



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARA LUCIA LUIZ RIBEIRO

**TEOR DE ISOFLAVONAS E ATIVIDADE DE β -
GLUCOSIDASE EM GRÃOS DE SOJA GERMINADA E DE
DIFERENTES GRUPOS DE MATURAÇÃO. PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA β -
GLUCOSIDASE**

Londrina
2006

MARA LUCIA LUIZ RIBEIRO

**TEOR DE ISOFLAVONAS E ATIVIDADE DE β -
GLUCOSIDASE EM GRÃOS DE SOJA GERMINADA E DE
DIFERENTES GRUPOS DE MATURAÇÃO. PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA β -
GLUCOSIDASE**

Londrina
2006

MARA LUCIA LUIZ RIBEIRO

**TEOR DE ISOFLAVONAS E ATIVIDADE DE β -
GLUCOSIDASE EM GRÃOS DE SOJA GERMINADA E DE
DIFERENTES GRUPOS DE MATURAÇÃO. PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA β -
GLUCOSIDASE**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Elza Louko Ida

Londrina
2006

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R484t Ribeiro, Mara Lúcia Luiz.
Teor de isoflavonas e atividade de β -glucosidase em grãos de soja germinada e de diferentes grupos de maturação. Purificação e caracterização bioquímica parcial da β -glucosidase / Mara Lúcia Luiz Ribeiro. – Londrina, 2006.
115f. : il.

Orientador : Elza Iouko Ida.
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2006.
Inclui bibliografia.

1. Isoflavonas – Teses. 2. Soja – Maturação – Teses. 3. Germinação – Teses. 4. β -glucosidase – Purificação e caracterização – Teses. I. Ida, Elza Iouko. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 641.002.61

MARA LUCIA LUIZ RIBEIRO

**TEOR DE ISOFLAVONAS E ATIVIDADE DE β -
GLUCOSIDASE EM GRÃOS DE SOJA GERMINADA E DE
DIFERENTES GRUPOS DE MATURAÇÃO. PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA β -
GLUCOSIDASE**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Elza Louko Ida
UEL/Londrina-PR

Prof^a. Dra. Marilde Luiz Bordignon
UFSC/Florianópolis-SC

Prof. Dr. Nehemias Curvelo Pereira
UEM/Maringá-PR

Prof. Dr. Deonísio Destro
UEL/Londrina-PR

Prof^a. Dra. Geni Varéa Pereira
UEL/Londrina-PR

Londrina, 30 de novembro de 2006.

*Para João Cláudio Santilli,
Companheiro de todas as horas,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Elza Louko Ida pela dedicação e competência na orientação deste trabalho e pela amizade e experiência de vida transmitida.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico/CNPq e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Massami Shimokomaki pela contribuição na minha formação.

A Embrapa pelo fornecimento das amostras e utilização de seus laboratórios e aos pesquisadores José Marcos Gontijo Mandarino, Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi, Maria Cristina Neves de Oliveira, Alexandre Lima Nepomuceno e Clara Beatriz Hoffmann Campo pelo apoio e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório Oswaldo Cruz - Análises Clínicas, Londrina-PR pelas análises de glucose.

Aos Docentes do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos desta Instituição pelos conhecimentos transmitidos e atenção dispensada.

Ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia desta Instituição pela liberação de minhas atividades para capacitação e formação à nível de Doutorado; à Dalva Tomoe Miyagui e Geni Varéa Pereira pela amizade e esclarecimentos prestados durante o desenvolvimento parcial de alguns experimentos; à Maria Helena Pimenta Pinoti e Elisabete Yurie Sataque Ono pela amizade e motivação; aos funcionários Elda Aparecida Jonas Aguiar, Nelson Janeiro Rodriguez e Sérgio do Nascimento Evangelista e a todos os funcionários do Departamento Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo atendimento em suas respectivas áreas de atuação.

A Therezinha Pereira e Maria de Lourdes L. Ribeiro de Assis, Mãe e Irmã, pela dedicação e carinho.

A todos que apoiaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

RIBEIRO, Mara Lucia L. **Teor de isoflavonas e atividade de β -glucosidase em grãos de soja germinada e de diferentes grupos de maturação. Purificação e caracterização bioquímica parcial da β -glucosidase.** 2006. 110f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

Isoflavonas da soja são compostos fenólicos classificados como agluconas, β -glucosídeos e β -glucosídeos conjugados com grupos malonil e acetil. A β -glucosidase (β -glucosídeo glucohidrolase, EC 3.2.1.21) hidrolisa isoflavonas β -glucosídicas com liberação de agluconas que possuem ação benéfica na saúde humana. O objetivo deste trabalho foi determinar o teor de isoflavonas, atividade de β -glucosidase e sua correlação em 18 cultivares de soja de diferentes dias de maturação semeados nas mesmas condições de cultivo. Experimentos foram realizados para observar o comportamento destes componentes na germinação de uma cultivar de soja (BRS 213), que apresentou a maior atividade da enzima, por 72 h a 25°C. Além disso, a β -glucosidase de cotilédones de soja foi purificada por cromatografia com caracterização bioquímica parcial. A análise de regressão não foi significativa entre número de dias de maturação e todas as formas de isoflavonas. A correlação não foi significativa entre dias de maturação e β -glucosídeos e malonil-glicosídeos. Entretanto, a correlação foi significativa ($P < 0,08$) entre dias de maturação e agluconas. As análises de regressão e correlação não foram significativas entre atividade de β -glucosidase e cultivares de diferentes dias de maturação e atividade de β -glucosidase não se correlacionou com o teor das formas de isoflavonas ($P < 0,05$). Em soja germinada, cultivar BRS 213, a atividade de β -glucosidase aumentou 3,3 vezes nas radículas e 2,3 vezes nos cotilédones. Nas radículas ocorreu redução significativa no teor de isoflavonas totais (6,3 vezes) enquanto que nos cotilédones houve aumento no teor de isoflavonas totais (2,4 vezes). A β -glucosidase foi purificada por cromatografia de troca iônica com CM Sephadex C-50 e filtração em gel com Sephadex G-100. A fração de β -glucosidase denominada de F₄₂, com caracterização bioquímica parcial, apresentou condições ótimas de reação de pH 5,0 e 30 minutos de incubação a 45°C. A enzima foi estável a 25°C, enquanto que a 45°C a redução foi de 60% após 1 h de incubação. Em temperatura superior a 60°C, a enzima apresentou baixa estabilidade, com redução 95% de atividade, após 5 min de incubação. O Km e Vmax da enzima com o substrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo foi de 0,16 mM e 4,3 μ M p-nitrofenol/min, respectivamente. A enzima apresentou especificidade para os substratos derivados de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeos e também para substratos que possuem ligantes na posição *para*, ligações do tipo α ou β e do tipo 1 \rightarrow 4 ou 1 \rightarrow 6.

Palavras chave: Isoflavonas. Grupos de maturação da soja. β -glucosidase da soja. Germinação. Purificação e caracterização de β -glucosidase.

RIBEIRO, Mara Lucia L. **Isoflavones content and β -glucosidase activity in germinated soy and of different maturity groups. β -glucosidase purification and partial biochemical characterization.** 2006. 110f. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

Soy Isoflavones are phenolic compounds comprised of aglucones, β -glucosides and β -glucosides conjugated with malonyl and acetyl groups. β -glucosidase (β -glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) hydrolyses β -glucosidic isoflavones releasing aglucones that possess human health beneficial role. Thus the objective of this work was to determine the isoflavone forms contents, β -glucosidase activity and their correlation in 18 soybean cultivars of different maturity groups under the same cultivation conditions. In addition an experiment was carried out in order to observe the behavior of these components throughout germination of a soy cultivar (BRS 213) that presented the highest enzyme activity for 72 h at 25°C. Furthermore soy cotyledons β -glucosidase was chromatographically purified and biochemically partially characterized. Regression analyses between number of days of maturity and all isoflavone forms were not significant. The relationship between maturity days and β -glucosides and malonyl-glucosides showed no correlation. However, a correlation was observed between maturity days and aglucones ($P < 0.08$). Regression analysis and correlation between β -glucosidase activity and cultivars of different number of days of maturity were not significant, and β -glucosidase activity did not correlate with isoflavone forms contents ($P < 0.05$). In the germinated soy cultivar BRS 213, the β -glucosidase activity increased 3.3-fold in the radicles and 2.3-fold in the cotyledons. In the radicles there was a significant decrease in the total isoflavone content (6.3-fold), while in the cotyledons there was an increase in total isoflavone content (2.4-fold). β -glucosidase was purified by ion exchange chromatography on CM-Sephadex C-50 and gel filtration on Sephadex G-100. A β -glucosidase fraction named F42 was partially biochemically characterized presenting reactions optimum conditions of pH at 5.0 under 30 min of incubation at 45°C. The enzyme was stable at 25°C while at 45°C the activity reduction was 60.0% after 1h of incubation. Finally, low stability was found at temperature above 60°C reducing its enzyme activity of 95% after 5 min of incubation. The enzyme K_m and V_{max} having *p*-nitrofenil- β -D-glycopiranoside as substrate was 0.16 mM and 4.3 μ M *p*-nitrofenol/min, respectively. Lastly, the enzyme presented a specificity for *p*-nitrofenil- β -D-glycopiranosides derivatives and also for substrates possessing ligants in *para* position and linkages of α or β type and finally 1 \rightarrow 4 or 1 \rightarrow 6 type.

Keywords: Isoflavones. Soy maturity groups. Soy β -glucosidase. Germination. β -glucosidase purification and characterization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura química das isoflavonas agluconas presentes na soja.....	20
Tabela 2 – Estrutura química das isoflavonas β -glucosídicas e conjugadas presentes na soja.....	20
Tabela 3 – Precipitação fracionada do extrato bruto de β -glucosidase com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 4°C	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral dos flavonóides (fonte: Liu, 1997)	19
Figura 2 – Estrutura geral de uma isoflavona aglucona (fonte: Liu, 1997)	19
Figura 3 – Estrutura química geral das isoflavonas β -glucosídicas (fonte: Liu, 1997)	19
Figura 4 – Fluxograma de extração, fracionamento e purificação parcial de β - glucosidases de cotilédones de soja	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 ISOFLAVONAS	18
3.2 β -GLUCOSIDASE	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAIS	26
4.1.1 Matéria-Prima	26
4.1.2 Reagentes	26
4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	27
4.2.1 Preparo de Amostras para Seleção de Cultivar	27
4.2.2 Extração de β -glucosidase para Determinação de Atividade	27
4.2.3 Determinação de Atividade de β -glucosidase	27
4.2.4 Determinação de Proteínas Solúveis e Carboidratos Totais	28
4.2.5 Determinação de Atividade Específica	28
4.2.6 Extração e Determinação de Isoflavonas por HPLC	29
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA CULTIVARES DE SOJA DE DIFERENTES GRUPOS DE MATURAÇÃO	30
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA GERMINAÇÃO DA SOJA BRS 213	30
4.5 PURIFICAÇÃO DE β -GLUCOSIDASE DA SOJA	31
4.5.1 Extração de β -glucosidase da Soja para Purificação	31
4.5.2 Precipitação Fracionada com Sulfato de Amônio	34
4.5.3 Cromatografia de Troca Iônica com CM Sephadex C-50	34
4.5.4 Cromatografia de Filtração em Gel com Sephadex G-100	35

	14
4.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA FRAÇÃO F ₄₂	35
4.6.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	35
4.6.2 Efeito do Tempo de Incubação sobre a Atividade da Enzima	36
4.6.3 Efeito da Temperatura e pH de Incubação sobre a Atividade da Enzima	37
4.6.4 Estabilidade Térmica da Enzima	37
4.6.5 Especificidade da Enzima com o Substrato p-NPG	37
4.6.6 Especificidade da Enzima a Diferentes Substratos	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1: Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. Journal of Food Composition and Analysis . v. 20, n. 1, p. 19 –24, 2007.	40
5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2: β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. Journal of Food Biochemistry , v. 30 p. 453–465, 2006	47
5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3: Purificação e caracterização parcial de β -glucosidase de cotilédone de soja. Será submetido ao Food Science and Technology ...	60
5.4 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS	90
5.4.1 6° Simpósio Latinoamericano de Ciência de Alimentos-SLACA, 2005.....	90
5.4.2 IV Congresso Brasileiro de Soja, 2006.....	93
5.4.3 XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos-CBCTA, 2006.....	97
5.5 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	100
6 CONCLUSÃO	103
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

As isoflavonas são compostos fenólicos do grupo dos flavonóides presentes em leguminosas em teor de 0,1 a 0,5 mg/g (COWARD et al., 1993) e é um dos substratos da β -glucosidase. Podem ser encontradas nas formas β -glucosídicas apresentando uma glucose ligada ao anel benzeno (daidzina, genistina e glicitina), suas respectivas agluconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), conjugada acetil-glucosídica (6''O-acetil-daidzina, 6''O-acetil-genistina e 6''-O-acetil-glicitina) e conjugada malonil-glucosídica (6''O-malonil-daidzina, 6''O-malonil-genistina e 6''O-malonil-glicitina). Na soja madura, as formas agluconas são encontradas em quantidades traço (LIU, 1997). Segundo Park et al. (2001), as isoflavonas são conhecidas por suas atividades biológicas como estrogênica, antifúngica, antioxidante e antitumoral, sendo estas mais acentuadas nas formas agluconas do que glucosiladas.

A β -glucosidase (β -D-glucosídeo glucohidrolase, EC. 3.2.1.21) catalisa a hidrólise de terminais não redutores de compostos contendo resíduos de β -D-glucose, com liberação de glucose. É produzida por microrganismos e também encontrada em vegetais, onde participa de inúmeras funções, tais como, hidrólise de giberelinas conjugadas, conversão de citocininas de armazenagem em formas ativas, em metabolismo de estresse, resistência a alguns fitopatógenos etc (ESEN, 1992).

Em humanos, a hidrólise de isoflavonas presentes na soja ocorre pela ação da β -glucosidase produzida pela microbiota intestinal (LIGGINS et al., 1998). Setchell et al. (2001) observaram que em adultos, a concentração plasmática máxima de agluconas foi obtida de 4 a 7 horas após sua ingestão, sendo que sua absorção ocorreu rapidamente no estômago, duodeno e porção inicial do jejuno. Porém, após a ingestão de β -glucosídeos, a concentração plasmática máxima de agluconas foi obtida entre 8 e 11 horas. Os β -glucosídeos foram hidrolisados previamente, para posteriormente serem absorvidos pelo intestino delgado distal.

Uma vez que as atividades biológicas são mais acentuadas nas isoflavonas agluconas, pesquisadores têm procurado alternativas de processos enzimáticos de biotransformação das formas glucosiladas em agluconas (PARK et

al., 2001). Durante a germinação de grãos ocorre a ativação de enzimas, tais como a β -glucosidase, aumentando o teor de isoflavonas agluconas (SANTOSH et al., 1999). A β -glucosidase obtida de fontes microbianas (MATSUDA et al., 1992; PARK et al., 2001) e de diferentes vegetais (ARAÚJO et al., 1997) tem sido utilizada também para a hidrólise de isoflavonas. A β -glucosidase da soja pode apresentar um potencial de aplicação em seus produtos com obtenção de alimentos funcionais.

Segundo Morais (2001), o uso da soja como alimento funcional tem aumentado nas últimas décadas, principalmente em países de primeiro mundo. A população destes países passou a reconhecer a importância da manutenção da saúde e prevenção de doenças, utilizando uma alimentação saudável com atividade física.

Considerando a importância das isoflavonas agluconas da soja para a saúde humana e que a obtenção desta forma de isoflavona é proveniente da atividade da β -glucosidase, neste trabalho foi investigada a correlação entre as isoflavonas e a atividade da β -glucosidase em cultivares de soja de diferentes grupos de maturação, selecionando a de maior atividade da enzima para avaliar também o efeito da germinação na atividade desta enzima, bem como sua extração, purificação e caracterização bioquímica parcial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a correlação entre teor de isoflavonas e atividade de β -glucosidase em grãos de cultivares de soja de diferentes grupos de maturação e também durante a germinação, para posterior purificação e caracterização bioquímica parcial da enzima.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a correlação entre o teor de isoflavonas e atividade de β -glucosidase em grãos de 18 cultivares de soja de diferentes grupos de maturação da safra 2002/2003.

Germinar a cultivar de soja com maior atividade de β -glucosidase e verificar as correlações com o teor de isoflavonas e atividade de β -glucosidase nas radículas e cotilédones em diferentes tempos de germinação.

Purificar e caracterizar parcialmente a β -glucosidase do cotilédone da soja.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A soja (*glycine max* (L.) Merrill), segundo historiadores, é originária do continente asiático, na região da Manchúria, atual China. Há referências deste grão no livro *Materia Medica*, escrito ao redor de 3.000 anos a.C., como sendo um dos cinco grãos sagrados. Sua importância na alimentação da antiga civilização era grande, e juntamente com o trigo, arroz, centeio e milheto, tinha direito a rituais antes do semeadura e da colheita. Desta região de origem, expandiu-se lentamente para outras partes do planeta. O ocidente iniciou o seu cultivo a partir do século dezoito. Os Estados Unidos iniciaram sua exploração comercial como forrageira e depois como grãos a partir da segunda década do século vinte. No Brasil sua importância comercial ocorreu a partir de 1914, quando foi introduzida no Rio Grande do Sul. O Brasil é o segundo produtor mundial deste grão com produção de 53 milhões de toneladas na safra 2005/2006. No Paraná, seu cultivo foi iniciado em 1954 e foi o segundo maior produtor no país na safra 2005/2006, com 9,4 milhões de toneladas. Ainda, nesta safra, Mato Grosso e Rio Grande do Sul produziram 15,9 e 7,5 milhões de toneladas, respectivamente (www.conab.com.br).

A cultura de soja apresenta inúmeras vantagens para o país. Devido à extensão territorial, topografia e clima favoráveis, a soja tornou-se a principal cultura, ocupando aproximadamente 22 milhões de hectares (www.conab.com.br).

O complexo soja, constituído por grão, farelo, óleo, margarina e lecitina, gera empregos e é um excelente setor exportador nacional.

A soja, inicialmente cultivada para extração de óleo e ração animal, teve seus produtos protéicos (farinha, concentrados e isolados protéicos) utilizados em grande escala na indústria de alimentos devido a suas características funcionais. Nos Estados Unidos, somente na década de 80, houve aumento no consumo de produtos tradicionais de soja, como tofu e extrato aquoso de soja, e de uma segunda geração de produtos, tais como, salsichas, produtos lácteos similares e molhos de soja (www.cnpso.embrapa.br).

O aumento do consumo de produtos de soja foi atribuído a fatores econômicos e de saúde. O potencial da soja, bem como sua investigação, estão relacionados com vários estudos na prevenção de câncer e outras doenças

crônicas (ADLERCREUTZ; MAZUR, 1997; ANDERSON; GARNER, 1997; LOVATI et al., 2000; MESSINA, 1999; MESSINA; MESSINA, 1991; ROSELL et al., 2004; zhang, 2003). No Brasil, os resultados de estudos sobre características nutricionais e nutracêuticas promoveram aumento no consumo via incorporação na dieta alimentar da população brasileira (www.cnpso.embrapa.br).

A composição do grão de soja ou de suas estruturas individuais é dependente de muitos fatores, tais como, cultivar, época de semeadura, localização geográfica e estresse ambiental. Em média, óleo e proteínas constituem cerca de 60% da soja em base seca, com 40% de proteína e 20% de óleo, 31% de carboidratos, 4% de cinzas e 5% de outros componentes. A soja é constituída de aproximadamente 8% de casca, 90% de cotilédone e 2% de hipocótilo. O cotilédone apresenta o maior teor de proteínas e óleo, enquanto que a casca apresenta teor de carboidratos mais elevados. Em comparação ao cotilédone, o hipocótilo apresenta teor semelhante de proteínas e 50% do teor de lipídeos. Além destes constituintes, a soja apresenta fosfolipídios, vitaminas, minerais e outros compostos biologicamente ativos como inibidores de tripsina, fitatos, oligossacarídeos e isoflavonas (LIU, 1997).

A germinação é uma alternativa de processamento para o consumo de grãos. Assim, desde os tempos remotos, o broto de soja é consumido no Oriente devido a sua textura crocante e sabor diferenciado com valor nutritivo elevado e comparável à soja verde (imatura) (LIU, 1997). Durante o processo de germinação, ocorre a ativação de várias enzimas presentes na soja, tais como proteases, α -galactosidases e fitases (ABDULLAH et al., 1984; BAU; DEBRY, 1979; CHEN; PAN, 1977; KIM et al., 1973; MOSTAFA; RAHMA, 1987). Santosh et al. (1999) observaram um aumento na atividade específica de β -glucosidase em grãos germinados a 30°C de *Trigonella foenum-graecum*, *Cicer arietinum* e *Vigna radiata*. Bau et al. (2000) descreveram que a germinação da soja aumentou consideravelmente o teor de alguns constituintes químicos e compostos biologicamente ativos como lecitina, fitoesteróis, saponinas, compostos estrogênicos etc. Conseqüentemente, a soja germinada pode ser incorporada na dieta com benefícios à saúde, com redução do colesterol sérico e prevenção de obesidade, doenças cardiovasculares, câncer de mama e próstata. A soja germinada pode ser utilizada como uma excelente alternativa de substituição da proteína animal, com obtenção de uma dieta nutricionalmente balanceada para

países industrializados e em desenvolvimento.

3.1 ISOFLAVONAS

A soja, por muitos anos, foi identificada em relação ao elevado teor de lipídeos e proteínas. Entretanto, a partir da década de 90, os clínicos e pesquisadores demonstraram interesse em alimentos de soja devido à função potencial no tratamento e prevenção de doenças crônicas (LIU, 1997).

Segundo Brouns (2002) muitas pesquisas demonstraram que mulheres asiáticas, consumidoras de sua dieta tradicional, apresentaram melhores condições cardiovasculares e ósseas, quando comparadas com as ocidentais. Os epidemiologistas em nutrição atribuíram estes resultados, em parte, a uma dieta rica em soja, que é consumida há mais de 5.000 anos pelos orientais enquanto que os povos ocidentais ingerem pouca soja. A soja é particularmente rica em isoflavonas, que são os flavonóides mais comuns encontrados em frutas e vegetais. Assim, evidências indicaram que as isoflavonas da soja podem contribuir com estes resultados. Atualmente, os ocidentais aumentaram o consumo de soja visando melhorar a saúde. Liu (1997) enfatizou a utilização da soja e suas isoflavonas na prevenção e tratamento de câncer e outras doenças crônicas.

As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides (Figura 1). Estas apresentam uma estrutura composta por dois anéis benzeno ligados a um terceiro anel pelo carbono três, sendo que as isoflavonas da soja podem existir em quatro formas químicas, ou seja, aglucona sem o respectivo açúcar (Figura 2 e Tabela 1), β -glucosídica com uma glucose ligada ao anel benzeno (Figura 3) e conjugada com grupos malonil ou acetil (Tabela 2). Portanto, há 12 isômeros de isoflavonas. As isoflavonas agluconas da soja são denominadas de daidzeína, genisteína e gliciteína (Tabela 1). Podem ser glucosiladas por ligação β -glucosídica, transformando-se em daidzina, genistina e glicitina. Na forma acetilglucosídica, as isoflavonas da soja são denominadas de 6"-O-acetildaidzina, 6"-O-acetilgenistina e 6"-O-acetilglicitina e na forma malonilglucosídica, os nomes correspondentes são 6"-O-malonil-daidzina, 6"-O-malonil-genistina e 6"-O-malonil-glicitina (LIU, 1997).

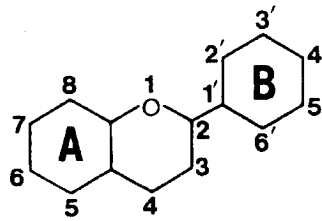


Figura 1 – Estrutura geral dos flavonóides (fonte: Liu, 1997).

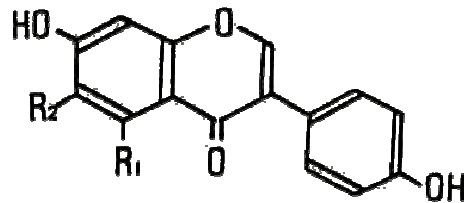


Figura 2 – Estrutura geral de uma isoflavona aglucona (fonte: Liu, 1997).

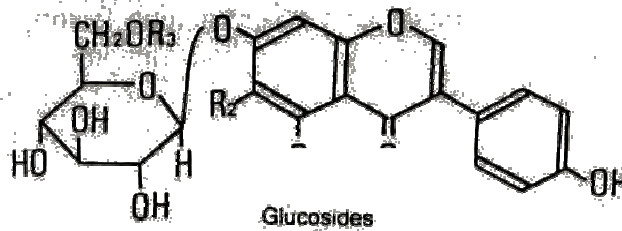


Figura 3 – Estrutura química geral das isoflavonas β -glucosídicas (fonte: Liu, 1997).

Tabela 1 – Estrutura química das isoflavonas agluconas presentes na soja.

Isoflavona	R ₁	R ₂
Daidzeína (4,7-dihidroxiisoflavona)	-H	-H
Genisteína (4,5,7-trihidroxiisoflavona)	-OH	-H
Gliciteína (4,7-dihidroxi-6-metoxiisoflavona)	-H	-OCH ₃

Tabela 2 – Estrutura química das isoflavonas β-glucosídicas e conjugadas presentes na soja.

Isoflavona	R ₁	R ₂	R ₃
Daidzina	-H	-H	-H
Genistina	-OH	-H	-H
Glicitina	-H	-OCH ₃	-H
6"O-Acetil-daidzina	-H	-H	-COCH ₃
6"O-Acetil-genistina	-OH	-H	-COCH ₃
6"O-Acetil-glicitina	-H	- OCH ₃	-COCH ₃
6"O-Malonil-daidzina	-H	-H	-COCH ₂ COOH
6"O-Malonil-genistina	-OH	-H	-COCH ₂ COOH
6"O-Malonil-glicitina	-H	- OCH ₃	-COCH ₂ COOH

A daidzina e genistina atuam como moléculas sinalizadoras para bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio em vegetais, resultando na produção de compostos aromáticos que podem influenciar geneticamente na atividade indutora da formação de nódulos (COOPER et al., 1999; PHILLIPS, 1992). Estas isoflavonas conjugadas podem ser utilizadas como reserva para liberação de agluconas livres, as quais têm importante papel na interação planta-microrganismo e em mecanismos de defesa contra patógenos. A genisteína aglucona é tóxica para fungos patógenos, como o *Phytophthora sojae*. As isoflavonas liberadas, por exemplo, podem ser incorporadas na via biossintética das fitoalexinas ou podem atuar como toxinas pré-formadas, denominadas de fitoanticipinas. As isoflavonas livres também podem exercer função de quimioatratores para patógenos como simbiontes ou como reguladores do gene de expressão em *Rhizobium* spp.

(GRAHAM; GRAHAM, 1999).

Embora os flavonóides sejam encontrados em várias famílias de vegetais, em diferentes tecidos e participem de processos biossintéticos, as isoflavonas estão presentes em poucas famílias, devido à distribuição limitada da enzima chalcona isomerase, que converte 2(R)-naringineno, uma flavona precursora em 2-hidroxicoumestrol (Coward et al., 1993). A soja é a única fonte que contém elevada quantidade de β -glucosídeos conjugados, ou seja, acima de 300 mg/100g em peso seco. Os alimentos derivados de soja contêm as mais elevadas concentrações de genistina e daidzina, seguido de outras leguminosas e vegetais. Além destes, foi quantificado o teor de daidzeína e genisteína de frutas, amêndoas e uva passas (LIGGINS et al., 2000).

No grão de soja, o teor e composição de isoflavonas variam conforme os seus componentes, ou seja, casca, cotilédone e hipocótilo. A concentração de isoflavonas totais no hipocótilo é 5,5 a 6,0 vezes maior do que do cotilédone, correspondendo de 10 a 20% do total de isoflavonas do grão, embora este corresponda a somente 2% do total do grão. Entretanto, do total de isoflavonas do grão, 80 a 90% estão localizadas no cotilédone, devido aos cotilédones estarem em maior proporção no grão (TSUKAMOTO et al., 1995). A glicitina e seus derivados estão presentes somente no hipocótilo, sendo que não foram detectadas isoflavonas nas cascas dos grãos de soja (KUDOU et al., 1991). O teor total de isoflavonas em diferentes cultivares de soja testadas foi de 126,1 a 409,2 mg/100g de grão (Araújo et al., 1997; Carrão-Panizzi et al., 1999; Eldridge; Kwolek, 1983; Tsukamoto et al., 1995; Wang; MURPHY, 1994b). Segundo Liu (1997) é desejável uma seleção de soja com elevado teor de isoflavonas para produção de alimentos.

A quantificação de isoflavonas realizada em diferentes cultivares de soja indicou que o seu teor não depende somente de fatores genéticos, mas também do ano da colheita, localização e temperatura da cultura (Araújo et al., 1997; Carrão-Panizzi et al., 1999; Eldridge; Kwolek, 1983; Tsukamoto et al., 1995; Wang; MURPHY, 1994b;). Segundo Tsukamoto et al. (1995), as variações no teor de isoflavonas não estão restritas a uma ou duas isoflavonas. Além disto, embora o hipocótilo possua concentração maior de isoflavonas, sua alteração é menos pronunciada em relação ao grão inteiro. Os grãos de plantas que cresceram em temperaturas elevadas apresentaram teor significativamente mais baixo de isoflavonas do que os que cresceram em temperaturas mais baixas. A diferença

neste teor foi de 14 a 16 vezes no grão, enquanto que no hipocótilo, esta foi de 3 a 6 vezes, em sete cultivares avaliadas. Estes resultados sugerem mecanismos que permitem que o teor de isoflavonas seja mantido no hipocótilo. Esta observação tem implicação prática importante, indicando que seu teor pode ser manipulado independentemente. Assim, estes resultados indicam que o teor de isoflavonas no grão depende da temperatura durante o desenvolvimento da semente e no hipocótilo depende da temperatura e também da cultivar. Possivelmente, existe um mecanismo para manter o teor elevado de isoflavonas no hipocótilo.

