



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAEL FERNANDES SANTOS

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE β -
GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA**

RAFAEL FERNANDES SANTOS

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE β -
GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro.

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237p Santos, Rafael Fernandes.
Purificação, caracterização e aplicação de β -glicosidase de cotilédones de soja /Rafael Fernandes Santos. – Londrina, 2010.
106 f. : il.

Orientador: Mara Lúcia Luiz Ribeiro.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Enzimas – Aplicações industriais – Teses. 2. Alimentos – Biotecnologia – Teses. 3. Isoflavonas – Teses. 4. Farinha de soja – Teses. I. Ribeiro, Mara Lúcia Luiz. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 664.6/.7

RAFAEL FERNANDES SANTOS

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE β -
GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Elza Iouko Ida
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Geni da Silva Varéa
UEL – Londrina – PR

Londrina, 19 de fevereiro de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais, Aparecido e Evani, por nunca medirem esforços para me proporcionar a melhor educação e qualidade de vida possível e por me apoiarem nos momentos de decisões.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mara Lucia Luiz Ribeiro, pela sua orientação, confiança, apoio e carinho durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/MEC pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro.

Às Profa. Dra. Geni da Silva Varéa e Profa. Dra. Elza Iouko Ida pelos esclarecimentos prestados durante o desenvolvimento de alguns experimentos e valiosas sugestões.

A Embrapa Soja pelo fornecimento da amostra utilizada neste trabalho.

Ao Laboratório Oswaldo Cruz -Análises Clínicas -Londrina-PR, na pessoa de João Claudio Santilli, pelas análises de glucose.

Aos docentes do Programa de Mestrado em Biotecnologia que contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico, transmitindo conhecimentos indispensáveis para a minha formação profissional.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelo atendimento em suas respectivas áreas de atuação.

Aos amigos de curso e de laboratório pela amizade que foi construída, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

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

Aprender é a única coisa que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se
arrepende.

Leonardo da Vinci

SANTOS, Rafael Fernandes. **Purificação, caracterização e aplicação de β -glicosidase de cotilédones de soja**. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A β -glicosidase (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) é uma enzima capaz de clivar as ligações β -glicosídicas de di e/ou oligosacarídeos liberando glicose e uma aglicona. Esta enzima possui inúmeras funções endógenas nos vegetais, podendo ser utilizadas na hidrólise de isoflavonas glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) em agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam ação benéfica na saúde humana, atuando no controle e prevenção de doenças crônicas. O objetivo deste trabalho foi purificar β -glicosidase de cotilédones de soja, caracterizá-la e aplicá-la em farinha de soja integral. A β -glicosidase foi extraída de farinha de cotilédones com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6, na proporção de 1:10 (p/v), com posterior acidificação com HCl 0,1 N até pH 5,0 para obtenção do extrato bruto que foi fracionado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0–40% e 40–85%. Os precipitados, ressuspenso em tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0 e os sobrenadantes foram dialisados no mesmo tampão. A fração com maior atividade de β -glicosidase (P_{40–85}) foi concentrada por ultrafiltração e aplicada em coluna de troca iônica com CM Sephadex C-50, eluída por gradiente de NaCl 0–1 M em tampão fosfato-citrato, onde foram separadas quatro frações protéicas (F₁, F₂, F₃, e F₄). A fração F₄, com maior atividade de β -glicosidase, foi aplicada em coluna de filtração em gel com Sephadex G-100, sendo separadas em três frações protéicas (F₄₁, F₄₂ e F₄₃). O processo de purificação foi acompanhado por meio de eletroforese nativa em gel de poliacrilamida. A β -glicosidase purificada foi caracterizada em relação a sua massa molecular e o efeito de íons metálicos e compostos orgânicos sobre sua atividade. A β -glicosidase purificada e parcialmente purificada foi aplicada em farinha de soja integral sob diferentes condições de tratamentos utilizando um planejamento experimental com esquema fatorial 2² com dois níveis e triplicata no ponto central onde foi avaliada a influência das variáveis tempo de incubação e concentração da enzima na liberação de glicose. A eletroforese nativa revelou uma única banda de proteína na fração F₄₂, demonstrando que o processo de purificação de β -glicosidase foi eficiente. A fração F₄₂ apresentou massa molecular de 53 kDa por filtração em gel e 33 kDa por eletroforese em condições desnaturantes. A atividade de β -glicosidase foi inibida por HgCl₂ 1 mM, glucona- δ -lactona 10 mM e glicose 150 mM em 84, 94 e 84%, respectivamente. O MnCl₂ 10 mM aumentou a atividade da enzima em 63%. A aplicação da β -glicosidase em farinha de soja integral mostrou-se eficiente na liberação de glicose e consequentemente na liberação de isoflavonas agliconas, sendo os melhores resultados obtidos com 6 horas de incubação, independente da concentração de enzima utilizada. A β -glicosidase purificada mostrou-se mais ativa na liberação de glicose em relação à parcialmente purificada.

Palavras-chave: β -glicosidase. Cotilédones de soja. Purificação e caracterização. Aplicação.

SANTOS, Rafael Fernades. **Purification, characterization and application of β -glucosidase of soybean cotyledons.** 2010. 106 f. Dissertation (Master's degree in Biotenology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

β -glucosidase (β -D-glycoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) is able to cleave di-and/or oligosaccharides β -glucoside linkages releasing glucose and aglycones. This enzyme has many functions in plants and it can be used for hydrolysis of glucosidic isoflavones (genistin, daidzin and glicitin) in aglycones (genistein, daidzein and glycitein) that have a beneficial effect on human health, acting in the control and prevention of chronic diseases. The objectives of this work was purify β -glucosidase from cotyledons of soybean, characterize it and apply it in soybean meal. β -glucosidase was extracted from cotyledons meal with 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6,6, at a ratio of 1:10 (w/v) and subsequent acidification with 0,1 N HCl to pH 5,0 to obtain the crude extract that was fractionated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 0–40% and 40–85%. The pellet was dissolved in phosphate citrate buffer 50 mM, pH 5,0, and the supernatants were dialysed in the same buffer. The fraction with highest β -glucosidase activity (P_{40-85}) was concentrated by ultrafiltration and loaded onto an ion exchange CM Sephadex C50 chromatography column, eluted with a 0–1 M NaCl gradient in 50 mM phosphate citrate buffer, separating four protein fractions (F_1 , F_2 , F_3 and F_4). F_4 fraction that showed the highest β -glucosidase activity was loaded onto a gel filtration Sephadex G-100 column, separating three other protein fractions (F_{41} , F_{42} and F_{43}). The purification process was monitored by electrophoresis in native polyacrylamide gel. The purified β -glucosidase was characterized for its molecular weight and the effect of metal ions and organics compounds on its activity. Purified and partially purified β -glucosidase was applied to soybean meal under different treatments through an experimental 2^2 factorial design with two levels and three replicates at the central point, to evaluate the effect of incubation time and enzyme concentration in the release of glucose. Native electrophoresis revealed a single protein band in fraction F_{42} , demonstrating that β -glucosidase purification was efficient. F_{42} fraction showed a molecular mass of 53 kDa by gel filtration and 33 kDa by electrophoresis under denaturing conditions. β -glucosidase activity was inhibited by 1mM HgCl_2 , 10 mM glucono- δ -lactone and 150 mM glucose at 84, 94 e 84%, respectively, while 10 mM MnCl_2 increased the enzyme activity by 63%. The application of β -glucosidase in soybean meal demonstrated that the enzyme was efficient in releasing glucose. The best results were obtained with a period of 6 hours of incubation, independent of enzyme concentration. The purified β -glucosidase fraction demonstrated higher activity in glucose release than the partially purified.

