



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CÍNTIA LADEIRA HANDA

**FERMENTAÇÃO DE FARINHA DE SOJA COM *Aspergillus
oryzae* ou *Manascus purpureus* PARA PRODUÇÃO DE
ENZIMAS COM ATIVIDADE β -GLICOSIDADE E
BIOCONVERSÃO DE ISOFLAVONAS EM AGLICONAS**

Londrina
2013

CÍNTIA LADEIRA HANDA

FERMENTAÇÃO DE FARINHA DE SOJA COM *Aspergillus oryzae* ou *Manascus purpureus* PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS COM ATIVIDADE β -GLICOSIDADE E BIOCONVERSÃO DE ISOFLAVONAS EM AGLICONAS

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. Bolsa concedida pelo CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Orientadora: Elza Louko Ida

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

H236f Handa, Cíntia Ladeira.
Fermentação de farinha de soja com *Aspergillus oryzae* ou *Monascus purpureus* para produção de enzimas com atividade de β -glicosidase e bioconversão de isoflavonas em agliconas / Cíntia Ladeira Handa. – Londrina, 2013.
87 f.: il.

Orientador: Elza Iouko Ida.
Coorientador: Sandra Regina Georgetti.
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Enzimas – Aplicações industriais – Teses. 2. Soja – Processamento – Teses. 3. Soja – Indústria – Teses. 4. Isoflavonas – Teses. 5. *Aspergillus oryzae* – Teses. I. Ida, Elza Iouko. II. Georgetti, Sandra Regina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 663.1

CÍNTIA LADEIRA HANDA

Fermentação de Farinha de Soja com *Aspergillus oryzae* ou
Monascus purpureus para Produção de Enzimas
com Atividade de β -Glicosidase e Bioconversão
de Isoflavonas em Agliconas

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. Bolsa concedida pelo CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elza Louko Ida
Universidade Estadual de Londrina

Dra. Sandra Helena Inoue Oda
Unilever Foods Brasil

Profa. Dra. Mara Lucia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 12 de abril de 2013.

Dedico

À Deus,

Por me conceder saúde e disposição para concluir mais esta etapa e pela oportunidade de ter conhecido e convivido com pessoas especiais que fizeram esta experiência inesquecível.

Aos meus pais Antônio Nobyuki Handa (in memorian), Angelina Ladeira e Zenildo Lima dos Santos por sempre me oferecer o melhor e me apoiarem em meus sonhos. Essa conquista não é minha, é nossa. Aos meus irmãos Silvana Ladeira Handa de Araújo e Leandro Toshizo Handa, pela força, carinho e torcida. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Elza Louko Ida, pela orientação, confiança, compreensão, incentivo e valiosos ensinamentos. Exemplo de profissional extremamente responsável e diligente.

À Prof^a Dr^a Sandra Regina Georgetti, pelos ensinamentos, confiança, conselhos, conhecimentos compartilhados e carinho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de realização do mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/MEC), pela concessão de bolsa de estudo.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pelos ensinamentos e em especial aos professores Doutores Raul Castro-Gomez, Fábio Yamashita e Pós-Doutoranda Josemeyre B. Silva pela contribuição e ponderações que foram fundamentais para a elaboração deste projeto.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro, conforme o Projeto PRONEX/ 2010 e protocolo 15159.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia Sambatti, Elza Youssef, Sandra Rezende, Alessandra Belitardo, Rubens Borges Santos, Maria Alice Carlos, Célia Primo, Marli Piologo em especial à Neusa C. dos Santos, pela prontidão e carinho.

Aos amigos Luciane Yoshiara, Wagner E. Risso, Juliano Zanela, Mônica Reis, Fernando S. Lima, Diogo G. Pedrollo, Angélica Ishikawa, Karla B. Guergoletto e Cássia Reika Takabayashi. Todo meu respeito e admiração. Em especial aos queridos amigos Marsilvio Moraes Filho e Thiago Montagner Souza, nossa amizade foi um dos melhores frutos deste mestrado.

Aos alunos atuais e egressos da Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina Gislaíne Simões, Maria Rita Porto,

Neide Kamikaze, Raissa Curti Bonfante, Marines Paula Corso, Paulo T. Carvalho, Ana Lucia S. Felicio, Daniele C. B. Honorato, Natalia C. V. Bom, Renata P. Sobottka, Juliana N. Almeida, Cristiane W. C. Borges, Daiana R. Ferreira, Fabiola M. Barreto, Gleice R. Almeida, Mario S. A. Resta, Natalia V. Rezende, Alessandra Tsuruda, Alécio Quinhone Jr, pela amizade, apoio, convivência agradável, palavras amigas de força e perseverança.

Aos queridos estagiários de iniciação científica Aline H. Vicensoti, Heloise H, Paulino e Uenifer Couto pelo profissionalismo, comprometimento, apoio e amizade.

Ao Miguel Nishihara, Amélia H. Nishihara e Eliseu Sakuma, pela compreensão, incentivo e apoio.

A todos aqueles que colaboraram e torceram para esta conquista.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é necessário dominar a força, mas sim a razão. É preciso, antes de mais nada querer.”
(Amyr Klink)

HANDA, Cíntia Ladeira. **Fermentação de farinha de soja com *Aspergillus oryzae* ou *Monascus purpureus* para produção de enzimas com atividade de β -glicosidase e bioconversão de isoflavonas em agliconas.** 2013. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

RESUMO

A fermentação em estado sólido (FES) de farinha de soja com diferentes fungos pode ser utilizada para produção de enzimas como a β -glicosidase, que durante o processo pode bioconverter as isoflavonas glicosídicas em agliconas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros do processo de FES da farinha de soja desengordurada (FSD) com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992. Foi utilizado o planejamento fatorial composto central rotacional (PCCR) 2^3 para otimizar a produção de enzima com atividade de β -glicosidase e avaliar a bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas das FSD fermentadas. As variáveis investigadas foram o pH inicial da FSD, volume de água adicionada à 10 g de FSD e temperatura de incubação. A atividade de β -glicosidase foi medida utilizando o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG). A separação e quantificação das diferentes formas químicas das isoflavonas foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). As condições ótimas de FES de FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 para a máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase ocorreram com adição de 10 mL de água à FSD, incubação à 30°C e pH inicial da FSD de 6,0, sendo que para o *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 o efeito de pH foi independente no intervalo de 5,2 e 6,8. Nas mesmas condições de fermentação, o *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 produziu atividade de β -glicosidase de 10,7 vezes superior ao *Monascus purpureus* NRRL 1992. Entretanto, a fermentação da FSD com *Monascus purpureus* NRRL 1992 foi mais eficiente para bioconverter as isoflavonas glicosídicas em agliconas. A FES da FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 promoveu aumento no teor de isoflavonas agliconas.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido. Isoflavonas. Farinha de soja. β -glicosidase. Planejamento composto central rotacional. *Aspergillus oryzae*. *Monascus purpureus*.

HANDA, Cíntia Ladeira. **Fermentation of soy flour with *Aspergillus oryzae* or *Monascus purpureus* for production of enzyme with β -glucosidase activity and bioconversion of isoflavones in aglycones.** 2013. 87 p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – State University of Londrina. Londrina, 2013

ABSTRACT

The solid state fermentation (SSF) of soybean flour by fungi can be used to produce enzymes such as β -glucosidase, which during the process may convert isoflavones glycosides to aglycones. The aim of this study was to evaluate the parameters of the process of SSF of defatted soybean flour (DSF) with *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 or *Monascus purpureus* NRRL 1992. For this purpose was used the Rotation Central Composite Design (RCCD) 2^3 to optimize the production of enzyme with β -glucosidase activity and to evaluate the bioconversion of glycosidic isoflavones in aglycones of fermented DSF. The variables investigated were initial pH of DSF, volume of water added to 10 g of DSF and incubation temperature. The β -glucosidase activity was measured using the synthetic substrate *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside (*p*-NPG). The separation and quantification of different chemical forms of isoflavones was conducted by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). The optimal conditions of SSF of DSF with *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 or *Monascus purpureus* NRRL 1992 to highest the production of enzyme with β -glucosidase activity occurred with addition of 10 mL water the DSF, incubating at 30 °C and 6.0 as initial pH of DSF. To *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998, the effect of pH was independent in the range of 5.2 to 6.8. Using the same conditions of fermentation, *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 presented β -glucosidase activity 10.7 times higher than *Monascus purpureus* NRRL 1992. However, the fermentation of DSF was more efficient in convert glycosidic isoflavones in aglycones using *Monascus purpureus* NRRL 1992. The SSF of DSF with *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 or 1992 *Monascus purpureus* NRRL promoted increase in isoflavones aglycones under evaluated conditions.

Key words: Solid state fermentation. Isoflavones. Soybean flour. β -glucosidase. Rotational central composite design. *Aspergillus oryzae*. *Monascus purpureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura geral de flavonóide.....	19
Figura 2 – Via de biossíntese de isoflavona	20
Figura 3 – Estrutura química da genisteína, daidzeína, glicitina e alguns dos seus conjugados glicosídicos e malonil.....	21
Figura 4 – Estruturas químicas das isoflavonas	23
Figura 5 – Fluxograma do processo de FES das FSD utilizando <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999/1998 ou <i>Monascus purpureus</i> NRRL 1992 para produção da enzima com atividade de β -glicosidase.....	36

ARTIGO: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA FARINHA DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE β -GLICOSIDASE E BIOCONVERSÃO EM AGLICONAS

Figura 1 – Superfície de resposta: (A) UA de β -glicosidase da FSD fermentada com <i>Aspergillus oryzae</i> , sendo X_3 (temperatura de incubação) fixa em 30°C. (B, C e D) UA de β -glicosidase da FSD fermentada com <i>Monascus purpureus</i> g ⁻¹ de amostra, sendo (B) X_3 (temperatura de incubação) fixa em 30°C; (C) X_2 (mL de água adicionada à FSD) fixo em 10 mL e (D) X_1 (pH inicial da FSD) fixo em 6,0.....	74
Figura 2 – Parâmetro de desejabilidade estimado na condição de máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase (Y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999/1998 g ⁻¹ de amostra ou Y_M = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com <i>Monascus purpureus</i> NRRL 1992 g ⁻¹ de amostra)	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis independentes e níveis de variação do PCCR.....37

Tabela 2 – Planejamento fatorial central composto rotacional para fermentação das FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 199237

ARTIGO: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA FARINHA DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMA COM ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE E BIOCONVERSÃO EM AGLICONAS

Tabela 1 – Variáveis independentes e níveis de variação do PCCR.....70

Tabela 2 – Planejamento fatorial central composto rotacional para fermentação das FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 e funções-respostas Y_A e Y_M71

Tabela 3 – ANOVA para atividade de β -glicosidase produzida por *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 - Bloco exploratório.....72

Tabela 4 – Teor de isoflavonas das FSD fermentadas com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 e controles.....73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 ASPECTOS GERAIS DA SOJA	16
2.2 ESTRUTURA DE ISOFLAVONAS E SUAS FUNÇÕES	19
2.3 BIOCONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS	23
2.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	28
3 OBJETIVO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAL	34
4.2 MÉTODOS	34
4.2.1 Reativação dos Micro-organismos e Obtenção da Suspensão de Esporos	34
4.2.2 FES da FSD	35
4.2.3 Planejamento Fatorial Composto Central Rotacional (PCCR)	36
4.2.4 Validação do Modelo	38
4.2.5 Bioconversão de Isoflavonas Glicosídicas em Agliconas das FSD Fermentadas com <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999/1998 ou <i>Monascus purpureus</i> NRRL 1992	38
4.2.6 Extração e Determinação da Atividade de β -Glicosidase	39
4.2.7 Quantificação de Isoflavonas por CLUE	40
4.2.8 Composição química da FSD	41
REFERÊNCIAS	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 ARTIGO: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA FARINHA DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMA COM ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE E BIOCONVERSÃO EM AGLICONAS	50
6 CONCLUSÃO	76
APÊNDICE A – Análise de regressão do planejamento fatorial 2^3 para produção de enzima com atividade de β -glicosidase	78
APÊNDICE B – Análise de regressão do planejamento fatorial 2^3 com efeito da curvatura para produção de enzima com atividade de β -glicosidase	79

APÊNDICE C – Análise de variância (ANOVA) do planejamento composto central rotacional 2^3 para produção de enzima com atividade de β -glicosidase	80
APÊNDICE D – Análise de regressão do planejamento composto central rotacional 2^3 para produção de enzima com atividade de β -glicosidase	81
APÊNDICE E – Resumos apresentados em congressos	82

1 INTRODUÇÃO

Uma ampla variedade de compostos tem sido sugerida como antioxidantes *in vivo* e em alimentos (HALLIWELL et al., 1995). Os flavonóides são compostos polifenólicos que apresentam atividade antihepatotóxica, anti-inflamatória, antialérgica, antiosteoporótica e anticancerígena, cujos efeitos estão associados com a atividade antioxidante (SILVA et al., 2002). Dentre estes, as isoflavonas da soja tem sido amplamente investigadas devido à capacidade de reduzir os riscos de doenças cardiovasculares, inibir o crescimento de células cancerígenas, prevenir doenças como osteoporose e amenizar sintomas da menopausa. Esta capacidade das isoflavonas é fortemente influenciada pela sua estrutura química (VILLARES et al., 2011). Além das isoflavonas, a soja contém outros compostos de interesses com atividade biológica que incluem os fitoesteróis, inibidores de protease e saponinas (SUGANO, 2006). Na soja as isoflavonas ocorrem em quatro formas químicas distintas denominadas de: agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), β -glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), acetil glicosídicas conjugadas (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina) e malonil glicosídicas conjugadas (6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina) que totalizam doze diferentes formas. As formas β -glicosídicas possuem uma molécula de glicose ligada na posição 7 do anel benzeno e as formas conjugadas são esterificadas no carbono 6 da molécula de glicose (LIU, 1997). Na soja as principais isoflavonas encontradas estão nas formas glicosídicas que constituem de 50 a 90% das isoflavonas totais. No entanto, as isoflavonas agliconas estão presentes em menor quantidade, porém, apresentam maior atividade biológica (IZUMI et al., 2000; PYO; LEE; LEE, 2005). Em produtos de soja o conteúdo e composição de isoflavonas dependem das condições e tipo de processamento como tratamento térmico, cozimento, fermentação e hidrólise com enzima (WANG; MURPH, 1994).

O potencial bioativo e de absorção no intestino das isoflavonas agliconas é superior às suas formas glicosídicas correspondentes. Portanto, o enriquecimento de produtos de soja com isoflavonas agliconas aumentou consideravelmente e, em geral, utilizam processos que visam à conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas (IZUMI et al., 2000). Estes processos envolvem a ação de enzimas provenientes da fermentação microbiana (PHAM;

SHAH, 2009) como bactérias (DONKOR; SHAH, 2008; CHIEN; HUANG; CHOU, 2006) ou fungos (PARK et al., 2001) ou de fontes vegetais e animais. A produção de enzima com atividade de β -glicosidase de fonte microbiana produzida por processo fermentativo apresenta maior vantagem, pois requer menos investimento e pode ser produzida em grande escala (LANGSTON; SHEEHY; XU, 2006). A conversão das diferentes formas químicas de isoflavonas da soja depende do tipo de micro-organismo e do potencial de hidrólise da enzima produzida (OTIENO; ASHTON; SHAH, 2006). Além disso, a hidrólise das ligações glicosídicas das isoflavonas pela β -glicosidase depende também do tempo e temperatura de fermentação (MATSURA; OBATA, 1993).

No processo de fermentação em estado semissólido ou sólido (FES) os micro-organismos são cultivados nas superfícies de materiais sólidos com limitada quantidade de água e pode ser utilizado para obtenção de enzimas microbianas. Os meios de cultivo devem ser favoráveis e conter todos os nutrientes necessários para a síntese celular e formação do produto desejado (WARD, 1991). A eficiência do processo de FES depende das condições de fermentação (MARTINS et al., 2011). A produção de enzima fúngica com atividade de β -glicosidase por meio de FES pode ser influenciada pelas condições de pH inicial e umidade do substrato, temperatura e tempo de incubação (QIAN et al., 2012). E para aumentar o rendimento do processo de FES é importante otimizar as condições de fermentação estabelecendo adequadamente os parâmetros físicos e químicos (FRANCIS et al., 2003). Neste sentido, o uso de ferramentas estatísticas com planejamentos experimentais adequados possibilita melhorar os processos de fermentação e investigar as possíveis combinações entre múltiplos fatores (SEN; SWAMINATHAN, 1997).

Os fungos filamentosos são mais adaptados para desenvolverem em processo de FES devido às suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. O *Aspergillus oryzae* é um fungo muito utilizado no Japão principalmente para produção de produtos fermentados como molho de soja, saquê, temperos e vinagre. Devido o potencial de produção de várias enzimas, este fungo é amplamente utilizado na área da biotecnologia moderna (MACHIDA; YAMADA; GOMI, 2008), além disso, as espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos mais promissores para a produção de β -glicosidase (SOLOVYEVA et al., 1997). Já o fungo *Monascus purpureus* é utilizado tradicionalmente no leste asiático para a produção de

alimentos fermentados e também para a obtenção de produtos secundários que são utilizados como pigmento alimentar ou agente biológico (LEE; YANG; MAU, 2008). A utilização deste fungo como produtor de β -glicosidase, somente foi avaliada por Daroit et al. (2007).

Considerando o potencial de produção de enzimas que hidrolisam as ligações β -glicosídicas, este trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros do processo de FES da farinha de soja desengordurada (FSD) com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 utilizando o planejamento fatorial composto central rotacional (PCCR) para otimizar a produção de enzima com atividade de β -glicosidase e investigar a bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA SOJA

A soja tem origem atribuída ao continente asiático e há 5 mil anos na China foi considerada como uma das plantas sagradas (GOLBITZ; JORDAN, 2006). Em 1882 foi introduzida no Brasil por Gustavo D`utra no estado da Bahia. Em 1941 há registro no Anuário Agrícola do Rio Grande do Sul, onde instalou-se em Santa Rosa, a primeira indústria processadora de soja. Em 1949, o Brasil apareceu pela primeira vez como produtor de soja nas estatísticas internacionais. Sendo que em 1942 os Estados Unidos já ocupavam o primeiro lugar na produção mundial. No Paraná foi introduzida em 1936 e somente em 1955 começou a ser cultivada efetivamente após uma grande geadada, quando seu cultivo foi recomendado para minimizar as consequências desse fenômeno climático nos cafezais (BONATO; BONATO, 1987).

Na safra 2011/2012 o Brasil atingiu o recorde de área plantada com 25 milhões de hectares, representado 50% de toda a área cultivada, no entanto, devido à estiagem prolongada a safra foi 12% menor do que o ano anterior. Entretanto, há perspectivas de que na safra 2012/2013 o Brasil já assuma a liderança mundial no agronegócio da soja, tanto em produção como em exportação, com expectativa de produção de 80 milhões de toneladas. Além disso, o país possui maior capacidade de multiplicar a produção, tanto pelo aumento da produtividade quanto pelo potencial de expansão da área cultivada (REETZ et al., 2012).

A soja é classificada como *Glycine max* (L.) pertence à classe *Dicotyledoneae*, ordem *Rosales*, família *Leguminosae*, subfamília *Papilionidae* e ao gênero *Glycine* L. Seus produtos são amplamente investigados devido ao valor nutritivo, às suas propriedades funcionais na indústria de alimentos e como alimento funcional por meio de suas proteínas (CIABOTTI et al., 2006) e outros compostos bioativos (SUGANO, 2006). A soja convencional possui composição química quase completa, incluindo proteínas, lipídeos, carboidratos e muitos minerais. É uma leguminosa formada pelos cotilédones que constituem 90% da massa total do grão, o hipocótilo representa 2-3% do total do grão e a casca representa 6% da massa total do grão (TSUKAMOTO et al., 2001). A composição química da soja depende da cultivar, das condições de crescimento e região de cultivo e contêm em base úmida,

35% de proteína, 17% de lipídeos, 31% de carboidratos e 4,4% de cinzas e minerais (LIU, 1997).

A soja pode ser utilizada para fins alimentícios para humanos ou animais, para produtos industrializados e matéria-prima para agroindústrias. A soja pode ser fermentada ou processada, gerando o óleo, farelo e farinha, seguidos de concentrados e isolados proteicos e, ainda, estes podem ser adicionados em produtos cárneos, na panificação, em molhos, massas, bebidas, sopas e alimentos dietéticos (PAN; TANGRATANAVALEE, 2003; BARNES, 2010). A fermentação do grão de soja produz vários tipos de alimentos tradicionalmente conhecidos como misso, shoyu, natto e tempeh. Quando os grãos de soja são tratados termicamente pode-se obter o extrato aquoso e o resíduo denominado okara. O extrato aquoso coagulado com alguns sais produz o tofu (BARNES, 2010). Além disso, a soja pode ser consumida também como hortaliça e nesse sentido a Embrapa tem realizado estudos para verificar a predisposição de variedades de soja para uso como brotos de soja (moyashi), consumidos *in natura*, ou como soja verde, imatura do tipo vegetal, cujo consumo pode ser similar à ervilha (REETZ et al., 2012). A soja desenvolvida e colhida no estágio R6 pode ser consumida *in natura* ou processada como soja tipo vegetal (CZAIKOSKI et al., 2013).

