



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VITÓRIA RIBEIRO GARCIA DE FIGUEIREDO

**CONCENTRAÇÃO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS
PROTEÍNAS DO *OKARA***

Londrina
2015

VITÓRIA RIBEIRO GARCIA DE FIGUEIREDO

**CONCENTRAÇÃO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS
PROTEÍNAS DO OKARA**

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

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F475c Figueiredo, Vitória Ribeiro Garcia de.
Concentração e hidrólise enzimática das proteínas do *okara* / Vitória Ribeiro
Garcia de Figueiredo. – Londrina, 2015.
110 f. : il.

Orientador: Louise Emy Kurozawa.

Coorientador: Elza louko Ida.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Ciência de Alimentos, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos fermentados – Teses. 2. Proteínas na nutrição humana –
Teses. 3. Produtos agrícolas – Processamento – Teses. 4. Soja – Teor
proteico – Teses. 5. Hidrólise – Teses. 6. Peptídeos – Teses. I. Kurozawa,
Louise Emy. II. Ida, Elza louko. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV.
Título.

CDU 664.6/.7

VITÓRIA RIBEIRO GARCIA DE FIGUEIREDO

**CONCENTRAÇÃO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO
OKARA**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado de Ciência em Alimentos da
Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Louise Emy Kurozawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Vera de Toledo Benassi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa

Prof^a. Dra. Thaís de Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de abril de 2015.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, pelo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e ter me permitido esta conquista.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Louise Emy Kurozawa pela orientação, atenção, paciência, e ensinamentos ao longo destes anos.

À minha co-orientadora Dra. Elza Ioko Ida, pela atenção, incentivo, e por todos os ensinamentos.

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

À professora Dra. Thaís de Souza Rocha, pela atenção, auxílio, ensinamentos e colaboração na realização da eletroforese.

Ao professor André Vanzela, pelo ensinamento e colaboração na realização da microscopia.

À Sandra Rezende, por toda atenção e auxílio.

À Cintia Ladeira Handa e Fernando Sanches de Lima pelo auxílio e colaboração.

Ao departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por toda a acolhida e auxílio.

À Fundação Araucária e a CAPES, pelo auxílio financeiro dado a esta pesquisa e a bolsa de estudo.

À empresa COCAMAR, pela doação do *okara*.

À empresa Tovani Benzaquen, pela doação das enzimas.

Aos meus pais, por todo esforço realizado para comigo, pelo apoio, incentivo, compreensão, confiança e amor.

Ao Marcus Vinícius, por estar presente na minha vida e ser o responsável por muitos momentos de felicidade, pelo carinho e amor.

A todos os meus amigos que tive o prazer de conhecer durante o curso, compartilhando ensinamentos e os bons momentos.

Aos meus amigos distantes ou presentes, pelos momentos de amizade, compreensão e diversão.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, tiveram sua parcela de participação durante a execução e conclusão deste trabalho.

“O êxito na vida não se mede por aquilo conquistado, mas pelas dificuldades que foram superadas pelo caminho” (Abraham Lincoln).

FIGUEIREDO, Vitória Ribeiro Garcia de. **Concentração e Hidrólise Enzimática das Proteínas do Okara**. 2015. 110 f. Dissertação de Mestrado de Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma semente oleaginosa pertencente à família Fabaceae, e o Brasil está entre os maiores produtores do mundo. A divulgação de seus benefícios à saúde humana resultou em uma crescente procura dos derivados de soja, entre eles, os fermentados, o concentrado proteico, as farinhas e farelos de soja, e o extrato aquoso de soja. A produção deste último gera um subproduto denominado *okara*, o qual apresenta elevada qualidade nutricional. Esse trabalho teve como objetivo otimizar o processo de extração e hidrólise das proteínas do *okara*. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas: otimização no pré-tratamento do *okara* com o complexo multi-enzimático Viscozyme[®] (composto por celulase, hemicelulase, xilanase e a β -glucanase) para a extração e concentração das proteínas, a otimização da hidrólise proteica com a protease Alcalase[®], e caracterização do hidrolisado proteico quanto às análises de atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP, conteúdo de isoflavonas, eletroforese em gel de policrilamida. A partir deste trabalho, foi possível obter a seguinte condição ótima do pré-tratamento do *okara* com o complexo multi-enzimático: 53°C, pH 6,2 e concentração de enzima de 4%, demonstrando que a ação enzimática sobre a parede celular pode melhorar significativamente a extração de proteínas do *okara*. Na etapa de hidrólise enzimática proteica, foi possível determinar a condição ótima de 55°C, pH 9 e razão enzima:substrato de 5% para se obter um hidrolisado proteico de *okara* com elevado grau de hidrólise. O hidrolisado obtido na condição ótima ainda apresentou maior conteúdo de isoflavonas agliconas e capacidade antioxidante em comparação com a amostra não hidrolisada.

Palavras-chave: Concentrado proteico. Hidrólise enzimática. Peptídeos bioativos. Planejamento experimental. *Okara*.

FIGUEIREDO, Vitória Ribeiro Garcia de. **Concentração e Hidrólise Enzimática das Proteínas do Okara**. 2015. 110 p. Dissertação de Mestrado de Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is an oilseed that belongs to the Fabaceae family, and Brazil is among the largest producers in the world. The disclosure of its health benefits results in a growing demand for soy products, among them, fermented, protein isolate, flour and soybean meals, and soymilk. This production generates a byproduct known as *okara*, which has a high nutritional quality. This research aimed to optimize the extraction process and enzymatic hydrolysis of *okara* protein. For this study, the following steps were performed: optimization of the pre-treatment with *okara* Viscozyme® multienzyme complex (consisting of cellulase, hemicellulase, xylanase and β -glucanase), and the extraction and concentration of protein, the optimization of the protein enzymatic hydrolysis by Alcalase and characterization of protein hydrolyzate as the analysis of antioxidant activity by ABTS and FRAP methods isoflavones content polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum condition for pre-treatment of *okara* with multienzyme complex were: 53 °C, pH 6.2 and 4% concentration of enzyme. It has been demonstrated that the enzyme action on the cell wall can significantly improve extraction of protein from *okara*. The optimum condition for: 55 °C, pH 9 and 5% of enzyme:substrate ratio, in order to obtain a protein hydrolyzate with a high hydrolysis degree. This hydrolyzate has shower content of aglycone isoflavones and antioxidant capacity higher than the non-hydrolyzed sample.

Key words: Bioactive peptides. Enzymatic hydrolysis. Experimental design. *Okara*. Protein concentrate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Composição química de aminoácidos.....	24
Figura 2 – Estrutura química de isoflavona genisteína.....	27
Figura 3 – Estrutura química das isoflavonas encontradas em grãos de soja.....	28
Figura 4 – Fluxograma do processo de concentração das proteínas.....	43
Figura 5 – Montagem experimental para a hidrólise enzimática do okara.....	45

Artigo A

Figura 1 – Superfície de resposta indicando a influência das variáveis independentes sobre a função-resposta CP: A) concentração de enzima e temperatura; B) pH e concentração de enzima; C) pH e temperatura.....	72
Figura 2 – Parâmetro de desejabilidade estimado na condição de máximo conteúdo de proteína e recuperação de proteína simultaneamente	74
Figura 3 – Microscopia de fluorescência da amostra de <i>okara</i> antes do pré-tratamento utilizando coloração com calcoflúor observada com filtro de 360-400 nm, e autofluorescência em filtro 560-595 nm. (A) visão geral do agregado de parede celular com aumento de 40 vezes em filtro de 360-400 nm; recorte de paredes celulares íntegras com aumento de 100 vezes em filtro de 360-400 nm (B) e em filtro 560-595 nm (C); visão geral do agregado de parede celular após o pré-tratamento com complexo multi-enzimático com aumento de 40 vezes em filtro de 360-400 nm (D) e em filtro 560-595 nm (E).....	77

Artigo B

Figura 1 – Cinética de hidrólise enzimática das proteínas do concentrado de <i>okara</i> : A) Ensaio fatoriais; B) Ensaio axiais; e C) Ensaio centrais.....	92
Figura 2 – Superfície de resposta da influência das variáveis independentes sobre a resposta grau de hidrólise: A) razão enzima substrato e temperatura; B) pH e razão enzima substrato; C) pH e temperatura	94

Figura 3 – Cinética de hidrólise enzimática proteica do <i>okara</i> média na condição otimizada.....	96
Figura 4 – Eletroforese das proteínas do <i>okara</i> concentrado e hidrolisado.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção brasileira de soja 2000/2014	21
Tabela 2 – Produção brasileira de soja safra 2013/2014 de acordo com a região	22
Tabela 3 – Ensaio do planejamento experimental variando os parâmetros temperatura (T) pH e concentração de enzima (E) nos experimentos de pré-tratamento	41
Tabela 4 – Ensaio do planejamento experimental variando os parâmetros temperatura (T) pH e razão enzima substrato (E/S), nos experimentos de hidrólise.....	44

Artigo A

Tabela 1 – Planejamento experimental com as variáveis independentes reais e codificadas e funções-respostas avaliadas	67
Tabela 2 – Composição centesimal em base seca do <i>okara</i> desengordurado	70
Tabela 3 – Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre as funções-respostas CP e RP, após a exclusão dos parâmetros não-significativos	71

Artigo B

Tabela 1 – Planejamento experimental (valores reais e codificados) para determinação do grau de hidrólise em diferentes condições de temperatura (T) pH e razão enzima: substrato (E/S).....	86
Tabela 2 – Estimativa dos efeitos sobre o teor de proteína, após a exclusão dos parâmetros não-significativos	93
Tabela 3 – Teor de isoflavonas (base seca) no concentrado e hidrolisado proteico do <i>okara</i>	99
Tabela 4 – Atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS e FRAP (μmol de trolox/g de amostra)	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Aminoácidos essenciais presentes no grão de soja.....	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Grau de dissociação
ABTS	2,2',azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
AACC	American Association of Cereal Chemists
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AU	Unidade Anson
bs	Base seca
CP	Conteúdo de proteína (%)
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DCCR	Delineamento composto central rotacional
E	Concentração de enzima (AU/l)
E/S	Relação enzima:substrato (%)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FBG	Fungal Beta Glucanase
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GH	Grau de hidrólise (%)
h	Número de ligações peptídicas (moles equiv/kg)
h_{total}	Número total de ligações peptídicas antes da reação (moles equiv/kg)
MP	Massa de proteína (g)
MP_{conc}	Massa de proteína do concentrado(g)
MP_{okara}	Massa de proteína na farinha de <i>okara</i> (g)
m_{conc}	Massa do concentrado (g)
m_{okara}	Massa de farinha de <i>okara</i> (g)
N_b	Normalidade da base
RP	Recuperação de proteína (%)
Rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T	Temperatura (°C ou K)
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazine
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloride
V_{NaOH}	Volume da base consumida (mL)

X_{conc} Conteúdo de proteína no concentrado (g/g fração);
 X_{okara} Conteúdo de proteína na farinha de *okara* (g/g farinha)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
	2.1 Objetivo geral.....	19
	2.2 Objetivos específicos.....	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
	3.1 Soja.....	20
	3.1.1 Proteína da soja	23
	3.1.2 Isoflavonas	26
	3.2 Subproduto da soja: Okara.....	29
	3.3 Concentrado protéico	31
	3.4 Hidrólise enzimática proteica	32
	3.4.1 Peptídeos bioativos	35
	3.5 Pré-tratamento enzimático com carboidrases para extração de proteínas	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
	4.1 Material e preparo da amostra.....	39
	4.2 Métodos.....	39
	4.2.1 Composição centesimal da farinha desengordurada do okara	39
	4.2.1.1 Determinação de umidade.....	40
	4.2.1.2 Determinação de cinzas	40
	4.2.1.3 Determinação do teor de proteínas totais.....	40
	4.2.1.4 Determinação do teor de lipídios.....	40
	4.2.1.5 Determinação de carboidratos totais	40
	4.2.2 Pré-tratamento da farinha de okara com a enzima Viscozyme®, extração e concentração das proteínas.....	41
	4.2.3 Hidrólise Enzimática do Concentrado Proteico pela Alcalase®.....	44
	4.2.3.1 Grau de hidrólise.....	46

4.2.4	Avaliação do hidrolisado proteico obtido na condição otimizada	47
4.2.4.1	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-Page).....	47
4.2.4.2	Extração e Quantificação de Isoflavonas.....	48
4.2.4.3	Atividade antioxidante pelo método da capacidade sequestradora do radical ABTS+ (2,2',azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))	49
4.2.4.4	Atividade antioxidante pela atividade inibidora da peroxidação lipídica independente de Fe+2	49
4.2.4.5	Microscopia Óptica de Fluorescência	50
	REFERÊNCIAS.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSÃO	62
5.1	Artigo Científico A	63
5.2	Artigo científico B.....	81
6	CONCLUSÃO.....	110

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa conhecida pelos chineses há cerca de cinco mil anos, sendo reconhecida por seu alto valor nutricional e versatilidade de aplicação. Apresenta grande importância socioeconômica, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial (SOMMIER et al., 2005).

O grão de soja contém alguns compostos de comprovada ação benéfica à saúde humana, e essa informação vem provocando um crescente interesse pelos produtos derivados da soja. Entre eles, o tofu (queijo de soja), farinha e farelo de soja, e extrato aquoso de soja (BOWLES, DEMIATE, 2006).

O processo de obtenção do extrato aquoso, que é capaz de extrair somente os componentes solúveis em água, gera um subproduto denominado pelos orientais de *okara*, o qual apresenta um valor nutritivo semelhante aos grãos com um elevado teor de proteínas de boa qualidade. As indústrias que elaboram o extrato de soja destinam o *okara*, quase que em sua totalidade, à alimentação animal ou descartam-o como resíduo orgânico. Os subprodutos gerados no processamento dos vegetais resultam em problemas econômicos e ambientais; entretanto, a minimização de resíduos pode ser uma alternativa bem sucedida para a indústria de alimentos e demais ramos industriais, que são caracterizados como potenciais poluidores (VIEIRA, 2006).

Atualmente, há uma crescente utilização das proteínas de alimentos hidrolisadas na elaboração de ingredientes proteicos funcionais e suplemento nutricional. A hidrólise da proteína presente no *okara* é uma boa maneira de reaproveitar esse subproduto, melhorando nutricionalmente produtos alimentícios que utilizam *okara* na sua composição. A hidrólise enzimática apresenta os seguintes benefícios: não resulta em reações indesejáveis, com formação de produtos tóxicos; seu processo transcorre sob condições mais amenas; apresenta efetividade em baixas concentrações; e não diminui o valor nutricional das proteínas (PHILLIPS; BEUCHAT, 1981).

A hidrólise enzimática de proteínas alimentares pode originar peptídeos capazes de modular funções fisiológicas, denominados peptídeos bioativos. Estes peptídeos são, atualmente, de grande interesse da indústria alimentícia, principalmente devido sua capacidade antioxidante.

Tendo em vista a potencial aplicação do *okara* na indústria alimentícia, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o pré-tratamento do *okara* com complexo multi-enzimático Viscozyme®, visando aumentar a eficiência de extração de suas proteínas, e otimizar a hidrólise destas pela ação de protease.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar os processos de extração das proteínas do *okara* para obtenção de concentrados proteicos e hidrólise enzimática dessas proteínas.

2.2 Objetivos específicos

- a) Verificar o efeito do pré-tratamento enzimático do *okara* com o complexo multi-enzimático Viscozyme[®] sobre a extração e concentração das proteínas, utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR);
- b) Determinar a condição ótima (temperatura, pH e concentração de enzima) para a extração e concentração das proteínas do *okara*, de modo a maximizar a recuperação de proteína e o conteúdo de proteína no concentrado proteico;
- c) Avaliar o efeito da temperatura, razão enzima:substrato e pH sobre o concentrado proteico pela endopeptidase Alcalase[®] através de um DCCR;
- d) Otimizar o processo de hidrólise enzimática proteica, definindo a condição ótima que permita maximizar o grau de hidrólise;
- e) Caracterizar o hidrolisado proteico obtido na condição otimizada em termos de composição de isoflavonas, perfil eletroforético e atividade antioxidante.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma semente oleaginosa pertencente à família Fabaceae e apresenta como centro de origem e domesticação o nordeste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Amarelo, na China. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais, entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (HALL, 1971; EMBRAPA, 2014).

Apesar de conhecida e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos, e somente em 1882, a soja chegou ao Brasil pelo professor da Escola de Agronomia da Bahia, Gustavo Dutra, que realizou os primeiros estudos de avaliação de cultivares introduzidas neste país (SOMMIER et al., 2005; EMBRAPA, 2014). Segundo Bonetti (1981) e EMBRAPA (2014), em 1900 e 1901, o Instituto Agrônomo de Campinas, SP, promoveu a primeira distribuição de sementes de soja para produtores paulistas. Em 1914, no município de Santa Rosa, Rio Grande do Sul, têm-se o primeiro registro de cultivo, sendo este por fim, o lugar onde as variedades trazidas dos Estados Unidos melhor se adaptaram às condições climáticas.

Desta forma, a soja se estabeleceu como cultura e se expandiu inicialmente no sul do Brasil, durante os anos 60 e 70 e, posteriormente, nos Cerrados do Brasil Central, anos 80 e 90. O crescimento dessa cultura no país se deve aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias ao setor produtivo, à mecanização e à criação de cultivares altamente produtivas adaptadas às diversas regiões (KIIHL, GARCIA, 1989; EMBRAPA, 2014).

Ao longo das últimas décadas, a produção brasileira de soja apresentou um grande avanço, com aumento na produtividade média e na área cultivada. A produção brasileira saltou de 13,2 em 1985/86 para 75,3 milhões de toneladas em 2010/11, o que rendeu uma participação significativa na oferta e demanda de produtos do complexo agroindustrial da soja no âmbito mundial. A estimativa de julho de 2014 apresentou a safra de 2013/2014 com uma produção de

86.273,2 milhões de toneladas (LAZZAROTTO, HIRAKURI, 2010; CONAB, 2014). Pode-se observar o crescimento de produção brasileira de soja na Tabela 1.

Tabela 1- Produção brasileira de soja 2000/2014.

Safra	Produção de soja (em mil toneladas)
2000/2001	38.431,8
2001/2002	41.916,9
2002/2003	52.017,5
2003/2004	49.792,7
2004/2005	52.304,6
2005/2006	55.027,1
2006/2007	58.391,8
2007/2008	60.017,7
2008/2009	57.165,5
2009/2010	68.688,2
2010/2011	75.324,3
2011/2012	66.383,0
2012/2013	81.449,4
2013/2014	86.273,2

Fonte: Conab, 2014

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, logo atrás dos Estados Unidos, porém apresenta uma tendência de produção que pode ultrapassar a barreira dos 100 milhões de toneladas em até 2020. Isso se deve ao expressivo aumento da oferta de tecnologias de produção, que permitiram ampliar significativamente a área cultivada e a produtividade da oleaginosa (LAZZAROTTO, HIRAKURI, 2010; VENCATO, 2010).

Atualmente, o Centro Oeste é a região brasileira que mais se destaca na produção, sendo o estado do Mato Grosso o maior produtor de soja no Brasil, como pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2- Produção brasileira de soja safra 2013/2014 de acordo com a região.

REGIÃO/UF	PRODUÇÃO (em mil t)
NORTE	3.344,4
RR	56,2
RO	608,8
PA	551,5
TO	2.127,9
NORDESTE	6.557,3
MA	1.838,9
PI	1.489,2
BA	3.229,2
CENTRO-OESTE	42.010,8
MT	27.010,2
MS	6.148,0
GO	8.636,6
DF	216,0
SUDESTE	5.044,0
MG	3.298,6
SP	1.754,4
SUL	29.316,7
PR	14.804,6
SC	1.644,4
RS	12.867,7
NORTE/NORDESTE	9.901,7
CENTRO-SUL	76.371,5
BRASIL	86.273,2

Fonte: Conab, 2014

A soja é um produto agrícola de grande interesse mundial graças à versatilidade de aplicação de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional. Além disso, trata-se de uma *commodity* padronizada e uniforme, podendo ser produzida e negociada por produtores de diversos países, apresentando alta liquidez e demanda (SOMMIER et al., 2005; LAZZAROTTO, HIRAKURI, 2010).

Um dos principais fatores que contribuem para o aumento no consumo mundial de soja está no crescente poder aquisitivo da população nos países em desenvolvimento e na procura por alimentos derivados de soja. Essa mudança no hábito alimentar se deve à divulgação dos benefícios à saúde trazidos por esse tipo de alimento (SOUZA; VALLE; MORENO, 2000; VENCATO, 2010).

Há uma crescente procura por alimentos derivados de soja como alimentos funcionais, não somente no Japão e na China, como na Europa e Estados Unidos. Isso se deve às várias atividades fisiológicas que esta leguminosa apresenta (PARK et al., 2001)

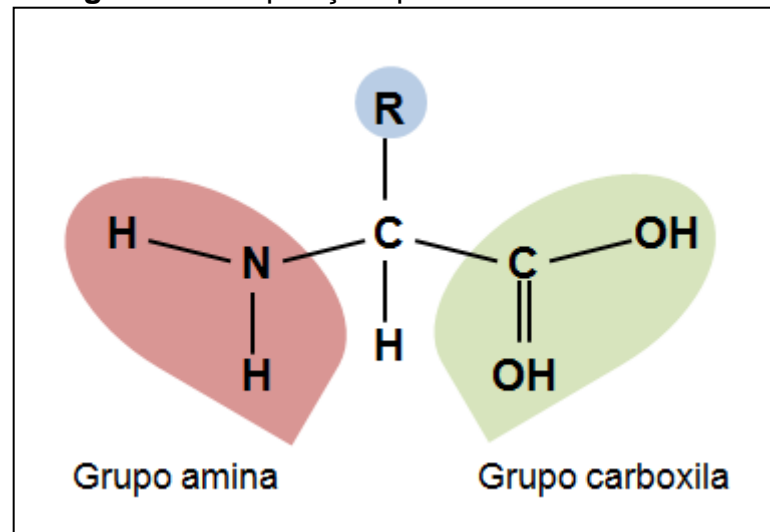
A utilização de produtos à base de soja na dieta humana contribui para uma melhor qualidade nutricional, uma vez que, além do alto teor proteico, apresenta componentes como isoflavonas, fosfolipídios, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. Diversos estudos relatam que a ingestão de soja resulta na redução dos níveis plasmáticos de colesterol, redução em alguns tipos de câncer, diabetes e obesidade, e proteção contra doenças de rim e intestino (FRIEDMAN; BRANDON, 2001; LA SOJA, 2014).

O que determina a importância econômica da soja é a sua composição química peculiar, que pode apresentar variações de acordo com as condições climáticas, variedade e de cultivo. Em média, o grão de soja contém 15 a 20% de óleo, 30% de carboidratos, 10 a 13% de umidade e aproximadamente 5% de minerais e cinzas. Entretanto, ela se destaca entre os cereais e as leguminosas, por apresentar o maior conteúdo proteico, cerca de 40% em base seca, sendo que em outros legumes esse teor é de 20 a 30%, e nos cereais, varia de 8 a 15% (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998; GOLBITZ & JORDAN, 2006).

3.1.1 Proteína da soja

Proteínas são macromoléculas biológicas constituídas por peptídeos, que contém de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos por ligações covalentes peptídicas. Com exceção da prolina, todos os aminoácidos presentes nas proteínas são α -aminoácidos e apresentam grupamentos α -amino e α -carboxílicos ligados ao mesmo átomo de carbono (Figura 1). Diferem entre si nas suas cadeias laterais (grupos R), que variam em estrutura, tamanho, carga elétrica e solubilidade em água. A sequência desses aminoácidos confere às proteínas atividades metabólicas específicas, como a formação de tecidos, enzimas entre outras (GUTTE, 1995; LEHNINGER, 1995).

Figura 1- Composição química de aminoácidos.