keywords: β -glucosidase. Soybean cotyledons. Purification and characterization. Application.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura química das isoflavonas agliconas presentes na soja	18
Tabela 2 – Estrutura química das isoflavonas β -glicosídicas e conjugadas presentes na soja	18
Tabela 3 – Etapas de purificação e caracterização bioquímica de β -glicosidases vegetais	31
Tabela 4 – Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2 (resolução full).....	46
Tabela 5 – Planejamento fatorial 2^2 para duas variáveis independentes em dois níveis de variação (-1 e +1) e três repetições do ponto central (0).....	46
 Artigo A	
Tabela 1 – Fases de purificação de β -glicosidase de cotilédones de soja por cromatografia de troca iônica e filtração em gel	56
Tabela 2 – Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos na atividade da β -glicosidase	62
 Artigo B	
Tabela 1 – Fatores e níveis do planejamento experimental.....	77
Tabela 2 – Planejamento experimental com esquema fatorial 2^2 para duas variáveis independentes em dois níveis de variação (-1 e +1) e três repetições do ponto central (0).....	77
Tabela 3 – Resultados obtidos utilizando a β -glicosidase parcialmente purificada	78
Tabela 4 – Efeitos das variáveis independentes sobre a variável dependente utilizando β -glicosidase parcialmente purificada	79
Tabela 5 – Resultados obtidos utilizando a β -glicosidase purificada.....	82
Tabela 6 – Efeitos das variáveis independentes sobre a variável dependente utilizando β -glicosidase purificada.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral da isoflavona aglicona	17
Figura 2 – Estrutura geral das isoflavonas β -glicosídicas e conjugadas.....	18
Figura 3 – Via de biossíntese de flavonóides	19
Figura 4 – Comparação da estrutura do metabólito equol de isoflavona com o hormônio endógeno 17 β -estradiol.....	22
Figura 5 – Estruturas das isoflavonas da soja e possíveis transformações por clivagem dos conjugados	27
Figura 6 – Fluxograma de obtenção da β -glicosidase purificada e parcialmente purificada de cotilédones de soja	40
 Artigo A	
Figura 1 – Cromatografia de troca iônica com CM Sephadex C50 da fração P ₄₀₋₈₅ , proveniente do extrato de cotilédones de soja, eluída com gradiente linear de NaCl 0–600 mM em tampão fosfato citrato 50 mM, com fluxo de 27 mL h ⁻¹	57
Figura 2 – Cromatografia de filtração em gel com Sephadex G100 da fração F ₄ , eluída em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0, com fluxo de 17 mL h ⁻¹ . Vo = 131,1 mL	58
Figura 3 – Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida das diferentes fases de purificação da β -glicosidase de cotilédones de soja.....	59
Figura 4 – SDS-PAGE em gel de poliacrilamida da enzima β -glicosidase purificada de cotilédones de soja. (A) Padrões de massa molecular conhecidas. (B) β -glicosidase purificada	60
Figura 5 – Efeito da concentração da glicose sobre a atividade da β -glicosidase de cotilédones de soja	63

Artigo B

Figura 1 – Superfícies de resposta utilizando β -glicosidase parcialmente purificada. (A) sem tratamento; (B) banho-fervente (100°C)/1h; (C) autoclavada.....	80
Figura 2 – Superfície de resposta utilizando β -glicosidase purificada	84

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	ISOFLAVONAS DA SOJA	17
3.1.1	Estrutura Química	17
3.1.2	Biossíntese de Isoflavonas	18
3.1.3	Ocorrência das Isoflavonas	20
3.1.4	Isoflavonas e os Benefícios à Saúde	20
3.1.5	Forma Química e a Biodisponibilidade das Isoflavonas	23
3.1.6	Transformações de Isoflavonas	25
3.2	β -GLICOSIDADE	28
3.2.1	β -glicosidases Vegetais	29
3.2.2	Aplicação das β -glicosidases	33
3.2.2.1	Aplicação da β -glicosidade em produtos de soja	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	MATERIAL	37
4.1.1	Matéria-prima	37
4.1.1.1	Preparo da matéria-prima	37
4.1.2	Reagentes	37
4.2	MÉTODOS ANALÍTICOS	38
4.2.1	Determinação da Atividade de β -glicosidase	38
4.2.2	Determinação de Proteínas Solúveis	38
4.2.3	Determinação da Atividade Específica de β -glicosidase	39
4.3	PURIFICAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA	39
4.3.1	Extração de β -glicosidase	39
4.3.2	Fracionamento com Sulfato de Amônio	41
4.3.3	Cromatografia de Troca Iônica	41

4.3.4	Cromatografia de Filtração em Gel	42
4.3.5	Ensaio de Homogeneidade por PAGE-nativa	42
4.4	CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE.....	43
4.4.1	Estimativa da Massa Molecular de β -glicosidase por Filtração em Gel	43
4.4.2	Estimativa da Massa Molecular de β -glicosidase por SDS-PAGE	44
4.4.3	Efeito de Íons Metálicos e Compostos Orgânicos na Atividade de β - glicosidase	44
4.4.4	Efeito da Glicose na Atividade de β -glicosidase.....	45
4.5	APLICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE PURIFICADA E PARCIALMENTE PURIFICADA EM FARINHA DE SOJA INTEGRAL	45
4.5.1	Tratamento da Farinha de Soja Integral (FSI).....	45
4.5.2	Aplicação da β -glicosidase Parcialmente Purificada em FSI.....	45
4.5.3	Aplicação da β -glicosidase Purificada em FSI.....	47
4.5.4	Análises Estatísticas	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO A	49
5.2	ARTIGO CIENTÍFICO B.....	78
5.3	TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS	92
	CONCLUSÕES.....	99
	REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

As isoflavonas, ou isoflavonóides, são compostos fenólicos pertencentes à classe dos fitoestrógenos, com teor superior nas leguminosas, em particular, na soja, onde são encontradas em três tipos com quatro estruturas químicas distintas: as agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína), as glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) e as conjugadas acetil e malonilglicosídicas.

A procura por alimentos derivados de soja tem aumentado devido à divulgação dos benefícios à saúde atribuídos ao consumo desta leguminosa. Evidências científicas indicam que as isoflavonas podem atuar no controle e prevenção de doenças crônicas como câncer de mama, próstata e cólon, osteoporose, perda óssea pós-menopausa e doenças cardiovasculares.

Estudos clínicos demonstram que as isoflavonas agliconas são absorvidas mais rapidamente e em maior quantidade em relação as suas formas glicosídicas. Muitos produtos a base de soja são comercializados, sendo que os produtos não fermentados apresentam maior teor de isoflavonas glicosídicas, enquanto que nos produtos fermentados há predominância das formas aglicona.

As isoflavonas podem sofrer transformações durante o processo de fabricação de ingredientes e alimentos à base de soja, havendo conversão parcial das formas esterificadas para as formas glicosídicas e agliconas. O aquecimento promove a conversão das formas malonil glicosídicas a acetil glicosídicas enquanto que as β -glicosidases, presentes naturalmente na soja ou produzidas por microrganismos inoculados em produtos fermentados, podem hidrolisar os β -glicosídeos, liberando glicose e agliconas.

A β -glicosidase (β -D-glicosídeos glicohidrolase, EC 3.2.1.21) pertence a um grupo de hidrolases capazes de clivar as ligações β -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos. Esta enzima, amplamente distribuída na natureza, tem papel fundamental em muitos processos biológicos como a degradação de biomassa celulósica, hidrólise de glicolipídeos, cianogênese e modificação de metabólitos secundários, como as isoflavonas.

Considerando a importância das isoflavonas agliconas na saúde humana, o objetivo deste trabalho foi purificar a β -glicosidase de cotilédones de soja, caracterizá-la e avaliar a sua aplicação em farinha de soja integral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Purificar a β -glicosidase de cotilédones de soja, caracterizá-la e avaliar a sua aplicação em farinha de soja integral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extrair e purificar a β -glicosidase de cotilédones de soja utilizando o fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e cromatografia de filtração em gel.

Determinar a massa molecular da β -glicosidase purificada nas formas nativa e desnaturada e o efeito de íons metálicos e compostos orgânicos sobre a atividade, utilizando técnicas de eletroforese e espectrofotometria.

Aplicar a β -glicosidase purificada e parcialmente purificada em farinha de soja integral para obtenção de um produto contendo maior teor isoflavonas agliconas, utilizando metodologia de superfície de resposta.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta originária da China há 4000-5000 anos, sendo uma das culturas mais antigas do oriente. Durante esse período, os chineses transformaram os grãos de soja em vários alimentos e estes têm sido utilizados na nutrição até o presente, tendo um papel importante na formação da cultura e da civilização chinesa (LIU, 1997).

