez que apenas o aminoácido lisina apresentou valor de 0,9, mesmo sendo inferior, esse valor é próximo de 1 e por isso ainda pode ser considerado que a amostra apresentou um bom perfil de aminoácidos essenciais e boa qualidade nutricional.

Atividade antioxidante

Os valores de atividade antioxidante aumentaram significativamente com a hidrólise enzimática proteica (Tabela 6). Comparado à proteína intacta presente no concentrado proteico, o processo de hidrólise aumentou significativamente a atividade antioxidante nos hidrolisados, chegando a ser 2,3 vezes maior para o ABTS e 2,7 vezes no método de FRAP. Saito et al. (2003) relataram o papel da hidrólise da proteína no aumento da atividade antioxidante. Nesse estudo, houve a digestão enzimática das proteínas da soja, especificamente a β -conglucina e glicinina, na qual foi encontrado um aumento da atividade antioxidante após a hidrólise. Isto pode ser devido ao fato de os grupos R dos aminoácidos estarem mais ativos e expostos após a hidrólise, aumentando a atividade antioxidante. Esses autores reportaram também que os tri-peptídeos contendo resíduos de triptofano ou tirosina na posição C-terminal apresentaram forte atividade antioxidante na eliminação de radicais livres.

A capacidade antioxidante de proteínas de batata foi estudada por Wang e Xiong (2005) que relacionaram com a presença de peptídeos de peso molecular inferior a 6 kDa. Neste trabalho, o hidrolisado proteico também apresentou proteínas de baixo peso molecular, sugerindo que a hidrólise foi relevante para o aumento da atividade antioxidante, pois, quanto menor o tamanho dos peptídeos maior a atividade antioxidante devido a maior exposição dos radicais dos

aminoácidos, que se tornam mais reativos e assim capazes de interferir no processo oxidativo.

Tabela 5 – Atividade antioxidante do concentrado e hidrolisado proteico de okara (grau de hidrólise 22%) pelos métodos de ABTS e FRAP.

Amostras	ABTS (mMTrolox/g de Hidrolisado)	FRAP (mM Trolox/g de Hidrolisado)
Concentrado	4,29 ± 0,2 ^b	59,12 ± 1,42 ^b
GH 22%	10,09 ± 0,10 ^a	161,91 ± 4,49 ^a

*Média±desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam quais as amostras apresentam diferença significativa a 5% ($p < 0.05$).

As amostras de concentrado e hidrolisado proteicos possuíram maior atividade antioxidante pelo método de FRAP, que se baseia na capacidade da amostra em reduzir o íon férrico, do que no método de ABTS, que mede a atividade de sequestro de radicais livres das amostras (KUSKOSKI et al., 2005). Sarmadi e Ismail (2010) relacionaram a atividade antioxidante de hidrolisados com a composição dos aminoácidos, sendo que os aminoácidos sulfurados possuem maior atividade de sequestro de radicais livres. Como foi observado na Tabela 4, o hidrolisado proteico apresentou baixa concentração dos aminoácidos sulfurados metionina e cistina, explicando a baixa capacidade em sequestrar o radical ABTS em relação à capacidade de reduzir o íon ferro.

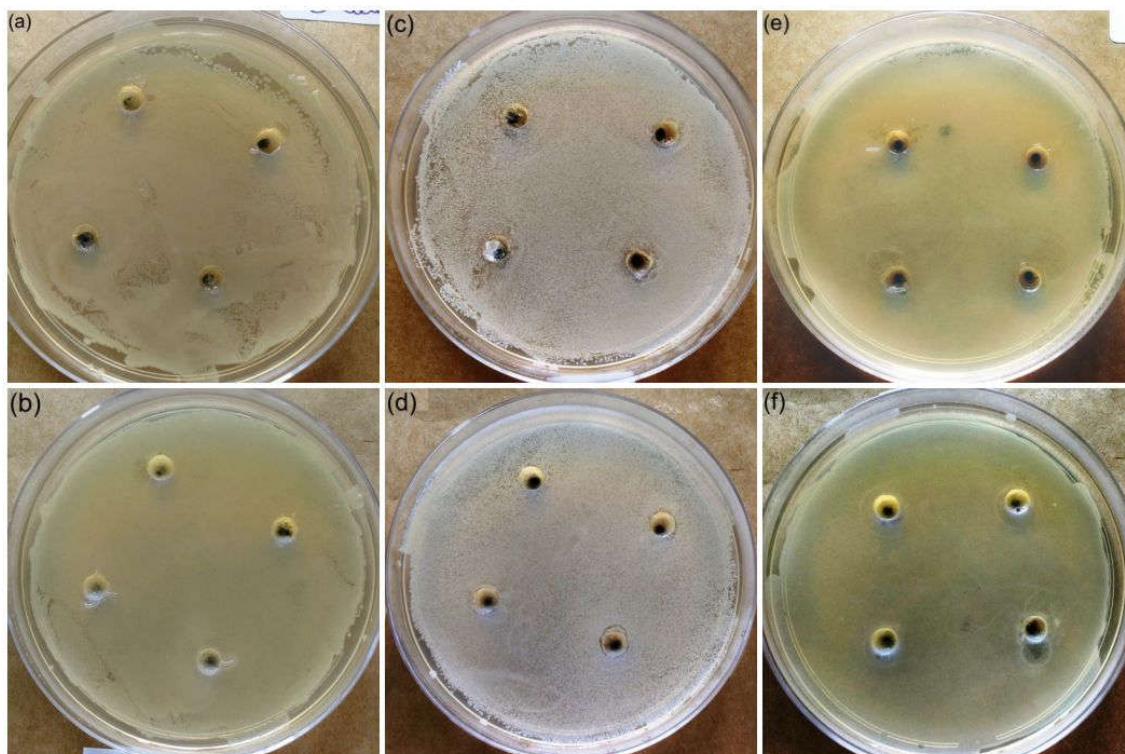
Em comparação com a amostra do concentrado proteico sem sofrer hidrólise, essa atividade de sequestro de radicais livres do hidrolisado pode ser considerada alta. Diversos estudos relacionaram alguns aminoácidos que possuem a capacidade de doar elétrons e/ou prótons ou que contenham grupamentos sulfidrilas, como a tirosina, triptofano, fenilalanina, histidina e cisteínas, apresentam a capacidade de atuarem como sequestradores de radicais livres (SAMARANAYAKA, LI-CHAN, 2011; SARMADI, ISMAIL, 2010; ELIAS, ELIAS, MCCLEMENTS, DECKER, 2005). Esses aminoácidos foram encontrados na amostra GH 22%, pela análise do conteúdo total de aminoácidos (Tabela 4).

Atividade Antimicrobiana

Sitohy, Mahgoub e Osman (2012) encontraram atividade antimicrobiana comparável ao antibiótico penicilina para amostras de glicinina,

importante proteína da soja. Porém, neste trabalho, o hidrolisado e o concentrado proteico do okara não apresentaram capacidade antioxidante contra as cepas estudadas no presente trabalho, como pode ser observado na Figura 5. Ou seja, as espécies *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* não foram susceptíveis à ação dos concentrados e hidrolisados proteicos do okara a uma concentração de 5%.