Assim, o teor de isoflavonas de alimentos à base de soja depende primariamente da fonte de soja utilizada. Outros fatores interferem nesta concentração, tais como, temperatura e tempo de processamento, processo de extração de proteína, diluição com outros ingredientes, hidrólise enzimática e fermentação. Como exemplo, pode-se citar a farinha, extrato aquoso, “nuts”, soja em pó e tofu, nos quais conjugados β -glucosídicos foram as principais formas encontradas. Entretanto, em alimentos fermentados de soja, as isoflavonas agluconas foram predominantes em produtos como o miso, tempeh etc (COWARD et al., 1993; Wang; Murphy, 1994a; Wiseman et al., 2002).

As isoflavonas têm sido amplamente descritas devido à suas atividades biológicas. Podem possuir atividade estrogênica (BROUNS, 2002; LIGGINS et al., 2000; Rosell et al., 2004), antioxidante (BROUNS, 2002; PARK, et al., 2001) e antitumoral (BARNES, 1995; FRITZ et al., 1998; LAMARTINIERE et al., 1995; LIGGINS et al., 2000) com atuação em doenças crônicas como cardiovasculares (ADLERCREUTZ; MAZUR, 1997; LIGGINS et al., 2000; Lovati et al., 2000; Zhang, 2003) e osteoporose (LIGGINS et al., 2000). Estas atividades biológicas são mais acentuadas nas formas agluconas do que glucosiladas. Em adultos, a concentração plasmática máxima após a ingestão de agluconas da soja é obtida de 4 a 7 horas. Sua absorção ocorre rapidamente no estômago, duodeno e porção inicial do jejuno. Para os β -glucosídeos, este tempo é de 8 a 11 horas. Estes necessitam de hidrólise prévia, para posterior absorção pelo intestino delgado distal (SETCHELL et al., 2001). A hidrólise ocorreu pela ação da β -glucosidase produzida na microbiota intestinal (LIGGINS et al., 1998).

Segundo Brouns (2002) muitos estudos têm buscado estabelecer a ingestão adequada de isoflavonas da soja com fortificação de alimentos para cada situação. Assim, para aliviar os sintomas da menopausa, foi proposta a ingestão de

60 mg de agliconas, porém para o consumo de proteínas de soja com isoflavonas não houve recomendação específica. Para melhorar a densidade óssea, foi sugerido o consumo de 60 a 100 mg de agluconas/dia, sem uso concomitante de proteína de soja. Para reduzir o nível de LDL colesterol, a ingestão mínima foi de 37 a 62 mg de agliconas/dia, dependendo das concentrações iniciais de colesterol (normais ou aumentadas), associado com 25 g de proteínas de soja/dia.

Uma questão chave em relação ao papel funcional de compostos vegetais no corpo humano é a sua absorção pelo trato gastrointestinal, metabolização e ação em tecidos alvo para atuar favoravelmente. Foram realizados testes para determinar a concentração de fitoestrógenos no sangue, urina e fezes, bem como determinado o papel da circulação enterohepática de tais componentes. As bactérias do trato gastrointestinal apresentam um importante papel no metabolismo de isoflavonas e seus conjugados. Estudos *in vivo* e *in vitro* com β -glucosídeos e material fecal demonstraram que estes foram hidrolisados por glucosidases das bactérias fecais, produzindo isoflavonas agluconas. Entretanto, a biodisponibilidade das isoflavonas da soja em humanos depende de sua capacidade de metabolismo, sendo relacionada a grupos étnicos, hábitos alimentares e microbiota intestinal. Estes fatores promoveram alterações na quantidade e atividade das β -glucosidases intestinais que hidrolisaram os β -glucosídeos em agluconas (Ismail; Hayes, 2005). As agluconas, com menor massa molecular, foram mais absorvidas e apresentaram maior atividade estrogênica do que os β -glucosídeos (Izumi et al., 2000; Brouns, 2002).

3.2 β -GLUCOSIDASE

A β -glucosidase (β -D-glucosídeo glucohidrolase, EC. 3.2.1.21) catalisa a hidrólise de ligações β -glucosídica de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados glucosídicos, com liberação de glucose. É produzida por microrganismos e também encontrada em vegetais, onde participa de inúmeras funções, tais como, hidrólise de giberelinas conjugadas, conversão de citocininas de armazenagem em formas ativas, em metabolismo de estresse e resistência a

alguns fitopatógenos etc (ESEN, 1992).

A presença de isoflavonas agluconas em grãos de soja está relacionada com a atividade de β -glucosidase presente no tecido vegetal. Os extratos da parede celular do grão de soja contêm pelo menos duas enzimas com atividade de β -glucosidase. Uma delas possui somente atividade de β -glucosidase e a outra, além desta, apresenta a de β -glucanase (CLINE; ALBERSHEIM, 1981).

Segundo Santosh et al. (1999), o desenvolvimento na purificação de β -glucosidases e sua aplicação biotecnológica em indústria de alimentos apresentaram um grande potencial e novos estudos estão em progresso. Entretanto, há poucas informações sobre a β -glucosidase da soja. Matssura e Obata (1993) caracterizaram e purificaram parcialmente esta enzima de grãos de soja. Foram separadas três frações (A, B, C), sendo que as frações B e C apresentaram atividade de hidrólise para genistina e daidzina. A massa molecular da β -glucosidase B e C foi estimada em 52.000 Da, com atividade máxima a 45°C e pH ótimo de 5,5 e faixa entre 4,3 e 7,0. Em relação à estabilidade térmica, 80% da atividade foi mantida a 55°C e quase inativada a 60°C. Em estudos posteriores, Matssura et al. (1995) purificaram e caracterizaram a β -glucosidase-C. Sua massa molecular foi estimada em 81.000 e 36.000 Da, utilizando filtração em gel. O ponto isoelétrico foi estimado em 6,7 com atividade ótima em pH 4,5 e 45°C, sendo que os limites de pH foram de 3,5 a 7,0. A enzima foi estável em pH entre 4,0 e 6,0 a 5°C. Hsieh e Graham (2001) purificaram e caracterizaram parcialmente a β -glucosidase com elevada especificidade para isoflavonas conjugadas (ICHG), extraída de raízes de soja germinada por 7 a 9 dias e esta apresentou elevada atividade específica de β -glucosidase. A atividade em extratos brutos das raízes foi aproximadamente 800 vezes maior do que a do extrato do cotilédone. A massa molecular desta enzima, em condições não redutoras foi de 165 kD, enquanto que em condições redutoras foram observadas duas bandas, uma de 80 kD e outra de 75 kD. O pH ótimo para esta enzima foi de 6,0 a 30°C e temperatura ótima de 30°C. A enzima foi altamente estável ao calor e permaneceu com 87% de atividade após 45 minutos a 50°C.

A conversão de isoflavonas conjugadas em agluconas ocorreu por diferentes tratamentos, tais como o uso de β -glucosidase de origem fúngica (*Aspergillus oryzae*) (PARK et al., 2001), bacteriana (*L. casei* subsp. *Rhamnosus* IFO 3425) (Matsuda et al., 1992) ou do próprio grão (Araújo et al., 1997).

Considerando a importância das isoflavonas agluconas da soja para a saúde humana e que a obtenção desta forma de isoflavona é proveniente da atividade da β -glucosidase, este trabalho investigou a correlação entre as isoflavonas e a atividade da β -glucosidase em cultivares de soja de diferentes grupos de maturação. Foi investigado também o efeito da germinação na atividade desta enzima, bem como sua extração, purificação e caracterização bioquímica parcial. A aplicação desta enzima em produtos alimentares com obtenção de alimentos funcionais poderá melhorar o aspecto nutricional e agregar valor aos produtos de soja.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-Prima

Foram utilizados grãos de 18 cultivares de soja (*glycine max* (L.) Merrill) de diferentes grupos de maturação da safra 2002/2003, desenvolvidos na Vitrine Tecnológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja, Londrina, Paraná. Esta região está situada a 585 m de altitude e latitude de 23°11' S e a temperatura média no período foi de 24°C. Estas cultivares cresceram nas mesmas condições de cultivo e de temperatura. As cultivares recomendadas neste ano agrícola e utilizadas nesta investigação foram: BRS 132, BRS 133, BRS 134, BRS 154, BRS 156, BRS 183, BRS 184, BRS 185, BRS 212, BRS 213, BRS 214, BRS 215, BRS 216, BRS 230, BRS 231, BRS 232, BRS 233 e Embrapa 48.

A classificação em grupos de maturação precoce, semiprecoce e médio foi realizada conforme o número de dias da emergência do broto até a colheita, ou seja, 100–110, 111–120 e 121–130 dias, respectivamente.

4.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico de diferentes procedências.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 Preparo de Amostras para Seleção de Cultivar

A partir de 100 g de grãos de cada cultivar de soja foram retiradas cerca de 30 g e formadas três sub amostras para obtenção de três blocos. Assim, foram constituídas 54 amostras para análises do teor de isoflavonas, suas formas químicas e de atividades de β -glucosidase com obtenção em triplicata dos respectivos resultados médios. As seqüências do preparo de amostras e análises foram sorteadas para cada bloco contendo as 18 cultivares. As amostras foram moídas para obtenção de farinha de soja integral contendo casca, hipocótilo e cotilédone, segundo recomendações de Carrão-Panizzi e Bordingnon (2000).

4.2.2 Extração de β -glucosidase para Determinação de Atividade

A extração de β -glucosidase das amostras para determinação de sua atividade foi realizada em tubos de ensaio com 100 mg de farinha de soja integral em 1,5 mL de tampão citrato 0,05 M, contendo NaCl 0,1 M e pH 4,5 por uma hora a temperatura ambiente (Carrão-Panizzi; Bordingnon, 2000) e agitados em intervalos de 15 min. Em seguida, foram centrifugados e obtidos os sobrenadantes ou extratos para determinação da atividade da enzima.

4.2.3 Determinação de Atividade de β -glucosidase

Para determinação de atividade de β -glucosidase nos extratos de soja e nas fases de extração, fracionamento e purificação da enzima foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p-NPG) conforme

procedimento descrito por Matsuura e Obata (1993). Neste procedimento foi utilizado tubo de ensaio contendo 2 mL de p-NPG 1mM, em tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0 e mantido em banho-maria a 30°C por 10 min para pré-incubação. Decorrido este tempo, foram adicionados 0,5 mL do extrato e novamente colocados em banho-maria a 30°C por 30 min para incubação. A reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M. O p-nitrofenol (p-NP), de coloração amarela, liberado nesta reação foi determinado por espectrofotometria a 420 nm. Em paralelo, uma curva padrão foi preparada com p-NP (20–160 μ M), para determinação da atividade da enzima.

Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de β -glucosidase que liberou 1 μ M de p-NP min^{-1} , nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos como níveis de atividade de β -glucosidase, ou seja, UA g^{-1} de farinha de soja integral em base seca.

4.2.4 Determinação de Proteínas Solúveis e Carboidratos Totais

O teor de proteínas solúveis dos extratos foi quantificado pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando solução padrão de albumina de soro bovino (BSA).

O teor de carboidratos totais foi quantificado pelo método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956) utilizando solução padrão de D-glucose.

4.2.5 Determinação de Atividade Específica

A atividade específica foi definida como relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e mg de proteínas, ou seja, UA mg^{-1} de proteínas.

4.2.6 Extração e Determinação de Isoflavonas por HPLC

A análise quantitativa de isoflavonas foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) segundo Berhow (2002). Aproximadamente 250 mg de farinha de soja integral foram extraídas em tubos de ensaio com 3,0 mL da mistura de dimetil sulfóxido (DMSO) : metanol (1:4 v/v) por 15 a 17 h em temperatura ambiente. Em seguida foram centrifugadas e os sobrenadantes filtrados em filtros de 0,43 μm e 20 μL foram utilizados para separação e quantificação de isoflavonas em cromatógrafo (Shimadzu, modelo LC-10AT VP, Kyoto, Japão) equipado com detector de arranjo de fotodiodos (modelo SPD-M10AVP) e forno (CTO-10AS VP) com temperatura controlada a 26°C. A eluição das isoflavonas foi realizada em coluna de fase reversa em sistema de gradiente linear [CLC-ODS (M) C18, Shimadzu, diâmetro interno de 4,6 mm x 250 mm e partículas de 5 μm]. O sistema gradiente inicial consistiu de 100% de H₂O (pH 3,0 ajustado com ácido trifluoroacético) e 0% de acetonitrila. Em 25 min de eluição, foi atingida a proporção de 45% de H₂O (pH 3,0) e 55% de acetonitrila e as isoflavonas foram separadas e detectadas a 260 nm. Em 27 min o gradiente ficou em 100% de acetonitrila, retornando às condições iniciais em 35 min. O tempo final de eluição foi de 40 min. O fluxo do solvente foi de 1 mL min⁻¹.

A identificação e quantificação das isoflavonas foram feitas com comparações das curvas padrão de genistina, daidzina e glicitina. As concentrações das formas químicas malonil-glucosídeos e agluconas foram calculadas a partir das curvas padrão de seus β -glucosídeos correspondentes, utilizando a semelhança dos coeficientes de extinção molar de malonil-isoflavonas aos de seus conjugados glucosilados (COWARD et al., 1998).

Os resultados do teor de isoflavonas foram expressos em mg/100 g de amostra em base seca. As isoflavonas separadas e quantificadas foram as agluconas genisteína e daidzeína, os β -glucosídeos genistina, daidzina e glicitina e os conjugados malonil- β -glucosídeos malonilgenistina, malonildaizina e malonilglicitina.

4.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística para Cultivares de Soja de Diferentes Grupos de Maturação

Para selecionar a cultivar com maior atividade de β -glucosidase foi utilizado o delineamento experimental de blocos ao acaso, com os 18 cultivares e três blocos. A análise de variância (ANOVA) foi realizada e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos ao mínimo de 5% de probabilidade, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Também foram realizadas as análises de regressão e correlação entre níveis de atividade de β -glucosidase e teor de isoflavonas (β -glucosídeos, malonil-glucosídeos e agluconas) dos 18 cultivares de diferentes dias de maturação. Os dados foram analisados com os Sistemas de Análises Estatísticas SAS versão 8.2 (SAS Inst., Cary, NC, U.S.A., 1999) e SANEST (Zonta et al., 1982).

Os resultados obtidos estão publicados no *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n.1, p. 19–24, 2007 e foram apresentados no IV Congresso Brasileiro de Soja, 05 a 08 de junho de 2006, Londrina-PR e XIV EAIC – Encontro Anual de Iniciação Científica, 31 de agosto a 3 setembro de 2005, UNICENTRO, Guarapuava-PR. A cópia do artigo científico completo e os respectivos resumos dos trabalhos apresentados estão no capítulo de Resultados e Discussão nos itens 6.1, 6.4.2, 6.5.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA GERMINAÇÃO DE SOJA BRS 213

Grãos de soja BRS 213 foram escolhidos para estudos de germinação devido à elevada atividade de β -glucosidase comparado às outras cultivares de soja semeadas em 2002/2003, conforme observado por Ribeiro et al. (2007). Três blocos com oito rolos de papel de germinação, para cada tempo de germinação, contendo cada um 50 grãos de soja BRS 213 foram aleatoriamente colocados na câmara de germinação a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100% de umidade e 10 h de

iluminação por 72 h. As amostras foram retiradas a cada 6 h de germinação. Após o término de cada tempo de germinação, os cotilédones e radículas foram separados, moidos e determinados o teor de isoflavonas e atividade de β -glucosidase conforme procedimentos anteriormente descritos nos itens 4.2.3 e 4.2.6. Partes de grãos não germinados foram utilizadas como controle. A germinação dos grãos de soja a 25 °C e 100% de umidade foi viável somente até 72 h, sendo que após este tempo houve acentuado crescimento do sistema radicular. A temperatura utilizada foi baseada em recomendações da Embrapa Soja (2003).

Após as determinações, foi aplicada a análise de variância, teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) para comparações das médias dos tratamentos, análises de regressão para definição de modelos matemáticos e correlação entre níveis de atividade de β -glucosidase e teor de isoflavonas nos tempos de germinação. Os dados foram analisados com os Sistemas de Análises Estatísticas SAS versão 8.2 (SAS Inst., Cary, NC, U.S.A., 1999) e SANEST (Zonta et al., 1982).

Os resultados obtidos foram publicados no *Journal of Food Biochemistry*, v. 30, p. 453–465, 2006 e apresentados no 6° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - SLACA, de 7 a 10 de novembro de 2005, UNICAMP, Campinas-SP. As cópias do artigo científico completo e do resumo do trabalho estão no capítulo de Resultados e Discussão nos itens 6.2 e 6.4.1.

4.5 PURIFICAÇÃO DE β -GLUCOSIDASE DA SOJA

4.5.1 Extração de β -glucosidase da Soja para Purificação

A cultivar de soja BRS 213 foi utilizada por apresentar maior atividade de β -glucosidase comparado às outras cultivares de soja semeadas em 2002/2003, conforme observado por Ribeiro et al. (2007).

A extração da enzima foi realizada com farinha de cotilédones de soja e tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,6, na proporção de 1:10 (peso/volume),

com agitação lenta por 1 h a 4°C e posterior centrifugação (centrífuga refrigerada Boeco, U-32R, Alemanha) a 4000 xg e 4°C por 15 min conforme Matsuura e Obata (1993). O sobrenadante assim obtido foi acidificado com HCl 0,1 N até pH 5,0 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante ou extrato bruto (EB) foi utilizado como fonte de enzima para fracionamento e purificação e o fluxograma deste procedimento está apresentado na Figura 4.

4.5.2 Precipitação Fracionada com Sulfato de Amônio

Para avaliação inicial da precipitação fracionada, o extrato bruto foi precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 4°C de 0 até 20%, 20 até 40% e sucessivamente até 80% de saturação. Ao extrato bruto foi adicionado lentamente o sulfato de amônio até atingir 20% de saturação e mantido em repouso a 4°C até completa precipitação. O material foi centrifugado a 4000 xg por 15 min a 4°C. No sobrenadante (S_{0-20}) foi adicionado sulfato de amônio até 40% de saturação, mantido a 4°C e centrifugado conforme descrito. O mesmo procedimento foi realizado até 60% e depois até 80% de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os precipitados (P_{0-20} , P_{20-40} , P_{40-60} e P_{40-80}) foram ressuspensos em tampão fosfato citrato 0,05 M, pH 5,0 e os sobrenadantes (S_{0-20} , S_{20-40} , S_{40-60} e S_{40-80}) foram dialisados no mesmo tampão por 14 h a 4°C. Após a diálise foi determinada a atividade de β -glucosidase (item 4.2.3) e teor de proteínas solúveis (item 4.2.4). A recuperação da enzima e o grau de purificação da precipitação fracionada foram calculados com base na atividade da enzima (Tabela 3).

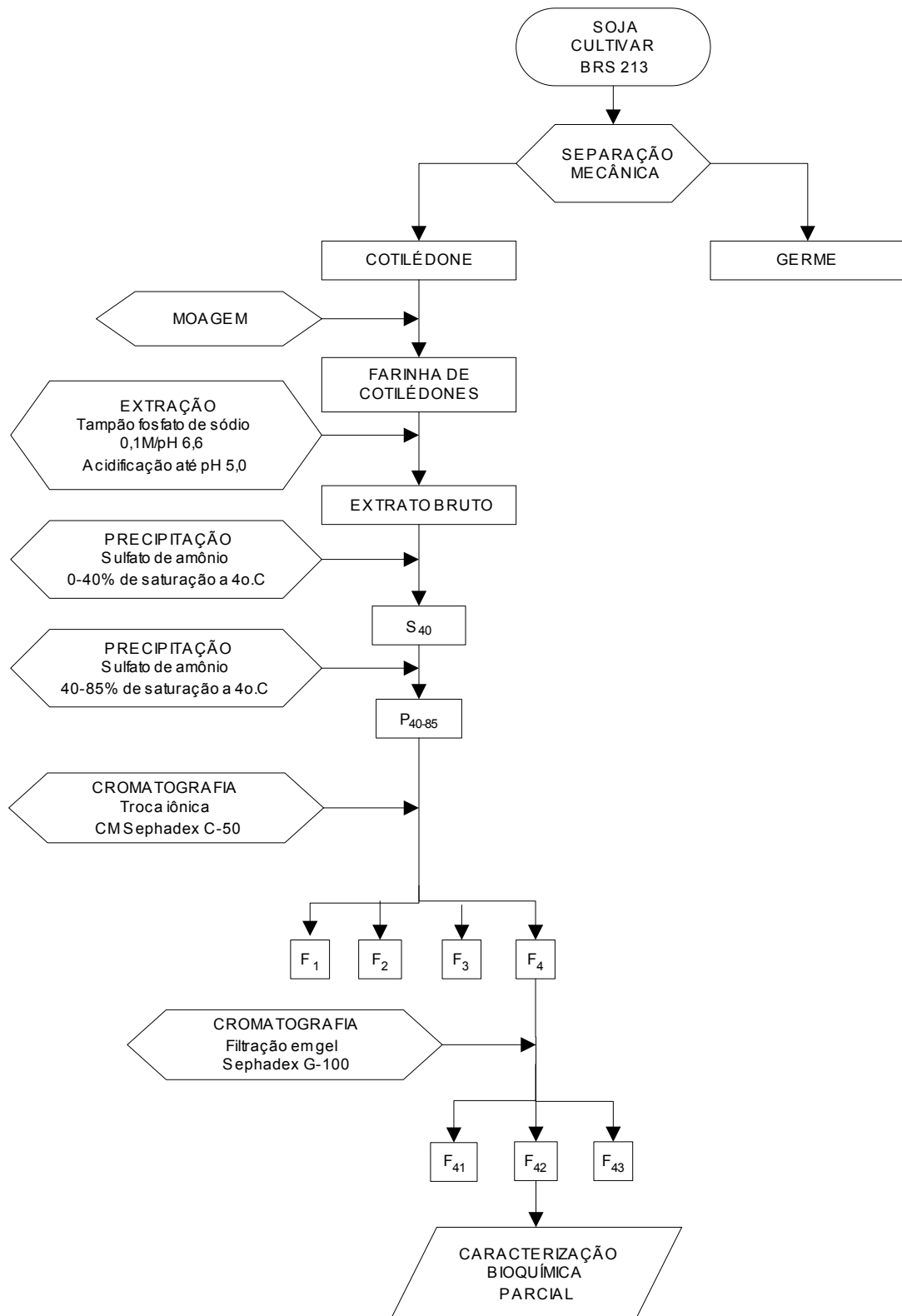


Figura 4 – Fluxograma de extração, fracionamento e purificação parcial de β -glucosidases de cotilédones de soja.

Tabela 3 – Precipitação fracionada do extrato bruto de β -glucosidase com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 4°C.

Fases	Proteínas Totais (mg)	Recuperação Proteínas (%)	UA Totais	Recuperação Atividade (%)	UA/mg Proteína*	Purificação (x)
EB	1236,97	100,00	1619,79	100,00	1,31	1,00
P ₀₋₂₀	49,94	4,04	106,99	6,61	2,14	1,64
P ₂₀₋₄₀	549,91	44,46	226,75	14,00	0,41	0,31
P ₄₀₋₆₀	223,60	18,08	637,95	39,38	2,85	2,18
P ₆₀₋₈₀	124,93	10,10	552,04	34,08	4,42	3,37

*Atividade específica; EB: extrato bruto; UA: unidades de atividade

A maior atividade específica de β -glucosidase foi obtida entre 40 e 60% e entre 60 e 80% de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 4°C, com recuperação total de proteína de 28,18% e atividade de 73,46%. Portanto, o fracionamento da proteína contendo maior atividade da enzima foi realizado com a precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 a 40% de saturação a 4°C, desprezado o precipitado e ao sobrenadante foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até atingir 85% de saturação a 4°C. O precipitado obtido (P₄₀₋₈₅) foi ressuspenso em tampão fosfato-citrato 0,05M, pH 5,0 e dialisado contra o mesmo tampão e utilizado para purificação da enzima.

4.5.3 Cromatografia de Troca Iônica com CM Sephadex C-50

A fração P₄₀₋₈₅ dialisada foi aplicada em coluna (2,5 cm x 55 cm) de troca iônica com CM Sephadex C-50, equilibrada previamente com tampão fosfato-citrato 0,05 M, pH 5,0 e fluxo de 27 mL/h. Após a eluição da primeira fração protéica, foram aplicados aproximadamente 900 mL de gradiente de NaCl 0–0,8 M em tampão fosfato-citrato 0,05 M, pH 5,0. Foram coletadas frações de 3,5 mL por tubo de ensaio e realizadas as leituras de absorvância a 280 nm. As atividades de β -glucosidase foram determinadas nas frações eluídas e foi traçado o perfil do

cromatograma.

Na cromatografia de troca iônica, quatro frações proteicas denominadas de F_1 , F_2 , F_3 e F_4 foram separadas e os respectivos tubos de ensaio foram combinados conforme ordem de eluição. A fração F_4 apresentou maior atividade específica de β -glucosidase, sendo liofilizada e dialisada em tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0 para aplicação em cromatografia de filtração em gel com Sephadex G-100.

4.5.4 Cromatografia de Filtração em Gel com Sephadex G-100

A fração F_4 , liofilizada e dialisada, foi aplicada em coluna (2,3 cm x 100 cm) de filtração em gel com Sephadex G-100. A coluna foi equilibrada previamente com tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0 e fluxo de 17 mL/h. Foram coletadas frações de 2,3 mL por tubo de ensaio, realizadas as leituras de absorvância a 280 nm. As atividades de β -glucosidase foram determinadas nas frações eluídas e foi traçado o perfil do cromatograma.

Na cromatografia de filtração em gel, a fração F_4 foi separada em três frações protéicas denominadas de F_{41} , F_{42} e F_{43} e os respectivos tubos de ensaio foram combinados conforme ordem de eluição. A fração F_{42} apresentou maior atividade específica de β -glucosidase e foi utilizada para caracterização bioquímica parcial.

4.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA FRAÇÃO F_{42}

4.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As frações separadas no processo de purificação da β -glucosidase foram analisadas por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 7,5%

(PAGE) conforme procedimento descrito por Davis (1964) em condições nativas utilizando tampão Tris-HCl 3,778 M, pH 8,9 e voltagem de 150 mV. Foram preparadas placas de dimensão de 101 mm x 106 mm x 1 mm com nove poços e aplicados de 30 a 70 μg de proteínas de cada fração. Após a eletroforese, os géis foram fixados com ácido tricloroacético (TCA) 10%, lavados com solução de etanol 10% e ácido acético 5% e depois com solução oxidante de dicromato de potássio 0,034 M em ácido nítrico 0,032 N. Após a fixação das bandas de proteínas, o procedimento de coloração e revelação foi realizado conforme descrição de Nielsen e Brown (1984) que utilizou nitrato de prata 0,012 M para coloração e posterior lavagem com água destilada. Em seguida, a revelação foi realizada com solução redutora de carbonato de sódio 0,28 M em formaldeído 0,37% até o desenvolvimento das bandas e interrompida com ácido acético 5%. As placas de géis foram lavadas com água destilada e secadas entre duas folhas de papel celofane embebidas com glicerol : H_2O (1:1, v:v) e mantidas por quatro dias em temperatura ambiente para secagem dos mesmos e registro por fotografia digital.

A fração F_{42} apresentou na eletroforese apenas uma banda corada com prata e maior atividade específica de β -glucosidase. Portanto, a caracterização bioquímica parcial foi realizada conforme segue.

4.6.2 Efeito do Tempo de Incubação sobre a Atividade da Enzima

O tempo ótimo de incubação da fração F_{42} para hidrólise de p-NPG foi investigado de 0 a 480 min com intervalos iniciais entre 10 min até 60 min, de 20 min até 120 min e depois de 60 em 60 min até 480 min. A cada tubo de ensaio foram adicionados 100 μL de amostra e 400 μL de p-NPG em tampão fosfato citrato 0,1 M, pH 5,0 e incubados a 30°C em banho maria. As reações foram interrompidas com 500 μL de carbonato de sódio 0,5M. O p-NP liberado foi determinado por espectrofotometria a 420 nm. Previamente, uma curva padrão de p-NP (20–a 160 μM) foi preparada para determinação de atividade da enzima. A atividade de β -glucosidase foi expressa como μM de p-NP liberado no respectivo tempo de incubação. Os resultados foram apresentados graficamente com μM p-NP em

função do tempo de incubação em minutos.

4.6.3 Efeito da Temperatura e pH de Incubação sobre a Atividade da Enzima

A temperatura ótima da β -glucosidase presente na fração F₄₂ para hidrólise de p-NPG foi determinada de 4 a 70°C, em intervalos de 10 °C, com incubação de 100 μ L de amostra e 400 μ L de p-NPG em tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0 por 30 min. O pH ótimo foi determinado entre pH de 3 e 8, em intervalos de 0,5 unidades de pH, na temperatura ótima de 45°C. O tampão fosfato-citrato foi utilizado para incubação. Os resultados foram expressos em percentagem de atividade de β -glucosidase em função da temperatura ou pH, respectivamente.

4.6.4 Estabilidade Térmica da Enzima

A estabilidade térmica da β -glucosidase da fração F₄₂ foi avaliada com a pré-incubação da enzima em temperaturas de 25 a 70°C em banho maria e tempos variáveis de 5 min a 10 dias. Também foi avaliada a estabilidade de β -glucosidase após 4 descongelamentos sucessivos. Quando necessário, as amostras foram resfriadas previamente e 100 μ L da fração F₄₂ pré-incubada foram adicionados em 400 μ L de p-NPG em tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0 por 30 min a 45°C. Os resultados foram expressos em percentagem de atividade de β -glucosidase em relação ao controle e temperaturas de pré-incubação da enzima.