A farinha de soja pode ser utilizada como ingrediente para uma variedade de produtos alimentícios incluindo sopas, bebidas, sobremesas, produtos de padaria, cereais matinais e produtos cárneos (HETTIRACHCHY; KALAPATH, 1997). A farinha desengordurada de soja é obtida por trituração fina de flocos de soja desengordurados que, por sua vez, são produzidos por esmagamento do grão em moinho de rolo e o óleo é extraído com solvente. Qualquer solvente restante é removido do floco por evaporação. Desse modo, a farinha desengordurada de soja tem maior teor de proteína em comparação à farinha de soja integral. A farinha de soja desengordurada contém de 44 a 54% de proteínas, 0,5 a 1% de lipídeos, 17 a 18% de fibra alimentar e 30 a 35% de carboidratos totais, além disso, apresenta maior teor de isoflavonas do que o grão de soja ou produtos derivados (GOLBITZ; JORDAN, 2006). Em relação às formas de isoflavonas a farinha desengordurada de soja comercial apresenta predominância de conjugados malonil glicosídeos e β -glicosídeos similar aos grãos de soja (BARBOSA et al., 2006).

O consumo direto da soja na alimentação humana ainda é discreto, no entanto, os seus efeitos benéficos são cada vez mais divulgados pelos meios de

comunicação, e produtos à base do grão estão sendo impulsionados para o consumo (REETZ et al., 2012). A entrada de empresas de alimentos tradicionais no mercado de alimentos de soja aumentou o acesso aos consumidores, de tal forma que cerca de metade de todos os produtos de soja são comercializados em grandes estabelecimentos de varejo do que em lojas especializadas (MESSINA, 2002). O consumo de alimentos a base de soja em países orientais tem sido relacionados com as boas condições de saúde das populações por meio de comparações entre as dietas, cujas constatações têm sido associadas à presença de isoflavonas nesses alimentos (FERRARI; DEMIATE, 2001). As isoflavonas têm sido investigadas por apresentarem efeitos benéficos na diminuição do risco para a saúde como câncer, menopausa e doenças cardiovasculares (MCCUE; SHETTY, 2004). Diante do potencial da soja, muitas pesquisas foram realizadas para determinar os componentes ativos associados aos benefícios à saúde (ISMAIL; HAYES, 2005).

A soja contém um amplo número de compostos de interesse biológico, que incluem os fitoesteróis, os inibidores de protease e as saponinas, além das isoflavonas que são polifenóis heterocíclicos com estrutura difenólica similar ao estrogênio (ROSTAGNO; ARAÚJO; SANDI, 2002).

Os fitoestrógenos são compostos que apresentam dois grupos principais: as isoflavonas e lignanas. Uma dieta pode apresentar um grande efeito sobre o risco de doenças hormônio-dependentes e, nesse sentido, os fitoestrógenos têm sido implicados na diminuição do risco de câncer. Esta constatação deve-se ao fato de que os níveis plasmáticos e urinários de fitoestrógenos são mais elevados em regiões onde a incidência de câncer é baixa em comparação com regiões onde a incidência de câncer é elevada. A variação na microbiota intestinal também pode estar relacionada com o risco de câncer conforme evidenciado pela incapacidade de certos indivíduos produzirem fitoestrógenos ativos (MAGEE; ROWLAND, 2004)

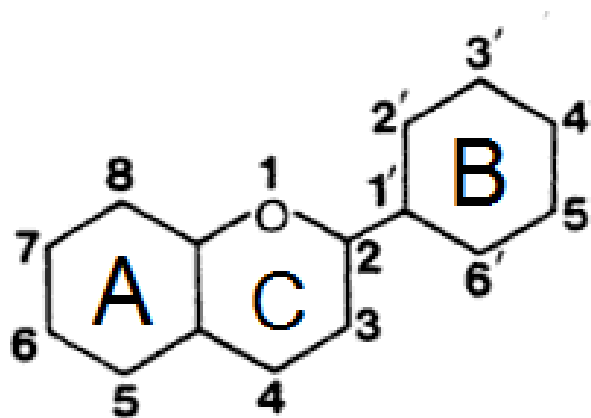
Segundo Barnes (2010) a estrogenicidade da isoflavona não é o único mecanismo pelo qual estes compostos poderão ter bioatividade, uma vez que as isoflavonas inibem a tirosina quinase, possuem atividade antioxidante, tem capacidade de inibir as enzimas de biossíntese de esteróides e inibir metástases. Estas várias propriedades poderiam explicar a menor incidência de câncer de mama em populações da Ásia com relação aos Norte-Americanos e Europeus.

2.2 ESTRUTURA DE ISOFLAVONAS E SUAS FUNÇÕES

As isoflavonas são utilizadas como moléculas sinalizadoras em plantas para o estabelecimento de relações simbióticas com as bactérias rizóbias resultando na formação de nódulos de fixação de nitrogênio nas raízes (NEWELL-MCGLOUGHLIN, 2010). Além disso, têm funções na proteção contra a luz UV, na defesa contra micro-organismos patogênicos ou pragas e na regulação do crescimento e atividade de algumas enzimas (FORKMANN; MARTENS, 2001).

As isoflavonas estão quimicamente relacionadas aos flavonóides e portanto são incluídas neste grupo. Distinguem-se pelo número de hidroxilas, metoxilas e outros substituintes sobre os dois anéis benzeno (SCHWARTZ; ELBE; GIUSTI, 2010). A estrutura básica dos flavonóides (Figura 1) é formada pelo núcleo flavona, que é composto por 2 anéis benzeno (A e B) ligados por um anel heterocíclico pirano (C) (LIU, 1997).

Figura 1: Estrutura geral de flavonóide

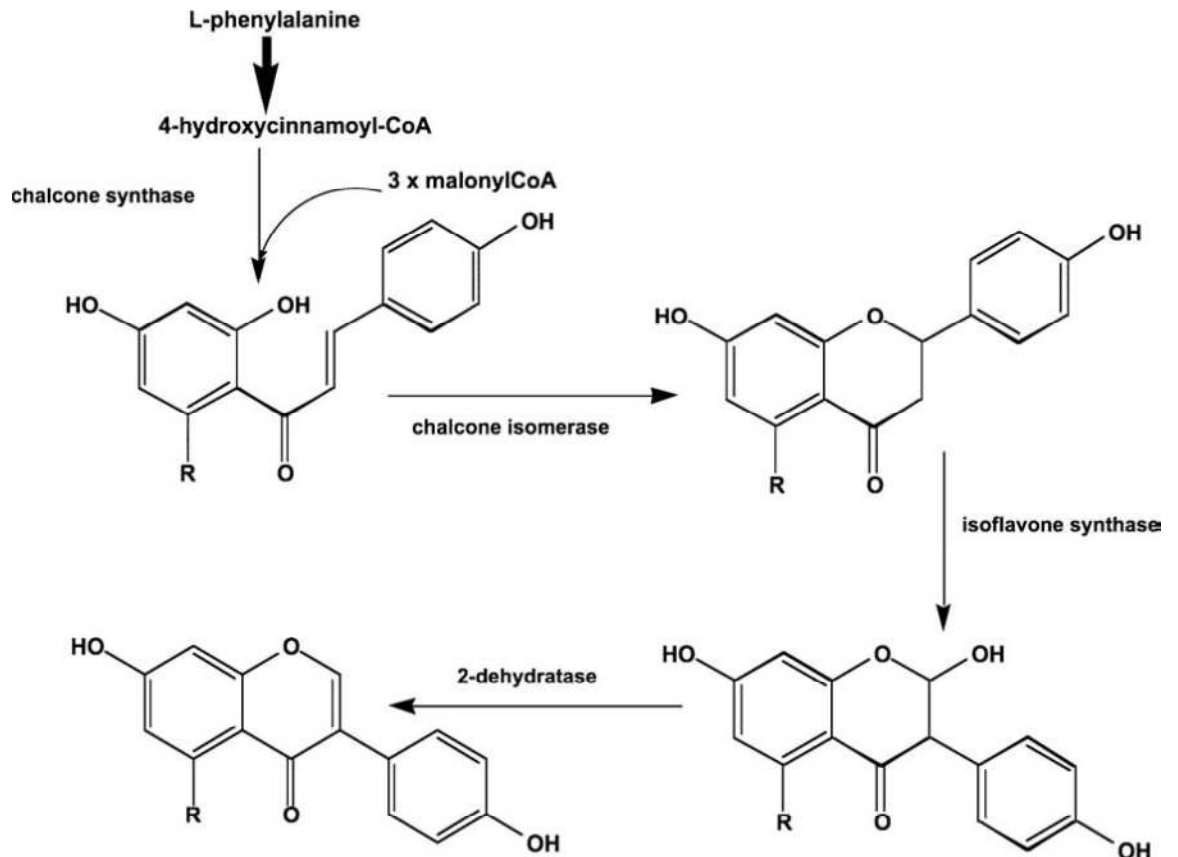


Fonte: Liu (1997).

Embora categorizadas como polifenóis, as isoflavonas são estudadas separadamente, pois constituem um subgrupo especial de flavonoides que não são comumente encontrados em frutas e vegetais (COWARD et al., 1998). Para a biossíntese de isoflavona (Figura 2) a fenilalanina reage primeiro com a malonil-CoA para produzir 4-hydroxycinnamoyl CoA. A chalcona sintase catalisa a reação de 4-hydroxycinnamoyl CoA com três moléculas de malonil-CoA para formar uma chalcona. A chalcona isomerase fecha o anel heterocíclico e forma naringenina. A isoflavona sintase introduz um grupo 2-hidroxil, que por sua vez é removido por

uma isoflavona desidratase para produzir daidzeína (7,4'-di-hidroxiisoflavona) e genisteína (5,7,4'-trihidroxiisoflavona), contudo, a biossíntese de gliciteína (7,4'-di-hidroxi-6-metoxiisoflavona) ainda não foi totalmente compreendida (BARNES, 2010).

Figura 2- Via de biossíntese de isoflavona

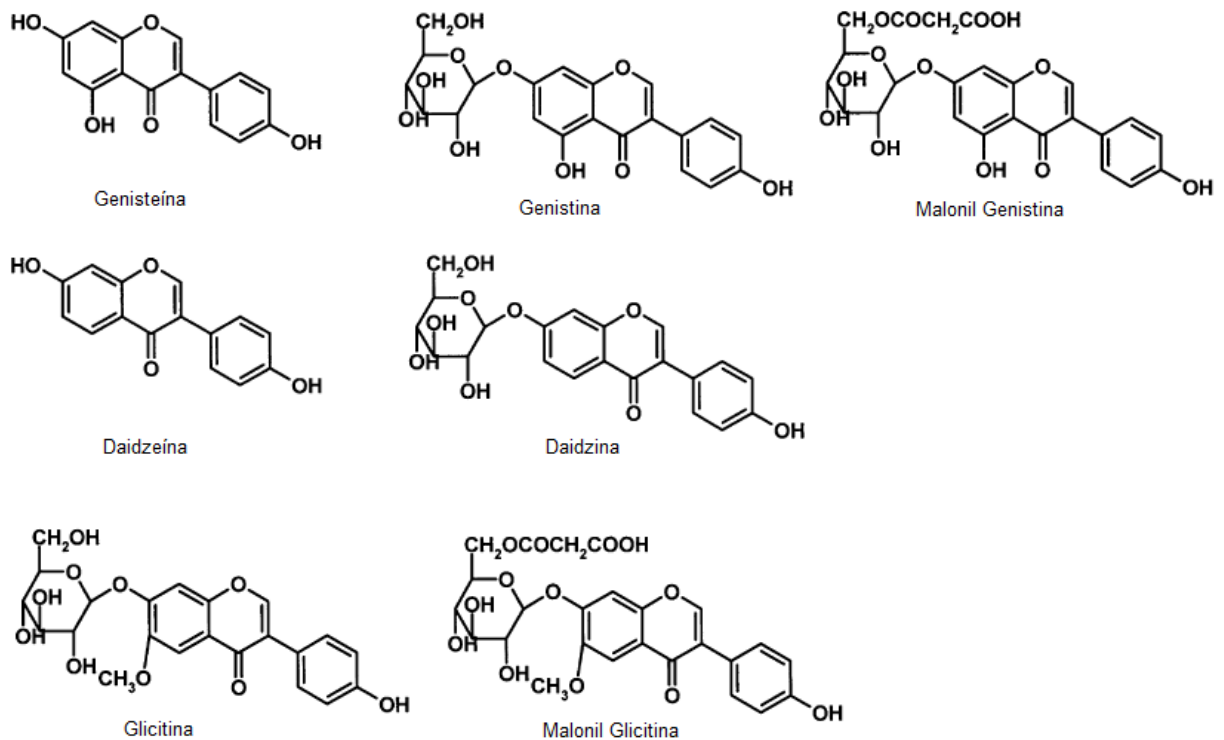


Fonte: Barnes (2010).

As plantas leguminosas tais como soja e trevo vermelho (*Trifolium pratense*) são conhecidas como fontes de isoflavonas, que podem ser encontradas sob as formas de agliconas ou glicosídica (TSAO; YANG; YOUNG, 2003, CHIEN; HUANG; CHOU, 2006). Na soja as isoflavonas podem ocorrer em quatro estruturas químicas distintas: as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), as β -glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), as acetil glicosídicas (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina) e as malonil glicosídicas (6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina) totalizando doze diferentes formas. As formas β -glicosídicas possuem uma molécula de glicose ligada na posição 7 do anel benzeno e as formas conjugadas são esterificadas no carbono 6 da molécula de

glicose (LIU, 1997). A estrutura das principais isoflavonas da soja estão apresentadas na Figura 3 (LEE et al., 2005).

Figura 3: Estrutura química da genisteína, daidzeína, glicitina e alguns dos seus conjugados glicosídicos e malonil



Fonte: Lee et al. (2005)

Alguns pesquisadores sugerem que as formas agliconas são absorvidas mais rapidamente e mais facilmente do que as glicosídicas (TSAO; YANG; YOUNG, 2003; CHIEN; HUANG; CHOU, 2006). De acordo com Arditi et al. (2000) a biodisponibilidade de isoflavonas ocorre através da ação da flora intestinal durante a degradação de compostos que é influenciada pela dose ingerida na dieta e ação de enzimas bacterianas, especialmente a enzima β -glicosidase. Nesse sentido, as isoflavonas glicosídicas, que não podem ser absorvidas, são hidrolizadas por ação dessas enzimas em suas formas agliconas.

A concentração de isoflavonas em produtos de soja depende de fatores genéticos do grão, do ambiente em que foi cultivado e do processamento utilizado, sendo que os níveis de isoflavonas em soja cultivada no mesmo campo e

no mesmo ano podem variar (RIAZ, 2006). Genovese, Hassimotto e Lajolo (2005) estudaram o conteúdo e o perfil de isoflavonas de 14 variedades de soja desenvolvidas pela Embrapa e observaram que o conteúdo variou significativamente entre as variedades (57-188 mg de isoflavonas/100 g de grão de soja) sendo que 90 a 95% estavam na forma glicosídica.

Fatores como tempo de processamento, processo de extração, diluição com outros ingredientes, hidrólise enzimática e fermentação podem afetar o conteúdo e o perfil de isoflavonas nos alimentos (BARNES, 2010). Murphy (1982) e Wang e Murphy (1994) relataram que, ao determinar os níveis de isoflavonas de soja e produtos à base de soja, foram encontradas diferenças significativas no conteúdo e distribuição de isoflavonas, principalmente em produtos processados à base de soja.

As isoflavonas exercem propriedades antioxidantes protegendo os alimentos da deterioração oxidativa dos lipídeos (FRITZ et al., 2003). Como o conteúdo total e tipo de isoflavonas. Assim, o teor de fenólicos dos produtos de soja dependem do processamento. A capacidade antioxidante desses produtos pode variar significativamente e parece estar associada tanto aos teores de compostos fenólicos totais, como à estrutura das agliconas e aos diferentes tipos de conjugação presentes (BARBOSA et al., 2006).

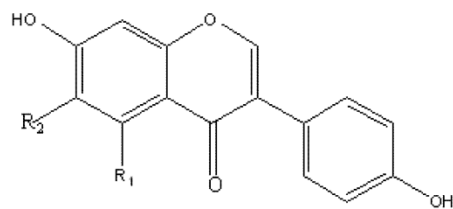
Todas as isoflavonas apresentam ação antioxidante, porém, esta varia amplamente, conforme a estrutura. A genisteína, com grupos hidroxila nas posições 5, 7 e 4, exibe maior poder antioxidante (ARORA; NAIR; STRASBRUG, 1998). Segundo Tsao, Yang e Young (2003) a atividade antioxidante das isoflavonas ocorreu na seguinte ordem: genisteína > daidzeína = genistina = biochanina A = daidzina > formononetina = ononina.

O centro ativo da atividade antioxidante das isoflavonas é o anel B, que é o responsável por sequestrar os radicais livres. Além disso, as isoflavonas possuem a habilidade de quelar metais dependendo da posição das hidroxilas fenólicas (ZHANG; WANGB; SUNC, 2003). Outro mecanismo que poderia explicar a atividade antioxidante das isoflavonas pode ser a capacidade de estabilizar as membranas celulares, distribuindo-se no seu interior hidrofóbico com diminuição drástica da fluidez dessa região, podendo impedir estericamente a difusão de radicais livres e diminuir a cinética das reações de oxidação (ARORA et al., 2000).

2.3 BIOCONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS

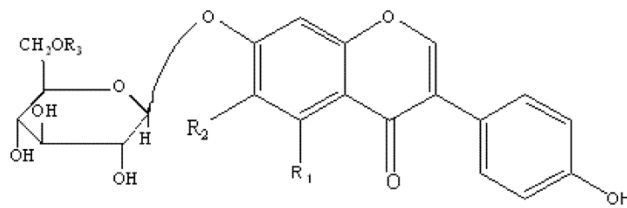
As isoflavonas podem ser convertidas em diferentes formas de conjugados com efeitos significativos na biodisponibilidade, sendo que as agliconas são absorvidas mais facilmente do que os conjugados glicosídicos devido o baixo peso molecular que melhora a difusão (XU et al., 2000). Assim, a conversão dos glicosídeos em agliconas é importante, uma vez que a biodisponibilidade e o metabolismo das isoflavonas estão fortemente ligados às suas estruturas moleculares (Figura 4) (HUBERT et al., 2008). Além disso as formas agliconas possuem maior atividade biológica (LIN; WEI; CHOU, 2006) e, portanto, produtos ricos em isoflavonas agliconas podem apresentar maior atividade antioxidante e conseqüentemente maior capacidade em diminuir o risco de doenças crônicas do que as formas glicosídicas (IZUMI et al., 2000).

Figura 4: Estruturas químicas das isoflavonas



Aglycones

R ₁	R ₂	Compounds
H	H	daidzein
OH	H	genistein
H	OCH ₃	glycitein



Glycosides

R ₁	R ₂	R ₃	Compounds
H	H	H	daidzin
OH	H	H	genistin
H	OCH ₃	H	glycitin
H	H	COCH ₃	6''-O-Acetyl daidzin
OH	H	COCH ₃	6''-O-Acetyl genistin
H	OCH ₃	COCH ₃	6''-O-Acetyl glycitin
H	H	COCH ₂ COOH	6''-O-malonyl daidzin
OH	H	COCH ₂ COOH	6''-O-malonyl genistin
H	OCH ₃	COCH ₂ COOH	6''-O-malonyl glycitin

Fonte: Liu (1997).

Assim, tem sido relatadas investigações sobre a conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas por hidrólise química ou fermentação microbiana. A conversão química pode ser alcançada usando uma base e um ácido. A ligação éster no grupo acetil e malonil do β -glicosídeo é hidrolisada utilizando uma base. Então, um ácido pode ser aplicado para hidrolisar as ligações entre a glicose e a isoflavonas para produzir agliconas. Esse processo químico é normalmente utilizado para análise de alimentos (PHAM; SHAH, 2009).

Chen e Wei (2008) estudaram o perfil de isoflavonas na soja e em diferentes produtos derivados de soja não fermentados como o extrato aquoso, tofu, e farelo de soja e fermentados como natto e sufu e verificaram que entre os não fermentados e soja, a concentração de isoflavonas variou entre 77,02 e 534,83 mg por 100 g e que as isoflavonas glicosídicas compreenderam entre 81 e 98% do total de isoflavonas. Para produtos fermentados as agliconas representavam entre 74 e 85% no sufu e 22-54% no natto. Este estudo confirmou que o conteúdo total de isoflavonas divergiu entre as variedades de soja e entre os produtos de soja, sendo que, em geral, os produtos fermentados de soja continham maiores teores de agliconas.

Dueñas et al. (2012) investigaram as modificações nos compostos fenólicos bioativos por fermentação com diferentes micro-organismos e concluíram que o processo de fermentação causou alterações significativas na composição fenólica de sementes de soja, afetando os benefícios biológicos associados a estes componentes. Estas alterações podem ser devido a produção de enzimas pelos micro-organismos utilizados no processo fermentação. Em geral, o processo de fermentação resultou em um aumento significativo nos níveis de ácidos fenólicos e flavonóides, principalmente isoflavonas agliconas. Entretanto, segundo Chen e Wei (2008) os produtos fermentados de soja apresentaram diferença na composição e teor de isoflavonas dependendo do processo de fermentação.