Fonte: Adaptado de Branden e Tooze (1999).

As cadeias de aminoácidos são denominadas cadeias polipeptídicas e seu processo de formação é conhecido como polimerização de aminoácidos. Durante a polimerização, o grupo amina de um aminoácido é ligado de forma covalente ao grupo carboxila do aminoácido seguinte, ocorrendo a eliminação de uma molécula de água. Desse modo, a cadeia polipeptídica apresenta a terminação amina à esquerda e a terminação carboxila à direita (HIGA, 2009).

As proteínas da soja são reconhecidas na indústria alimentícia por seu elevado valor nutritivo, e funcionalidade tecnológica, e com o seu uso é possível aumentar a ingestão de aminoácidos essenciais (SOUZA, et al., 2000). Sua composição 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).

Nos grãos de soja, cerca de 40% do total de matéria seca é proteína e, deste total, 90% podem ser extraídos com água ou soluções salinas. Em seu ponto isoelétrico (pH 4,5), são insolúveis em água, entretanto, em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico, as proteínas são solúveis em água ou soluções salinas diluídas (SGARBIERI, 1996; LIU, 1997).

Em condições de dissolução em água com pH ligeiramente alcalino, e utilização de ultracentrifugação, 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 15 (BADLEY et al., 1975). Segundo Wolf e Nelsen (1996) e Liu (1997), as proteínas da soja são classificadas de acordo com seu coeficiente de sedimentação em:

- Fração 2S: corresponde a 22% das proteínas extraídas em água e é composta principalmente pelos inibidores de tripsina.
- Fração 7S: corresponde a 37% das proteínas extraídas em água e contém hemaglutininas, lipoxigenases, β -amilase e globulinas 7S, também denominada de β -conglucina.
- Fração 11S: corresponde a 31% das proteínas extraídas em água e é composta unicamente pela globulina 11S, também denominada glicina.
- Fração 15S: corresponde a 11% das proteínas extraídas em água, e apresenta-se como dímero de glicina estável a força iônica superior a 0,5 M.

A fração 7S é uma proteína glicosilada trimérica, contendo três subunidades diferentes, α , α' e β , com massa molar de 62, 65 e 47 kDa, respectivamente.

Já a fração 11S, composta principalmente pela glicina, é um hexâmero de monômeros composto por polipeptídeos ácidos (36-40 kDa) e básicos (18-20 kDa) ligados por pontes dissulfeto (RENKEMA et al., 2002; SINGH; MOHAMED, 2005). As globulinas 7S constituem mais da metade da fração 7S e podem ser classificadas de acordo com o seu coeficiente de sedimentação como: em tampão fosfato, pH 7,6 e força iônica 0,1 M. Segundo Fukushima (1994) e Renkema et al. (2000), a β -conglucina (globulina 7S) e a glicina (globulina 11S) são as principais proteínas de reserva da soja.

De acordo com Almeida e Simão, (1972), Acasio (1997) e Baker (2000) as proteínas da soja são formadas por 18 aminoácidos, apresentando altos níveis de lisina, o que qualifica ainda mais este grão como excelente fonte de proteína vegetal. No entanto, apresentam uma baixa concentração dos aminoácidos sulfurados metionina e cistina.

As proteínas da soja possuem um elevado número de aminoácidos essenciais (Quadro 2) e a alta proporção de lisina/arginina contribuem para a redução dos níveis séricos de colesterol (JACKSON et al., 2001).

Quadro 1- Aminoácidos essenciais presentes no grão de soja

Aminoácidos essenciais	g/kg de proteína
Arginina	75,0±2,43
Fenilalanina	48,4 ± 1,91
Histidina	35,1 ± 1,04
Isoleucina	53,7 ± 1,35
Leucina	82,5 ± 3,39
Lisina	80,9 ± 2,05
Metionina	10,6 ± 0,19
Treonina	53,1 ± 1,30
Triptofano	11,4 ± 0,87
Valina	55,8 ± 1,42

Fonte: adaptado Waliszewski et al., 2002

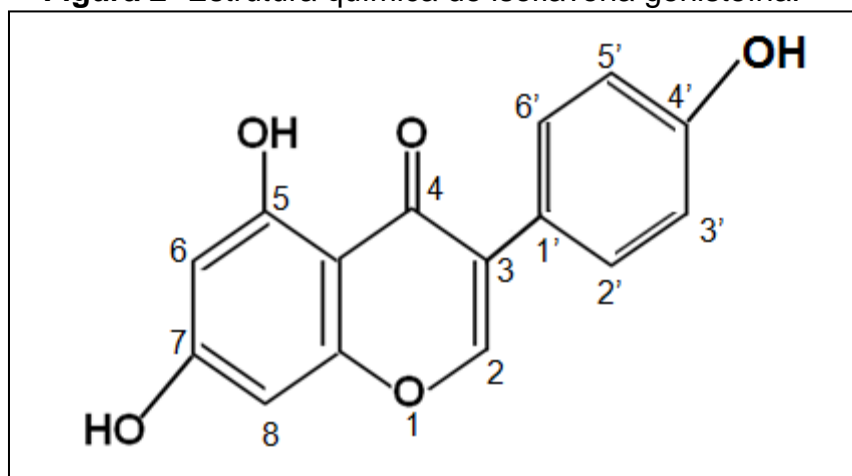
As proteínas de soja apresentam as seguintes propriedades tecnológicas: solubilidade, absorção e retenção de água, viscosidade, geleificação, emulsificação, formação de espuma, absorção de gorduras, formação de filmes e retenção de aromas (LIU, 1997).

3.1.2 Isoflavonas

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais durante o desenvolvimento normal, decorrente a condições de estresse, tais como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta (UV), entre outras. São formados a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, e quimicamente são constituídos por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilas substituintes. Pode-se classificar os compostos fenólicos como não flavonoides (fenóis simples) e flavonoides (polifenóis). Entre as classes de flavonoides, as mais importantes são flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavononóis, flavan-3-ol e antocianidinas (RICE-EVANS et al., 1996; NACZK, SHAHIDI, 2006).

Também denominadas isoflavonoides, as isoflavonas são pertencentes à classe dos fitoestrógenos e estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Em particular, a soja apresenta concentrações relativamente superiores em relação a outras leguminosas. As isoflavonas são isômeros que se diferenciam das demais estruturas dos flavonoides por apresentarem o ciclo benzênico unido ao carbono 3 do heterociclo ao invés do carbono 2, como pode ser visualizado na Figura 2 (SETCHELL, 1998; MORAES et al., 2009).

Figura 2- Estrutura química de isoflavona genisteína.



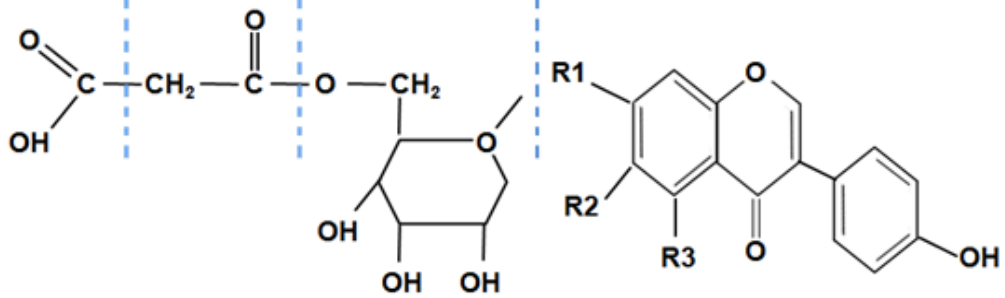
Fonte: Moraes et al., 2009.

O teor de isoflavonas presentes nos grãos de soja é variável, em função de diferentes genéticas, cultivares, condições climáticas e ambientais, além das condições de processamento sofrido (GENOVESE; LAJOLO, 2001; LEE et al., 2003). De acordo com Nain et al. (1974) e Setchell (1998), e as principais isoflavonas encontradas na soja e seus derivados são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína, as quais apresentam-se como várias formas de conjugados glicosídicos, dependendo da extensão do processamento ou fermentação. As formas predominantes de isoflavonas em soja e em produtos não fermentados de soja são as formas glicosídicas, enquanto em produtos fermentados as formas predominantes são as agliconas.

A soja possui três grupos de isoflavonas, sendo que cada uma delas apresenta quatro formas químicas diferentes, totalizando 12 isômeros (Figura 3). As formas agliconas são denominadas daidzeína, genisteína e gliciteína e, quando glicosiladas, são formados os β -glicosídeos, chamados de daidzina, genistina e glicitina. Existem ainda as isoflavonas conjugadas, na forma malonil-glicosídica,

onde encontramos 6"O-malonil-daidzina, 6"O-malonil-genistina e 6"O-malonil-glicitina, e na forma acetil-glicosídica, os 6"O-acetil-daidzina, 6"O-acetil-genistina e 6"O-acetil-glicitina (LIU, 1999).

Figura 3- Estrutura química das isoflavonas encontradas em grãos de soja.



	Malonil	Acetil	Glicosídica	Aglicona
Isoflavonas			R1	R2 R3
Genisteína			OH	H OH
Daidzeína			OH	H H
Gliciteína			OH	OCH ₃ H
Genistina			C ₆ O ₅ H ₁₁	H OH
Daidzina			C ₆ O ₅ H ₁₁	H H
Glicitina			C ₆ O ₅ H ₁₁	OCH ₃ H
Acetil-genistina			C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃	H OH
Acetil-daidzina			C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃	H H
Acetil-glicitina			C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃	OCH ₃ H
Malonil-genistina			C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₂ COOH	H OH
Malonil-daidzina			C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₂ COOH	H H

Fonte: Adaptado de Rostagno et al., (2005).

Em diferentes variedades de soja, Wang e Murphy (1994b), observaram que o isômero de isoflavona malonil genistina apresenta-se em maior concentração nos grãos (25 a 42%), seguido por genistina, malonil daidzina e daidzina. Góes-Favoni et al. (2004) reportaram que os conjugados malonil e β -glicosídeos apresentaram-se como os principais compostos em farinha de soja desengordurada, sendo que o malonil representou 55% do total de isoflavonas enquanto os conjugados β -glicosídeos 42%.

Wang e Murphy (1996) reportaram que durante o processamento de extrato de soja ocorreram perdas insignificantes de isoflavonas para o resíduo insolúvel (*okara*), sugerindo que as isoflavonas podem estar associadas a componentes solúveis, provavelmente proteínas solúveis da soja.

Em concentrados e isolados proteicos, o teor de isoflavonas tende a ser inferior ao observado em suas matérias-primas, evidenciando assim a possíveis perdas durante a extração alcalina, pois o pH alcalino pode modificar as cargas das moléculas de proteínas e alterar ligações com as isoflavonas (WANG; MURPHY, 1994a). Em concentrado proteico obtido por extração aquosa, Singletary et al. (2000) quantificaram 3% de agliconas em relação ao total de isoflavonas, enquanto que Wang e Murphy (1996) observaram que o teor de agliconas aumentou cerca de 6 vezes em relação à sua matéria-prima, entretanto, o teor de isoflavonas totais diminuiu cerca de 70%.

De acordo com Ferrari (2001) e Aguiar (2002), as isoflavonas apresentam propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante, estrogênica, antifúngica, antimutagênica e antitumoral. Apresentam ação potencial na prevenção de algumas doenças crônicas, como câncer relacionado a problemas hormonais, câncer de colo, câncer de próstata, osteoporose e disfunção cardiovasculares. Anthony (2000) e Badger et al. (2002) ainda sugerem que as isoflavonas e proteínas da soja, quando associadas, desencadeiam respostas fisiológicas mais acentuadas na redução do colesterol.

De acordo com Naim et al. (1976), Kao e Chen (2006), a capacidade antioxidante associadas à isoflavonas é decorrente ao número de grupos hidroxilas presentes em sua estrutura química. Tal capacidade decresce com a glicosilação ou a substituição do grupo metoxila. Deste modo, a atividade antioxidante das aglicona são superiores em relação às formas glicosiladas.

3.2 Subproduto da soja: *Okara*

A soja pode ser processada de diferentes maneiras, obtendo-se uma grande variedade de produtos alimentícios, tais como o tofu (“queijo de soja”), os fermentados (iogurte à base de soja), a “carne” de soja, o missô, o isolado e

concentrado proteico, os grãos integrais, as farinhas e farelos de soja e o extrato aquoso (SOUZA; VALLE; MORENO, 2000).

Segundo O'Toole (1999) e Jackson et al. (2001), o extrato de soja foi elaborado pela primeira vez na China, durante o segundo século depois de Cristo, e seu consumo foi incorporado como um hábito diário. Na obtenção desse produto, primeiramente é realizada a lavagem e maceração dos grãos de soja. Posteriormente, os mesmos são moídos e aquecidos para, então, passarem por um processo de filtração, que separa o extrato aquoso de seu subproduto, denominado como *okara* pelos orientais.

O *okara* apresenta elevado valor nutritivo, sendo rico em fibras (10-12%), proteínas (27-38%), lipídios insaturados (17%) e carboidratos (25,2-30,0%), e é aproveitado principalmente como ração animal. Entretanto, 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).

Os subprodutos gerados no processamento dos vegetais constituem problemas econômicos e ambientais, entretanto, a minimização de resíduos pode ser uma alternativa bem sucedida para a indústria de alimentos e demais setores industriais, que são caracterizados como potenciais poluidores (VIEIRA, 2006).

De acordo com O'Toole (1999), enriquecer produtos alimentícios com *okara* pode apresentar resultados positivos, já que este subproduto dispõe de propriedades funcionais como capacidade emulsificante e umectante, proveniente da presença de polissacarídeos não celulósicos.

A utilização do *okara* na alimentação humana ainda está se desenvolvendo. Há relatos do seu uso, em forma de farinha de *okara*, na substituição parcial da farinha de trigo para panificação, na substituição da farinha de soja para a produção de tofu, e como um meio de fermentação para a produção de condimentos, especiarias e temperos (WANG; CAVINS, 1989; BOWLES; DEMIATE 2006; CANTUÁRIA, 2008). O *okara* foi uma das matérias-primas básicas utilizadas pela Universidade La Plata no projeto "Ajudando a Crescer com Soja", que efetuou aportes solidários a fim de resolver parcialmente as necessidades nutricionais da população infantil e de baixa renda nesta região (PROYECTO PILOTO, 2002).

3.3 Concentrado proteico

O concentrado proteico pode ser obtido por um processo de precipitação com solução alcoólica (etanol 60-80%), precipitação com solução ácida (pH 4,5), ou por desnaturação por vapor e lavagem com água quente. O processo com ácido se destaca entre eles por apresentar a vantagem de utilizar um solvente (água) não inflamável e de baixo custo. No entanto, o farelo apresenta a propriedade de absorver água, forçando o uso de filtros rotatórios à vácuo ou centrifugas (BERK, 1992).

De acordo com Sgarbieri (1996), o processo de concentração da fração proteica por precipitação envolve a suspensão da farinha ou flocos desengordurados de soja em solução alcalina (pH 9,0), seguida por centrifugação, para eliminar o resíduo insolúvel e obter o extrato alcalino. Posteriormente, ocorre a adição de ácido hidrocloreídrico até atingir o pH isoelétrico (pH 4,5) da fração proteica, e uma segunda centrifugação, para a separação do precipitado (concentrado proteico) e do sobrenadante (composto principalmente por carboidratos, lipídios e minerais).

O concentrado e isolado proteico de soja são caracterizados pela presença de proteínas globulares, representadas pelas frações de globulina 7S (β -conglucina) e 11S (glicina) (RENKEMA et al., 2002; SINGH; MOHAMED, 2005).

De acordo com Berk (1992) e Hettiarachchy e Kalapathy (1999), os concentrados proteicos apresentam sabor suave em relação aos grãos de soja, pois os compostos responsáveis pelo sabor adstringente são removidos ou inativados durante o processamento. Sendo assim, podem ser largamente utilizados na indústria alimentícia, sendo aplicados em produtos cárneos, de panificação, bebidas, cereais, entre outros.

Em decorrência de suas propriedades nutricionais e funcionais, além de apresentar sabor neutro, os concentrados e isolados proteicos são extensivamente utilizados para a formulação de produtos alimentícios. Suas principais aplicações na formulação de produtos de panificação e confeitaria, produtos lácteos como iogurtes e substitutivos de lácteos e farinhas e produtos cárneos emulsionados e embutidos (MORAIS; SILVA, 1996; MARTINS; NETTO, 2006). Além disso, existem estudos para a aplicação do isolado proteico como matriz em produtos microencapsulados (ORTIZ et al., 2009).

3.4 Hidrólise enzimática proteica

Atualmente, as enzimas apresentam diversas aplicações e são muito utilizadas nas indústrias para melhorar a qualidade dos produtos, podendo produzir um caminho intermediário que não possa ser obtido quimicamente (GODOI, 2007). Segundo Phillips Beuchati (1981), a hidrólise enzimática é um método usado para aperfeiçoar ou modificar as propriedades químicas, funcionais e sensoriais da proteína sem prejudicar o seu valor nutricional.

A hidrólise proteica consiste na clivagem da proteína, obtendo-se em pequenos peptídeos de tamanhos diversos e eventualmente aminoácidos. A clivagem pode ocorrer tanto quimicamente, por ácido ou base, quanto enzimaticamente, pela adição de enzimas (BLENFORD, 1994; LAHL; BRAUN, 1994; PHILLIPS; BEUCHATI, 1981).

Ao contrário das hidrólises ácida e alcalina, o processo enzimático ocorre sob condições brandas, sem produzir produtos de degradação, apresentando assim um bom controle do processo e das propriedades dos produtos resultantes (GONÇALES-TELO et al., 1994; SHAHIDI; HAN;SYNOWIECKI, 1995). A escolha do tipo de enzima e a especificidade pelo substrato, associadas às condições do meio e grau de hidrólise, resultam em uma variedade de peptídeos, que apresentam tanto alto ou baixo peso molecular, e ainda cadeias que não sofreram hidrólise (PANYAM; KILARA, 1996).

A utilização de enzimas apresenta maiores vantagens e benefícios, sendo que ela apresenta efetividade a baixas concentrações, processa em condições mais amenas, não reduz o valor nutricional das proteínas, além de apresentar especificidade em relação ao substrato, havendo pouca probabilidade de ocorrer reações indesejáveis, que resultem na formação de produtos tóxicos (KILARA, 1995; PHILLIPS; BEAUCHAT, 1981).

As enzimas proteases, proteolíticas ou proteinases, pertencem à classe das hidrolases, que quebram moléculas pela introdução da água. As proteases atuam sobre as proteínas e hidrolisam as ligações peptídicas das proteínas com formação de grupos amina (NH_2) e carboxila (COOH), originando polipetídeos de menor peso molecular e aminoácidos simples (BOBBIO; BOBBIO, 1984). Segundo Clemente (2000), as enzimas proteolíticas apresentam dois tipos de mecanismo: as

endopeptidases, que hidrolisam as ligações peptídicas das moléculas de proteína produzindo peptídeos moleculares, e o mecanismo de exopeptidases, que removem aminoácidos N-terminais ou C-terminais pela hidrólise das ligações peptídicas.

Uma das endopeptidases que tem sido utilizada nos processos de hidrólise de proteínas é a Alcalase[®], enzima de origem bacteriana produzida pelo *Bacillus licheniformis*. É uma hidrolase do subgrupo das peptidases, com preferência hidrolítica para regiões com resíduos não carregados em S1. Apresenta atividade e estabilidade em temperatura entre 50 e 70 °C e pH 6 a 10 (SINHA et al., 2007). A Alcalase[®] (subtilisina Carlsberg) é muito utilizada desde a década de 60 na indústria de detergentes, e na produção de hidrolisados enzimáticos de variadas fontes proteicas de grau alimentício (ADLER-NISSEN, 1976; KOBLITZ, 2010).

De acordo com Doucet et al. (2003) e Donlon (2007), a Alcalase[®] quebra ligações peptídicas das quais participam resíduos de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptofano, e tirosina), ácidos (glutamato), sulfurados (metionina), alifáticos (leucina e alanina), hidroxil (serina) e básicos (lisina) no lado carboxílico.

Os hidrolisados enzimáticos de proteína para uso de alimentos apresentam seus primeiros relatos durante a segunda guerra mundial, onde se utilizaram hidrolisados de caseína na substituição parcial da clara de ovo em produtos de confeitaria. Esses produtos eram destinados a indivíduos que não podiam fazer a ingestão da proteína intacta (ADLER-NISSEN, 1986).

Mahmoud (1994) classificou os hidrolisados proteicos em duas categorias:

- Proteínas altamente hidrolisadas, que são compostas majoritariamente por aminoácidos livres e peptídeos de cadeia curta (di e tri-peptídeos);
- Proteínas parcialmente hidrolisadas, que apresentam moléculas maiores que 5 kDa.

Os hidrolisados proteicos são uma excelente fonte de peptídeos de baixo peso molecular e quando comparados às proteínas *in natura* possuem elevada digestibilidade e funcionalidade. Tal funcionalidade é dependente tanto do comprimento e estrutura das cadeias polipeptídicas quanto da composição de aminoácidos (MAHMOUD, 1994; ABDUL-HAMID et al., 2002).

Proteínas altamente hidrolisadas podem ser utilizadas para a formulação de produtos hipoalergênicos para crianças, devido à sua capacidade de reduzir substancialmente algumas reações alergênicas. Por outro lado, as proteínas parcialmente hidrolisadas podem ser utilizadas na preparação de dietas especializadas e suplementos alimentícios como fonte de nitrogênio (MAHMOUD, 1994; BARBOSA et al., 2002).

Segundo Pedroche et al. (2004), hidrolisados com baixo grau de hidrólise são utilizados para melhorar as propriedades funcionais, enquanto que o hidrolisados com alto grau de hidrólise são usado em sua maioria como suplementos nutritivos sem dietas médicas especiais. E aqueles hidrolisados considerados com grau de hidrólise variável são utilizados na maior parte como saborizantes.

O processo de hidrólise pode ser medido através da determinação do grau de hidrólise (GH), que é definido por Adler–Nissen (1986) como a medida da extensão da degradação hidrolítica das proteínas, ou seja, o número de ligações peptídicas hidrolisadas. É expresso em equivalentes de hidrólise (h), em relação ao número total de ligações peptídicas antes da reação (h_{total}). Para a maioria das proteínas, h_{total} corresponde a 8 moles equiv/kg de proteína, estimado com base na composição de aminoácidos. O grau de hidrólise pode ser obtido pelo método pH-stat, ou método de titulação de grupos α -amino liberados em pH e temperatura constante.

A concentração da protease, a relação enzima:substrato, pH e temperatura são os fatores mais importantes da reação de hidrólise, e dependendo da maneira que é controlado, pode-se obter produtos com as características desejadas. O critério quantitativo da reação de proteólise é o grau de hidrólise, o qual pode aumentar ou diminuir a funcionalidade da proteína, sendo assim cada produto apresenta seu grau ótimo de hidrólise (HOWELL, 1996; NIELSEN; OLSEN, 2002).

O grau de hidrólise e o perfil de peso molecular dos peptídeos definem a utilização dos hidrolisados. Por exemplo, para utilização em alimentos de fins especiais, como suplementos nutritivos, é desejável peptídeos de baixo peso molecular, conseqüentemente com grau de hidrólise maior que 10%. No entanto, deve-se considerar que mesmo grau de hidrólise obtido pela mesma enzima e de substratos diferentes não garante que os produtos apresentarão as mesmas características (ADLER-NISSEN, 1986). De acordo com Kim et al. (1998), isso se

deve pela diferença na estrutura primária, secundária e terciária, que determinaria a diferente ação da enzima de acordo com sua especificidade.