4.6.5 Especificidade da Enzima com o Substrato p-NPG

O efeito da concentração de p-NPG de 0,1 mM a 20 mM na atividade de β -glucosidase da fração F₄₂ foi determinado nas condições de reação

de pH 5,0 e 30 min de incubação a 45°C. Os resultados foram expressos como unidade de atividade de β -glucosidases ($\mu\text{M p-NP min}^{-1}$).

Os valores de K_m e V_{max} foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk conforme descrito por Marzzoco e Torres (1999).

4.6.6 Especificidade da Enzima a Diferentes Substratos

A especificidade de atividade de β -glucosidase da fração F_{42} foi investigada, nas condições ótimas de reação da enzima de pH 5,0 e 30 min de incubação a 45°C, utilizando os seguintes substratos na concentração de 1 mM: derivados de β -D-glucosídeos (daidzina, genistina, salicina, celobiose, gentiobiose, amigdalina, esculina e metil- β -D-glucopiranosídeo) e derivados de *para* ou *orto*-nitrofenil (p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, p-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo, p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo, o-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo). A atividade de β -glucosidase foi determinada conforme descrito no item 4.2.3 e uma unidade de atividade de β -glucosidase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μM de p-NP min^{-1} , nas condições de ensaio.

Para determinação da especificidade da atividade β -glucosidase para daidzina e genistina para liberação das agluconas daidzeína e genisteína, foram utilizados 400 μL de substrato 1 mM e 100 μL da fração F_{42} e a reação interrompida com 2000 μL de metanol (Matsuura; Obata, 1993), nas condições ótimas de reação, pH 5,0 e 30 min de incubação a 45°C. A análise quantitativa de daidzeína e genisteína liberadas foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) segundo Berhow (2002). Neste procedimento, as amostras foram filtradas em filtros de 0,43 μm e 20 μL foram utilizados para separação e quantificação em cromatógrafo (Waters Serie 600) com injetor automático de amostras (Waters Serie 717) e detector de arranjo de fotodiodos (Waters Serie 996). A eluição das isoflavonas foi realizada pelo uso do sistema de gradiente linear binário em coluna de fase reversa do tipo ODS-C18 (Metachem, Torrance, CA) com diâmetro interno de 4,6 mm x 250 mm e partículas de 5 μm . A coluna foi equilibrada com 20% de metanol contendo 0,025% de ácido trifluoroacético e 80% de H_2O

contendo 0,025% de ácido trifluoroacético, com fluxo de 1 mL min⁻¹ e temperatura controlada a 25°C. Após a injeção, a condição inicial foi mantida por 2 min e atingindo 100% de metanol contendo 0,025% de ácido trifluoroacético em 50 min. Para detecção das isoflavonas foi utilizado o comprimento de onda de 260 nm e os picos foram identificados por seu espectro e tempo de retenção. As isoflavonas foram quantificadas por padronização externa (área dos picos) utilizando padrões como referência. Uma unidade de atividade da β -glucosidase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ M de aglucona min⁻¹, nas condições do ensaio.

A especificidade de atividade de β -glucosidase também foi investigada para os substratos derivados de β -D-glucosídeos: salicina, celobiose, gentiobiose, amigdalina, esculina e metil- β -D-glucopiranosídeo. A atividade de β -glucosidase foi determinada utilizando o método de glucose oxidase com sistema automatizado (Selectra 1, Vitalab/Merck). Neste procedimento, a glucose liberada foi quantificada por espectrofotometria a 420 nm. Uma unidade de atividade da β -glucosidase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ M de glucose min⁻¹, nas condições do ensaio.

Para determinação da especificidade da atividade de β -glucosidase utilizando os substratos derivados de *para* e *orto*-nitrofenil foi realizada a comparação com o substrato p-NPG, considerado neste estudo como 100% de atividade. A determinação da especificidade da atividade de β -glucosidase para os substratos derivados de β -D-glucosídeos, com atividade expressa em liberação de μ M de glucose foi comparada entre estes substratos, considerando 100% o substrato com maior liberação de glucose. Os resultados também foram comparados com o p-NPG.

Os resultados obtidos foram descritos na forma de artigo científico intitulado: Purificação e caracterização bioquímica parcial de β -glucosidase de cotilédones de soja e será encaminhado ao periódico ***Food Science and Technology***. A cópia do artigo científico completo e as normas para publicação neste periódico estão contidas no capítulo de Resultados e Discussão no item 6.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de três artigos científicos e de resumos apresentados em eventos científicos e de iniciação científica conforme segue.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 1, p. 19–24, 2007.



Original Article

Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groupsM.L.L. Ribeiro^a, J.M.G. Mandarino^b, M.C. Carrão-Panizzi^b, M.C.N. de Oliveira^b, C.B.H. Campo^b, A.L. Nepomuceno^b, E.I. Ida^{c,*}^aDepartment of Biochemistry and Biotechnology, Londrina State University, P.O. Box, 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR, Brazil^bEmbrapa Soybean, Londrina-PR, Brazil^cGraduate Program in Food Science, Department of Food and Drugs Technology, Agricultural Science Centre, Londrina State University, P.O. Box, 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR, Brazil

Received 29 July 2005; received in revised form 23 March 2006; accepted 3 July 2006

Abstract

Soy isoflavones are phenolic compounds comprised of aglucones, β -glucosides and β -glucosides conjugated with malonyl and acetyl groups. The β -glucosidases are a heterogeneous group of enzymes which hydrolyse β -glucosidic links of oligosaccharides and other glucosides conjugates releasing glucose. Thus the objective of this study was to determine the isoflavone forms content, β -glucosidase activity and their correlation in 18 soybean cultivars of different maturity groups under the same cultivation conditions. The predominant isoflavone forms were malonyldaidzin and malonylgenistin in all cultivars, corresponding to 67.0%, while β -glucoside and aglucone forms corresponded to 31.0% and 2.0%, respectively, of the total isoflavones; the acetylated form was not detected. This proportion among different forms was similar to all soybean cultivars studied. Regression analysis between number of days of maturity and all isoflavone forms were not significant. The relationship between maturity days and β -glucosides and malonyl-glucosides showed no correlation. However, a correlation was observed between maturity days and aglucones ($P < 0.08$). Regression analysis and correlation between β -glucosidase activity and cultivars of different number of days of maturity were not significant, and β -glucosidase activity did not correlate with isoflavone forms contents ($P < 0.05$).

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Glycine max* (L.) Merrill; Soybean; Cultivar; Isoflavone conjugates; Number of days of maturity

1. Introduction

The use of soybean as a food has increased because of the importance of its nutritional properties and the functional characteristics of the isoflavones compounds in potentially preventing chronic disease (Messina and Messina, 1991; Adlercreutz and Mazur, 1997; Anderson and Garner, 1997; Liu, 1997; Messina, 1999). Isoflavones are phenolic compounds that occur in soybean as aglucones (daidzein, genistein and glycitein), β -glucosides (genistin, daidzin and glycitin) and β -glucosides conjugated with malonyl (6''-O-malonyldaidzin, 6''-O-malonylgenistin and 6''-O-malonylglycitin) and acetyl groups (6''-O-acetyl-

daidzin, 6''-O-acetylgenistin and 6''-O-acetylglycitin). In general, isoflavone aglucones are found in soy in trace quantities (Liu, 1997).

In soybean, the isoflavone concentration and composition vary according to the part of the seed in which it is found (seed coat, cotyledon, axis). Several authors have considered isoflavone as the main phenolic soybean compounds and their concentration in different cultivars may vary from 126.1 to 409.2 mg/100 g of grains (Eldridge and Kwolek, 1983; Coward et al., 1993; Wang and Murphy, 1994; Tsukamoto et al., 1995; Araújo et al., 1997; Carrão-Panizzi et al., 1999). The isoflavone content of different soybean cultivars depends on genetic factors, sowing conditions, geographic location and temperature during cultivation (Eldridge and Kwolek, 1983; Wang and Murphy, 1994; Tsukamoto et al., 1995; Araújo et al., 1997;

*Corresponding author. Tel./fax: +55 43 3371 4080.
E-mail address: elida@uel.br (E.I. Ida).

Carrão-Panizzi et al., 1999). According to Kudou et al. (1991), accumulation of isoflavone in soybean seeds starts 35 days after flowering and Kitamura et al. (1991) reported lower isoflavone contents in early cultivars compared to those from late maturity group cultivars. However, so far, to the best of our knowledge, no reports are available that relate isoflavone forms to the number of days required for the seeds to reach maturity.

Soybean isoflavones have been widely studied because of their biological properties, which include oestrogenic (Liggins et al., 2000; Brouns, 2002), antioxidant (Park et al., 2001; Brouns, 2002) and antitumoral activities (Barnes, 1995; Lamartiniere et al., 1995; Fritz et al., 1998; Liggins et al., 2000). Additionally, there are claims that isoflavones may prevent cardiovascular diseases (Adlercreutz and Mazur, 1977; Liggins et al., 2000) and osteoporosis (Liggins et al., 2000). These biological properties are prevalent when the isoflavones are present as aglucones rather than as β -glucosides (Liggins et al., 2000).

The β -glucosidases (β -D-glucoside-*o*-glucohydrolase, EC. 3.2.1.21) form a heterogeneous group of enzymes, specific to glucosides. They catalyze and hydrolyse the β -glucosidic linkage of oligosaccharides and other glucoside conjugates releasing glucose. These enzymes are widely distributed in nature (Hsieh and Graham, 2001) and they can also be found in other legumes such as beans and chickpeas (Santosh et al., 1999), as well as in cereals such as corn and rye (Esen, 1992; Leah et al., 1995); in oranges and vanilla (Cameron et al., 2001; Odoux et al., 2003); and finally in micro-organism sources (Matsuda et al., 1992; Decker et al., 2001; Park et al., 2001; Miura et al., 2002; Yang et al., 2004). A technological application of β -glucosidase can be forwarded for soybean products by producing functional foods with high aglucone contents towards human health benefits.

The objective of this study was to determine qualitatively and quantitatively the contents of isoflavone forms, their β -glucosidase activity and to investigate their correlation with soybean cultivars of different maturity groups under the same cultivation conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Samples of 18 soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars from different maturity groups sown in the 2002/2003 season, in Londrina region, Paraná State, south of Brazil (585 m altitude, 23°11'S latitude, 24 °C average temperature) were analysed for isoflavone content and β -glucosidase activity. The classification of maturity groups in early, semi-early and medium was made according to the number of days the soybean required to reach maturity (from emergence of sprout to harvest), i.e. 100–110, 111–120 and 121–130 days, respectively.

2.2. Sample preparation

Samples of 30 g were taken from 100 g of seeds of each cultivar and made into three blocks of replication. Sampling sequences were randomized in each block of 18 cultivars. The samples were ground to obtain whole soybean flour, as proposed by Carrão-Panizzi and Bordignon (2000).

2.3. Isoflavone extraction and determination by HPLC

The isoflavone quantitative analysis was carried out following procedures proposed by Berhow (2002). Approximately 250 mg of sample were extracted in test tubes with 3.0 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO):methanol (1:4 v/v) for 15–17 h at room temperature and then centrifuged. Supernatants were filtered using 0.43 μ m filters, and an aliquot of 20 μ L was injected into a Shimadzu chromatographer (LC-10AT VP), equipped with photodiode array detector (SPD-M10A VP) and oven (CTO-10AS VP) kept at 26 °C. Analysis of isoflavones was performed with a reverse-phase column (CLC-ODS (M) C₁₈, 4.6 mm internal diameter \times 250 mm, 5 μ m particles) and eluted with a linear gradient system composed of water (H₂O, solvent 1) and acetonitrile (solvent 2). The initial gradient system consisted of 100% H₂O (pH 3.0 checked with trifluoroacetic acid) and 0% acetonitrile, changing to 45% of H₂O and 55% of acetonitrile in 25 min of elution. The isoflavones were detected at 260 nm. The gradient remained at 100% acetonitrile for 2 min and returned to the initial condition within next 8 min. The final elution time was 40 min. The solvent flow rate was 1 mL/min. Quantitative data for β -glucosides were obtained from comparison to known standards of genistin, daidzin and glycitin. Molar extinction coefficients obtained from those standards were used to determine the concentration of the malonyl-glucosides and aglucones. The isoflavone contents were expressed in mg/100 g of whole soybean flour on a dry weight basis.

2.4. Extraction and determination of β -glucosidase activity

The synthetic substrate *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NPG) was used to detect β -glucosidase activity, according to procedure described by Matsuura et al. (1995). β -glucosidases were extracted from a 100 mg of samples in a 1.5 mL 0.05 M citrate buffer, pH 4.5, containing 0.1 M NaCl for 1 h at room temperature (Carrão-Panizzi and Bordignon, 2000). Sample was centrifuged and the supernatant was analysed for enzyme activity by transferring 2 mL of 1 mM *p*-NPG in 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 5.0) to test tubes; they were kept in a water bath at 30 °C for 10 min. After that, 0.5 mL supernatant samples were added and placed in the water bath at 30 °C for 30 min. The reaction was interrupted by the addition of 2.5 mL 0.5 M sodium carbonate. The *p*-nitrophenol released in the reaction was determined by the yellow colour, read in spectrophotometer at 420 nm. A *p*-nitrophenol

(20–160 μM) calibration curve was previously prepared to determine the enzyme activity. A unit of enzyme activity (UA) was defined as the amount of β -glucosidases which would liberate 1 μM *p*-nitrophenol/min under the experimental conditions. The results were expressed as UA/g whole soybean flour on dry weight.

2.5. Experimental design and statistical analysis

A complete randomized block design with 18 cultivars and three blocks was used. The analysis of variance (ANOVA) was performed and if the effect of treatment were significantly at minimal 5% of probability, means were compared by Tukey test ($P < 0.05$). Regression analysis and correlation between β -glucosidase activity and isoflavone content (β -glucosides, malonyl-glucosides and aglucones) from 18 soybean cultivars of different maturity days. All data analysis were performed by SAS version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and SANEST programme (Zonta et al., 1982).

3. Results and discussion

The total isoflavone content and β -glucosidase activity (Table 1), malonyl-glucosides (Table 2) and β -glucosides and aglucones contents (Table 3) were analysed in 18 soybean cultivars from different maturity groups. The total

Table 1
Total isoflavone content and β -glucosidase activity levels of 18 soybean cultivars (sown in the 2002/2003 season, Londrina, PR)^a

Cultivar	Maturity groups ^b	Total isoflavone (mg/100g)	β -glucosidase activity (UA/g)
BRS 213	Early	80.27 ^{ghij}	88.97 ^a
BRS 132	Early	89.93 ^{efghi}	81.61 ^{abc}
BRS 183	Early	152.44 ^{ab}	72.19 ^{defg}
BRS 212	Early	174.30 ^a	66.29 ^{fgh}
BRS 230	Early	71.11 ^{ij}	63.44 ^{gh}
Emb rap a 48	Semi-early	127.96 ^{bcd}	80.39 ^{abcd}
BRS 184	Semi-early	94.99 ^{efghi}	78.39 ^{bode}
BRS 216	Semi-early	89.87 ^{efghi*}	75.28 ^{cdef}
BRS 156	Semi-early	108.00 ^{cdce*}	72.89 ^{cdef}
BRS 231	Semi-early	79.14 ^{hij}	72.67 ^{cdef}
BRS 154	Semi-early	110.64 ^{cde}	71.16 ^{efg}
BRS 185	Semi-early	102.31 ^{defg}	70.72 ^{efg}
BRS 133	Semi-early	106.66 ^{cdef}	68.43 ^{fgh}
BRS 214	Semi-early	121.20 ^{cde*}	67.71 ^{fgh}
BRS 232	Semi-early	61.83 ^j	61.10 ^h
BRS 233	Medium	128.26 ^{bcd}	86.22 ^{ab}
BRS 215	Medium	80.57 ^{fghij}	73.77 ^{cdef}
BRS 134	Medium	100.84 ^{efgh}	71.37 ^{defg}
CV		7.88	4.00

CV: Coefficients of variation. Mean value followed by the same letters in the columns are not significantly different (Tukey $P \leq 0.05$).

^aResults expressed in dry weight.

^bClassification according to days from emergence to maturity in 2002 and 2003.

^{*}Mean values of two blocks.

Table 2

Malonyl-glucosides content of 18 soybean cultivars (sown in the 2002/2003 season, Londrina, PR)^a

Cultivar	Malonyl-glucosides (mg/100g)		
	Malonylgenistin	Malonyldaidzin	Malonylglicitin
BRS 213	33.51 ^{fghi}	21.63 ^{fgh}	Nd
BRS 132	37.16 ^{efgh}	23.41 ^{defg}	Nd
BRS 183	69.86 ^b	33.31 ^{abod}	Nd
BRS 212	81.44 ^a	36.35 ^{nb}	Nd
BRS 230	30.88 ^{ghi}	15.48 ^f	Nd
Emb rap a 48	47.92 ^c	35.26 ^{abc}	Nd
BRS 184	35.94 ^{efgh}	27.65 ^{abodef}	Nd
BRS 216	28.97 ^{ghi}	25.48 ^{cdef}	3.64
BRS 156	38.67 ^{cdefg}	33.34 ^{abod}	Nd
BRS 231	24.74 ^l	18.43 ^{fg}	10.82
BRS 154	43.48 ^{cdef}	29.41 ^{abode}	Nd
BRS 185	36.23 ^{efgh}	31.60 ^{abode}	Nd
BRS 133	38.72 ^{cdefg}	33.83 ^{abod}	Nd
BRS 214	44.81 ^{cde}	38.19 ^a	Nd
BRS 232	25.06 ^l	15.32 ^g	Nd
BRS 233	47.43 ^{cd}	26.98 ^{bdef}	17.46
BRS 215	28.03 ^{ghi}	26.31 ^{bdef}	Nd
BRS 134	37.70 ^{defgh}	31.22 ^{abode}	Nd
CV	8.05	12.41	

CV: Coefficients of variation. Nd: not detected.

Mean value followed by the same letters in the columns are not significantly different (Tukey $P \leq 0.05$).

^aResults expressed in dry weight.

isoflavone content varied from 71.11 to 174.30 mg/100 g in early cultivars; 61.83–127.96 mg/100 g in semi-early cultivars and finally 80.57–128.26 mg/100 g for the medium maturity group. The analysis of variance showed that there were significant differences (2.8 times) in the total isoflavone content among cultivars. However, the regression analysis was not significant between maturity days and β -glucosides ($R^2 = 0.02$), malonyl-glucosides ($R^2 = 0.02$) and aglucones ($R^2 = 0.19$). The correlation between maturity days and total isoflavone content ($r = -0.15$), β -glucosides ($r = -0.14$) and malonyl-glucosides ($r = -0.15$) was not significant, indicating that maturity days did not influence in these variables. However the correlation between maturity days and aglucones ($r = -0.43$) was indeed significant ($P < 0.08$) showing that the aglucones content was possibly influenced by the number of days of maturity. Unfortunately, the results of this study have not been reported anywhere else under similar conditions, thus no data comparison can be made at this time. This type of experiment will need to include samples from unsprouted seeds.

The highest total isoflavone content was observed in the BRS 212 cultivar that belongs to the early maturity group, and the lowest was in the BRS 232, a semi-early maturity group cultivar. Therefore, differences in the total isoflavone content, β -glucosides and malonyl-glucosides were independent of the maturity groups. When analysing soybean cultivars from the 1993/1994 growing season, at an average temperature of 24 °C, Carrão-Panizzi (1996) obtained

Table 3
 β -glucosides and aglucones content of 18 soybean cultivars (sown in the 2002/2003 season, Londrina, PR)^a

Cultivar	β -glucosides (mg/100g)			Aglucones (mg/100g)	
	Genistin	Daidzin	Glicitin	Genistein	Daidzein
BRS 212	32.71 ^a	16.17 ^a	3.88 ^d	2.17 ^a	1.58 ^a
BRS 183	27.06 ^b	14.21 ^{ab}	5.04 ^{bcd}	1.64 ^b	1.32 ^{ab}
BRS 132	13.71 ^{efg}	9.00 ^{efg}	4.93 ^{cd}	0.96 ^{def}	0.76 ^{cd}
BRS 230	13.38 ^{efgh}	6.70 ^{gh}	3.08 ^d	0.90 ^{ef}	0.69 ^{cd}
BRS 213	11.54 ^{gh}	8.13 ^{efgh}	3.88 ^d	0.81 ^{fgh}	0.59 ^{cd}
BRS 184	13.90 ^{defg}	9.03 ^{efg}	5.80 ^{abcd}	1.36 ^c	1.31 ^{ab}
BRS 214	15.95 ^{cdef}	13.83 ^{ab*}	5.95 ^{abcd}	1.13 ^{cd}	1.35 ^a
Emb rap a 48	19.52 ^c	14.45 ^{ab}	8.68 ^{ab}	1.18 ^{cd}	0.95 ^{bcd}
BRS 154	17.58 ^{cd}	12.13 ^{bcd}	6.27 ^{abcd}	1.04 ^{de}	0.73 ^{cd*}
BRS 185	14.31 ^{defg}	11.95 ^{bcd}	6.38 ^{abcd}	0.83 ^{efg}	1.01 ^{bc}
BRS 133	13.66 ^{efg}	13.44 ^b	5.43 ^{abcd}	0.77 ^{fgh}	0.81 ^{cd}
BRS 216	12.76 ^{fgh}	9.97 ^{def}	7.79 ^{abc}	0.66 ^{hij}	0.60 ^{cd}
BRS 156	14.20 ^{defg}	12.73 ^{bc}	7.73 ^{abc}	0.60 ^{ghij}	0.72 ^{cd}
BRS 231	10.65 ^{gh}	7.52 ^{fgh}	5.67 ^{abcd}	0.65 ^{ghij}	0.66 ^{cd}
BRS 232	10.50 ^{gh}	6.18 ^h	3.67 ^d	0.61 ^{ghij}	0.49 ^d
BRS 134	13.36 ^{efgh}	10.65 ^{cde}	6.13 ^{abcd}	0.77 ^{fgh}	1.01 ^{bc}
BRS 215	9.77 ^h	9.09 ^{efg}	6.13 ^{abcd}	0.44 ^{ij}	0.80 ^{cd}
BRS 233	17.01 ^{cde}	9.89 ^{def}	9.08 ^{a*}	0.41 ^j	Nd ^{e*}
CV	7.92	7.88	20.47	7.72	16.80

CV: Coefficients of variation. Nd: not detected.

Mean value followed by the same letters in the columns are not significantly different (Tukey $P \leq 0.05$).

^aResults expressed in dry weight.

*Mean values of two blocks.

similar results. This author observed that the total isoflavone content in the early and semi-early maturity groups cultivars was 35.82–121.38 mg/100 g, and in the medium group, 9.58–121.72 mg/100 g. Variability in total isoflavone contents was also not related to the maturity group, but it was related to the cultivar's genetic characteristics.

Several investigations have reported that isoflavone contents are affected by genetic diversity and environmental conditions. Temperatures higher than 24 °C during seed development reduced the isoflavone content (Kitamura et al., 1991; Carrão-Panizzi and Kitamura, 1995; Tsukamoto et al., 1995; Carrão-Panizzi, 1996; Carrão-Panizzi et al., 1998; Carrão-Panizzi and Bordignon, 2000). Similar results were observed in this study for the total isoflavone content of the 18 soybean cultivars from different groups of maturity. However, Kitamura et al. (1991) reported lower isoflavone contents in early cultivars compared to those from late maturity group cultivars. In Japan they are called "summer" cultivars, and their seed development occurs at higher temperatures. The isoflavone content increases when the early cultivars are submitted to the same conditions as late cultivars; they have an extended development as well.

The predominant soybean isoflavone forms were malonylgenistin and malonyldaidzin (Table 2) ranging from 24.74 to 81.44 and 15.32 to 38.19 mg/100 mg, respectively. Malonylglycitin was detected only in the BRS 233, BRS 216 and BRS 231 cultivars. The β -glucosides, genistin, daidzin and glycitin contents (Table 3) ranged from 9.77 to

32.71, 6.18 to 16.17 and 3.08 to 9.08 mg/100 g, respectively. The aglucones, genistein and daidzein concentration were 0.41–2.17 and 0.49–1.58 mg/100 g. Neither daidzein in the BRS 233 cultivar nor acetyl isoflavone conjugates were detected in any cultivar tested here. Therefore the malonyl, β -glucosides and aglucones forms corresponded to approximately 67.0%, 31.0% and 2.0% of the total isoflavone content. According to Kudou et al. (1991), both the malonylgenistin and malonyldaidzin fractions corresponded to 66.0% of total isoflavone in soybean seeds; these results were corroborated by other reports (Carrão-Panizzi, 1996; Araújo et al., 1997; Toda et al., 2001).

The β -glucosidase activity (Table 1) for cultivars of the early, semi-early and medium maturity groups were 63.44–88.97, 61.10–80.39 and 71.37–86.22 UA/g, respectively. Analysis of variance showed significant differences in the β -glucosidase activity among the 18 cultivars; regression analyses ($R^2 = 0.001$) and correlation ($r = -0.03$) between maturity days and β -glucosidase activity were not significant, indicating that maturity days did not influence the enzyme activity. The BRS 213 (early maturity group) and BRS 232 (semi-early maturity group) cultivars presented, respectively, the highest (88.97 UA/g FSI) and the lowest (61.10 UA/g FSI) β -glucosidase activity. Differences were also reported by Carrão-Panizzi and Bordignon (2000); however the β -glucosidase activity in their case ranged from 96.3 to 176.1 UA/g in 51 soybean cultivars (1993/1994 soybean season), sown in Londrina, Brazil, corresponding to 1.8-fold difference. Since all cultivars were grown under similar environmental

conditions, the differences observed among the cultivars (Table 1) indicate genetic differences. However, Toda et al. (2001) did not observe significant differences in the β -glucosidase activity of four soybean cultivars cultivated in Japan in 1998, and the results varied from 0.02 to 0.03 UA/g.

Variations of 2.8 times in the total isoflavone content and of 1.4 times in the β -glucosidase activity of 18 soybean cultivars suggested that the environmental conditions affected the β -glucosidase activity less than total isoflavone content. The β -glucosidase activity did not correlate significantly with isoflavone content ($r = 0.03$), β -glucosides ($r = -0.0004$), malonyl-glucosides ($r = 0.06$) and aglucones ($r = -0.27$) and similar results were reported by Carrão-Panizzi and Bordignon (2000).

In order to improve the relation of β -glucosidase: isoflavone, the conditions for this reaction are needed. For instance, the optimal conditions for soybean β -glucosidase activity were reported by others as pH 5.5 at 45 °C (Matsuura and Obata, 1993) or pH 6.0 at 30 °C (Hsieh and Graham, 2001). As has already been pointed out, the soybean β -glucosidases show more activity during seed germination (Ribeiro et al., 2006), and also during the processing of soy products, such as hydrating and fermentation processes (Murphy, 1982; Matsuura et al., 1989; Coward et al., 1993; Santosh et al., 1999).

4. Conclusions

The results of this study showed that a significantly higher amount of isoflavone aglucones in soybean seed was obtained in early maturing groups. β -glucosidase activity and contents of β -glucosides, malonyl glucosides, did not correlate significantly regardless of seed maturity group. In order to find a soybean cultivar with higher aglucones contents, further research should be carried out in unsprouted soybean seeds.

Acknowledgments

This research was financed by CNPq and Araucária Foundation. E.I. Ida is currently CNPq Research Fellows.

References

- Adlercreutz, H., Mazur, W., 1997. Phyto-oestrogens and western diseases. *Annals of Medicine* 29 (2), 95–102.
- Anderson, J.J.B., Garner, S.C.G., 1997. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutrition Research* 17 (10), 1617–1632.
- Araújo, J.M.A., Carlos, J.C.S., Sedyama, C.S., 1997. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de beta-glucosidase na formação do sabor amargo e adstringente. *Ciência Tecnologia de Alimentos* 17 (2), 137–141.
- Barnes, S., 1995. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *Journal of Nutrition* 125, 777–783.
- Berhow, M.A., 2002. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: Buslig, B.S., Manthey, J.A.E. (Eds.), *Flavonoids in the Living Cell*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 61–76.
- Brouns, F., 2002. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health food sector. *Food Research International* 35, 187–193.
- Cameron, R.G., Manthey, J.A., Baker, R.A., Grohmann, K., 2001. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia fruit tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4457–4462.
- Carrão-Panizzi, M.C., 1996. Avaliação de cultivares de soja quanto aos teores de isoflavonóides. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 31 (10), 691–698.
- Carrão-Panizzi, M.C., Belícia, A.D.P., Kitamura, K., Oliveira, M.C.N., 1999. Effects of genetics and environment of isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34 (10), 1787–1795.
- 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.
- Carrão-Panizzi, M.C., Belícia, A.D.P., Kitamura, K., Oliveira, M.C.N., 1998. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybeans cultivars. *Breeding Science* 48, 409–413.
- Carrão-Panizzi, M.C., Kitamura, K., 1995. Isoflavone content in Brazilian soybean cultivars. *Breeding Science* 45, 295–300.
- Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R., Barnes, S., 1993. Genistein, daidzein, and their β -glucoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal of Food Agricultural and Food Chemistry* 41, 1961–1967.
- Decker, C.H., Visser, J., Schreier, P., 2001. β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 157–163.
- Eldridge, A.C., Kwolek, W.F., 1983. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 394–396.
- Esen, A., 1992. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. *Plant Physiology* 98 (1), 174–182.
- Fritz, W.A., Coward, L., Wang, J., Lamartiniere, C.A., 1998. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 19 (12), 2151–2158.
- Hsieh, M.C., Graham, T.L., 2001. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry* 58, 995–1005.
- Kitamura, K., Igita, K., Kikuchi, A., Kudou, S., Okubo, K., 1991. Low isoflavone content in early maturing cultivars, so-called summer-type soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). *Japanese Journal of Breeding* 41, 651–654.
- Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K., Okubo, K., 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL). *Journal of Agricultural and Biological Chemistry* 55 (9), 2227–2233.
- Lamartiniere, C.A., Moore, J., Holland, M., Barnes, S., 1995. Neonatal genistein chemo prevents mammary cancer. *Experimental Biology and Medicine* 208, 120–123.
- Leah, R., Kegel, J., Svendsen, I., Mundy, J., 1995. Biological and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase. *Journal of American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 270 (26), 15789–15797.
- Liggins, J., Bluck, L.J.C., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W.A., Bingham, S.A., 2000. Daidzein and genistein contents of vegetables. *British Journal of Nutrition* 84, 717–725.
- Liu, K., 1997. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. IPT, New York, pp. 82–93.
- Matsuda, S., Miyazaki, T., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., Ohta, N., Ueda, S., 1992. Hydrolysis of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* IFO 3425. *Journal of Fermentation Bioengineering* 74 (5), 301–304.
- Matsuura, M., Obata, A., 1993. β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science* 58 (1), 144–147.