A atividade antioxidante de produtos fermentados de soja, tais como tempeh e natto, inoculados com *Rhizopus oligosporum* e *Bacillus natto*, respectivamente (WANG et al., 2006), ou com *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (OTIENO; ASHTON; SHAH, 2006) demonstrou ser significativamente maior do que nos produtos de soja não fermentados. Bordignon et al. (2004) também relataram que *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* são cepas que produziram alto teor de isoflavonas agliconas no extrato aquoso de soja fermentado.

O extrato aquoso de soja fermentado a 37 °C por 48 h com culturas mistas de diferentes *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* apresentou aumento no conteúdo de agliconas, sendo que esta quantidade de 36% para um valor acima de 90% das isoflavonas totais. Além disso, verificou-se que a combinação de *Lactobacillus casei* / *Bifidobacterium longum* apresentou o melhor potencial hidrolítico de isoflavona e maior atividade da β -glicosidase após 12 h de incubação

(CHEN; SU; WEI, 2010). Hubert et al. (2008) ao fermentarem o gérmen de soja com misturas de bactérias ácido lácticas, verificaram que após 48 h de incubação as isoflavonas agliconas representaram em média 71% das isoflavonas totais. Estes resultados enfatizam a importância do estudo de métodos de obtenção de formas agliconas a partir de formas glicosídicas pelo tratamento direto da β -glicosidase ou por processo fermentativo (OTIENO; ASHTON; SHAH, 2006).

As β -glicosidases formam uma classe de enzimas biologicamente importante que desempenha diversas funções. Em condições fisiológicas, geralmente, catalisam a hidrólise de ligações β -glicosídicas. Apresentam grande importância biotecnológica devido às possíveis aplicações, entre elas, a liberação de compostos fenólicos com atividade antioxidante a partir de resíduos vegetais (DAROIT, 2007). Podem ser utilizadas também para melhorar o sabor de sucos de frutas e vinhos pela liberação de compostos a partir dos precursores glucosídicos na sacarificação de celulose para a produção de glicose e obtenção de etanol (EYZAGUIRRE; HIDALGO; LESCHOT, 2005).

São encontradas naturalmente na soja ou são produzidas por micro-organismos inoculados para a obtenção de produtos fermentados, podendo hidrolisar as isoflavonas β -glicosídicas com produção de glicose e agliconas (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000; WANG; MURPHY, 1996).

A β -glicosidase esta inserida no grupo das celulasas, embora, não ataque a celulose diretamente. A β -glicosidase (β -D-glicosideo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) hidrolisa ligações β -glicosídicas entre dois resíduos de glicose ou entre um resíduo de glicose e uma aglicona. A especificidade da β -glicosidase para diferentes substratos varia dependendo de sua fonte. Esta enzima é amplamente distribuída na natureza e pode ser encontrada em animais, plantas, bactérias e fungos. As β -glicosidases possuem grande diversidade na especificidade de substrato e não é reconhecido um padrão definitivo, de tal forma que cada β -glicosidase deve ser analisada separadamente (EYZAGUIRRE; HIDALGO; LESCHOT, 2005).

A hidrólise enzimática para a conversão de forma β -glicosídica em aglicona pode ocorrer via tratamento direto com a enzima, por meio de fermentação bacteriana (DONKOR; SHAH, 2008; CHIEN; HUANG; CHOU, 2006) ou fúngica (PARK et al., 2001) e tratamento hidrotérmico em que a própria β -glicosidase da soja é responsável pela hidrólise (SUTIL, 2006).

O tratamento hidrotérmico a 60 °C por 60 min de grãos de soja aumentou consideravelmente o teor de isoflavonas agliconas, onde a genisteína de 1,2 mg/100g passou para 12 e 53 mg/100g, em duas variedades analisadas. Entretanto, em temperatura de 85 °C houve redução no teor das agliconas devido à inativação da enzima β -glicosidase (CARRAO-PANIZZI; GOES-FAVONI; KIKUCHI, 2004).

Em estudo realizado por Sutil (2006) verificou-se que a presença de β -glicosidase estava diretamente ligada ao aumento no teor de agliconas durante o tratamento hidrotérmico. A ação de β -glicosidase foi avaliada em farinha de soja hidratada em pH 6,0, na presença e ausência do inibidor glucona- δ -lactona. Nas farinhas sem o inibidor o teor de agliconas, após 16 h de incubação, foi de 54,27% superior ao teor de agliconas quando se utilizou o inibidor.

Hsieh e Graham (2001) estudaram a β -glicosidase das raízes da soja germinada e verificaram que as condições ótimas de pH e temperatura foram de 6,0 e 30 °C, respectivamente. Em adição, demonstram que esta enzima está envolvida na liberação de daidzeína e genisteína, as quais desempenham um papel central na defesa de soja durante o ataque de patógenos.

A especificidade da β -glicosidase para diferentes substratos varia dependendo da sua fonte (animal, planta, bactéria ou fungos). E devido o seu potencial biotecnológico, as β -glicosidases de várias fontes, particularmente bactérias e fungos tem sido purificadas e caracterizadas (EYZAGUIRRE; HIDALGO; LESCHOT, 2005). Langston, Sheehy e Xu (2006) relataram que entre as várias β -glicosidases, as de fonte microbiana atraem cada vez mais atenção por seu potencial de aplicação industrial. Em geral, a β -glicosidase microbiana tem vantagem sobre a de plantas e animais uma vez que sua produção, por meio de processo fermentativo, pode ser em grande escala e menor custo. As β -glicosidases fúngicas apresentaram diferenças nas propriedades como tamanho, especificidade de substrato, resistência a inibidores e estabilidade e atividade em diferentes pHs e temperaturas (EYZAGUIRRE; HIDALGO; LESCHOT, 2005).

A produção de enzima com atividade de β -glicosidase por microorganismos depende de diversos fatores como: tempo de incubação, presença de compostos indutores no meio e um nível intracelular adequado de nutrientes e minerais (PALMA-FERNANDEZ; GOMES; DA SILVA, 2002). Otieno, Ashton e Shah (2006) ressaltaram que a capacidade de hidrólise de isoflavonas β -glicosídicas varia

entre os micro-organismos, levando a variação nas concentrações e perfil das isoflavonas.

Um grande número de micro-organismos, particularmente os fungos, são intensivamente estudados por produzirem β -glicosidase durante seu crescimento sob diferentes substratos, até mesmo em materiais sólidos naturais provenientes da agroindústria (JABASINGH; VALLINACHIYAR, 2010), contudo as espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos mais promissores para a produção desta enzima (SOLOVYEVA et al., 1997). *Aspergillus oryzae* é um fungo muito utilizado em indústrias de fermentação no Japão na produção de molho de soja, saquê, temperos e vinagre. É conhecido por apresentar grande potencial de produção de várias enzimas, sendo, portanto, utilizado na produção de enzimas industriais na área da biotecnologia moderna (MACHIDA; YAMADA; GOMI, 2008).

Park et al. (2001) observaram que o *Aspergillus oryzae*, devido a atividade de β -glicosidase, produziu alta taxa de conversão de isoflavonas glicosídicas de farinha desengordurada de soja em agliconas que, por sua vez, mostraram elevada atividade antioxidante. Em outro trabalho, Horii et al. (2009) demonstraram que a β -glicosidase pode ser produzida por *Aspergillus oryzae* recombinante e que a enzima foi eficaz na obtenção de isoflavonas agliconas. Aguiar e Park (2004) também converteram as isoflavonas glicosídicas nas formas daidzeína e genisteína via fermentação semissólida utilizando o *Aspergillus oryzae*, em substrato de farelo de soja e temperatura de 30 °C por 48 h obtendo 100% da bioconversão.

Dueñas et al. (2012) obtiveram maior teor de isoflavonas agliconas após fermentação semissólida da farinha de soja com *Aspergillus oryzae* por 48h. Este aumento no teor de agliconas após o processo de fermentação foi associado à diminuição das isoflavonas glicosídicas devido à atividade de β -glicosidase produzida pelo fungo. O koji de soja preta teve o conteúdo de isoflavonas agliconas aumentado 5,3 vezes com a fermentação com *Aspergillus oryzae*, passando de 56 $\mu\text{g g}^{-1}$ para 297 $\mu\text{g g}^{-1}$ (LEE; CHOU, 2006). A FES de farinha de soja integral com *Aspergillus oryzae* resultou em aumento de isoflavonas agliconas correspondendo à 75,51% do total de isoflavonas que predominaram após 48 h de fermentação, enquanto que no controle e na farinha representavam 6,94 e 2,67%, respectivamente (SILVA; CELEGHINI; CHANG, 2011).

Lim et al. (2010) estudaram a composição de isoflavavonas agliconas de extrato aquoso de soja obtido a partir de soja fermentada com *Monascus sp.* e verificaram que após 21 dias de incubação a maioria das isoflavonas foram convertidas em seus correspondentes agliconas. Ainda, observaram que a homogeneização e a pasteurização não causaram mudanças significativas na composição das isoflavonas durante a produção do extrato aquoso de soja fermentada com *Monascus sp.* que também apresentou maior atividade antioxidante com relação ao controle.

Daroit et al. (2007) investigaram a produção de β -glicosidase extracelular por *Monascus purpureus* em cultivo submerso com diversos substratos e verificaram que a combinação de resíduo de uva com peptona resultou em maior produção da enzima (1,68 U/mL). Entretanto, o farelo de soja adicionado de peptona apresentou uma boa produção de β -glicosidase (1,10 U/mL). Além disso, observaram que a produção da enzima parece ser induzível e controlada por repressão catabólica (glicose) e que a β -glicosidase obtida apresentou ampla especificidade hidrolisando grande variedade de substratos. Em adição, os autores ressaltaram a importância do fungo *Monascus* como micro-organismo seguro já utilizado na produção de pigmentos culinários com potencial substituição de pigmentos sintéticos.

O *Monascus purpureus* é um fungo utilizado tradicionalmente no leste asiático para a produção de alimentos fermentados e obtenção de produtos secundários que são utilizados como pigmento alimentar ou agente biológico (LEE; YANG; MAU, 2008). A fermentação em estado sólido não permite o controle dos parâmetros ambientais, mesmo assim, esse fungo normalmente é cultivado em meios sólidos, como por exemplo, grãos de arroz e pão (BLANC, 1998; DUFOSSÉ et al., 2005; HAJJAJ et al., 2000).

2.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação é amplamente utilizada na indústria de alimentos para melhorar as características sensoriais de um produto, eliminar certos componentes indesejáveis, tornar os nutrientes mais acessíveis, preservando e até mesmo melhorando as propriedades nutricionais (HUBERT et al., 2008). É um dos métodos de processamento de alimento mais antigo e econômico que leva

frequentemente a uma melhoria no valor nutritivo pelo bio-enriquecimento (SANNI et al., 1999).

O processo de fermentação pode ser dividido em dois sistemas: fermentação submersa (FS), em que o micro-organismo é cultivado em meio líquido e fermentação em estado sólido (FES) no qual os micro-organismos são cultivados nas superfícies de materiais sólidos com limitada quantidade de água. Os meios de cultivo devem ser favoráveis e conter todos os nutrientes necessários para a síntese celular e formação do produto desejado (WARD, 1991). A FES tem emergido como uma tecnologia potencial para a produção de produtos microbianos, tais como ração, combustível, alimentos, produtos químicos e farmacêuticos, com destaque para a produção de enzimas fúngicas (PANDEY, 2003). Segundo Bhargav (2008), a produção de enzimas é uma das mais importantes aplicações da FES que possui vantagens sobre fermentação submersa, tais como elevada produtividade, baixo custo dos equipamentos envolvidos, melhor rendimento do produto, menor geração de lixo e menos tempo consumidos no processo (PANDEY, 2003; EMBRAPA, 2009). As principais dificuldades são o acúmulo de calor, contaminação bacteriana e dificuldade de controlar o nível de umidade (WARD, 1991).

A soja é uma matéria-prima de custo acessível e apresenta em sua composição proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, polissacarídeos, lecitina, dentre outros que constituem como excelente meio nutritivo para o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos em processos de FES (MONTOVANI, 2010).

Em geral, produtos compostos e heterogêneos da agricultura ou subprodutos da agroindústria são substratos para FES que são as fontes de carbono e energia (açúcares, lipídeos, ácidos orgânicos). Esta estrutura macromolecular básica (celulose, amido, pectina lignocelulose, fibras etc) confere as propriedades de um sólido ao substrato que pode ser suplementado com nutrientes (nitrogênio, fósforo, sais) e ter definindo o teor de umidade e pH iniciais (RAIMBAULT, 1998). Dessa forma, a utilização de resíduos agroindustriais como substratos em processos de FES constitui uma via alternativa e de agregação de valor a estes resíduos os quais, de outro modo, seriam sub ou não utilizados (PANDEY, 2003). Sendo assim, a FES desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos visando a síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande

interesse industrial, sendo aplicada na produção de alimentos, biopesticidas e substâncias químicas diversas (DANTAS; AQUINO, 2010).

As bactérias, leveduras e fungos podem crescer em substratos sólidos, e encontram aplicação em processos de FES. No entanto, os fungos filamentosos são os mais adaptados para esse tipo de fermentação devido à suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. A estrutura de hifas dos fungos e sua boa tolerância à baixa atividade de água (a_w) e alta pressão osmótica os tornam eficientes e competitivos por recursos naturais para a bioconversão de substratos sólidos. As enzimas hidrolíticas são excretadas na ponta das hifas, o que aumenta a sua ação hidrolítica e permite a penetração no substrato deixando-as mais eficientes. Essa penetração aumenta a acessibilidade aos nutrientes disponíveis dentro de partículas (RAIMBAULT, 1998).

Na FES com fungos filamentosos, o aumento da área de contato e a manutenção de uma textura firme e manejável podem influenciar diretamente a velocidade de germinação dos esporos inoculados, a taxa de crescimento e a síntese de enzimas extracelulares e outros metabólitos secundários (SANTOS et al., 2006).

Para adequação do substrato às condições necessárias ao crescimento e à produção de metabólitos pelo micro-organismo alguns pré-tratamentos são utilizados para a realização do processo de FES, tais como: esmagamento, quebra, moagem e peneiramento visando a adequação da granulometria; suplementação de nutrientes e correção de pH; tratamento térmico para pré-degradação da estrutura macromolecular, adição de água para regular o teor e umidade inicial do processo e esterilização visando diminuir ou eliminar possíveis contaminações (RAIMBAULT, 1998; SCHMIDELL et al., 2001). O processo de FES compreende essencialmente as operações unitárias: preparação do substrato, preparação do inóculo, fermentação, separação e purificação dos produtos que se deseja (SANTOS et al., 2006).

As condições operacionais como temperatura, pH e teor de umidade são muito importantes para o crescimento microbiano e para produção de um sistema enzimático eficiente durante a FES (WEN; LIAO; CHEN, 2005). Qian et al. (2012) verificaram que a produção de enzima com atividade de β -glicosidase pode ser influenciada pelo meio e condições de fermentação, tais como: pH inicial e umidade do substrato, temperatura e tempo de incubação.

O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia a FES. Sendo que o grau de umidade do substrato é determinado por sua natureza, pelas necessidades do micro-organismo utilizado e o tipo de produto que se deseja obter (PARIS, 2008). Diferentes fungos requerem diferentes teores de umidade ótima e essa característica também varia de acordo com a natureza do substrato (GOWTHAMANA; CHUNDAKKADU; MOO-YOUN, 2001). Além disso, a produção de metabólitos secundários, como enzimas, depende da atividade de água, pois se verificou que existe uma relação direta entre a quantidade de enzima produzida e atividade de água (BHARGAV et al., 2008). Desse modo, o preparo e a seleção do substrato devem considerar os níveis de atividade de água e umidade ideais, que podem ser alcançadas por adição de água ou solução de nutrientes ao meio (SANTOS, 2007).

A temperatura também afeta o desempenho da FES, pois o crescimento e produção de enzimas ou metabólitos são geralmente sensíveis a este fator. Apesar dos fungos terem a capacidade de crescer em ampla faixa de temperatura, a temperatura ótima para o crescimento pode ser diferente daquela para a formação do produto (YADAV, 1988).

O pH é outro fator importante para o cultivo em FES e pode variar em resposta as atividades metabólicas, por meio da secreção de ácidos orgânicos que promove a redução de pH. Por outro lado, a assimilação destes ácidos presentes em alguns meios ou a hidrólise de uréia resulta na alcalinização do meio (RAIMBAULT, 1998). O controle do pH em FES é praticamente impossível devido à heterogeneidade e consistência do material e a falta de equipamentos adequados para determinar o pH em materiais sólidos (LONSANE et al., 1992).

A eficiência do processo de FES depende dos efeitos das variáveis como pré-tratamento, tamanho das partículas do substrato, suplementação do meio, esterilização, teor de umidade, atividade de água, quantidade de inóculo, temperatura, pH, agitação e aeração (MARTINS et al., 2011). A produção de enzima fúngica com atividade de β -glicosidase por meio de FES pode ser influenciada pelas condições de pH inicial e umidade do substrato, temperatura e tempo de incubação (QIAN et al., 2012). Entretanto, para aumentar o rendimento do processo de FES é importante otimizar as condições de fermentação estabelecendo adequadamente os parâmetros físicos e químicos (FRANCIS et al., 2003). Assim, o uso de ferramentas estatísticas como planejamentos experimentais adequados possibilita melhorar os

processos de fermentação investigando as possíveis combinações entre os fatores, para compreender melhor os mecanismos detalhados de alguns sistemas complexos e as interações de múltiplos fatores. Um planejamento adequado pode, ainda, reduzir o tempo de análise e dos custos envolvidos (SEN; SWAMINATHAN, 1997).

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que é utilizada quando se tem mais de duas variáveis independentes (fatores) e permite a combinação de todas as variáveis em todos os níveis para medir os efeitos das variáveis na resposta de um processo. O planejamento fatorial com dois níveis supõe uma linearidade nos efeitos dos fatores, quando os termos de interação entre os fatores são adicionados, o modelo é capaz de representar alguma torção existente no plano e dependendo da curvatura desse plano, um modelo quadrático deve ser proposto e denominado de modelo de superfície de resposta de segunda ordem (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Assim, quando a curvatura é importante, os valores independentes dos parâmetros quadráticos devem ser determinados adicionando-se mais pontos, aumentando-se o planejamento com pontos axiais (HAIR et al., 2006). Esse planejamento é chamado composto central, no qual devem ser especificados a distância α a partir do centro do planejamento até os pontos axiais e o número de pontos centrais. O α é denominado de rotabilidade, é importante para o modelo de segunda ordem fornecer previsões através da região de interesse que tenham uma variância razoavelmente consistente e estável nos pontos de interesse das variáveis independentes (CALADO; MONTGOMERY, 2003). O modelo quadrático é utilizado quando se deseja otimizar um processo e inclui os efeitos principais, interação e quadráticos (HAIR et al., 2006).

Assim, a ferramenta de planejamento experimental e análise de superfície de resposta foi aplicada nesta investigação pois fornece uma relação funcional existente entre a resposta e os fatores, sendo possível investigar a influência de determinadas variáveis em um processo e a forma de interação entre as mesmas, bem como obter o valor das variáveis que maximizem os resultados esperados.