3.4.1 Peptídeos bioativos

Além das diversas vantagens tecnológicas, os hidrolisados proteicos ainda podem apresentar peptídeos com atividade biológica (CLEMENTE, 2000; YUST et al., 2010). De acordo com Meisel, Fitzgerald (2003) e Sienkiewicz- Szlapka et al. (2008), os fragmentos de proteínas específicos que estão inativos dentro da sequência da proteína original são denominados peptídeos bioativos. Quando libertados dessa sequência pela hidrólise enzimática, eles podem exercer diversas funções fisiológicas, entre elas antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensivas e hipocolesterolêmica.

Segundo Moller et al. (2008), para o componente da dieta ser considerado bioativo, ele deverá exercer um efeito fisiologicamente significativo afetando a saúde de maneira benéfica. São constituintes extra-nutricionais e são encontrados em pequenas quantidades nos alimentos.

Peptídeos bioativos contêm normalmente de 3 a 20 resíduos de aminoácidos, e as suas bioatividades são baseadas na sua composição de aminoácidos, bem como sua sequência. Estudos têm demonstrado que a proteína de soja são excelentes fontes de peptídeos bioativos, apresentando propriedades hipocolesterolêmica, anti-hipertensivas, antitrombótica, antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante (WANG; DE MEJIA, 2005; ROY; BOYE; SIMPSON, 2010; SARMADI; ISMAIL, 2010; ZHANG et al., 2010).

Hidrolisados de proteína de origem animal e vegetal tem sido estudados por suas significantes propriedades antioxidantes. E essa habilidade dos hidrolisados proteicos de inibir alterações causadas pela oxidação lipídica parece estar relacionada à sua composição, à sequência dos aminoácidos e ao tamanho dos peptídeos liberados na hidrólise (PEÑA-RAMOS et al., 2004; WANG et al., 2006).

Segundo Chen et al. (1996), Sakanaka et al. (2004) e Cumby et al. (2008), os peptídeos são caracterizados como potenciais antioxidantes devido sua

capacidade de quelar metais ou sequestrar radicais livres. Sendo assim, a presença de aminoácidos aromáticos afeta a capacidade antioxidante de um peptídeo, já que o grupo hidroxil é capaz de doar hidrogênio e estabilizar radicais livres.

Conforme De Mejia e Lumen (2006), o grau de hidrólise, o tipo de protease e condições utilizadas nos isolados proteicos podem afetar as propriedades bioativas e antioxidantes dos peptídeos. A glicinina apresenta-se como principal precursora dos peptídeos isolados, enquanto que a β -conglucina demonstra-se parcialmente resistente ao processo de hidrólise. Alguns aminoácidos apresentam capacidade de retardar a oxidação lipídica, entre eles: a tirosina, metionina, histidina, lisina, triptofano, glicina, alanina e cisteína (CHEN et al., 1996; PEÑA-RAMOS et al., 2004; MENDIS et al., 2005; SINHA et al., 2007).

3.5 Pré-tratamento enzimático com carboidrases para extração de proteínas

Os polissacarídeos localizados na parede celular podem dificultar o acesso às proteínas e sua extração (DUEÑAS et al., 2007; TANG et al., 2002). De acordo Cutter (1996) e Zhong e Ye (2007), a parede celular vegetal é uma zona de fronteira entre cada célula, e morfologicamente é dividida por três camadas, sendo elas a lamela média, a parede celular primária e parede celular secundária. Apresenta as seguintes funções: conferir rigidez, tamanho e formato da célula, controlar o transporte intracelular, armazenar reservas alimentares, e proteger contra ataque de insetos e agentes patogênicos.

A primeira parede a ser formada pela célula é a parede celular primária, e é depositada sobre cada lado da lamela média pelas células adjacentes, recobrando a membrana plasmática. É composta por três estruturas independentes, as microfibrilas de celulose, os polissacarídeos não-celulósicos (pectina e hemicelulose) e as proteínas estruturais. A lamela média é composta por substâncias pécticas que mantêm as paredes primárias juntas às células adjacentes, sendo então denominadas de substâncias intercelulares. Quando o crescimento celular é finalizado, há a formação da parede secundária, que é composta de 40% de celulose (RAVEN et al., 2001; WALDRON et al., 2003).

A celulose, principal componente de sustentação das estruturas vegetais, é um homopolímero de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4. As moléculas de celulose estão interligadas por pontes de hidrogênio, formando microfibrilas muito resistentes. As fibras de celulose são constituídas por região amorfa, que é a porção hidrolisável, e região cristalina, a porção resistente (WALDRON et al., 2003; LEROUXEL, 2006).

Segundo McDougall et al. (1996) e Waldron et al. (2003), a hemicelulose é definido como um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados que se ligam firmemente á superfície das microfibrilas de celulose e entre si. Estes polissacarídeos apresentam ligação β 1,4 de xilose, manose ou glicose, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduos, a partir da qual surgem ramificações laterais de outros açúcares.

A parede celular vegetal ainda contém proteínas estruturais, sendo a extensina a principal glicoproteína, a qual é constituída por hidroxiprolina e outros aminoácidos, como a lisina, serina e tirosina. Essas proteínas são capazes de fazer ligações covalentes intra e intermoleculares com demais constituintes da parede celular (WALDRON et al., 2003).

Entre as enzimas celulasas, há o grupo das endoglucanases, que apresentam o nome sistêmico de 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases, no entanto são referenciadas de várias outras maneiras. Este grupo de enzimas é capaz de clivar randomicamente as ligações internas da região amorfa da cadeia de celulose, liberando oligossacarídeos de variados tamanhos (ARANTES, SADDLER, 2010; BHAT, 2000; LYND et al., 2002). Conforme Schomburg e Salzman (1991), as enzimas β -glucanases podem ser classificadas de acordo com o substrato clivado preferencialmente, podendo clivar preferencialmente porções internas (endo- β -glucanases) ou externas (exo- β -glucanases) do polímero de β -1,3,1,4-glucana .

As β -glucanases apresentam diferentes aplicações biotecnológicas, sendo que essas enzimas atuam sobre diversas substâncias naturais que possuem ligações β -1,3-1,4-glicosídicas. Assim, podem ser utilizadas em indústrias de alimentos, auxiliando na produção de bebidas como vinhos e cervejas, na obtenção de oligossacarídeos que apresentam atividades funcionais, entre outros (KIRK et al., 2002; BLASCO et al., 2006; GIESE et al., 2010).

De acordo com Schmidt e Salas-Mellado (2009) e a empresa Novozymes (2014), entre as carboidrases comerciais, a Viscozyme[®] é um complexo

multi-enzimático que inclui celulase, hemicelulase, xilanase e a β -glucanase, que apresenta atividade enzimática principal. É produzida a partir do *Aspergillus aculeatus* e possui atividade sobre substâncias similares à pectina com cadeias ramificadas, encontradas nas paredes celulares da soja.

Os polissacarídeos localizados na parede celular podem limitar o acesso de enzimas à nutrientes, e a utilização de carboidrase para extração de proteínas tem sido aplicado desde 1997. A enzima Viscozyme[®] é capaz de desintegrar tecidos da parede celular pela hidrólise das ligações entre polissacarídeos, liberando xilose, hemicelulose, celulose e outros componentes intercelulares, como as proteínas (ANON, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e preparo da amostra

Para a realização deste trabalho, as amostras de *okara*, provenientes do processo de obtenção do extrato aquoso, foram doadas pela Cocamar Cooperativa Agroindustrial, Maringá-PR.

As amostras foram desidratadas em estufa com circulação de ar a 40 °C por 24 horas. O produto seco foi moído em um moinho de facas para obtenção da farinha de *okara*. Esta foi desengordurada com n-hexano (1:10, p/v) por 30 minutos na mesa agitadora orbital (modelo Ma-140, Marconi) à 300 rpm e temperatura ambiente, após a filtração a vácuo, a farinha de *okara* desengordurada foi embalada em frascos de vidro e armazenada em refrigerador doméstico (7°C) até o momento de realização das análises.

No processo de hidrólise enzimática do concentrado proteico, foi utilizada a protease Alcalase® 2.4L tipo FG da Novozymes, oriunda de *Bacillus licheniformis*, com atividade declarada de 2.4 AU-A/g. Unidades Anson (AU) por grama. Uma Unidade Anson (AU) equivale a um miliequivalente de tirosina liberada da hidrólise de hemoglobina por minuto. Para a hidrólise da parede celular do *okara* foi utilizado o complexo multi-enzimático (composto por celulase, hemicelulase, xilanase e a β -glucanase) Viscozyme® da Novozymes, oriundo de *Aspergillus aculeatus*, com atividade declarada 100 FBG/g, onde cada FBG é a quantidade de enzima necessária, em condições padrões (30 °C, pH 5,0 e 30 minutos de reação), para hidrolisar β -glucanas.

4.2 Métodos

4.2.1 Composição centesimal da farinha desengordurada do *okara*

4.2.1.1 Determinação de umidade

A umidade foi determinada por método gravimétrico, em estufa a 105 °C, até peso constante, empregando o método descrito no AOAC (1990). Esta determinação foi realizada em triplicata e a umidade foi expressa em g/100g.

4.2.1.2 Determinação de cinzas

A determinação do resíduo mineral foi feita por uma carbonização prévia, seguida de uma incineração completa em mufla a 550 °C e posteriormente quantificado pela diferença de peso. A análise foi feita em triplicata e o resultado foi expresso em g/100g (INSTITUTO, 2008).

4.2.1.3 Determinação do teor de proteínas totais

O teor de proteínas totais do *okara* foi determinado pelo método de Kjeldahl descrito pela AACC (1995), utilizando o fator 6,25 para converter o valor de nitrogênio em proteína total.

4.2.1.4 Determinação do teor de lipídios

Foi utilizado para a determinação de lipídios totais o método de Soxhlet, com solubilização da fração lipossolúvel da amostra analisada por meio do solvente hexano (INSTITUTO, 2008).

4.2.1.5 Determinação de carboidratos totais

O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença entre 100.

4.2.2 Pré-tratamento da farinha de *okara* com a enzima Viscozyme[®], extração e concentração das proteínas

Para a sua otimização, foi realizado um planejamento experimental fatorial 2³, com 3 repetições no ponto central (Tabela 3). As variáveis independentes utilizadas foram: temperatura (37 a 53°C), pH (5,5 a 6,5) e concentração de enzima (1,5 a 4%). As análises estatísticas foram realizadas por meio do software StatSoft Statistica 10, visando verificar o efeito das variáveis nas funções respostas teor de proteína (%) e recuperação de proteína no concentrado proteico (%).

Tabela 3- Ensaios do planejamento experimental variando os parâmetros temperatura (T) pH e concentração de enzima (E) nos experimentos de pré-tratamento.

Ensaios	Codificado			Real		
	T	pH	E	T (°C)	pH	E (%)
1	-1	-1	-1	40	5,7	2
2	1	-1	-1	50	5,7	2
3	-1	1	-1	40	6,3	2
4	1	1	-1	50	6,3	2
5	-1	-1	1	40	5,7	3,5
6	1	-1	1	50	5,7	3,5
7	-1	1	1	40	6,3	3,5
8	1	1	1	50	6,3	3,5
9	-1,68	0	0	37	6	2,75
10	1,68	0	0	53	6	2,75
11	0	-1,68	0	45	5,5	2,75
12	0	1,68	0	45	6,5	2,75
13	0	0	-1,68	45	6	1,5
14	0	0	1,68	45	6	4
15	0	0	0	45	6	2,75
16	0	0	0	45	6	2,75
17	0	0	0	45	6	2,75

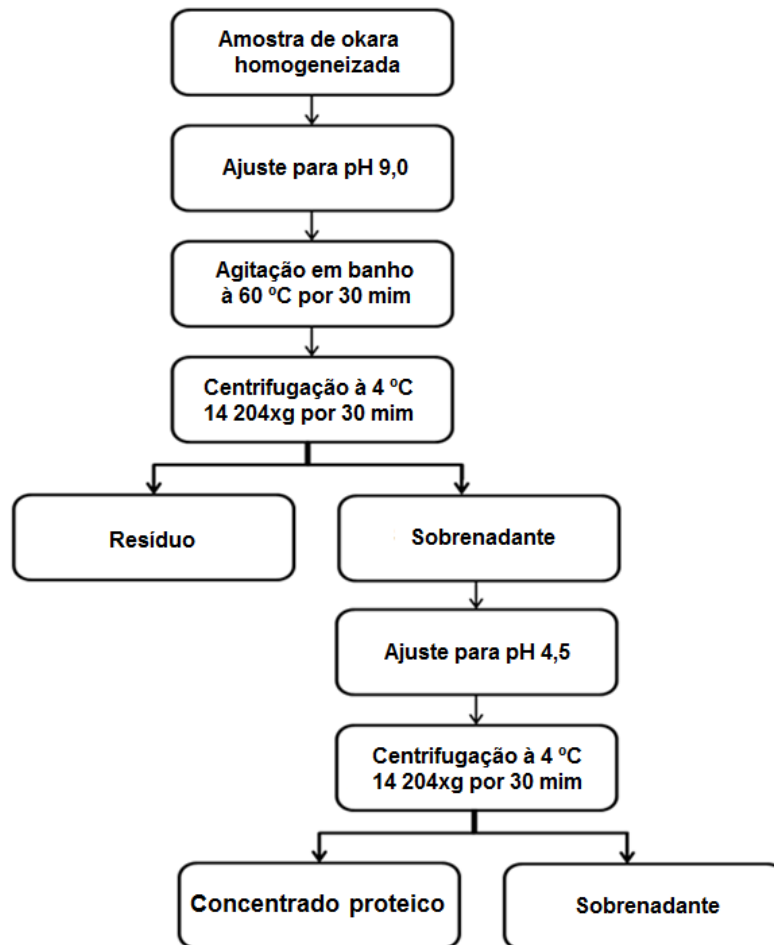
Para a realização aleatória de cada experimento, foram utilizados frascos de erlenmeyer contendo 5,0 g de *okara* desengordurada e adicionados 95 mL de tampão citrato fosfato com pH (5,5, 5,7, 6,0, 6,3 ou 6,5). Atingida a temperatura (37 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C ou 53 °C), foi adicionado o complexo multi-enzimático na concentração determinada (1,5, 2,0, 2,75, 3,5 ou 4%) e a solução foi

agitada (mesa agitadora orbital Dubnoff com controle de temperatura, Mod.T-53, TECNAL, Piracicaba, Brasil) por 2 horas.

Após a realização de cada experimento de pré-tratamento do *okara* com a enzima (Tabela 1), as proteínas foram extraídas conforme a metodologia descrita por Ma et al. (1997), com algumas modificações (Figura 4). Assim, para extração das proteínas, o pH de cada amostra foi ajustado para 9,0 com NaOH 1 M e agitados em uma mesa agitadora orbital Dubnoff, por 30 min a 60 °C. Em seguida, foi centrifugada a 14 204×g em centrífuga refrigerada (modelo 5804-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 30 min a 4 °C e obtido o sobrenadante e descartado o precipitado. O pH do sobrenadante foi ajustado para 4,5 com HCl 0,5M para precipitação das proteínas. Após centrifugação a 14 204×g por 30 min a 4 °C, foram obtidos o sobrenadante e a proteína precipitada ou o concentrado proteico. Neste concentrado proteico, foram determinadas as funções-respostas conteúdo proteico (CP) e recuperação de proteínas (RP).

Como amostra controle foi obtido um concentrado proteico de *okara* sem o pré-tratamento enzimático, o qual também se determinou CP e RP.

Figura 4- Fluxograma do processo de concentração das proteínas



O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Kjeldahl, e a recuperação de proteína no concentrado proteico foi definida pela seguinte equação:

$$RP(\%) = \frac{MP_{conc}}{MP_{okara}} \times 100 = \frac{X_{conc} \times m_{conc}}{X_{okara} \times m_{okara}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Onde: RP é a recuperação de proteína (%) no concentrado proteico; MP_{conc} é a massa de proteína no concentrado (g); MP_{okara} é a massa de proteína na farinha de *okara* (g); X_{conc} é o conteúdo de proteína no concentrado (g/g fração); X_{okara} é o conteúdo de proteína na farinha de *okara* (g/g farinha); m_{conc} é a massa do concentrado (g); m_{okara} é a massa de farinha de *okara* (g).

Para a elaboração dos modelos preditivos, 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 (R²) e do teste F, para verificar se o modelo apresenta um ajuste adequado dos dados experimentais.

Após a definição das condições ótimas do pré-tratamento com a Viscozyme[®], as amostras foram concentradas e liofilizadas para realizar a hidrólise enzimática proteica.

4.2.3 Hidrólise Enzimática do Concentrado Proteico pela Alcalase[®]

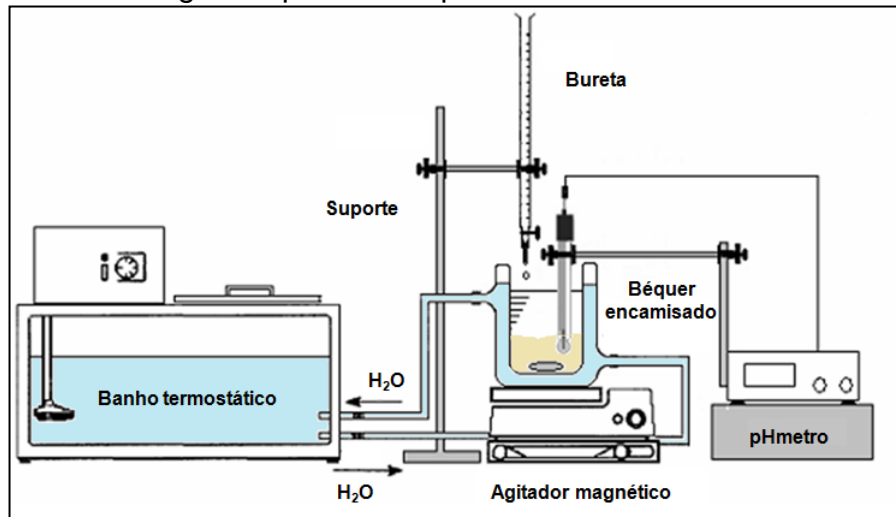
Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ para verificar o efeito das variáveis temperatura da reação enzimática (40 a 70 °C), razão enzima:substrato (0,5 a 5 %, g enzima/100g proteína) e pH (7,0 a 9,0) sobre o grau de hidrólise. Foram realizados 8 ensaios fatoriais, 6 axiais e 3 centrais, totalizando 17 ensaios experimentais (Tabela 4).

Tabela 4- Ensaios do planejamento experimental variando os parâmetros temperatura (T) pH e razão enzima substrato (E/S), nos experimentos de hidrólise.

Ensaio	Codificado			Real		
	T	E/S	pH	T (°C)	E/S (%)	pH
1	-1	-1	-1	46	1,4	7,4
2	1	-1	-1	64	1,4	7,4
3	-1	1	-1	46	4,1	7,4
4	1	1	-1	64	4,1	7,4
5	-1	-1	1	46	1,4	8,6
6	1	-1	1	64	1,4	8,6
7	-1	1	1	46	4,1	8,6
8	1	1	1	64	4,1	8,6
9	-1,68	0	0	40	2,75	8,0
10	1,68	0	0	70	2,75	8,0
11	0	-1,68	0	55	0,5	8,0
12	0	1,68	0	55	5,0	8,0
13	0	0	-1,68	55	2,75	7,0
14	0	0	1,68	55	2,75	9,0
15	0	0	0	55	2,75	8,0
16	0	0	0	55	2,75	8,0
17	0	0	0	55	2,75	8,0

Os experimentos de hidrólise foram conduzidos em um béquer encamisado de 250 mL com sistema de agitação e aquecimento utilizando o método pH-stat (Figura 5), descrito por Adler-Nissen (1986). Foi colocado no béquer 2 g de concentrado proteico obtido do *okara*, previamente liofilizado, e 100 mL de água destilada. A mistura foi mantida em agitação por um agitador magnético, aquecida a uma determinada temperatura (40 C°, 46 C°, 55 C°, 64 C° e 70 C°) e o pH ajustado (7,0, 7,4, 8,0, 8,6, 9,0) com NaOH 1 M. Em seguida, a enzima Alcalase[®] foi adicionada à mistura e a reação monitorada com auxílio de um pHmetro acrescentando-se NaOH 0,1 M de modo a manter o pH constante. O volume de base consumida foi anotado em intervalos regulares até que as variações do consumo da base se tornarem insignificantes, indicando o final da hidrólise, e usado para calcular o grau de hidrólise.

Figura 5- Montagem experimental para a hidrólise enzimática do *okara*



A otimização da hidrólise enzimática foi feita pela função desejabilidade de modo a obter maiores valores de grau de hidrólise (GH), que foi calculado conforme descrito por Adler-Nissen (1986). 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.

4.2.3.1 Grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi definido por Adler-Nissen (1986) como sendo o número de ligações peptídicas hidrolisadas, expresso em equivalentes de hidrólise (h), em relação ao número total de ligações peptídicas antes da reação (h_{total}). Para a maioria das proteínas, h_{total} corresponde a 8 moles equiv/kg de proteína, estimado com base na composição de aminoácidos.

$$GH(\%) = \frac{h}{h_{total}} \times 100 = \frac{V_{NaOH} \times N_b}{MP \times \alpha \times h_{total}} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

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) (ADLER-NISSEN, 1986):

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK-pH}} \quad (\text{Eq.3})$$

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 (1964¹ apud KRISTINSSON e RASCO, 2000), pode ser estimado através da equação (4.3):

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \quad (\text{Eq.4})$$

Onde: T é a temperatura em Kelvin.

O hidrolisado proteico foi obtido a partir da hidrólise enzimática do concentrado proteico nas condições otimizadas. Ele foi caracterizado em termos de composição de isoflavonas, perfil eletroforético dos peptídeos e atividade antioxidante. Também foi obtida a curva de cinética de hidrólise enzimática (GH versus tempo).

4.2.4 Análises físico-químicas

4.2.4.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-Page)

A determinação do perfil eletroforético das proteínas do *okara* e dos peptídeos presentes no hidrolisado proteico foi feita de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), utilizando gel de separação com 20% de acrilamida e de empilhamento com 4%. As amostra do concentrado e do hidrolisado 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 4% e 2,26% respectivamente e foram aquecidas à 95 °C por 5 minutos. Após resfriadas, alíquotas de 12 µL de cada 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 Bioltecnologia), e o gel correu a 200 V e 60 mA durante 1 hora e 20 minutos.

¹ STEINHARDT, H.; BEYCHOK, S. Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules. In: H. Neurath (Ed). The proteins, vol. 2. New York: Academic Press, 1964. p. 139-304.

O perfil de massa molecular das proteínas foi determinado utilizando-se o padrão Precision Plus Protein (Bio-Rad).

4.2.4.2 Extração e Quantificação de Isoflavonas

A extração das isoflavonas nas amostras de *okara* e do hidrolisado proteico foi feita de acordo com a metodologia descrita por Yoshiara et al. (2012). Alíquotas de 300 mg de amostra desengordurada e 6,0 mL de solvente extrator composto por água, etanol e acetona (1:1:1, v/v/v) foram colocadas em tubos de ensaios, e durante 1 h à temperatura ambiente os tubos foram agitados em vortex de 15 em 15 minutos. Logo após, os tubos foram colocados em banho ultrassônico à temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Eppendorf 5804 R, Hamburgo, Alemanha) por 15 minutos a 800×g (21 000 rpm) a temperatura de 4 °C e os sobrenadantes foram então filtradas em filtros Millex – LH (0,20 µm) utilizando a seringa e nos vials próprios do equipamento.