Figura 5 – Resultado das placas com o teste da atividade antimicrobiana do hidrolisado e concentrado proteicos do okara. As letras nas imagens se referem a qual microorganismo/amostra que foram testados, sendo: (a) - *E. coli*/concentrado proteico de okara (CONC); (b) - *E. coli*/Hidrolisado; (c) - *S. aureus*/CONC; (d) - *S. aureus*/Hidrolisado (e)– *Salmonella*/CONC; (f)– *Salmonella*/ Hidrolisado.



Conclusão

Com este trabalho, foi possível obter um modelo matemático preditivo do grau de hidrólise usando a mistura das enzimas Alcalase e Flavourzyme eliminando uma etapa no processo de hidrólise. A condição ótima foi temperatura de

40 °C, pH 7,1, razão enzima substrato de 5% e 90% de Alcalase e 10% de Flavourzyme na mistura das duas enzimas. Nessas condições, foi possível obter um produto hidrolisado com baixo peso molecular, alta atividade antioxidante e bom escore de aminoácidos essenciais. Tais resultados sugerem uma possível aplicação do hidrolisado proteico do okara como uma alternativa de antioxidante natural para alimentos ao invés do uso de antioxidantes sintéticos. Porém, o hidrolisado não apresentou atividade antimicrobiana com 5% de proteínas contra as espécies *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (Convênio n°160/2014) e ao CNPq (Processo n°473117/2013-4) pelo apoio financeiro. LEK foi bolsista produtividade em pesquisa da Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (Convênio n°501/2014).

Referências

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.

AOAC. **Official methods of analysis**. 16^a ed., 3^a rev. Gaithersburg: Published by AOAC International. v.2, cap. 32, p.1-43, 1997.

BAMDAD, F.; WU, J.; CHEN, L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. **Journal of Cereal Science**. v. 54 p- 20-28, jan, 2011.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Anal Biochem**, 239: p.70-76, jul. 1996.

BUTRÉ, C. I.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Influence of water availability on the enzymatic hydrolysis of proteins. **Process Biochemistry**. v 49. p 1903–1912. Aug. 2014.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: An approach based

on enzymes specificities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. V. 4, I.4, , P. 694–702, Oct, 2015.

DAMODARAN, S. Aminoácidos, hidrolisados e proteínas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, Cap. 5, p. 180 -262. 2010.

DEMIRHAN, E.; APAR, D. K.; ÖZBEK, B. A Kinetic Study on Sesame Cake ProteinHydrolysis by Alcalase. **Journal of Food Science**. Vol. 76, Nr. 1, feb, 2011.

ELIAS, R.J.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and tryptophan, and methionine residues in continuous phase β -Lactoglobulin in Oil-in-Water Emulsions, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v 53 (26), pp 10248–10253. Nov, 2005.

ESTEVE, C.; MARINA, M.L.; GARCÍA M.C.; Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residuesbased on the extraction of bioactive peptides. **Food Chemistry**. v 167. p 272–280. jan, 2015.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization.Evaluation of protein quality. **Joint FAO/WHO report**. Rome: FAO Food Nutrition. 1991.

FIGUEIREDO, V, R, G. **Concentração e hidrólise enzimática das proteínas do okara**. 2015. 113f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 2015.

FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos / Food composition tables. **Atheneu**; 307 p. São Paulo 2005.

GILMARTIN, L; JERVIS,L. Production of Cod (*Gadus morhua*) Muscle Hydrolysates. Influence of Combinations of Commercial Enzyme Preparations on Hydrolysate Peptide Size Range. **Journal of Automatic Chemistry**.,Vol. 50, No. 19, sep, 2002.

GONZALES-TELO, P.; CAMACHO, F.; JURADO, E.; PAEZ, M. P.; GUADIX, E. M.Enzymatic hydrolysis of whey proteins. I Kinetic models. **Biotechnology and bioenginery**, v.44, n.4, p.523 - 527, aug,1994.

HAMADA, J.S.; Characterization and Functional Properties ofRice Bran Proteins Modified by CommercialExoproteases and Endoproteases. **Journal Of Food Science**. Vol. 65, No. 2, mar, 2000.

HOA, N.T.; HUONG, T. T. X.; MINH, N. P.; DAO,D. T.Investigation of Enzymatic Optimization by Flavourzyme and Celluclast for Soy Protein Hydrolysate Powder. **International Journal of advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 3, July - Sep, 2014.

KHARE, S. K.; JHA, K.; GANDHI, A. P. Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state. **Bioresource Technology**, v.54, p. 323-325, dec,1995.

- KUROZAWA, L.E.; PARK, K.J.; HUBINBER, M.D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. **Journal Food Science**, v.73, p.405-412, jun 2008.
- JAMDAR, S. N., RAJALAKSHMI, V., PEDNEKAR, M. D., JUAN, F., YARDI, V., SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 121(1), p. 178-184. jul, 2010.
- JIN, D.; LIU, X., ZHENG, X., WANG, X., HE, J. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. **Food Chemistry**, v. 204, p. 427-436, aug, 2016.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO A. G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FET, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v 25(4): 726-732, out.-dez. 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v. 227, n. 15, p. 685-689, aug, 1970.
- LEHNINGER, A.L., et al. **Principios de bioquímica**. 2.ed. Sao Paulo: Sarvier, 839p.1995.
- LI, S.; YANG, X., ZHANG, Y., MA, H., LIANG, Q., QU, W., HE, R., ZHOU, C., MAHUNU, G. K. Effects of ultrasound and ultrasound assisted alkaline pretreatments on the enzymolysis and structural characteristics of rice protein. **Ultrasonics Sonochemistry**. v 31, p. 20-28. jul, 2016.
- MA, C.-Y.; LIU, W.-S.; KWOK, K.C.; KWOK, F. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**, vol. 29, n. 8, p. 799-805. dec. 1997.
- PEDROCHE, J., YUST, M. M., GIRÓN-CALLE, J., ALAIZ, M., MILLÁN, F., VIOQUE, J. Utilisation of chickpea protein isolate for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v 82(9), p. 960- 965, feb. 2002.
- SITOHY, M. Z.; MAHGOUB.; S. A.; OSMAN, AO. In vitro and in situ antimicrobial action and mechanism of glycinin and its basic subunit. **International Journal of Food Microbiology**. v. 154, p. 19–29, dec, 2012.
- MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B. C.; FERESU, S. B.; GADAGA, T. H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic Escherichia coli and Salmonella enteritidis strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 147-152, apr, 2006.
- O'MEARA, G.M.; MUNRO, P.A. Selection of a proteolytic enzyme to solubilize lean beef tissue. **Enzyme Microbial Technology**, n. 6, p.181–185, apr, 1984.

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

RENKEMA, J. M. S.; LAKEMOND, C. M. M.; JOUGH, H. H. J.; GRUPPEN, H.; VLIET, T. V. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 79, p. 223-230, may, 2000.

ROSSET, M.; JUNIOR, A.V.R.; BELÉIA, A. D. P. Protein extraction from defatted soybean flour With viscozyme I pretreatment. **Journal of Food Processing and Preservation**. n. 38, p.784–790, sep, 2012.

SAITO, K; JIN, DH; OGAWA, T; MURAMOTO, K; HATAKEYAMA, E; YASUHARA, T; NOKIHARA K. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. **Journal of Automatic Chemistry**. v 51, p. 3668–74, jun 2003.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**. v. 3, n. 4, p 229-254, out. 2011.

SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v. 90, p.133-139, apr, 2005.

SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidant peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v.31,n.10, p.1949-1956, oct, 2010.