- Matsuura, M., Obata, A., Fukushima, D., 1989. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. *Journal of Food Science* 54 (3), 602–605.
- Matsuura, M., Sasaki, J., Muraio, S., 1995. Studies on beta-glucosidase from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59 (9), 1623–1627.
- Messina, M.J., 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition* 70, 439–450.
- Messina, M.J., Messina, V., 1991. Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. *Journal of American Dietetic Association* 91, 836–840.
- Miura, T., Yuan, L., Sun, B., Fujii, H., Yoshida, M., Wakame, K., Kosuna, K., 2002. Isoflavone aglycon produced by culture of soybean extracts with basidiomycetes and its anti-angiogenic activity. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66 (12), 2626–2631.
- Murphy, P.A., 1982. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technology* 36, 60–64.
- Odoux, E., Chauwin, A., Brillouet, J., 2003. Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -D-glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3168–3173.
- Park, Y.K., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Mascarenhas, H.A.A., Scamparini, A.R.P., 2001. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 3 (3), 156–160.
- Ribeiro, M.L.L., Mandarino, J.M.G., Carrão-Panizzi, M.C., Oliveira, M.C.N., Campo, C.B.H., Nepomuceno, A.L., Ida, E.I., 2006. β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. *Journal of Food Biochemistry* 30, 453–465.
- Santosh, T.R., Balasubramanian, K.K., Lalitha, K., 1999. Enhancement of beta-glucosidase and beta-galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by exposure to the allelochemical mimosine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 462–467.
- Toda, T., Sakamoto, A., Takayanagi, T., Yokotsuka, K., 2001. Changes in isoflavona compositions of soybean during soaking in water. *Food Science Technology Research* 7 (2), 171–175.
- Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K., Kitamura, K., 1995. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1184–1192.
- Wang, H., Murphy, P.A., 1994. Isoflavone composition of the American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 1674–1677.
- Yang, L., Ning, Z.S., Shi, C.Z., Chang, Z.Y., Huan, L.Y., 2004. Purification and characterization of an isoflavona-conjugates-hydrolyzing β -glucosidase from endophytic bacterium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 1940–1944.
- Zonta, E.P., Machado, A.A., Silveira Júnior, P., 1982. Sistema de Análise Estatística-SANEST, Registro na SEI No. 066060, UFPEL, Pelotas, 63pp.

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2: β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. Journal of Food Biochemistry, v. 30 p. 453–465, 2006

β -GLUCOSIDASE ACTIVITY AND ISOFLAVONE CONTENT IN GERMINATED SOYBEAN RADICLES AND COTYLEDONS

M.L.L. RIBEIRO^{1,3}, J.M.G. MANDARINO², M.C. CARRÃO-PANIZZI², M.C.N. OLIVEIRA² and C.B.H. CAMPO², A.L. NEPOMUCENO² and E.I. IDA^{3,4}

¹*Department of Biochemistry and Biotechnology
Londrina State University*

²*Embrapa Soybean
Londrina-PR, Brazil*

³*Graduate Program in Food Science, Department of Food and Drugs Technology
Agricultural Science Centre
Londrina State University
PO Box 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR, Brazil*

Received for Publication September 22, 2005
Accepted for Publication November 4, 2005

ABSTRACT

Seeds of BRS 213 soybean cultivar were germinated for 72 h at 25°C. Samples were collected and analyzed every 6 h during germination. β -glucosidase activity increased 3.3-fold in radicles and 2.3-fold in cotyledons. In the radicles, there was a significant decrease in total isoflavone content (6.3-fold), while for malonyl forms, daidzin and glycitin, there was a decrease of 5.0- to 10.0-fold. Daidzein did not vary significantly during germination, while genistein and glycitein were detected at some germination times. In the cotyledons, there was an increase in total isoflavone content (2.4-fold), malonylgenistin (2.6-fold) and 3.3-fold increases for malonyldaidzin. Genistin and daidzin did not vary significantly during germination and genistein was only detected 0 and 6 h after incubation.

INTRODUCTION

Soybean consumption in Western countries has increased due to its nutritional properties and functional characteristics of compounds, as isoflavones. In soybean, the isoflavones can be found in different chemical forms such as aglycones (genistein, daidzein and glycitein), β -glucosides (genistin, daidzin

⁴ Corresponding author. TEL: (55) 43-3371-4080; FAX: (55) 43-3371-4080; EMAIL: elida@uel.br

and glycitin), malonylglucosides (malonylgenistin, malonyldaidzin and malonylglycitin) and acetylglucosides (acetylgenistin, acetyldaidzin and acetylglycitin). Soybean has a high content of β -glucosides and the aglycones are found in trace quantities.

Soybean isoflavones were described by their biological properties, preventing chronic diseases acting as phytoestrogen, antioxidant and antitumoral activity (Anderson and Garner 1997; Constantinou *et al.* 1998; Messina 1999; Brouns 2002; Lai and Yen 2002). The bioavailability of soybean isoflavones in humans depends on their metabolism capacity, which is related to ethnic backgrounds, dietary habits and intestinal microflora that cause variations in the amount as well as activity of the gut β -glucosidases. β -Glucosides are hydrolyzed by β -glucosidases of the intestinal microflora into aglycones (Ismail and Hayes 2005). The β -glucosides have less estrogenic activity when compared to their respective aglycone forms, because of hydrophilic capacity and lower molecular weight, with better absorption (Izumi *et al.* 2000; Brouns 2002).

The β -glucosidases (β -D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) are a heterogeneous group of enzymes, which hydrolyse β -glucosidic links of oligosaccharides and other glucosides conjugates releasing glucose. These enzymes are widely distributed in plant sources and have a high specificity for isoflavones (Hsieh and Graham 2001). The presence of aglycone isoflavones in soybean is related to β -glucosidase activity. During grain hydration, these enzymes hydrolyze the β -glucosides, forming the aglycones daidzein and genistein (Matsuura *et al.* 1989). It was reported that β -glucosidases from microbial sources hydrolyze β -glucosides of soybean into aglycones (Matsuda *et al.* 1992, 1994; Park *et al.* 2001; Miura *et al.* 2002; Tsangalis *et al.* 2002; Wu *et al.* 2004).

During soybean seed germination, important biochemical alterations take place such as enzyme activation, including β -glucosidase (Chen and Pan 1977; Bau and Debry 1979; Murphy 1982; Abdullah *et al.* 1984; Mostafa and Rahma 1987; Santosh *et al.* 1999; Kuo *et al.* 2004). Germinated soybean could therefore be an alternative to enhance isoflavone aglycones to obtain functional products.

The objective of this study was to assess the β -glucosidase activity and to estimate total isoflavone content and its chemical forms in germinated soybean radicle and cotyledon.

MATERIALS AND METHODS

Raw Material

Seeds of soybean cultivar BRS 213 were selected because of its high β -glucosidase activity compared to other soybean cultivars sown in the 2002/

2003 growing season. The cultivar was supplied by the Embrapa-National Center for Soybean Research, Londrina, Brazil.

Soybean Germination

Three blocks of eight germination paper rolls, for each of 13 germination time, with 50 selected seeds (BRS 213 cultivar), were randomly placed in a germination chamber at 25C (\pm 1C) and 10 h of lighting, for 72 h. The samples were removed every 6 h of germination, the radicles were separated from the cotyledons, and the seed coat was discarded. Germinated seed parts were frozen and freeze-dried. Parts of nongerminated seeds were used as control. The samples were ground and stored at -20 C for analysis.

Soybean seed germination at 25C and 100% moisture was viable only up to 72 h, after which there was an accentuated root system growth and seedling development. The temperature used is based on recommendations by the Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa De Soja (2005).

Extraction and Determination of β -Glucosidases Activities

The synthetic substrate p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p-NPG) was used to determine β -glucosidase activities, according to the procedure described by Matsuura *et al.* (1995). β -Glucosidases were extracted from a 100-mg sample of whole soybean flour with 1.5 mL of 0.05 M citrate buffer, pH 4.5, containing 0.1 M NaCl for 1 h at room temperature (Carrão-Panizzi and Bordignon 2000). The samples were centrifuged and the supernatant was kept for enzyme activity analysis. Two milliliters of 1 mM p-NPG with 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 5.0) was transferred to test tubes and kept in a water bath at 30C for 10 min. Then, 0.5-mL supernatant samples were added and test tubes were placed in the water bath at 30C for 30 min. The reaction was interrupted by adding 2.5 mL of 0.5 M sodium carbonate. The p-nitrophenol released in the reaction was read in a spectrophotometer at 420 nm. A p-nitrophenol (20–160 μ M) calibration curve was previously prepared to determine the enzyme activity.

One unit of enzyme activity (UA) was defined as the amount of β -glucosidases liberated by 1 μ M p-nitrophenol/min under the experimental conditions. Results were expressed as β -glucosidases activity levels (UA/g of sample on dry weight) and clustered according to germination time.

Isoflavone Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Analyses

Quantitative analysis of isoflavone was carried out following procedures proposed by Berhow (2002). Approximately 250 mg of whole soybean flour

was extracted in test tubes with 3.0 mL of dimethyl sulfoxide : methanol (1 : 4 v/v). After 15–17 h at room temperature, the extracts were centrifuged and supernatants were filtered in 0.43- μ m filters. For isoflavone analysis, a 20 μ L aliquot was injected into a Shimadzu chromatographer (LC-10AT VP, Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with photodiode array detector (SPD-M10A VP) and oven (CTO-10AS VP) to maintain the samples at 26C temperature. The analyses were developed in a reverse-phase column (CLC-ODS [M] C18, 4.6 \times 250-mm internal diameter, 5 μ m particles) and eluted with a linear gradient system composed of water (H₂O, solvent 1) and acetonitrile (solvent 2). The initial gradient system consisted of 100% H₂O (pH 3.0) and 0% acetonitrile, changing to 45% of H₂O and 55% of acetonitrile, in 25 min of elution. The isoflavones were detected at 260 nm. The gradient was maintained at 100% acetonitrile for 2 min and returned to the initial condition in the next 8 min. Final elution time was 40 min and solvent flow rate was 1 mL/min.

The isoflavones were identified and quantified by comparing the standard genistin, daidzin and glycitin curves. Concentration of the malonylglucosides and aglycones were calculated from the standard curves of their corresponding β -glucosides, using the similarity of the molar extinction coefficients of malonyl-isoflavones and their β -glucosides (Coward *et al.* 1998). Isoflavone contents were expressed in mg/100 g of sample on a dry weight basis and clustered according to the germination time.

Experimental Design and Statistical Analyses

The experiment was conducted in a randomized complete block design, replicated three times for the 13 germination times. Analysis of variance was carried out and treatment mean effects were compared by the Tukey test ($p < 0.05$). Regression analyses and correlation between β -glucosidase activity level and isoflavone content were carried out. The data were analyzed by SAS (SAS 1999) and Sistema de Análise Estatística-SANEST (Zonta *et al.* 1982).

RESULTS AND DISCUSSION

β -Glucosidase Activity and Total Isoflavone Content in Soybean

The seeds of BRS 213 soybean cultivar were composed of 86.8% cotyledons, 3.2% radicle and 10% seed coat. Ninety-eight percent of β -glucosidase activity was in the seed cotyledons, and it was 1.7-fold greater in the cotyledons (127.16 UA/g) than in the radicle (75.67 UA/g). No β -glucosidase activity was detected in the seed coat.

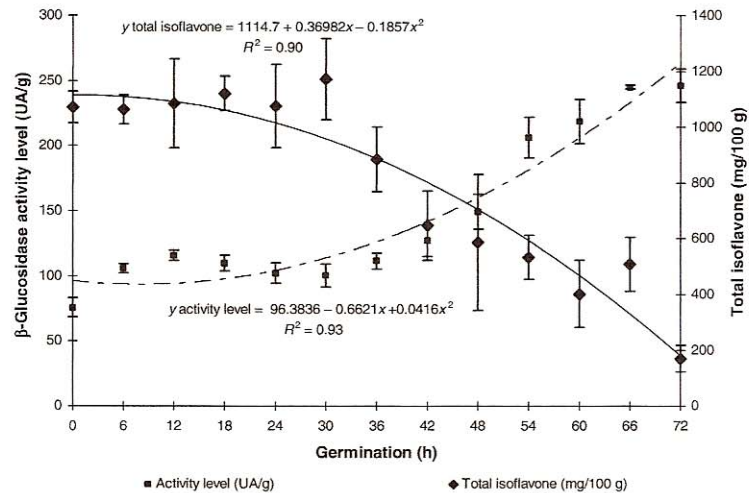


FIG. 1. β -GLUCOSIDASE ACTIVITY LEVELS AND TOTAL ISOFLAVONE CONTENT IN BRS 213 SOYBEAN RADICLES GERMINATED FOR 72 h. Bars indicate SD of three determinations for the β -glucosidase activities and total isoflavone in each germination time.

The total isoflavone content in the radicle and cotyledons in BRS 213 soybean cultivar was 48.2 and 51.8%, respectively. However, when comparing soybean seeds components, it was observed that the total isoflavone content in the radicle (1071.63 mg/100 g) was 25.2-fold greater than that in the cotyledons (42.50 mg/100 g). Kudou *et al.* (1991) observed that the total isoflavone content in the soybean radicle was 5.5-fold greater than that in the cotyledon. Isoflavones were not detected in the seed coat as also observed by Kudou *et al.* (1991).

β -Glucosidase Activity and Isoflavone Content in Germinated Soybean Radicle

β -Glucosidase activity levels and total isoflavone contents of the radicles germinated for 72 h are shown in Fig. 1. Throughout the germination time, a significant increase ($p < 0.05$) was observed in the β -glucosidase activities levels and a significant reduction ($p < 0.05$) was observed in the total isoflavone content. The regression analysis shows a good fit ($R^2 = 0.93$ and 0.90) to a quadratic polynomial model of β -glucosidase activity levels and total isoflavone content (Fig. 1). Correlation between β -glucosidase activity levels and isoflavone content in the germinated soybean radicle was negative; the observed coefficient of determination (r) was -0.91 . Thus, β -glucosidase

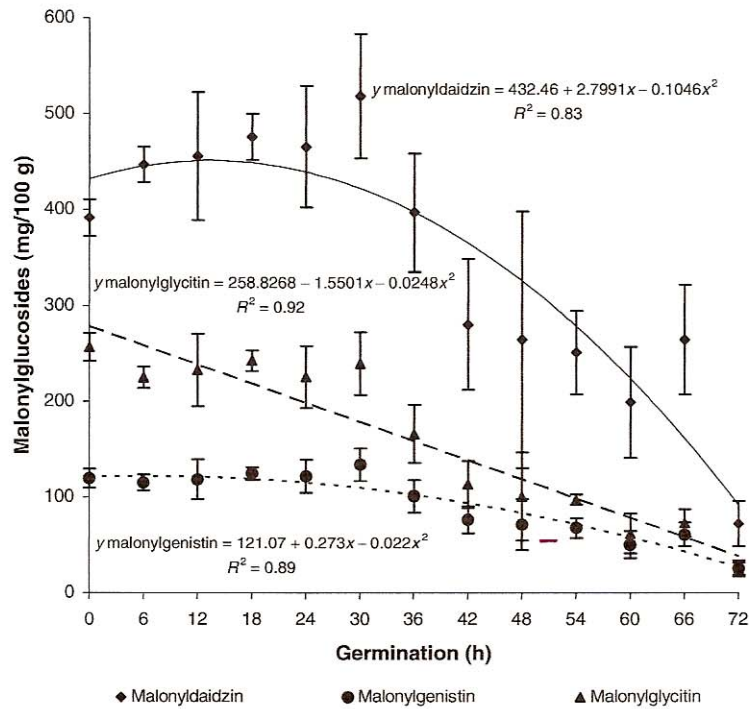


FIG. 2. MALONYLGLUCOSIDE CONTENT IN BRS 213 SOYBEAN RADICLES GERMINATED FOR 72 h

Bars indicate SD of three determinations of malonylglucosides in each germination time.

activity in soybean radicles germinated for 72 h increased 3.3-fold and total isoflavone content decreased 6.3-fold, indicating enzyme action on isoflavones. In nongerminated seeds, Carrão-Panizzi and Bordingnon (2000) reported that soybean β -glucosidase activity and total isoflavone content do not significantly correlate. It can be concluded therefore that the process of soybean germination may be an alternative to obtain radicles with high β -glucosidase activity and reduced total isoflavone content.

The malonylglucosides (malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglycitin), β -glucosides (daidzin and glycitin) and aglycone (daidzein, glicitein and genistein) contents in the soybean radicle germinated for 72 h are shown in Figs. 2 and 3 and Table 1. Acetylglucosides and the β -glucoside genistein were not detected. The content of malonyl forms (Fig. 2) decreased significantly in the soybean radicles germinated for 72 h ($p < 0.05$). By regression analysis, the experimental data of malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglycitin contents were a good fit ($R^2 = 0.83$,

β-GLUCOSIDASE ACTIVITY AND ISOFLAVONE CONTENT IN SOYBEAN 459

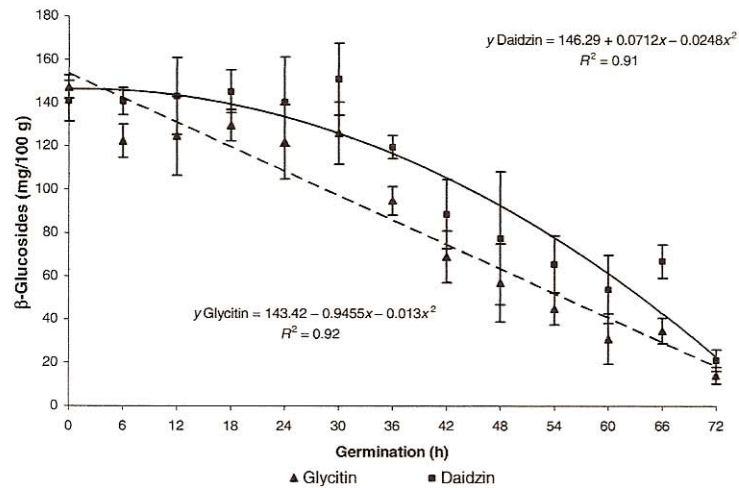


FIG. 3. β-GLUCOSIDE CONTENT IN BRS 213 SOYBEAN RADICLES GERMINATED FOR 72 h
 Bars indicate SD in each germination time of three determinations for the β-glucoside content in each germination time.

TABLE 1.
 ISOFLAVONE CONTENT* IN BRS 213 RADICLES AND COTYLEDONS OF SOYBEAN GERMINATED FOR 72 h

Germination (h)	Radicles		Cotyledons	
	Daidzein	Genistein	Genistin	Daidzin
0	7.95 ± 0.84 ^{bc}	2.07 ± 0.21	6.52 ± 0.27 ^a	4.00 ± 0.50 ^a
6	7.69 ± 0.35 ^{bc}	1.77 ± 0.35	6.42 ± 0.57 ^a	4.30 ± 0.62 ^a
12	6.06 ± 1.16 ^{bc}	0.79 ± 0.17	6.61 ± 0.99 ^a	3.53 ± 0.95 ^a
18	1.24 ± 0.45 ^c	nd	7.69 ± 0.23 ^a	4.08 ± 1.10 ^a
24	0.66 ± 0.24 ^c	nd	6.99 ± 1.02 ^a	3.66 ± 0.98 ^a
30	3.18 ± 0.32 ^{bc}	nd	7.06 ± 1.02 ^a	4.67 ± 1.26 ^a
36	5.82 ± 2.15 ^{bc}	nd	7.05 ± 1.05 ^a	4.81 ± 1.30 ^a
42	16.82 ± 6.22 ^a	1.83 ± 0.51	7.33 ± 0.10 ^a	5.02 ± 1.03 ^a
48	19.30 ± 7.14 ^{a†}	1.72 ± 0.61	6.05 ± 0.41 ^a	3.84 ± 0.40 ^a
54	6.07 ± 1.77 ^{bc}	nd	6.54 ± 0.35 ^a	4.25 ± 0.84 ^a
60	5.35 ± 0.81 ^{bc}	nd	7.24 ± 1.08 ^a	4.68 ± 1.26 ^a
66	7.57 ± 1.88 ^{bc}	nd	7.89 ± 1.18 ^a	5.15 ± 1.39 ^a
72	10.16 ± 3.75 ^{ab}	1.50 ± 0.46	7.58 ± 0.57 ^a	4.69 ± 1.05 ^a

Values with different superscript letters in the same column are significantly different at $P < 0.05$.

* Results are expressed in mg/100 g dry matter.

† Means of two blocks.

nd, not detected.

0.89 and 0.90) to quadratic polynomial models. Malonylglucosides degradation was detected in the radicle and increased with time. Malonylgenistin and malonylglicitin contents dropped to less than 100 mg/100 g of radicle. Reduction was also observed in malonyldaidzin, whose content was higher than others. Graham (1991) reported 17% increase in malonyldaidzin and 13% reduction in malonylgenistin in the soybean radicle tip germinated under light, for up to 3 days, and the contents dropped to 67 and 83%, respectively, in 7 days of germination. In this study, malonyldaidzin was present at high concentrations (6037 nmol/g of fresh tissue) in 7 days of germinated soybean root tip, whose meristemic tissue presence is associated with root growth.

β -Glucoside contents in radicles of soybean germinated seed for 72 h are presented in Fig. 3. A significant reduction ($p < 0.05$) was observed in the glycitin and daidzin contents. These experimental data for glycitin and daidzin fitted ($R^2 = 0.92$ and 0.91) to the quadratic polynomial model. The data suggested that β -glucosides of the radicles were metabolized during germination.

The daidzein contents varied over time in the germinated soybean radicles (Table 1) and started relatively high. Daidzein concentration in the first three analysis times (0, 6 and 12 h) was different than that observed at 42 and 48 h of germination. The lowest content was observed at 18 and 24 h of germination. Glycitein was detected in radicles only at 0, 6 and 12 h (5.90, 4.46 and 3.15 mg/100 g dry matter, respectively) and genistein at 0, 6, 12, 42, 48 and 72 h of germination.

The reduction in β -glucoside (daidzin and glycitin) contents in the germinated radicles may have resulted from the increase in the β -glucosidase activity. Reduction of malonyl forms and aglycones could be attributed to the physiological mobilization during germination. Hsieh and Graham (2001) purified four chick pea isoenzymes that participated in conjugated isoflavone metabolism, and observed that malonylglucosides were first converted to β -glucosides, by the action of malonyltransferase followed by a release of the aglycones through the β -glucosidase action. These authors also reported that aglycones released by the action of glycosyltransferase and malonyltransferase can either be used for the synthesis of new β -glucosides and malonylglucosides or further incorporation in other biosynthetic pathways, such as phytoalexin synthesis of soybean glyceollins.

In spite of aglycone release, seed metabolism during soybean germination is dynamic and aglycones likely are transformed into other metabolites. Consequently, the increase in their content was not observed during this period. Additional studies are needed on plant metabolism during its development to better understand the reduction in aglycone content in the soybean germination process.

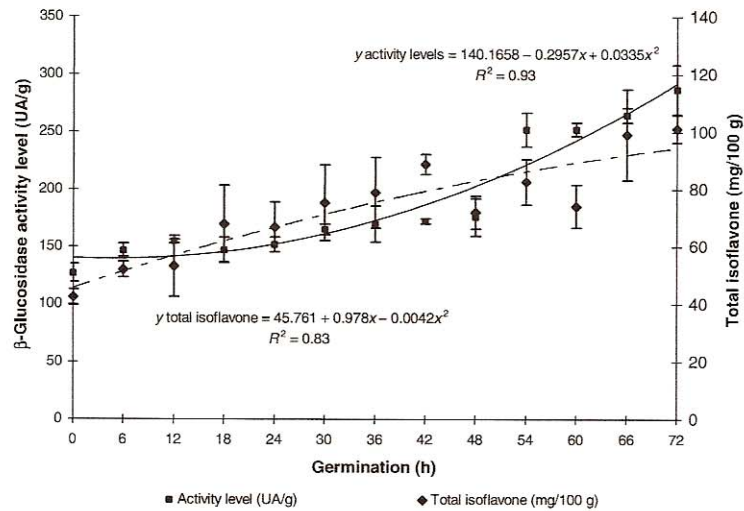


FIG. 4. β -GLUCOSIDASE ACTIVITY LEVELS AND TOTAL ISOFLAVONE CONTENT IN BRS 213 SOYBEAN COTYLEDONS GERMINATED FOR 72 h. Bars indicate SD of three determinations for the β -glucosidase activities and total isoflavone content in each germination time.

β -Glucosidase Activity and Isoflavone Content in Germinated Soybean Cotyledons

Fig. 4 shows that the β -glucosidase activity levels and total isoflavone content of BRS 213 soybean cotyledons increased significantly ($p < 0.05$) over a germination period of 72 h. A regression analysis of the experimental data fitted the quadratic polynomial model for the β -glucosidase activity levels and total isoflavone content ($R^2 = 0.93$ and 0.83). The correlation between β -glucosidase activity levels and isoflavone content in the germinated soybean cotyledons was positive with a determination coefficient of $+0.79$. Comparing Figs. 1 and 4, it is possible to observe differences in the total isoflavone content in radicles and cotyledons of soybean. Results regarding total isoflavones produced in 72 h of laboratory germination were not reported in the literature. However, Schmidt and Quirnbach (2002) observed in greenhouse-sowed soybeans that isoflavone content increased from 532.2 to $739.9 \mu\text{g/g}$ fresh weight of the plant tissues, after 3 days of germination. This content gradually reduced, dropping to $0.29 \mu\text{g/g}$ fresh weight of the plant tissues at 56 days of plant development.

The possible explanation for the reason of this controversial finding of isoflavone total amount in both tissues is because of their physiological function. During seed germination, cotyledons need to provide nutritive reserve for

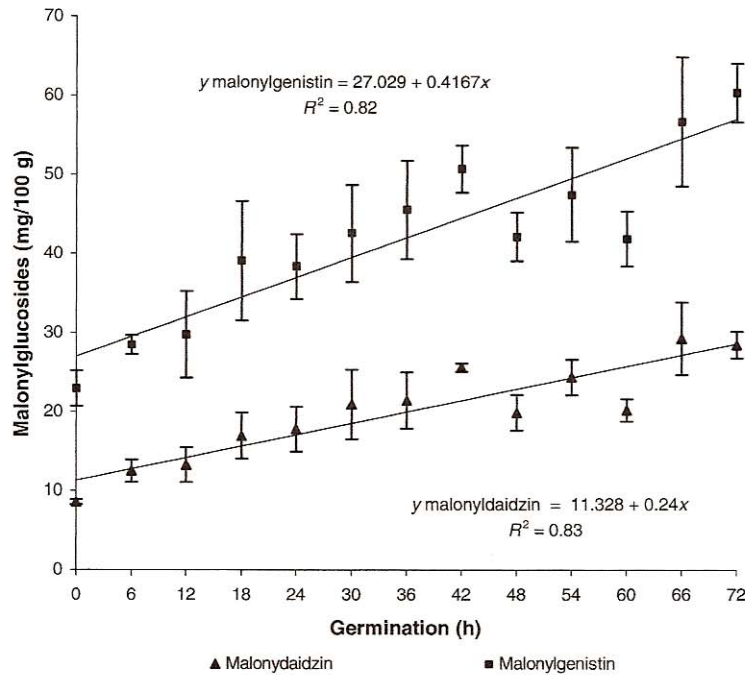


FIG. 5. MALONYLGLUCOSIDE CONTENT IN BRS 213 SOYBEAN COTYLEDONS GERMINATED FOR 72 h

Bars indicate SD of three determinations for the malonylglucoside content in each germination time.

radicle to develop into a final plant and therefore, cotyledons possess a different metabolism cycle in relation to the latter including the carbohydrate cycle (Ribeiro *et al.* 1997; Morkunas *et al.* 2005). Obviously, this subject deserves further attention and more research is in need.

The malonylgenistin and malonyldaidzin contents increased ($p < 0.05$) in soybean cotyledons germinated for 72 h (Fig. 5). Malonylgenistin content was larger than the malonyldaidzin content during germination time, corresponding to 60% of the total isoflavones at 72 h. The regression analysis for malonylgenistin ($R^2 = 0.82$) and malonyldaidzin ($R^2 = 0.83$) contents fitted the linear model. Graham (1991) also reported that malonylgenistin was the main soybean cotyledon metabolite, which represented 52% of the soluble isoflavones over a germination period of 7 days. Table 1 shows that the β -glucoside content (daidzin and genistin) did not differ significantly ($p < 0.05$) during the germination process and the aglycone genistein was detected only at 0 and 6 h of germination (0.46 and 0.42 mg/100 g dry matter). The acetylglucosides,

malonylglycitin, glycitin, glycitein and daidzein were not detected at any time during the 72 h germination period. The distribution of isoflavone in different soybean tissues during germination for 7 days, according to Graham (1991), can be different and affected by the stage of development and germination conditions.