A etapa de separação e quantificação das isoflavonas foi realizada de acordo com a metodologia de Handa et al. (2014), em que foi utilizado a fase reversa modelo Acquity – UPLC BEH C18 (Waters, 2,1 mm x 50 mm, partículas de 1,7 µm) utilizando-se cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência da (modelo Acquity, Waters) e injetor automático de amostras. Utilizou-se um sistema de gradiente binário com fase inicial de 90% de H₂O acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) e 10% de acetonitrila. Em 8 min de eluição, atingiu-se uma proporção de 0% de H₂O e 100% de acetonitrila, retornando às condições iniciais em 9 min. O tempo total da corrida foi de 10 min e o volume injetado de 1,4 µL. A vazão da fase móvel foi de 0,70 mL min⁻¹ e a temperatura da corrida mantida constante a 35 °C. Para a detecção, foi utilizado o detector de arranjo de diodos da marca Waters ajustado ao comprimento de onda de 260 nm. A identificação das isoflavonas foi realizada por comparação com curvas individuais de padrão de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína, genisteína (Sigma-Aldrich), acetil-daidzina, acetil-glicitina e acetil-genistina malonil-daidzina, malonil-glicitina e malonil-genistina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). A concentração das isoflavonas malonilglicosídicas foi calculada a partir das curvas dos padrões dos seus correspondentes β-glicosídeos utilizando a similaridade do coeficiente de extinção

(Coward et al., 1993). A quantificação por padronização externa foi feita utilizando como referência, as curvas dos padrões. Os resultados foram realizados em triplicata e expressos em mg g^{-1} , em base seca.

4.2.4.3 Atividade antioxidante pelo método da capacidade sequestradora do radical ABTS+ (2,2',azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))

A capacidade antioxidante do hidrolisado 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 com solução estoque ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM. A mistura foi armazenada em frasco escuro e em temperatura ambiente por 16 horas antes do uso. A solução ABTS+ foi diluída com tampão fosfato (pH 7.4) para uma absorbância de 0,7 a 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 minutos de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de trolox (1,25, 2,5, 4, 5, 7,5 e 10 $\mu\text{Mol/L}$) 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.

4.2.4.4 Atividade antioxidante pela atividade inibidora da peroxidação lipídica independente de Fe+2

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-tripiryridyl-s-triazine) 10 mM em HCl 40 Mm, cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM e tampão acetato (5 mM; pH 3,6). O reagente de trabalho FRAP foi preparado no momento da análise misturando 25 mL de tampão acetato (5 mM; pH 3,6), 2,5 mL de solução estoque de TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-triazine; 10 mM) e 2,5 mL de solução estoque de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM), exatamente nesta ordem. A solução foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Para a reação, foram adicionados 10 μL de amostra e 110 μL de água destilada a 900 μL de reagente FRAP recentemente preparado. Para o branco foram adicionados 900 μL de reagente FRAP em 120 μL de água destilada.

A reação ocorreu no escuro mantendo a temperatura em 37 °C durante 30 minutos. Terminado o tempo de reação, leituras de absorvância foram feitas a 593 nm em um espectrofotômetro UV-visível. Os resultados foram correlacionados com uma curva padrão de Trolox feita com soluções variando a concentração de 50 a 500 µM a partir da solução padrão de Trolox (10 mM). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados de capacidade antioxidante foram expressos como µM de Trolox equivalente (TE) por grama de amostra.

4.2.4.5 Microscopia Óptica de Fluorescência

As lâminas contendo as amostras foram montadas com 25 µL de um meio composto por 40 µL de uma solução de DABCO [1,4-diazabicyclo (2.2.2) octano (2,3%), 20 mM Tris HCl, pH 8,0, (2%) e glicerol (90%), em água destilada, 40 µL de água destilada e 8 µL de calcofluor. Todas as imagens foram obtidas com microscópio óptico de fluorescência (4500 DM B, Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com uma câmara de DFC 300FX, e software Leica IM50 4.0. Para otimizar e melhorar o contraste e brilho, foi utilizado o software Imagem iGrafx.

REFERÊNCIAS

AACC. American Association of Cereal Chemists. **Approved Methods**. St. Paul Minn, 1995.

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G.H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 69-74, 2002.

ACASIO, U.A. Handling and store of soybeans and soybean meal. Technical Bulletin, Singapura: **American Soybean Assotiation- Asa**, n. 044/11/96, p.16, 1997.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

_____. Enzymatic Hidrolysis of Proteins for Increased Solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 24, p. 1090–1093, 1976.

AGUIAR, D.L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.20, n.2, p.323-334, 2002.

ALMEIDA, M.E.W.A.; SIMÃO, A.M. Aminoácidos de proteínas de soja e dosagem de ácido glutâmico. **Rev. Inst Adolfo Lutz**, n. 32, p.105-112, 1972.

ANON. **Product sheet of Viscozyme L**. Novo Nordisk A/S, Enzymes process division, Bagsvaerd, Denmark, 2008.

ANTHONY, M. S. Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. **The Journal of Nutrition**. v.130, p.662S-663S, 2000.

ANVISA, Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. Disponível em:<
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3b43f08047457c0188d5dc3fbc4c6735/RDC_268_2005.pdf?MOD=AJPERES >Ultimo acesso em setembro de 2014.

A.O.A.C. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15 ed. Washington: A.O.A.C. 1990.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Acess to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis the role of amorphogenesis. **Biotechnol Biofuels**, v.3, p.4, 2010.

BARBOSA, C. M. S.; MORAIS, H. A.; LOPES, D. C. F.; MANSUR, H. S.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P.C. Microencapsulação de Hidrolisados de Caseína em Liposferas Para Mascarar o Sabor Amargo: Avaliação Físico-Química e Sensorial Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**,v. 38, n. 3, 2002.

BADGER, T. M.; RONIS, M. J. J.; HAKKAK, R.; ROWLANDS, J. C.; KOROURIAN, S. The health consequences of early soy consumption. **The Journal of Nutrition**, v.132, p. 559S-565S, 2002.

BADLEY, R.A.; ATKINSON, 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, 1975.

BAKER, D.H. Nutricional constraints to use of soy products by animais, in: Soy in Animal Nutricion. **Savoy: Federation of Animal Science Societies**, p.1-12, 2000.

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, 1996.

BERK, Z. Isolated Soybean Protein (ISP). In.. **Technology of edible flours and protein products from soybean** Roma, FAO (United Nations), ed.5 cap. 6, 1992.

BHAT, M.K. Reserch review papers: Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotchnology Advances**, v.18, n.5,p.355-383, 2000.

BLASCO, L.; VEIGA-CRESPO, P.; POZA, M.; VILLA, T. G. Hydrolases as markers of wine aging. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.22, p.1229-1233, 2006.

BLENFORD, D. E. Protein hydrolysates: functionalities and uses in nutritional products. **International Food Ingredient**, v.3, p.45, 1994.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de Alimentos**. Campinas, Fundação Cargill, cap.7, p.161-175, 1984.

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo : origem, história e distribuição. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, p.1-6, 1981.

BOWLES, S.; DEMIATE, I. M. Caracterização físico-química de *okara* e aplicação em pães do tipo francês. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.652-659, 2006.

BRANDEN, C. E.; TOOZE, J. **Introduction to Protein Structure**, Garland Publishing, New York, NY, USA. Second Edition, 1999.

CANTUÁRIA, C.M.; RIBEIRO, S.C.A.; RIBEIRO, C.F.A.; PARK, K.P.; 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, 2008.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. **Soja: potencial de uso na dieta brasileira**. Londrina: Embrapa- CNPSO, p.16, 1998.

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

CHEN, H.M.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F.; NOKIHARA, K. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digest of a soybean protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago, v.44, n.1, p.2619-2623, 1996.

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

CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> > Ultimo acesso em agosto de 2014.

COWARD, L.; BRANES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their beta-glicoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1961-1967, 1993.

CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity and waterholding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, Oxford, v.109, n.1, p.144-148, 2008.

CUTTER, E.G. Células e Tecidos In: **Anatomia Vegetal**, 2ed. Rocca, São Paulo, 1996.

DONLON, J. Subtilisin. In: J. POLAINA e A. MACCABE (Ed.). **Industrial Enzymes**: Springer Netherlands, Subtilisin, p.197-206, 2007.

DOUCET, D., OTTER, D. E., GAUTHIER, S. F., et al. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: Peptide Identification and Determination of Enzyme Specificity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.21, 2003/10/01, p.6300-6308, 2003.

EMBRAPA. Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>> Ultimo acesso em agosto de 2014.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España). 1258p, 1993.

FERRARI, R.A.; DEMIATE, I.M.; Soybean isoflavones – a short review, **Biol. Health Science**, n. 7, 2001.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D.L. Nutricional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.3, 2001.

FUKUSHIMA, D. Recent progress on biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products. **Foods and Biotechnology**, v.8, p.83-135, 1994.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.1, p.86-93, 2001.

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Pathways to bioactive oligosaccharides: biological functions and potential applications. In: ITO, R.; MATSUO, Y. Handbook of carbohydrate polymers: development, properties and applications. New York: **Nova Science Publishers**, p.279-309, 2010.

GOLBITZ, P.; JORDAN, J. Soyfoods: Market and Products. In: **Soy Applications in Food**. RIAZ, M. N., New York: CRC Press, cap.1, p. 2-21, 2006.

GODOI, P.H. **Estudo da atividade enzimática da bromelina pura em solução em diferentes temperaturas e pH** Dissertação (Mestrado Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, 2007.

GÓES-FAVONI, S. P.; BELÉIA, A. D. P.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Isoflavonas em produtos comerciais de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, p.582-586, 2004.

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

GUTTE, B.; **Peptides: Synthesis, Structure, and Applications**, Academic Press: New York, 1995.

HALL, C. W. **Drying farm crops**. Westport: The Avi, 1971.

HANDA, C.L.; COUTO, U.R.; VICENSOTI, A.H.; GEORGETTI, S.R.; IDA, E.I. Optimization of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. **Food Chemistry**, v.152, p.56-65, 2014.

HETTIARACHCHY, N.; KALAPATHY, U. Soybean protein products. In.: LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. Gaithersburg, Aspen Publishers. Ed.2, cap.8, p.379-411, 1999.

HIGA, R.H. **Predição de regiões de interface proteína-proteína baseada em informações estruturais**. Campinas:UNICAMP, 2009. Tese (Doutorado Engenharia Elétrica) Universidade Estadual de Campinas, 2009.

HOWELL, K.N. Chemical and enzymatic modification. In: **Food proteins- properties and characterization**. Shuryo Nakai and H. Wayne Modler (ed). New York: Miley-VCH, Cap. 5, p.235-280, 1996.

INSTITUTO Adolfo Lutz. **Normas analíticas**. Ed.5 São Paulo, 2008.

JACKSON, C. J. C.; DINI, J. P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H. P. V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZELL, D.; De GRANDIS, S. Effects of processing

on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p.1117-1123, 2001.

KAO, T.H.; CHEN, B.H. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p.7544-7555, 2006.

KIRK, O.; BORCHET, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 13, p. 345-351, 2002.

KILARA, A. Enzyme-modified protein food ingredients. *Process Biochemistry*, Rickmansworth, v.23, n.5, p.1995.

KIIHL, R. A. S.; GARCIA, A. **The use of the long-juvenile trai in breeding soybean cultivars**. In: World Soybean Research Conference, n.4, p.994-1000, 1989.

KIM, H.; PETERSON, T.G.; BARNES, S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 68, n.6, p.1418S-1425S, Suppl.S, Dec., 1998.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos – Teoria e aplicações práticas**. GEN. p. 77-105, 2010.

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, 2000.

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, 1970.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, v.48, n.10, p.68 -71, 1994.

LA SOJA. Disponível em:< <http://lasoja.org/>> ultimo acesso em agosto de 2014.

LAZZAROTTO, J.J.; HIRAKURI, M. H. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, p.46, 2010.

LEE, S. J.; AHN, J. K.; KIM, S. H.; KIM, J. T.; HAN, S. H.; JUNG, M. Y.; CHUNG, I. M. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.3382-3389, 2003.

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

LEROUXEL, O.; CAVALIER, D.M.; LIEPMAN, A.H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides- a complex process. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, n.6, p.621-630, 2006.

LIU, K. Current constraints in soybean food utilization and efforts to overcome them. In: World Soybean Research Conference VI. **Proceedings**. Chicago, p.409-418, 1999.

_____. **Soybeans: Chemistry, technology, and utilization**. Chapman & Hall: New York, p.535. 1997.

LYND, L.R.; WEIMER, R.J.; VANZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p.506-77, 2002.

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

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products, **Food Technology**, v.48, n.10, p.89-113, 1994.

MARTIN, K.; MCDOUGALL, B.M.; MCILROY, S.; JAYUS, CHEN J.E.; SEVIOUR, R.E. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal α -(1-3) and (1,6) – b-glucanases. **FEMS Microbiol Rev**, 31, p.168-192, 2007.

MARTINS, V.B.; NETTO, F.M. Physicochemical and functional properties of soy protein isolate as a function of water activity and storage. **Food Research International**, v.39, p.145-153, 2006.

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, 2011.

MATHEWS, K.C.; VAN HOLDE, K.E. **Biochemistry, Enzymes: Biological Catalysts**. New York The Benjamin Cummings Publishing Company, cap.10, p.339-380, 1990.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Curr Pharm** n.9 p.1289-1295, 2003.

MEJIA, E. LUMEN, B.O. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic disease. **Sexuality, Reproduction and Menopause**, v.4, n.2, p.91-95, 2006.

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S.K. Antioxidant properties of a radicalscavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.53, n.3, p.581-587, 2005.

MCDUGALL, G.J.; MORRISON, I.M. STEWART, D.; HILLMAN, J.R. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.70, n.2, p.133-150, 1996.

MOLLER, N.P.; SCHOLZ- AHRENS, K.E.; ROOS, N.;SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v.47,171-82, 2008.

MORAES, C.S. **isoflavonas de soja e suas atividades biológicas**. São Paulo: Livraria Vela, p.31-28, 2009.

MORAIS, A.A.C.; SILVA, A.L. **Soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, p.259, 1996.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p.1523-1542, 2006.

NAIN, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; Soybean isoflavones: characterization, determination, and antifungal activity, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 22, 1974.

NIELSEN, P.M.; OSLEN, H.S. Enzimic modification of food protein. In: **Enzymes in food technology**. Robert J. Whintehurst and Barry A. Law (eds.) Sheffield Academic Press, cap. 6, p.109- 143, 2002.

NOVOZYMES. **Industrial Biotechnology**. Disponível em:<
<http://www.novozymes.com/en/Pages/default.aspx/>> Ultimo acesso em novembro de 2014.

ORTIZ, S.E.M.; MAURI, A., MONTERREY-QUINTERO, E.S.; TRINDADE, M.A.; SANTANA, A.S.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. **Food Science and Technology**, v.42, p.919–923, 2009.

O'TOOLE, D. K. Characteristics and Use of *Okara*, the Soybean Residue from Soy Milk Production-A Review. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.363-371, 1999.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; MASCARENHAS, H. A.A.; SCAMPARINI, A.R.P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.3, n.3, p.156-160, 2001.

PANYAM, D.; KILARA, A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science e Technology**, Cambridge, v.7, p.120-125, 1996.

PEÑA-RAMOS, E.A.; XIONG, Y.L.; ARTEAGA, G.E. Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolyzed whey protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v.84, n.14, p.1908-1918, 2004.

PHILLIPS, R.D.; BEUCHAT, L.R. Protein Functionality in Foods. **ACS Symposium Series**, Washington, D.C., 1981.

PITSON, S.; SEVIOUR, R.E.; MCDOUGALL, B.M. Effect of carbon source on extracellular (1-3) and (1,6) – β -glucanase production by *Acremonium persicinum*. **Can. J. Microbiol.** v.43, p.432-439, 1997.

PREDROCHE, J.; YUST, M.M.; LQARI, H.CALLE, J.G.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MILLAN, F. Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases. **International Dairy Journal**, v.14, p.527-533, 2004.

PROYECTO PILOTO de emprendimiento solidário de producción, elaboración y distribución de alimentos de soja para assistência alimentaria em comedores comunitarios del partido, 2002.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of plants**, New York: Worth Publ, 2001.

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**, Washington, v.79, p.223-230, 2000.

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, 2002.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

RICHARDSON, T.; HYSLOP, D.B. Enzymes, In: **Fenema. Food Chemistry**, 2^a edição. New York: Marcel Dekker, cap.6, p.371-476, 1985.

ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G.; Solid-phase extraction of soy isoflavones, **J. Chromatogr. A**, p.1076, 2005.

ROY, F.; BOYE, J.I.; SIMPSON, B.K. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Res. Int.** 43: p.432-442, 2010.

SAID & PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Editora Eventos, 2002.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L.R. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system. **Food Chemistry**, Oxford, v.86, n.1, p.99-103, 2004.

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

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**, Barking, v.90, p.133-139, 2005.

SARTORELLO, M.C. **Estudo do processo de extração de bromelina em sistemas descontínuo utilizando água, polietileno glicol e polissacarídeo da goma do cajueiro**. Dissertação (Mestrado de Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influencia da ação das enzimas Alcalase® e flavourzyme no grau de hidrolise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v.32, n.5, p.1144-1150, 2009.

SCHOMBURG, D.; SALZMANN, M. **Enzyme Handbook 3: Hydrolases**. p.1-825, 1991.

SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, Bethesda, v.134, n.6, p.1333S-1343S, 1998.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em produtos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. 1. ed. São Paulo: Varela, p.216-230, 1996.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v.53, n.3, p.285-293, 1995.

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

SIENKIEWICZ- SZLAPKA, E. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides indifferent cheese varieties. **Int Dairy J**. v.19, n.4, p.258-263, 2008.

SINGH, M.; MOHAMED, A. **Influence of gluten-soy protein blends on the quality of reduced carbohydrates cookies**. Food Science and Technology, 2005.

SINGLETERY, K.; FALLER, J.; LI, J. Y.; MAHUNGU, S. Effect of extrusion on isoflavone content and antiproliferative bioactivity of soy/corn mixtures. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 48, n. 8, p. 3566-3571, 2000.

SINHA, R. RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, London, v.101, n.4, p.1484-1491, 2007.

SOMMIER, A.; CHIRON, H.; COLONNA, P.; VALLE, G. D.; ROUILLÉ, J. An instrumented pilot scale oven for the study of French bread baking. **Journal of food Engineering**, v. 69, p. 97-106, 2005.

- SOUZA, G.; VALLE, J. L. E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.34, n.2, p.61-69, 2000.
- STEWART, J. **Snack craker production: how to chose ingredients and methods**. Bakers igest, v.58, n.4, p.20-24, 1984.
- SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.38, p.319-328, 1999.
- TRAVAGLINI, D. A.; VITTI, P. Soja em produtos derivados de preparo rápido. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, p.872, 1981.
- VENCATO, A. Z. Anuário Brasileiro da Soja 2010. Santa Cruz do Sul: Ed. **Gazeta Santa Cruz**, p.144, 2010.
- VIEIRA, M. A. **Caracterização de farinhas obtidas do resíduo da produção de palmito da palmeira real (*Archontophoenix alexandrae*) e desenvolvimento de biscoito fibroso**. Florianópolis: UFSC, 2006. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- WALDRON, K.W.; PARKER, M.L.; SMITH, A.C. Plant cell walls and foos quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2, p.101-119, 2003.
- WALISZEWSKI, K. N.; PARDIO, V.; CARREON, E. Physicochemical and sensory properties of corn tortillas made from nixtamalized corn flour fortified with spent soymilk residue (*okara*). **Journal of Food Science**, Chicago, v.67, n.8, p.3194-3197, 2002.
- WANG, H. L.; CAVINS, J. F. Yield and amino acid composition of fractions obtained during tofu production. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.66, p.359-361, 1989.
- WANG, J.S.; ZHAO, M.M.; ZHAO, Q.Z.; JIANG, Y.M. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. **Food Chemistry**, Oxford, v.101, n.4 , p.1658-1663 , 2006.
- WANG, Y.; DE MEJIA, G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Compr. Rev. Food Sci. Food Safety**, n.4, p.63-78, 2005.
- WANG, H-J; MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.2377-2383, 1996.
- WANG, H-J.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of american and japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1674-1677, 1994 b.
- WANG, H-J.; MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1666-1673, 1994 a.

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, 1996.

WOLF, J. W. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. **Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 18, p. 969-975, 1970.

YOSHIARA L. Y.; MADEIRA T. B.; DELAROZA F.; SILVA J. B.; IDA E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. **Int. Journal of Food Science Nutrition**, 2012.

YUST, M.D.; PEDROCHE, J.; MILLÁN-LINARES, M.C.; ALCAIDE-HIDALGO, J.M.; MILLÁN, F. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. **Food Chemistry**, v.122, n.4, p.1212-1217, 2010.

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**, Oxford, v.101, p.2084-2089, 2010.

ZHONG, R.; YE, Z. Regulation of cell wall biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, n.6, p.564-572, 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Artigo A

FIGUEIREDO, V.R.G.; YAMASHITA, F.; VANZELA, A.L.L.; IDA, E.I. ; KUROZAWA, L.E. Ação do complexo multi-enzimático melhora a extração e obtenção de concentrados proteicos do *okara*.

Artigo B

FIGUEIREDO, V.R.G.; GEORGETTI, S.R.; IDA, E.I.; KUROZAWA, L.E. Otimização da hidrólise enzimática das proteínas do *okara* para obtenção de hidrolisados proteicos com elevada capacidade antioxidante.

5.1 Artigo Científico A

AÇÃO DO COMPLEXO MULTI-ENZIMÁTICO MELHORA A EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS PROTEICOS DO OKARA

FIGUEIREDO, V.R.G.¹, YAMASHITA, F.¹, VANZELA, A.L.L.², IDA, E.I.¹,
KUROZAWA, L.E.^{1,*}

¹Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, 86.057-970, Londrina, PR, Brasil.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, 86.057-970, Londrina, PR, Brasil.

RESUMO

O *okara*, subproduto da elaboração de extrato de soja, apresenta elevado conteúdo de proteínas, com 27 a 38% em base seca. Estas são reconhecidas na indústria alimentícia por seu elevado valor nutritivo e funcionalidade tecnológica. No entanto, a parede celular pode limitar a extração de proteínas. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo otimizar o pré-tratamento enzimático do *okara*, utilizando o complexo multi-enzimático Viscozyme[®], para aumentar a extração proteica. Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR), para avaliar o efeito das variáveis temperatura (37 – 53 °C), concentração de enzima (1,5 – 4%) e pH (5,5 – 6,5) sobre as funções-respostas, conteúdo e a recuperação de proteínas do concentrado proteico. A condição ótima do pré-tratamento enzimático, de modo a obter máximos valores das respostas estudadas, foi à 53 °C, pH 6,2 e concentração de enzima de 4%. Nessa condição, obteve-se um concentrado proteico com 56% de proteínas (base seca), correspondendo a uma elevação de 17% em

* **Autor correspondente:**

Universidade Estadual de Londrina. Programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos. Rod. Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Caixa Postal 6001, 86051-980, Londrina, PR, Brasil. Telefone: +55 (43) 3371-4987. E-mail: louise@uel.br

comparação com a amostra controle sem o pré-tratamento enzimático. Também, foram recuperados 28% das proteínas do *okara* no concentrado proteico, valor duas vezes superior ao encontrado para a amostra controle. Estes resultados demonstram que a ação do complexo multi-enzimático sobre a parede celular pode melhorar significativamente a extração de proteínas a partir de *okara*.

Palavras-chave: Concentrado proteico. Hidrólise enzimática. Planejamento experimental. Soja. Microscopia de fluorescência.

1 INTRODUÇÃO

O *okara* é um subproduto da soja obtido a partir do processo de filtração do extrato aquoso, e apresenta elevado valor nutritivo, sendo rico em fibras (10-12%), proteínas (27-38%), lipídios insaturados (17%) e carboidratos (25,2 - 30,0%). Apesar de ser aproveitado principalmente como ração animal, pesquisas demonstram que sua elevada qualidade nutricional, principalmente em função do seu teor de proteínas, possibilita ampliar a sua aplicação na nutrição humana, visando melhorias dos produtos alimentícios (CHAN; MA, 1999; SHIMIZU, 2002; SUREL; COUPLET, 2005).