A soja é o principal grão oleaginoso produzido no mundo. Sua produção mundial na safra 2008/2009 foi de 210,6 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos o maior produtor mundial do grão, com 80,5 milhões de toneladas, seguido pelo Brasil com 57,1 milhões de toneladas. No Brasil, os maiores produtores de soja são os estados do Mato Grosso e Paraná, com 17,963 e 9,510 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2009). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2009), a estimativa da produção brasileira para a safra de 2009/2010 é de 62,5 a 63,6 milhões de toneladas de soja. O Brasil tem possibilidade de ser o maior produtor de soja, devido às limitações de área para expansão nos demais países produtores e pelo domínio tecnológico que possui para produzir em regiões tropicais com baixas latitudes (DALL'AGNOL et al., 2007).

A soja é um grão conhecido por seu teor elevado de óleo e proteínas. Possui 40% de proteínas, 20% de óleo, 35% de carboidratos e 5% de cinzas em relação ao seu peso seco (LIU, 1997).

Os chineses e outros orientais, incluindo os japoneses, coreanos e asiáticos, usam esse grão em várias formas como uma fonte importante de proteínas para a dieta, além de fonte de óleo. Porém, há uma diferença distinta da forma como os povos orientais e ocidentais utilizam a soja. No oriente, a soja é utilizada na produção de alimentos não fermentados como o tofu, leite de soja e fermentados como miso, natto e tempeh (LIU, 1997). No sudeste da Ásia, a soja representa 20–60% da ingestão de proteínas diárias (BRANDI, 1997).

No ocidente, o consumo de soja foi inicialmente direcionado para a extração de óleo e ração animal. O consumo desta leguminosa e de seus derivados em países europeus e nos Estados Unidos vem crescendo (PARK et al., 2001a). No Brasil, em 2006, cerca de 60% do farelo de soja foi destinado à exportação e os 40% restantes utilizados no consumo interno.

Somente 2,7 milhões de toneladas de semente foram utilizadas na alimentação humana (EMBRAPA, 2009).

Na dieta humana, a soja é consumida na forma de grão e de alimentos elaborados a partir destes como tofu, miso e tempeh. Os derivados protéicos de soja como as farinhas desengorduradas, texturizados, concentrados e isolados protéicos são também utilizados na produção de diversos alimentos industrializados como produtos cárneos, de panificação, molhos e sopas (GENOVESE; LAJOLO, 2001). A proteína de soja apresenta propriedades como capacidade de retenção de água, emulsificação, gelatinização e formação de espuma. Assim, sua adição em produtos industrializados reduz custos e melhora características como uniformidade, textura e suculência (MORAES et al., 2009).

Nos últimos anos, a procura por alimentos derivados de soja tem aumentado devido a divulgação dos benefícios à saúde atribuídos ao consumo desta leguminosa. O FDA (U.S. Food and Drug Administration) em outubro de 1999, aprovou a alegação de que a ingestão de 25 g de proteínas de soja por dia, associada a uma dieta com baixa quantidade de gordura saturada e colesterol pode reduzir o risco de doenças coronarianas. Pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de determinar os compostos funcionais da soja que estão relacionados a este fato. Entre estes compostos, as isoflavonas são as mais investigadas devido à possibilidade dos seus efeitos benéficos (ISMAIL; HAYES, 2005).

A presença de compostos bioativos, relacionados aos efeitos biológicos da soja, apresentam um grande potencial no mercado de alimentos funcionais. Conforme a resolução nº 18 de 30/04/1999, da Agência de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil – ANVISA, que dá as diretrizes para a alegação de alimento funcional, define alimento funcional como *“todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”* (BRASIL, 1999). Segundo a ANVISA (2010), para os produtos à base de soja, as alegações de propriedade funcional e ou de saúde em função da proteína de soja são permitidas, sendo que os dizeres de rotulagem e o material publicitário destes produtos não podem veicular qualquer alegação em função das isoflavonas, seja de conteúdo (“contém”), funcional, de saúde e terapêutica (prevenção, tratamento e cura de doenças), já que as isoflavonas não são registradas como alimentos.

3.1 ISOFLAVONAS DA SOJA

3.1.1 Estrutura Química

As isoflavonas, também denominadas isoflavonóides, são compostos fenólicos derivados dos flavonóides, pertencentes à classe dos fitoestrógenos e estão amplamente distribuídas no reino vegetal (ESTEVES; MONTEIRO, 2001). A estrutura básica das isoflavonas (Figura 1) é formada pelo núcleo flavona, que é composto por 2 anéis benzeno (A e B) ligados por um anel heterocíclico pirano (C) (LIU, 1997; MESSINA, 1999). O sistema de numeração utilizado para diferenciar as posições dos carbonos ao redor da molécula dos isoflavonóides, por conveniência, é o numeral ordinal para os anéis A e C, sendo estes seguidos de apóstrofo para o anel B.

As isoflavonas da soja são encontradas em quatro estruturas químicas distintas: as agliconas genisteína, daidzeína e gliciteína, as β -glicosídicas genistina, daidzina e glicitina, as acetil glicosídicas 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina e as malonil glicosídicas 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina. As formas β -glicosídicas (Figura 2) apresentam uma molécula de glicose ligada na posição 7 do anel benzeno, e nas agliconas este açúcar está ausente (LIU, 1997). As formas conjugadas são esterificadas no carbono 6 da molécula de glicose. Os tipos de isoflavonas são caracterizados conforme os radicais ligados à estrutura básica da molécula (Tabelas 1 e 2)

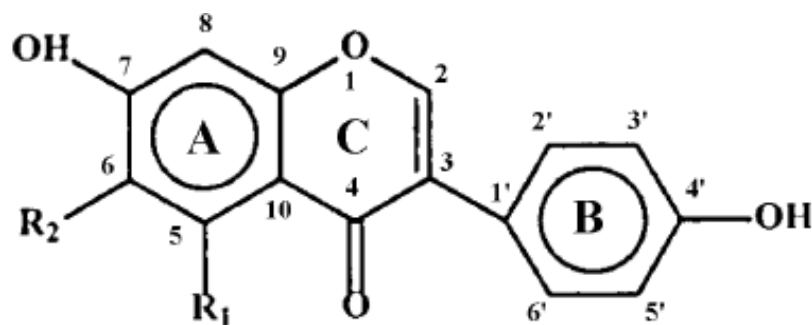


Figura 1 – Estrutura geral da isoflavona aglicona

Fonte: Adaptado de Liu (1997).

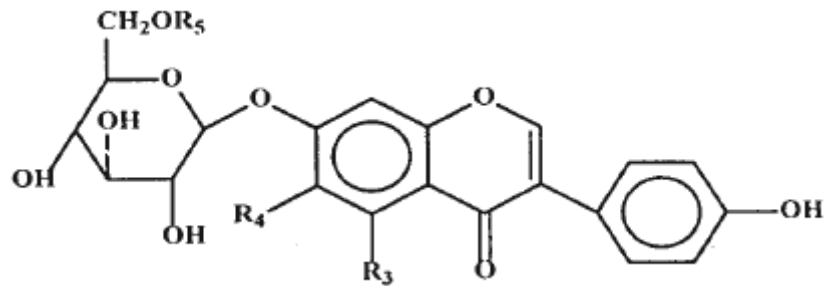


Figura 2 – Estrutura geral das isoflavonas β -glicosídicas e conjugadas
 Fonte: Liu (1997).

Tabela 1 – Estrutura química das isoflavonas agliconas 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 -glicosídicas e conjugadas presentes na soja.

Isoflavona	R ₃	R ₄	R ₅
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

3.1.2 Biossíntese de Isoflavonas

Os isoflavonóides são formados pela via de biossíntese dos flavonóides (Figura 3), iniciando com a conversão da fenilalanina ou tirosina em ácido cinâmico pela

fenilalanina amônia liase. Na seqüência, reações são catalisadas pela ácido cinâmico 4-hidrolase, formando o ácido 4-hidroxil cinâmico (ácido ρ -cumárico), que pela ação da ácido ρ -cumárico CoA ligase libera o ρ -cumariol CoA. Três moléculas de malonil CoA reagem com uma molécula de ρ -cumariol CoA formando a chalcona, que pode ser isomerizada pela chalcona isomerase, originando as flavanonas, como a 5,7,4'-trihidroxil flavanona, também conhecida como 2S-naringenina. A formação das isoflavonas está associada à ação da isoflavona sintase, que transforma as flavononas naringenina e liquiritigenina em isoflavonas genisteína e daidzeína, respectivamente (AGUIAR, 2004; MORAES et al., 2009).