Germination affects β -glucosidase activity, total isoflavone content and their isomeric forms. During germination, β -glucosidase activity increased in radicles and cotyledons, while the total isoflavone content increased in the cotyledons and decreased in the radicles. Therefore, changes in isoflavone contents depend on the stage of germination and seed physiological metabolism.

REFERENCES

- ABDULLAH, A., BALDWIN, R.E. and MINOR, H. 1984. Germination effects on flatus-causing factors and antinutrients of mungbeans and two strains of small-seeds soybeans. *J. Food Prot.* 47(6), 441–444.
- ANDERSON, J.J.B. and GARNER, S.C.G. 1997. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr. Res.* 17(10), 1617–1632.
- BAU, H.M. and DEBRY, G. 1979. Germinated soybean protein products chemical and nutritional evaluation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56(3), 160–162.
- BERHOW, M.A. 2002. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In *Flavonoids in the Living Cell*, Vol 505 (B.S. Buslig and J.A.E. Manthey, eds.) pp. 61–76, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- BROUNS, F. 2002. Soya isoflavones: A new and promising ingredient for the health food sector. *Food Res. Int.* 35, 187–193.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C. and BORDINGNON, J.R. 2000. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesq. Agropec. Bras.* 35(5), 873–878.
- CHEN, L.H. and PAN, S.H. 1977. Decrease of phytates during germination of pea seeds (*Pisum sativa*). *Nutr. Rep. Int.* 16(1), 125–131.
- CONSTANTINO, A.I., KRYGIER, A.E. and MEHTA, R.R. 1998. Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1426S–1430S.
- COWARD, L., SMITH, M., KIRK, M. and BARNES, S. 1998. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1486S–1491S.
- EMBRAPA-CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA 2005. Soja na alimentação. <http://www.cnpso.embrapa.br> (accessed May 6, 2005).

- GRAHAM, T. 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissue and in seed and root exudates. *Plant Physiol.* 2, 594–603.
- HSIEH, M.C. and GRAHAM, T.L. 2001. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry* 58, 995–1005.
- ISMAIL, B. and HAYES, K. 2005. β -Glycosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4918–4924.
- IZUMI, T., PISKULA, M.K., OSAWA, S., OBATA, A., TOBE, K., SAITO, M., KATAOKA, S., KUBOTA, Y. and KIKUCHI, M. 2000. Agliconas da isoflavona da soja são absorvidas mais rápido e em maiores quantias que seus glicosídeos em humanos. *J. Nutr.* 130, 1695–1699.
- KUDOU, S., FLEURY, Y., WELTI, D., MAGNOLATO, D., UCHIDA, T., KITAMURA, K. and OKUBO, K. 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL). *J. Agric. Biol. Chem.* 55(9), 2227–2233.
- KUO, Y., ROZAN, P., LAMBEIN, F., FRIAS, J. and VIDAL-VALVERDE, C. 2004. Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. *Food Chem.* 86, 537–545.
- LAI, H. and YEN, G. 2002. Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(1), 22–28.
- MATSUDA, M., MIYAZAKI, T., MATSUMOTO, Y., OHBA, R., TERAMOTO, Y., OHTA, N. and UEDA, S. 1992. Hydrolysis of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus IFO 3425. *J. Ferment. Bioeng.* 74(5), 301–304.
- MATSUDA, S., NORIMOTO, F., MATSUMOTO, Y., OHBA, R., TERAMOTO, Y., OHTA, N. and UEDA, S. 1994. Solubilization of a novel isoflavone glycoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus. *J. Ferment. Bioeng.* 77(4), 439–441.
- MATSUURA, M., OBATA, A. and FUKUSHIMA, D. 1989. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. *J. Food Sci.* 54(3), 602–605.
- MATSUURA, M., SASAKI, J. and MURAO, S. 1995. Studies on beta-glucosidase from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: Isolation and characterization of an isozyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(9), 1623–1627.
- MESSINA, M.J. 1999. Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 439–450.
- MIURA, T., YUAN, L., SUN, B., FUJII, H., YOSHIDA, M., WAKAME, K. and KOSUNA, K. 2002. Isoflavone aglycon produced by culture of

- soybean extracts with basidiomycetes and its anti-angiogenic activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(12), 2626–2631.
- MORKUNAS, I., MARCZAK, L., STACHOWIAK, J. and STOBIECKI, M. 2005. Sucrose-induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*. Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defense response of lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiol. Biochem.* 43(4), 363–373.
- MOSTAFA, M.M. and RAHMA, E.H. 1987. Chemical and nutritional changes in soybean during germination. *Food Chem.* 23, 257–275.
- MURPHY, P.A. 1982. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.* 36, 60–64.
- PARK, Y.K., AGUIAR, C.L., ALENCAR, S.M., MASCARENHAS, H.A.A. and SCAMPARINI, A.R.P. 2001. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 3(3), 156–160.
- RIBEIRO, M.L.L., IDA, E.I. and OLIVEIRA, M.C.N. 1997. Germinação de soja BR-13 e Paraná: Efeito sobre proteínas, lipídios e carboidratos. *Arq. Biol. Tecnol.* 40(1), 9–17.
- SANTOSH, T.R., BALASUBRAMANIAN, K.K. and LALITHA, K. 1999. Enhancement of beta-glucosidase and beta-galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by exposure to the allelochemical mimosine. *J. Agric. Food Chem.* 47, 462–467.
- SAS INSTITUTE. 1999. 8.2 *Version*. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- SCHMIDT, B. and QUIRMBACH. 2002. Content of selected isoflavones in plants and plant cell cultures of soybean. *Curr. Topics Phytochem.* 5, 91–98.
- TSANGALIS, D., ASHTON, J.F., MCGILL, A.E.J. and SHAH, N.P. 2002. Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase-producing bifidobacteria. *J. Food Sci.* 67(8), 3104–3113.
- WU, M., CHANG, J., LAI, Y., CHENG, S. and CHIOU, R. 2004. Enhancement of tofu isoflavone recovery by pretreatment of soy milk with koji enzyme extract. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4785–4790.
- ZONTA, E.P., MACHADO, A.A. and SILVEIRA JÚNIOR, P. 1982. *Sistema de Análise Estatística-SANEST, Registro na SEI N° 066060*. UFPEL, Pelotas, Brazil.

5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3: Purificação e caracterização parcial de β -glucosidase de cotilédone de soja. Será submetido ao Food Science and Technology. As normas para publicação estão anexadas após o artigo.

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DE
 β -GLUCOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA**

M.L.L. Ribeiro^{1,3}, J.M.G. Mandarino², M.C. Carrão-Panizzi², M.C.N. Oliveira², A.L. Nepomuceno², E.I. Ida^{3*}

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina-PR-Brasil.

²Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Londrina-PR-Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR-Brasil.

* Corresponding author: Tel/fax: 55 (43) 3371-4080.

E-mail address: elida@uel.br (E.I. Ida)

Resumo

A β -glucosidase (β -glucosídeo glucohidrolase, EC 3.2.1.21) hidrolisa isoflavonas β -glucosídicas com liberação de agluconas que possuem ação benéfica na saúde humana. Este trabalho teve como objetivo a purificação e caracterização bioquímica parcial desta enzima de cotilédono de soja. A β -glucosidase foi purificada utilizando cromatografia de troca iônica com CM Sephadex C-50 e filtração em gel com Sephadex G-100. A enzima purificada (F_{42}) foi parcialmente caracterizada. As condições ótimas de reação da enzima foram de pH 5,0 e 30 minutos de incubação a 45°C. A enzima foi estável em 25°C com redução de atividade de 35% após 10 dias e a 45°C reduziu 60% de atividade após 1 h de incubação. Em temperatura superior a 60°C apresentou redução de atividade de 95% após 5 min de incubação. O K_m e V_{max} da enzima para p-nitrofenil- β -D-glucosídeo foi de 0,16 mM e 4,3 μ M p-nitrofenol/min, respectivamente. A enzima apresentou especificidade para os derivados de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeos e também para substratos que possuem ligantes na posição *para*, ligações do tipo α ou β e do tipo 1 \rightarrow 4 e 1 \rightarrow 6.

1 Introdução

A β -glucosidase (β -D-glucosídeo glucohidrolase, EC. 3.2.1.21) catalisa a hidrólise de terminais não redutores de compostos contendo resíduos de β -D-glucose, com liberação de glucose. É produzida por microrganismos e também encontrada em vegetais, onde participa de inúmeras funções, tais como, hidrólise de giberelinas conjugadas, conversão de citocininas de armazenagem em formas ativas, em metabolismo de estresse e resistência a alguns fitopatógenos etc (ESEN, 1992).

A utilização da soja como alimento aumentou devido à importância de suas propriedades nutricionais e biológicas. As propriedades biológicas da soja foram descritas devido às isoflavonas que possuem ação fitoestrogênica, antioxidante e antitumoral na prevenção de doenças crônicas (Anderson & Garner, 1997; Constantinou, Krygier & Mehta, 1998; Messina, 1999; Brouns, 2002; Lai & Yen, 2002). Entretanto, a biodisponibilidade das isoflavonas da soja em humanos depende da capacidade do seu metabolismo e está relacionada a grupos étnicos, hábitos alimentares e microbiota intestinal. Estes fatores promovem alterações na quantidade e atividade das β -glucosidases intestinais que hidrolisam os β -glucosídeos em agluconas (Ismail & Hayes, 2005). Os β -glucosídeos apresentaram menor atividade estrogênica quando comparado às agluconas, que possuem menor massa molecular e maior absorção (Izumi et al., 2000; Brouns, 2002).

Segundo Santosh, Balasubramanian e Lalitha (1999), o processo de purificação e obtenção de β -glucosidase isolada apresentam um grande potencial de aplicação biotecnológica em indústria de alimentos. A conversão de β -glucosídeos em agluconas pode ocorrer com a utilização de β -glucosidase de origem fúngica (*Aspergillus oryzae*) (Park, Aguiar, Alencar & Mascarenhas, 2001), bacteriana (*L. casei* subsp. *Rhamnosus* IFO 3425) (Matsuda et al., 1992) ou do próprio grão (Araújo, Carlos & Sedyama, 1997). Porém, a purificação e caracterização da β -glucosidase da soja foi pouco explorada e somente investigada na farinha integral (Matssura & Obata, 1993) e na raiz de soja germinada (Hsieh & Graham, 2001).

Assim, considerando que as atividades biológicas são mais

acentuadas nas isoflavonas agluconas, o objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar parcialmente a β -glucosidase de cotilédones da soja.

2 Material e métodos

2.1 Matéria-prima

Foi utilizada a cultivar de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) BRS 213, safra 2002/2003 desenvolvida na Vitrine Tecnológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja em Londrina-PR.

2.2 Métodos

2.2.1 Determinação de Atividade de β -glucosidase

A atividade de β -glucosidase nas diferentes fases de extração e purificação foi determinada utilizando o substrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p-NPG) conforme procedimentos descritos por Matsuura e Obata (1993). Neste procedimento, foram pipetados 2 mL de p-NPG 1mM, em tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0 em tubo de ensaio e mantido em banho-maria a 30°C por 10 min. Decorrido este tempo, foram adicionados 0,5 mL de amostra permanecendo em banho-maria a 30°C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M. O p-nitrofenol (p-NP) liberado nesta reação foi determinado por espectrofotometria a 420 nm. Previamente, uma curva padrão de p-NP (20–160 μ M) foi preparada para quantificação de atividade da enzima.

Uma unidade de atividade (UA) de β -glucosidase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ M de p-NP/min, nas condições de ensaio.

2.2.2 Proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis foi quantificado pelo método de Lowry, Rosenbrough, Farr e Randal (1951) utilizando solução padrão de albumina de soro bovino (BSA).

2.2.3 Atividade específica de β -glucosidase

A atividade específica de β -glucosidase de cada fração foi determinada pela relação entre atividade da enzima e de proteína e expressa como unidade de atividade da enzima por mg de proteína (UA/mg).

2.2.4 Carboidratos Totais

O teor de carboidratos totais foi quantificado pelo método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956) utilizando solução padrão de D-glucose.

2.3 Extração, Fracionamento e Purificação de β -glucosidase

O procedimento de extração, fracionamento e purificação de β -glucosidase foi realizado entre 0 e 4°C.

2.3.1 Extração

A extração de β -glucosidase foi realizada conforme descrição de Matsuura e Obata (1993) e foram utilizadas 60 g farinha de cotilédones de soja e tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,6 na proporção de 1:10 (peso/volume), com agitação lenta por 1 h e centrifugação a 4000g por 15 min. O sobrenadante obtido foi acidificado com HCl 0,1N até pH 5,0 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante assim obtido foi denominado de extrato bruto (EB) de β -glucosidase.

2.3.2 Fracionamento da enzima com sulfato de amônio

Ao EB foi adicionado sulfato de amônio até atingir 40% de saturação a 4°C para fracionamento parcial da enzima. O material foi mantido em repouso até completa precipitação e centrifugado a 4000 xg por 15 min. O precipitado sem atividade da enzima foi desprezado e ao sobrenadante (S_{0-40}) foi adicionado lentamente o sulfato de amônio até atingir 85% de saturação. Após completa precipitação, o material foi centrifugado conforme descrito anteriormente. O precipitado obtido (P_{40-85}) foi ressuspenso com tampão fosfato-citrato 50 mM, pH 5,0 e dialisado contra o mesmo tampão. Alíquotas da fração P_{40-85} e do EB também dialisado foram utilizadas para determinação do teor de proteína solúvel, atividade da enzima e suas atividades específicas para posterior aplicação em cromatografia de troca iônica.

2.3.3 Cromatografia de Troca Iônica

A fração P_{40-85} dialisada foi aplicada em coluna de troca iônica com CM Sephadex C-50 (2,5 cm x 55 cm) pré-equilibrada com tampão fosfato-citrato 50

mM, pH 5,0. Foi utilizado fluxo de 27 mL/h e coletado frações de 3,5 mL por tubo de ensaio. Após a separação da primeira fração protéica, a coluna foi eluída com gradiente linear de NaCl 0–0,8 M em tampão fosfato-citrato 50 mM, pH 5,0. Nas frações coletadas foram realizadas leitura de absorvância a 280 nm e determinada a atividade de β -glucosidase e traçado o perfil de cromatografia. Nesta cromatografia de troca iônica foram separadas quatro frações protéicas e denominadas de frações F₁, F₂, F₃ e F₄. A fração F₄ com maior atividade específica de β -glucosidase foi liofilizada e dialisada em tampão fosfato-citrato 100 mM, pH 5,0 para posterior aplicação em cromatografia de filtração em gel.

2.3.4 Cromatografia de filtração em gel

A fração F₄, liofilizada e dialisada, foi aplicada em coluna (2,3 cm x 100 cm) de filtração em gel com Sephadex G-100. A coluna foi pré-equilibrada com tampão fosfato-citrato 100 mM, pH 5,0. Foi utilizado o fluxo de 17 mL/h e coletado frações de 2,3 mL por tubo de ensaio. Nas frações coletadas foram realizadas leituras de absorvância a 280 nm e determinada a atividade de β -glucosidase e traçado o perfil de cromatografia. Nesta cromatografia por filtração em gel foram separadas três frações protéicas e denominadas de F₄₁, F₄₂ e F₄₃. A fração F₄₂ apresentou maior atividade específica de β -glucosidase e foi utilizada para caracterização bioquímica parcial.

2.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese descontínua das frações obtidas no processo de purificação de β -glucosidase foi realizada em gel de poliacrilamida 7,5% (PAGE) em condições nativas com tampão Tris-HCl 3,778 M, pH 8,9 a 150 mV (Davis, 1964). Foram aplicados de 30 a 70 μ g de proteínas de cada fração em placas de dimensão de 101 mm x 106 mm x 1 mm com 9 poços. Após a eletroforese, os géis foram

fixados com ácido tricloroacético (TCA) 10%, lavados com solução de etanol 10% e ácido acético 5% e depois com solução oxidante de dicromato de potássio 0,034 M em ácido nítrico 0,032 N. Após a fixação das bandas de proteínas, o procedimento de coloração com prata e revelação foi realizado conforme descrição de Nielsen e Brown (1984). As placas de géis foram lavadas com água destilada e secadas entre duas folhas de papel celofane embebidas com glicerol : H₂O (1:1, v:v) e mantidas por quatro dias em temperatura ambiente para secagem dos mesmos e documentação por fotografia digital.

A fração F₄₂ apresentou na eletroforese apenas uma banda corada com prata e maior atividade específica de β -glucosidase, sendo caracterizada conforme segue.

2.4 Caracterização Bioquímica Parcial de β -glucosidase

A caracterização bioquímica parcial da fração F₄₂ com maior atividade específica de β -glucosidase foi realizada e a atividade foi determinada conforme procedimento descrito anteriormente por Matsuura e Obata (1993).

2.4.1 Efeito do tempo de incubação na atividade de β -glucosidase

O tempo ótimo de incubação da fração F₄₂ para hidrólise de p-NPG foi investigado no período de 0 a 480 min com intervalos iniciais entre 10 min até 1 h, de 20 min até 2 h e depois de 1 em 1 h até 8 h. A atividade de β -glucosidase foi expressa como μ M de p-PN liberado no respectivo tempo de incubação.

2.4.2 Efeito da temperatura e pH na atividade de β -glucosidase

A temperatura ótima da fração F₄₂ para hidrólise de p-NPG foi

determinada entre 4 e 70°C, com incubação de 30 min. O pH ótimo foi determinado entre 3 e 8, na temperatura de 45°C, definida anteriormente. Os resultados foram expressos em percentagem de atividade de β -glucosidase em função da temperatura ou pH, respectivamente.

2.4.3 Estabilidade térmica de β -glucosidase

A estabilidade térmica de β -glucosidase da fração F₄₂ foi avaliada com a pré-incubação da enzima em temperaturas de 25 a 70°C e tempos variáveis de 5 min a 10 dias. Também foi avaliada a estabilidade de β -glucosidase após 4 descongelamentos sucessivos em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em percentagem de atividade de β -glucosidase em relação ao controle.

2.4.4 Especificidade da Enzima com o Substrato p-NPG

O efeito da concentração de p-NPG de 0,1 mM a 20 mM na atividade de β -glucosidase da fração F₄₂ foi determinado nas condições ótimas de reação definidas neste trabalho de pH 5,0; 30 min de incubação e 45°C. Os resultados foram expressos como unidade de atividade de β -glucosidase, ou seja, μ M p-NP/min.

Os valores de Km e Vmax foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk conforme descrito por Marzzoco e Torres (1999).

2.4.5 Especificidade da Enzima com Diferentes Substratos

A especificidade de atividade de β -glucosidase da fração F₄₂ foi investigada, nas condições ótimas de reação da enzima de pH 5,0 e 30 min de

incubação a 45°C, definidas neste trabalho, utilizando os seguintes substratos na concentração de 1mM: derivados de β -D-glucosídeos (daidzina, genistina, salicina, celobiose, gentiobiose, amigdalina, esculina e metil- β -D-glucopiranosídeo) e derivados de *para* ou *orto*-nitrofenil (p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, p-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo, p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo, o-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo). A atividade de β -glucosidase foi determinada conforme descrito no item 2.2.1 e uma unidade de atividade de β -glucosidase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ M de p-NP/min, nas condições de ensaio.

Para determinação da especificidade de atividade β -glucosidase para daidzina e genistina com liberação das agluconas daidzeína e genisteína, foram utilizados 400 μ L de substrato 1 mM e 100 μ L da fração F₄₂ e a reação interrompida com 2000 μ L de metanol (Matsuura & Obata, 1993), nas condições ótimas de reação, pH 5,0 e 30 min de incubação a 45°C. A análise quantitativa de daidzeína e genisteína liberadas foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) segundo Berhow (2002). Neste procedimento, as amostras foram filtradas em filtros de 0.43 μ m e 20 μ L foram utilizados para separação e quantificação em cromatógrafo (Waters Serie 600) com injetor automático de amostras (Waters Serie 717) e detector de arranjo de fotodiodos (Waters Serie 996). A eluição das isoflavonas foi realizada pelo uso do sistema de gradiente linear binário em coluna de fase reversa do tipo ODS-C18 (Metachem, Torrance, CA) com diâmetro interno de 4,6 mm x 250 mm e partículas de 5 μ m. A coluna foi equilibrada com 20% de metanol contendo 0,025% de ácido trifluoroacético e 80% de H₂O contendo 0,025% de ácido trifluoroacético, com fluxo de 1 mL/min e temperatura controlada a 25°C. Após a injeção, a condição inicial foi mantida por 2 min e atingindo 100% de metanol contendo 0,025% de ácido trifluoroacético em 50 min. Para detecção das isoflavonas foi utilizado o comprimento de onda de 260 nm e os picos foram identificados por seu espectro e tempo de retenção. As isoflavonas foram quantificadas por padronização externa (área dos picos) utilizando padrões como referência. Uma unidade de atividade de β -glucosidase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ M de agluconas/min, nas condições do ensaio.

A especificidade de atividade de β -glucosidase também foi investigada para os substratos derivados de β -D-glucosídeos: salicina, celobiose,

gentiobiose, amigdalina, esculina e metil- β -D-glucopiranosídeo. A atividade de β -glucosidase foi determinada utilizando o método de glucose oxidase com sistema automatizado (Selectra 1, Vitalab/Merck). Neste procedimento, a glucose liberada foi quantificada por espectrofotometria a 420 nm. Uma unidade de atividade de β -glucosidase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ M de glucose/min, nas condições do ensaio.

Para determinação da especificidade da atividade de β -glucosidase utilizando os substratos derivados de *para* e *orto*-nitrofenil foi realizada a comparação com o substrato p-NPG, considerado neste estudo como 100% de atividade. A determinação da especificidade da atividade de β -glucosidase para os substratos derivados de β -D-glucosídeos, com atividade expressa em liberação de μ M de glucose/min foi comparada entre estes substratos, considerando 100% o substrato com maior liberação de glucose. Os resultados também foram comparados com o p-NPG.

3 Resultados e discussão

3.1 Extração e Purificação Parcial de β -glucosidase

O EB obtido a partir de 60 g de farinha de cotilédone de soja foi inicialmente precipitado com sulfato de amônio com saturação de até 40% a 4°C e o material foi centrifugado. No sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio de 40 a 85% de saturação a 4°C e o precipitado denominado de P₄₀₋₈₅ foi ressuspensão e dialisado em tampão fosfato-citrato 50 mM e pH 5,0. Nesta fase de separação recuperou-se 32% de proteínas e 69% de atividade de β -glucosidase (Tabela 1) em relação ao EB.

A fração P₄₀₋₈₅ foi aplicada na coluna de troca iônica com CM Sephadex C-50 equilibrada e eluída com tampão fosfato-citrato 50 mM e pH 5,0. Nesta eluição ocorreu a separação da fração F₁ com recuperação de 3,7% de proteínas e 1,3% de atividade de β -glucosidase (Tabela 1 e Fig. 1). Após a

aplicação de gradiente linear de NaCl 0–800 mM no mesmo tampão, foram separadas mais três frações, F₂, F₃ e F₄, com recuperação de proteínas de 3,0, 3,2 e 1,4% (Tabela 1), respectivamente. Assim, a cromatografia de troca iônica do extrato de cotilédones de soja separou quatro frações distintas de proteínas, sendo que apenas a fração F₄ apresentou elevada atividade específica de β-glucosidase, com recuperação de 27% e purificação de 19 vezes. Hsieh e Graham (2001) separaram por cromatografia de troca iônica com CM Sephadex C-50 extratos de raízes de soja germinada de 7 a 9 dias e observaram quatro frações de proteínas com atividade de β-glucosidase em apenas uma fração com recuperação de 20% e purificação de 20 vezes. Entretanto, Matssura e Obata (1993) utilizaram extrato de grãos de soja nas mesmas condições aplicadas de cromatografia de troca iônica com CM Sephadex C-50 e observaram a separação de três frações (A, B e C), com atividade de β-glucosidase nas frações B e C e recuperação de atividade de 6 e 22%, respectivamente. A purificação foi de 8,5 e 44 vezes para as frações B e C, respectivamente. Pouca atividade foi encontrada na primeira fração.

A fração F₄ foi aplicada em cromatografia de filtração em gel com Sephadex G-100 e eluída com tampão fosfato-citrato 0,1M e pH 5,0. Esta filtração em gel separou três frações distintas de proteínas (Tabela 1 e Fig. 2). Apenas a fração F₄₂ apresentou elevada atividade específica de β-glucosidase, com recuperação de 4,1% e purificação de 44 vezes em relação ao EB. Matssura e Obata (1993) aplicaram as frações B e C em Sephadex G-150 e observaram uma única fração com atividade para cada uma das amostras aplicadas. Após a cromatografia, a fração B foi purificada 87 vezes com 2% de recuperação de atividade de hidrólise de daidzina e a C, 95 vezes com 7% de recuperação.

A diferença no número de frações de proteínas obtidas nestes trabalhos possivelmente foi devido a diferenças na cromatografia e o tipo de matéria-prima utilizada para obtenção de β-glucosidase.

As diferentes fases de purificação de β-glucosidase da soja foram acompanhadas por meio de eletroforese nativa em gel de poli(acrilamida) (Figura 3). A fração F₄₂ apresentou uma banda protéica, indicando a provável purificação da enzima.

Na eletroforese nativa em gel de poli(acrilamida) do EB, P₄₀₋₈₅, F₄ e F₄₂ foram aplicados em cada poço 70, 70, 30 e 30 ug de proteínas,

respectivamente. Observa-se que nas diferentes fases da purificação, desde o EB até a cromatografia de filtração em gel, ocorreu a separação de várias frações de proteínas. Após a cromatografia de troca iônica com CM Sephadex C-50, a eletroforese da fração F₄ apresentou mais de uma banda de proteína. Contudo, após a cromatografia de filtração em gel, observa-se que na eletroforese há apenas uma banda de proteína com mobilidade relativa (Rf) igual a 0,51, indicando uma provável purificação da β -glucosidase. Porém, a falta de nitidez na eletroforese foi devido à baixa concentração da fração F₄, necessitando de repetição de eletroforese com maior concentração para confirmar esta purificação. Também, seria importante aplicar outras técnicas para confirmar a pureza desta enzima, tais como, diferentes concentrações de enzima, eletroforese em condições desnaturantes e pl.

3.2 Caracterização Bioquímica Parcial de β -glucosidase da Fração F₄₂

3.2.1 Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram detectados e quantificados em todas as fases de purificação da β -glucosidase, com exceção da fração F₃, indicando uma possível natureza glicoproteica das frações (Tabela 2). A percentagem de carboidratos com relação à soma de proteínas e carboidratos variou de 2,17 a 9,3% para o EB e F₄₁. Destaca-se que a fração F₄₂ apresentou 3,45% de carboidratos, confirmando que trata-se de uma glicoproteína. Na literatura, ainda não há relatos sobre a presença de carboidratos nas frações de β -glucosidase de soja purificada.

3.2.2 Efeito do tempo de incubação na atividade de β -glucosidase

O tempo ótimo de incubação da β -glucosidase da fração F₄₂ (Fig. 4)

foi de 30 min em tampão fosfato-citrato 100 mM e pH 5,0 devido à linearidade de liberação de p-NP até 60 min. Entretanto, a partir de 60 min até 480 min de incubação, ocorreu aumento gradativo na atividade de β -glucosidase, porém não proporcional ao tempo de incubação.

3.2.3 Efeito da temperatura e pH de incubação na atividade de β -glucosidase

A temperatura e pH ótimos de incubação na atividade de β -glucosidase da fração F_{42} estão ilustrados nas Fig. 5 e 6. A temperatura ótima de reação da enzima foi de 45°C (Fig. 5), cuja temperatura foi superior às temperaturas em que ocorrem as reações endógenas na estocagem ou germinação da soja. Em condições de temperatura ótima, a β -glucosidase apresentou pH ótimo entre 4,5 e 5,5 e a atividade da enzima reduziu em 71% em pH 3,5 e 7,0.

A temperatura ótima de 45°C de ação da β -glucosidase foi similar à obtida em soja por Matsuura e Obata (1993) e por Cameron, Manthey, Baker e Grohmann (2001) em *Citrus sinensis* var. Valencia fruit (40–45°C). Outras fontes de β -glucosidase apresentaram temperaturas ótimas distintas, como 25–30°C em centeio (Sue, Ishihara & Iwamura, 2000), 40°C em vanilla bean (Odoux, Chauwin & Brillouet, 2003), 50°C em milho (Esen, 1992) e 60°C em cevada (Leah, Kigel, Svendsen & Mundy, 1995).

A faixa de pH ótimo de 4,5 a 5,5 (Fig. 6) na atividade de β -glucosidase da soja da fração F_{42} foi similar à descrita por Matsuura e Obata (1993) na soja, Akiyama, Kaku & Shibuya (1998) no arroz e Leah et al. (1995) na cevada. Entretanto, no milho pH ótimo desta enzima foi de 5,8 (Esen, 1992).

3.2.4 Estabilidade térmica de β -glucosidase

A estabilidade térmica de β -glucosidase da fração F_{42} foi investigada por meio de sua atividade residual em relação ao controle, após manutenção da

enzima em diferentes tempos e temperaturas de incubação (Fig. 7). Após a determinação de atividade em tampão fosfato-citrato 100 mM, pH 5,0, observou-se que a 25°C a enzima foi estável até 4 dias e após 10 dias ocorreu redução de apenas 35% da atividade. Em 45°C a enzima apresentou redução de 60% de sua atividade, após uma hora de incubação. Portanto, a enzima não foi estável por longo período em sua própria temperatura ótima de atividade. Segundo Esen (1992), esta discrepância entre atividade e estabilidade pode ser diminuída com aumento da estabilidade da enzima na presença do substrato, onde o complexo enzima-substrato protege a enzima da desnaturação e inativação pelo calor. Em temperatura de 50°C, a enzima reduziu sua atividade em 91% após 20 min de incubação e em temperatura superior a 60°C apresentou baixa estabilidade, com redução de 95% de atividade após 5 min de incubação. Após quatro descongelamentos sucessivos, em temperatura ambiente, da fração F42, a atividade de β -glucosidase permaneceu estável.