As proteínas da soja são reconhecidas na indústria alimentícia por seu elevado valor nutritivo e funcionalidade tecnológica, possibilitando aumentar a ingestão de aminoácidos essenciais (JACKSON et al., 2001; WALISZEWSKI et al., 2002). Os concentrados e isolados proteicos são extensivamente utilizados para a formulação de produtos alimentícios, em decorrência de suas propriedades nutricionais e funcionais, além de apresentar sabor neutro (MARTINS; NETTO, 2006).

No entanto, os polissacarídeos da parede celular podem limitar o acesso às proteínas e sua extração (DUEÑAS et al., 2007; TANG et al., 2002). Preece et al. (2014), em seu estudo da microestrutura da soja e do *okara* por microscopia confocal, verificaram a localização da proteína no interior da célula vegetal e sugeriram que um tratamento na parede celular poderia melhorar a extração proteica do *okara*. Tratamentos enzimáticos para reduzir a rigidez da parede celular e melhorar a extração e rendimento de óleos e proteínas têm se mostrado promissores (KASAI et al., 2004; ROSENTHAL et al., 2001). Complexos multi-enzimáticos contendo uma ampla variedade de carboidrases são capazes de desintegrar a parede celular pela hidrólise das ligações entre polissacarídeos, liberando componentes intercelulares como as proteínas (DUEÑAS et al., 2007). Estudos sobre os efeitos do pré-tratamento de matérias-primas com carboidrases para melhorar a extração de proteína foram realizados em farelo de aveia (LIU et al., 2008), em farelo de arroz (ANSHARULLAH; HOURIGAN; CHESTERMAN, 1997) e em folhas de oliveira (VERGARA-BARBERÁN et al., 2015).

A atividade de uma enzima é afetada por vários fatores, entre os quais se destacam pH, temperatura e concentração de enzima e de substrato (STEWART,

1984; RICHARDSON; HYSLOP, 1985; LEHNINGER, 1995). O conhecimento desses fatores é importante, uma vez que a otimização dos parâmetros da hidrólise enzimática é essencial para o desenvolvimento de um processo eficiente e econômico visando à obtenção de concentrados ou isolados proteicos.

Tendo em vista o sucesso obtido na aplicação de hidrólise enzimática para extração de proteínas em outras matérias-primas, este trabalho teve como objetivo otimizar o pré-tratamento enzimático do *okara* com o complexo multi-enzimático Viscozyme[®], a partir de um planejamento composto central rotacional, visando aumentar a extração e obtenção de concentrado proteico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material e Preparo de Amostra

O *okara* proveniente do processo de obtenção do extrato de soja foi doado pela Cocamar Cooperativa Agroindustrial (Maringá, PR, Brasil). O material foi imediatamente desidratado em estufa com circulação de ar a 40 °C por 24 h. Em seguida, foi moído em um moinho de facas para obtenção da farinha de *okara*. Esta foi desengordurada com n-hexano (1:10, p/v) mediante agitação (mesa agitadora orbital, modelo Ma-140, Marconi, Piracicaba, Brasil) por 30 min a 300 rpm, sob temperatura ambiente. Após filtração a vácuo, a farinha desengordurada foi armazenada em refrigerador a 7 °C até o momento das análises.

Para a hidrólise da parede celular do *okara*, foi utilizado o complexo multi-enzimático (composto por celulase, hemicelulase, xilanase e a β -glucanase) denominado de Viscozyme[®] (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) oriunda de *Aspergillus aculeatus*, com atividade declarada de 100 FBG/g. Cada FBG é a quantidade de enzima necessária, em condição padrão (30 °C, pH 5,0) para hidrolisar β -glucanas.

2.2 Pré-tratamento enzimático do *okara*, extração e concentração das proteínas

Para a otimização do pré-tratamento enzimático do *okara* utilizando o complexo multi-enzimático Viscozyme[®], foi aplicado o delineamento composto

central rotacional 2³, com 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios (Tabela 1). Assim, foram avaliados os efeitos das variáveis independentes temperatura (37, 45, 43, 50 e 53 °C), pH (5,5, 5,7, 6,0, 6,3 e 6,5) e concentração de enzima (1,5, 2,0, 2,75, 3,5 e 4,0%), sobre as funções-respostas conteúdo de proteína CP (%) e recuperação de proteína no concentrado proteico RP (%). Os intervalos de temperatura, pH e concentração de enzima utilizados neste estudo foram baseados na literatura e em testes preliminares.

Os experimentos foram realizados de forma aleatória. Frascos de erlenmeyer contendo 5,0 g de farinha de *okara* desengordurada, e 95 mL de tampão citrato fosfato com diferentes pH (5,5, 5,7, 6,0, 6,3 ou 6,5) foram colocados em banho Dubnoff (Mod.T-53, TECNAL, Piracicaba, Brasil) na temperatura (37 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C ou 53 °C) específica de cada ensaio. E após atingirem a temperatura, foram adicionadas a enzima na concentração específica de cada ensaio (1,5, 2,0, 2,75, 3,5 ou 4%), sendo então agitados (Dubnoff com controle de temperatura) por 2 horas.

Tabela 1- Planejamento experimental com as variáveis independentes reais e codificadas e funções-respostas avaliadas.

Ensaio	Variáveis Independentes			Funções-respostas	
	T (C°)	pH	E (%)	CP	RP
1	40 (-1)	5,7 (-1)	2 (-1)	53,83	24,01
2	50 (+1)	5,7 (-1)	2 (-1)	46,88	27,25
3	40 (-1)	6,3 (+1)	2 (-1)	55,27	22,12
4	50 (+1)	6,3 (+1)	2 (-1)	49,74	28,62
5	40 (-1)	5,7 (-1)	3,5 (+1)	59,3	31,65
6	50 (+1)	5,7 (-1)	3,5 (+1)	52,71	35,29
7	40 (-1)	6,3 (+1)	3,5 (+1)	45	35,45
8	50 (+1)	6,3 (+1)	3,5 (+1)	58,96	31,28
9	37 (-1,68)	6 (0)	2,75 (0)	54,34	24,53
10	53 (+1,68)	6 (0)	2,75 (0)	61,66	30,5
11	45 (0)	5,5 (-1,68)	2,75 (0)	43,11	19,44
12	45 (0)	6,5 (+1,68)	2,75 (0)	50,97	24,8
13	45 (0)	6 (0)	1,5 (-1,68)	53,99	26,99
14	45 (0)	6 (0)	4 (+1,68)	51,37	25,66
15	45 (0)	6 (0)	2,75 (0)	67,17	31,36
16	45 (0)	6 (0)	2,75 (0)	66,1	28,84
17	45 (0)	6 (0)	2,75 (0)	66,72	33,37

T=temperatura em °C, E=% do conteúdo de enzima, CP= conteúdo de proteínas e RP = rendimento de proteína.

Após a realização de cada experimento de pré-tratamento do *okara* com o complexo multi-enzimático de carboidrases (Tabela 1), as proteínas foram extraídas

conforme a metodologia descrita por Ma et al. (1997), com algumas modificações. Assim, para a solubilização das proteínas, o pH de cada amostra foi ajustado para 9,0 com NaOH 1 M e agitados na mesa agitadora orbital Dubnoff, por 30 min a 60 °C. Em seguida, foram centrifugadas (modelo 5804-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 14 204×g por 30 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante teve seu pH ajustado para 4,5 com HCl 0,5 M para precipitação das proteínas. Após centrifugação a 14 204×g por 30 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado remanescente é o concentrado proteico. Neste concentrado proteico, foram determinadas as funções-respostas conteúdo proteico (CP) e recuperação de proteínas (RP).

Como amostra controle foi obtido um concentrado proteico de *okara* sem o pré-tratamento enzimático, o qual também se determinou CP e RP.

2.3 Procedimentos Analíticos

Para a caracterização química da matéria-prima farinha de *okara*, foram determinados em triplicata os conteúdos de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos segundo a metodologia da AOAC (1995). O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Kjeldahl (N x 6,25); lipídios, pelo método gravimétrico de extração a quente utilizando extrator de Soxhlet; cinzas, pelo método gravimétrico em mufla (550 °C); o teor de umidade, pelo método gravimétrico em estufa a 105 °C; e o conteúdo de carboidratos totais foi calculado por diferença.

O conteúdo de proteínas (CP) totais foi determinado pelo método de Kjeldahl conforme descrito anteriormente e a recuperação de proteína (RP) no concentrado proteico foi definida pela seguinte equação que segue:

$$RP(\%) = \frac{MP_{conc}}{MP_{okara}} \times 100 = \frac{X_{conc} \times m_{conc}}{X_{okara} \times m_{okara}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

onde, RP(%) é a recuperação de proteína no concentrado proteico; MP_{conc} é a massa de proteína no concentrado (g); MP_{okara} é a massa de proteína na farinha de *okara* (g); x_{conc} é o conteúdo de proteína no concentrado (g/g fração); x_{okara} é o conteúdo de proteína na farinha de *okara* (g/g farinha); m_{conc} é a massa do concentrado (g); m_{okara} é a massa de farinha de *okara* (g).

2.4 Análise Estatística

Para a elaboração dos modelos matemáticos, 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%. Após a análise estatística dos coeficientes, foi realizada análise de variância (ANOVA), avaliando o coeficiente de determinação (R^2) e realizando o teste F, para verificar se cada modelo apresentava um ajuste adequado dos dados experimentais.

2.5 Microscopia Óptica de Fluorescência

Amostras de *okara* antes e após o pré-tratamento enzimático foram avaliadas por meio de microscopia óptica de fluorescência. As lâminas contendo as amostras foram montadas com 25 μ L de um meio composto por 40 μ L de uma solução de DABCO [1,4-diazabicyclo (2.2.2) octano (2,3%), 20 mM Tris HCl, pH 8,0, (2%) e glicerol (90%), em água destilada, 40 μ L de água destilada e 8 μ L de calcofluor. Todas as imagens foram obtidas com microscópio óptico de fluorescência (4500 DM B, Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com uma câmara de DFC 300FX, e software Leica IM50 4.0. Para otimizar e melhorar o contraste e brilho, foi utilizado o software Imagem iGrafx.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização Química do *Okara*

Na caracterização química, o *okara* desengordurado apresentou elevado conteúdo de proteínas e carboidratos em base seca (Tabela 2). No estudo de enriquecimento de pão de forma Cantuária et al. (2008), utilizaram *okara* sem desengordurar contendo 38,60%, 27,13% e 31,77% de proteína, carboidratos e lipídios em base seca, respectivamente. Valores de proteína são próximos aos obtidos neste estudo, enquanto que valores de carboidratos e lipídios são superiores. Os valores inferiores de lipídios é resultado do processo de desengorduramento.

Valores semelhantes de cinzas (5,20%) em *okara* foram encontrados com Silvia et al. (2006) em seu estudo de comparação da composição química do grão de soja e do *okara*. No entanto, os autores obtiveram valores superiores de conteúdo proteico, o qual apresentou 46,7%.

Tabela 2– Composição centesimal do *okara* desengordurado

Composição	Média (em g/100g de <i>okara</i>) ± DP
Umidade	16,49 ± 0,14
Proteínas (bs)	31,73 ± 0,78
Lipídios (bs)	3,04 ± 0,15
Cinzas (bs)	5,26 ± 0,25
Carboidratos*	60,47 ± 0,84

*Calculado por diferença; DP= desvio padrão; bs= base seca

Variações na composição química do *okara* são justificadas pelas diferenças no processo de obtenção do extrato aquoso (temperatura, maceração entre outros) e variedades de soja (MA et al., 1997; SUREL; COUPLÉ, 2005).

3.2 Otimização do Pré-tratamento do *Okara* com Carboidrases e Obtenção de Concentrado de Proteínas

Para análise estatística ($p < 0,1$), foram calculados as estimativas dos efeitos das variáveis independentes sobre as funções-respostas CP (conteúdo de proteínas expressos em %) e RP (recuperação de proteínas expressos em %) (Tabela1), o erro padrão, o coeficiente t e a significância estatística (p) (Tabela 3) exclusão das variáveis não significativas ($p > 0,1$).

Tabela 3- Estimativa dos efeitos das variáveis independentes sobre as funções-respostas CP e RP, após a exclusão dos parâmetros não-significativos.

Fatores	CP	RP
T	-5,64 (Q)	3,44 (L)
pH	-13,41(Q)	-3,28 (Q)
E	-9,41(Q)	4,93 (L)
T x pH	5,53 (L)	n.s.
T x E	4,99 (L)	n.s.
pH x E	-3,05 (L)	n.s.
R ²	0,85	0,63
F calculado	7,29	n.s.
F tabelado	2,50	n.s.

Onde: CP= Conteúdo de proteínas; RP = Rendimento de proteínas;
 T = Temperatura; E = % de enzima; L = linear e Q = quadrático.
 n.s.= não significativo a $p < 0,1$

A função-resposta CP obteve um R² de 0,85, e no teste F, o F calculado (7,29) apresentou-se maior que o F tabelado (2,50) (Tabela 3), deste modo, o modelo pode ser considerado preditivo (Equação 2). Entretanto, para a função-resposta RP, não foi possível obter um modelo preditivo devido ao baixo valor R² de 0,63.

Assim, o seguinte modelo polinomial de segunda ordem foi proposto para prever o CP em termos de variáveis codificadas:

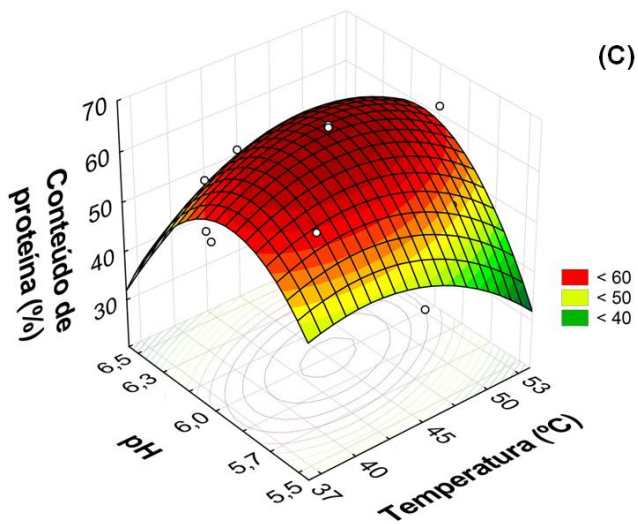
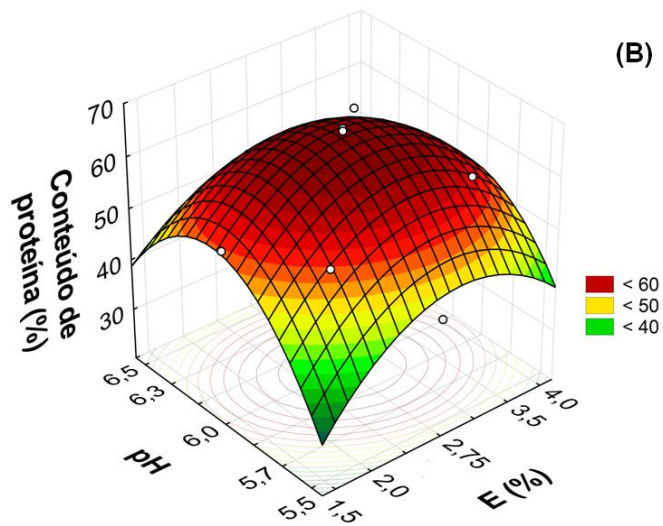
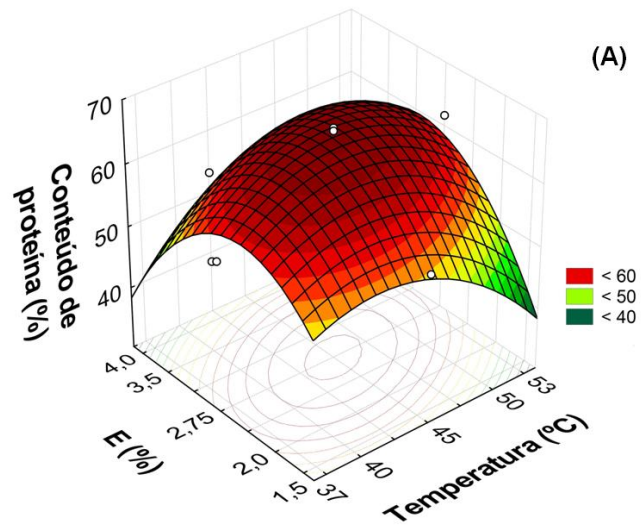
$$CP = 66,53 - 2,82 T^2 - 6,70 pH^2 - 4,70 E^2 + 2,76 T \times pH + 2,50 T \times E - 1,53 pH \times E$$

(Eq. 2)

onde: CP = função-resposta expressa em % de proteínas, T é a temperatura (codificada) e E é a concentração de enzima (codificada).

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta gerada para a função-resposta CP utilizando o modelo proposto (Eq.1). A figura expressa a interação entre as duas variáveis independentes, em que a terceira variável foi mantida no ponto central.

Figura 1- Superfície de resposta indicando a influência das variáveis independentes sobre a função-resposta CP: A) concentração de enzima x temperatura; B) pH x concentração de enzima; C) pH x temperatura.



Entre as variáveis investigadas, o pH apresentou maior influência sobre o CP, com efeito quadrático negativo, indicando uma região de máximo valor próximo ao ponto central (Figuras 1B e 1C). Segundo Whitaker (1994), cada enzima apresenta um pH ótimo e o deslocamento deste ponto pode afetar a estabilidade da enzima, causando uma desnaturação irreversível em sua estrutura conformacional e, conseqüentemente, uma contínua perda da sua atividade.

A variável concentração de enzima (E) atuou de maneira quadrática negativa, indicando uma região de máximo na CP próximo ao ponto central (Figura 1A e B). O efeito quadrático de concentração de enzima também foi observado por Kim et al. (1998), Berlin et al. (2007) e Zhou et al., (2009) quando investigaram a otimização com misturas de celulasas. Os autores reportaram que este efeito era decorrente da competição por sítios de ligação entre as enzimas e a saturação individual de cada enzima, sendo o sinergismo maior quando cada celulase estava presente em uma concentração não saturada.

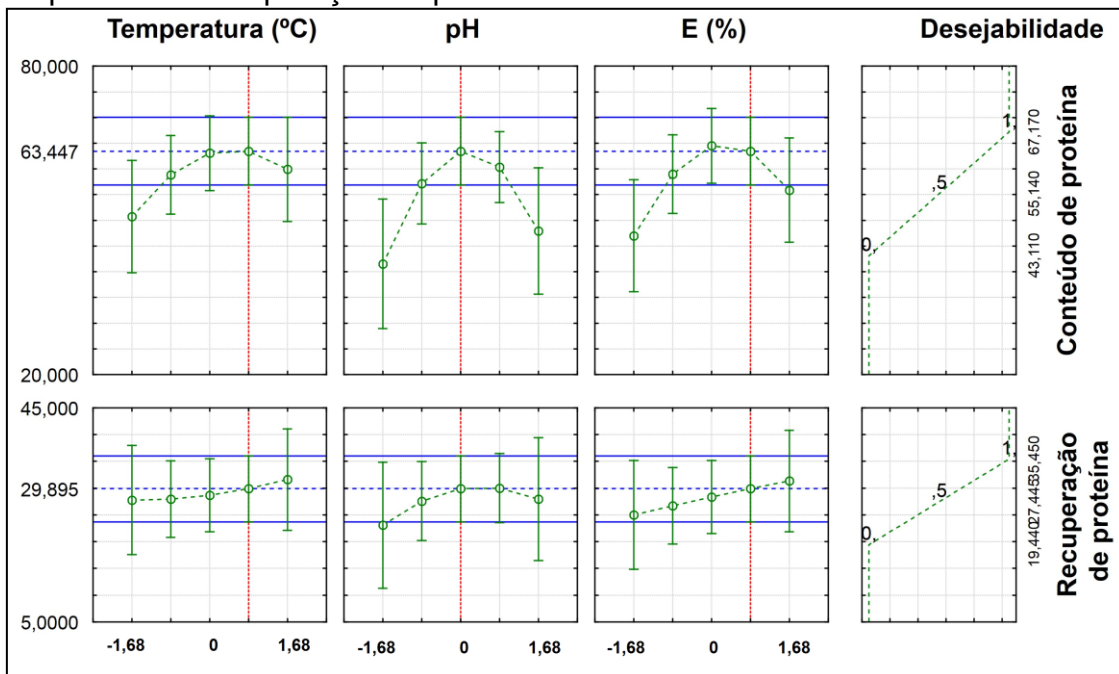
O mesmo comportamento quadrático negativo foi observado para a variável temperatura, indicando maior CP em temperatura de 45 °C (Figura 1A e C). Resultados semelhantes foram descritos por Guan e Yao (2008) e Rosset et al., (2012) quando investigaram a extração de proteína em farelo de aveia e farinha de soja desengordurada, respectivamente. A hidrólise enzimática de celobiose pela β -1,4-glucosidase em diferentes temperaturas (40 a 70 °C) foi avaliada por Bravo et al. (2000), os quais observaram que houve uma desativação significativa da enzima a 70 °C, em um curto tempo de processo. A velocidade da reação aumenta com a concentração de enzima e mantém saturada à concentração do substrato. Com relação à temperatura de reação, a sua elevação provoca aumentos na velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. Entretanto, em elevadas temperaturas, ocorre à desnaturação da enzima, resultando na diminuição da sua atividade enzimática e, conseqüentemente, da clivagem dos polissacarídeos da parede celular (MATHEWS; VAN HOLDE, 1990; LEHNINGER,1995). Assim, há uma redução na liberação das proteínas presentes no interior das células, diminuindo o CP no concentrado proteico, conforme observado nas Figuras 1A e C.

Com a estimativa dos efeitos sobre a função-resposta RP (Tabela 3), observa-se que a variável pH atua de forma quadrática negativa, indicando uma

região de máximo para esta resposta próximo ao ponto central. As variáveis temperatura e concentração de enzima apresentaram um efeito linear positivo, indicando que o aumento delas resulta em maiores valores de RP.

Embora o coeficiente de determinação da função resposta RP tenha sido baixo, a função desejabilidade (Figura 2) indicou as regiões para se obter um máximo CP e RP simultaneamente. Maiores valores de RP são observados em altas temperaturas, enquanto que maiores CP podem ser obtidos em temperaturas entre o ponto central e o ponto +1. Desta forma, a temperatura ótima foi estabelecida no ponto máximo (53 °C). O mesmo ocorreu para a concentração de enzima (4%). Em relação à variável pH, maiores valores de recuperação de proteína são encontrados em pH entre o ponto central e o ponto +1. Apesar de serem observados maiores valores de conteúdo de proteína com pH no ponto central, a mesma apresenta uma faixa de variação que permitiu fixar o pH neste intervalo. Diante disso, foi estabelecido o pH 6,2 como sendo o ponto ótimo para as duas funções-respostas.

Figura 2 - Parâmetro de desejabilidade estimado na condição em que o conteúdo de proteína e recuperação de proteína são maximizados simultaneamente.



Para validação do modelo preditivo (Eq. 1), realizou-se um ensaio na condição otimizada. O CP ótimo do experimento observado foi de 56,0% e o predito foi de 51,4%, com um erro relativo de 8,2%, desta forma, o modelo mostrou-se

adequado para predizer o CP do *okara*. Com relação à resposta RP, foi observado um valor experimental de 28%.

Rosset et al. (2012), investigaram o efeito do pré-tratamento de farinha de soja desengordurada com a enzima Viscozyme® sobre a extração de proteína, tendo como variáveis independentes: temperatura (40-65 °C) e concentração de enzima (1-3%). Os resultados obtidos por estes autores indicam que a temperatura ótima foi superior (60 °C) e similar a este estudo, enquanto que a concentração ótima de enzima determinada (3%) foi inferior à condição encontrada neste estudo. Nessa condição foi obtido um concentrado proteico com 59,6% de proteínas, cujo valor está próximo ao encontrado neste estudo.