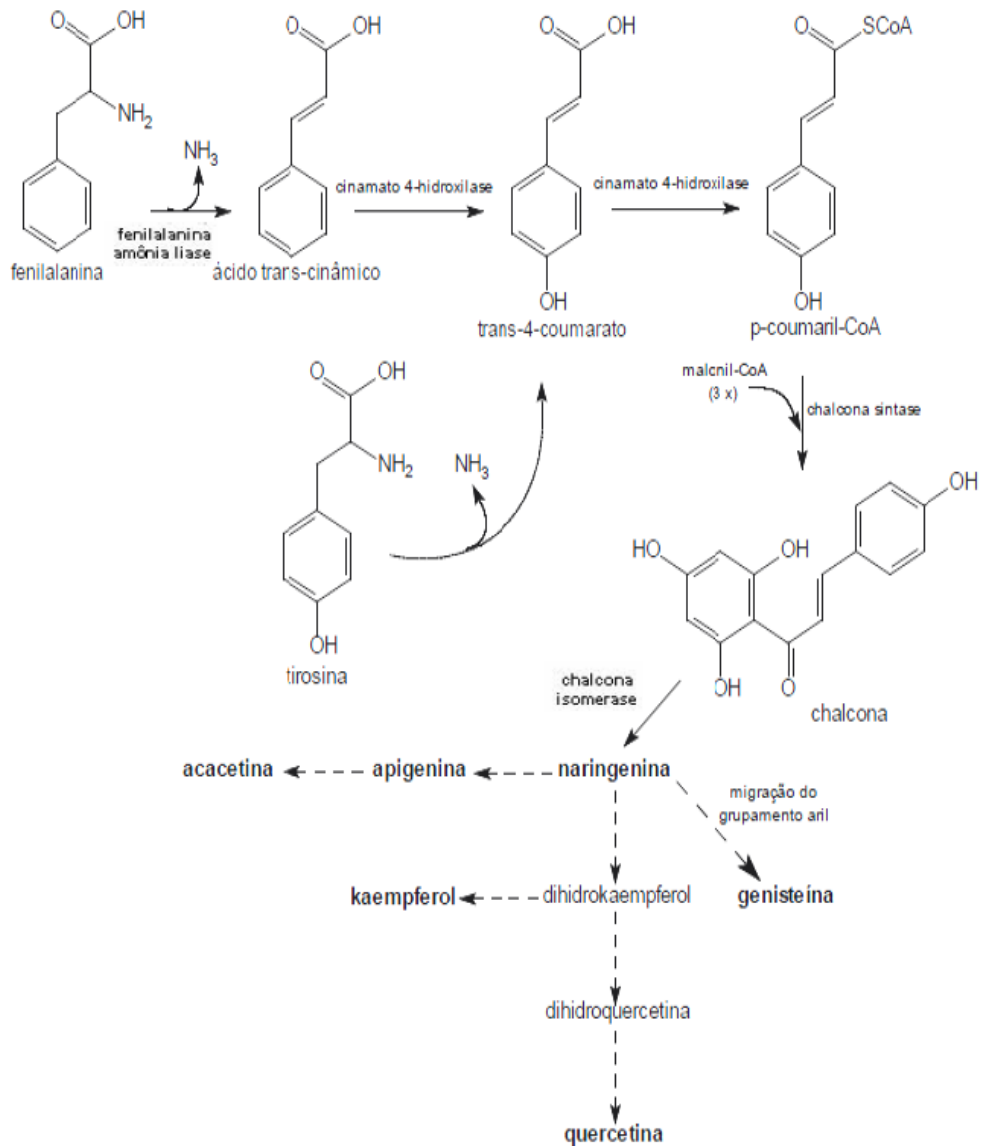


Figura 3 – Via de biossíntese de flavonoides

Fonte: Adaptado de Aguiar (2004)

3.1.3 Ocorrência das Isoflavonas

Embora os flavonóides sejam encontrados em várias famílias de plantas e em diversos tecidos, as isoflavonas estão presentes em apenas algumas famílias de vegetais, devido a distribuição limitada da chalcona isomerase (Figura 3) (COWARD et al., 1993).

Segundo Kaufman et al. (1997), genisteína e daidzeína são encontradas em muitas partes vegetativas de leguminosas como a *Psoralea corylifolia* (planta medicinal indiana), *Pueraria lobata* (planta nativa do Japão), *Vicia faba* (fava), *Glycine max* (soja), *Pisum sativum* (ervilha), *Cicer arietinum* (grão de bico), *Phaseolus aureus* (broto de feijão), *Phaseolus lunatus* (feijão fava), entre outros. O teor destes compostos é superior nas leguminosas e, em particular, na soja (ESTEVES; MONTEIRO, 2001), onde estão presentes em toda a planta, incluindo as sementes, folhas, caule e raiz (CHANG, 2002).

O teor de isoflavonas varia segundo sua parte morfológica como cotilédone, hipocótilo e casca, variedade (fatores genéticos) e condições ambientais de cultivo como temperatura e umidade (MORAES et al., 2009).

Ribeiro et al. (2006) analisaram o teor de isoflavonas da cultivar de soja BRS 213. O teor total de isoflavonas no hipocótilo ($10,71 \text{ mg g}^{-1}$) foi vinte e cinco vezes maior do que nos cotilédones ($0,42 \text{ mg g}^{-1}$). Resultados semelhantes foram encontrados por Yuan et al. (2009) que analisaram o teor de isoflavonas no cotilédone, hipocótilo e casca. A concentração total de isoflavonas foi de $12,39 \text{ mg g}^{-1}$ no hipocótilo, $1,59 \text{ mg g}^{-1}$ no cotilédone e $0,01 \text{ mg g}^{-1}$ na casca. Os resultados indicaram que o hipocótilo foi a melhor fonte de isoflavonas.

3.1.4 Isoflavonas e os Benefícios à Saúde

A capacidade de alguns alimentos derivados de plantas em reduzir o risco de doenças crônicas tem sido associada, em parte, à presença de metabólitos secundários, os fitoquímicos. Estes metabólitos têm baixo potencial como compostos bioativos quando comparados aos fármacos, porém, quando ingeridos regularmente e em quantidades

significativas, como parte da dieta, apresentam efeito fisiológico em longo prazo. Os fitoquímicos que estão presentes na dieta, e que têm sido associados aos benefícios à saúde incluem glucosinolatos, terpenóides como carotenóides, monoterpenos e fitoesteróis, e diversos grupos de polifenóis como antocianinas, flavonas, isoflavonas e outros (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007).

Segundo a ANVISA (2010), as evidências científicas sobre os efeitos das isoflavonas permitem reconhecer, até o momento, como viável apenas o seu uso para o alívio das ondas de calor associadas à menopausa e no auxílio da redução dos níveis de colesterol, sendo que as demais alegações das isoflavonas não têm comprovação científica suficiente para justificar o seu uso.

As isoflavonas são também estudadas por seu papel na prevenção e tratamento de doenças crônicas, como câncer de mama, próstata e cólon, na redução de riscos de doenças cardiovasculares (ESTEVES; MONTEIRO, 2001; MESSINA, 1999; NESTEL, 2004), na perda óssea pós-menopausa (ESTEVES MONTEIRO, 2001) e na prevenção da osteoporose (ANDERSON; GARNER, 1997). Segundo Faraj e Vasanthan (2004), mais estudos de longa duração, especialmente estudos clínicos, devem ser realizados para confirmar ou reprovocar os efeitos benéficos das isoflavonas presentes nos alimentos de soja na prevenção e no tratamento de doenças crônicas.

Os mecanismos de prevenção que as isoflavonas exercem parece depender das suas propriedades estrogênicas e antiestrogênicas. Desta forma, elas podem não ter nenhum efeito, ter um efeito estrogênico ou antiestrogênico ou ainda um efeito não-estrogênico sobre os tecidos com resposta ao estrogênio (BRANDI, 1997).

Segundo Brouns (2002), a produção de estrogênio pela mulher diminui durante e depois da meia-idade. Os estrogênios naturais podem compensar parcialmente o declínio dos níveis de estrogênio endógeno. A ação estrogênica e anti-estrogênica está relacionada com a estrutura química das isoflavonas. As isoflavonas possuem estrutura química semelhante à dos estrógenos tais como o 17 β -estradiol, o principal hormônio feminino (Figura 4). Desta forma, as isoflavonas se comportam de maneira similar aos estrógenos.