SBROGGIO, M. F.; GEORGETT S. R.; MONTILHA, M. S.; FIGUEIREDO, V. R. G.; KUROSZAWA, L. E. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology**. vol.36 no.2 Campinas Apr./June 2016.

SCHAGGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, São Diego, v. 166, n. 2, p. 368-379; Feb.1987.

SINGH, M.; MOHAMED, A. Influence of gluten-soy protein blends on the quality of reduced carbohydrates cookies. **Food Science and Technology**. V. 40, ed. 2, P. 353–36. Mar, 2007.

SUREL, O., COUPLET, B. Influence of the dehydration process on active compounds of okara during its fractionation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 1343–1349. feb, 2005.

VAŠTAG, Ž., POPOVIĆ, L., POPOVIĆ, S., KRIMER, V., & PERIČIN, D. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. **Food Chemistry**. v 124(4), p.1316-1321. jul, 2011.

VIOQUE, J.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; BAUTISTAB, J.; MILLANA, F.; Production and Characterization of an Extensive Rapeseed Protein Hydrolysate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Vol. 76, no. 7 . mar, 1999.

VISHWANATHAN, K.H.;SINGH,V.; SUBRAMANIAN R. Influence of particle size on protein extractability from soybean and okara. **Journal of Food Engineering**. v. 102 p. 240–246, feb, 2011.

WANG, L.; XIONG, Y., Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9186-9192, nov, 2005.

WHITAKER, J.R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2.ed. New York: Marcel Dekker.Inc., 1994.

WHITE, J. A., HART R. J., KRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. **J Automatic Chem**, vol 8, pp170-177, 1986.

YUAN, D. -B., YANG, X. -Q., TANG, C. -H., ZHENG, Z. -X., MIN, W., AHMAD, I., YIN, S. -W. Physicochemical and functional properties of acidic and basic polypeptides of soy glycinin. **Food Research International**, v 42, 5-6, p 700-706. feb, 2009.

ZHANG, L; LI, J; ZHOU, K. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. **Bioresource Technology**. V.101, 2084–2089. Apr. 2010.

5.2. ARTIGO CIENTÍFICO B: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADOS PROTEICOS DO OKARA COM DIFERENTES GRAUS DE HIDRÓLISE

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE HIDROLISADOS PROTEICOS DO OKARA COM DIFERENTES GRAUS DE HIDRÓLISE

Dafne Garcia Pereira , Ariana Justus , Elza Iouko Ida, Louise Emy Kurozawa

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do grau de hidrólise (GH 0, 6, 12, 18 e 24%) sobre a atividade antioxidante e antimicrobiana de hidrolisados proteicos de okara obtidos pela ação da mistura das enzimas Alcalase e Flavourzyme. As amostras foram avaliadas quanto ao perfil eletroforético, atividade antioxidante (FRAP e ABTS) e atividade antimicrobiana. Para a amostra com os melhores resultados, também foi avaliado o seu conteúdo de aminoácidos totais. Os hidrolisados apresentaram pesos moleculares variados, diminuindo com o grau de hidrólise, melhor atividade antioxidante para todas as amostras hidrolisadas em comparação com a não hidrolisada, e ainda verificou-se que a amostra com maior grau de hidrólise 24% apresentou significativamente maior atividade na redução dos íons férricos e também apresentou um bom balanço de aminoácidos essenciais. Porém nenhuma amostra apresentou atividade antimicrobiana contra as espécies *E. Coli*, *Salmonella* e *S. Aureus* com 5% de proteínas. Dessa forma, os resultados sugerem que com maior grau de hidrólise pode ocorrer a liberação de peptídeos com elevada atividade antioxidante principalmente pela redução dos íons férricos que é responsável por catalizar reações oxidativas em biomoléculas.

Palavras-chaves: Concentrado proteico; clivagem proteica; FRAP; ABTS; Eletroforese.

INTRODUÇÃO

O okara, que é o subproduto do processamento do extrato de soja, tem grande potencial para a utilização nos alimentos, apesar de ser pouco utilizado nas indústrias alimentícias. Quantidades substanciais dos nutrientes da soja ficam retidas no okara, sendo, até 20% das proteínas e 11% do óleo presentes inicialmente nos grãos de soja. Também, há uma quantidade significativa de resíduo gerado, uma vez que, com 1 kg de grãos de soja, é possível obter até 1,1 kg de okara úmido (O'TOOLE, 1999). Por isso, é importante o estudo de alternativas para

introduzir os benefícios da soja na alimentação humana, seja como um ingrediente, aditivo, ou como componente de uma mistura em um sistema alimentar.

Devido ao seu elevado conteúdo de proteínas, o okara pode ser utilizado como fonte para obtenção de hidrolisados proteicos. A partir de concentrados proteicos, pode-se realizar o processo de hidrólise enzimática das proteínas, que consiste na clivagem das ligações peptídicas, liberando assim uma mistura de polipeptídios de pesos moleculares variados (DAMODARAM, 2010). Os hidrolisados proteicos têm diversas aplicações na indústria de alimentos. Podem ser usados em alimentos especiais para fins geriátricos e infantis, por serem mais disponíveis biologicamente para serem absorvidos, ou em suplementos e bebidas para alimentação esportiva (DAMODARAM, 2010).

Os hidrolisados também podem exercer atividade antioxidante e antimicrobiana, tais atividades podem estar relacionadas com a extensão da hidrólise. Wang e Xiong (2005) relataram que maiores valores de grau de hidrólise (GH) resultam em maior atividade antioxidante de hidrolisados proteicos. Uma vez que a atividade antioxidante pode estar relacionada com o conteúdo de aminoácidos presentes no interior das proteínas, ela é limitada pela estrutura terciária das proteínas. A hidrólise enzimática ajuda a expor resíduos de aminoácidos, aumentando a atividade antioxidante com o GH (JAMDAR et al. 2010; KARAMAC, et al. 2014; ELIAS et al. 2008). Os peptídeos também estão relacionados com a atividade antimicrobiana, principalmente os de baixo e médio peso molecular, por exemplo, proteínas altamente hidrofóbicas com pesos moleculares entre 27 e 31 kDa isoladas de peixes foram associados com forte atividade antibacteriana (EBRAN et al. 1999; SITOHY, MAHGOUB E OSMAN, 2012). De modo geral, estudos apontam que os peptídeos atuam principalmente na membrana plasmática do microrganismo. Os peptídeos podem interagir com os lipídeos da membrana, resultando na alteração da permeabilidade dessa membrana, ou ainda os peptídeos de menores pesos moleculares podem se transpor para o citoplasma e agir sobre os componentes. Ambos os mecanismos são vitais para um microrganismo (GOBBETTI et al., 2004; BENKERROUM, 2010). Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do grau de hidrólise sobre a atividade antioxidante e antimicrobiana de hidrolisados proteicos de okara, obtidos pela ação da mistura das enzimas comerciais, a endopeptidase Alcalase® e a exopeptidase Flavourzyme®.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Para a realização deste trabalho, o okara foi fornecido pela Cocamar Cooperativa Agroindustrial (Maringá, PR, Brasil). As enzimas que foram utilizadas na hidrólise enzimática proteica são a endoprotease Alcalase[®]2.4L FG oriunda de *Bacillus licheniformis*, com atividade declarada de 2.4 AU-A/g e a exoprotease Flavourzyme[®] 1000L, oriunda de *Aspergillus oryzae*, com atividade declarada de 1000 LAPU/g (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). Para a extração das proteínas da farinha de okara desengordurada, foi utilizado o complexo multi-enzimático (composto por celulase, hemicelulase, xilanase e a β -glucanase) Viscozyme[®] da Novozymes, oriunda de *Aspergillus aculeatus*, com atividade declarada 100 FBG/g (Fúngica Beta-Glucanase).