Outros autores investigaram o uso do complexo multi-enzimático Viscozyme® no pré-tratamento de outras fontes proteicas, visando melhorar a extração de proteínas, e apesar de terem encontrado condições ótimas distintas apresentaram conteúdo de proteína similares a este estudo. Liu et al., (2008) realizou o pré-tratamento de farelo de aveia com 3% de enzima, a 44 °C e pH 4,6, resultou em um conteúdo de proteínas de 56,2%. A mesma condição foi apontada por Guan e Yao (2008) para extração de proteína em farelo de aveia, o qual foi obtido um conteúdo proteico (55,7%). Ansharullah et al. (1997) reportaram como condição ótima para extração de proteínas de farelo de arroz: 1% de concentração de enzima, 50 °C e pH de 3,8, e nesta condição obtiveram 57,89% de conteúdo proteico. Tang et al. (2003) sugeriram como condição ótima o uso de 45 °C, pH 4,1 e 8% de enzima para o pré-tratamento de farelo de arroz, entretanto, obtiveram conteúdo de proteína de 28,5%, inferior ao obtido neste estudo. Contudo, por se tratar de outras matérias-primas e diferentes condições de processamento, essas diferenças nas condições de otimização de pré-tratamento com enzimas são esperadas.

Comparando os resultados de CP e RP do concentrado proteico obtido no ensaio otimizado e no ensaio controle (sem o pré-tratamento enzimático), pode-se observar que a amostra controle apresentou teor de 47,8% de proteínas e recuperação de 15,05% de proteínas. Tais resultados foram inferiores ao encontrado na amostra otimizada com pré-tratamento enzimático, cujos resultados foram de 56,0% e 28% de proteínas para o concentrado proteico e rendimento proteico, respectivamente. Desta forma, estes resultados indicaram que a utilização da enzima Viscozyme® se mostrou eficiente e adequada para melhorar a extração de

proteína, com um aumento de 17% no teor de proteínas no concentrado e de 86% no rendimento proteico.

3.3 Microscopia Óptica de Fluorescência

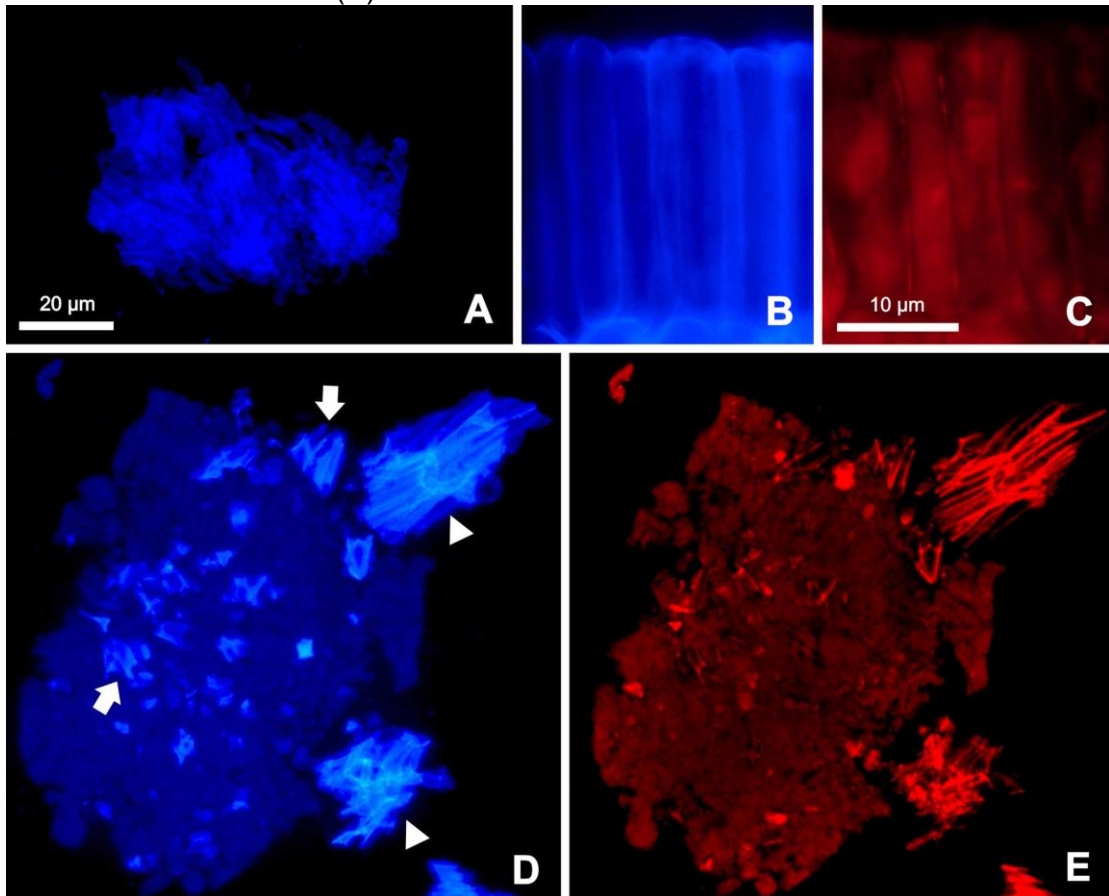
Para verificar o efeito do complexo multi-enzimático de carboidrases sobre o material celular do *okara*, evidenciou-se a presença de celulose com calcoflúor e observado por microscopia de epifluorescência. O calcoflúor é um fluorocromo que reconhece polissacarídeos com ligações β 1-3, β 1-4, presentes na parede celular íntegra (HAGEAGE; HARRINGTON, 1984).

Na Figura 3-A, pode-se observar um aglomerado de tecido vegetal antes do pré-tratamento enzimático, com aumento de 40 vezes. Neste caso, não foi possível observar a parede celular delineada, mas somente a fluorescência intensa em azul correspondente ao calcoflúor (360-400 nm). No aumento de 100 vezes a parede celular apareceu mais delineada, com sinal de fluorescência em azul marcando os seus limites (Figura 3-B), que também podem ser notados com autofluorescência no filtro vermelho (560-595 nm) (Figura 3-C).

Após o pré-tratamento enzimático na amostra de *okara*, a parede celular apresenta-se danificada e desorganizada, mas com algumas regiões íntegras, configurando uma hidrólise enzimática parcial (Figura 3-D). Podem-se observar regiões do agregado que ainda mantém ligações β 1,3 e 1,4 (seta) e duas regiões menos afetadas pelo pré-tratamento (ponta de seta).

Quando se observou a autofluorescência da mesma amostra, foi possível notar diferenças de intensidade em regiões mais e menos degradadas, porém sem a especificidade do calcoflúor (Figura 3-E). Tanto as imagens obtidas com calcoflúor como aquelas por autofluorescência, mostram que ocorreu a degradação da parede celular. Desta maneira, a microscopia óptica de fluorescência permitiu comprovar que a realização do pré-tratamento com a enzima danifica a parede celular, reforçando assim que o procedimento com o complexo multi-enzimático é efetivo para facilitar a extração de proteínas.

Figura 3– Microscopia de fluorescência da amostra de *okara* antes do pré-tratamento utilizando coloração com calcoflúor observada com filtro de 360-400 nm, e autofluorescência em filtro 560-595 nm. (A) visão geral do agregado de parede celular com aumento de 40 vezes em filtro de 360-400 nm; recorte de paredes celulares íntegras com aumento de 100 vezes em filtro de 360-400 nm (B) e em filtro 560-595 nm (C); visão geral do agregado de parede celular após o pré-tratamento com o complexo multi-enzimático com aumento de 40 vezes em filtro de 360-400 nm (D) e em filtro 560-595 nm (E).



CONCLUSÃO

O método de análise de superfície de resposta permitiu verificar a influência das variáveis estudadas, bem como determinar as condições para otimização do pré-tratamento enzimático do *okara*. As condições ideais determinadas foram: temperatura de 53 °C, pH 6,2 e concentração de enzima de 4,0%. Nesta condição foi obtido um concentrado proteico com 56% de proteínas e recuperados 28% das proteínas do *okara*.

O concentrado proteico que não sofreu o pré-tratamento apresentou valores de CP e RP inferiores aos da amostra pré-tratada enzimaticamente na condição otimizada. Portanto, comprovou-se que o pré-tratamento com o complexo multi-enzimático de carboidrases foi eficiente e adequado para a extração de proteínas a partir de *okara*, com aumento de 17% no teor de proteínas e 86% na recuperação das proteínas do concentrado proteico. Este processo é pouco descrito na literatura e é a primeira vez que a condição de hidrólise dessa matéria-prima foi otimizada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pelo apoio financeiro à Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (160/2014) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (473117/2013-4). LEK é bolsista produtividade em pesquisa da Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (501/2014).

REFERENCIAS

ANSHARULLAH, HOURIGAN, J. A., & CHESTERMAN, C. F. Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.74, p.141–146, 1997.

A.O.A.C. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15 ed. Washington: A.O.A.C. 1990.

BERLIN, A., MAXIMENKO, V., GILKES, N., SADDLER, J. Optimization of enzyme mixtures for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.**n. 97, p.287–296 , 2007.

BRAVO, V.; PAEZ, M.P.; AOULAD, M.; REYES, A. The influence of temperature upon the hydrolysis of cellobiose by b-1,4-glucosidases from *Aspergillus Níger*. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 26,p. 614–620, 2000.

CANTUÁRIA, C.M.; RIBEIRO, S.C.A.; RIBEIRO, C.F.A.; PARK, K.P.; 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, 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, 1999.

DUEÑAS, M.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. Changes in the content of bioactive polyphenolic compounds of lentils by action of exogenous enzymes. Effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.101, n.1,p.90-97, 2007.

GUAN, X. YAO, H. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. **Food Chemistry**, n.106, p.345–351, 2008.

HAGEAGE, G.J.; HARRINGTON, B.J. Use of calcofluor white in clinical mycology. **Lab. Med.** 15, p.109-112, 1984.

JACKSON, C. J.; DINI, J. P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H. P. V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZELL, D.; GRANDIS, S. de. 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, 2001.

KASAI, N., MURATA, A., INUI, H., SAKAMOTO, T., KAHN, R.I. Enzymatic high digestion of soybean milk residue (*okara*). **Journal Agricultural Food Chemistry**. 52, p. 5709–5716, 2004.

KIM, E., IRWIN, D.C., WALKER, L.P., WILSON, D.B. Factorial optimization of a sixcellulase mixture. **Biotechnol. Bioeng.** 58, 494–501, 1998.

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

LIU, J., GUAN, X., ZHU, D., SUN, J. Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling. **Food Science and Technology** . v.41, p. 1913–19, 2008.

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, 1997.

MATHEWS, K.C.; VAN HOLDE, K.E. **Biochemistry, Enzymes: Biological Catalysts**. New York The Benjamin Cummings Publishing Company, cap. 10, p.339-380, 1990.

MARTINS, V.B.; NETTO, F.M. Physicochemical and functional properties of soy protein isolate as a function of water activity and storage. **Food Research International**, v.39, p. 145-153. 2006.

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

RICHARDSON, T.; HYSLOP, D.B. Enzymes, In: **Fenema. Food Chemistry**, 2ª edição. New York: Marcel Dekker, cp.6, p.371-476, 1985.

ROSENTHAL, A., PYLE, D.L., NIRANJAN, K., GILMOUR, S., TRINCA, L. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. **Enzyme Microbial. Technol.** 28, p. 499–509, 2001.

ROSSET, M.; ACQUARO JUNIOR, 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, 2012.

SILVA, M.S.; NAVES, M.M.V.; OLIVEIRA, R.B.; LEITE, O.S.M. Composição Química e Valor Protéico do Resíduo de Soja em Relação ao Grão de Soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, p. 571-576, 2006.

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

STEWART, J. **Snack craker production: how to chose ingredients and methods.** Bakers igest, v.58, n.4, p.20-24, 1984.

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, n.8, p.1343–1349, 2005.

TANG, S., HETTIARACHCHY, N.S., ESWARANANDAM, S.; CRANDALL, P. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran: II. The role of Amylase, Celluclast, and Viscozyme. **Journal Food Science.** n.68, p.471–475, 2003.

TANG, S.; HETTIARACHCHY, N.S.; SHELLHAMMER, T.H Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran. 1. Physical processing and enzyme treatments. **Journal Agricultural Food Chemistry**, n.50, p.7444–7448, 2002.

VERGARA-BARBERÁN, M.; LERMA-GARCÍA, M.J.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; SIMÓ-ALFONSO, E.F. Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. **Food Chemistry**, v.169, p.28–33, 2015.

WALISZEWSKI, K. N.; PARDIO, V.; CARREON, E. Physiochemical and Sensory Properties of Corn Tortillas Made from Nixtamalized Corn Flour Fortified With Spent Soymilk Residue (*Okara*). **Journal of Food Science**, v. 67, n.8, p.3194-3197, 2002.

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

ZHOU, J.; WANG, Y.H.; CHU, J.; LUO, L.; ZHUANG, Y.P., ZHANG, S.L. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. **Bioresource Technology.** n.100, p.819–825, 2009.

5.2 Artigo científico B

OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO *OKARA* PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS COM ELEVADA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

FIGUEIREDO, V.R.G., GEORGETTI, S.R., IDA, E.I., KUROZAWA, L.E.

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 10.011 CEP 86.057-970, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO

O *okara* é um subproduto obtido da elaboração do extrato aquoso de soja e apresenta elevado valor nutritivo, com cerca de 27,0 - 38,0% de proteínas. Quantidades substanciais deste nutriente são descartadas ou subutilizadas em alimentação animal. Assim, este trabalho teve como objetivo otimizar o processo de hidrólise enzimática proteica do *okara*, visando obter maior grau de hidrólise. Para isso, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar a influência das variáveis temperatura (40 – 70 °C), razão enzima:substrato (0,5 – 5,0%, g/100g proteína) e pH (7,0 – 9,0) sobre o grau de hidrólise (GH). A condição ótima encontrada foi 55 °C, pH 9 e razão enzima:substrato de 5,0%, em que o grau de hidrólise obtido foi de 35,51%. Foi feita a análise de eletroforese do hidrolisado obtido na condição otimizada, a qual evidenciou a formação de peptídeos de baixo peso molecular. O hidrolisado ainda apresentou elevado conteúdo de isoflavonas agliconas e maior capacidade antioxidante, pelo método de ABTS e FRAP, em comparação com a amostra não hidrolisada.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Clivagem enzimática de proteína. Isoflavonas. Eletroforese. Planejamento experimental. Subproduto.

1 INTRODUÇÃO

A partir do processamento de obtenção do extrato aquoso, é gerado um subproduto denominado *okara*, o qual apresenta elevado teor de proteínas (27,0 - 38,0%) com alto valor nutritivo e funcionalidade tecnológica. Desse modo, o *okara* pode ser incorporado em produtos alimentícios, possibilitando o enriquecimento da ingestão de aminoácidos essenciais (SUREL; COUPLÉ, 2005; WALISZEWSKI, et al., 2002).

A hidrólise proteica consiste na clivagem da proteína, obtendo-se pequenos peptídeos de tamanhos diversos e eventualmente aminoácidos. A clivagem pode ocorrer tanto quimicamente (por ácido ou base), quanto enzimaticamente (BLENFORD, 1994; LAHL; BRAUN, 1994; PHILLIPS; BEUCHATI, 1981).

Ao contrário das hidrólises ácida e alcalina, o processo enzimático ocorre sob condições brandas, sem gerar produtos de degradação, apresentando assim um bom controle do processo e das propriedades dos produtos resultantes (GONÇALES-TELO et al., 1994; SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995). A concentração da protease, a relação enzima:substrato, pH e temperatura são os fatores mais importantes da reação de hidrólise, pelo controle das quais se podem obter produtos com as características desejadas (HOWELL, 1996; NIELSEN; OLSEN, 2002).

Hidrolisados proteicos apresentam melhor absorção, solubilidade, capacidade de hidratação, poder de emulsificação, capacidade de formação de espuma, estabilidade ao aquecimento e maior resistência à precipitação provocada por alterações de pH. Desta forma, há um crescente interesse na utilização de hidrolisados proteicos, sendo que a hidrólise enzimática de proteínas é capaz de modificar as propriedades químicas, funcionais e sensoriais, sem prejudicar o seu valor nutricional (CLEMENTE, 2000; ORTIZ; AÑÓN, 2000; YUST et al., 2010).

Os hidrolisados proteicos são uma excelente fonte de peptídeos de baixo peso molecular e, quando comparados às proteínas *in natura*, possuem elevada digestibilidade e funcionalidade. Tal funcionalidade é dependente tanto do comprimento e estrutura das cadeias polipeptídicas, quanto da composição de aminoácidos (MAHMOUD, 1994; ABDUL-HAMID et al., 2002).

Além das diversas vantagens tecnológicas, os hidrolisados proteicos ainda podem apresentar peptídeos com atividade biológica (CLEMENTE, 2000; YUST et

al., 2010). De acordo com Meisel, Fitzgerald (2003) e Sienkiewicz- Szlapka et al. (2008), há fragmentos de proteínas específicos, inativos dentro da sequência da proteína original, que ao serem libertados dessa sequência pela hidrólise enzimática, podem exercer diversas funções fisiológicas, sendo então denominados peptídeos bioativos. Estudos têm demonstrado que as proteínas de soja são excelentes fontes de peptídeos bioativos, apresentando propriedades hipocolesterolêmica, anti-hipertensiva, antitrombótica, antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante (WANG; DE MEJIA, 2005; ROY et al., 2010; SARMADI; ISMAIL, 2010; ZHANG et al., 2010).

Hidrolisados de proteína de origem animal e vegetal tem sido estudados por suas importantes propriedades antioxidantes. Tal habilidade dos hidrolisados proteicos pode estar relacionada à sua composição, à sequência dos aminoácidos e ao tamanho dos peptídeos liberados na hidrólise (PEÑA-RAMOS et al., 2004; WANG et al., 2006). Korhonen, Pihlanto (2005), Zhu et al., (2006) e Cumby et al., (2008), relataram o uso da enzima Alcalase[®] para a produção de hidrolisados com melhores características nutricionais e funcionais, e também para a produção de peptídeos bioativos. A Alcalase[®] tem sido utilizada para hidrolisar diferentes fontes de proteínas, tais como: isolado proteico de amendoim (JAMDAR et al., 2010), leite (ULUKO et al., 2014), soro de queijo (SOUZA et al., 2003), peixe (RAMAKRISHNAN, et al., 2013), frango (KUROZAWA et al. 2008), hemoglobina (CHANG et al. 2007) e soja (SEO et al., 2008).

Os derivados de soja podem apresentar três tipos de isoflavonas, sendo que cada uma delas apresenta quatro formas químicas diferentes, totalizando 12 isômeros. As formas agliconas são denominadas daidzeína, genisteína e gliciteína, e quando glicosiladas, são formados os β -glicosídeos, que são chamados de daidzina, genistina e glicitina. Existem ainda as isoflavonas conjugadas, na forma malonil-glicosídica, onde encontramos 6"O-malonil-daidzina, 6"O-malonil-genistina e 6"O-malonil-glicitina, e na forma acetil-glicosídica, os 6"O-acetil-daidzina, 6"O-acetil-genistina e 6"O-acetil-glicitina (PETERSON, 1995; LIU, 1999). A capacidade antioxidante associadas à isoflavonas é decorrente ao número de grupos hidroxilas presentes em sua estrutura química, e essa capacidade decresce com a glicosilação ou a substituição do grupo metoxila. Deste modo, a atividade antioxidante das agliconas é superior, em especial a da genisteína (KAO, CHEN, 2006; PARK et al., 2001).

Este trabalho teve como objetivo otimizar a hidrólise enzimática das proteínas do *okara*, por meio de um planejamento composto central rotacional, visando obter maior grau de hidrólise. O objetivo específico deste trabalho foi caracterizar o hidrolisado proteico obtido na condição ótima em termos de eletroforese, atividade antioxidante e perfil de isoflavonas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O *okara*, proveniente do processo de obtenção do extrato aquoso de soja, foi doado pela Cocamar Cooperativa Agroindustrial, Maringá-PR. As amostras foram desidratadas em estufa a uma temperatura de 40 °C por 24 horas. O produto seco foi moído em um moinho de facas para obtenção da farinha de *okara*, que posteriormente foi desengordurada com n-hexano (1:10, p/v) por 30 minutos a temperatura ambiente, filtrada a vácuo e armazenada em freezer doméstico até o momento de realização das análises. A composição centesimal do produto, obtida de acordo com a AOAC (1995) em base seca foi: 19,74 ± 0,2 % de umidade, 31,73 ± 0,78 % de proteínas, 3,04 ± 0,15 % de lipídeos, 5,26 ± 0,25 % de cinzas e 60,47 ± 0,84 % de carboidratos.

Para a hidrólise da parede celular do *okara*, 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, onde cada FBG é a quantidade de enzima necessária, em condição padrão (30 °C, pH 5,0) para hidrolisar β-glucanas. No processo de hidrólise enzimática proteica, foi utilizada a protease Alcalase[®] 2.4L tipo FG da Novozymes, oriunda de *Bacillus licheniformis*, com atividade declarada de 2.4 AU-A/g. Uma Unidade Anson (AU) equivale a um miliequivalente de tirosina liberada da hidrólise de hemoglobina por minuto.

2.2 Obtenção do concentrado proteico do *okara*

Inicialmente, foi feito um pré-tratamento da amostra com um complexo multi-enzimático de carboidrases Viscozyme[®]. Para isso, foram pesados 5 g de amostra de *okara* desengordurado, a qual se adicionou 95 mL de tampão citrato fosfato com pH 6,2, mantendo-se a amostra em um banho Dubnoff com agitação orbital (modelo T-53 Tecnal, Piracicaba, Brasil), a 53 °C. Atingida a temperatura, foi acrescentada a enzima Viscozyme[®] a uma concentração de 4,0% e a amostra foi mantida por 2 horas no banho (FIGUEIREDO et al., 2015).

Após o pré-tratamento, as proteínas do *okara* foram extraídas de acordo com a metodologia descrita por Ma et al. (1997), com algumas modificações. O pH foi ajustado para 9,0 com NaOH 1 M e a amostra foi mantida banho com agitação Dubnoff (modelo T-53 Tecnal, Piracicaba) a uma temperatura de 60 °C por 30 minutos. Em seguida, foi centrifugada a 14204×g em centrífuga refrigerada (modelo 5804-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à 4 °C, por 30 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante teve seu pH ajustado para 4,5 com HCl 0,5M, para a precipitação das proteínas. As proteínas foram recuperadas por centrifugação à 14204×g à 4 °C por 30 minutos, obtendo-se assim o concentrado proteico (fase precipitada) e o soro (fase sobrenadante). O experimento foi realizado em triplicata e o concentrado apresentou 56% ± 4 de conteúdo de proteína em base seca.

2.3 Hidrólise enzimática do concentrado proteico

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ para verificar o efeito das variáveis temperatura (40 a 70 °C), razão enzima:substrato (0,5 a 5 %, g enzima/100g proteína) e pH (7,0 a 9,0) sobre o grau de hidrólise alcançado. Foram realizados 8 ensaios fatoriais, 6 axiais e 3 centrais, totalizando 17 experimentos (Tabela 1).

Tabela 1- Planejamento experimental (valores reais e codificados) para determinação do grau de hidrólise em diferentes condições de temperatura (T) pH e razão enzima: substrato (E/S).