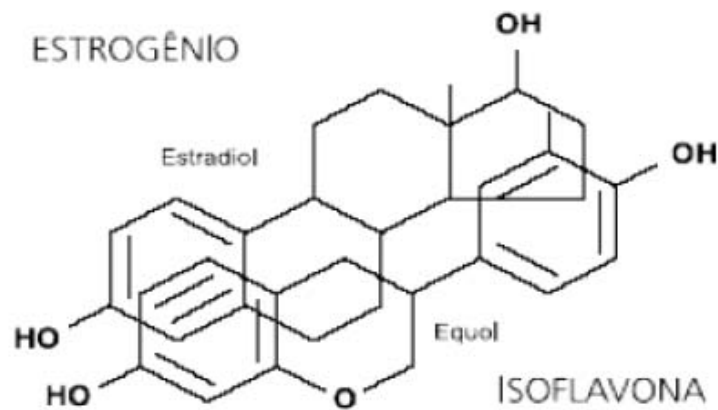


Figura 4 – Comparação da estrutura do metabólito equol de isoflavona com o hormônio endógeno 17 β -estradiol

Fonte: Adaptado de Setchell; Cassidy (1999).

As isoflavonas, assim como o hormônio feminino estrogênio, se ligam a receptores de estrogênio nas células de diferentes órgãos do corpo humano. A afinidade do estrogênio de plantas é, no entanto, menor do que a do estrogênio produzido pelo organismo humano. As células possuem dois tipos de receptores de estrogênio, denominados α e β . O estrogênio humano tem afinidade aos receptores α , enquanto que as isoflavonas aos receptores β (BROUNS, 2002).

A estrutura molecular da genisteína e do 17 β -estradiol são semelhantes em muitos aspectos. A distância intramolecular entre os grupos hidroxila em cada extremidade das moléculas são quase idênticas. Estas distâncias determinam a interação por pontes de hidrogênio com os aminoácidos dos sítios de ligação dos receptores de estrogênio (VAYA; TAMIR, 2004).

As isoflavonas têm apresentado atividade antimicrobiana (DIXON; FERREIRA, 2002; HSIEH; GRAHAM, 2001) e antioxidante. A capacidade antioxidante das isoflavonas foi relacionada ao número de hidroxilas presentes em sua estrutura química (BARBOSA et al., 2006), localizados em várias regiões dos anéis A e B. Esta atividade está ligada à inativação de radicais livres do organismo, defendendo-o contra a ação prejudicial desses compostos que promovem o envelhecimento (BROUNS, 2002).

As isoflavonas agem efetivamente contra células cancerígenas hormônio-dependentes e hormônio-independentes. É interessante que essas moléculas podem influenciar diretamente na atividade de enzimas sem atuar por meio dos receptores de estrogênio. O efeito bioquímico não-estrogênico de inibição da enzima tirosina quinase, que está

relacionada com a regulação do crescimento, diferenciação e apoptose celular, é responsável pela ação anticarcinogênica das isoflavonas (BRANDI, 1997; MESSINA, 1999). Segundo Park et al. (2001b), entre as isoflavonas, a genisteína tem sido mencionada como a forma mais potente que consegue inibir o crescimento de células cancerígenas.

A suplementação com fitoestrógenos tem uma vantagem prolongada sobre a retenção de massa óssea. Essas moléculas poderiam ser utilizadas para promover a saúde óssea em mulheres adultas jovens, bem como para retardar ou prevenir a osteoporose nas mulheres pós-menopáusicas (ANDERSON; GARNER, 1997).

3.1.5 Forma Química e a Biodisponibilidade das Isoflavonas

A forma química das isoflavonas é de grande importância, considerando que ela influencia na atividade biológica e na biodisponibilidade das isoflavonas (SETCHELL; CASSIDY, 1999).

Na soja, a maioria das isoflavonas estão na forma β -glicosídica, acetilglicosídica e malonilglicosídica e em menor quantidade na forma aglicona (XIE et al., 2003). Ribeiro et al. (2007) analisaram o teor de isoflavonas em 18 cultivares de soja de diferentes grupos de maturidade cultivadas nas mesmas condições. Os resultados indicaram uma predominância das formas malonilglicosídicas (67%), enquanto que as formas β -glicosídicas e agliconas representaram 31% e 2% do total de isoflavonas.

Yuan et al. (2009) analisando o teor de isoflavonas no cotilédone e no hipocótilo, também observaram a predominância da forma malonilglicosídica tanto no cotilédone quanto no hipocótilo ($1,11 \text{ mg g}^{-1}$ e $8,56 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente). O teor de malonilglicosídeos foi de 69,1 e 69,4% do total de isoflavonas no hipocótilo e cotilédones.

Góes-Favoni et al. (2004) analisaram a teor de isoflavonas em produtos comerciais de soja. Em relação a farinha integral de soja, foi encontrado um maior teor de malonilglicosídeos, porém, quando esta farinha passou por um tratamento térmico, o teor de β -glicosídeos e agliconas aumentaram, enquanto que de malonilglicosídeos diminuíram.

Segundo Pham e Shah (2009), mais da metade das isoflavonas do leite de soja estão na forma malonilglicosídicas, com predominância da forma malonilgenistina (67,23

mg/100 g). A forma acetilglicosídica representa o segundo maior grupo de isoflavonas. No leite de soja foi encontrado um baixo teor de isoflavonas agliconas (4,50 mg/100 g).

A proteína texturizada de soja apresentou um elevado teor de acetilglicosídeos (17% do total) em relação ao grão de soja (1% do total) segundo estudos de Barbosa et al. (2006), e isso está associado ao processo de extrusão durante o processamento do grão. Porém, a forma predominante foi a malonilglicosídica com 35,5% do total. Assim, a distribuição das formas e o teor total de isoflavonas nos produtos de soja variam em função das condições de processamento (BARBOSA et al., 2006; GÓES-FAVONI et al., 2004; LUI et al., 2003).

Em relação à absorção das isoflavonas em humanos, as pesquisas mostram que a forma aglicona é absorvida mais rapidamente do que as isoflavonas glicosídicas. Izumi et al. (2000) observaram que após a ingestão de baixo teor (0,11 mmol) de isoflavonas agliconas e glicosídicas, seus níveis séricos máximos foram observados em 2 e 4 h, sendo que a concentração das formas agliconas foi duas vezes superior às formas glicosídicas. Setchell et al. (2001) observaram que os níveis séricos máximos para genisteína e daidzeína foram em 5,2 e 6,6 h, enquanto que suas formas glicosídicas correspondentes, foram em 9,3 e 9 h. Kano et al. (2006) investigaram, em adultos, a absorção, excreção e metabolismo das diferentes isoflavonas do leite de soja tratado com β -glicosidase e sem tratamento. Os resultados indicaram que as isoflavonas agliconas foram absorvidas mais rapidamente e em maiores quantidades do que suas formas glicosídicas. As diferenças entre as formas de isoflavonas podem afetar a velocidade de absorção sem necessariamente afetar a absorção total (MESSINA, 1997).

A biodisponibilidade das isoflavonas, ou seja, a quantidade de isoflavona que é encontrada inalterada a circulação sistêmica após a ingestão, segundo Setchell et al. (2001) é maior para a isoflavonas glicosídicas do que para a suas agliconas correspondentes, sendo que a fração glicosídica pode atuar protegendo e prevenindo a biodegradação da estrutura da isoflavona. Zubik e Meydani (2003) relataram que a biodisponibilidade das agliconas genisteína e daidzeína não foi diferente quando consumidas na sua forma glicosilada.

Setchell et al. (2002) e Xie et al. (2003) concluíram que as isoflavonas glicosídicas não são absorvidas diretamente pelo organismo e sua biodisponibilidade está relacionada com a hidrólise destas formas pelas β -glicosidases intestinais para posterior absorção. A biodisponibilidade das isoflavonas de soja é influenciada por um intestino

saudável, com a microflora capaz de converter estas isoflavonas às suas formas ativas. A administração de antibióticos elimina as bactérias intestinais e impedem que suas enzimas hidrolíticas convertam as isoflavonas em moléculas sem açúcar, bloqueando seu metabolismo no lúmen intestinal (SETCHELL et al., 1998).