3 OBJETIVO

Investigar os parâmetros do processo de FES da farinha de soja desengordurada com *Aspergillus oryzae* ou *Monascus purpureus* aplicando o planejamento fatorial composto central rotacional para produção de enzima com atividade de β -glicosidase e avaliar a bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Para FES foi utilizada como substrato a farinha de soja desengordurada (FSD) da Indústria Brasil Foods (Curitiba, Paraná) que apresentou a seguinte composição química: 8,95% de umidade; 1,07% de lipídeos, 48,96% de proteínas (N x 6,25), 5,98% de cinzas e 35,04% de carboidratos por diferença. O fungo *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 foi cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, RJ) e o fungo *Monascus purpureus* NRRL 1992 (GenBank: JQ614061.1) foi proveniente do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) foram utilizados os seguintes padrões de isoflavonas (β -glicosídeos, malonil conjugados, acetil conjugados e agliconas) e para determinação da atividade de β -glicosidase foi utilizado o substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG), ambos adquiridos da Sigma Chemical (San Louis, USA). Os solventes utilizados para a extração das isoflavonas foram de grau analítico e para quantificação por CLUE, de grau cromatográfico. Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

4.2 MÉTODOS

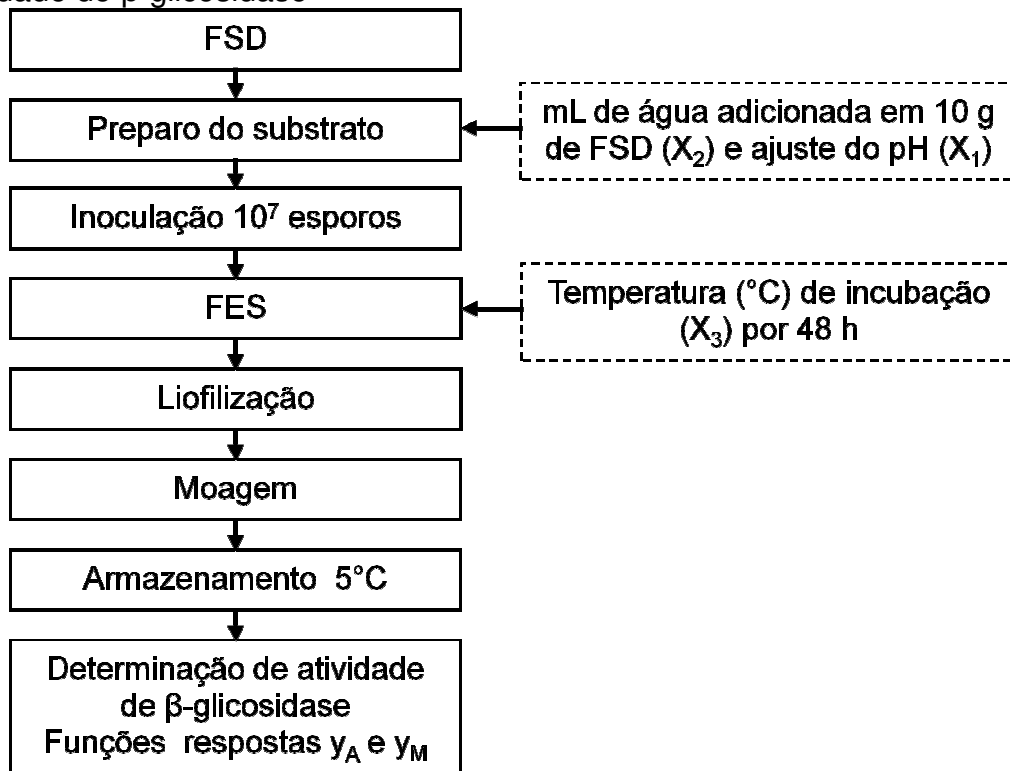
4.2.1 Reativação dos Micro-organismos e Obtenção da Suspensão de Esporos

Os fungos *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 congelados foram colocados a temperatura ambiente, ativados em caldo *sabouraud* e incubados a 30 °C por sete dias. Em seguida, foram repicados em meio batata dextrose agar (BDA) inclinado e incubados nas mesmas condições para posteriormente serem utilizados no processo de fermentação. Após a adição de 5 mL de solução tween 20 à 2% aos tubos, os esporos da superfície do meio foram suspensos com auxílio de bastão de vidro. A suspensão obtida foi diluída 1:10 (v/v) para a contagem dos esporos utilizando a câmara de Neubauer.

4.2.2 FES da FSD

As fermentações das FSD foram conduzidas em separado utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 conforme procedimento descrito por Georgetti et al. (2009) com algumas modificações (Figura 5). Assim, para cada ensaio de fermentação foi utilizado 10 g de FSD e o pH (X_1) ajustado conforme a tabela 1 do planejamento composto central rotacional (PCCR). A quantidade de água adicionada a FSD (X_2) do PCCR (Tabela 1) para a FES foi previamente preparada utilizando água destilada cujo pH foi ajustado com adição de alíquotas de ácido clorídrico 1 M ou carbonato de sódio 1 M de tal forma que quando adicionada na FSD o pH (X_1) seria igual ao estabelecido na tabela 1. Após a homogeneização das amostras, distribuição uniforme em frascos de erlenmeyers de 250 mL e esterilização em autoclave a 121 °C por 15 min foram mantidos em temperatura ambiente. Uma suspensão contendo 10^7 esporos foi espalhada uniformemente sobre a superfície de cada amostra e incubada por 48 h em diferentes temperaturas de incubação (X_3) conforme o PCCR (Tabela 1). Após a incubação, as FSD devidamente fermentadas foram congeladas, liofilizadas, moídas e armazenadas à 5 °C até o momento das análises (Figura 5). Para cada ensaio realizado, foi preparado um controle contendo FSD sem adição da suspensão de esporos dos fungos e utilizadas para acompanhamento da produção de enzima fúngica com atividade de β -glicosidase.

Figura 5- Fluxograma do processo de FES das FSD utilizando *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 para produção da enzima com atividade de β -glicosidase



Onde: y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g^{-1} de amostra e y_M = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 g^{-1} de amostra.

4.2.3 Planejamento Fatorial Composto Central Rotacional (PCCR)

Para avaliar os efeitos das condições de fermentação das FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 sobre a produção de enzima com atividade de β -glicosidase fúngica foi aplicado o PCCR com três fatores e repetições no ponto central. As variáveis independentes investigadas foram: X_1 (pH inicial da FSD), X_2 (mL de água adicionada em 10 g de FSD) e X_3 ($^{\circ}C$ de incubação). A tabela 1 apresenta as variáveis independentes codificadas e não codificadas com os níveis de variação. Cada variável apresentou cinco níveis de variação que foram estabelecidos conforme ensaios preliminares. O PCCR foi realizado em 2 blocos (Tabela 2), sendo que para a modelagem exploratória foi realizado o bloco 1 com 11 ensaios aleatórios (9 pontos fatoriais e 3 pontos centrais) e para a modelagem de otimização foi realizado o bloco 2 com 9

ensaios aleatórios (6 pontos axiais e 3 pontos centrais), totalizando assim, 20 ensaios nos dois blocos.

Tabela 1 – Variáveis independentes e níveis de variação do PCCR

Variáveis independentes	Níveis de variação				
	-1,68	-1	0	1	1,68
X ₁ (pH inicial da FSD)	5,2	5,5	6	6,5	6,8
X ₂ (mL de água adicionada à FSD)	2	5	10	15	18
X ₃ (temperatura (°C) de incubação)	13	20	30	40	47

Tabela 2 - Planejamento fatorial central composto rotacional para fermentação das FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992.

Ensaio	(x₁) X₁	(x₂) X₂	(x₃) X₃
1	-1(5,5)	-1(5)	-1(20)
2	-1(5,5)	-1(5)	+1(40)
3	-1(5,5)	+1(15)	-1(20)
4	-1(5,5)	+1(15)	+1(40)
5	+1(6,5)	-1(5)	-1(20)
6	+1(6,5)	-1(5)	+1(40)
7	+1(6,5)	+1(15)	-1(20)
8	+1(6,5)	+1(15)	+1(40)
9	0(6,0)	0(10)	0(30)
10	0(6,0)	0(10)	0(30)
11	0(6,0)	0(10)	0(30)
12	-1,68(5,2)	0(10)	0(30)
13	+1,68(6,8)	0(10)	0(30)
14	0(6,0)	-1,68(2)	0(30)
15	0(6,0)	+1,68(18)	0(30)
16	0(6,0)	0(10)	-1,68(13)
17	0(6,0)	0(10)	+1,68(47)
18	0(6,0)	0(10)	0(30)
19	0(6,0)	0(10)	0(30)
20	0(6,0)	0(10)	0(30)

Onde: X₁ (pH inicial da FSD) ; X₂ (mL de água adicionada à FSD) e X₃ (°C de incubação).

Na FES das FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 a produção de enzima com atividades de β -glicosidases fúngicas foram avaliadas pelas funções respostas: Y_A ou Y_M (Y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g⁻¹ de

amostra e $Y_M = \text{UA de } \beta\text{-glicosidase de FSD fermentada com } \textit{Monascus purpureus}$ NRRL 1992 g^{-1} de amostra), conforme o modelo da equação 1: $Y = \beta_0 + B_j + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + e$; onde: Y (função resposta); x_1 , x_2 e x_3 (variáveis codificadas); β (coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta); β_j (coeficiente estimado do bloco para o modelo de superfície resposta); e (erro puro).

A partir das avaliações das funções respostas (Y_A ou Y_M) foram realizadas as análises de regressão para avaliar os efeitos das variáveis independentes (X_1 , X_2 e X_3) e suas interações. A análise de variância (ANOVA) da regressão e coeficiente de determinação (R^2) foram realizados para verificar o ajuste do modelo aos dados experimentais. Os gráficos de superfície de resposta e parâmetros de desejabilidade foram gerados para cada função resposta (Y_A ou Y_M) para avaliar as condições de produção de enzima com máxima atividade de β -glicosidase na fermentação das FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992. Todos os cálculos, construção dos gráficos das superfícies de resposta ou curvas de contorno e desejabilidade foram realizados utilizando o programa STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc, 2007).

4.2.4 Validação do Modelo

A partir da observação dos gráficos de superfícies de respostas ou curvas de contorno da região de máxima atividade de β -glicosidase e desejabilidade, o modelo proposto foi validado realizando novos ensaios em triplicata. Os resultados obtidos ($Y_{\text{exp.}}$) foram comparados com a resposta estimada utilizando o teste t-Student ($p < 0,05$).

4.2.5 Bioconversão de Isoflavonas Glicosídicas em Agliconas das FSD Fermentadas com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992

A bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas foi avaliada a partir das FSD fermentadas com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 nas condições de máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase por meio de quantificação das diferentes formas de isoflavonas por

cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Para acompanhar a bioconversão na fermentação das FSD com os dois fungos foram utilizados controles passando por todas as etapas da fermentação, exceto a adição da suspensão de esporos dos fungos. Os teores das diferentes formas de isoflavonas das FSD fermentadas com diferentes fungos e controles foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.6 Extração e Determinação da Atividade de β -glicosidase

A extração da enzima β -glicosidase produzida por *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 foi conduzida segundo a metodologia descrita por Carrão-Panizzi e Bordignon (2000). Neste procedimento, a extração foi realizada com 1 g da amostra liofilizada e moída e 15 mL de tampão fosfato citrato 0,05 M contendo 0,1 M de cloreto de sódio e pH 4,5, seguidos de agitação a cada 15 min por 1 h à temperatura ambiente. Após a centrifugação (Centrifuge 5804R – Eppendorf, Hamburg, GE) por 15 min a $2500 \times g$ e 5°C , o sobrenadante foi utilizado como extrato bruto para quantificação da atividade de β -Glicosidase.

Para determinação da atividade da β -glicosidase foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) em concentração de 1 mM conforme Matsuura e Obata (1993). Nesta determinação foi utilizado 2 mL de substrato (*p*-NPG 1 mM em tampão citrato fosfato 0,1 M e pH 5,0) mantido a 30°C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL do extrato e a mistura incubada à 30°C por 30 min. A reação foi interrompida com adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M. A absorbância da solução de cor amarela foi medida em espectrofotômetro (Biochrom®, Cambridge, Reino Unido) a 420 nm. Uma unidade de atividade (UA) de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima que liberou $1\mu\text{mol}$ de *p*-nitrofenol (*p*-NP) por min nas condições do ensaio. A atividade da β -glicosidase foi expressa como UA de β -glicosidase de FSD fermentada e não fermentada g^{-1} de amostra liofilizada. O teor de umidade das FSD fermentadas e não fermentadas foi estimado pela diferença de pesagem antes e após a liofilização. As funções respostas (Y_A ou Y_M) foram expressas pela diferença entre UA de β -glicosidase de FSD fermentada e UA de β -glicosidase de FSD não fermentada (controle).

4.2.7 Quantificação de Isoflavonas por CLUE

As FSD fermentadas, controles e FSD foram liofilizados, moídos, desengordurados com hexano (1:10, m/v) por 30 min à temperatura ambiente com agitação rotativa contínua e filtradas à vácuo. A extração de isoflavonas foi realizada com uma mistura de solventes orgânicos contendo água ultra pura, acetona e etanol (1:1:1, v/v/v), conforme descrito por Yoshiara et al. (2012) A extração foi realizada em triplicata utilizando 0,3 g de FSD fermentada e não fermentada (controle) com 6 mL de solvente extrator e agitação em vortex a cada 15 min por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram colocadas em banho ultrassônico por 15 min à temperatura ambiente, centrifugadas ($2500 \times g$ à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e 15 min) (Centrifuge 5804R – Eppendorf, Hamburg, GE) e filtradas (Millex filter - LH ($0,22 \mu\text{m}$)). Aliquotas de $1,4 \mu\text{L}$ em triplicata do filtrado foram injetadas automaticamente no cromatógrafo líquido UPLC® Waters. A coluna foi de fase reversa (modelo ACQUITY – UPLC BEH C18, Waters) com dimensão de $2,1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ e tamanho da partícula de $1,7 \mu\text{m}$. A eluição foi realizada com gradiente não linear, utilizando fase móvel A água acidificada em pH 3,0 ajustado com ácido acético glacial e B acetonitrila com fluxo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. O gradiente foi iniciado com 90% de eluente A e 10% de eluente B e em 8 min de eluição, o gradiente atingiu proporção de 0% de A e 100% de B e as condições iniciais retornaram em 9 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. O detector foi de arranjo de diodos (Waters) com comprimento de onda ajustado para 260 nm. As soluções padrão para a construção das curvas de calibração (área do pico x teor de isoflavonas) foram daidzina, genistina, glicitina, malonil daidzina, malonil genistina, malonil glicitina, acetil daidzina, acetil genistina, acetil glicitina, gliciteína e genisteína ($0,1$; $0,025$; $0,006$ e $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$) e daidzeína ($0,1$; $0,025$; $0,006$; $0,002$ e $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$). Os padrões em triplicata foram injetados originando os cromatogramas correspondentes a cada forma química de isoflavonas com respectivos tempos de retenção. Os picos de cada forma de isoflavona foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros na região do UV dos respectivos padrões de referência. O aplicativo acoplado no cromatógrafo gerou as curvas de calibração e as concentrações de isoflavonas foram calculadas e expressas em μg de isoflavona por g de amostra (FSD; controle e FSD fermentada) liofilizada.

4.2.8 Composição química da FSD

Foi determinado o teor de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos por diferença da FSD segundo metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

Todos os resultados provenientes deste trabalho são apresentados no apêndice da presente Dissertação.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. C.; PARK, Y. K. Conversão de daidzina e genistina de soja por β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*. **Boletim do CEPPA**, v. 22, n.1, p.183-195, jan/jun, 2004.
- ARDITI, T.; MERDITH, T.; FLOWERMAN, P. Renewed interest in soy isoflavones and saponins. **Cereal Foods World**, n. 45, p. 414-417, 2000.
- ARORA, A.; BYREM, T. M.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 102–109, 2000.
- ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 356, n. 2, p. 133-141, 1998.
- BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, M. F.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 921-926, out.-dez. 2006.
- BARNES, S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. **Lymphatic Research and Biology**, v. 8, p. 89–98, 2010.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state Fermentation: An Overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 49–70, 2008.
- BLANC, P. Les pigments rouges de *Monascus*. **Biofutur**, v.183, p. 34-36, 1998.
- BONATO, E.R.; BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1987, 61p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 21).
- BORDIGNON, J. R.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; NIKKUMI, S. Hydrolysis of isoflavones and consumption of oligosaccharides during lactic acid fermentation of soybean milk. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 38, p. 259–265, 2004.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2003, 260p.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDIGNON, J.R. Activity of β -glicosidase e níveis de isoflavonas glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 873-878, mai. 2000.
- CARRAO-PANIZZI, M. C.; GOES-FAVONI, S. P.; KIKUCHI, A. Hydrothermal treatments in the development of isoflavone aglycones in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) grains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.2, p. 225-232, 2004.

- CHEN, T. R.; SU, R. Q.; WEI, Q. K. Hydrolysis of isoflavone phytoestrogens in Soymilk fermented by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* cocultures. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p.1–12, 2010.
- CHEN, T. R.; WEI, Q. K. Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soybean and soybean products. **Nutrition & Food Science**, v. 38, n. 6, p. 540 – 547, 2008.
- CHIEN, H.L.; HUANG, H.Y.; CHOU, C.C. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 23, p. 772–778, 2006.
- CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M.F.P.; MANDARINO, J.M.G.; TARONE, A.G. Avaliações químicas e bioquímicas de grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. **Ciência Agrotécnica**, v. 30, n. 5, p. 920-929, 2006
- COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, n. 6, p. 1486S-1491S, 1998.
- CZAIKOSKIA, K.; LEITE, R. S.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SILVA, J. B. da S.; IDA, E. I. Canning of vegetable-type soybean in acidified brine: Effect of the addition of sucrose and pasteurisation time on color and other characteristics. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 472-476, 2013.
- DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.1, p.81-87, 2010.
- DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus***. 2007. 137 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- DAROIT, D.; SILVEIRA, S. T.; HERTZ, P. F.; BRANDELLI, A. Production of extracellular β -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 904–908, 2007.
- DONKOR N.P.; SHAH. Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. **Journal of Food Science**, v. 73, n.1, 2008.
- DUEÑAS, M.; HERNÁNDEZ, T.; ROBREDO, S.; LAMPARSKI, G.; ESTRELLA, L.; MUÑOZ, R. Bioactive phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit): modifications by different microbiological fermentations. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**. v. 62, n. 4, p. 241-250, 2012.
- DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTH K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 389-406, 2005.

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa Instrumentação Agropecuária**. Automação de reatores de fermentação sólida para produção de enzimas, 2009.

EYZAGUIRRE, J.; HIDALGO, M.; LESCHOT, A. **Glucosidases from filamentous fungi: properties, structure, and applications**. Handbook of Carbohydrate Engineering. Taylor & Francis Group, LLC, 2005.

FERRARI, R. A.; DEMIATE, I. M. Isoflavonas de soja – Uma breve revisão. **Biological and Health Sciences**, v. 7, p. 39-46, 2001.

FORKMANN, G.; MARTENS, S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, p. 155–160, 2001.

FRANCIS, F.; SABU, A. K.; NAMPOOTHIRI, M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, p. 107–115, 2003.

FRITZ, K. L.; SEPPANEN, C. M.; KURZER, M. S.; CSALLANY, A. S. The in vivo antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. **Nutrition Research**, v.23, p.479–487, 2003.

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.

GEORGETTI, S.R.; VICENTINI, F.T.M.C.; YOKOYAMA, C.Y.; BORIN, M.F.; SPADARO, A.C.C.; FONSECA, M.J.V. Enhanced *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.459-466, 2009.

GOLBITZ, P.; JORDAN, J. Soyfoods: Market and Products. In: RIAZ, Mian N. **Soy applications in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. p. 1-22.

GOWTHAMAM, M.K; KRISHNA, C.; MOO- YOUNG, M. Fungal solid state fermentation - An overview. In: KHACHATOURIANS, G. G.; ARORA, D. K. (Ed.) **Applied Mycology and Biotechnology**. The Netherlands: Elsevier, 2001. p. 305-352.

HAIR, J. F.; BLACK, B.; BABIN, B.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Multivariate Data Analysis**. 6 ed., Prentice Hall, 2006.

HAJJAJ, H.; BLANC, P.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G. LOUBIERE, P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 619–625, 2000.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HETTIRACHCHY, N., KALAPATH, U. Soybean Protein Products. In LIU, K. **Soybeans chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997. 532 p.

HORII, K.; ADACHI, T.; MATSUDA, T.; TANAKA, T.; SAHARA, H.; SHIBASAKI, S.; OGINO, C.; HATA, YOJI.; UEDA, M.; KONDO, A. Improvement of isoflavone aglycones production using β -glucosidase secretory produced in recombinant *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2009. doi:10.1016/j.molcatb.2008.11.013.

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v. 58, p. 995–1005, 2001.

HUBERT, J; BERGER, M.; NEPVEU, F.; PAUL, F.; DAYDE, JEAN. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. **Food Chemistry**, v. 109, p. 709–721, 2008.

JABASINGH, S. A.; VALLINACHIYAR, C. Optimization of cellulase production by *Aspergillus nidulans*: application in the biosoftening of cotton fibers. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 85-97, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 5. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISMAIL, B.; HAYES, K. β -glycosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4918–4924, 2005.

IZUMI, T.; PISKULA, M.K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1695-1699, 2000.

LANGSTON, J.; SHEEHY, N.; XU, F. Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3 β -glucosidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1764, p. 972-978, 2006.

LEE , I-HSIN; CHOU, CHENG-CHUN. Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1309-1314, 2006.

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.

LEE, YU-LING; YANG, JOAN-HWA; MAU, JENG-LEUN. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1128–1137, 2008.

LIM, JEE-YEON; KIM, J. J.; LEE, D. S.; KIM, G. H.; SHIM, J. Y.; LEE, I.; IMM, JEE-YOUNG. Physicochemical characteristics and production of whole soymilk from *Monascus* fermented soybeans. **Food Chemistry**, v. 120, p. 255–260, 2010.

LIN, C.H.; WEI, Y.T.; CHOU, C.C. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. **Food Microbiology**, v. 23, p. 628–633, 2006.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. IPT., 1997.

LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; GHILDYAL, N.P.; RAMAKRISHNA, M. E KRISHNAIAH, M. M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 259-273, 1992.

MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. **DNA Research**, v. 15, p. 173–183, 2008.

MAGEE, P. J.; ROWLAND, I. R. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 513–53, 2004.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal Food Science**, v.58, n.1, p. 144-147, 1993.

MCCUE, P.; SHETTY, K. Health Benefits of Soy Isoflavonoids and Strategies for Enhancement: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p. 361–367, 2004.

MESSINA, M. Soy in the prevention and treatment of chronic diseases: a short review of literature. **ASA Technical Bulletin**, v. HN35, p. 1- 19, 2002.

MONTOVANI, D. **Bioconversão de isoflavonas glicosídicas em isoflavonas agliconas do melaço de soja**. 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

MURPHY, P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. **Food Technology**, v.36, p.60-64, 1982.