Ensaio	Variáveis Independentes			Variável Dependente
	T (C°)	E/S(%)	pH	GH (%)
1	46 (-1)	1,4 (-1)	7,4 (-1)	22,5
2	64 (+1)	1,4 (-1)	7,4 (-1)	19,4
3	46 (-1)	4,1 (+1)	7,4 (-1)	27,2
4	64 (+1)	4,1 (+1)	7,4 (-1)	25,1
5	46 (-1)	1,4 (-1)	8,6 (+1)	19,8
6	64 (+1)	1,4 (-1)	8,6 (+1)	23,0
7	46 (-1)	4,1 (+1)	8,6 (+1)	30,8
8	64 (+1)	4,1 (+1)	8,6 (+1)	28,0
9	40 (-1,68)	2,75 (0)	8,0 (0)	23,6
10	70 (+1,68)	2,75 (0)	8,0 (0)	16,5
11	55 (0)	0,5 (-1,68)	8,0 (0)	16,5
12	55 (0)	5,0 (+1,68)	8,0 (0)	25,9
13	55 (0)	2,75 (0)	7,0 (-1,68)	26,5
14	55 (0)	2,75 (0)	9,0 (+1,68)	31,0
15	55 (0)	2,75 (0)	8,0 (0)	23,4
16	55 (0)	2,75 (0)	8,0 (0)	23,4
17	55 (0)	2,75 (0)	8,0 (0)	23,5

Os experimentos de hidrólise foram conduzidos em um béquer encamisado de 250mL com sistema de agitação e aquecimento utilizando o método pH-stat, descrito por Adler-Nissen (1986). Foram colocados no béquer 2g de concentrado proteico obtido do *okara*, previamente liofilizado, e 100 mL de água destilada. A suspensão foi mantida em agitação por um agitador magnético, aquecida por um banho termostatizado (modelo TE-2005, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a cada uma das temperaturas estudadas (40 °C, 46 °C, 55 °C, 64 °C e 70 °C) e o pH foi ajustado (7,0, 7,4, 8,0, 8,6, 9,0) com NaOH 1 M. Em seguida, a enzima Alcalase[®] foi adicionada à suspensão e a reação monitorada com auxílio de um pHmetro, acrescentando-se NaOH 0,1 M, de modo a manter o pH constante. O volume de base consumida foi anotado em intervalos regulares de tempo até que as variações no consumo fossem insignificantes, indicando o final da hidrólise, e os valores de base consumidos foram usados para calcular o grau de hidrólise, e o tempo total dos experimentos variou de 40 a 200 min.

Cálculo do grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise foi definido por Adler-Nissen (1986) como sendo o número de ligações peptídicas hidrolisadas, expresso em equivalentes de hidrólise (h), em relação ao número total de ligações peptídicas antes da reação (h_{total}). Para a soja, o 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 (ADLER-NISSEN, 1986). 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 (1964² apud KRISTINSSON e RASCO, 2000), pode ser estimado através da equação 3:

² STEINHARDT, H.; BEYCHOK, S. Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules. In: H. Neurath (Ed). The proteins, vol. 2. New York: Academic Press, 1964. p. 139-304.

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

Onde: T é a temperatura em Kelvin.

2.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-Page)

A determinação do perfil eletroforético das proteínas do *okara* e dos peptídeos presentes no hidrolisado proteico obtido na condição otimizada foi feita de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), utilizando gel de separação com 20% de acrilamida e de empilhamento com 4%. As amostras do concentrado e do hidrolisado obtido em condição otimizada 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 4% e 2,26% respectivamente e foram aquecidas à 95 °C por 5 minutos. Após resfriadas, alíquotas de 12 µL de cada 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 200 V e 60 mA, durante 1 hora e 20 minutos. O perfil de massa molecular das proteínas foi determinado utilizando-se o padrão Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA.).

2.5 Extração e Quantificação de Isoflavonas

A extração das isoflavonas do concentrado e do hidrolisado proteico obtido na condição otimizada foi realizada com solvente extrator, composto por água, etanol e acetona (1:1:1, v/v/v), de acordo com a metodologia descrita por Yoshiara et al. (2012). Alíquotas de 300 mg de amostra e 6 mL de solvente extrator foram agitados em vortex a cada 15 minutos e durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram colocadas em banho ultrassônico à temperatura ambiente durante 15 minutos e centrifugadas por 15 minutos a 800 ×g à 4 °C em centrífuga (Eppendorf 5804 R, Hamburgo, Alemanha). Os sobrenadantes foram então filtrados em filtros Millex – LH (0,22 µm) utilizando a seringa nos vials próprios do equipamento. A etapa de separação e quantificação das isoflavonas foi realizada de acordo com a metodologia de Handa et al. (2014).

Alíquota de 1,4µL do filtrado foi injetada automaticamente no cromatógrafo líquido UPLC® Waters. A etapa de separação e quantificação foi realizada por coluna de fase reversa (modelo Acquity – UPLC BEH C18, Waters) com dimensões de 2,1 mm x 50 mm, e tamanho da partícula de 1,7 µm. Utilizou-se um sistema de gradiente binário com fase inicial de 90% de H₂O acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) e 10% de acetonitrila. Em 8 min de eluição, atingiu-se uma proporção de 0% de H₂O e 100% de acetonitrila, retornando às condições iniciais em 9° min. O tempo total da corrida foi de 10 min, a vazão da fase móvel foi de 0,70 mL min⁻¹ e a temperatura da corrida mantida constante a 35°C. Para a detecção, foi utilizado o detector de arranjo de diodos da marca Waters ajustado ao comprimento de onda de 260 nm. A identificação das isoflavonas foi realizada por comparação com curvas individuais de solução padrão de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína, genisteína (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, EUA), acetil-daidzina, acetil-glicitina, acetil-genistina, malonil-daidzina, malonil-glicitina e malonil-genistina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japão) A concentração das isoflavonas malonilglicosídicas foi calculada a partir das curvas dos padrões dos seus correspondentes β-glicosídeos utilizando a similaridade do coeficiente de extinção (COWARD et al., 1993). A quantificação por padronização externa foi feita utilizando como referência, as curvas dos padrões. Os resultados foram expressos em mg/100g de amostra liofilizada.

2.6 Atividade antioxidante pelo método da capacidade sequestradora do radical ABTS+

A capacidade antioxidante do hidrolisado e 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 7mM com persulfato de potássio 140 mM, e foi armazenado em frasco escuro e em temperatura ambiente por 16 horas antes do uso. A solução ABTS⁺ foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4) para uma absorvância de 0,7 a 730 nm. As amostras de concentrado e de hidrolisado foram diluídas em 4mL da solução ABTS⁺, e as leituras de absorvância a 730 nm foram realizadas após 6 minutos de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de trolox (1,25, 2,5, 4, 5, 7,5 e 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.

2.7 Atividade antioxidante pela avaliação do poder de redução pelo teste FRAP

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-tripiryridyl-s-triazine) 10mM em HCl 40mM, cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM e tampão acetato (5mM; pH 3,6). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, misturando 25 mL de tampão acetato (5 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 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20mM), exatamente nesta ordem. A solução foi incubada a 37 °C durante 30 minutos. Para a reação, foram adicionados 10 μL de amostra e 110 μL de água destilada a 900 μL de reagente FRAP recentemente preparado. Para o branco, foram adicionados 900 μL de reagente FRAP em 120 μL de água destilada. A reação ocorreu no escuro, mantendo a temperatura em 37 °C durante 30 minutos. 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 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.

2.8 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 de atividade antioxidante e conteúdo de isoflavonas do concentrado e do hidrolisado proteico obtido na condição ótima, foram submetidos à

análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey com 95% de confiança, utilizando o mesmo software.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

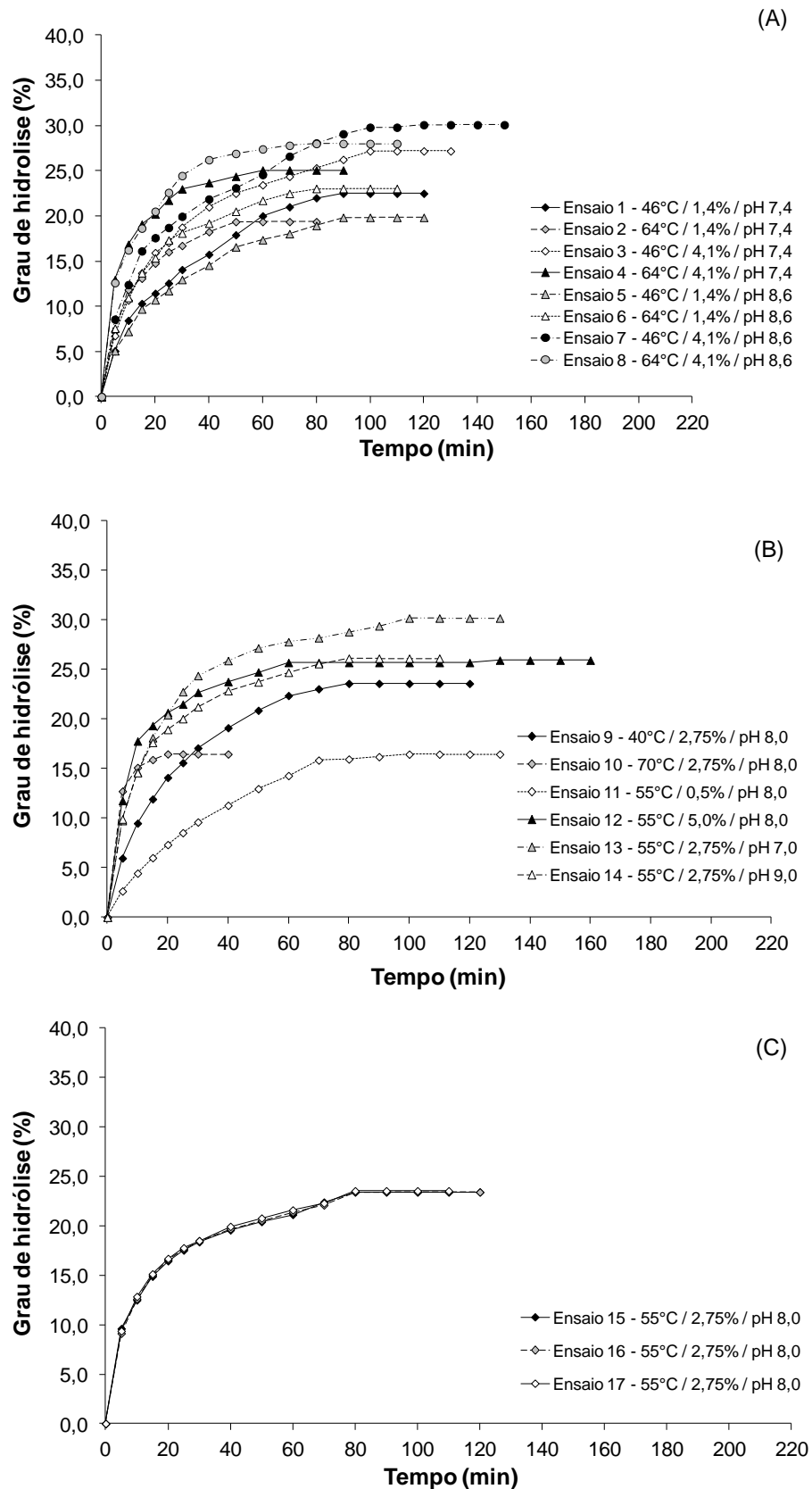
3.1 Cinética de hidrólise enzimática do concentrado proteico

Analisando as curvas de cinética, que relacionam o grau de hidrólise com o tempo de reação, observa-se que os diferentes ensaios do planejamento experimental apresentaram duas etapas diferenciadas: a primeira, caracterizada por uma taxa de reação alta, onde ocorre uma quebra intensa de ligações peptídicas; e a segunda etapa, onde foi observada uma queda na taxa de reação a partir de 15 minutos, aproximadamente, com tendência a atingir um comportamento estacionário no final do tempo de reação (Figura 1).

De acordo com Gonzalez-Tello et al. (1994) e O'Meara e Munro (1984), este comportamento é resultado da rápida clivagem das ligações peptídicas durante o estágio inicial, onde ocorre uma quebra acentuada destas devido à grande quantidade de polipeptídios de alto peso molecular disponíveis na matéria-prima para reação de hidrólise. Posteriormente, há uma redução da velocidade da clivagem, que pode ser devida aos seguintes fatores: a menor concentração de ligações peptídicas disponíveis para clivagem pela protease; pela possível inibição das enzimas causada por produtos da hidrólise; e pela desnaturação da enzima.

O comportamento da curva de cinética é semelhante ao descrito para hidrólise enzimática com Alcalase[®] em proteínas de soja (CONSTANTINIDES et al., 1980; NETTO; GALEAZZI, 1998) e isolado proteico de soja (SEO et al., 2008).

Figura 1- Cinética de hidrólise enzimática das proteínas do concentrado de *okara*: A) Ensaios fatoriais; B) Ensaios axiais; e C) Ensaios centrais.



3.2. Otimização da hidrólise enzimática do concentrado proteico do *okara*

Os resultados de máximo grau de hidrólise obtidos pelo planejamento experimental encontram-se entre 16,5% e 31,0%, correspondentes aos ensaios 11 e 14 respectivamente (Tabela 1).

Foi calculada a estimativa dos efeitos sobre o grau de hidrólise máximo alcançado em cada ensaio do planejamento experimental. A Tabela 2 mostra os valores destes parâmetros após exclusão das variáveis não significativas ($p > 0,1$). Pode-se observar que todos os fatores lineares e o pH quadrático foram significativos ($p < 0,1$). Embora o fator T(Q) não foi significativo a um nível de 90% de significância, esse termo foi incluído no modelo, uma vez que apresentou um valor de p próximo a 0,1.

Tabela 2- Estimativa dos efeitos sobre o teor de proteína, após a exclusão dos parâmetros não-significativos.

Fatores	GH	P
Média	22,69	0,000
T (L)	-2,46	0,024
T (Q)	-1,60	0,135
E/S (L)	6,18	0,000
pH (L)	2,22	0,038
pH (Q)	4,58	0,001

Onde: T é a temperatura, E/S é a razão enzima:substrato, L é linear e Q é quadrático.

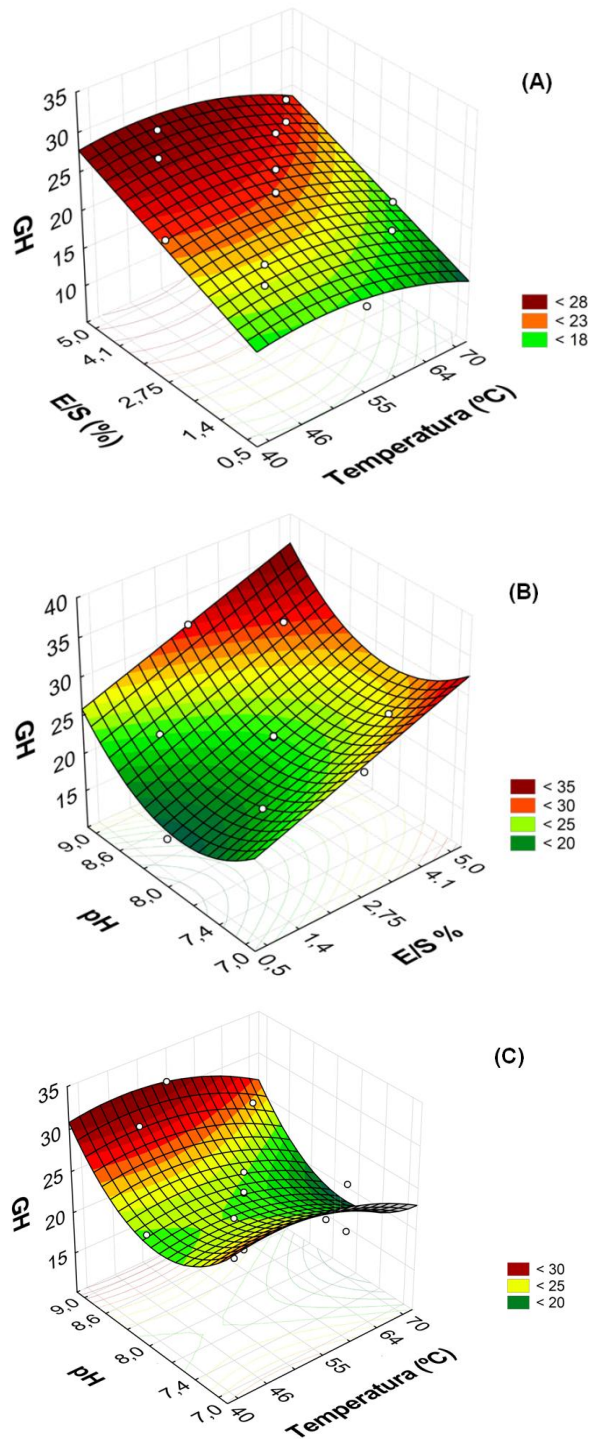
Os resultados do planejamento experimental foram ajustados a um modelo polinomial de 2ª ordem em função de T, E/S e pH. Foi verificada a significância da regressão e da falta de ajuste do modelo a um nível de confiança de 90%, através de uma Análise de Variância (ANOVA), utilizando-se o teste F para o planejamento estudado. O coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado foi 0,88, e o F calculado (16,83) foi maior que o F tabelado (2,61). Desta forma, a regressão foi significativa e o modelo pode ser considerado preditivo.

O modelo polinomial de 2ª ordem (Eq. 4) foi proposto para prever o efeito das variáveis T, pH e E/S (codificadas) sobre o grau de hidrólise GH.

$$GH (\%) = 22,69 - 1,23 T - 0,80 T^2 + 3,09 E/S + 1,11 pH + 2,29 pH^2 \quad (\text{Eq.4})$$

A partir do modelo preditivo, foram geradas as superfícies de respostas, que expressam a interação entre duas das variáveis independentes, mantendo-se fixa a 3ª variável no ponto central (Figura 2).

Figura 2- Superfície de resposta da influência das variáveis independentes sobre a resposta grau de hidrólise: A) razão enzima substrato e temperatura; B) pH e razão enzima substrato; C) pH e temperatura.



Nas Figuras 2A e C, pode ser observado que a variável temperatura apresenta um efeito quadrático negativo sobre o GH, indicando um máximo valor de resposta em temperaturas próximas a região do ponto central. O aumento do GH se deve ao fato de que incrementos de temperatura aceleram a velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. Entretanto, temperaturas acima do ponto ótimo acarretam a desnaturação da enzima, com perda da sua atividade, ocorrendo a estabilização da reação enzimática a baixos valores de grau de hidrólise (LEHNINGER, 1995). Comportamento semelhante de temperatura sobre o grau de hidrólise também foi reportado por Hu et al. (2010) e Kanu et al. (2009) em hidrolisados proteicos de soja e, de farinha de gergilim, respectivamente.

Analisando o efeito da relação enzima/substrato sobre o GH, observou-se na Figura 2A e B que, para maiores concentrações de enzima utilizada, maior o grau de hidrólise obtido, principalmente quando em temperatura próxima a 55 °C e em alto pH. Tal comportamento já foi demonstrado pelo gráfico de cinética de hidrólise. De acordo com Lehninger (1995), a velocidade da reação aumenta com a concentração de enzima, mantendo-se saturada à concentração do substrato. Ao aumentar a concentração de enzima, mais sítios ativos estão disponíveis para clivar as ligações peptídicas. O mesmo efeito da relação enzima:substrato sobre o grau de hidrólise foi observado em farinha de ervilha (MORENO; CUADRADO, 1993) e farinha de gergelím (KANU et al., 2009).

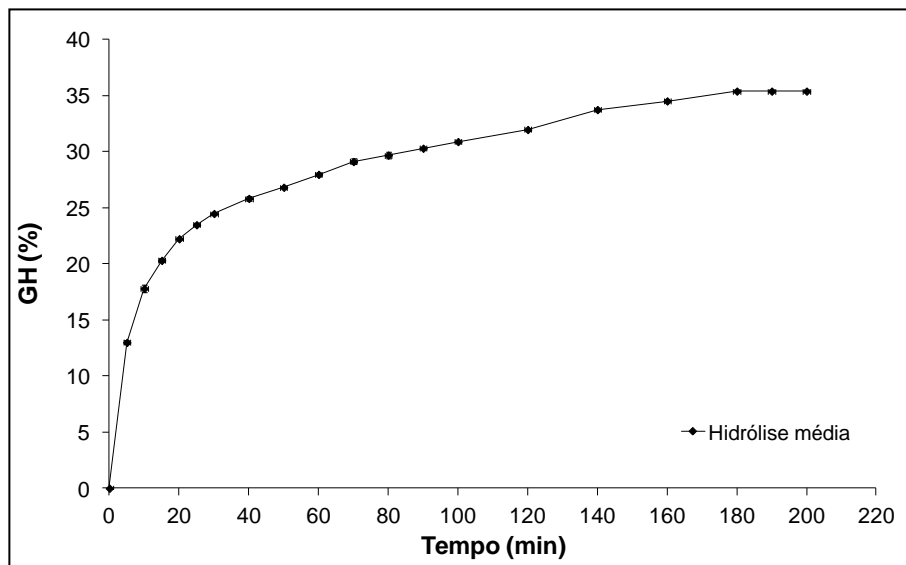
O pH por sua vez, atua de maneira quadrática positiva, indicando uma tendência de GH mínimo próximo ao ponto central (pH 8,0), e ainda apresenta efeito linear positivo, indicando que quanto maior o pH, maior o GH (Figuras 2B e C). Segundo Whitaker (1994), mudanças do pH em uma reação enzimática podem afetar a estabilidade da enzima, causando uma desnaturação irreversível em sua estrutura conformacional, resultando em uma contínua perda da sua atividade. Além disso, o aumento do pH para valores acima de 8,0 melhora a solubilização da proteína, facilitando a ação da enzima sobre a proteína. A quantidade de água disponível, tanto para enzima como para seu substrato, uma vez que, em baixas concentrações de água as enzimas tem sua ação severamente restringida (FENNEMA, 1993).

A partir das superfícies de resposta apresentadas na Figura 2, as máximas respostas para o grau de hidrólise foram obtidas nas seguintes condições: razão

enzima:substrato de 5,0%, pH 9,0 e temperatura de 55 °C. Estudos com diferentes fontes proteicas de origem vegetal utilizaram a mesma protease deste estudo para otimização do processo de hidrólise enzimática. Kanu et al. (2009) analisaram as variáveis temperatura, pH e E/S sobre a hidrólise de proteína de farinha de gergelim e reportaram que valores de pH (8,32) e temperatura (58,79 °C) na condição ótima próximos ao encontrado no presente estudo, enquanto que a razão enzima:substrato (1,80%) foi inferior. Essas diferenças são aceitáveis considerando que se trata de matérias-primas diferentes. Por outro lado, condição ótima distinta foi determinada por Huang et al. (2010) na hidrólise de isolado proteico de soja. As condições ótimas apresentadas pelos autores foram: 60 °C, pH 8,0.

O processo de hidrólise proteica do concentrado de *okara* foi validado em triplicata na condição ótima de reação (Figura 3). Os valores de desvio padrão dos dados experimentais variaram de 0,03 a 0,3%. O máximo grau de hidrólise alcançado experimentalmente foi de $35,51 \pm 0,2\%$, que está próximo ao valor predito pelo modelo para o grau de hidrólise (36,2%). Dessa maneira, o modelo demonstrase adequado para prever o grau de hidrólise do concentrado proteico do *okara* dentro da faixa estudada.