As isoflavonas agliconas podem ser absorvidas ou metabolizadas por bactérias intestinais e produzir metabólitos específicos, tais como equol e/ou O-desmetilangolensina (ODMA) a partir da daidzeína e ρ -etilfenol a partir da genisteína (SETCHELL, 2000). A atividade biológica das isoflavonas pode ser afetada por seu metabolismo, que pode gerar metabólitos inativos, como o ρ -etilfenol (MESSINA, 1997) e ativos como o equol.

A formação de equol a partir da daidzeína é de grande relevância no estudo da atividade biológica das isoflavonas, uma vez que este é um antioxidante mais potente do que as demais isoflavonas. Seu potencial estrogênico é cerca de dez vezes superior e o seu tempo de permanência na circulação é maior do que de seu precursor, podendo ser detectado na urina até 5 dias após a ingestão de alimentos de soja, enquanto que as isoflavonas são totalmente excretadas em até 48 horas. Entretanto, apenas 30% da população adulta é capaz de metabolizar o equol a partir de daidzeína, fato atribuído às diferenças na microbiota intestinal. Dietas ricas em probióticos como carboidratos e fibras favorecem a fermentação no intestino, aumentando a produção de equol. Assim, a ingestão de frutooligossacarídeos, por exemplo, aumentam a hidrólise de daidzina a daidzeína por promover o crescimento de bifidobactérias produtoras de β -glicosidase, liberando dessa forma maior quantidade de substrato para a produção de equol (MORAES et al., 2009).

3.1.6 Transformações de Isoflavonas

A possibilidade de prevenir e combater doenças por meio da dieta tem atraído a atenção, tanto da comunidade científica como das indústrias alimentícias, com o objetivo comum de desenvolver alimentos funcionais ou alimentos ricos em um ou mais compostos bioativos que apresentem efeitos positivos na saúde. Devido a este fato, os derivados protéicos de soja, como farinhas desengorduradas, isolados, concentrados e

texturizados protéicos são amplamente utilizados na indústria alimentícia (BARBOSA et al., 2006).

O consumo de alimentos a base de soja, ricos em isoflavonas agliconas, pode ser mais efetivo do que o consumo de produtos ricos em isoflavonas glicosídicas na prevenção de doenças crônicas. Os produtos fermentados de soja contêm predominantemente isoflavonas agliconas, enquanto que em produtos não fermentados estão presentes principalmente nas formas β -glicosídicas conjugadas (LIU, 1997). Desta forma, é importante a transformação das isoflavonas glicosídicas em agliconas nos produtos não fermentados de soja.

As isoflavonas podem sofrer transformações durante o processo de fabricação de ingredientes e alimentos à base de soja, havendo conversão parcial das formas esterificadas para as formas glicosiladas e agliconas. Os processos térmicos, químicos ou enzimáticos estão envolvidos nestas transformações e os produtos podem ser observados na Figura 5.

Segundo Pham e Shah (2009), nos últimos anos muitos pesquisadores citaram a transformação de isoflavonas glicosídicas em agliconas por hidrólise química e fermentação microbiana. A transformação por hidrólise química pode ser realizada usando uma base e um ácido. A ligação éster entre o grupamento acetil e malonil com a fração β -glicosídica é hidrolizada por uma base e a ligação entre fração aglicona e glicose, por um ácido. A hidrólise ácida foi utilizada por Genovese e Lajolo (2001) para obtenção de isoflavonas agliconas, sendo que para a hidrólise total das isoflavonas foi necessário um refluxo de 2 h com HCl 2N em banho de água fervente. Porém, nessas condições as isoflavonas foram degradadas, sendo essa técnica considerada inadequada.

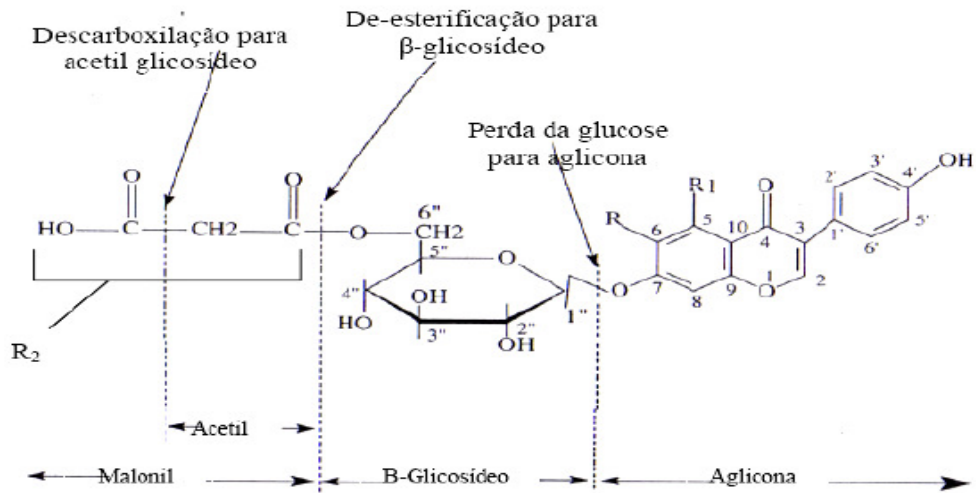


Figura 5 – Estruturas das isoflavonas da soja e possíveis transformações por clivagem dos conjugados
 Fonte: Faraj;Vasanthan (2004)

A extrusão com altas temperaturas e pressão favorecem a desesterificação dos conjugados malonilglicosídicos e formação de β-glicosídeos (WANG; MURPHY, 1996). Aparentemente, os conjugados malonilglicosídicos são termicamente instáveis e são convertidos as suas formas glicosídicas correspondentes em altas temperaturas (LIU, 1997). Park et al. (2002) observaram uma redução média de 17,6 vezes no teor de malonil isoflavonas e um aumento nas concentrações de glicosil isoflavonas na extração de isoflavonas após tratamento térmico a 121°C por 40 min. Yuan et al. (2009) analisaram a mudança no perfil de isoflavonas no hipocótilo e cotilédones de soja durante o tratamento térmico em diferentes temperaturas. Os resultados mostraram que a forma malonilglicosídica na soja foi instável, sendo convertida nas formas acetilglicosídicas e β-glicosídicas, mais estáveis, através da descarboxilação e desesterificação. A forma malonilglicosídica não foi mais detectada após 25 min a 150°C e 60 min a 130°C.

As β-glicosidases, presentes naturalmente na soja ou produzidas por microrganismos inoculados em produtos fermentados, podem hidrolisar os β-glicosídeos, liberando glicose e agluconas (WANG; MURPHY, 1996).

3.2 β -GLICOSIDASE

A β -glicosidase (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) catalisa a hidrólise de ligações β -glicosídicas entre dois resíduos de glicose, como na celobiose e outros oligossacarídeos com ligações β -glicosídicas, e das ligações entre glicose e aril ou alquil agliconas, como na maioria dos substratos naturais encontrados em plantas (ESEN, 2003).

As β -glicosidases podem ser classificadas conforme sua especificidade pelo substrato, sendo então agrupadas em aril- β -glicosidases, celobiasas verdadeiras e enzimas com ampla especificidade por substratos, sendo a maioria das β -glicosidases classificadas nesta categoria (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002). As β -glicosidases são eficientes na hidrólise de diversos substratos, tais como β -glicosídeos, β -galactosídeos e β -fucosídeos (NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D., 2006; ODOUX; CHAUWIN; BRILLOUET, 2003; RIBEIRO, 2006). Devido a esta especificidade, Odoux, Chauwin e Brillouet (2003) afirmaram que esta enzima atua mais como uma β -glicosidase do que como uma β -glucosidase.

Porém, o sistema atual de classificação das glicosil hidrolases proposto por Henrissat (1991) baseia-se na similaridade da seqüência de aminoácidos, relacionando características estruturais, relações evolucionárias e mecanismo catalítico dessas enzimas. As β -glicosidases são as principais representantes das famílias GH1 e GH3 das glicosil hidrolases, clivando tanto ligações O- β -glicosídicas, como a β -glicosidase (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21), ou S- β -glicosídica como a β -tioglicosidase (mirosinase ou β -D-tioglicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.3.1) (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002; CZJZEK et al., 2001; ESEN, 2003).