- NEWELL-MCGLOUGHLIN, M. Impacto da biotecnologia sobre suprimento e qualidade dos alimentos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 819-858.
- OTIENO, D.O.; ASHTON, J.F.; SHAH, N.P. Evaluation of enzymic for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 39, p. 394–407, 2006.
- PALMA-FERNANDEZ, E. R. D.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Purification and characterization of two β -glucosidase from thermophilic fungus *Thermophilicus aurantiacus miehe*. **Folia Microbiologica**, v. 47, n. 6, p. 685-690, 2002.
- PAN, Z.; TANGRATANAVALEE, W. Characteristics of soybeans as affected by soaking conditions. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 36, p. 143-151, 2003.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003.
- PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.
- PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 12-14, 2001.
- PHAM, T. T.; SHAH, N. P. Hydrolysis of isoflavone glycosides in soy milk by β -galactosidase and β -glucosidase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, p.38–60, 2009.
- PYO, Y. H.; LEE, T. C.; LEE, Y. C. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 38, p. 551-559, 2005.
- QIAN, LI-CHUN; FU, SHI-JUN; ZHOU, HONG-ME; SUN, JIAN-YI; WENG, XIAO-YAN. Optimization of fermentation parameters for β -glucosidase production by *Aspergillus niger*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 5, p. 583-591, 2012.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.
- REETZ, A.R ; CARVALHO, C.; KIST, B. B.; POLL, H.; CLEITON, DOS SANTOS, E.; DA SILVEIRA, D. N. Anuário Brasileiro da Soja 2012. Santa Cruz do Sul: Ed. **Gazeta Santa Cruz**, p. 156, 2012.

RIAZ, M. N. Processing os soybeabs into ingredients . In _____ **Soy applications in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 39-62, 2006.

ROSTAGNO, M.A.; ARAÚJO, J.M.A.; SANDI, D. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. **Food Chemistry**, v.78, p.111-117, 2002.

SANNI, A. I.; ONILUDE, A.A.; OMOLARA, O.; IBIDAPO, T. Biochemical composition of infant weaning food fabricated from fermented blends of cereal and soybean. **Food Chemistry**, v.65, p.35-39, 1999.

SANTOS, D.T; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. **Janus**, v. 3, n.4, p. 164-183, 2006.

SANTOS, S. F. **Estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007, 132 f. Tese (Doutorado em engenharia química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte , Natal, 2007.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial** – vol. 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SCHWARTZ, S. J.; ELBE, J. H. V.; GIUSTI, M. M. Corantes. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 445-498.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 358-363, 1997.

SILVA, L. H.; CELEGHINI, R. M.S.; CHANG, Y. K. Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. **Food Chemistry**, v. 128, p. 640–644, 2011.

SILVA, M.M.; SANTOS, M. R.; CAROÇO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radical Research**, v.36, n.11, p.1219-1227, 2002.

SOLOVYEVA, I.V.; ANANJIN, V.M., BOEV, A. V; OKUNEV, O.N. The controlled biosynthesis of cellobiase by *Aspergillus* fungi. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 21–28, 1997.

SUGANO , M.. **Soy in health and disease prevention**. ed. Boca Raton, FL: CRC PRESS, 2006

SUTIL, G. A. **Tratamento hidrotérmico e ação da enzima β -glicosidase na formação de agliconas em soja**. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

TSAO, R.; YANG, R.; YOUNG, J.C. Antioxidant isoflavones in osage orange, *maclura pomifera* (Raf.) schneid. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6445-6451, 2003.

TSUKAMOTO, C.; KUDOU, S.; KIKUCHI, A.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; ONO, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Isoflavones in soybean products: composition, concentration, and physiological effects. **Documentos da Embrapa**, v.169, n.1, p.9-14, 2001.

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E. J.; MARTÍNEZ, A. Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 27-38, 2011.

WANG, H.; 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.

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

WANG, YI-CHIEH; YU, ROCH-CHUI; CHOU, CHENG-CHUN. Antioxidant activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 23, p. 128-135, 2006.,

WARD, P. O. **Biotecnología de la fermentación**. Zgaroza: Acribia, 1991.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3087–3094, 2005.

XU, X.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 798–801, 2000.

YADAV, J.S. SSF of wheat straw with alkaliphilic coprinus. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 414–417, 1988.

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. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 9, p. 978-986, 2012

ZHANG, HONG-YU; WANG, LAN-FEN; SUNG, YOU-MIN. Why b-ring is the active center for genistein to scavenge peroxy radical: A DFT Study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 909–911, 2003.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de artigo científico.

5.1 ARTIGO: FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA FARINHA DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMA COM ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE E BIOCONVERSÃO EM AGLICONAS

FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DA FARINHA DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMA COM ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE E BIOCONVERSÃO EM AGLICONAS

HANDA, C. L., COUTO, U. R., VICENSOTI, A. H., GEORGETTI, S. R., IDA, E. I.

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 10.011, CEP 86.057-970, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros do processo de fermentação em estado sólido (FES) da farinha de soja desengordurada (FSD) com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 utilizando o planejamento fatorial composto central rotacional (PCCR) para otimizar a produção de enzima com atividade de β -glicosidase e bioconverter as isoflavonas glicosídicas em agliconas. As variáveis investigadas foram o pH inicial da FSD, volume de água adicionada à 10 g de FSD e temperatura de incubação. A atividade de β -glicosidase foi medida utilizando o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG). A separação e quantificação das diferentes formas químicas das isoflavonas foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). A máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase por FES de FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 ocorreu quando adicionou-se 10 mL de água à FSD, incubação a 30 °C e pH inicial da FSD de 6,0, sendo que para o *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 o efeito de pH foi independente do intervalo de 5,2 e 6,8. Nas mesmas condições de fermentação o *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 produziu atividade de β -glicosidase de 10,7 vezes superior ao *Monascus purpureus* NRRL 1992. Contudo, a fermentação da FSD com *Monascus purpureus* NRRL 1992 foi mais eficiente para bioconverter as isoflavonas glicosídicas em agliconas.

Palavras chaves: Fermentação em estado sólido. Isoflavonas. Farinha desengordurada de soja. β -glicosidase. Planejamento composto central rotacional. *Aspergillus oryzae*. *Monascus purpureus*.

1. Introdução

A soja contém vários compostos de interesse com atividade biológica que incluem os fitoesteróis, inibidores de protease, saponinas e isoflavonas. As isoflavonas da soja têm atraído atenção devido à capacidade de reduzir os riscos de doenças cardiovasculares, promover a inibição do crescimento de células cancerígenas, além de prevenir diversas doenças como a osteoporose e amenizar os sintomas da menopausa. Os efeitos destas isoflavonas são fortemente influenciados pela estrutura química (Villares et al., 2011).

As isoflavonas podem ocorrer em quatro formas químicas distintas e denominadas de: agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), β -glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina), acetil glicosídicas conjugadas (6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina) e malonil glicosídicas conjugadas (6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina) que totalizam doze diferentes formas. As formas β -glicosídicas possuem uma molécula de glicose ligada na posição 7 do anel benzeno e as formas conjugadas são esterificadas no carbono 6 da molécula de glicose (Liu, 1997). Dentre essas, as formas glicosídicas são as principais formas encontradas na soja, constituindo de 50 a 90% das isoflavonas. No entanto, as formas agliconas, em menor quantidade, são as que possuem maior atividade biológica (Izumi et al., 2000). O conteúdo e composição de isoflavonas em produtos de soja dependem das condições e tipo de processamento, como tratamento térmico, cozimento, hidrólise com enzima e fermentação (Wang & Murph, 1994).

As isoflavonas agliconas possuem maior potencial bioativo e absorção no intestino do que as suas formas glicosídicas correspondentes. Portanto, muitos produtos de soja têm sido enriquecidos com agliconas obtidas a partir de diferentes processos de conversão das formas glicosídicas em agliconas (Izumi et al., 2000). Estes processos podem ocorrer pela ação de enzimas provenientes de fonte microbiana (Pham & Shah, 2009) ou de fontes vegetais e animais, sendo que a β -glicosidase de fonte microbiana obtida por processo fermentativo apresenta maior

vantagem do que as demais, uma vez que tem menor custo e pode ser produzida em grande escala (Langston, Sheehy & Xu, 2006). Contudo, a conversão das diferentes formas químicas de isoflavonas depende do tipo de micro-organismo e do potencial de hidrólise da enzima produzida (Otieno, Ashton & Shah 2006). Além disso, a hidrólise das ligações glicosídicas das isoflavonas pela enzima também depende do tempo e temperatura de fermentação (Matsura & Obata, 1993).

No processo de fermentação em estado semisólido ou sólido (FES) os micro-organismos são cultivados nas superfícies de materiais sólidos com limitada quantidade de água e pode ser utilizado para obtenção de enzimas microbianas. Os meios de cultivo devem ser favoráveis e conter todos os nutrientes necessários para a síntese celular e formação do produto desejado (Ward, 1991). A produção de enzima fúngica com atividade de β -glicosidase por meio de FES depende do pH e umidade inicial do substrato, temperatura e tempo de incubação (Qian et al., 2012). Assim, para aumentar o rendimento do processo de FES é importante otimizar as condições de fermentação estabelecendo adequadamente os parâmetros físicos e químicos (Francis et al., 2003). Dessa forma, o uso de ferramentas estatísticas com planejamentos adequados, possibilita melhorar os processos de fermentação e compreender melhor os mecanismos detalhados de sistemas complexos e as interações de múltiplos fatores (Sen & Swaminathan, 1997).

Os fungos filamentosos são mais adaptados para crescer em processo de FES devido às suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. O *Aspergillus oryzae* é um fungo muito utilizado no Japão, principalmente para obtenção de produtos fermentados como molho de soja, saquê, temperos e vinagre. Devido o potencial de produção de várias enzimas, este fungo é amplamente utilizado na área da biotecnologia moderna (Machida, Yamada & Gomi, 2008) As espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos mais promissores para a produção de β -glicosidase (Solovyeva et al., 1997). Na fermentação semissólida de farinha de soja integral com *Aspergillus oryzae* por 48h o teor de isoflavonas agliconas aumentou significativamente de 6,94 para 75,51% (Silva et al., 2011). O *Monascus purpureus* é um fungo utilizado tradicionalmente no leste asiático para a produção de alimentos fermentados e obtenção de produtos secundários que são utilizados como pigmento alimentar ou agente biológico (Lee, Yang & Mau, 2008). Sua utilização como produtor de β -glicosidase foi avaliada somente por Daroit et al. (2007) que utilizaram fermentação submersa com resíduos de uva e peptona como fontes de nitrogênio.

Considerando o potencial de produção de enzimas que hidrolisam as ligações β -glicosídicas, este trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros do processo de fermentação em estado sólido (FES) da farinha de soja desengordurada (FSD) com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 utilizando o planejamento fatorial composto central rotacional (PCCR) para otimizar a produção de enzima com atividade de β -glicosidase e bioconverter as isoflavonas glicosídicas em agliconas.

2. Material e métodos

2.1. Material

Para FES foi utilizada como substrato a FSD da Indústria Brasil Foods (Curitiba, Paraná) que apresentou a composição química de 8,95% de umidade; 1,07% de lipídeos, 48,96% de proteínas (N x 6,25), 5,98% de cinzas e 35,04% de carboidratos por diferença. O fungo *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 foi cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ) e o fungo *Monascus purpureus* NRRL 1992 (GenBank: JQ614061.1) foi proveniente do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) foram utilizados os padrões de isoflavonas (β -glicosídicas, malonil conjugados, acetil conjugados e agliconas) e para determinação da atividade de β -glicosidase foi utilizado o substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG), adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Para quantificação por CLUE foram utilizados reagentes de grau cromatográfico e todos os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2. Reativação dos Micro-organismos e Obtenção da Suspensão de Esporos

Os fungos *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 congelados foram colocados à temperatura ambiente, ativados em caldo sabouraud e incubados a 30 °C por sete dias. Em seguida, foram repicados em meio batata dextrose agar (BDA) inclinado e incubados a 30 °C por sete dias e utilizados para fermentação. Para a contagem dos esporos e inoculação, foram adicionados 5

mL de solução tween 20 à 2% (v/v). Os esporos da superfície do meio de cultura foram suspensos com auxílio de bastão de vidro. A suspensão foi diluída 1:10 (v/v) para contagem dos esporos realizada em câmara de Neubauer.

2.3. Fermentação em estado sólido da FSD

As fermentações das FSD foram conduzidas em separado utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 e realizadas conforme Georgetti et al. (2009) com algumas modificações. Para cada ensaio de FES foi utilizado 10 g de FSD e o pH inicial da FSD (X_1) foi ajustado conforme Tabela 1 do planejamento composto central rotacional (PCCR). A quantidade de água adicionada à FSD (X_2) foi previamente preparada utilizando água destilada, cujo pH foi ajustado com adição de ácido clorídrico 1 M ou carbonato de sódio 1M de conferindo à FSD o pH (X_1) igual ao estabelecido na tabela 1. Após adição de água à FSD (X_2) e homogeneização, o material foi distribuído uniformemente em frascos de erlenmeyers de 250 mL e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Ao atingir a temperatura ambiente, uma suspensão contendo 10^7 esporos foi espalhada uniformemente sobre a superfície de cada amostra e incubada (Fanem, mod. 347F, São Paulo, Brasil) por 48 h em diferentes temperaturas (X_3) conforme o PCCR (Tabela 1). Após a incubação, as FSD devidamente fermentadas foram congeladas, liofilizadas, moídas e armazenadas a 5 °C até o momento da análise. Para acompanhamento dos ensaios (Tabela 2), objetivando a produção de enzima fúngica com atividade da β -glicosidase, foi utilizado um controle para cada ensaio sem adição da suspensão de esporos dos fungos.

2.4. Planejamento Fatorial Composto Central Rotacional

Para avaliar os efeitos das condições de fermentação das FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 na produção enzima fúngica com atividade de β -glicosidase foi aplicado o PCCR com três fatores e repetições no ponto central (Tabela 2).

As variáveis independentes codificadas (x_1 , x_2 e x_3) e não codificadas (X_1 = pH inicial da FSD, X_2 = mL de água adicionada em 10 g de FSD e X_3 = °C de incubação) com os cinco níveis de variação estão apresentados na tabela 1. O PCCR foi realizado em 2 blocos (Tabela 2), sendo que para a modelagem

exploratória foi realizado o bloco 1 com 11 ensaios aleatórios (9 pontos fatoriais e 3 pontos centrais) e para a modelagem de otimização foi realizado o bloco 2 com 9 ensaios aleatórios (6 pontos axiais e 3 pontos centrais), totalizando assim 20 ensaios nos dois blocos.

A produção de enzimas fúngicas com atividade de β -glicosidases foram avaliadas pelas funções respostas: Y_A ou Y_M (Y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g^{-1} de amostra e Y_M = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 g^{-1} de amostra), conforme o modelo da equação: $Y = \beta_0 + B_j + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + e$ (Equação 1); onde: Y (função resposta); x_1 , x_2 e x_3 (variáveis codificadas); β (coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta) ; β_j (coeficiente estimado do bloco para o modelo de superfície resposta); e (erro puro).

A partir das avaliações das funções respostas (Y_A ou Y_M) foram realizadas as análises de regressão e análise de variância (ANOVA) da regressão. O modelo da equação foi ajustado aos dados experimentais e obtido o modelo proposto. Os gráficos de superfície de resposta e parâmetros de desejabilidade foram gerados para cada função resposta (Y_A ou Y_M). Todas as análises executadas, superfícies de respostas e desejabilidade foram realizadas utilizando o programa STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc, 2007).

Para validação do modelo proposto foram realizados novos ensaios em triplicata após analisar as superfícies de respostas e gráficos de desejabilidade de máxima atividade de β -glicosidase. Os resultados obtidos ($Y_{exp.}$) foram comparados com a resposta estimada aplicando o teste t-Student ($p < 0,05$).

2.5. Bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas das FSD fermentadas com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992

A bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas das FSD fermentadas com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 nas condições de produção de enzima com máxima atividade de β -glicosidase foi avaliada quantificando as diferentes formas de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Foi utilizado um controle em paralelo à fermentação sem adição da suspensão de esporos. O teor das diferentes formas de

isoflavonas das FSD fermentadas com diferentes fungos e controles foram comparados pelo teste de Tukey.

2.6. Extração e determinação da enzima com atividade da β -glicosidase

A extração da enzima com atividade de β -glicosidase produzida por *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 foi conduzida segundo a metodologia descrita por Carrão-Panizzi e Bordignon (2000). A atividade da β -glicosidase foi medida conforme descrição de Matsuura e Obata (1993). Uma unidade de atividade (UA) de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima que liberou $1\mu\text{mol}$ de *p*-nitrofenol (*p*-NP) por min nas condições do ensaio. A atividade da β -glicosidase foi expressa como UA de β -glicosidase g^{-1} de FSD fermentada ou controle liofilizados. As funções respostas (Y_A ou Y_M) foram expressas pela diferença entre a atividade de β -glicosidase de FSD fermentada e do controle.

2.7. Quantificação de isoflavonas por CLUE

As FSD fermentadas e controles foram liofilizadas, moídas, desengorduradas com hexano (1:10, m/v) por 30 min à temperatura ambiente com agitação rotativa contínua e filtradas a vácuo. A extração de isoflavonas foi realizada com uma mistura de solventes extrator contendo água ultra pura, acetona e etanol (1:1:1, v/v/v), conforme descrito por Yoshiara et al. (2012). A extração foi realizada em triplicata utilizando 0,3 g de FSD fermentada e não fermentada (controle) com 6 mL de solvente extrator e agitação em vortex a cada 15 min por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram colocadas em banho ultrassônico por 15 min à temperatura ambiente, centrifugadas ($2500 \times g$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$ e 15 min) (Centrifuge 5804R – Eppendorf, Hamburg, GE) e filtradas (Millex filter - LH ($0,22\ \mu\text{m}$)). Aliquotas de $1,4\ \mu\text{L}$, em triplicata, do filtrado foram injetadas automaticamente no cromatógrafo líquido UPLC® Waters. A coluna foi de fase reversa (modelo ACQUITY – UPLC BEH C18, Waters) com dimensão de $2,1\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$ e tamanho da partícula de $1,7\ \mu\text{m}$. A eluição foi realizada com gradiente não linear, utilizando fase móvel A contendo água acidificada em pH 3,0 ajustado com ácido acético glacial e fase móvel B acetonitrila com fluxo de $0,7\ \text{mL min}^{-1}$ a $35\text{ }^\circ\text{C}$. O gradiente foi iniciado com 90% de

eluente A e 10% de eluente B e em 8 min de eluição o gradiente atingiu proporção de 0% de A e 100% de B. As condições iniciais retornaram após 9 min e o tempo total de corrida foi de 10 min. O detector foi de arranjo de diodos (Waters) com comprimento de onda ajustado para 260 nm. As soluções padrão para a construção das curvas de calibração (área do pico x teor de isoflavonas) foram daidzina, genistina, glicitina, malonil daidzina, malonil genistina, malonil glicitina, acetil daidzina, acetil genistina, acetil glicitina, gliciteína e genisteína (0,1; 0,025; 0,006 e 0,002 mg mL⁻¹) e daidzeína (0,1; 0,025; 0,006; 0,002 e 0,001 mg mL⁻¹). Os padrões em triplicata foram injetados originando os cromatogramas correspondentes de cada forma química de isoflavonas com respectivos tempos de retenção. Os picos de cada forma de isoflavona das amostras foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros na região do UV dos respectivos padrões de referência. O aplicativo acoplado no cromatógrafo gerou as curvas de calibração e as concentrações de isoflavonas foram calculadas e expressas em µg de isoflavona por g de amostra liofilizada de FSD; controle ou FSD fermentada.

3. Resultados e discussão

3.1. Efeito das condições de fermentação das FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 sobre a produção de enzima com atividade de β-glicosidase

A partir da modelagem exploratória do primeiro bloco do PCCR (Tabela 2), análise de regressão e ANOVA, observou-se que os efeitos das variáveis X_1 (pH inicial da FSD), X_2 (mL de água adicionada em 10 g de FSD) e X_3 (temperatura em °C de incubação) e todas as interações ($X_1.X_2$, $X_1.X_3$, $X_2.X_3$ e $X_1.X_2.X_3$) não foram significativos e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,01. Considerando a curvatura e realizando uma nova análise de regressão e ANOVA (Tabela 3) verificou-se que somente a curvatura foi significativa ($p < 0,05$) e R^2 elevado de 0,99. Esta constatação indicou que o modelo linear não foi adequado e suficiente para explicar o efeito das três variáveis (X_1 , X_2 e X_3) sobre a função resposta Y_A (UA de β-glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* g⁻¹ de amostra liofilizada).

Assim, para ampliar os níveis das variáveis investigadas e otimizar o processo, foram realizados os ensaios do bloco 2 contendo os 6 pontos axiais e 3 pontos centrais. A análise de regressão e ANOVA da função resposta Y_A (UA de β-

glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* g⁻¹ de amostra liofilizada) indicaram que as variáveis independentes X₂ (mL de água adicionada a FSD) e X₃ (°C de incubação) apresentaram efeitos quadráticos negativos e significativos. Estes resultados foram esperados, uma vez que, durante a fermentação o teor de umidade inicial do substrato geralmente varia de 35-75% e pode ser alterado devido à evaporação e atividades metabólicas (Nishio; Tai; Nagai, 1979). Em estudos realizados por Yadav (1988) verificou-se que o teor de umidade e temperatura foram considerados relevantes para o processo de FES. Durante a fermentação o elevado teor de umidade diminui a porosidade e difusão do oxigênio, enquanto que o baixo teor pode influenciar negativamente o crescimento do micro-organismo devido a menor solubilidade dos nutrientes e rápida perda de água por volatilização. Além disso, a temperatura de incubação tem influência sobre a germinação dos esporos, crescimento dos micro-organismos, formação do produto e esporulação (Lonsane et al., 1985).