MÉTODOS

Caracterização do okara

O okara foi desidratado em estufa com circulação de ar a 50°C por 24 h e moído em um moinho de facas para a obtenção da farinha de okara. A farinha foi desengordurada com n-hexano (1:10, p/v) por 2 h em uma mesa agitadora orbital (modelo Ma-140, Marconi) à temperatura ambiente, filtrada a vácuo e armazenada em freezer doméstico até o início dos experimentos. A farinha de okara desengordurada foi caracterizada quanto à composição centesimal em base seca: umidade 9,41±0,07 g/100g, proteínas 33,75±0,35 g/100g, cinzas 4,95±0,02 g/100g, lipídeos 0,91±0,13 g/100g, fibras 58,83±4,44 g/100g (AOAC,1997), e carboidratos 1,56±0,37 g/100g (calculados por diferença).

Obtenção do Concentrado Proteico do Okara

Previamente às etapas de extração e concentração das proteínas do okara, foi realizado um pré-tratamento enzimático da farinha de okara

desengordurada com o complexo de carboidrases Viscozyme[®] visando romper a parede celular do okara e aumentar a eficiência de extração das proteínas, segundo o método descrito por (FIGUEIREDO, 2015). As proteínas do okara foram extraídas de acordo com a metodologia descrita por Ma et al. (1997) com algumas modificações que se baseia na extração das proteínas (pH 9, 60°C, 30 min) seguido de precipitação isoelétrica das proteínas (pH 4,5) recuperada por centrifugação a 14.204xg por 30 min a 4°C e liofilizada (Liofilizador Labconco). O concentrado proteico de okara apresentou a seguinte composição centesimal em base seca: conteúdo de umidade 4,27±0,17 g/100g, proteínas 77,19±0,98 g/100g, cinzas 2,40±0,04 g/100g, lipídeos 0,64±0,32 g/100g (AOAC, 1997) carboidratos 19,77±1,05 g/100g (calculados por diferença).

Hidrólise Enzimática do Concentrado Proteico do Okara

A hidrólise foi realizada em um béquer encamisado de 250 mL com sistema de agitação e aquecimento utilizando o método pH-stat descrito por Adler-Nissen (1985). Para cada experimento de hidrólise, foi utilizado 1,5 g de concentrado proteico e 75 ml de água destilada. A mistura foi transferida para o béquer encamisado, sendo agitada por um agitador magnético, aquecida por um banho termostatizado com sistema de circulação externa a 40 °C, e o pH ajustado com solução de NaOH 1N para 7,1. Em seguida, as enzimas (90% de Alcalase/10% de Flavourzyme) foram adicionadas na razão de 5% de enzima em relação ao substrato (Condições obtidas em trabalho anterior, dados ainda não publicados) à mistura foi monitorada, titulando-se manualmente e continuamente NaOH 0,1N, de modo a manter o pH constante durante toda a reação. O conteúdo de base consumido foi anotado em intervalos de 5 em 5 min na primeira hora, 10 min na segunda hora, 15 min para as duas horas seguintes e 30 min até que as variações do consumo da base foram insignificantes. O processo de hidrólise foi monitorado através da determinação do grau de hidrólise, que foi obtido pelo método pH-stat ou método de titulação de grupos α -amino liberados em pH e temperatura constantes. (ADLER-NISSEN; 1985). Os ensaios experimentais foram conduzidos de modo a obter amostras com diferentes graus de hidrólise, (GH 6, 12, 18 e 24 %) e com GH de 0%, referente ao concentrado proteico sem sofrer hidrólise proteica (amostra

controle). A reação enzimática foi finalizada pela inativação da enzima por aquecimento a 90°C por 10 min, seguida de resfriamento a temperatura ambiente. Posteriormente, os hidrolisados obtidos em cada um dos diferentes graus de hidrólise foram avaliados quanto as suas propriedades antioxidantes e antimicrobiana.

Perfil Eletroforético

A determinação do perfil eletroforético das proteínas concentradas do okara foi feita de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), utilizando gel tris-HCl com 20% de acrilamida e gel de empilhamento de 4%. A amostra do concentrado foi diluída em uma solução tampão contendo 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol, de modo a obter uma concentração de proteína de 0,4%. A amostra foi aquecida a 95°C por 4 min. Após, alíquotas de 10 μ L de amostra foram aplicadas no gel com 2% de SDS e 20% de glicerol. As análises foram realizadas em um sistema Mini-protein II (Electrophoresis Power Supply Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil), e o gel correu a 120 V. O perfil de massa molecular das proteínas foi determinado utilizando-se o padrão Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA).

Os perfis eletroforéticos dos hidrolisados proteicos com diferentes valores de GH foram feitos de acordo com a metodologia de Schagger, Jagow (1987). Utilizando gel de separação Tris-Tricina com 10% de acrilamida e gel de empilhamento de 4%. As amostra dos hidrolisados foram diluídas em uma solução tampão contendo 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol, de modo a obter uma concentração de proteína de 2% e foram aquecidas à 37 °C por 15 min. Após, alíquotas de 10 μ L de cada amostra foram aplicadas no gel. As análises foram realizadas em um sistema Mini-protein II (Electrophoresis Power Supply Loccus Bioltecnologia). O gel correu inicialmente a 30V até todas as amostras entrarem no gel de empilhamento, aumentando a voltagem a cada 15 min para 50 V, 100 V, 150 V e 190 V. Esta última foi mantida até que o marcador azul atingisse 1 cm da borda inferior do gel, aumentando a voltagem para 240 V. A voltagem foi então aumentada para 270V quando o marcador azul atingiu 0,5 cm da borda inferior do gel e mantido até o final. O perfil de massa molecular das proteínas foi determinado utilizando o

padrão de polipeptídeos (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA).

Determinação da Atividade Antioxidante Utilizando o Radical ABTS

A capacidade antioxidante dos hidrolisados e do concentrado proteico frente ao radical livre ABTS⁺ foi realizada de acordo com Sanchez-Gonzales et al. (2005) com modificações. A solução ABTS foi preparada em meio aquoso. O cátion ABTS⁺ foi produzido reagindo a solução estoque ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM. A solução ABTS⁺ foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4) para uma absorvância de 0,700 em 730 nm. As amostras de concentrado e dos hidrolisados foram diluídas em 4mL da solução ABTS⁺, e as leituras de absorvância a 730 nm foram realizadas após 6 min de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (1,25 a 10 µMol/L) foram usadas para calibração. O ensaio foi realizado em triplicata, e os resultados de capacidade antioxidante foram expressos como µM de Trolox equivalente (TE) por grama de amostra líquida.