3.2.5 Efeito da concentração de p-NPG na atividade de β -glucosidase

A atividade de β -glucosidase aumentou linearmente em baixas concentrações até 0,4 mM de p-NPG e prosseguiu o aumento gradativo até cerca de 1 mM com manutenção de atividade até 20 mM, sem apresentar inibição ou redução de atividade (Fig. 8).

A constante de *Michaelis-Menten* (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) de reação, em pH 5,0 e 45°C, da fração F₄₂ foram 0,16 mM e 4,3 μ M de p-NP/ min, respectivamente, indicando elevada especificidade de reação para o p-NPG. Hsieh e Graham (2001) observaram um K_m de 1,3 mM para β -glucosidase de raiz de soja, a 40°C. Em vanilla bean (Odoux et al., 2003) e *Citrus sinensis* var. Valencia (Cameron et al., 2001) os valores de K_m para p-NPG foram 1,1 mM (40°C e pH 7,0) e 0,12 mM (40°C e pH 5,0), respectivamente.

3.2.6 Especificidade da atividade de β -glucosidase com diferentes substratos

A especificidade da atividade da fração F₄₂ com diferentes substratos derivados de *para* ou *orto*-nitrofenil e derivados de β -D-glucosídeos foi avaliada por meio da atividade relativa de hidrólise destes substratos em concentração de 1 mM e condições ótimas de pH 5,0 e 30 minutos de incubação a 45°C (Tabelas 3 e 4).

O substrato p-NPG apresentou maior especificidade de atividade de β -glucosidase em comparação com os outros substratos (Tabela 3). A especificidade elevada de β -glucosidases vegetais para o substrato p-NPG também foi observada em cereja madura e milho (Gerardi, Blando, Santino & Zacheo, 2001; Esen, 1992).

Na Tabela 3 observa-se que a β -glucosidase atuou em outros substratos derivados de β -glucosídeos, como a celobiose e gentiobiose, com maior especificidade, seguido de daidzina e genistina. Entretanto, na soja, a genistina e daidzina são os próprios substratos desta enzima e nas condições experimentais desta investigação estes não foram os melhores substratos. Possivelmente, devido à procedência destas isoflavonas, uma vez que Matsuura e Obata (1993) observaram que a daidzina e genistina extraída de soja foram os melhores substratos do que outros glucosídeos naturais como a amigdalina e esculina.

A ação desta enzima no p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo indica elevada especificidade para β -D-glucose. Entretanto, na Tabela 4 observa-se que a enzima apresentou especificidade para a de D-manose (p-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo) e D-galactose (p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo). Assim, a β -glucosidase pode ser considerada também uma β -D-glicosidase (Odoux et al., 2003).

Em relação ao tipo de ligação (α e β), a ausência de atividade para o substrato p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo sugere que esta enzima apresenta especificidade somente para ligações do tipo β (Tabela 4). Entretanto, a enzima atuou no substrato p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, cuja ação também foi observada por Hsieh e Graham (2001) em extrato de raiz de soja.

A posição de ligantes na estrutura também afetou a especificidade da enzima. Quando o mesmo substrato apresentou mudança de ligação da posição *para* (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo) para a posição *orto* (o-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo), ocorreu redução de 74% na atividade da enzima, indicando uma

possível especificidade da enzima para o ligante na posição *para* (Tabela 4).

A posição da ligação entre duas glucoses também pode afetar a atividade enzimática. Entretanto, a β -glucosidase hidrolisou tanto a celobiose (1 \rightarrow 4) quanto à gentiobiose (1 \rightarrow 6) (Tabela 5). Resultado semelhante foi observado em *citrus sinensis* var. Valencia (Cameron et al., 2001). Entretanto, Matsuura e Obata (1993) não observaram atividade de β -glucosidase purificada de soja para estes substratos.

REFERÊNCIAS

- Akiyama, T., Kaku, H., & Shibuya, N. (1998). A cell wall-bound beta-glucosidase from germinated rice: Purification and properties. *Phytochemistry*, 48, 49–54.
- Anderson, J. J. B., & Garner, S. C. G. (1997). The effects of phytoestrogens on bone. *Nutrition Research*, 17(10), 1617-1632.
- Araujo, J. M. A., Carlos, J. C. S., & Sedyama, C. S. (1997). Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de beta-glucosidase na formação do sabor amargo e adstringente. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 17(2), 137–141.
- Berhow, M. A. (2002). Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: *Flavonoids in the living cell*, VOL. 505 (B.S. Buslig; J.A.E. Manthey, eds.) pp. 61–76., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Brouns, F. (2002). Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health food sector. *Food Research International*, 35, 187-193.
- Cameron, R. G., Manthey, J. A., Baker, R. A., & Grohmann, K. (2001). Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia fruit tissue. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4457–4462.
- Constantinou, A. I., Krygier, A. E., & Mehta, R. R. (1998). Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1426S–1430S.
- Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404-427.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Esen, A. (1992). Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. *Plant Physiology*, 98, 174–182.

Gerardi, C., Blando, F., Santino, A., & Zacheo, G. (2001). Purification and characterization of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science*, 160, 795–805.

Hsieh, M. C., & Graham, T. L. (2001). Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*, 58, 995–1005.

Ismail, B., & Hayes, K. (2005). β -Glycosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4918–4924.

Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., & Kikuchi, M. (2000). Agliconas da isoflavona da soja são absorvidas mais rápido e em maiores quantias que seus glicosídeos em humanos. *Journal of Nutrition*, 130, 1695–1699.

Lai, H., & Yen, G. (2002). Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 66(1), 22–28.

Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I., & Mundy, J. (1995). Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase. *Journal American Society Biochemistry Molecular Biology*, 270(26), 15789–15797.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randal, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, 193, 265–275.

Marzzoco, A., & Torres, B. (1999). *Bioquímica Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 360 p.

Matsuda, M., Miyazaki, T., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., Ohta, N., & Ueda, S. (1992). Hydrolysis of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnous* IFO 3425. *Journal Ferment. Bioeng*, 74(5), 301–304.

Matsuura, M., & Obata, A. (1993). β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*, 58, 144–147.

Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 439–450.

Nielsen, B. L., & Brown, L. R. (1984). The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 141(2), 311–315.

Odoux, E., Chauwin, A., & Brillouet, J. (2003). Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -d-glucosidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 3168–3173.

Park, Y. K., Aguiar, C. L., Alencar, S. M., Mascarenhas, H. A. A., & Scamparini, A. R. P. (2001). Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 3(3), 156–160.

Santosh, T. R., Balasubramanian, K. K., & Lalitha, K. (1999). Enhancement of beta-glucosidase and beta-galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by exposure to the allelochemical mimosine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 462–467.

Sue, M., Ishihara, A., & Iwamura, H. (2000). Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. *Plant Science*, 155, 67–74.

Tabela 1 – Fases de purificação de β -glucosidase de cotilédone de soja por cromatografia de troca iônica e filtração em gel

Fases de Purificação	Proteínas			β -glucosidase		
	mg	Recuperação %	Atividade ¹ UA	Recuperação %	Atividade Específica ²	Grau de Purificação
Extrato Bruto	2469	100	3558	100	1,4	1
P ₄₀₋₈₅	792	32	2437	69	3,1	2,1
CM Sephadex C-50						
F ₁	91	3,7	47	1,3	0,5	0,4
F ₂	75	3,0	0,2	0,01	0	0
F ₃	78	3,2	27	0,8	0,4	0,2
F ₄	35	1,4	946	27	27	19
Sephadex G-100 – Fração F4						
F ₄₁	2,5	0,1	0	0	0	0
F ₄₂	2,4	0,1	146	4,1	61	44
F ₄₃	7,5	0,3	0	0	0	0

¹UA = μ M p-nitrofenol/min; ² = UA/mg de proteína

Tabela 2 – Teor de proteínas e carboidratos totais nas diferentes fases de purificação de β -glucosidase de cotilédone de soja

Fases de Purificação	Proteínas (μ g/100 μ L)	Carboidratos (μ g/100 μ L)	Carboidratos (%)
Extrato bruto	472,52	10,48	2,17
P ₄₀₋₈₅	1066,70	31,17	2,84
F1	714,14	17,95	2,45
F2	573,34	33,74	5,5
F3	723,15	n.d.	n.d.
F4	198,24	5,18	2,6
F41	118,04	12,12	9,3
F42	96,58	3,46	3,45
F43	212,36	6,09	2,78

n.d.: não detectado

Tabela 3 – Especificidade de β -glucosidase com substratos derivados de β -D-glucosídeos

Substrato (1mM)	Atividade Relativa* (%)
p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo	100
Celbiose	46
Gentiobiose	44
Daidzina	25
Genistina	24
Amigdalina	20
Esculina	17
Salicina	11
Metil- β -D-glucopiranosídeo	8

*Atividades expressas em percentagem de atividade calculada com p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato, no qual a enzima apresentou atividades superiores.

Tabela 4 – Especificidade de β -glucosidase com substratos derivados de *para*- ou *orto*-nitrofenil- β -D-glicosídeos

Substrato (1mM)	Atividade Relativa* (%)
p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo	100,0
p-nitrofenil- β -D-manopiranosídeo	99,3
p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo	88,7
o-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo	25,9
p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo	ND

*Atividades expressas em percentagem de atividade calculada com p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato, no qual a enzima apresentou atividades superiores.
ND: não detectada.

Tabela 5 – Especificidade de β -glucosidase com substratos derivados de β -D-glucosídeos em comparação à celbiose

Substrato (1mM)	Atividade Relativa* (%)
Celbiose	100,0
Gentiobiose	94,4
Amigdalina	43,9
Esculina	36,7
Salicina	23,8

*Atividades expressas em percentagem de atividade calculada com celbiose como substrato, no qual a enzima apresentou atividades superiores.

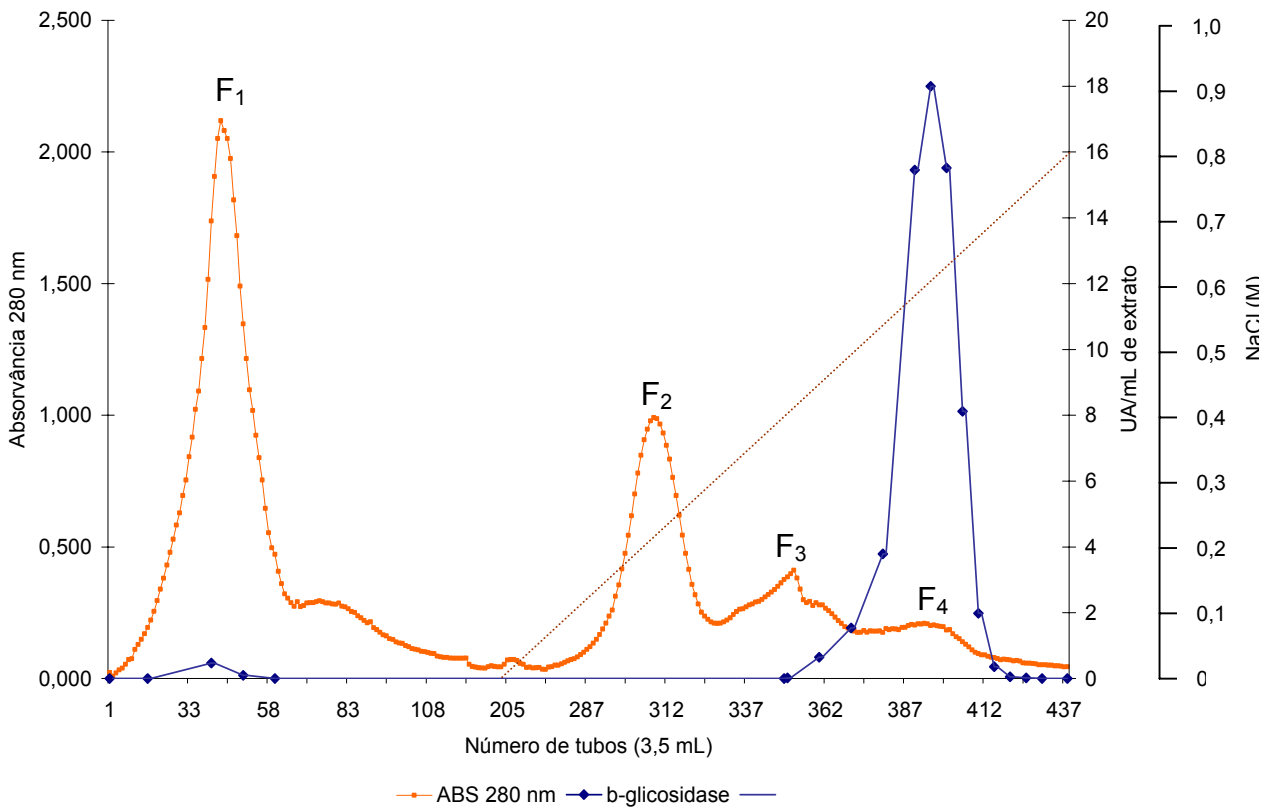


Figura 1 – Cromatografia de troca iônica com CM Sephadex C-50 da fração P₄₀₋₈₅ proveniente de extrato de cotilédone de soja.

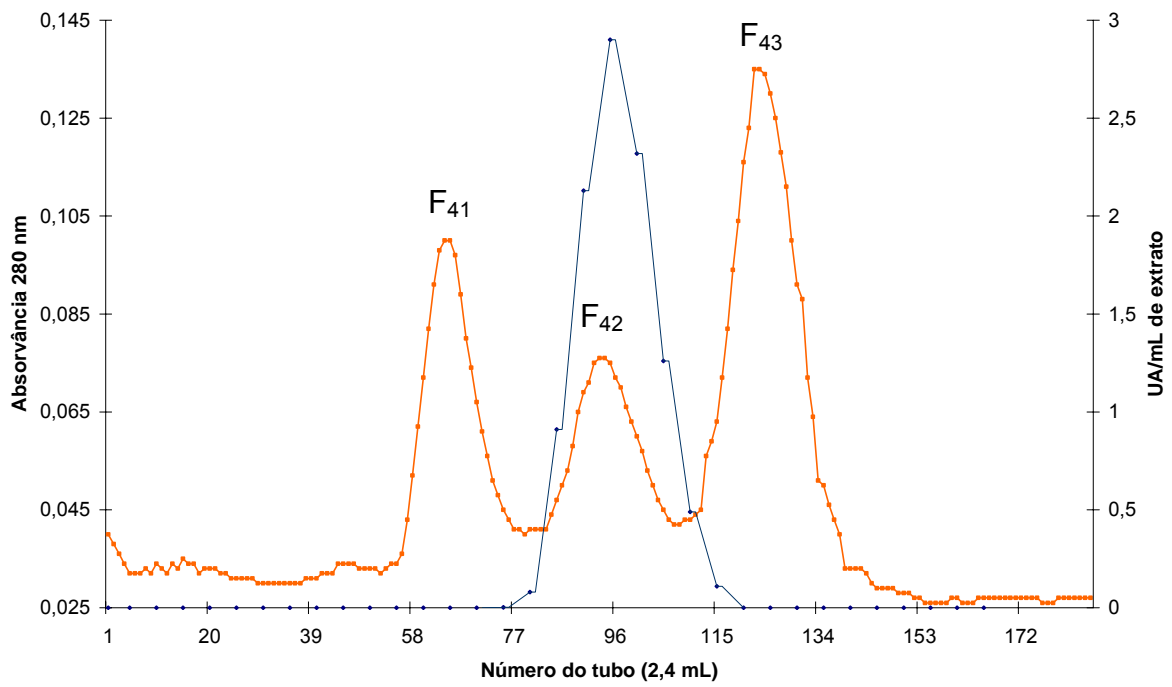
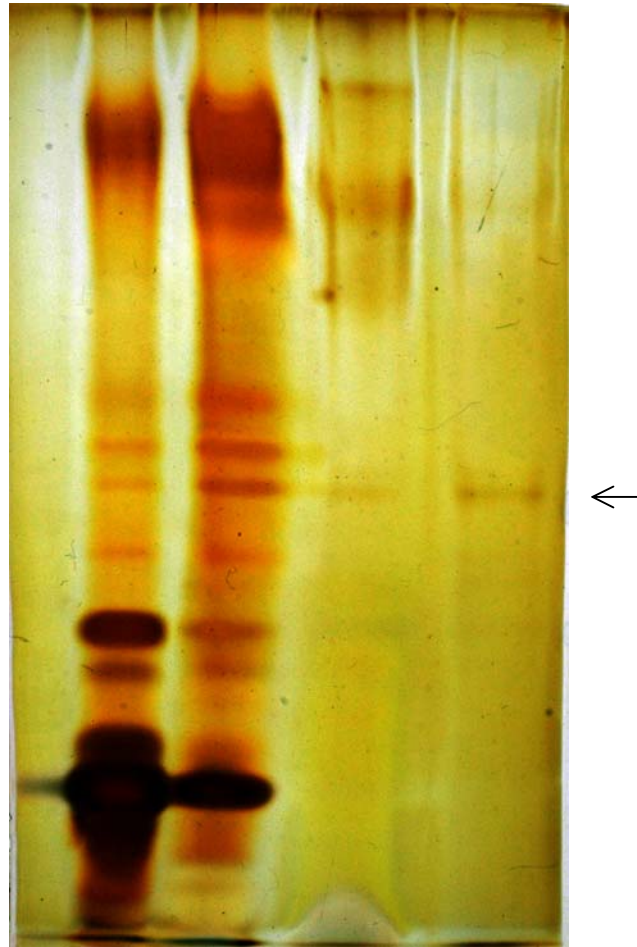


Figura 2 – Cromatografia de β -glicosidase Sephadex G-100 da fração F₄.



EB P₄₀₋₈₅ F₄ F₄₂
 70µg 70µg 30µg 30µg

Figura 3 – Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida das diferentes fases de purificação da β -glucosidase de cotilédone de soja.

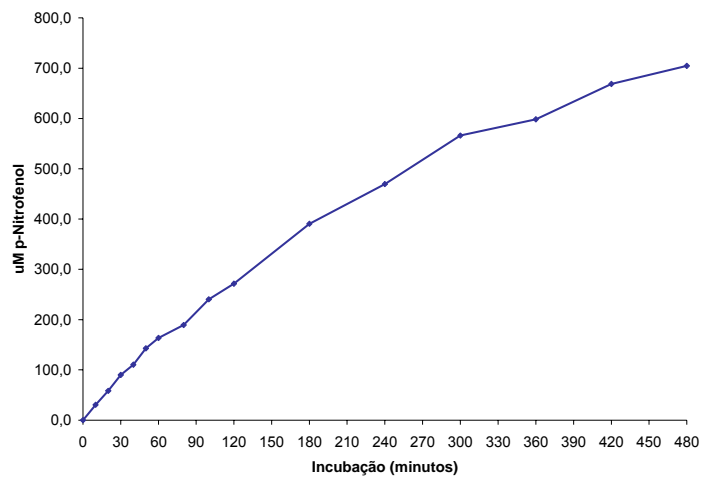


Figura 4 – Efeito do tempo de incubação na liberação de p-nitrofenol pela β -glucosidase da fração F₄₂.

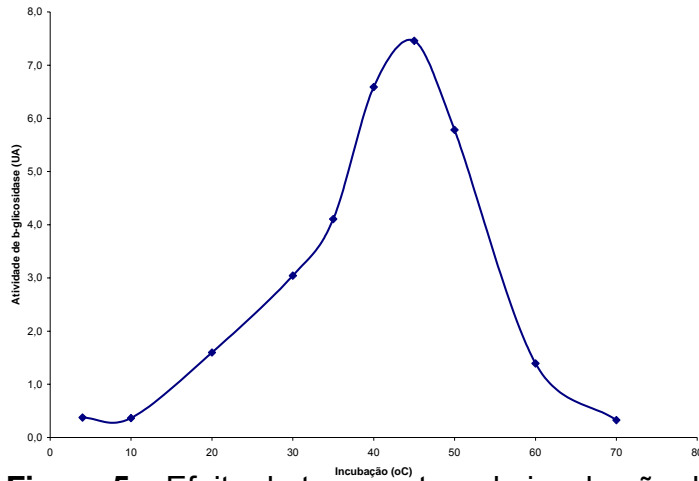


Figura 5 – Efeito da temperatura de incubação da reação na atividade de β -glicosidase da fração F₄₂.

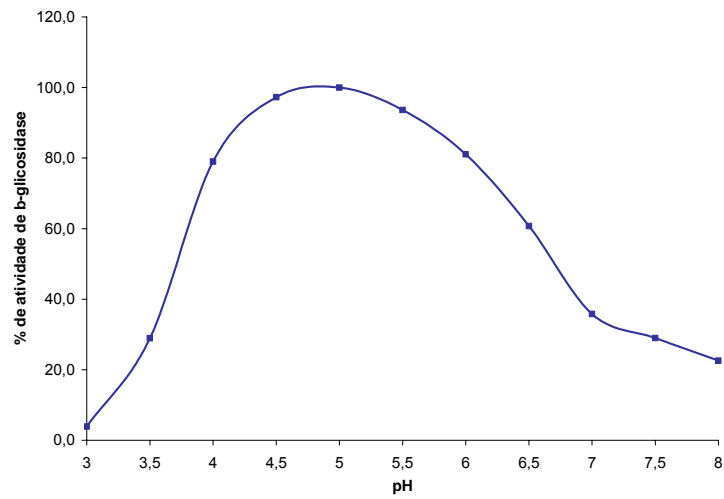


Figura 6 – Efeito do pH na atividade de β -glicosidase da fração F₄₂.

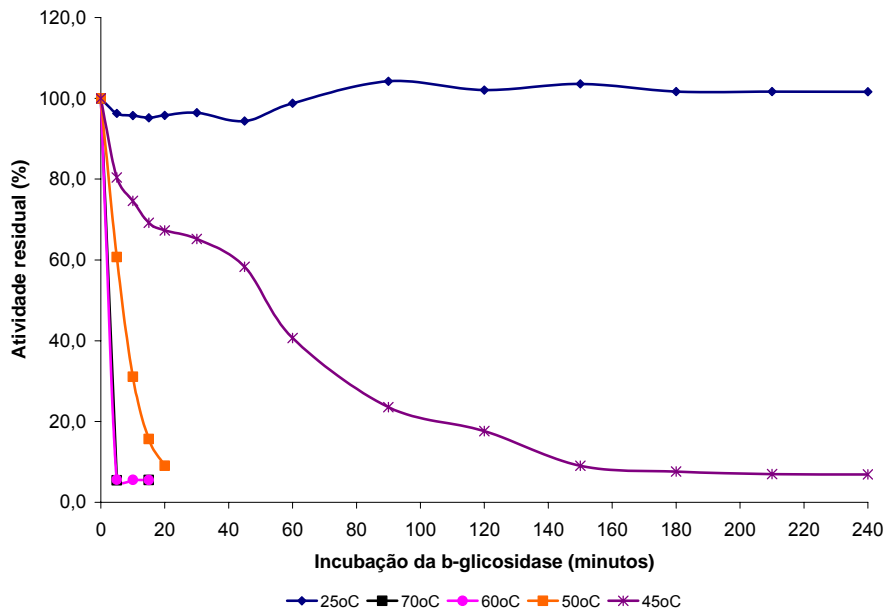


Figura 7 – Estabilidade térmica de β -glicosidase da fração F₄₂.

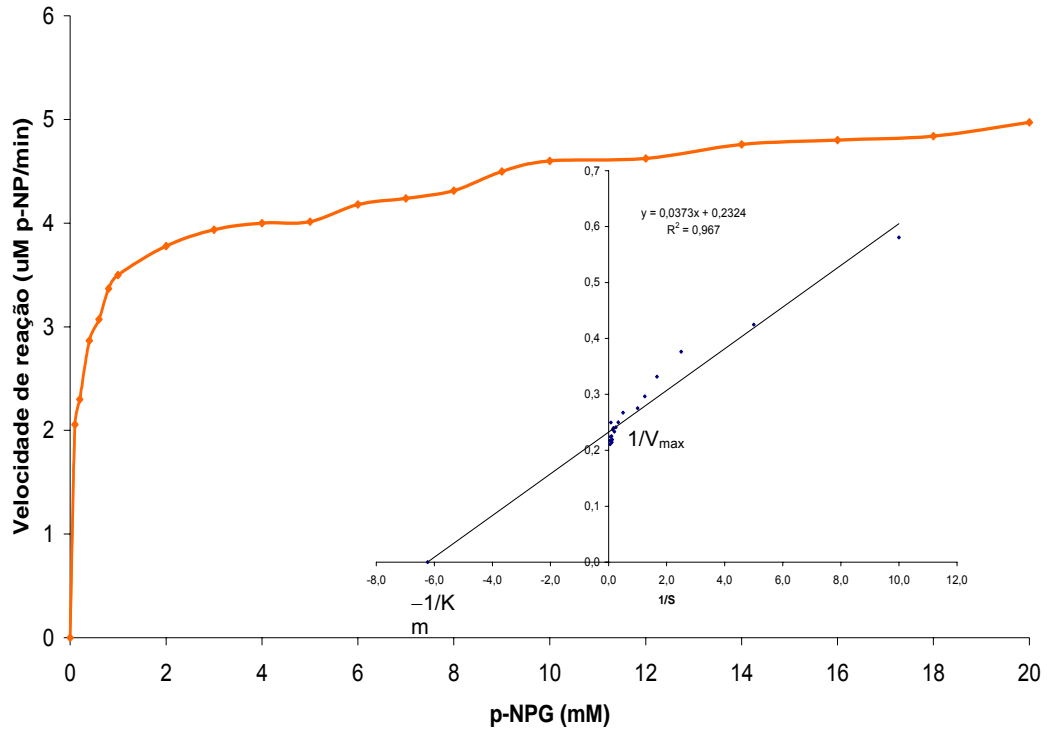


Figura 8 – Efeito da concentração de p-NPG (mM) na atividade de β -glucosidase da fração F₄₂.

Guide for Authors

LWT - Food Science and Technology is an international journal that publishes innovative papers in the fields of food chemistry, biochemistry, microbiology, technology and nutrition. The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication. Submission of a paper will be held to imply that it presents original research, that it has not been published previously, and that it is not under consideration for publication elsewhere.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

As of 1 June 2006, submission for all types of manuscripts to *LWT - Food Science and Technology* will proceed totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal, <http://ees.elsevier.com/lwt>, you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail generated by EES and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail. Authors must submit revisions via EES. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to authorsupport@elsevier.com.

Books for review should be sent to the Editors; all other correspondence should be sent directly to the publishers.

Four types of peer-reviewed papers will be published:

Short Reviews. These should present a focused aspect on a topic of current interest or an emerging field. They are not intended as comprehensive literature surveys covering all aspects of the topic. They should aim to give balanced, objective assessments by giving due reference to relevant published work, and not merely present the prejudices of individual authors or summarise only work carried out by the authors or by those with whom the authors agree. Undue speculation should also be avoided. These short reviews will receive priority in publication.

Reviews. Concise reviews of a scientific or applied field should include all major findings and bring together reports from a number of sources.

Research Papers. Reports of complete, scientifically sound, original research which contributes new knowledge to its field. The paper must be organised as described below.

Research Notes. Brief reports of scientifically sound, original research of limited scope of new findings. Research Notes have the formal organisation of a full paper. Such notes will receive priority of publication.

Peer Reviews It is the journal policy to keep the peer reviewing anonymous. Names of reviewers are only revealed if they are in agreement with the request of the author. When submitting a manuscript, authors may indicate names of experts who are not suitable/appropriate for reviewing the paper.

Language Manuscripts should be written in English. Authors whose mother tongue is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by someone familiar with English scientific writing. The Editors reserve the right to make any necessary linguistic alterations without consulting the authors.

Preparation of Manuscripts Authors should aim at producing 6 printed A4 pages (research papers) or 3 printed pages (research notes), which corresponds to approximately 18 and 9 pages of double-spaced type, respectively. All papers should follow the new style for LWT. Please see Volume 36 issue 1 onward. Manuscripts should be double-spaced throughout, with a left-hand margin of not less than 4 cm. On the first page, immediately below the title, give authors' names, affiliations and business addresses. Number the lines of each page. If your manuscript cites submitted but unpublished papers, send one copy of each of these papers with your manuscript.

The SI system (Système International d'Unités, often referred to as 'International Units') must be used for reporting units of measurement. Do not use %, ppm, M, N, etc. as units for concentrations. If analytical data are reported, replicate analyses must have been carried out and the number of replications must be stated.

Standard error or other evidence of reliability of data must be given.

Editorial Style *Title.* The title of the papers should be short but informative.

Abstract. Each article should include an abstract, not exceeding 200 words.

Introduction. In the Introduction, briefly review important prior publications and state the reasons for the investigation being reported.

Methods. Results. Discussion. Following the Introduction, authors are free to structure papers as appropriate. However, for the sake of clarity and uniformity, the above or similar section headings are recommended. If necessary, each section may be divided into further subsections, but do not use more than two levels for subtitles.

The Materials and Methods section must provide enough detail that a competent worker can repeat the experiments. However, detailed descriptions of well-known methods should be avoided in the experimental section. References to the relevant literature are sufficient. The Discussion should not be a compilation of current literature, but a consideration of the significance and consequences of the authors' present findings.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. References should be given in the following form:

Watt, D. K., Brasch, D. J., Larsen, D. S., & Melton, L. D. (1999). Isolation, characterisation, and NMR study of xyloglucan from enzymatically depectinised and non-depectinised apple pomace. *Carbohydrate Polymers*, 39(2), 165-180.

Closs, C. B., Roberts, I. D., Conde-Petit, B., & Eschler, F. (1997). Phase separation and rheology of aqueous amylopectin/ galactomannan systems. In E. J. Windhab, & B. Wolf. Proceedings of the 1st international symposium on food rheology and structure (pp. 233-237). Hannover: Vincentz Verlag.