Na tabela 2 observa-se que a atividade da β-glicosidase foi maior no ensaio 12 (Y_A de 3,641 UA de β-glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* g⁻¹ de amostra liofilizada), cujas condições de fermentação foram: pH inicial da FSD de 5,2 (X₁), 10 mL de água adicionada à FSD (X₂) e 30 °C de incubação (X₃). Entretanto, o ensaio 13 e os pontos centrais do bloco 1 e bloco 2 também apresentaram elevadas atividades de β-glicosidase, porém estes ensaios diferiram apenas na variável X₁ com pH inicial da FSD de 6,8 (ensaio 13) e pH de 6,0 (pontos centrais blocos 1 e 2). Estas observações demonstraram que a produção de enzima com atividade de β-glicosidase (Y_A) foi independente do pH na faixa investigada e confirmam que a variável X₁ (pH inicial da FSD) não apresentou efeito significativo sobre a produção de enzima com atividade de β-glicosidase de FSD fermentada.

Assim, o modelo proposto (equação 2) pode ser escrito como: $\hat{y}_A = 2,68508^* + 0,40114^* - 0,87688x_2^2 - 1,15850x_3^2$, onde \hat{y}_A (UA de β-glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* g⁻¹ de amostra), x₂ (variável codificada de X₂ = mL de água adicionada a FSD), x₃ (variável codificada de X₃ = °C de incubação) e * termos significativos (p<0,05). O modelo apresentou falta de ajuste não significativo (p>0,05) e R² de 0,91, indicando que 91% dos resultados experimentais ajustaram adequadamente ao modelo proposto e, portanto, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

Analisando o modelo matemático (equação 2) da função resposta Y_A (UA de β -glicosidase de FSD fermentada g^{-1} de amostra) e a superfície de resposta Fig. 1A, observa-se que há uma região onde a atividade de β -glicosidase é maior do que 2,0 UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* g^{-1} de amostra, ou seja, x_2 está entre -0,8 e +0,8 ou X_2 entre 6,0 e 14,0 mL de água adicionada a FSD e x_3 está entre -0,8 e +0,8 ou X_3 entre 22 e 38 °C de incubação. Pelos parâmetros de desejabilidade (Fig. 2) a máxima produção de atividade da β -glicosidase prevista é de $\hat{y}_A = 3,0862$ UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* g^{-1} de amostra e ocorreu quando $x_2=0$ ou $X_2=10,0$ mL de água adicionada à FSD e $x_3 = 0$ ou $X_3= 30$ °C de incubação. O modelo foi validado com realização de um ensaio em triplicata utilizando X_2 (10 mL de água adicionada à FSD) que correspondeu a 50% de umidade e X_3 (30 °C de incubação) e a variável X_1 (pH inicial da FSD em 6,0) foi mantida constante. A atividade de β -glicosidase média obtida experimentalmente foi igual a $Y_{A \text{ exp.}}=2,6347 \pm 0,2688$ UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* g^{-1} de amostra. Este resultado não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) pelo teste “t” do valor estimado, ou seja, $\hat{y}_A = 3,0862$ UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* g^{-1} de amostra.

As espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos mais promissores para a produção de enzima com atividade de β -glicosidase, porém, as diferentes condições de fermentação e diferentes cepas podem influenciar a produção de enzima com atividade de β -glicosidase (Solovyeva et al., 1997). Qian et al. (2012) verificaram que a máxima produção da enzima β -glicosidase em FES de farelo de trigo com *Apergillus niger* ocorreu em pH 6,0; 70% de umidade por 72 h de incubação à 28 °C, enquanto que baixa atividade de β -glicosidase foi observada entre 32 e 36 °C. Entretanto, para FES de bagaço de sorgo com o mesmo fungo, as condições de pH 5,0, 70% de umidade, 96 h de incubação à 30 °C produziram máxima atividade de β -glicosidase (Lavudi et al., 2013). Utilizando cultura mista de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae* na FES de casca de soja suplementada com farelo de trigo a máxima atividade de β -glicosidase ocorreu nas condições de fermentação quando o pH foi de 5,0; 70% de umidade e 96 h de incubação 30 °C (Brijwani, Oberoi, Vadlani, 2010).

A $Y_{A \text{ exp.}}$ na condição de máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase foi de $2,6347 \pm 0,26884$ de UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* g^{-1} de amostra liofilizada. Entretanto, considerando o volume

inicial do extrato e FSD fermentada em base úmida foi possível converter o valor de $Y_{A \text{ exp.}}$ para 0,0878 UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* mL⁻¹ de extrato bruto. Este resultado representou aproximadamente a metade da atividade descrito por Aguiar et al. (2003) que obtiveram 0,18 UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* mL⁻¹ e 0,15 UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus awamori* mL⁻¹ após a fermentação de FSD (1:1, m/v; FSD/água deionizada), porém com 96 h de incubação a 30 °C e com 10⁷ esporos. Entretanto, Georgetti et al. (2009) nas mesmas condições estudadas por Aguiar et al. (2003), porém por 48 h de fermentação da FSD, observaram que a FES com os fungos *Aspergillus awamori* ATCC 22342, *Aspergillus niger* e *Aspergillus niveus* produziram atividade de β -glicosidase com diferentes atividades específicas.

Portanto, para obtenção de máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase por FES de FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 recomenda-se utilizar 10 mL de água adicionada a 10 g de FSD (X_2), temperatura de incubação de 30 °C (X_3) e o pH (X_1) entre 5,2 e 6,8.

3.2. Efeito das condições de fermentação da FSD com *Monascus purpureus* NRRL 1992 sobre a produção de enzima com atividade de β -glicosidase

A partir da modelagem exploratória do primeiro bloco do PCCR (Tabela 2), análise de regressão e ANOVA, observou-se que os efeitos das variáveis X_1 (pH inicial da FSD), X_2 (mL de água adicionada em 10g de FSD) e X_3 (°C de incubação) e todas as interações ($X_1.X_2$, $X_1.X_3$, $X_2.X_3$ e $X_1.X_2.X_3$) não foram significativos e o R^2 foi de 0,56. Considerando a curvatura, foram realizadas nova análise de regressão e ANOVA (Tabela 3) na qual verificou-se que a curvatura e os efeitos das variáveis X_1 (pH inicial da FSD), X_2 (mL de água adicionada a FSD) e X_3 (°C de incubação) e todas as interações $X_1.X_2$, $X_1.X_3$ e $X_2.X_3$ foram significativos com R^2 de 0,99 (Tabela 3), indicando que o modelo linear não foi adequado e suficiente para explicar o efeito das três variáveis (X_1 , X_2 e X_3) sobre a função resposta Y_M (UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* g⁻¹ de amostra liofilizada). Assim, para ampliar os níveis das variáveis investigadas e otimização do processo, foram realizados os ensaios do bloco 2 contendo os 6 pontos axiais e 3 pontos centrais. Pela análise de regressão da função resposta Y_M as variáveis independentes X_1 e X_2

apresentaram efeitos lineares e quadráticos significativos, enquanto que a variável X_3 apresentou somente efeito quadrático significativo.

Observa-se (Tabela 2) que a atividade da β -glicosidase foi maior no ponto central do segundo bloco ($Y_M = 0,2585$ UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* g^{-1} de amostra), ensaios 18, 19 e 20 com X_1 (pH inicial da FSD de 6,0), X_2 (10 mL de água adicionada à FSD) e X_3 (30 °C de incubação). Porém, as três condições de fermentação (ensaios 3, 7 e 16) em que não houve produção de enzima com atividade de β -glicosidase, ocorreram quando a variável x_3 estava em seus níveis mais baixos (-1 ou -1,68), ou seja, $X_3 = 20$ °C ou 13 °C.

Considerando a elevada contribuição da interação $X_2 \cdot X_3$ no modelo proposto, esta interação foi mantida na equação e os outros termos não significativos foram retirados do modelo. Portanto, o modelo proposto (Equação 3) pode ser escrito como: $\hat{y}_M = 0,23064^* + 0,00894^* - 0,03776x_1^* + 0,034508x_2^* - 0,035110x_1^{2*} - 0,038388x_2^{2*} - 0,079504x_3^{2*} + 0,041666x_2 \cdot x_3$, onde \hat{y}_M (UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* g^{-1} de amostra), x_1 (variável codificada de $X_1 = \text{pH}$ inicial da FSD), x_2 (variável codificada de $X_2 = \text{mL}$ de água adicionada a FSD), x_3 (variável codificada de $X_3 = \text{°C}$ de incubação) e * significativo ($p < 0,05$). O modelo apresentou falta de ajuste não significativo e R^2 de 0,81 indicando que os resultados experimentais apresentaram um bom ajuste ao modelo proposto e, portanto, o modelo pode ser utilizado com fins preditivos.

Analisando o modelo proposto (Equação 3) para Y_M e superfícies de respostas Figuras 1B, 1C, 1D observa-se que há regiões onde ocorreu o máximo de produção de enzima com atividade de β -glicosidase (Y_M) quando (Figura 1B) x_1 está entre -1,3 e +0,2, ou seja, X_1 com pH inicial da FSD entre 5,4 e 6,1 e x_2 está entre -0,3 e +1,2, ou seja, X_2 entre 8,5 e 16 mL de água adicionada à FSD e 30 °C de incubação; (Figura 1C) x_1 está entre -1,2 e +0,2, ou seja, X_1 com pH entre 5,4 e 6,1 e x_3 está entre -0,4 e +0,3, ou seja, X_3 entre 26 e 33 °C e 10 mL de água adicionada a FSD; (Figura 1D) x_2 está entre -0,1 e +1,1, ou seja, X_2 entre 9,5 e 15,5 mL de água adicionada e x_3 está entre -0,3 e +0,5, ou seja, X_3 entre 27 e 35 °C com pH inicial da FSD de 6,0. Destaca-se que nas regiões onde ocorreu o máximo de Y_M estão incluídos os ensaios do ponto central.

Pelos parâmetros de desejabilidade (Figura 2) a condição ótima para a função-resposta Y_M ocorreu quando $x_1 = -1,682, -0,8409, 0$ ou $+0,84$ ($X_1 = \text{pH}$ 5,2; 5,6; 6,0 ou 6,4), $x_2 = -0,84; 0; +0,84$ ou $1,68$ ($X_2 = 5,8; 10,0; 14,2$ ou $18,0$ mL de água

adicionada à FSD) e $x_3 = 0$ ou $+0,84$ ($X_3 = 30$ ou 38 °C). Assim, um ensaio em triplicata, que coincidiu com o ponto central ($X_1 = \text{pH } 6,0$, $X_2 = 10$ mL, e $X_3 = 30$ °C), foi realizado experimentalmente e obteve-se $Y_{M \text{ exp.}} = 0,245468 \pm 0,002213$ UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* g^{-1} de amostra cujo resultado não diferiu pelo teste “t” ($p > 0,05$) do $\hat{y}_M = 0,24838$ UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* g^{-1} de amostra, confirmando assim a validade do modelo proposto.

A produção de maior atividade de β -glicosidase de $2,78 \text{ UA mL}^{-1}$ após 9 dias de incubação a 27°C foi descrita por Daroit et al. (2007) que utilizaram a fermentação com o mesmo fungo *Monascus purpureus* NRRL 1992 em meio submerso, porém com resíduo de uva (50 g/L) e peptona (20 g/L) como fontes de nitrogênio.

Dessa forma, os resultados demonstraram que para se obter máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase por FES de FSD com *Monascus purpureus* NRRL 1992, deve-se utilizar a seguinte condição de fermentação: X_1 (pH inicial da FSD de 6,0); X_2 (10 mL de água adicionada à FSD) e X_3 (30 °C de incubação). Além disso, pode-se observar que essas condições de fermentação foram similares às encontradas com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 para obtenção de máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase, exceto a variável X_1 que não apresentou efeito significativo nos níveis investigados. Contudo, comparando a máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase entre os dois fungos, obtidas experimentalmente na validação dos modelos propostos, verificou-se que o *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 apresentou atividade de β -glicosidase de 10,7 vezes superior a do *Monascus purpureus* NRRL 1992.

3.3. Bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas das FSD fermentadas com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992.

As diferentes formas de isoflavonas da FSD foram quantificadas por CLUE, cujos teores foram de $185,04 \mu\text{g g}^{-1}$ de daidzina, $206,72 \mu\text{g g}^{-1}$ de genistina, $88,26 \mu\text{g g}^{-1}$ de glicitina, $655,39 \mu\text{g g}^{-1}$ de malonil daidzina, $1535,14 \mu\text{g g}^{-1}$ de malonil genistina, $575,79 \mu\text{g g}^{-1}$ de malonil glicitina, $107,71 \mu\text{g g}^{-1}$ de acetil daidzina, $54,22 \mu\text{g g}^{-1}$ de acetil genistina, $1,48 \mu\text{g g}^{-1}$ de daidzeína e $135,67 \mu\text{g g}^{-1}$ de genisteína. Na FSD acetil glicitina e gliciteína não foram detectadas. A fermentação, nas condições

de maior produção de enzima com atividade de β -glicosidase das FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992, diminuiu o conteúdo total de isoflavonas em relação aos respectivos controles (Tabela 4). A redução no teor de isoflavonas totais segundo Aguiar et al. (2003) esta redução também pode ser devido a outras reações que ocorreram durante a fermentação semissólida.

O teor de isoflavonas conjugadas malonil daidzina e malonil genistina das FSD fermentadas com os fungos não apresentou diferenças significativas com relação aos seus respectivos controles (Tabela 4). Estes resultados confirmaram as observações de Park et al. (2001) que verificaram que a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae* não foi eficiente para hidrolisar as formas malonil glicosídicas, porém, foi eficiente para hidrolisar as isoflavonas glicosídicas. A β -glicosidase extraída de okara (resíduo da produção de extrato aquoso de soja) também não apresentou especificidade de atividade para as formas malonil, entretanto, foi efetiva para as isoflavonas glicosídicas (Chiou et al., 2010).

Na FSD o teor de malonil glicetina foi de $575,79 \mu\text{g g}^{-1}$ de amostra, enquanto que nas FSD fermentadas e seus controles (Tabela 4) não foi detectada, devido ao tratamento térmico com autoclave para esterilização do substrato. As isoflavonas malonil- β -glicosídicas estão em maior quantidade na soja e são termolábeis, sob aquecimento são convertidas as suas formas glicosídicas (Coward et al., 1998). Park et al. (2001) verificaram que a extração de isoflavonas de FSD após tratamento térmico a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ promoveu redução no teor de isoflavonas malonil.

A fermentação da FSD com o fungo *Monascus purpureus* NRRL 1992 reduziu em maior proporção o teor das formas conjugadas acetil daidzina e acetil genistina do que com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 (Tabela 4). Esta redução pode ter ocorrido devido à produção de enzima com atividade de β -glicosidase com especificidade para acetil glicosídica durante a fermentação da FSD.

A fermentação da FSD com os dois fungos produziu enzima com atividade de β -glicosidase bioconvertendo as formas glicosídicas (daizina, genistina e glicetina) em suas correspondentes formas agliconas (daidzeína e genisteína e ausência de gliciteína), obtendo assim, uma FSD fermentada rica em agliconas (Tabela 4). Desta forma, o processo de FES com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 pode ser uma opção para bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas que, segundo Izumi et al. (2000), apresentam maior

potencial bioativo e absorção no intestino do que às suas formas glicosídicas correspondentes.

A bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas foi de 5 e 1,8 vezes nas FSD fermentadas com *Monascus purpureus* NRRL 1992 ou *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998, respectivamente (Tabela 4). A FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 reduziu em 47,25; 30,20 e 25,58 % o teor de daidzina, genistina e glicitina e aumentou em 193,90 e 72,51% o teor de agliconas daidzeína e genisteína. A FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 reduziu em 99,90%; 69,74 e 75,10% o teor de daidzina, genistina e glicitina e aumentou em 979,98 e 371,75% o teor de agliconas daidzeína e genisteína. Destaca-se que na FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 o teor das isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína) aumentou de 3,86 vezes em relação à FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998, embora o *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 tenha apresentado atividade de β -glicosidase de 10,7 vezes superior ao do *Monascus purpureus* NRRL 1992. Esses resultados sugerem que a enzima com atividade de β -glicosidase produzida pelo *Monascus purpureus* NRRL 1992 foi mais seletiva para bioconversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas do que a produzida pelo *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998. Esses resultados estão de acordo com Lee e Chou (2006) que observaram que a fermentação de kojis de soja preta com diferentes fungos (*Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus azygosporus* e *Rhizopus sp.*) à 30 °C e 72 h de incubação, reduziu o teor de isoflavonas glicosídicas (daidzina, genistina e glicitina) e aumentou o teor de agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) quando comparado com o produto não fermentado. Além disso, o koji fermentado com *Rhizopus sp.* apresentou menor atividade de β -glicosidase e maior bioconversão em agliconas do que *A. oryzae* e *A. sojae*. Georgetti et al. (2009) compararam a bioconversão de genistina em genisteína de FDS fermentada com *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* e *Aspergillus awamori* e observaram que o *Aspergillus niveus* apresentou maior capacidade de bioconversão com menor atividade de β -glicosidase. Possivelmente, foi devido a algumas espécies de *Aspergillus* produziram β -glicosidase com diferentes especificidades ou outras enzimas que também hidrolisam as ligações glicosídicas. Contudo, Aguiar et al. (2003) observaram que diferentes micro-organismos podem produzir enzimas com atividade de β -glicosidase que atuam na hidrólise de ligações glicosídicas de materiais celulósicos ou *p*-

nitrofenil- β -glicopiranosídeo (p NPG), porém, não apresentam especificidades para a ligação glicosídica das isoflavonas.

4. Conclusões

Para máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase por fermentação em estado sólido de FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 deve-se utilizar 10 mL de água adicionada à 10 g FSD, temperatura de incubação de 30 °C e pH inicial da FSD de 6,0, sendo que o pH para *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 foi independente no intervalo de pH entre 5,2 e 6,8.

Nas mesmas condições de fermentação em estado sólido de FSD o *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 produziu enzima com atividade de β -glicosidase 10,7 vezes superior ao *Monascus purpureus* NRRL 1992. Entretanto, a fermentação da FSD o *Monascus purpureus* NRRL 1992 foi mais eficiente na bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas.

Agradecimentos

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / Fundação Araucária, Paraná e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro do Projeto PRONEX/FA/CNPq. Handa, C. agradece pela bolsa da Fundação CAPES/MEC e Ida, E. I. pela bolsa produtividade PQ do CNPq.

Referências

1. AGUIAR, C.L., SUZUKI, C.N., PAREDES-GUZMÁN, J.F., ALENCAR, S.M., PARK, Y.K. (2003). Transformación de las β -glicosil isoflavonas por fermentación semi-sólida de harina de soja con *Aspergillus oryzae*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 4 (2), 115-121.
2. BRIJWANI, K., OBEROI, H. S., VADLANI, P. V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45, 120–128.

3. CARRÃO-PANIZZI, M. C., BORDIGNON, J.R. (2000). Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, (5), 873-878.
4. CHIOU, TAI-YING, LIN, YI-HSUAN, SU, NAN-WEI, LEE, MIN-HSIUNG (2010). β -Glucosidase Isolated from Soybean Okara Shows Specificity toward Glucosyl Isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8872–8878.
5. COWARD, L., SMITH, M., KIRK M., BARNES, S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (6), 1486-1491.
6. DAROIT, D., SILVEIRA, S. T., HERTZ, P. F., BRANDELLI, A. (2007). Production of extracellular β -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. *Process Biochemistry*, 42, 904–908.
7. FRANCIS, F., SABU, A. K., NAMPOOTHIRI, M., RAMACHANDRAN, S., GHOSH, S., SZAKACS, G., PANDEY, A. (2003). Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15, 107–115.
8. GEORGETTI, S.R., VICENTINI, F.T.M.C., YOKOYAMA, C.Y., BORIN, M.F., SPADARO, A.C.C., FONSECA, M.J.V. (2009). Enhanced *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different β -glucosidase-producing fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 459-466.
9. IZUMI, T., PISKULA, M.K., OSAWA, S., OBATA, A., TOBE, K. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition*, 130, 1695-1699.
10. LANGSTON, J., SHEEHY, N., XU, F. (2006). Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3 β -glucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 972-978.
11. LAVUDI, S., HARINDER, S. O., M.LAXIMI, N. (2003). Studies on cellulase production by solid state fermentation using sweet sorghum bagasse. *Helix*, 1, 261-266.