Determinação da Atividade Antioxidante Utilizando FRAP – Método de Redução do Ferro

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP, foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, misturando 25 mL de tampão acetato (100 mM; pH 3,6), 2,5 mL de solução estoque de TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine; 10 mM) e 2,5 mL de solução estoque de FeCl₃.6H₂O (20mM). Para a reação, foram adicionados 30 µL de amostra e 70 µL de água destilada a 900 µL de reagente FRAP. Para o branco, foram adicionados 900 µL de reagente FRAP em 100 µL de água destilada. A reação ocorreu no escuro, mantendo a temperatura em 37°C durante 30 min. As leituras de absorvância foram feitas a 593 nm em um espectrofotômetro UV-visível. Os resultados foram correlacionados com uma curva padrão de Trolox constituída com soluções de concentrações variadas de 50 a 500 µM preparados a partir da solução padrão de Trolox (10mM). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados de

capacidade antioxidante foram expressos como μM de Trolox equivalente (TE) por grama de amostralíquida.

Conteúdo de Aminoácidos totais

A composição de aminoácidos do hidrolisado proteico obtido nas melhores condições foi determinada por digestão em HCl 6 N/0,1% de fenol a 110 °C durante 20 h, de acordo com o método Pico-Tag descrito por White et al. (1986). Após hidrólise ácida, a derivatização da amostra foi iniciada por adição de uma solução de etanol:água: trietilamina: fenilisotiocianato (7:1:1:1, v/v), que foi misturada com o auxílio de um misturador de vórtice e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 20 min. A identificação dos aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) utilizando uma coluna LUNA C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA).A qualidade nutricional do hidrolisado foi avaliada pelo escore de aminoácido totais, que compara os níveis de aminoácidos essenciais na amostra com o padrão de proteínas, recomendado pela FAO / WHO (1991).

Determinação da atividade antimicrobiana por difusão por cavidade em ágar

A atividade antimicrobiana dos hidrolisados (GH 6, 12, 18 e 24%) e da amostra controle não-hidrolisada (GH 0%) foram determinadas pelo método de difusão por cavidade em ágar (MUFANDAEDZA et al., 2006) com algumas modificações. As cepas bacterianas, de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) foram reativadas em caldo BHI. A concentração de cada inóculo foi padronizada pelo ajuste da densidade óptica na escala 0,5 de Mc Farland (correspondente a $1,5 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹). Uma alíquota de 100 μL das suspensões foi semeada em ágar Mueller-Hinton. Foram feitos poços de 8 mm aos quais foram adicionados 15 μl do hidrolisado e do concentrado com 5% de proteínas. As placas foram mantidas a 4°C por 3 h para permitir a difusão do caldo concentrado no meio de cultura antes do crescimento das cepas patogênicas, depois as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Para a determinação da atividade antimicrobiana das amostras, os halos de

inibição se formados serão medidos com o auxílio de um paquímetro.

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o *software* Statistica 10 (Statsoft, Tulsa, EUA), para a análise de variância (ANOVA), e teste de comparação de médias de Tukey com 95% de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

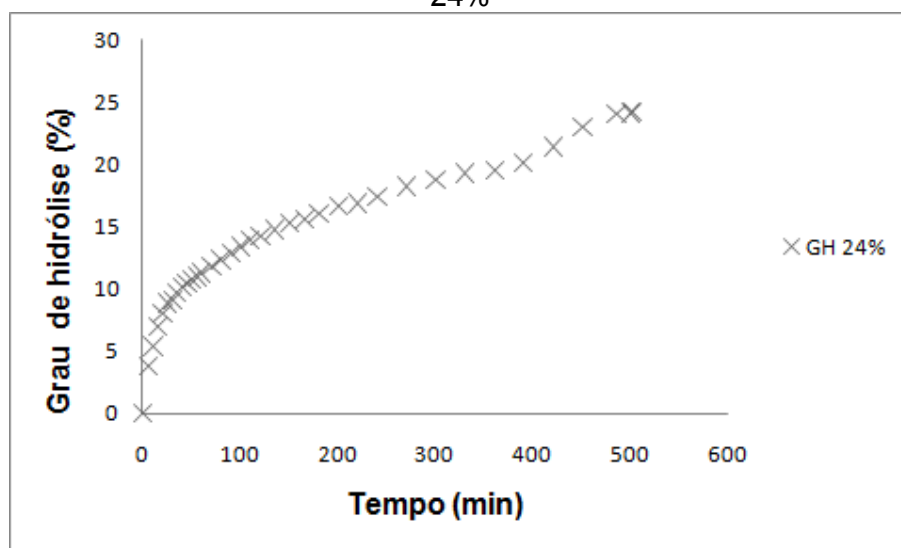
Cinética de Hidrólise Enzimática das proteínas do okara

O comportamento padrão da curva de uma reação enzimática apresenta duas fases distintas. Inicialmente há uma alta taxa de reação, onde ocorre uma quebra intensa de ligações peptídicas com elevado aumento no grau de hidrólise, caracterizado pela alta disponibilidade de substrato no início da reação, que estão sendo clivados rapidamente. Após um determinado tempo, numa segunda fase da reação enzimática, a taxa de reação diminui, tendendo a ficar constante o grau de hidrólise. Tal redução da velocidade da reação pode ser devido à menor disponibilidade de substrato para as enzimas. Também pode ser devido a uma possível inibição das enzimas pelos produtos da própria hidrólise e ou desnaturação das enzimas (GONZÁLEZ-TELLO et al.1994; O'MEARA e MUNRO 1984; ADLER-NISSEN, 1985, KUROZAWA et. al. 2008).

A cinética de reação (Figura 1) mostrou um comportamento não esperado para o hidrolisado com GH 24% com uma pequena elevação no GH (após cerca de 400 min) pouco antes da estabilização da reação, que ocorreu após 8 horas de processo enzimático. Bamdad, Wu e Chen (2011) também observaram comportamento semelhante para hordeína de cevada hidrolisada com a enzima Flavourzyme. Os autores atribuíram esse comportamento aos grupamentos sulfidrilas característicos da hordeína de cevada. Apesar de estar em menor quantidade na composição dos aminoácidos do hidrolisado (Tabela 3), a amostra apresentou 1,48g/100g de proteínas de metionina e 1,60g/100g de proteínas de cisteína que são aminoácidos sulfurados. Segundo Damodaram (2010), essa

interação de pontes de dissulfetos ajuda na estabilidade e manutenção da forma dobrada das proteínas em sua estrutura terciária e provavelmente isso dificultou o acesso da enzima aos sítios de ligação na etapa inicial da reação de hidrólise. Tal clivagem destes sítios ativos pode ter ocorrido somente após 8 horas de processo, indicado pelo aumento do GH.

Figura 1– Cinética da hidrólise enzimática do hidrolisado com grau de hidrólise de 24%



Caracterização das amostras com diferentes graus de hidrólise

Os hidrolisados com diferentes valores de GH e a amostra controle (GH 0%) liofilizados foram caracterizados quanto ao teor de proteínas e umidade (Tabela 1). Para verificar o efeito da hidrólise enzimática proteica, os hidrolisados e a amostra controle foram avaliados quanto ao peso molecular das proteínas por eletroforese, atividade antioxidante, composição total de aminoácidos e atividade antimicrobiana.

Tabela 1- Teores de umidade e proteínas das amostras em diferentes graus de hidrólise (GH).