A família GH1 normalmente inclui as β -glicosidases de origem bacteriana, de plantas e mamíferos. Já na família GH3 estão incluídas as β -glicosidases de origem fúngica, bacteriana e vegetal, sendo que em ambas as famílias, a β -glicosidase é classificada como enzimas de retenção, uma vez que seus produtos exibem a mesma configuração anomérica do seu substrato (HARNPICHARNCHAI et al., 2009). Segundo SUE et al. (2006), as β -glicosidases que estão envolvidas na hidrólise de metabólitos secundários de plantas são membros da família GH1.

As β -glicosidases constituem o maior grupo entre as glicosil hidrolases. Sua distribuição na natureza abrange os três domínios (Eukarya, Archaea e Bactéria) (ESEN,

2003), ou seja, é sintetizada por microrganismos, como por exemplo o fungo *Aspergillus oryzae* (PARK et al., 2001b) *Aspergillus japonicus*, *Penicillium verruculosum* e *Trichoderma reesei* (KOROTKOVA et al., 2009) e as bactérias do gênero *Pseudomonas* (YANG et al., 2004), *Bifidobacterium* (RAIMONDI et al., 2009), *Lactobacillus* (PYO; LEE; LEE, 2005), por animais (PONTOH; LOW, 2002) e por plantas como a soja (HSIEH; GRAHAM, 2001; MATSUURA; OBATA, 1993) e milho (ESEN, 1992; HAN; CHEN, 2008).

Langston, Sheehy e Xu (2006) relatam que entre as várias β -glicosidases, as de fonte microbiana atraem cada vez mais atenção por seu potencial de aplicação industrial. Em geral, a β -glicosidase microbiana tem vantagem sobre a de plantas e animais uma vez que sua produção, através de processo fermentativo, pode ser em grande escala, além de ser segura e mais barata. Entretanto, Sonia et al. (2008) afirmaram que a maioria das β -glicosidases microbianas é fortemente inibida por glicose, um metabólito de sua ação, constituindo um fator limitante para sua aplicação industrial.

Além disso, um microrganismo, para ser utilizado na indústria de alimentos, ter que ser considerado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA, ou seja, totalmente seguro para o homem e para os animais, assim como os metabólitos por eles produzidos devem ser inócuos. Assim, a β -glicosidase endógena de vegetais pode ser uma alternativa segura de enzima para aplicação em alimentos.

3.2.1 β -Glicosidases Vegetais

Nos vegetais, as β -glicosidases estão envolvidas em diversos processos biológicos nos como na hidrólise de glicolipídeos, na cianogênese, na modificação de metabólitos secundários (ESEN *apud* HSIEH; GRAHAM, 2001) como as isoflavonas, no crescimento e desenvolvimento por meio da regulação de fitohormônios, no catabolismo de oligossacarídeos, na lignificação da célula, na produção de aromas (CZJZEK et al., 2001; OPASSIRI et al., 2003), na ativação de componentes de defesa de plantas (MORANT et al., 2008), no metabolismo da vitamina B, na sinalização das plantas (CZJZEK et al., 2001), entre outros.

A ativação de componentes de defesa acontece quando a parede celular da planta é rompida, por exemplo, por um inseto ao mastigar a planta. Após o rompimento, os

compostos de defesa são bioativados pela ação da β -glicosidases. No tecido vegetal, as β -glicosidases são armazenadas separadamente dos substratos, sendo um sistema de dois compartimentos, onde cada componente individual é quimicamente inerte, fornecendo a planta uma defesa imediata contra o ataque de herbívoros e patógenos (MORANT et al., 2008). A β -glicosidase atua na defesa dos vegetais contra fungos e patógenos através da hidrólise de isoflavonóides conjugados, liberando glicose e aglicona, sendo a forma aglicona tóxica para os fungos patógenos (HSIEH; GRAHAM, 2001). Em outro processo de defesa química contra patógenos e herbívoros, estas enzimas liberam o ácido cianídrico (HCN) e outros compostos tóxicos pela hidrólise de glicosídeos cianogênicos O- β -glicosídeos.

Diferentes β -glicosidases de fontes vegetais, como por exemplo, de soja, milho, centeio, arroz e maçã já foram purificadas e caracterizadas. No processo de purificação utiliza-se geralmente a precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica e filtração em gel. O resumo de etapas de purificação e caracterização bioquímica destas enzimas vegetais pode ser observado na Tabela 3

A temperatura ótima das β -glicosidases vegetais pode variar de 25–70°C. A β -glicosidase apresentou uma temperatura ótima de 25–30°C em semente germinada de centeio (SUE; ISHIHARA; IWAMURA, 2000), 30°C em raiz da soja (HSIEH; GRAHAM, 2001), 37°C em forragem de milho (HAN; CHEN, 2008), 40°C em bagaço laranja (CAMERON et al., 2001) e baunilha (ODOUX; CHAUWIN; BRILLOUET, 2003), 45°C em azeitona (ROMERO-SEGURA; SANS; PEREZ, 2009) e soja (MATSUURA; OBATA, 1993; RIBEIRO, 2006), 50°C em arroz germinado (AKIYAHA; KAKU; SHIBUYA, 1998), coleótilo de milho (ESEN, 1992) e folha de *Camellia sinensis* (LI et al., 2005) e 70°C em semente de maçã (YU et al., 2007). Em relação a estabilidade térmica, a β -glicosidase de folha de *Camellia sinensis* foi estável por 7 dias a 25°C (LI et al., 2005), em semente de maçã por 42,9 h a 50°C (YU et al., 2007), em raiz de soja por 45 min a 50°C (HSIEH; GRAHAM, 2001) e em cotilédones de soja por 4 dias a 25°C (RIBEIRO, 2006).

O pH ótimo da β -glicosidase varia de 4,5–6,5, sendo de 4,5 em arroz (AKIYAHA; KAKU; SHIBUYA, 1998), 4,8 em forragem de milho (HAN; CHEN, 2008), 5,0 em cotilédones de soja (RIBEIRO, 2006), 5,5 em semente germinada de centeio (SUE; ISHIHARA; IWAMURA, 2000), folha de *Camellia sinensis* (LI et al., 2005), azeitona (ROMERO-SEGURA; SANS; PEREZ, 2009) e soja (MATSUURA; OBATA, 1993), 5,8 em coleótilo de milho (ESEN, 1992), 6,0 em semente de maçã (YU et al., 2007) e raiz de soja (HSIEH; GRAHAM, 2001) e 6,5 em baunilha (ODOUX; CHAUWIN; BRILLOUET, 2003).

No entanto, a β -glicosidase de bagaço de laranja apresentou estabilidade de pH de 4,5–5,5 (CAMERON et al., 2001) e a de folha de *Camellia sinensis* de 4,5-8,0 (LI et al., 2005).

Tabela 3 – Etapas de purificação e caracterização bioquímica de β -glicosidasas vegetais.