12. LEE , I-HSIN, CHOU, CHENG-CHUN. (2006). Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1309-1314.
13. LEE, YU-LING, YANG, JOAN-HWA, MAU, JENG-LEUN (2008). Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. *Food Chemistry*, 106, 1128–1137.
14. LIU, K. (1997). *Soybeans: chemistry, technology and utilization*. IPT.
15. LONSANE, B. K., GHILDYAL, N. P., BUDIATMAN, S., RAMAKRISHNAT, S. V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7, 258-265.
16. MACHIDA, M., YAMADA, O., GOMI, K. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Research*, 15, 173–183.
17. MATSUURA, M., OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal Food Science*, 58(1), 144-147, 1993.
18. NISHIO, N., TAI, K. and NAGAI, S (1979). Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 8, 263-270.
19. OTIENO, D.O., ASHTON, J.F., SHAH, N.P. (2006). Evaluation of enzymic for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 39, 394–407.
20. PARK, Y.K., ALENCAR, S.M., NERY, I.A., AGUIAR, C.L. E PACHECO, T.A.R.C. (2001). Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. *Food and Science Industry*, 34, 14-19.
21. PHAM, T. T., SHAH, N. P. (2009). Hydrolysis of isoflavone glycosides in soy milk by β -galactosidase and β -glucosidase. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 38–60.
22. QIAN, LI-CHUN, FU, SHI-JUN, ZHOU, HONG-ME, SUN, JIAN-YI, WENG, XIAO-YAN. (2012). Optimization of fermentation parameters for β -glucosidase production by *Aspergillus niger*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(5), 583-591.

23. SEN, R., SWAMINATHAN, T. (1997). Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 358-363.
24. SILVA, L. H., CELEGHINI, R. M.S., CHANG, Y. K. (2011). Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. *Food Chemistry*, 128, 640–644.
25. SOLOVYEVA I.V., ANANJIN V.M., BOEV A.V, OKUNEV O.N. (1997). The controlled biosynthesis of cellobiase by *Aspergillus* fungi. *Process Biochemistry*. 32, 21–28.
26. VILLARES, A., ROSTAGNO, M. A., GARCÍA-LAFUENTE, A., GUILLAMÓN, E. J., MARTÍNEZ, A. (2011). Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. *Food Bioprocess Technology*, 4, 27-38.
27. WANG, H.-J., MURPHY, P. A. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1666–1673.
28. WARD, P. O. (1991). *Biotechnology de la fermentacion*. Zaragoza, Acribia.
29. YADAV, J.S. (1988) SSF of wheat straw with alkaliphilic *Coprinus*. *Biotechnology and bioengineering*, 31, 414–417.
30. YOSHIARA, L. Y., MADEIRA, T. B., DELAROZA, F., SILVA, J. B., IDA, E. I. (2012). Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 9, 978-986.

Tabela 1

Variáveis independentes e níveis de variação do PCCR

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Níveis de variação</i>				
	<i>-1,68</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1,68</i>
X ₁ = pH inicial da FSD	5,2	5,5	6	6,5	6,8
X ₂ = mL de água adicionada à FSD	2	5	10	15	18
X ₃ = temperatura (°C) de incubação	13	20	30	40	47

Tabela 2

Planejamento fatorial central composto rotacional para fermentação das FDS fermentadas com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 e funções-respostas Y_A e Y_M

Ensaio	Variáveis independentes codificadas e não codificadas			Funções respostas	
	x_1 (X_1)	x_2 (X_2)	x_3 (X_3)	Y_A	Y_M
1	-1(5,5)	-1(5)	-1(20)	0,000	0,122
2	-1(5,5)	-1(5)	+1(40)	0,015	0,128
3	-1(5,5)	+1(15)	-1(20)	0,000	0,000
4	-1(5,5)	+1(15)	+1(40)	0,152	0,216
5	+1(6,5)	-1(5)	-1(20)	0,000	0,008
6	+1(6,5)	-1(5)	+1(40)	0,408	0,007
7	+1(6,5)	+1(15)	-1(20)	0,021	0,000
8	+1(6,5)	+1(15)	+1(40)	0,282	0,122
9	0(6,0)	0(10)	0(30)	2,496	0,200
10	0(6,0)	0(10)	0(30)	2,598	0,202
11	0(6,0)	0(10)	0(30)	2,867	0,209
12	-1,68(5,2)	0(10)	0(30)	3,641	0,187
13	+1,68(6,8)	0(10)	0(30)	3,142	0,075
14	0(6,0)	-1,68(2)	0(30)	0,003	0,003
15	0(6,0)	+1,68(18)	0(30)	1,602	0,240
16	0(6,0)	0(10)	-1,68(13)	0,005	0,000
17	0(6,0)	0(10)	+1,68(47)	0,007	0,010
18	0(6,0)	0(10)	0(30)	2,321	0,281
19	0(6,0)	0(10)	0(30)	2,826	0,280
20	0(6,0)	0(10)	0(30)	2,717	0,214

X_1 (pH inicial das FSD); X_2 (mL de água adicionada às FSD); X_3 ($^{\circ}$ C de incubação) e Y_A ou Y_M (Y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g^{-1} de amostra ou Y_M = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 g^{-1} de amostra).

Tabela 3ANOVA para atividade de β -glicosidase produzida por *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 - Bloco exploratório

	Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	p-valor*
Y_A	Curvatura	14,1218	1	14,1218	384,104	0,003
	X ₁	0,0371	1	0,0371	1,009	0,421
	X ₂	0,0001	1	0,0001	0,003	0,959
	X ₃	0,0874	1	0,0874	2,378	0,263
	X ₁ .X ₂	0,0073	1	0,0073	0,198	0,700
	X ₁ .X ₃	0,0316	1	0,0316	0,859	0,452
	X ₂ .X ₃	0,0000	1	0,0000	0,000	0,987
	X ₁ .X ₂ .X ₃	0,0100	1	0,0100	0,271	0,654
	Resíduo	0,0735	2	0,0368		
	Total	14,3688	10			
Y_M	Curvatura	0,0360	1	0,0360	1549,380	0,001
	X ₁	0,0135	1	0,0135	579,832	0,002
	X ₂	0,0007	1	0,0007	28,726	0,033
	X ₃	0,0147	1	0,0147	632,628	0,002
	X ₁ .X ₂	0,0025	1	0,0025	106,640	0,009
	X ₁ .X ₃	0,0012	1	0,0012	53,323	0,018
	X ₂ .X ₃	0,0139	1	0,0139	597,787	0,002
	X ₁ .X ₂ .X ₃	0,0010	1	0,0010	41,613	0,023
	Resíduo	0,0000	2	0,0000		
	Total	0,0834	10			

$$R^2_A = 0,99; R^2_M = 0,99$$

* significativo ($p < 0,05$) x_1 = pH inicial da FSD; x_2 = água adicionada à FSD (mL); x_3 = temperatura de incubação ($^{\circ}$ C), (Y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g^{-1} de amostra ou Y_M = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 g^{-1} de amostra), R^2 : coeficiente de determinação.

Tabela 4

Teor de isoflavonas das FSD fermentadas com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 e controles

Isoflavonas ($\mu\text{g/g}$)	<i>Monascus purpureus</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>	
	Controle	FSD ferm.	Controle	FSD ferm.
Daidzina	284,603 \pm 3,407 ^a	0,294 \pm 0,449 ^b	270,608 \pm 18,673 ^a	142,112 \pm 15,491 ^b
Genistina	697,800 \pm 18,600 ^a	211,176 \pm 8,460 ^b	699,806 \pm 56,468 ^a	488,444 \pm 34,337 ^b
Glicitina	110,308 \pm 0,442 ^a	27,474 \pm 0,047 ^b	109,444 \pm 4,936 ^a	87,142 \pm 3,316 ^b
Malonil Daidzina	151,834 \pm 1,612	162,955 \pm 8,438	200,859 \pm 7,799	194,183 \pm 9,971
Malonil genistina	324,884 \pm 12,398	374,005 \pm 28,376	483,384 \pm 23,624	475,640 \pm 31,267
Acetil daidzina	117,288 \pm 4,435 ^a	ND ^b	112,953 \pm 4,357 ^a	90,096 \pm 6,535 ^b
Acetil genistina	132,156 \pm 2,230 ^a	54,069 \pm 2,887 ^b	108,900 \pm 7,174 ^a	90,597 \pm 5,551 ^b
Daidzeína	8,209 \pm 0,614 ^b	88,656 \pm 1,553 ^a	14,432 \pm 1,827 ^b	42,416 \pm 4,884 ^a
Genisteína	147,064 \pm 1,484 ^b	693,517 \pm 11,260 ^a	185,574 \pm 10,014 ^b	320,132 \pm 25,938 ^a
Agliconas totais	155,273 \pm 2,098 ^b	782,173 \pm 12,813 ^{Aa}	200,006 \pm 11,841 ^b	362,548 \pm 30,82 ^{Ba}
TOTAL	1974,147 \pm 45,222 ^a	1617,072 \pm 61,978 ^b	2185,958 \pm 134,872 ^a	1930,762 \pm 137,289 ^b

Média de três repetições e desvio padrão \pm DP, liofilizada.

Letras minúsculas diferentes representa diferença significativa entre a FSD fermentada e seu respectivo controle ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes para agliconas totais representa diferença significativa entre as FSD fermentadas ($p < 0,05$). ND= não detectado.

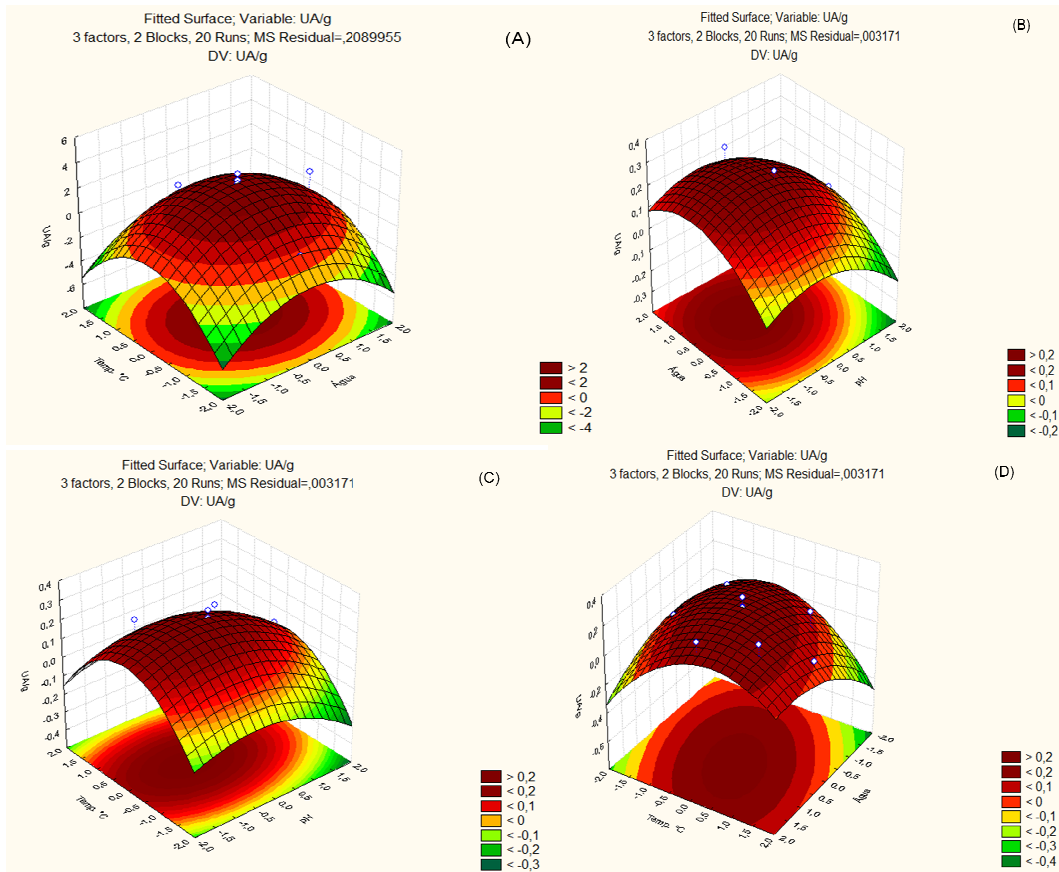


Figura 1. Superfície de resposta: (A) UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g^{-1} de amostra, sendo X_1 (pH inicial da FSD) fixo em 6,0. (B, C e D) UA de β -glicosidase da FSD fermentada com *Monascus purpureus* g^{-1} de amostra, sendo (B) X_3 (temperatura de incubação) fixa em 30°C ; (C) X_2 (mL de água adicionada à FSD) fixo em 10 mL e (D) X_1 (pH inicial da FSD) fixo em 6,0.

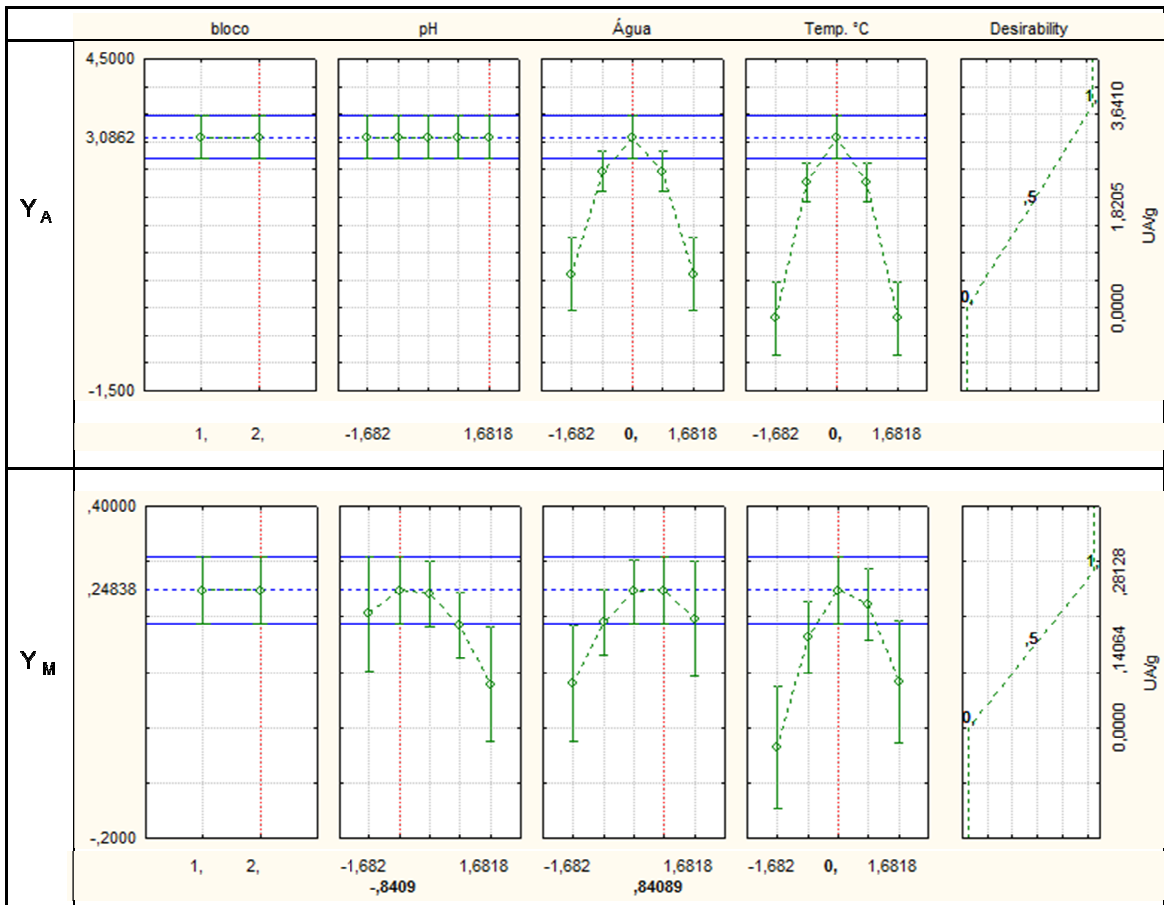


Figura 2. Parâmetro de desejabilidade estimado na condição de máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase (Y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g^{-1} de amostra ou Y_M = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 g^{-1} de amostra).

6 CONCLUSÃO

Para máxima produção de enzima com atividade de β -glicosidase por fermentação em estado sólido de FSD com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 deve-se utilizar 10 mL de água adicionada à 10 g FSD, temperatura de incubação de 30 °C e pH inicial da FSD de 6,0, sendo que o pH para *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 foi independente no intervalo de pH entre 5,2 e 6,8.

Nas mesmas condições de fermentação em estado sólido de FSD o *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 produziu enzima com atividade de β -glicosidase 10,7 vezes superior ao *Monascus purpureus* NRRL 1992. Entretanto, a fermentação da FSD o *Monascus purpureus* NRRL 1992 foi mais eficiente na bioconversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Análise de regressão do planejamento fatorial 2^3 para produção de enzima com atividade de β -glicosidase.

Análise de regressão - Modelo linear

	Variável Independente	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(9)	p-valor *
Y_A	Média	0,804	0,656	1,225	0,308
	x_1	0,068	0,769	0,089	0,935
	x_2	0,004	0,769	0,005	0,996
	x_3	0,105	0,769	0,136	0,900
	$x_1 \cdot x_2$	-0,030	0,769	-0,039	0,971
	$x_1 \cdot x_3$	0,063	0,769	0,082	0,940
	$x_2 \cdot x_3$	-0,001	0,769	-0,002	0,999
	$x_1 \cdot x_2 \cdot x_3$	-0,035	0,769	-0,046	0,966
Y_M	Média	0,110	0,033	3,341	0,044
	x_1	-0,041	0,039	-1,059	0,367
	x_2	0,009	0,039	0,236	0,829
	x_3	0,043	0,039	1,106	0,349
	$x_1 \cdot x_2$	0,018	0,039	0,454	0,681
	$x_1 \cdot x_3$	-0,012	0,039	-0,321	0,769
	$x_2 \cdot x_3$	0,042	0,039	1,075	0,361
	$x_1 \cdot x_2 \cdot x_3$	-0,011	0,039	-0,284	0,795
$R^2_A = 0,01$; $R^2_M = 0,56$					

* significativo ($p < 0,05$) x_1 = pH inicial da FSD; x_2 = água adicionada à FSD (mL); x_3 = temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$), Y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g^{-1} de amostra ou Y_M = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 g^{-1} de amostra

APÊNDICE B

Análise de regressão do planejamento fatorial 2^3 com efeito da curvatura para produção de enzima com atividade de β -glicosidase.

Análise de regressão com efeito da curvatura - Modelo linear

	Variável Independente	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(9)	p-valor *
Y _A	Média	0,110	0,068	1,620	0,247
	Curvatura	2,544	0,130	19,599	0,003
	X ₁	0,068	0,068	1,005	0,421
	X ₂	0,004	0,068	0,058	0,959
	X ₃	0,105	0,068	1,542	0,263
	X ₁ .X ₂	-0,030	0,068	-0,445	0,700
	X ₁ .X ₃	0,063	0,068	0,927	0,452
	X ₂ .X ₃	-0,001	0,068	-0,018	0,987
	X ₁ .X ₂ .X ₃	-0,035	0,068	-0,521	0,654
Y _M	Média	0,075	0,002	44,242	0,001
	Curvatura	0,128	0,003	39,362	0,001
	X ₁	-0,041	0,002	-24,080	0,002
	X ₂	0,009	0,002	5,360	0,033
	X ₃	0,043	0,002	25,152	0,002
	X ₁ .X ₂	0,018	0,002	10,327	0,009
	X ₁ .X ₃	-0,012	0,002	-7,302	0,018
	X ₂ .X ₃	0,042	0,002	24,450	0,002
	X ₁ .X ₂ .X ₃	-0,011	0,002	-6,451	0,023
$R^2_A = 0,99$; $R^2_M = 0,99$					

* significativo ($p < 0,05$) x_1 = pH inicial da FSD; x_2 = água adicionada à FSD (mL); x_3 = temperatura de incubação ($^{\circ}$ C), Y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g^{-1} de amostra ou Y_M = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 g^{-1} de amostra.

APÊNDICE C

Análise de variância (ANOVA) do planejamento composto central rotacional 2^3 para produção de enzima com atividade de β -glicosidase.

ANOVA para produção de enzima com atividade de β -glicosidase produzida por *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 - Modelo quadrático.

	Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	p-valor*
	Bloco	3,188	1	3,188	10,710	0,010
	X ₁	0,006	1	0,006	0,021	0,887
	X ₁₂	0,026	1	0,026	0,089	0,772
	X ₂	0,542	1	0,542	1,820	0,210
	X ₂₂	10,916	1	10,916	36,672	0,000
Y _A	X ₃	0,052	1	0,052	0,173	0,687
	X ₃₂	19,100	1	19,100	64,169	0,000
	X ₁ .X ₂	0,007	1	0,007	0,024	0,879
	X ₁ .X ₃	0,032	1	0,032	0,106	0,752
	X ₂ .X ₃	0,000	1	0,000	0,000	0,995
	Resíduo	2,679	9	0,298		
	Total	36,412	19			
	Bloco	0,002	1	0,002	0,567	0,471
	X ₁	0,019	1	0,019	7,060	0,026
	X ₁₂	0,018	1	0,018	6,411	0,032
	X ₂	0,016	1	0,016	5,898	0,038
	X ₂₂	0,021	1	0,021	7,664	0,022
Y _M	X ₃	0,010	1	0,010	3,451	0,096
	X ₃₂	0,091	1	0,091	32,873	0,000
	X ₁ .X ₂	0,002	1	0,002	0,898	0,368
	X ₁ .X ₃	0,001	1	0,001	0,449	0,520
	X ₂ .X ₃	0,014	1	0,014	5,036	0,051
	Resíduo	0,025	9	0,003		
	Total	0,205	19			

$$R^2_A = 0,93; R^2_M = 0,88$$

* significativo ($p < 0,05$) x₁= pH inicial da FSD; x₂= água adicionada à FSD (mL); x₃= temperatura de incubação (°C), Y_A = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g⁻¹ de amostra ou Y_M = UA de β -glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 g⁻¹ de amostra

APÊNDICE D

Análise de regressão do planejamento composto central rotacional 2³ para produção de enzima com atividade de β-glicosidase.