Stephen, A. M. (1995). Food polysaccharides and their applications. New York: Marcel Dekker.
Wurzburg, O. B. (1986). Cross-linked starches. In O. B. Wurzburg, Modified starches: properties and uses (pp. 41). Boca Raton, FL: CRC Press.

Tables

Tables should be numbered and headed by a short but informative title. The experimental conditions, as far as they are necessary for understanding, should be given. Use no vertical and few horizontal lines. Probabilities may be indicated by *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001. Tables should be submitted on separate sheets.

Figures and Illustrations

Figures must be provided on separate sheets. Do not repeat material already included in tables. Figures should be comprehensible without reference to the text. All drawings and graphs should not exceed 20 x 20.5 cm in size. All illustrations should be consecutively numbered. Keys to graphs etc., should not appear on the figure, but only in the figure legend. Legends should consist of a short title followed by a brief description of experimental conditions and, where necessary, a key. Where it is necessary to use photographs, these should again be clearly labelled and numbered. Authors are strongly advised to

consult Elsevier's artwork instructions before uploading any graphics files for electronic submission. These are available at <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Colour Illustrations

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to grey scale? (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

Key Words

Four to five pertinent key words should be provided. If possible the Food Science and Technology Abstracts (FSTA) Thesaurus should be used (IFIS Publ., Shinfield, Reading RG2 9BB, UK <http://www.foodScienceCentral.com>).

Proofs

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

Offprints

Twenty-five offprints will be supplied free of charge. If colour has been paid for within the article, 100 extra offprints will be supplied free of charge. Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders for reprints (produced after publication of an article) will incur a 50% surcharge.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier Ltd., Global Rights Department, The Boulevard, Langford Lane, Oxford, OX5 1GB, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com

Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's [Author Gateway](#). Other questions or queries will also be dealt with via the website <http://authors.elsevier.com>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

5.4 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

5.4.1 6° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos – SLACA, 2005

6° SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

7 a 10 de novembro de 2005
Centro de Convenções - Unicamp

6° Simpósio Latino Americano
de Ciência de Alimentos

Ciência de Alimentos:
Abrindo Caminhos
para o Desenvolvimento
Científico, Tecnológico e Industrial

slaca
10
anos

UNICAMP

sbCTA
Sociedade Brasileira de
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Fea
Faculdade de Engenharia de Alimentos

ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE E TEOR DE ISOFLAVONAS NAS RADÍCULAS E COTILÉDONES DE SOJA GERMINADA

Resumo

As β -Glicosidasas (β -D-Glicosideo glicohidrolase, EC.3.2.1.21) estão amplamente distribuídas na natureza e apresentam especificidade para substratos como isoflavonas. Durante a germinação da soja ocorre ativação de enzimas como as β -glicosidasas, que hidrolisam as isoflavonas conjugadas liberando agliconas. O consumo de produtos com maior teor de agliconas é benéfico na redução dos riscos de doenças crônicas e degenerativas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de β -glicosidase e teor de isoflavonas de radículas e cotilédones de soja germinada. As sementes da cultivar de soja BRS 213, devido seu elevado nível de atividade de β -glicosidase, foram germinadas até 72h em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com 100% de umidade e mantidos por 10h com iluminação fluorescente. A cada 6h de germinação foram retiradas amostras, liofilizadas e separadas em cotilédones, radículas e cascas. As isoflavonas foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa e para determinação de atividades de β -glicosidasas foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p-NPG). Após 72h de germinação da soja, a atividade de β -glicosidase aumentou significativamente de 75,67UA/g a 246,21UA/g em radículas e 127,16UA/g a 286,89UA/g em cotilédones. Nas radículas houve diminuição significativa de 1.071,63mg/100g a 170,29mg/100g no teor de isoflavonas totais. O teor de malonildaidzina, malonilglicitina e malonilgenistina foi de 391,62mg/100g, 256,79mg/100g e 25,49mg/100g, respectivamente. O teor de daidzina e glicitina variou de 140,84mg/100g a 21,15mg/100g e 147,25mg/100g a 14,18mg/100g. Entretanto, na germinação a daidzeína apresentou pequena variação em seu teor, de 7,95mg/100g a 10,16mg/100g e gliciteína e genisteína foram detectadas em baixas concentrações. Nos cotilédones ocorreu aumento significativo no teor de isoflavonas totais de 42,50mg/100g a 101,14mg/100g. O teor de malonilgenistina e malonildaidzina aumentou de 22,93mg/100g a 60,38mg/100g e 8,59mg/100g a 28,49mg/100g. A genistina e daidzina nos cotilédones não apresentaram diferenças significativas e genisteína foi detectada em 0 e 6h de germinação.

ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASES E TEOR DE ISOFLAVONAS NAS RADÍCULAS E COTILÉDONES DE SOJA GERMINADA



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
LONDRINA

Mara Lucia L. Ribeiro¹, José Marcos G. Mandarino², Mercedes C. Carrão-Panizzi², Maria Cristina N. de Oliveira², Clara Beatriz H. Campo², Alexandre L. Nepomuceno², Elza I. Ida^{3*}

¹ Doutoranda em Ciência de Alimentos, UEL, ² Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Londrina, PR, ³ Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/CCA. Caixa Postal 6001, CEP 86051-970 – Londrina, PR, Brasil. E-mail: elida@uel.br.



CONCLUSÃO

O processo de germinação tem efeito significativo na atividade de β -glicosidase e no teor de isoflavonas totais e suas formas isoméricas. A atividade de β -glicosidase aumentou nas radículas e cotilédones enquanto o teor de isoflavonas totais aumentou nos cotilédones e reduziu nas radículas. A redução no teor de isoflavonas totais nas radículas foi decorrente do aumento de atividade de β -glicosidase.

INTRODUÇÃO

As β -Glicosidases (β -D-Glicosídeo glicohidrolase, EC. 3.2.1.21) estão amplamente distribuídas na natureza e apresentam especificidade para substratos como flavonas e isoflavonas⁽¹⁾. Durante a germinação da soja ocorre ativação de enzimas como as β -glicosidases que hidrolisam isoflavonas conjugadas, liberando isoflavonas agliconas⁽²⁾. O consumo de produtos com maior teor de agliconas é benéfico no tratamento e prevenção de doenças crônicas^(3,4).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de β -glicosidase e teor de isoflavonas de radículas e cotilédones de soja germinada.

METODOLOGIA

Sementes de soja BRS 213 foram germinadas até 72 h em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com 100 % de umidade e mantidos por 10 h com iluminação fluorescente. A cada 6 h de germinação foram retiradas amostras, liofilizadas e separadas em cotilédones, radículas e cascas. As isoflavonas foram quantificadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase reversa e para determinação de atividades de β -glicosidases foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p-NPG).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 72 h de germinação da soja e em relação a soja não germinada, a atividade de β -glicosidase aumentou 3,3 vezes em radículas (Figura 1) e 2,3 vezes em cotilédones (Figura 2).

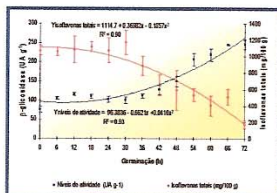


Figura 1. Atividade de β -glicosidase e teor de isoflavonas totais de radículas de soja BRS 213 germinada por 72 h.

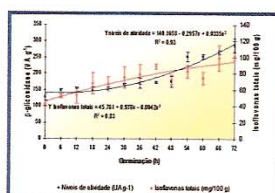


Figura 2. Atividade de β -glicosidase e teor de isoflavonas totais de cotilédones de soja BRS 213 germinada por 72 h.

Nos cotilédones ocorreu aumento de 2,4 vezes no teor de isoflavonas totais (Figura 2), de 2,6 vezes para malonilgenistina e 3,3 vezes para malonildaidzina (Figura 5). Genistina e daidzina não variaram durante a germinação (Tabela 1) e genisteína foi detectada somente em 0 e 6 h (0,46 e 0,42 mg/100 g).

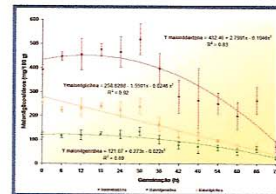


Figura 3. Teor de malonilglicosídeos de radículas de soja BRS 213 germinada por 72 h.

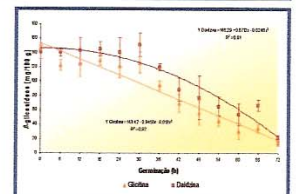


Figura 4. Teor de β -glicosídeos de radículas de soja BRS 213 germinada por 72 h.

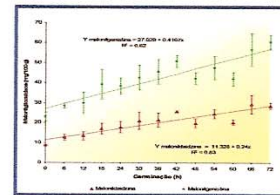


Figura 5. Teor de malonilglicosídeos de cotilédones de soja BRS 213 germinada por 72 h.

Tabela 1. Teor de isoflavonas* em radículas e cotilédones de soja BRS 213 germinada por 72 h.

Germinação (h)	Radículas		Cotilédones	
	Daidzeína	Genisteína	Genistina	Daidzina
0	7,95 ^{bc}	2,07	6,52 ^a	4,00 ^a
12	6,06 ^{bc}	0,79	6,61 ^a	3,53 ^a
24	1,24 ^c	nd	6,99 ^a	3,66 ^a
36	5,82 ^{bc}	nd	7,05 ^a	4,81 ^a
48	19,30 ^a	1,72	6,05 ^a	3,84 ^a
60	5,35 ^{bc}	nd	7,24 ^a	4,68 ^a
72	10,16 ^{ab}	1,50	7,58 ^a	4,69 ^a

Diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). *Resultados expressos em mg/100g base seca. nd: não detectado.

Nas radículas houve diminuição de 6,3 vezes no teor de isoflavonas totais (Figura 1), sendo que o teor das formas malonil (Figura 3), daidzina e gliciteína (Figura 4) diminuíram de 5,0 a 10,0 vezes. Gliciteína foi detectada somente em 0, 6 e 12 h (5,90, 4,46 e 3,15 mg/100g, respectivamente). Daidzeína apresentou pequena variação em seu teor e genisteína foi detectada em baixas concentrações em alguns tempos de germinação (Tabela 1).

REFERÊNCIAS

- HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. 2001. *Phytochemistry* 58, 995-1005.
- SANTOSH, T. R. 1999. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 462-467.
- MESSINA, M.J. 1999. *American Journal Clinical Nutrition* 70, 439-450.
- BROUNS, F. 2002. *Food Research International* 35, 187-193.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: CNPq.

05 a 08 de junho de 2006

Centro de Exposições e Eventos de Londrina

**IV CONGRESSO
BRASILEIRO DE
SOJA**

Resumos

Embrapa

Ciência e Tecnologia de Alimentos

047 Atividade de β -glicosidases de diferentes cultivares e grupos de maturação de duas safras de soja do Paraná.

M.L.L. RIBEIRO¹; L. ZIDOI¹; J.M.G. MANDARINO²; M.C. CARRÃO-PANIZZI²; M.C.N. DE OLIVEIRA²; C.B.H. CAMPO²; A.L. NEPOMUCENO²; E.I. IDA¹. ¹UEL, Caixa Postal 6001, Londrina, PR, elida@uel.br; ²Embrapa Soja.

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade de β -glicosidases de 16 cultivares de soja de diferentes grupos de maturação semeadas no Paraná das safras 2002/2003 e 2003/2004. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 16 cultivares e três blocos. O teste de comparações múltiplas de médias foi o de Tukey ($p < 0,05$). Para determinação da atividade de β -glicosidases foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p-NPG) e a enzima foi extraída com tampão citrato 0,05 M, pH 4,5, contendo NaCl 0,1 M por uma hora a temperatura ambiente. Na safra 2002/2003, o nível de atividade de β -glicosidases para cultivares de grupo de maturação precoce, semiprecoce e médio foi de 88,97–63,44 UA g⁻¹, de 80,39–61,10 UA g⁻¹ e de 86,22–73,77 UA g⁻¹, respectivamente. Na safra 2003/2004, o nível de atividade de β -glicosidases para as cultivares de grupos de maturação precoce, semi precoce e médio foi de 106,25–56,14 UA g⁻¹, 85,94–57,03 UA g⁻¹ e 89,01–73,46 UA g⁻¹, respectivamente. Na safra 2002/2003, as cultivares precoce BRS 213, semiprecoce Embrapa 48 e médio BRS 233 apresentaram maior nível de atividade de β -glicosidases, enquanto que menor nível de atividade foi observado nas cultivares precoce BRS 183 e BRS 212 e semiprecoce BRS 185, BRS 154, BRS 133 e BRS 214. Na safra 2003/2004, a cultivar precoce BRS 213 apresentou maior nível de atividade de β -glicosidases e menor nível de atividade foi observado nas cultivares precoce BRS 230 e BRS 212 e semiprecoce BRS 133 e BRS 214. Comparando as duas safras 2002/2003 e 2003/2004 das 16 cultivares de soja observou-se que as cultivares precoce BRS 213, semiprecoce BRS 185, BRS 232 e BRS 214 apresentaram a mesma tendência para o nível de atividade de β -glicosidases. Assim, verificou-se que o nível de atividade de β -glicosidases foi independente dos grupos de maturação das 16 cultivares de soja das safras 2002/2003 e 2003/2004.

048 Isoflavonas da soja de diferentes cultivares e grupos de maturação.

M.L.L. RIBEIRO¹; L. ZIDOI¹; J.M.G. MANDARINO²; M.C. CARRÃO-PANIZZI²; M.C.N. DE OLIVEIRA²; C.B.H. CAMPO²; A.L. NEPOMUCENO²; E.I. IDA¹. ¹UEL, Caixa Postal 6001, Londrina, PR, elida@uel.br; ²Embrapa Soja.

O objetivo deste trabalho foi determinar o teor de isoflavonas totais de 18 cultivares de soja de diferentes grupos de maturação da safra 2002/2003, semeadas em Londrina-PR. Foi utilizado o delineamento experimental de blocos ao acaso, com 18 cultivares e três blocos. O teste de comparações múltiplas de médias foi o de Tukey ($p < 0,05$). As isoflavonas foram extraídas com dimetil sulfoxido (DMSO) : metanol (1:4 v/v) por 15 a 17 h em temperatura ambiente e quantificadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase reversa. Pela análise de variância, verificou-se que houve diferenças significativas no nível de atividade das 18 cultivares de soja. O teor de isoflavonas totais variou 174,30 a 71,11 mg/100 g; 127,96 a 61,83 mg/100 g e 128,26 a 80,57 mg/100 g, nas cultivares de maturação precoce, semiprecoce e médio, respectivamente. O teor de isoflavonas foi independente do grupo de maturação e o maior teor foi observado na cultivar BRS 212, enquanto que o menor teor foi observado nas cultivares precoces BRS 230 e BRS 213, semiprecoces BRS 231 e BRS 232 e médio BRS 215. As isoflavonas predominantes nestas cultivares de soja foram malonildaidzina e malonilgenistina, correspondendo a 67% das isoflavonas totais enquanto que os β -glicosídeos e as agliconas corresponderam a 31% e 2%, respectivamente. A proporção das diferentes formas de isoflavonas foi similar para as 18 cultivares de soja.

ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE DE DIFERENTES CULTIVARES E GRUPOS DE MATURAÇÃO DE DUAS SAFRAS DE SOJA DO PARANÁ



RIBEIRO, M.L.L.¹; ZIDOI, L.¹; MANDARINO, J.M.G.²; CARRÃO-PANIZZI, M.C.²; OLIVEIRA, M. C.N.²; NEPOMUCENO, A.L.²; IDA, E.I.¹

¹ Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/CCA. Caixa Postal 6001, CEP 86051-970 – Londrina, PR, Brasil. E-mail: elida@uel.br. ² Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Londrina, PR



INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC. 3.2.1.21) compreendem um grupo heterogêneo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações β -glicosídicas de oligossacarídeos e outros conjugados glicosídicos com liberação de glucose. Algumas β -glicosidases de origem vegetal são altamente específicas para alguns substratos como isoflavonas, flavonas etc¹. Portanto, a presença de isoflavonas agliconas em grãos de soja está relacionada com a atividade de β -glicosidase e na hidratação dos grãos estas enzimas hidrolisam os β -glicosídeos, aumentando o teor das agliconas daidzeína e genisteína². Uma vez que as isoflavonas agliconas apresentam atividades biológicas mais acentuadas do que os derivados β -glicosídeos^{3,4}, têm-se procurado alternativas de processos enzimáticos de biotransformação das formas glicosiladas de isoflavonas em agliconas⁵. Uma das alternativas de aplicação desta enzima seria em produtos derivados de soja, para obtenção de alimentos funcionais com elevado teor de isoflavonas agliconas.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade de β -glicosidases de 16 cultivares de soja de diferentes grupos de maturação semeados em Londrina-PR, safras 2002/2003 e 2003/2004.

METODOLOGIA

A extração da enzima foi realizada com tampão citrato 0,05 M, pH 4,5, contendo NaCl 0,1 M por uma hora a temperatura ambiente.

Para determinação da atividade de β -glicosidases foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p-NPG)².

O teste de Tukey (ANOVA) foi aplicado ao nível de 5% de probabilidade para comparação de médias.

RESULTADOS

A atividade de β -glicosidase (Tabela 1), safra 2002/2003, foi maior nas cultivares de grupos de maturidade precoce BRS 213, semiprecoce Embrapa 48 e médio BRS 233. A menor atividade foi observada nas cultivares precoce BRS 183 e BRS 212 e semiprecoce BRS 185, BRS 154, BRS 133 e BRS 214.

Na safra 2003/2004, a cultivar de grupo de maturidade precoce BRS 213 apresentou maior atividade de β -glicosidases e a menor atividade foi observada nas cultivares precoce BRS 230 e BRS 212 e semiprecoce BRS 133 e BRS 214.

Comprando as duas safras 2002/2003 e 2003/2004 das 16 cultivares de soja observou-se que as cultivares precoce BRS 213, semiprecoce BRS 185, BRS 232 e BRS 214 apresentaram diferenças significativas na atividade de β -glicosidases.

Tabela 1 – Atividade de β -glicosidases de 16 cultivares de soja, safras 2002/2003 e 2003/2004, Londrina – PR.

Cultivar	Grupo de Maturação	Safra 2002/2003 UA/g FSI*	Safra 2003/2004 UA/g FSI*
BRS 213	Precoce	88,97 ^a A	106,28 ^a B
BRS 183	Precoce	72,19 ^{defg} A	72,02 ^{def} A
BRS 230	Precoce	63,44 ^{gh} A	64,03 ^{efg} ** A
BRS 212	Precoce	66,29 ^{gh} A	56,14 ^g ** A
BRS 184	Semiprecoce	78,39 ^{bcd} A	85,94 ^{bcd} ** A
Embrapa 48	Semiprecoce	80,39 ^{abcd} A	85,30 ^{bcd} A
BRS 185	Semiprecoce	70,72 ^{efg} A	76,85 ^{cde} B
BRS 231	Semiprecoce	72,67 ^{cdef} A	73,66 ^{def} A
BRS 156	Semiprecoce	72,89 ^{cdef} A	73,40 ^{def} A
BRS 232	Semiprecoce	61,10 ^h A	71,81 ^{def} B
BRS 154	Semiprecoce	71,16 ^{efg} A	71,22 ^{def} ** A
BRS 216	Semiprecoce	75,28 ^{cdef} A	70,10 ^{def} A
BRS 133	Semiprecoce	68,43 ^{gh} A	65,65 ^{efg} A
BRS 214	Semiprecoce	67,71 ^{gh} A	57,03 ^g B
BRS 233	Médio	86,22 ^{ab} A	89,01 ^{bc} A
BRS 215	Médio	73,77 ^{cdef} A	73,46 ^{def} A

*Resultados obtidos através de médias de triplicata, em base seca.

**Resultados obtidos através de média de duplicata, em base seca.

Médias seguidas por letras minúsculas distintas, nas colunas, e maiúsculas nas linhas, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

A atividade de β -glicosidase foi independente dos grupos de maturação das 16 cultivares de soja das safras 2002/2003 e 2003/2004.

REFERÊNCIAS

- HSIEH, M.C.; GRAHAM, T.L. *Phytochemistry* 58, 995-1005, 2001.
- MATSUURA, M. et al. *Journal of Food Science* 54(3), 602-605, 1989.
- IZUMI et al. 2000.
- BROUNS, F. *Food Research International* 35, 187-193, 2002.
- PARK, Y.K. et al. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 3(3), 156-160, 2001.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: CNPq.

ISOFLAVONAS DA SOJA DE DIFERENTES CULTIVARES E GRUPOS DE MATURAÇÃO



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
LONDRINA

Mara Lucia L. Ribeiro¹, José Marcos G. Mandarino², Mercedes C. Carrão-Panizzi², Maria Cristina N. de Oliveira², Clara Beatriz H. Campo², Alexandre L. Nepomuceno², Elza I. Ida^{3*}

¹ Dotoranda em Ciência de Alimentos, UEL, ² Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Londrina, PR, ³ Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/CCA. Caixa Postal 6001, CEP 86051-970 – Londrina, PR, Brasil. E-mail: elida@uel.br.



INTRODUÇÃO

As isoflavonas da soja são amplamente investigadas devido a sua atividade estrogênica^{1,2}, antioxidante^{1,3} e antitumoral^{4,5} e com potencial no tratamento e prevenção de doenças crônicas^{5,6}. Estas atividades biológicas são mais acentuadas nas formas agliconas do que nas formas β-glicosídicas.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi determinar quanti- e qualitativamente o teor de isoflavonas de 18 cultivares de soja de diferentes grupos de maturação da safra 2002/2003, semeados em Londrina-PR.

METODOLOGIA

As isoflavonas foram extraídas com dimetil sulfoxido (DMSO) : metanol (1:4 v/v) por 15 a 17 h em temperatura ambiente e quantificadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase reversa. O teste de Tukey (ANOVA) foi aplicado ao nível de 5% de probabilidade para comparação de médias.

RESULTADOS

O teor de isoflavonas totais e de suas formas químicas (Tabelas 1 e 2) foram quantificados e agrupados conforme o grupo de maturação. Na análise de variância verificou-se diferenças significativas de 2,8 vezes no teor de isoflavonas totais entre as cultivares.

Tabela 1 – Teor médio de isoflavonas totais e de malonilglicosídeos de 18 cultivares de soja, safra 2002/2003, Londrina - PR.

Cultivar	Grupos de Maturidade	Isoflavonas Totais (mg/100g) ^a	Malonilglicosídeos (mg/100g) ^a	
			Malonigenistina	Malonidaidzina
BRS 212	Precoco	174,30 ^{a 1j}	81,44 ^a	36,35 ^{ab}
BRS 183	Precoco	152,44 ^{ab}	69,86 ^b	33,31 ^{abcd}
BRS 132	Precoco	89,93 ^{efghi}	37,16 ^{efgh}	23,41 ^{defg}
BRS 213	Precoco	80,27 ^{ghij}	33,51 ^{fghi}	21,63 ^{fgh}
BRS 230	Precoco	71,11 ^{ij}	30,88 ^{ghi}	15,48 ^g
Embrapa 48	Semiprecoco	127,96 ^{bcd}	47,92 ^c	35,26 ^{abc}
BRS 214	Semiprecoco	121,20 ^{cde}	44,81 ^{ode}	38,19 ^a
BRS 154	Semiprecoco	110,64 ^{cde}	43,48 ^{cdef}	29,41 ^{abcde}
BRS 156	Semiprecoco	108,00 ^{cde}	38,67 ^{cdefg}	33,34 ^{abcd}
BRS 133	Semiprecoco	106,66 ^{cdef}	38,72 ^{cdefg}	33,83 ^{abcd}
BRS 185	Semiprecoco	102,31 ^{defg}	36,23 ^{efgh}	31,60 ^{abcde}
BRS 184	Semiprecoco	94,99 ^{efghi}	35,94 ^{efgh}	27,65 ^{abcdef}
BRS 216	Semiprecoco	89,87 ^{efghi}	28,97 ^{ghi}	25,48 ^{cdef}
BRS 231	Semiprecoco	79,14 ^{hij}	24,74 ⁱ	18,43 ^{fg}
BRS 232	Semiprecoco	61,83 ^j	25,06 ⁱ	15,32 ^g
BRS 233	Médio	128,26 ^{bcd}	47,43 ^{cd}	26,98 ^{bodef}
BRS 134	Médio	100,84 ^{efgh}	37,70 ^{defgh}	31,22 ^{abcde}
BRS 215	Médio	80,57 ^{fghij}	28,03 ^{ghi}	26,31 ^{bodef}
CV		7,88	8,05	12,41

^aResultados expressos em base seca. CV: Coeficiente de variação.
^{1j} Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação às formas químicas das isoflavonas (Tabela 2), observa-se em todas cultivares de soja que os derivados predominantes foram malonilaidzina e malonilgenistina. A malonilglicitina foi detectada nas cultivares BRS-233, BRS-231 e BRS-216 (17,46, 10,82 e 3,64 mg/100g, respectivamente). Não foram detectadas formas acetiladas de isoflavonas.

Tabela 2 – Teor médio dos glicosídeos e agliconas de 18 cultivares de soja, safra 2002/2003, Londrina - PR.

Cultivar	Glicosídeos (mg/100g)			Agliconas (mg/100g)	
	Genistina	Daidzina	Glicitina	Genisteína	Daidzeína
BRS 212	32,71 ^{a 1j}	16,17 ^a	3,88 ^d	2,17 ^a	1,58 ^a
BRS 183	27,06 ^b	14,21 ^{ab}	5,04 ^{bcd}	1,64 ^b	1,32 ^{ab}
BRS 132	13,71 ^{efg}	9,00 ^{efg}	4,93 ^{cd}	0,96 ^{def}	0,76 ^{cd}
BRS 213	11,54 ^{gh}	8,13 ^{efgh}	3,88 ^d	0,81 ^{fgh}	0,59 ^{cd}
BRS 230	13,38 ^{efgh}	6,70 ^{gh}	3,08 ^d	0,90 ^{ef}	0,69 ^{cd}
Embrapa 48	19,52 ^c	14,45 ^{ab}	8,68 ^{ab}	1,18 ^{cd}	0,95 ^{bcd}
BRS 214	15,95 ^{cdef}	13,83 ^{ab*}	5,95 ^{abcd}	1,13 ^{cd}	1,35 ^a
BRS 154	17,58 ^{cd}	12,13 ^{bcd}	6,27 ^{abcd}	1,04 ^{de}	0,73 ^{cd*}
BRS 156	14,20 ^{defg}	12,73 ^{bc}	7,73 ^{abc}	0,60 ^{ghij}	0,72 ^{cd}
BRS 133	13,66 ^{efg}	13,44 ^b	5,43 ^{abcd}	0,77 ^{fgh}	0,81 ^{cd}
BRS 185	14,31 ^{defg}	11,95 ^{bcd}	6,38 ^{abcd}	0,83 ^{efg}	1,01 ^{bc}
BRS 184	13,90 ^{defg}	9,03 ^{efg}	5,80 ^{abcd}	1,36 ^c	1,31 ^{ab}
BRS 216	12,76 ^{fgh}	9,97 ^{def}	7,79 ^{abc}	0,66 ^{hij}	0,60 ^{cd}
BRS 231	10,65 ^{gh}	7,52 ^{fgh}	5,67 ^{abcd}	0,65 ^{ghi}	0,66 ^{cd}
BRS 232	10,50 ^{gh}	6,18 ^h	3,67 ^d	0,61 ^{ghij}	0,49 ^d
BRS 233	17,01 ^{cde}	9,89 ^{def}	9,08 ^{a*}	0,41 ^j	nd ^{e*}
BRS 134	13,36 ^{efgh}	10,65 ^{cde}	6,13 ^{abcd}	0,77 ^{fgh}	1,01 ^{bc}
BRS 215	9,77 ^h	9,09 ^{efg}	6,13 ^{abcd}	0,44 ^{ij}	0,80 ^{cd}
CV	7,92	7,88	20,47	7,72	16,80

*Resultados expressos em base seca. CV: Coeficiente de variação.
^{1j} Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

As formas malonil, glicosil e agliconas corresponderam a 67%, 31% e 2% do teor de isoflavonas totais e estas proporções foram similares nas 18 cultivares analisadas.

CONCLUSÃO

As diferenças observadas no teor de isoflavonas foram independentes dos grupos de maturação e podem ser atribuídas às diferenças genéticas das cultivares, localização do plantio, condições climáticas e ano de colheita.

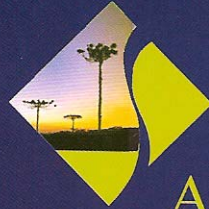
REFERÊNCIAS

- BROUNS, F. 2002. *Food Research International* 35, 187-193
- Liggins et al., 2000
- Park et al., 2001
- Barnes, 1995; Lamartiniere et al., 1995; Fritz et al., 1998; Liggins et al., 2000

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: CNPq.