Amostra	Umidade (g/100g)	Proteínas (g/100g) b.s*
GH 0%	9,56±0,67 ^a	73,61±0,49 ^a
GH 6 %	9,05±0,06 ^a	73,20±0,01 ^a
GH 12 %	9,13±1,39 ^a	70,20±2,56 ^a
GH 18 %	10,34±1,34 ^a	73,63±1,87 ^a
GH24%	9,39±0,28 ^a	70,10±0,79 ^a

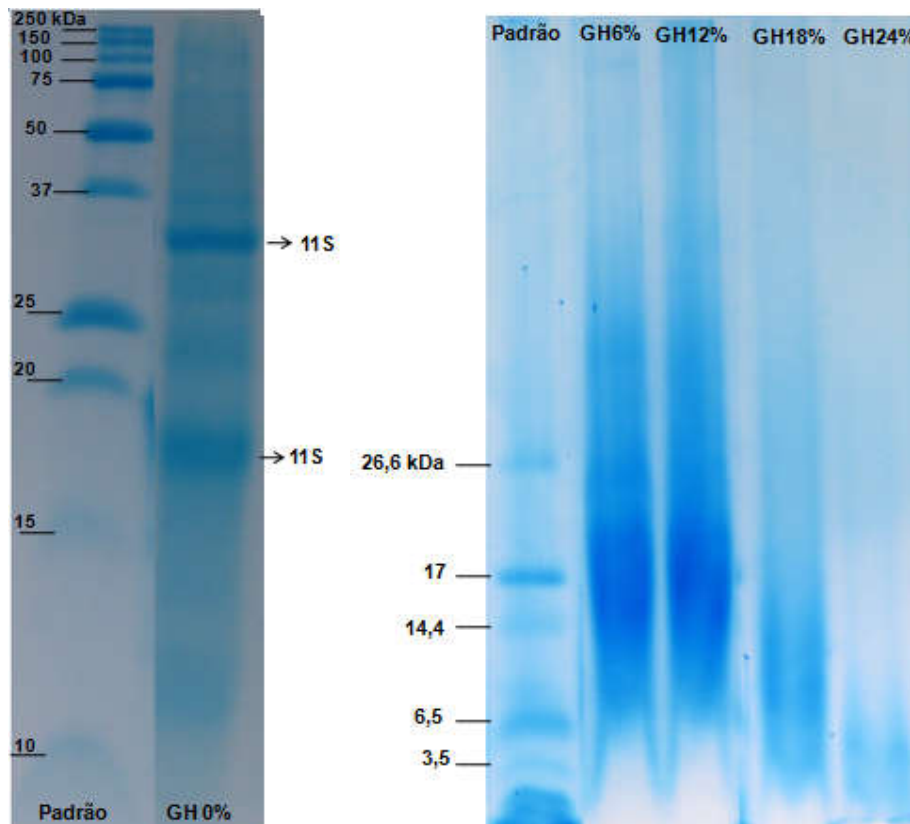
*b.s = base seca. *Média±desvio padrão. Letras diferentes indicam quas as amostras apresentam diferença significativa a 5% ($p < 0.05$).

Eletroforese

O perfil eletroforético da amostra com GH 0% apresentou apenas duas bandas mais evidentes, que estão com peso molecular médio pouco menores que 20 kDa e 37 kDa. Algumas bandas mais fracas de tamanhos variados (Figura 2) também podem ser observadas. A principal proteína da soja é a glicinina, que é composta por polipeptídios ácidos e básicos de aproximadamente 36-40 kDa e 18-20 kDa, respectivamente (RENKEMA et al., 2002; SINGH; MOHAMED, 2007). Provavelmente as duas bandas mais evidentes encontradas da eletroforese são correspondentes aos polipeptídios que formam a glicinina.

Para as amostras que foram hidrolisadas, foi possível verificar o aparecimento de bandas difusas resultado da clivagem das proteínas. Nas amostras com menores GH (6 e 12%), ainda estão presentes em grandes quantidades proteínas com maiores pesos moleculares na faixa de 14,4 a 26,6 kDa, uma vez que as bandas estão extensas e escuras nessas amostras. Já para as amostras com maiores GH (18 e 24%), observa-se também o efeito do processo de hidrólise das proteínas, com bandas difusas de peso molecular inferior a 15 kDa e 7 kDa, respectivamente (Figura 2). Esses resultados mostram que, quanto maior o GH das amostras, menor foi o peso molecular das proteínas restantes no hidrolisado, podendo até ter ocorrido a liberação de aminoácidos livres, que por terem pesos moleculares bem menores, não ficaram retidos no gel de eletroforese impedindo a sua visualização (MAHMOUD, 1994).

Figura 2 – Eletroforese em gel de SDS-PAGE Tris-HCl para a amostra com grau de hidrólise (GH) de 0%, e em SDS-PAGE Tris-Tricina para as amostras com GH 6,12,18 e 24%.



Hamada (2000) verificou que os hidrolisados proteicos do farelo de arroz usando separadamente as enzimas Alcalase e Flavourzyme apresentaram pesos moleculares de 10 a 90 kDa, respectivamente. O autor relatou que apenas 5,3% e 3,8% das proteínas hidrolisadas usando Flavourzyme e Alcalase, respectivamente, ficaram com pesos moleculares entre 1 e 3 kDa. Comparando ao presente trabalho, essa diferença pode ser atribuída ao uso das enzimas separadas, a origem das proteínas e ao baixo GH das amostras, onde esse autor conseguiu 7,5% para Alcalase e 8,8% para a Flavourzyme. Tironi e Anon (2010) obtiveram hidrolisados protéicos de amaranto, em frações com diferentes pesos moleculares sendo entre 10 e 0,25 kDa, que foram separados por cromatografia.

Atividade antioxidante

Como pode ser observada na Tabela 2, a atividade antioxidante das amostras aumentou significativamente com a hidrólise enzimática para ambos os métodos avaliados. A atividade antioxidante de sequestro do radical catiônico ABTS dobrou da amostra não-hidrolisada (GH 0%) para o hidrolisado com GH 6%; entretanto, ao aumentar o GH das amostras (12,18 e 24%), não houve diferença significativa. Já para o método de FRAP, que analisa a capacidade da amostra antioxidante em reduzir o íon férrico, aumentou significativamente entre a amostra não-hidrolisada (GH 0%) e os hidrolisados proteicos. Para as amostras com GH 6, 12 e 18%, houve diferença significativa entre esses hidrolisados. Por outro lado, ao elevar o GH para 24%, ocorreu um aumento na atividade antioxidante de cerca de três vezes maior em comparação a amostra controle (GH 0%). Saito et al. (2003) afirmaram que a proteína hidrolisada possui maior atividade antioxidante se comparada à proteína intacta, uma vez que os grupos R e C-terminais dos aminoácidos ficam expostos após a clivagem das proteínas β -conglícinina e glicínina da soja, e em função do menor peso molecular das amostras após a hidrólise que foi observado na eletroforese (Figura – 2) pode-se afirmar que houve exposição dos grupos R e C-terminais dos aminoácidos dos hidrolisados.

Tabela 2– Atividade antioxidante pelos métodos de ABTS e FRAP.

Amostras	ABTS (mM Trolox/g de Hidrolisado líquido)	FRAP (mM Trolox/g de Hidrolisado líquido)
GH 0%	4,78 ± 0,03 ^b	46,73 ± 0,47 ^c
GH 6%	8,78 ± 0,12 ^a	123,55 ± 0,52 ^b
GH 12%	8,96 ± 0,41 ^a	127,76 ± 5,04 ^b
GH 18%	8,85 ± 0,25 ^a	124,84 ± 4,51 ^b
GH 24%	9,52 ± 0,21 ^a	161,91 ± 4,49 ^a

*Média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam que as amostras apresentam diferença significativa a 5% ($p < 0.05$).