Figura 3- Cinética de hidrólise enzimática proteica do *okara* média na condição otimizada



O grau de hidrólise encontrado foi semelhante ao reportado por Hrcková et al. (2002) quando utilizaram Alcalase[®] para hidrolisar a proteína de farinha desengordurada de soja. Foi constatado um GH de 35,1% em pH 8,0 e temperatura

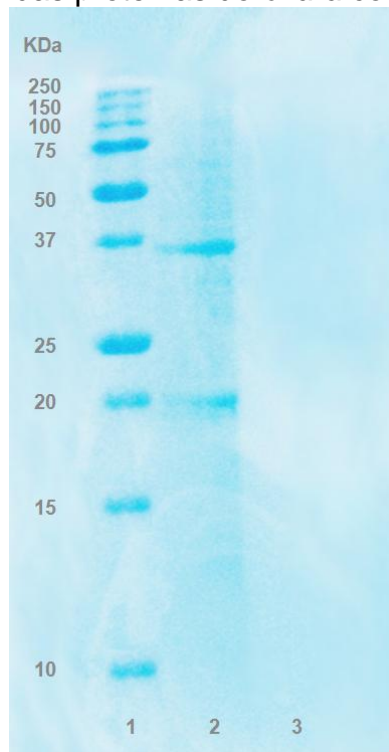
de 40 °C. Entretanto, Seo et al. (2008) e Peña-Ramos, Xiong (2002) encontraram valores de GH inferiores na hidrólise de isolado proteico de soja. No estudo de Seo et al. (2008), o experimento foi a 50 °C, pH de 6,8 a 7,1 e razão enzima:substrato de 2,0%, obtendo GH de 23%. Já Peña-Ramos e Xiong (2002) determinaram GH máximo de 9%, a 50 °C e pH 8,0.

3.3. Caracterização do hidrolisado proteico obtido na condição otimizada

3.3.1. Eletroforese

No perfil eletroforético, pode-se observar que o concentrado proteico apresentou duas bandas distintas com peso molecular de 20 KDa e 37 KDa (Figura 4). De acordo com Liu et al. (2007), tais bandas se referem à proteína glicinina (11S), que apresenta subunidades ácidas entre 36-40 KDa e subunidades básicas entre 18-20 KDa.

Figura 4- Eletroforese das proteínas do *okara* concentrado e hidrolisado



1- Padrão, 2- Concentrado, 3- Hidrolisado

Segundo Fukushima (1994) e Renkema et al. (2000), a β -conglucina (globulina 7S) e a glicinina (globulina 11S) são as principais proteínas de reserva da

soja, onde a fração 11S da soja é constituída unicamente pela globulina 11S. No entanto, a fração 7S não foi encontrada, indicando que possivelmente durante o processamento do extrato aquoso, essa proteína foi lixiviada para o mesmo, uma vez que se trata de uma proteína solúvel.

Em relação à amostra hidrolisada, não foi possível identificar nenhuma banda, sugerindo que a hidrólise resultou na formação de peptídeos de baixo peso molecular, não sendo possível de serem detectados pelo método. A obtenção destes peptídeos é confirmada pelo elevado grau de hidrólise alcançado neste estudo, que pode ter liberado aminoácidos livres e peptídeos de cadeia curta (di e tri-peptídeos) (MAHMOUD, 1994).

3.3.2. Conteúdo de isoflavonas

O teor de isoflavonas nos grãos de soja é variável, em função das diferenças entre cultivares, condições do seu cultivo e condições ambientais, podendo ser encontrados valores desde 71 a 865,36 mg/100g (GENOVESE et al., 2005; GONÇALVES, et al., 2014; 2005; RIBEIRO et al., 2007).

Foi determinada uma concentração de 206,99 mg/100g de isoflavonas totais no concentrado proteico de *okara* (Tabela 3). Teores de isoflavonas inferiores foram encontrados em diferentes estudos com *okara*, variando de 47,90 a 139,80 mg/100g totais de isoflavonas (SUREL; COUPLET, 2005; JANKOWIAK et al., 2014a; JANKOWIAK et al., 2014b).

As seguintes isoflavonas estavam presentes no concentrado proteico do *okara*: malonil genistina (malonil glicosídeos), daidzina, genistina (β -glicosídeos), daidzeína e genisteína (agliconas). Entretanto, além dessas formas de isoflavonas encontradas neste estudo, Jankowiak et al. (2014b), Jackson et al. (2002), Rinaldi et al. (2000) e Wang e Murphy (1996) encontraram outras formas de isoflavonas no *okara* bruto: malonil daizina, malonil glicitina (malonil glicosídeos), acetil genistina (acetil glicosídeos), glicitina (β -glicosídeo) e gliciteína (aglicona). Tal diferença no perfil pode ser atribuída ao efeito da extração e concentração das proteínas do *okara* na interconversão das isoflavonas. Em adição, essa diferença também pode ser devido à variedade da soja, do seu cultivo, das condições de processo e de armazenamento (GENOVESE et al., 2002; JUNG et al., 2008; KAO et al., 2004).

No concentrado proteico, as agliconas genisteína e daidzeína predominaram entre as isoflavonas, com cerca de 93,69 mg/100g e 40,40 mg/100g respectivamente, sendo que a genisteína representou cerca de 45,3% do total de isoflavonas.

Tabela 3- Teor de isoflavonas (base seca) no concentrado e hidrolisado proteico do *okara*

Grupos	Isoflavonas	Concentrado		Hidrolisado	
		Teor de isoflavonas (mg/100g)	% em relação ao total	Teor de isoflavonas (mg/100g)	% em relação ao total
Malonil glicosídeo β -glicosídeos	Malonil genistina	38,13 \pm 2,70	18,4	Nd	-
	Daidzina	10,09 \pm 0,65	4,9	Nd	-
	Genistina	24,69 \pm 1,58 _a	11,9	94,60 \pm 11,86 _b	19,4
Agliconas	Daidzeína	40,40 \pm 2,64 _a	19,5	80,02 \pm 9,94 ^b	16,4
	Gliciteína	Nd	-	133,39 \pm 17,68	27,4
	Genisteína	93,69 \pm 5,97 _a	45,3	179,35 \pm 22,88 ^b	36,8
Total		206,99	100,0	487,36	100,0

Valores representam a média de 2 determinações \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam quas as amostras apresentam diferença significativa a 5% ($p < 0.05$).

A amostra hidrolisada apresenta conteúdo total de isoflavonas superior a da amostra concentrada, provavelmente resultado das alterações ocorridas nas interações proteínas-isoflavonas durante a hidrólise. De acordo com a Malaypally et al. (2010), a eficiência da extração de isoflavona e a sua estabilidade térmica podem ser influenciadas não somente pelo teor de proteína, mas também pela desnaturação de proteínas. Nufer et al. (2009) sugerem que a hidrólise proteica pode aumentar a eficiência da extração de isoflavonas, uma vez que a desnaturação e o desdobramento da proteína expõe os grupos hidrofóbicos e as isoflavonas associadas à ela. Isto também pode explicar o fato da gliciteína ter sido detectada somente após a hidrólise proteica.

Na amostra de *okara* hidrolisado, é observada a ausência da daidzina e da malonil genistina. Também, em comparação com o concentrado proteico, observa-se no hidrolisado um aumento na porcentagem de agliconas em relação ao conteúdo total de isoflavonas, passando a representar cerca de 80,65%. Tal resultado indica que, durante o processo de hidrólise, ocorreu a conversão das

formas glicosídicas em agliconas (Tabela 4). Ao realizar a extração de isoflavonas em derivados de soja, Barnes, Kirk e Coward (1994), constataram que os conjugados malonil são termicamente instáveis, e podem sofrer reações de desesterificação produzindo β -glicosídeos. De acordo com Park et al. (2001), durante os processos térmicos, os compostos glicosilados presentes nos grãos de soja, podem ser transformados em suas formas agliconas. Segundo Matsuura et al. (1989), Lima e Ida (2014), o tratamento térmico de soja influencia o perfil de isoflavonas, favorecendo a atividade da β -glucosidade na conversão dos β -glicosídeos em agliconas. As β -glicosidases são enzimas que hidrolisam as ligações β -glicosídicas dos dissacarídeos, oligossacarídeos e outros glicosídios glicosilados. Lima e Ida (2014), investigando o efeito da temperatura do tratamento hidrotérmico de grãos de soja, constataram que em 55°C ocorreu maior conversão de β -glicosídeos em agliconas. Tal resultado corrobora com os resultados obtidos neste estudo, uma vez que o processo de hidrólise enzimática proteica foi conduzido nesta mesma temperatura.

Portanto a hidrólise proteica favoreceu a extração das isoflavonas, bem como a conversão das formas glicosídicas para agliconas. Izumi et al. (2000) e Munro et al. (2003) afirmam que a atividade biológica e o metabolismo das isoflavonas ingeridas na dieta dependem da forma química em que se apresentam, sendo as agliconas absorvidas mais rapidamente do que as demais, o que torna mais desejáveis.

3.3.3. Capacidade antioxidante

O método de ABTS se baseia na capacidade do antioxidante sequestrar o radical catiônico $ABTS^+$, enquanto que o método FRAP analisa a capacidade do antioxidante reduzir o íon férrico. Desta forma, torna-se interessante e útil a combinação de métodos com diferentes mecanismos antioxidantes (KUSKOSKI et al., 2005).

Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram que ambas as amostras apresentam capacidade redutora de íon ferro. No entanto, verifica-se que o hidrolisado possui atividade antioxidante 6,5 vezes superior ao concentrado proteico. O mesmo ocorre para o método ABTS, em que o hidrolisado apresenta

atividade sequestradora de radical livre 6,4 vezes maior que a amostra não hidrolisada. Estes resultados evidenciam que a hidrólise das proteínas leva à produção de hidrolisados com capacidade antioxidante maior que a encontrada na matéria prima original.

Tabela 4- Atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS e FRAP (μM de TE/g de amostra).

Análise	Concentrado proteico	Hidrolisado proteico
ABTS	58,29 \pm 0,010 ^a	383,49 \pm 0,063 ^b
FRAP	2,41 \pm 0,001 ^a	15,32 \pm 0,020 ^b

Valores representam a média de 3 determinações \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam quais as amostras apresentam diferença significativa a 5% ($p < 0.05$).

Outros estudos também reportam que hidrólise enzimática da proteína de soja provocou um aumento da capacidade antioxidante, e esse aumento foi relacionado com a liberação de peptídeos bioativos que apresentam atividade antioxidante (BEERMANN et al., 2009; CHEN et al., 1995). A obtenção de peptídeos a partir da hidrólise do concentrado de *okara* foi confirmada tanto pelo alto grau de hidrólise alcançado neste trabalho, como pela análise de eletroforese.

Além de estar relacionado com a geração de peptídeos bioativos, a capacidade antioxidante das amostras pode ser devido à presença das isoflavonas agliconas. De acordo com Park et al. (2001), as agliconas apresentam capacidade antioxidante superior, em comparação com as demais formas. A partir do método de DPPH e FRAP, Lee et al. (2005) compararam o poder antioxidante da genisteína e daidzeína com seus glicosídeos correspondentes, isolados de sementes de soja. Os autores constataram que as formas agliconas apresentam maior potencial antioxidante, especialmente as formas genisteína e daidzeína. Desta maneira, o elevado conteúdo de agliconas na amostra hidrolisada também pode ter contribuído para o aumento da atividade antioxidante.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível verificar a influência das variáveis estudadas e determinar as condições ótimas da hidrólise enzimática de concentrado proteico obtido do *okara*, de modo a obter maior grau de hidrólise. A condição ótima para produzir hidrolisados proteicos determinadas foram: temperatura de 55 °C, pH 9 e concentração de enzima de 5,0%, em que foi obtido 35,51% de grau de hidrólise.

Obtido na condição otimizada, o hidrolisado apresentou maior conteúdo de isoflavonas totais, e também das formas agliconas em comparação com a amostra não hidrolisada. Também foi observada uma maior atividade antioxidante no hidrolisado proteico, podendo ser resultado do aumento das formas agliconas, como também pela liberação de peptídeos bioativos com capacidade antioxidante.

Este estudo demonstrou que foi possível transformar a matéria-prima inicial (*okara*), um subproduto de pouco valor comercial em hidrolisado proteico com maior valor nutricional e com propriedades antioxidantes, com excelente potencial como ingrediente na formulação de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pelo apoio financeiro à Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (160/2014) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (473117/2013-4). LEK é bolsista produtividade em pesquisa da Fundação Araucária de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (501/2014).

REFERENCIAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

ADLER-NISSEN, J. Enzymatic Hidrolysis of Proteins for Increased Solubility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 24, p. 1090–1093, 1976.

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G.H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 69-74, 2002.

A.O.A.C. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15 ed. Washington: A.O.A.C. 1990.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n.11, p.2466-2474, 1994.

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. 1996.

BEERMANN, C.; EULER, M.; HERZBERG, J.; STAHL, B. Anti-oxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate. **European Food Research and Technology**, n. 229, p.637–644, 2009.

BLENFORD, D. E. Protein hydrolysates: functionalities and uses in nutritional products. **International Food Ingredient**, v.3, p.45, 1994.

CHANG, C.Y.; WU, K.C.; CHIANG, S.H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobine hydrolysates. **Food Chemistry**. v.100, p.1537-1543, 2007.

CHEN, HM.; MURAMOTO, K.; YAMAUCHI, F. Structural Analysis of Antioxidative Peptides from Soybean P-Conglycinin. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, n. 43,p. 574-578, 1995.

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

CONSTANTINIDES, A.; ADU-AMANKWA, B. Enzymatic modification of vegetable protein: mechanisms, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in batch reactor. **Biotechnol Bioengineering**, v.23, p.1543-65, 1980.

COWARD L.; BRANES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their beta-glicoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1961-1967, 1993.

CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity and waterholding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.109, n.1, p.144-148, 2008.

FIGUEIREDO, V.R.G.; YAMASHITA, F.; VANZELA, A.L.L.; IDA, E.I. ; KUROZAWA, L.E. Ação do complexo multi-enzimático melhora a extração e obtenção de concentrados proteicos do *okara*, Artigo A, Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, p. 63-80, 2015.

FUKUSHIMA, D. Recent progress on biotechnology of soybean proteins and soybean protein food products. **Foods and Biotechnology**, v. 8, p. 83-135, 1994.

GENOVESE, M.I.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F. M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties. **Food Science and Technology International**, v.11, p. 205-211, 2005.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F. M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: Levels, Distribution, and Estimated intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.50, p.5987-5993, 2002.

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

GONÇALVES, L.C.; ANDRADE, A.P.C.; RIBEIRO, G.P.; SEIBEL, N.F. Chemical composition and technological properties of two soybean cultivars. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.3, n.1, p. 33-40, 2014.

HANDA, C.L.; COUTO, U.R.; VICENSOTI, A.H.; GEORGETTI, S.R.; IDA, E.I. Optimization of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. **Food Chemistry**, v.152, p.56-65, 2014.

HOWELL, K.N. Chemical and enzymatic modification. **In: Food proteins- properties and characterization**. Shuryo Nakai and H. Wayne Modler (ed). New York: Miley-VCH, Cap. 5, p.235-280, 1996.

HRCKOVÁ, M.; RUSNÁKOVÁ, M.; ZEMANOVIC, J. Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 20, p. 7-14, 2002.

HU, A.; WU, C.; ZHENG, J.; HU, X.; CHEN, Q. LIU, X.; LIU, R. Soybean peptide preparation by enzymatic hydrolysis with and without ultrasound. **In: Proceedings of International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE)**, China, 2010.

HUANG, J.; ZHANG, H.; ZHAO, D. Study on hydrolysis of soybean protein isolate by alcalase. **Journal of Hunan University of Arts and Science (Natural Science)**, n. 1, p.28-30, 2010.

IZUMI, T.; PISUKULA, M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than glucosides in humans. **Journal of Nutrition**, 130: p.1695- 1699, 2000.

JACKSON, C.J.C.; DINI, J.P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H.P.V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZELL, D.; DE GRANDIS, 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, 2002.

JAMDAR, S.N.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M.D.; JUAN, F.; YAR, 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, p.178-184, 2010.

JANKOWIAK, L., TRIFUNOVIC, O., BOOM, R. M., & VAN DER GOOT, A. J. The potential of crude *okara* for isoflavone production. **Journal of Food Engineering**, v.124, p. 166–172, 2014a.

JANKOWIAK, L.; KANTZAS, N.; BOOM, R. M.; VAN DER GOOT, A. J. Isoflavone extraction from *okara* using water as extractant. **Journal of Food Engineering**, v.160, p. 371–378, 2014b.

JUNG, S.; MURPHY, P. A.; SALA, I. Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. **Food Chemistry**, n.111, v.3, p.592–598, 2008.

KANU, P.J.; KANU, J.B.; SANDY, E.H.; KANDEH, J.B.A.; MORNYA, P.M.P.; HUIMING, Z. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Defatted Sesame Flour by Different Proteases and their Effect on the Functional Properties of the Resulting Protein Hydrolysate. *American Journal of Food Technology*, v.4, p.226-240, 2009.

KAO, T.H.; CHEN, B.H. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p.7544-7555, 2006.

KAO, T.H.; LU, Y.F.; HSIEH, H.C.; CHEN, B.H. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. **Food Research International**, n.37, v. 9, p.891– 900, 2004.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos** – Teoria e aplicações práticas. GEN. p. 77-105, 2010.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.945-960, 2005.

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.405-412,2008.

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, 1970.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, v.48, n.10, p. 68 - 71, 1994.

LEE, C. H.; YANG, L.; XU, J. Z.; YEUNG, S. Y. V.; HUANG, Y.; CHEN, Z-Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chemistry**, v. 90, p. 735–741, 2005.

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

LIMA, F.S.; IDA, E.I. Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones at algycones. **LWT-Food Science and Technology**, v.56, p.232-239, 2014.

LIU, C.; WANG, H.; CUI, Z.; HE, X.; WANG, X.; ZENG, X.; MA, H. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1310-1316, 2007.

LIU, K. Current constraints in soybean food utilization and efforts to overcome them. In: World Soybean Research Conference VI. **Proceedings**. Chicago, p. 409-418, 1999.

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

MAHMOUD, M.I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 89-113, 1994.

MALAYPALLY, S.P.; BARAEM ISMAIL, B. Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 8958–8965, 2010.

MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Obrtionable flavor of soy milk developpep during the soaking of soybeans and its control. **Journal of Food Science and Technology**, v.54, p.602-605, 1989.

MEISEL, H.; FITZGERALD, R.J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Curr Pharm**, v.9, p.1289-1295, 2003.

MEJIA, E. LUMEN, B.O. Soybean bioactive peptides: A new horizon in preventing chronic disease. **Sexuality, Reproduction and Menopause**, v.4, n.2, p.91-95, 2006.

MORENO, M.C.M.; CUADRADO, V.F. Enzymic hydrolysis of vegetables proteins: mechanism and kinetics. **Process Biochemistry**, v. 28, n. 7, p. 481-490, 1993.

MUNRO, I. C.; HLYWKA, J. J.; STEPHEN, A. M.; DOULL, J.; FLAMM, G.; ADLERCREUTZ, H. Soy isoflavones: a safety review. **Nutrition Reviews**, v.61 n.1, p.1-33, 2003.

NETTO, F.M, GALEAZZI, M.A.M. Production and characterization of enzymatic hydrolysate from soy protein isolate. **LebensmWiss Technol**, v. 31, p.624–31, 1998.

NIELSEN, P.M.; OSLEN, H.S. Enzimic modification of food protein. In: **Enzymes in food technology**. Robert J. Whitehurst and Barry A. Law (eds.) Sheffield Academic Press, Cap. 6, p.109- 143, 2002.

NUFER, K.R.; ISMAIL, B.; HAYES, D.K. The Effects of Processing and Extraction Conditions on Content, Profile, and Stability of Isoflavones in a

Soy milk System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n. 4, 2009.

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

ORTIZ, S.E.M.; AÑÓN, M.C. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates. **Journal of the American Oil Chemists`s Society**, v. 77, n.12, p. 1293-1301, 2000.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; NERY, I.A.; AGUIAR, C.L.; PACHECO, T.A.R.C. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal beta-glicosidase. **Food Science and Industry**, v.34, n.4, p. 14-19, 2001.

PEÑA-RAMOS, E.A.; XIONG, Y.L.; ARTEAGA, G.E. Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolyzed whey protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n.14, p.1908-1918, 2004.

_____. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. **Journal Chemistry and Toxicology**, v. 67, n. 8, p. 2952-2956, 2002.

PETERSON, G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. **Journal of Nutrition**, v.125 (suppl.), p.784-S-789S, 1995.

PHILLIPS, R.D.; BEUCHAT, L.R. Protein Functionality in Foods. **ACS Symposium Series**, Washington, D.C., 1981.

RAMAKRISHNAN, V.V.; GHALY, A.E.; BROOKS, M.S.; BUDGE, S.M. Extraction of proteins from mackerel fish processing waste using Alcalase enzyme. **Journal Bioprocess Biotechniq**, v. 3, n. 2, 2013.

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, 2000.

RIBEIRO, M.L.L .; MANDARINO, J.M.G.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; OLIVEIRA, M.C.N.; CAMPO, C.B.H.; NEPOMUCENO, A.L.; IDA, E.I. Isoflavone content and b-glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p.19-24, 2007.

RINALDI, V.E.A., NG, P.K.W., BENNINK, M.R. Effects of extrusion on dietary fiber and isoflavone contents of wheat extrudates enriched with wet *okara*. **Cereal Chemistry**, v. 77, n.2, p.237–240, 2000.

ROY, F.; BOYE, J.I.; SIMPSON, B.K. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**, v. 43, p. 432-442, 2010.

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

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, 2005.

SEO, W.H.; LEE, H.G.; BAEK, H.H. Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, p.41-46, 2008.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 285-293, 1995.

SIENKIEWICZ- SZLAPKA, E. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 4, p. 258-263, 2008.

SOUSA R, J.R.; RESENDE, M.M.; GIORDANO, R.L.; GIORDANO, R.C. Hybrid model for an enzymatic reactor: hydrolysis of cheese whey proteins by alcalase immobilized in agarose gel particles. *Spring*; p. 413-422, 2003.

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, n. 8, p. 1343–1349, 2005.

ULUKO, H.; LIU, L.; LI, H.; CUI, W.; ZHAO, L.; XUE, H.; LV, J. Effect of power ultrasound pretreatment on peptidic profiles and angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates. **Journal Science Food Agricultural**, v. 94, n.12, 2014.

WALISZEWSKI, K. N.; PARDIO, V.; CARREON, E. Physiochemical and Sensory Properties of Corn Tortillas Made from Nixtamalized Corn Flour Fortified With Spent Soymilk Residue (*Okara*). **Journal of Food Science**, v. 67, n.8, p.3194-3197, 2002.

WANG, J.S.; ZHAO, M.M.; ZHAO, Q.Z.; JIANG, Y.M. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1658-1663, 2006.

WANG, Y., DE MEJIA, G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Compr. Rev. Food Sci. Food Safety**, v. 4, p. 63-78, 2005.

WANG, H-J; MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, p. 2377-2383, 1996.

YOSHIARA L. Y.; MADEIRA T. B.; DELAROZA F.; SILVA J. B.; IDA E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *Int. Journal of Food Science Nutrition*, 2012.

YUST, M.D.; PEDROCHE, J.; MILLÁN-LINARES, M.C.; ALCAIDE-HIDALGO, J.M.; MILLÁN, F. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. **Food Chemistry**, v.122, n.4, p.1212-1217, 2010.

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, p. 2084-2089, 2010.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with Alcalase. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1296-1302, 2006.

6 CONCLUSÃO

A partir deste trabalho, foi possível demonstrar que a ação do complexo multi-enzimático Viscozyme[®] sobre a parede celular pode melhorar significativamente a extração de proteínas a partir de *okara*. Foi também possível determinar a condição ótima para se obter a partir do concentrado proteico extraído do *okara*, um hidrolisado proteico com elevado grau de hidrólise. O hidrolisado proteico apresentou maior capacidade antioxidante em comparação com a amostra não hidrolisada devido ao elevado teor de isoflavonas agliconas e à formação dos peptídeos bioativos. Assim, este estudo demonstrou que o hidrolisado obtido representa uma alternativa para o aproveitamento de nutrientes descartados no *okara* na obtenção de um produto com elevado valor agregado.