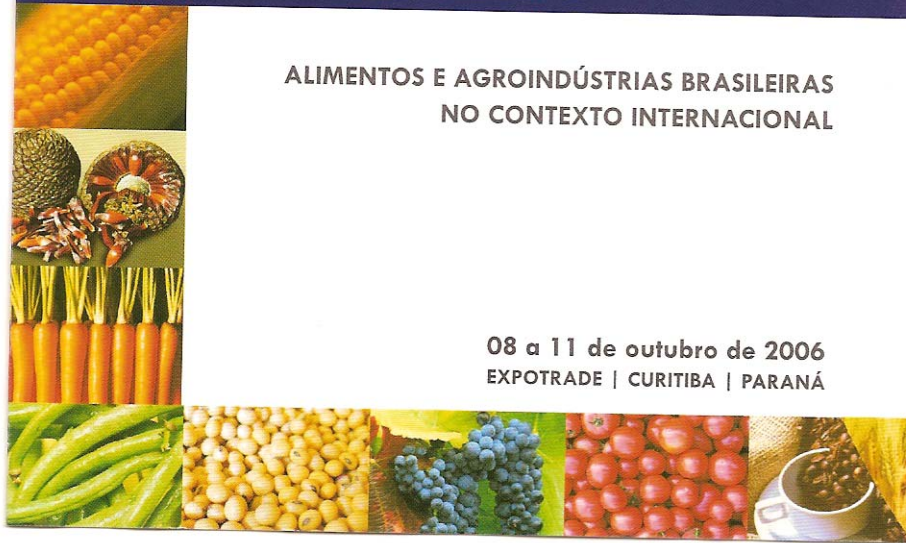
ANAIS | 2006



XX
Congresso Brasileiro de
Ciência e
Tecnologia de
Alimentos

**ALIMENTOS E AGROINDÚSTRIAS BRASILEIRAS
NO CONTEXTO INTERNACIONAL**

**08 a 11 de outubro de 2006
EXPOTRADE | CURITIBA | PARANÁ**





**XX Congresso Brasileiro
de Ciência e Tecnologia
de Alimentos**

08 a 11 de outubro de 2006
EXPO TRADE - Curitiba - PR

Área: **Química e Bioquímica**

Código do Trabalho: **255** Data Apresentação: **09/10/2006**

Página: **1780**

ISBN: **978 - 85 - 60299 - 00 - :**

TEOR DE ISOFLAVONAS E ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE E SUA CORRELAÇÃO COM CULTIVARES DE SOJA DE DIFERENTES GRUPOS DE MATURIDADE

MARA LUCIA LUIZ RIBEIRO* (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA); **JOSÉ
MARCOS G. MANDARINO** (EMBRAPA SOJA, LONDRINA); **MERCEDES C. CARRÃO-
PANIZZI** (EMBRAPA SOJA, LONDRINA); **MARIA CRISTINA N. DE OLIVEIRA**
(EMBRAPA SOJA, LONDRINA); **CLARA BEATRIZ H. CAMPO** (EMBRAPA SOJA,
LONDRINA); **ALEXANDRE L. NEPOMUCENO** (EMBRAPA SOJA, LONDRINA); **ELZA
IOUKO IDA** (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

*E-mail: maralucia.ribeiro@gmail.com

As isoflavonas são amplamente investigadas devido a sua atividade estrogênica, antioxidante e antitumoral e potencial no tratamento e prevenção de doenças crônicas. Estas atividades biológicas são mais acentuadas nas formas agliconas do que nas formas b-glicosídicas. Para liberação das formas agliconas, os b-glicosídeos são hidrolisados pela b-glicosidase, presente na soja. O objetivo deste trabalho foi correlacionar o teor das diferentes formas químicas de isoflavonas e atividade de b-glicosidase com 18 cultivares de soja de diferentes grupos de maturidade da safra 2002/2003, submetidos às mesmas condições de cultivo. Foi utilizado o delineamento experimental de blocos ao acaso, com 18 cultivares e três blocos. O teste de Tukey (ANOVA) foi aplicado ao nível de 5% ($p < 0,05$). As isoflavonas foram extraídas com dimetil sulfoxido (DMSO) : metanol (1:4 v/v) por 16 h em temperatura ambiente e quantificadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase reversa. A extração da b-glicosidase foi realizada com tampão citrato 0,05 M, pH 4,5, contendo NaCl 0,1 M por uma hora a temperatura ambiente. Para determinação de atividade de b-glicosidase foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil-b-D-glicopiranosídeo (p-NPG). O teor de isoflavonas totais e atividade de b-glicosidases foram de 174,30 a 61,83 mg/100 g e 88,97 a 61,10 UA/g, respectivamente. As formas predominantes de isoflavonas foram malonilidaizina e malonilgenistina em todas cultivares e corresponderam a 67,0%. Os b-glicosídeos e agliconas corresponderam a 31,0% e 2,0% do total de isoflavonas, respectivamente. As formas acetiladas não foram detectadas. A proporção entre as diferentes formas de isoflavonas foi similar para todas cultivares de soja. Análises de regressão entre dias de maturidade e cada forma de isoflavona não foram significativas. Não houve correlação entre dias de maturidade e teor de b-glicosídeos e malonilglicosídeos. Entretanto, foi observada correlação entre dias de maturidade e teor de agliconas ($p < 0,08$). Análises de regressão e correlação entre atividade de b-glicosidase e cultivares de soja de diferentes dias de maturidade não foram significativas e a atividade de b-glicosidase não correlacionou com o teor das diferentes formas de isoflavonas ($p < 0,05$).

Palavras-Chave: Glycine max, isoflavonas, dias de maturidade

Agradecimentos:

Apoio financeiro: CNPq

PROMOÇÃO



www.sbcta.org.br

REALIZAÇÃO



Universidade
Estadual de Londrina



TEOR DE ISOFLAVONAS E ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE E SUA CORRELAÇÃO COM CULTIVARES DE SOJA DE DIFERENTES GRUPOS DE MATURIDADE

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
LONDRINA



RIBEIRO, M.L.L.¹; MANDARINO, J.M.G.², CARRÃO-PANIZZI, M.C.², OLIVEIRA, M. C.N.²; HOFMANN CAMPO, C.B.; NEPOMUCENO, A.L.², IDA, E.I.¹

¹ Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos/CCA. Caixa Postal 6001, CEP 86051-970 – Londrina, PR, Brasil. E-mail: elida@uel.br. ² Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Londrina, PR



INTRODUÇÃO

As isoflavonas são amplamente investigadas devido a sua atividade estrogênica, antioxidante e antitumoral e potencial no tratamento e prevenção de doenças crônicas. Estas atividades biológicas são mais acentuadas nas formas agliconas do que nas formas β -glicosídicas. A presença de isoflavonas agliconas em grãos de soja está relacionada com a atividade de β -glicosidase presente na soja.

OBJETIVO

Correlacionar o teor das diferentes formas químicas de isoflavonas e atividade de β -glicosidase com 18 cultivares de soja de diferentes grupos de maturidade da safra 2002/2003, submetidos às mesmas condições de cultivo.

METODOLOGIA

As isoflavonas foram extraídas com dimetil sulfóxido (DMSO) : metanol (1:4 v/v) por 16 h em temperatura ambiente e quantificadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com coluna de fase reversa.

A extração da β -glicosidase foi realizada com tampão citrato 0,05 M, pH 4,5, contendo NaCl 0,1 M por uma hora a temperatura ambiente. Para determinação de atividade de β -glicosidase foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p-NPG).

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com 18 cultivares e três blocos. O teste de Tukey (ANOVA) foi aplicado para comparação de médias, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

O teor de isoflavonas totais e atividade de β -glicosidase foram de 174,30 a 61,83 mg/100 g e 88,97 a 61,10 UA/g, respectivamente (Tabela 1). As formas predominantes de isoflavonas foram malonilidaizina e malonilgenistina em todas cultivares e corresponderam a 67,0% (Tabela 2). Os β -glicosídeos e agliconas corresponderam a 31,0% e 2,0% do total de isoflavonas, respectivamente (Tabela 3). As formas acetiladas não foram detectadas. A proporção entre as diferentes formas de isoflavonas foi similar para todas cultivares de soja.

Tabela 1 – Teor de isoflavonas totais e atividade de β -glicosidase de 18 cultivares de soja, safra 2002/2003, Londrina - PR.^a

Cultivar	Grupo de maturidade ^b	Isoflavonas totais (mg/100g)	Atividade de β -glicosidase (UA/g)
BRS 213	Precoce	80,27 ^{gh}	88,97 ^a
BRS 132	Precoce	89,93 ^{efgh}	81,61 ^{abc}
BRS 183	Precoce	152,44 ^{ab}	72,19 ^{defg}
BRS 212	Precoce	174,30 ^a	66,29 ^{fgh}
BRS 230	Precoce	71,11 ⁱ	63,44 ^{gh}
Embrapa 48	Semi-precoce	127,96 ^{bcde}	80,39 ^{abcd}
BRS 184	Semi-precoce	94,99 ^{efgh}	78,39 ^{bcde}
BRS 216	Semi-precoce	89,87 ^{efgh}	75,28 ^{efde}
BRS 156	Semi-precoce	108,00 ^{cdef}	72,89 ^{cdef}
BRS 231	Semi-precoce	79,14 ^{hi}	72,67 ^{defd}
BRS 154	Semi-precoce	110,64 ^{cde}	71,16 ^{efg}
BRS 185	Semi-precoce	102,31 ^{defg}	70,72 ^{efg}
BRS 133	Semi-precoce	106,66 ^{cdef}	68,43 ^{fgh}
BRS 214	Semi-precoce	121,20 ^{cdef}	67,71 ^{fgh}
BRS 232	Semi-precoce	61,83 ^j	61,10 ^h
BRS 233	Médio	128,26 ^{bcde}	86,22 ^{ab}
BRS 215	Médio	80,57 ^{fgh}	73,77 ^{cdef}
BRS 134	Médio	100,84 ^{efgh}	71,37 ^{defg}
CV		7,88	4,00

^a Resultados expressos em base seca. ^b Classificação segundo dias de emergência até maturidade em 2002 e 2003. CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não foram significativamente diferentes (Tukey p<0,05). ^c Médias de dois blocos.

PALAVRAS-CHAVE

Glycine max, isoflavonas, dias de maturidade.

Tabela 2 – Teor de malonilglicosídeos de 18 cultivares de sojas, safra 2002/2003, Londrina - PR.^a

Cultivar	Malonilglicosídeos (mg/100g)		
	Malonilgenistina	Malonilidaizina	Malonilglicetina
BRS 213	33,51 ^{gh}	21,63 ^{gh}	Nd
BRS 132	37,16 ^{efgh}	23,41 ^{defg}	Nd
BRS 183	69,86 ^b	33,31 ^{abcd}	Nd
BRS 212	81,44 ^a	36,35 ^{ab}	Nd
BRS 230	30,88 ^{gh}	15,48 ^g	Nd
Embrapa 48	47,92 ^c	35,26 ^{abc}	Nd
BRS 184	35,94 ^{efgh}	27,65 ^{abcd}	Nd
BRS 216	28,97 ^{gh}	25,48 ^{cdef}	3,64
BRS 156	38,67 ^{cdefg}	33,34 ^{abcd}	Nd
BRS 231	24,74 ⁱ	18,43 ^{fg}	10,82
BRS 154	43,48 ^{cdef}	29,41 ^{abcde}	Nd
BRS 185	36,23 ^{efgh}	31,60 ^{abcde}	Nd
BRS 133	38,72 ^{cdefg}	33,83 ^{abcd}	Nd
BRS 214	44,81 ^{cde}	38,19 ^a	Nd
BRS 232	25,06 ⁱ	15,32 ^g	Nd
BRS 233	47,43 ^{cde}	26,98 ^{bcdef}	17,46
BRS 215	28,03 ^{gh}	26,31 ^{bcdef}	Nd
BRS 134	37,70 ^{defgh}	31,22 ^{abcde}	Nd
CV	8,05	12,41	

^a Resultados expressos em base seca. CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não foram significativamente diferentes (Tukey p<0,05).

Tabela 3 – Teor de β -glicosídeos e agliconas de 18 cultivares de soja, safra 2002/2003, Londrina - PR.^a

Cultivar	β -glicosídeos (mg/100g)			Agliconas (mg/100g)	
	Genistina	Daidzina	Glicetina	Genisteína	Daidzeína
BRS 212	32,71 ^a	16,17 ^a	3,88 ^d	2,17 ^a	1,58 ^a
BRS 183	27,06 ^b	14,21 ^{ab}	5,04 ^{bcd}	1,64 ^b	1,32 ^{ab}
BRS 132	13,71 ^{efg}	9,00 ^{efg}	4,93 ^{cd}	0,96 ^{def}	0,76 ^{cd}
BRS 230	13,38 ^{efgh}	6,70 ^{gh}	3,08 ^d	0,90 ^{ef}	0,69 ^{cd}
BRS 213	11,54 ^{gh}	8,13 ^{efgh}	3,88 ^d	0,81 ^{efgh}	0,59 ^{cd}
BRS 184	13,90 ^{defg}	9,03 ^{efg}	5,80 ^{abcd}	1,26 ^c	1,31 ^{ab}
BRS 214	15,95 ^{cdef}	13,83 ^{abc}	5,95 ^{abcd}	1,13 ^{cd}	1,35 ^a
Embrapa 48	19,52 ^c	14,45 ^{ab}	8,68 ^{ab}	1,16 ^{cd}	0,95 ^{bcd}
BRS 154	17,58 ^{cd}	12,13 ^{bcd}	6,27 ^{abcd}	1,04 ^{de}	0,73 ^{cd}
BRS 185	14,31 ^{efgh}	11,95 ^{bcd}	6,38 ^{abcd}	0,83 ^{efg}	1,01 ^{bc}
BRS 133	13,66 ^{efg}	13,44 ^b	5,43 ^{abcd}	0,77 ^{efgh}	0,81 ^{cd}
BRS 216	12,78 ^{fgh}	9,97 ^{def}	7,79 ^{abc}	0,66 ^{hij}	0,60 ^{cd}
BRS 156	14,20 ^{defg}	12,73 ^{bc}	7,73 ^{abc}	0,60 ^{ghij}	0,72 ^{cd}
BRS 231	10,65 ^{gh}	7,52 ^{fgh}	5,67 ^{abcd}	0,65 ^{ghij}	0,66 ^{cd}
BRS 232	10,50 ^{gh}	6,18 ^h	3,67 ^d	0,61 ^{ghij}	0,49 ^d
BRS 134	13,36 ^{efgh}	10,65 ^{cde}	6,13 ^{abcd}	0,77 ^{efgh}	1,01 ^{bc}
BRS 215	9,77 ^h	9,09 ^{efg}	6,13 ^{abcd}	0,44 ⁱ	0,80 ^{cd}
BRS 233	17,01 ^{cde}	9,89 ^{def}	9,08 ^{ab}	0,41 ⁱ	nd ^{ef}
CV	7,92	7,88	20,47	7,72	16,80

^a Resultados expressos em base seca. CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não foram significativamente diferentes (Tukey p<0,05). ^b Médias de dois blocos.

Análises de regressão entre dias de maturidade e cada forma de isoflavona não foram significativas. Não houve correlação entre dias de maturidade e teor de β -glicosídeos e malonilglicosídeos. Entretanto, foi observada correlação entre dias de maturidade e teor de agliconas (p<0,08). Análises de regressão e correlação entre atividade de β -glicosidase e cultivares de soja de diferentes dias de maturidade não foram significativas e a atividade de β -glicosidase não correlacionou com o teor das diferentes formas de isoflavonas (p<0,05).

CONCLUSÃO

As cultivares de soja de maturidade precoce apresentaram teor elevado de isoflavonas agliconas.

Atividade de β -glicosidase e teor de β -glicosídeos e malonilglicosídeos não correlacionaram significativamente com grupos de maturidade.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: CNPq.

5.5 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – XIV EAIC – ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UNICENTRO, GUARAPUAVA, PR.

ISSN 1676-0018
Registrado no XIV EAIC sob nº 1153

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO
XIV EAIC - Encontro Anual de Iniciação Científica
31 de agosto a 3 de setembro de 2005 - Guarapuava/PR

b-GLICOSIDASES DE DIFERENTES CULTIVARES E GRUPOS DE MATURAÇÃO DA SAFRA DE SOJA 2003/2004

LUCIANA ZIDOI
luzidoi@yahoo.com.br
Prof(ª) ELZA IOUKO IDA
Universidade Estadual de Londrina
LEONARDO RAFFAQUINTANA
GABRIELA SALOMÃO DURIGAN
MARA LUCIA LUIZ RIBEIRO
ELZA IOUKO IDA

Palavras-chave: B-GLICOSIDASES, GLYCINE MAX, SOJA

As b-Glicosidases (b-D-Glicosideo glicohidrolase, EC. 3.2.1.21) estão presentes em várias fontes vegetais e apresentam especificidade para substratos como flavonas e isoflavonas. As isoflavonas da soja são amplamente investigadas por apresentarem atividades estrogênica, antioxidante e antitumoral e podem ser utilizadas no tratamento e prevenção de doenças crônicas. Estas atividades são mais acentuadas nas formas agliconas do que nos b-glicosídeos cuja hidrólise é realizada pelas b-glicosidases. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade de b-glicosidases de 16 cultivares de soja, safra 2003/2004, de diferentes grupos de maturação. Para determinação em triplicata da atividade de b-glicosidases foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil-b-D-glicopiranosídeo (p-NPG) e a enzima foi extraída com tampão citrato 0,05 M, pH 4,5, contendo NaCl 0.1 M por uma hora a temperatura ambiente. Os níveis de atividade de b-glicosidases para as cultivares de grupos de maturação precoce, semi precoce e médio foram de 106,25–56,14 UA g⁻¹, 85,94–57,03 UA g⁻¹ e 89,01–73,46 UA g⁻¹, respectivamente. As cultivares de soja BRS 213 e BRS 212, do grupo de maturação precoce, apresentaram níveis mais elevado e mais baixo de atividade de b-glicosidases. Os níveis de atividade de b-glicosidases foram independentes dos grupos de maturação.

ISSN 1676-0018
Registrado no XIV EAIC sob nº 1469

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO
XIV EAIC - Encontro Anual de Iniciação Científica
31 de agosto a 3 de setembro de 2005 - Guarapuava/PR

b-GLICOSIDASES DE DIFERENTES CULTIVARES E GRUPOS DE MATURAÇÃO DA SAFRA DE SOJA 2002/2003

GABRIELA SALOMÃO DURIGAN
gabirobex@hotmail.com
Prof(ª) ELZA IOUKO IDA
Universidade Estadual de Londrina
LEONARDO RAFFA QUINTANA
LUCIANA ZIDOI
MARA LUCIA LUIZ RIBEIRO
ELZA IOUKO IDA

Palavras-chave: B-GLICOSIDASES, GLYCINE MAX, SOJA

Na soja, os b-glicosídeos podem ser hidrolisados pelas b-glicosidases liberando as formas agliconas, que possuem atividades biológicas mais acentuadas. As b-Glicosidases (b-D-Glicosídeo glicohidrolase, EC. 3.2.1.21) estão presentes na soja e apresentam especificidade para substratos como flavonas e isoflavonas. As isoflavonas da soja são investigadas devido suas atividades estrogênica, antioxidante e antitumoral e podem ser utilizadas no tratamento e prevenção de doenças crônicas. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade de b-glicosidases de 18 cultivares de soja de diferentes grupos de maturação da safra 2002/2003. A extração das enzimas em triplicata foi realizada com tampão citrato 0,05 M, pH 4,5, contendo NaCl 0,1 M por uma hora a temperatura ambiente. Para determinação de atividade de b-glicosidases foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil-b-D-glicopiranosídeo (p-NPG). Os níveis de atividade de b-glicosidases para as cultivares de grupos de maturação precoce, semiprecoce e médio variaram de 88,97 a 63,44 UA g⁻¹, de 80,39 a 61,10 UA g⁻¹ e 86,22 a 71,37 UA g⁻¹, respectivamente e foram independentes dos grupos de maturação. A cultivar de soja BRS 213 do grupo de maturação precoce apresentou o nível de atividade de b-glicosidases mais elevado enquanto que a cultivar BRS 232 do grupo de maturação semiprecoce apresentou menor atividade.

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO
XIV EAIC - Encontro Anual de Iniciação Científica
31 de agosto a 3 de setembro de 2005 - Guarapuava/PR

TEOR DE ISOFLAVONAS DA SOJA DE DIFERENTES CULTIVARES E GRUPOS DE MATURAÇÃO

LEONARDO RAFFA QUINTANA
leonardoraf@bol.com.br
Prof^(a) ELZA IOUKO IDA
Universidade Estadual de Londrina
GABRIELA SALOMÃO DURIGAN
LUCIANA ZIDOI
MARA LUCIA LUIZ RIBEIRO
ELZA IOUKO IDA

Palavras-chave: ISOFLAVONAS, GLYCINE MAX, SOJA

As isoflavonas da soja são os principais compostos fenólicos encontrados na forma b-glicosídica (genistina, daidzina e glicitina), na forma conjugada a grupos malonil (malonilgenistina, malonildaizina e malonilglicitina) e acetil (acetilgenistina, acetildaizina e acetilglicitina) e na forma aglicona (genisteína, daidzeína e gliciteína). As isoflavonas são amplamente investigadas por apresentarem atividades estrogênica, antioxidante e antitumoral e são recomendadas para tratamento e prevenção de doenças crônicas. As atividades biológicas são mais acentuadas nas formas agliconas do que nas formas b-glicosídicas. Considerando a importância das isoflavonas da soja na saúde humana, o objetivo deste trabalho foi determinar o teor de isoflavonas totais de 18 cultivares de soja de diferentes grupos de maturação da safra 2002/2003. As isoflavonas foram extraídas em triplicata com dimetil sulfoxido (DMSO) : metanol (1:4 v/v) por 15 a 17 h em temperatura ambiente e quantificadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase reversa. O teor de isoflavonas totais variou nas cultivares de maturação precoce, semiprecoce e médio e foram de 174,30 a 71,11 mg/100 g; 127,96 a 61,83 mg/100 g e 128,26 a 80,57 mg/100 g, respectivamente. O teor de isoflavonas foi independente do grupo de maturação. As isoflavonas predominantes em todas cultivares de soja foram malonildaizina e malonilgenistina, correspondendo a 67% das isoflavonas totais enquanto que os b-glicosídeos e as agliconas corresponderam a 31% e 2%. As formas acetiladas de isoflavonas não foram detectadas. A proporção das diferentes formas de isoflavonas foi similar para as 18 cultivares de soja.

6 CONCLUSÃO

Para obtenção de soja com teor elevado de isoflavonas agluconas deve-se utilizar cultivares de grupos de maturação precoces.

Atividade de β -glucosidase e teor de β -glucosídeos e malonilglucosídeos não se correlacionaram significativamente com grupos de maturação das cultivares de soja investigadas.

A germinação afetou a atividade de β -glucosidase, teor de isoflavonas totais e de suas formas, sendo que os estádios de germinação correlacionaram com o teor de isoflavonas da soja.

A purificação da β -glucosidase de cotilédones de soja foi obtida à partir de extração com tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 6,6; fracionada de 40 a 85% de saturação com sulfato de amônio a 4°C e cromatografia de troca iônica com CM Sephadex C-50 e filtração em gel com Sephadex G-100.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A β -glucosidase purificada de cotilédones de soja será aplicada em produtos de soja para avaliar a sua ação em substratos endógenos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.; BALSWIN, R. E.; MINOR, H. Germination effects on flatus-causing factors and antinutrients of mungbeans and two strains of small-seeds soybeans. *J. Food Prot.*, v. 47, n. 6, p. 441–444, 1984.
- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-oestrogens and western diseases. *Ann. Med.*, v. 29, n. 2, p. 95–102, 1997.
- ANDERSON, J. J. B.; GARNER, S. C. G. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr. Res.*, v. 17, n. 10, p. 1617–1632, 1997.
- ARAÚJO, J. M. A.; CARLOS, J. C. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de beta-glucosidase na formação do sabor amargo e adstringente. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 17, n. 2, p. 137–141, maio/ago.1997.
- BAU, H. M.; DEBRY, G. Germinated soybean protein products chemical and nutritional evaluation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 56, n. 3, p. 160–162, 1979.
- BAU, H. M.; VILLAUME, Ch.; MÉJEAN, L. Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats. *Nahrung*, v. 44, p. 2–6, 2000.
- BARNES, S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J. Nutr.*, v. 125, p. 777–783, 1995.
- BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: *Flavonoids in the living cell*, VOL. 505 (B.S. Buslig; J.A.E. Manthey, eds.) pp. 61–76., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, 2002.
- BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health food sector. *Food Res. Int.*, v. 35, p. 187–193, 2002.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELÉIA, A. D. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M. C. N. Effects of genetics and environment of isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. *Pesq. agropec. Bras.*, v. 34, n. 10, p. 1787–1795, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDIGNON, J. R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesq. agropec. Bras.*, v. 35, n. 5, p. 873–878, 2000.

CHEN, L. H.; PAN, S. H. Decrease of phitates during germination of pea seeds (*Pisum sativa*). *Nutr. Rep. Int.*, v. 16, n. 1, p.125–131, 1977.

CLINE, K.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. Purification and characterization of a β -glucosyl hydrolase/transferase present in the walls of soybean cells. *Plant Physiol.*, v. 68, n. 2, p. 207–220, 1981.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 28 out. 2006.

COOPER, J. E.; RAO, J. R.; STEELE, H. L.; McCORRY, T. P. Legume flavonoids: symbiotic functions, method for identification and their metabolism by rhizobia. *Physiol. Plant.*, v. 107, p. 251–258, 1999.

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.*, v. 41, p. 1961–1967, 1993.

COWARD, L.; SMITH, M., KIRK, M., BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 68, p. 1486S–1491S, 1998.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404-427, 1964.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 28, p. 350-356, 1956.

ELDRIDGE, A. C.; KWOLEK, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food Chem.*, v. 31, p. 394–396, 1983.

EMBRAPA SOJA - TECNOLOGIAS de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2003. Disponível em:<<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acesso em: 22 abr. 2003.

ESEN, A. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. *Plant Physiol.*, v. 98, p. 174–182, 1992.

FRITZ, W. A.; COWARD, L.; WANG, J.; LAMARTINIÈRE, C. A. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis*, v. 19, n. 12, p. 2151–2158, 1998.

GRAHAM, T. L.; GRAHAM, M. Y. Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competency and defense potentiation. *Physiol. Mol. Plant Patol.*, v. 55, p. 13–20, 1999.

HISTÓRICO da soja. Disponível em: <<http://www.agropage.hpg.ig.com.br>>. Acesso em: 22 abr. 2006.

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

ISMAIL, B.; HAYES, K. β -Glycosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 4918–4924, 2005.

IZUMI, T.; PISKULA, M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Agliconas da isoflavona da soja são absorvidas mais rápido e em maiores quantias que seus glicosídeos em humanos. *J. Nutr.*, v. 130, p. 1695–1699, 2000.

KIM, W. J.; SMIT, C. J. B.; NAKAYAMA, T. O. M. The removal of oligosaccharides from soybeans. *Labensma. Wess. Technol.*, [S.1], v. 6, p. 201–204, 1973.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL). *Agric. Biol. Chem.*, v. 55, n. 9, p. 2227–2233, 1991.

LAMARTINIÈRE, C. A.; MOORE, J.; HOLLAND, M.; BARNES, S. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *P.S.E.B.M.*, v. 208, p. 120–123, 1995.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J. C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Analyt. Biochem.*, v. 264, p. 1–7, 1998.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J. C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein contents of vegetables. *British J. Nutr.*, v. 84, p. 717–725, 2000.

LIU, K. Soybeans: chemistry, technology and utilization. *IPT.*, p. 82–93, 1997.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; GIANAZZA, E.; ARNOLDI, A.; KUROWSKA, E.; CARROL, K. K.; SIRTORI, C. R. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J. Nutr.*, v. 130, p. 2543–2549, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265–275, 1951.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. *Bioquímica Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 360 p., 1999.

MATSUDA, S.; MIYAZAKI, T.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Hydrolysis of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* IFO 3425. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 74, n. 5, p. 301–304, 1992.

MATSSURA M.; OBATA, A. β -Glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. *J. Food Sci.*, v. 58, n. 1, p. 144–147, 1993.

MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on beta-glucosidase from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 59, n. 9, p. 1623–1627, 1995.

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

MESSINA, M. J.; MESSINA, V. Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 91, p. 836–840, 1991.

MORAIS, A. A. C. Uso da soja em medicina In: ANAIS DO I SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 2001, Londrina. *Anais ...* Londrina: Embrapa Soja, p. 15–18, 2001.

MOSTAFA, M. M.; RAHMA, E. H. Chemical and nutritional changes in soybean during germination. *Food Chem.*, v. 23, p. 257–275, 1987.

NIELSEN, B. L.; BROWN, L. R. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, v. 141, n. 2, p. 311–315, 1984.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de β -glicosil isoflavonas de soja em isoflavonas agliconas por β -glicosidase fúngica. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE OS BENEFÍCIOS DA SOJA PARA A SAÚDE HUMANA, 2001, Londrina, PR. *Anais...* Londrina: EMBRAPA, 2001, p. 33–36.

PHILLIPS, D. A. Flavonoids: plant signals to soil microbes. *Annu. Rev. Phytochem.*, v. 26, p. 201–231, 1992.

RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *J. Food Comp. Anal.*, v. 20, n. 1, p. 19–24, 2007.

ROSELL, M. S.; APPLEBY, P. N.; SPENCER, E. A.; KEY, T. J. Soy intake and blood cholesterol concentrations: a cross-sectional study of 1033 pré- and postmenopausal women in the Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 80, p. 1396–1396, 2004.

SANTOSH, T. R.; BALASUBRAMANIAN, K. K.; LALITHA, K. Enhancement of beta-glucosidase and beta-galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by exposure to the allelochemical mimosine. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, p. 462–467, 1999.

SAS INSTITUTE. Versão 8.2. SAS Institute, Inc., Cary, NC. 1999.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B. E.; BRASHEAR, W. T.; KIRSCHNER, A. S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J.E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J. Nutr.*, v. 131, p. 1362S–1375S, 2001.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K.; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, p. 1184–1192, 1995.

ZHANG, X.; SHU, X. O.; GAO, Y. T.; YANG, G.; LI, H.; JIN, F.; ZHENG, W. Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease risk reduction in Chinese women. *J. Nutr.*, v. 133, p. 2874–2878, 2003.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A.; SILVEIRA JUNIOR, P. *Sistema de Análise Estatística-SANEST, Registro na SEI n° 066060*. UFPEL, Pelotas, Brasil.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p.1666–1673, 1994a.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of the American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 1674–1677, 1994b.

WISEMAN, H.; CASEY, K.; CLARKE, D. B.; BARNES, K. A.; BOWEY, E. Isoflavone aglycon and glucoconjugate content of high- and low-soy U.K. foods used in nutritional studies. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 1404–1410, 2002.