Sbroggio et al. (2016) também obtiveram hidrolisados proteicos de okara em diferentes graus de hidrólise, separadamente com as enzimas Alcalase e Flavourzyme, e obteve resultados semelhantes para as atividades antioxidantes de ABTS e FRAP, que também aumentaram significativamente entre as amostras

hidrolisadas e a amostra controle GH 0%, confirmando que os hidrolisados possuem maior capacidade antioxidante se comparados com a proteína intacta.

As amostras apresentaram maior atividade antioxidante na redução dos íons férricos, se comparada com o método de ABTS que mede a atividade de sequestro de radicais livres das amostras (KUSKOSKI et al., 2005). Segundo Sarmadi e Ismail (2010), a composição de aminoácidos influencia na atividade antioxidante de hidrolisados, sendo que os aminoácidos sulfurados são os que possuem maior atividade de sequestro de radicais livres. De acordo com a Tabela 4 de composição de aminoácidos totais, verifica-se que o hidrolisado proteico do okara é deficiente em aminoácidos sulfurados. Tal fato pode explicar porque as amostras apresentaram maior atividade antioxidante na redução dos íons férricos do que para o sequestro de radical livre.

Conteúdo total de aminoácidos

Estudos relacionam a atividade antioxidante com a presença de determinados aminoácidos. Para verificar essa relação, foi realizada a análise do conteúdo total de aminoácidos (Tabela - 3) da amostra que apresentou maior atividade antioxidante, ou seja, para a amostra com GH 24%.

A tabela 4 mostra o perfil dos aminoácidos encontrados no hidrolisado com GH de 24%. Essa amostra apresentou baixos teores de metionina e cisteína, que são aminoácidos sulfurados, enquanto que os maiores teores de aminoácidos encontrados na amostra foram de ácido glutâmico e aspártico. Esses resultados corroboram ao que foi observado na análise de eletroforese, onde encontrou-se bandas correspondentes aos polipeptídios ácidos e básicos isolados de glicinina, principal proteína encontrada no okara, sendo que, estudos realizados por Yuan et al. (2009) relata que esses polipeptídios ácidos e básicos são ricos em ácido glutâmico e aspártico.

Tabela 3 – Composição total de aminoácidos no hidrolisado protéico.

Aminoácidos Totais	GH24%	FAO/WHO (1991)¹	Escore de aminoácidos
Não essenciais g/100g de proteínas			
Alanina	4,06±0,01		
Arginina	6,44±0,03		
Ác. Aspártico	12,20±0,08		
Cisteína	1,60±0,09		
Ác. Glutâmico	20,48±0,11		
Glicina	4,64±0,01		
Prolina	5,36±0,01		
Serina	5,40±0,02		
Tirosina	4,03±0,01		
Essenciais g/100g de proteínas			
Histidina	2,48±0,01	1,9	1,3
Isoleucina	4,98±0,02	2,8	1,8
Leucina	7,13±0,04	6,6	1,1
Lisina	5,50±0,04	5,8	0,9
Metionina	1,48±0,06	2,5 ²	1,2
Fenilalanina	5,33±0,07	6,3 ³	1,5
Treonina	3,91±0,01	3,4	1,2
Triptofano	Nd	Nd	Nd
Valina	4,96±0,04	3,5	1,4

¹Referencia FAO/WHO (1991) Padrão de aminoácidos essenciais para a criança de 2-5 anos.

²Metionina + Cisteína

³ Fenilalanina + Tirosina

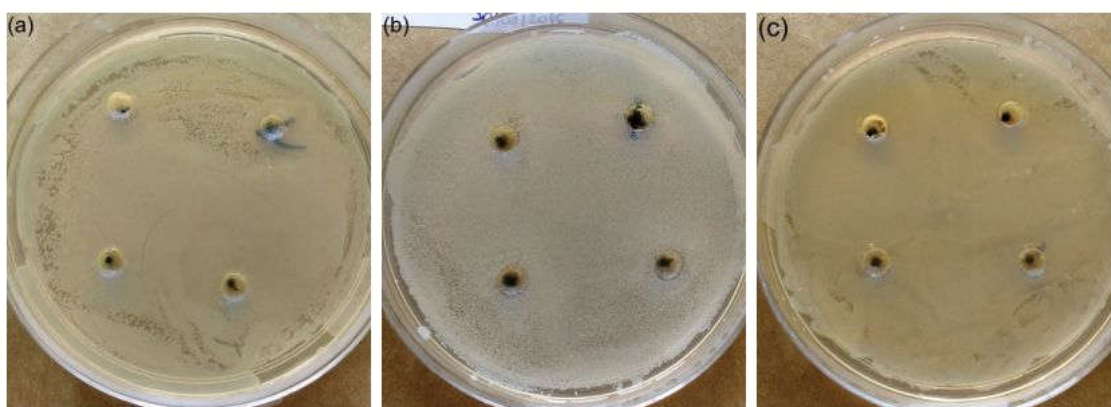
Nd = Não determinado.

Os aminoácidos são divididos em essenciais e não essenciais, sendo que os aminoácidos que são essenciais devem ser ingeridos pela alimentação, pois o organismo humano não consegue sintetizar esses aminoácidos (FRANCO, 2005). Por isso, é importante que amostra analisada tenha um adequado balanço de aminoácidos essenciais. A qualidade nutricional de uma amostra proteica pode ser avaliada pelo escore de aminoácidos, que compara os níveis de aminoácidos essenciais na amostra com os de padrão de proteína (g aminoácidos da amostra/g aminoácidos do padrão), recomendado pela FAO/WHO (1991). Ao analisar a tabela 4, apesar da lisina apresentar o valor de escore abaixo de 1, o hidrolisado ainda pode ser considerado como uma boa fonte de aminoácidos essenciais.

Atividade antimicrobiana

Todas as amostras testadas a 5% de proteínas não apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *E. Coli*, *S. aureus* e *Salmonella*. A Figura 3 ilustra esses resultados para o hidrolisado proteico com GH de 24%. Sitohy, Mahgoub e Osman (2012) encontraram atividade antimicrobiana comparável ao antibiótico penicilina para amostras de glicinina numa concentração de 100 µg/mL. Provavelmente, como nas amostras de hidrolisados neste trabalho a glicinina não foi isolada para os ensaios de atividade antimicrobiana, não foi verificado essa atividade.

Figura 3 – Resultado das placas com o teste da atividade antimicrobiana do hidrolisado com GH 24%. As letras nas imagens se referem ao microorganismo, sendo: (a) - *E. coli* (b) - *S. aureus* (c) – *Salmonella*.