Análise de regressão para produção de enzima com atividade de β-glicosidase produzida por *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 ou *Monascus purpureus* NRRL 1992 - Modelo quadrático.

	Variável Independente	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(9)	p-valor *
	Média	2,650	0,223	11,901	0,000
	Bloco	0,404	0,123	3,273	0,010
	X ₁	-0,022	0,148	-0,146	0,887
	X ₁₂	0,043	0,144	0,298	0,772
	X ₂	0,199	0,148	1,349	0,210
Y _A	X ₂₂	-0,872	0,144	-6,056	0,000
	X ₃	0,061	0,148	0,416	0,687
	X ₃₂	-1,154	0,144	-8,011	0,000
	X ₁ .X ₂	-0,030	0,193	-0,156	0,879
	X ₁ .X ₃	0,063	0,193	0,326	0,752
	X ₂ .X ₃	-0,001	0,193	-0,006	0,995
	Média	0,231	0,021	10,762	0,000
	Bloco	0,009	0,012	0,753	0,471
	X ₁	-0,038	0,014	-2,657	0,026
	X ₁₂	-0,035	0,014	-2,532	0,032
	X ₂	0,035	0,014	2,428	0,038
Y _M	X ₂₂	-0,038	0,014	-2,768	0,022
	X ₃	0,026	0,014	1,858	0,096
	X ₃₂	-0,080	0,014	-5,734	0,000
	X ₁ .X ₂	0,018	0,019	0,948	0,368
	X ₁ .X ₃	-0,012	0,019	-0,670	0,520
	X ₂ .X ₃	0,042	0,019	2,244	0,051
R ² _A = 0,99; R ² _M = 0,99					


* significativo (p<0,05) x₁= pH inicial da FSD; x₂= água adicionada à FSD (mL); x₃= temperatura de incubação (°C), Y_A = UA de β-glicosidase de FSD fermentada com *Aspergillus oryzae* IOC 3999/1998 g⁻¹ de amostra ou Y_M = UA de β-glicosidase de FSD fermentada com *Monascus purpureus* NRRL 1992 g⁻¹ de amostra.

APÊNDICE E

Resumos apresentados em congressos

RESUMO 1: XVI World Congress of Food Science and Technology, IUFOST.

SONICATION AND VORTEXING EXTRACTION OF SOY ISOFLAVONES



16TH IUFOST - WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
XVII ALACCTA - LATIN AMERICAN SEMINAR OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
AUGUST 5 - 9, 2012. FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ, BRAZIL

Sonication and Vortexing Extraction of Soy Isoflavones

Cintia L. Handa, Luciane Y. Yoshiara, Josemeyre B. da Silva, Elza I. Ida[†]
Dept. of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. *elida@uel.br

Introduction

Twelve free and conjugated forms of isoflavones have been isolated from different soybean samples. The isoflavone forms have a wide variation in polarities, thus development of an adequate extraction procedure for all isoflavones has been a challenging task. The objective of this study was to compare vortexing and sonication extraction for soy isoflavones determination

Materials and Methods

Defatted flour soybean were extracted with a mixture of solvents (water : acetone : ethanol, 1:1:1, v/v/v) during 10, 30, 45 and 60 min at room temperature by sonication and vortexing. The isoflavones separation and quantification was performed using a Waters Acquity UPLC® system (reverse phase column Acquity UPLC® BEH C18, 2.1 mm x 50.0 mm x 1.7 µm particles) and injections of 1.4 µL with a non-linear gradient and an initial phase of 90%/10% (A/B). Total run time was 12 min, the flow rate, 0.7 mL min⁻¹ and temperature was 35°C. The results were compared by tukey test

Results and Discussion

Table 1: Isoflavone content extracted by different methods extraction for different times

Extraction Method	Extraction Time (min)	Isoflavones mg 100g ⁻¹
Sonication	60	153,45 ± 0,77 ^a
Sonication	45	150,33 ± 0,52 ^b
Sonication	30	147,52 ± 0,21 ^c
Sonication	10	147,46 ± 1,57 ^c
Vortexing	60	146,43 ± 0,63 ^{cd}
Vortexing	30	145,05 ± 1,16 ^d
Vortexing	45	144,10 ± 0,69 ^{de}
Sonication	20	142,28 ± 0,81 ^e
Vortexing	10	138,37 ± 0,35 ^f
Vortexing	20	135,32 ± 0,60 ^g

Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05) by the Tukey test.

The extraction by vortexing for 30 min and 45 min did not show difference (145.19 mg 100 g⁻¹) as well as sonication for 30 min and 10 min and vortexing for 60 min (147.14 mg 100 g⁻¹) (Table 1).

The lowest level was observed by vortexing for 10 min (138.37 mg 100 g⁻¹) and the highest content of total isoflavones extracted (153.45 mg 100 g⁻¹) was obtained with extraction using sonication bath for 60 min. However, the proportion of isoflavones forms (glycosil, malonyl, acetyl and aglycones) did not change for all procedures and extraction times (Table 2).

Table 2: Proportion of isoflavone forms extracted by different methods for different times

Extraction Method	Extraction Time (min)	% Isoflavone form			
		Glycosidic	Malonyl glycosidic	Acetyl glycosidic	Aglycone
Sonication	60	39,5 ^a	43,8 ^a	5,5 ^a	11,2 ^a
Sonication	45	39,2 ^a	44,0 ^a	5,6 ^a	11,2 ^a
Sonication	30	39,6 ^a	43,6 ^a	5,5 ^a	11,3 ^a
Sonication	10	39,0 ^a	43,9 ^a	5,5 ^a	11,6 ^a
Vortexing	60	39,3 ^a	43,8 ^a	5,6 ^a	11,3 ^a
Vortexing	30	39,4 ^a	43,8 ^a	5,5 ^a	11,3 ^a
Vortexing	45	39,4 ^a	43,8 ^a	5,5 ^a	11,3 ^a
Sonication	20	39,1 ^a	43,9 ^a	5,5 ^a	11,5 ^a
Vortexing	10	39,1 ^a	43,7 ^a	5,5 ^a	11,7 ^a
Vortexing	20	39,6 ^a	43,4 ^a	5,5 ^a	11,5 ^a

Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05) by the Tukey test.

Similar results were found by Rostagno et al. (2003) who concluded that sonication is better than mix-stirring for isoflavone extractions when investigated the efficiency in extracting four isoflavone derivatives (daidzin, glycitin, genistin and malonyl genistin) from freeze-dried ground soybeans comparing mix-stirring extraction and ultrasound-assisted extraction, with different solvents and extraction temperatures with both.

Conclusion

For the extraction of soy isoflavones, the sonication method proved to be more advantageous for extracting more isoflavones and less time consuming

References


Yoshiara D, Madeira TB, Delarosa F, Silva JB, Ida EI. 2012. Int. J. Food Sci. Nutr. [Epub ahead of print]. DOI: 10.3109/09637486.2012.690026.
Berhow MA. 2002. Kluwer Academic, Plenum Publishers. v.505, p.61-76.
Fukutake M, Takahashi H, Ishida K, Kawamura H, Sugimura T, Wakabayashi K. 1996. Food and Chemical Toxicology. 34(5), 457-461.
Cunha-Pereira MC, Favari SP, Kikuchi A. 2002. Braz Arch Bio/Technol 45:515-518
Griffith AP, Collison MW. 2001. J Chromatogr A 913: 397-413
Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. 2003. J Chromatogr A 1012:119-128.

Acknowledgements




RESUMO 2: XVI World Congress of Food Science and Technology, IUFOST.

FERMENTATION OF DEFATTED SOYBEAN FLOUR WITH *MONASCUS PURPUREUS* AS A BIOPROCESS TO ENHANCE AGLYCONE ISOFLAVONES CONTENT



16th World Congress of Food Science and Technology – IUFOST
XVII Latin American Seminar of Food Science and Technology - ALACCTA



Fermentation of Defatted Soybean Flour with *Monascus purpureus* as a Bioprocess to Enhance Aglycone Isoflavones Content

HANDA, C. L., YOSHIARA, L. Y., SILVA, J. B., COUTO, U. R., VICENSOTI, A. H., PAULINO, H. H., GEORGETTI, S. R., IDA, E. I.
Graduate Program in Food Science and Technology of The State University of Londrina - UEL - Rod. Celso Garcia Cid, Km 330 - Zip Code: 86051-990, Londrina, PR, Brazil.
e-mail: dritellanda@gmail.com

Introduction

The soybean powder contains polyphenols such as isoflavonoids in different glucosides and aglycones forms. The highest biological activity and absorption of soybean polyphenols are related to the presence of aglycones forms. Fermentation process can be an alternative for glycoside isoflavones conversion into aglycones achieved by the catalytic action of β -glucosidase. The aim of this work was to investigate the effect of fermentation process with *Monascus purpureus* on defatted soybean flour (DSF) for the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones.

Results and Discussion

The results demonstrated that the fermentation process of the DSF induced β -glucosidase production by fungus and showed statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with DSF and control (Table 1). The highest aglycones content was observed in the fermented DSF suggesting that fungus β -glucosidase might have hydrolysed β -glucosidic linkages, mobilizing aglycones forms (Figure 1).

Table 1- β -glucosidase activity and percentage of aglycone isoflavones.

Parameters	Fermented DSF	DSF	Control
β -glucosidase activity (UA g ⁻¹)	150.62±0.38	39.80±1.06*	24.22±0.04*
Aglycone isoflavones	82.08%	14%	17.24%

* SEM (standard deviation mean)
* Significant (P < 0.05) when compared with fermented DSF

Methodology

For the semi-solid fermentation process (GEORGETTI *et al.*, 2006), the DSF was dispersed with distilled water (1:1; w/v), initial pH 6.0 and sterilized at 121°C for 20 min after being inoculated with *Monascus purpureus* (10⁷ spores ml⁻¹). A control was prepared without inoculum. The bioprocess was monitored by the β -glucosidase activity using p-NPG as substrate (MATSUURA, OBATA, 1993). For the analysis of the isoflavones (YOSHIARA, *et al.*, 2012), the samples were defatted with hexane solvent for 30 min at room temperature and vacuum filtered. The extraction was realized with organic solvent comprising water, acetone and acetonitrile (1:1:1, v/v/v). The samples were placed in ultrasonic bath with controlled temperature of 60°C for 10 min and then centrifuged and filtered through Millex filter - LH (0.20 μ m). The separation and quantification of the isoflavones were conducted in reverse phase column model ACQUITY - UPLC BEH C18 (Waters, 2.1 mm x 50 mm, particle size of 1.7 μ m) with a non-linear gradient with an initial phase of 90%/10% acidified water/acetonitrile. Total run time was 12 min, the flow rate, 0,7 mL min⁻¹ and 35°C, using a Ultra Performance Liquid Chromatograph UPLC (Waters ACQUITY) with automatic injectors. For detection were used the diode array detector (Waters) with wavelength of 260 nm. The isoflavones were separated and then quantified according to standard references.

References

GEORGETTI, S. R.; CUNHA GRUNDE, R.; VICENSOTI, A. H.; VERRI JUNIOR, W. A.; FONSECA, M. V. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different *in vitro* methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, v.41, p. 99-104, 2004.




MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal Food Science*, v.26, n.1, p.141-147, 1992.

YOSHIARA, L. Y.; MOURA, T. S.; DEL ROSO, F.; SILVA, J. B.; IDA, E. I. Otimização da extração de isoflavonas com diferentes solventes usando o planejamento fatorial. *Revista de Ciências Exatas e da Saúde*, v.10, n.1, p. 1-10, 2012.

Conclusion

The fermentation process resulted in an increase in the levels of isoflavone aglycones of approximately 5.86 times as compared to the DSF. Therefore, the fungus *M. purpureus*, by producing the enzyme β -glucosidase, promoted the transformation of isoflavone glycoside into aglycones forms.

Acknowledgements

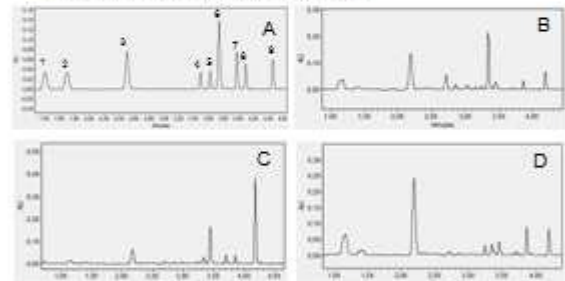


Figure 1- Chromatographic profiles of the isoflavones by UPLC: Standards (A), DSF (B), Fermented DSF (C) and Control (D). 1- Daidzin; 2- Glycitin; 3- Genistin; 4- Acetyl daidzin; 5- Acetyl glycitin; 6- Daidzein; 7- Glycitein; 8- Acetyl genistin and 9- Genistein.

RESUMO 3: XXI Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC

**DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS
COMERCIAIS DE SOJA**



**DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS
COMERCIAIS DE SOJA**

Uenifer Rodrigues Couto ⁽¹⁾, Cíntia Ladeira Handa ⁽²⁾, Josemeyre Bonifácio da Silva ⁽³⁾,
Elza Louko Ida ⁽⁴⁾. E-mail: elida@uel.br

⁽¹⁾Graduando do 2º ano do curso de bacharelado em química, Universidade Estadual de Londrina; ⁽²⁾Mestranda em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina; ⁽³⁾Pós-doutoranda em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina; ⁽⁴⁾Profª. Dra., Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

Área e subárea: Ciências Agrárias/Ciência e Tecnologia de Alimentos

Palavras-chave: Fenólicos, DPPH, ABTS⁺

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar o teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante pelos métodos ABTS⁺ e DPPH de produtos comerciais de soja. O Extrato Aquoso de Soja (EAS) apresentou o maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelo ensaio do ABTS⁺ enquanto que a Soja Ervas Finas (SEF), os menores teores de fenólicos e de capacidade antioxidante. A Proteína Texturizada de Soja (PTS) apresentou a maior atividade antioxidante pelo método de DPPH. Os resultados do presente trabalho sugerem que processamento da soja pode proporcionar alterações nas propriedades antioxidantes.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max (L.) Merrill*) tem origem atribuída ao continente asiático, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial. No passado, os grãos de soja destinavam-se principalmente à produção de óleo e de ração animal. Atualmente, os grãos de soja são utilizados na produção de diversos alimentos como missô, natto, extrato

solúvel, tofu, farinha de soja integral, proteína texturizada, concentrados e isolados protéicos. A soja tem recebido especial atenção devido à presença de compostos fenólicos que promovem efeitos benéficos à saúde humana. Esses efeitos benéficos, em grande parte, são devido à sua capacidade antioxidante. Antioxidantes são substâncias naturais ou sintéticas que agem no sentido de prevenir ou retardar a oxidação de diversos substratos, evitando o início da reação em cadeia. A atividade antioxidante de compostos fenólicos se dá por sua capacidade de sequestrar radicais livres e/ou capturar íons metálicos, catalisadores de reação lipídica. Diferentes métodos de avaliação são necessários para determinar a capacidade antioxidante total, pois nem todos os antioxidantes se comportam da mesma forma. Os ensaios de capacidade antioxidante podem ser classificados com base nas reações químicas envolvidas, tais como os de transferência de elétrons (TE) e os de transferência de átomo de hidrogênio (TAH). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH (TAH) e ABTS⁺ (TE) de produtos comerciais de soja.

Materiais e métodos

Para as análises foram adquiridos em supermercado local em Londrina/PR, os seguintes produtos de soja: Soja Ervas Finas (SEF) da Macrovida Produtos Naturais; Soja Grão (SG) da Macrovida Produtos Naturais; Soja Cozida à Vapor (SCV) da Yoki Alimentos S.A.; Fibra e Gérmen de Soja (FGS) da Visoy; Farinha de Soja Integral (FSI) da Visoy; Proteína de Soja Texturizada (PST) da Vitao e Extrato Aquoso de Soja (EAS) da Yoki Alimentos S.A. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os compostos fenólicos foram determinados conforme descrito por Hung *et al.*, (2009) e quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Swain e Hillis (1959). Os resultados foram expressos como mg Equivalentes de Ácido Gálico por 100 g de amostra em base seca (mg EAG/100g b.s.). A capacidade doadora de átomos de hidrogênio ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada segundo Casagrande *et al.*, (2007). A mudança na absorbância foi medida após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e os resultados foram expressos em porcentagem (%) de atividade antioxidante. A capacidade sequestradora do radical **2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)** (ABTS⁺) foi determinada de acordo com Sanchez-Gonzales *et al.*, (2005). Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de atividade antioxidante. O teor de umidade foi determinado conforme com os procedimentos analíticos da AOAC (1995). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Resultados e Discussão

O Extrato Aquoso de Soja (EAS) apresentou maior teor de compostos fenólicos e conteúdo de umidade (92,40%) (Tabela 1). Enquanto que a Soja Ervas Finas (SEF) mostrou o menor teor de fenólicos e atividade antioxidante tanto pelo método do ABTS⁺ quanto pelo DPPH. A Soja Cozida à vapor (SCV) e Farinha de Soja Integral (FSI) não diferiram entre si quanto ao teor de fenólicos. A Proteína Texturizada de Soja (PTS) apresentou maior capacidade antioxidante pelo método do DPPH e o Extrato Aquoso de Soja (EAS), a maior capacidade antioxidante pelo ensaio de ABTS⁺. Em ambos os métodos, a Soja Ervas Finas (SEF) apresentou a menor atividade.

Tabela 1 - Conteúdo de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e umidade¹.

Amostra	Fenólicos (mg EAG/100g b.s)	DPPH (% AA)	ABTS ⁺ (% AA)	Umidade (%)
SEF	59,90 ± 0,25 ^f	6,50 ± 0,29 ^e	15,80 ± 0,71 ^d	2,66 ± 0,33
SG	144,95 ± 0,53 ^e	20,53 ± 0,40 ^d	35,53 ± 0,51 ^c	9,98 ± 0,12
SCV	182,02 ± 1,39 ^d	20,33 ± 0,40 ^d	61,02 ± 2,08 ^a	66,27 ± 0,06
FGS	228,25 ± 0,58 ^b	28,44 ± 1,55 ^c	45,21 ± 1,59 ^b	6,63 ± 0,20
FSI	182,83 ± 0,35 ^d	26,77 ± 0,62 ^c	44,64 ± 1,29 ^b	5,40 ± 0,20
PST	209,37 ± 1,69 ^c	33,91 ± 0,29 ^a	47,96 ± 0,62 ^b	7,75 ± 0,18
EAS	300,00 ± 3,56 ^a	31,47 ± 0,51 ^b	62,60 ± 1,07 ^a	92,40 ± 0,03

¹Resultados apresentados como média de 3 repetições ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% (p<0,05).

De acordo com a Figura 1, pode-se observar que a atividade antioxidante (método ABTS⁺ e DPPH) nem sempre aumenta com o aumento do teor de compostos fenólicos.

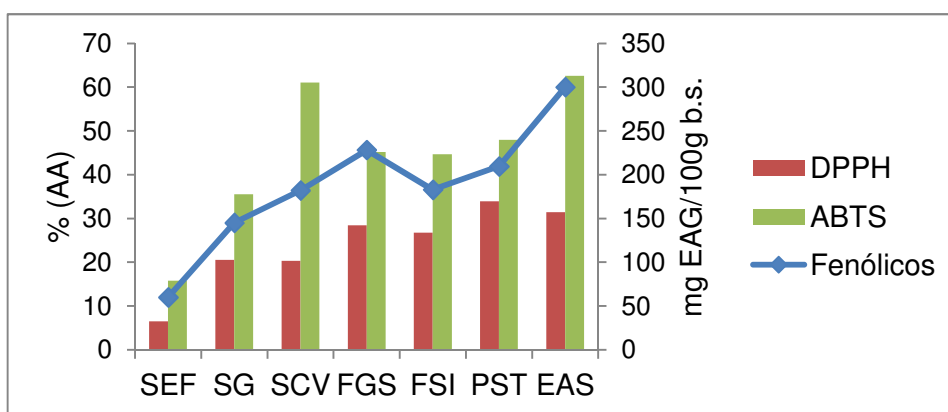


Figura 1 – Atividade antioxidante (DPPH e ABTS - %AA) em relação ao teor de fenólicos (mg EAG/100g b.s)

Conclusões

O processamento da soja provoca alterações no teor de fenólicos e na atividade antioxidante.

Agradecimentos

Ao programa CNPq/PIBIC pelo financiamento do projeto de pesquisa e concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Referências

- A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16 ed.; Arlington, v.2, 1995.
- HUNG, P. V.; MAEDA, T.; MIYATAKE, K.; MORITA, N. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 185-190, 2009.

- SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The Phenolic constituents of *Prunus Domestica*. I. - The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A., JR; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183-190, 2007.
- 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.