CONCLUSÃO

Com a avaliação dos hidrolisados proteicos em diferentes graus de hidrólises, é possível concluir que o grau de hidrólise é importante para a melhora da atividade antioxidante, principalmente no método de redução de íons férricos, assim como também é importante conhecer os pesos moleculares e a composição de aminoácidos que estão envolvidos nesses mecanismos. Apesar de todas as amostras mostrarem que possuem boa atividade na redução do íon férrico, o aumento no grau de hidrólise aumentou essa atividade, sendo o hidrolisado com GH 24%

que apresentou melhor capacidade de redução de íons ferricos. Já para a capacidade de sequestro de radicais livres, uma hidrólise branda e mais rápida, atingindo apenas GH 6% já é suficiente para obter amostras com boa atividade nesse método. Porém, nenhuma das amostras neste trabalho apresentou atividade antimicrobiana contra as espécies *E. Coli*, *S. aureus* e *Salmonella* com 5% de proteínas. Assim, uma possível aplicação desses hidrolisados deve estar relacionada com a sua alta atividade antioxidante, possivelmente como um ingrediente visando prevenir a oxidação de um sistema alimentar.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (Convênio nº160/2014) e ao CNPq (Processo nº473117/2013-4) pelo apoio financeiro. LEK foi bolsista produtividade em pesquisa da Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (Convênio nº501/2014).

REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.
- AOAC. **Official methods of analysis**. 16ª ed., 3ª rev. Gaithersburg: Published by AOAC International. v.2, cap. 32, p.1-43, 1997.
- BAMDAD, F.; WU, J.; CHEN, L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. **Journal of Cereal Science**. v. 54 p- 20-28, jan, 2011.
- BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. **A review. International Journal of Dairy Technology**, v.63, l 3. p.320-338, ago. 2010
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 239: p.70-76, jul, 1996.
- DAMODARAN, S. Aminoácidos, hidrolisados e proteínas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 5, p. 180-262.

EBRAN, N., JULIENA, S., ORANGEB, N., SAGLIO, P., LEMAÎTREA, C., MOLLE, G. Pore-forming properties and antimicrobial activity of proteins extracted from epiderma mucus offish. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 122, p. 181–189. feb, 1999.

ELIAS, R. J., KELLERBY, S. S., DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 48(5), p. 430–441. may, 2008.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Evaluation of protein quality. **Joint FAO/WHO report**. Rome: FAO Food Nutrition. 1991.

FIGUEIREDO, V, R, G. **Concentração e hidrólise enzimática das proteínas do okara**. 2015. 113f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 2015.

FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos / Food composition tables. **Atheneu**; 307 p. São Paulo 2005.

GOBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. **Internacional Journal of Dairy Technology**. v. 57, n.2/3, apr, 2004.

GONZÁLEZ-TELLO, P., CAMACHO, F., JURADO, E., PÁEZ, M. P., GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey protein: Kinetic models. **Biotechnology and Bioengineering**. v 44, p. 523 – 527, aug, 1994.

HAMADA, J.S.; Characterization and Functional Properties of Rice Bran Proteins Modified by Commercial Exoproteases and Endoproteases. **Journal Of Food Science**. Vol. 65, No. 2, mar, 2000.

JAMDAR, S. N., RAJALAKSHMI, V., PEDNEKAR, M. D., JUAN, F., YARDI, V., SHARMA, A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 121(1), p. 178-184. jul, 2010.

KARAMAĆ, M., KULCZYK, A., SULEWSKA, K. Antioxidant activity of hydrolysates prepared from flaxseed cake proteins using pancreatin. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 64(4), p. 227-233, dec, 2014.

KUROZAWA, L.E.; PARK, K.J.; HUBINBER, M.D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. **Journal Food Science**, v.73, p.405-412, jun, 2008.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO A. G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FET, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v 25(4): 726-732, out.-dez. 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v. 227, n. 15, p. 685-689, aug,1970.

MA, C.-Y.; LIU, W.-S.; KWOK, K.C.; KWOK, F. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**, vol. 29, n. 8, p. 799-805. dec. 1997.

MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, 48, 89-113. oct,1994.

SITOHY, M. Z.; MAHGOUB.;S. A.; OSMAN, A O.In vitro and in situ antimicrobial action and mechanism of glycinin and itsbasic subunit. **International Journal of Food Microbiology**. v. 154,p. 19–29, dec, 2012.

MUFANDAEDZA, J.; VILJOEN, B. C.; FERESU, S. B.; GADAGA, T. H. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic Escherichia coli and Salmonella enteritidis strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 147-152, apr, 2006.

O'MEARA, G.M.; MUNRO, P.A. Selection of a proteolytic enzyme to solubilize lean beef tissue. **Enzyme Microbial Technology**, n. 6, p.181–185, oct, 1984.

RENKEMA, J. M. S.; GRUPPEN, H.; VAN VLIET, T. Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6064-6071,oct, 2002.

ROSSET, M.; JUNIOR, A.V.R.; BELÉIA, A. D. P. Protein extraction from defatted soybean flour With viscozyme I pretreatment. **Journal of Food Processing and Preservation**. n. 38, p.784–790, sep, 2012.

SAITO, K; JIN, DH; OGAWA, T; MURAMOTO, K; HATAKEYAMA, E; YASUHARA, T; NOKIHARA K.Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorialchemistry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51,p. 3668–74, jun, 2003.

SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v. 90, p.133-139, apr, 2005.

SARMADI, B.H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v.31,n.10, p.1949-1956, otc, 2010.

SBROGGIO, M. F.; GEORGETT S. R.; MONTILHA, M. S.; FIGUEIREDO, V. R. G.; KUROZAWA, L. E.Influence of the degree of hydrolysis and type of enzymeon antioxidant activity of okara protein hydrolysates. **Food Science and Technology**. vol.36 no.2 Campinas Apr./June 2016.

SCHAGGER, H.; JAGOW, G.V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, São Diego, v. 166, n. 2, p. 368-379; Feb.1987.

SINGH, M.; MOHAMED, A. Influence of gluten-soy protein blends on the quality of reduced carbohydrates cookies. **Food Science and Technology**. V. 40, ed. 2, P. 353–36 . Mar, 2007.

TIRONI, V. A.; AÑÓN M. C.; Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. **Food Research International**. v. 43. p 315–322, jan, 2010.

VIOQUE, J.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; PEDROCHE, J.; BAUTISTAB, J.; MILLANA, F.; Production and Characterization of an Extensive Rapeseed Protein Hydrolysate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Vol. 76, no. 7, sep, 1999.

WANG, L.; XIONG, Y., Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9186-9192, nov, 2005.

WHITE, J. A., HART R. J., KRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, vol 8, pp170-177, 1986.

YUAN, D. -B., YANG, X. -Q., TANG, C. -H., ZHENG, Z. -X., MIN, W., AHMAD, I., YIN, S. -W. Physicochemical and functional properties of acidic and basic polypeptides of soy glycinin. **Food Research International**, v 42, 5-6, p 700-706. feb, 2009.

6. CONCLUSÃO

Com este trabalho, foi possível otimizar a hidrólise enzimática das proteínas do okara e verificar qual a melhor condição para se obter maior grau de hidrólise, utilizando duas enzimas com ações catalíticas diferentes, que foi com a temperatura de 40°C, pH 7,1, razão enzima substrato de 5% e 90% de Alcalase e 10% de Flavourzyme na mistura das suas enzimas. Também foi possível obter amostras com elevada atividade antioxidante, principalmente com a capacidade de redução do íon férrico, baixo peso molecular, adequada qualidade nutricional na composição total de aminoácidos essenciais e que o grau de hidrólise pode influenciar nessas propriedades e melhorar a atividade antioxidante para o método de FRAP. Porém, nenhuma das amostras neste trabalho, apresentou atividade antimicrobiana com 5% de proteínas. Assim, uma possível aplicação desses hidrolisados deve estar relacionada com a sua alta atividade antioxidante.