Planta	Etapas de purificação	Massa molecular	pH e temperatura ótimos	Estabilidade de pH e temperatura	Referências
Soja (grão)	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografia de troca iônica e de filtração em gel	52 kDa (Filtração em gel)	5,5 e 45°C	pH de 4,3–7,0	Matsuura e Obata, 1993
Soja (grão)	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografia de troca iônica e de filtração em gel	81 kDa (filtração em gel/HPLC) e 36 kDa (SDS-PAGE)	4,5 e 45°C	pH de 4,0–6,0	Matsuura, Sasaki e Murao, 1995
Soja (cotilédones)	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografia de troca iônica e de filtração em gel	--	5,0 e 45°C	pH de 4,5–5,5 e 25°C / 4 dias	Ribeiro, 2006
Soja (raiz)	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e cromatografia de troca iônica (aniônica e catiônica)	165 kDa (nativa) e subunidades de 80 e 75 kDa (SDS-PAGE)	6,0 e 30°C	50°C por 45 min	Hsieh e Graham, 2001
Milho (coleóptilo)	Precipitação com ácido acético e cromatografia de troca catiônica	60 kDa (SDS-PAGE)	5,8 e 50°C	30°C por 60 min	Esen, 1992
Milho (forragem)	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografia de troca iônica e de filtração em gel	62,4 kDa (SDS-PAGE)	4,8 e 37°C	pH de 4,5–5,0 e 40°C / 120 min	Han e Chen, 2008
Laranja (bagaço)	Cromatografia de troca iônica (aniônica e catiônica) e de filtração em gel	55 kDa (filtração em gel) e 64 kDa (SDS-PAGE)	5,0 e 40°C	--	Cameron et al., 2001
Centeio (semente)	Precipitação isoeétrica, cromatografia de troca iônica e filtração em gel	300 kDa (gel filtração) e 60 kDa (SDS-PAGE)	5,5 e 25–30°C	--	Sue, Ishihara e Iwamura, 2000
Maçã (semente)	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografia de troca iônica e de filtração em gel	120 kDa (filtração em gel) e 60 kDa (SDS-PAGE)	6,0 e 70°C	pH de 5,0–9,0 e 50°C / 42,9 h	YU et al., 2007
<i>Camellia sinensis</i> (folha)	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografia de troca iônica e FPLC	34 kDa (filtração em gel) e 41 kDa (SDS-PAGE)	5,5 e 50°C	pH de 4,5–8,0 e temperaturas menores que 40°C	Li et al., 2005
Azeitona	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografia de troca aniônica e interação hidrofóbica	130 kDa (filtração em gel) e 65,4 kDa (SDS-PAGE)	5,5 e 45°C	40°C / 1 h	Romero-Segura, Sans e Perez, 2009
Baunilha	Cromatografia de troca aniônica, interação hidrofóbica e filtração em gel	201 kDa (filtração em gel) e 50 kDa (SDS-PAGE)	6,5 e 40°C	40°C / 30 min	Odoux, Chauwin e Brillouet, 2003
Cereja	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografia de troca iônica e de filtração em gel	70 kDa (filtração em gel) e 68 kDa (SDS-PAGE)	--	--	Gerardi et al., 2001
Arroz (germinado)	Precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cromatografias de troca iônica e filtração em gel	55-57 kDa (filtração em gel) e 56 kDa (SDS-PAGE)	4,5 e 50°C	--	Akiyama, Kaku e Shibuya, 1998

O pH isoelétrico foi determinado em 4,9–5,1 para β -glicosidase de semente germinada de centeio (SUE; ISHIHARA; IWAMURA, 2000), em 4,6 para a de cereja (GERARDI et al., 2001), 5,2 para a de coleóptilo de milho (ESEN, 1992) e de 10 para a de arroz germinado (AKIYAHARA; KAKU; SHIBUYA, 1998).

A massa molecular das β -glicosidases vegetais variou de 34 a 300 kDa, sendo que algumas podem ser formadas por subunidades. As β -glicosidases de coleóptilo de milho (ESEN, 1992), de bagaço de laranja (CAMERON et al., 2001), de cereja (GERARDI et al., 2001), da folha de *Camellia sinensis* (LI et al., 2005) e de forragem de milho (HAN; CHEN, 2008) são monoméricas, com massa molecular variando de 34 a 70 kDa (Tabela 3). A β -glicosidase da raiz de soja possui 2 subunidades de 80 e 75 kDa, respectivamente (HSIEH; GRAHAM, 2001), a centeio é um oligômero formado por 5 subunidades de 60 kDa (SUE; ISHIHARA; IWAMURA, 2000), a de baunilha é formada por 4 subunidades de 50 kDa (ODOUX; CHAUWIN; BRILLOUET, 2003), a de semente de maçã possui 2 subunidades de 60 kDa (YU et al., 2007) e a de azeitona possui 2 subunidades de 65 kDa (ROMERO-SEGURA; SANS; PEREZ, 2009). No entanto, a β -glicosidase de soja apresentou massa molecular de 36 kDa por SDS-PAGE e 52 e 81 kDa por filtração em gel e filtração em gel acoplada ao HPLC, respectivamente, indicando que esta enzima pode ser formada por subunidades não idênticas (MATSUURA; OBATA, 1993). De acordo com Hsieh e Graham (2001), muitas β -glicosidases contém subunidades idênticas ou não idênticas. O número de subunidades varia de 2 a 10, dependendo da enzima. Segundo Kim e Kim (2004), a família 1 das β -glicosidases possui uma estrutura terciária muito semelhante e com forte tendência a formar homo e heterooligômeros. As estruturas quaternárias da família 1 exibem várias formas de oligômeros como dímeros, tetrameros, octâmeros ou grandes agregados formados por diferentes números de subunidades.

Os principais íons metálicos que inibem a atividade da β -glicosidase são Cu^{2+} , Ag^+ e Hg^{2+} . As β -glicosidases de coleóptilo de milho (ESEN, 1992), semente germinada de centeio (SUE; ISHIHARA; IWAMURA, 2000), baunilha (ODOUX; CHAUWIN; BRILLOUET, 2003), semente de maçã (YU et al., 2007), forragem de milho (HAN; CHEN, 2008) e raiz da soja (HSIEH; GRAHAM, 2006) são fortemente inibida por esses íons. A inibição por Ag^+ e Hg^{2+} sugere que o grupo sulfidrílico pode ter um papel essencial na atividade da β -glicosidase. A inibição por esses metais pode ser evitada na presença de β -mercaptoetanol (HSIEH; GRAHAM, 2001).

Entre os compostos orgânicos, a glucona- δ -lactona tem sido descrita na literatura com um forte inibidor de β -glicosidase de diferentes fontes vegetais (CAMERON et al., 2001; HSIEH; GRAHAM, 2001; MATSUURA; OBATA, 1993). Segundo Yang et al. (2004), a inibição competitiva pela glicose é uma característica comum das β -glicosidases, tanto vegetais quanto microbianas. Cameron et al. (2001) e Han e Chen (2008) verificaram a inibição por glicose da β -glicosidase de bagaço de laranja e forragem de milho, respectivamente. No entanto, a β -glicosidase de baunilha não foi inibida por glicose até 2 M (ODOUX; CHAUWIN; BRILLOUET, 2003).

3.2.2 Aplicação das β -glicosidases

As β -glicosidases tem sido foco de pesquisas por apresentarem um papel importante em processos biológicos e biotecnológicos (CZJZEK et al., 2001; MORANT et al., 2008), como biocatalisador industrial, sendo aplicada na produção de alimentos (PARK et al., 2001b), vinhos (PALMERI; SPAGNA; 2007; VILLENA; IRANZO; PÉREZ, 2007), suco de frutas (CAMERON et al., 2001; SARRY; GUNATA, 2004) e de celulose (BALDRIAN; VALASKOVA, 2008).

Na indústria de vinhos e sucos de frutas, a β -glicosidase contribui para a formação e aumento do sabor (CAMERON et al., 2001; SARRY; GUNATA, 2004; VILLENA, 2007). Os sucos e vinhos são conhecidos por conter uma fração livre de terpenos voláteis e também precursores glicosídicos não voláteis, que constituem uma importante fonte odorífera. Quimicamente, a fração aglicona dos precursores glicosídicos estão ligadas a um dissacarídeo. A hidrólise da ligação glicosídica pela β -glicosidase endógena libera uma aglicona, por exemplo, vários álcoois aromáticos. Como na natureza este processo é geralmente lento e incapaz de liberar toda a reserva de aroma, a suplementação com β -glicosidases exógenas pode aumentar essa liberação, trazendo benefícios ao processo de produção de vinho (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002).

A degradação da celulose em glicose envolve a ação sinérgica de três enzimas: as endoglucanases ou endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou exocelobiohidrolase (EC 3.2.1.91) e β -1,4-glicosidase ou celobiase (EC 3.2.1.21) (LEITE et al., 2008). A contribuição da β -glicosidase na hidrólise de celulose é indispensável para um

sistema eficiente de degradação da celulose em açúcares fermentáveis, uma vez que esta enzima degrada a celobiose, um metabólito intermediário da degradação da celulose. Além disso, a celobiose é um inibidor das endo e exoglucanases, que fazem parte do complexo celulolítico, devendo então ser removida para uma eficiente e completa sacarificação da celulose (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002; KOROTKOVA et al., 2009).

A β -glicosidase pode ser utilizada na indústria de alimentos no setor de produtos sem lactose na sua composição (PESSELA et al., 2003), uma vez que esta enzima, em muitos microrganismos e plantas, apresenta atividade β -glicosídica e β -galactosídica. Esta propriedade é conveniente para a hidrólise de lactose, sendo este um processo promissor para o problema de intolerância a lactose.

A goma gelana de baixa viscosidade para o uso na indústria alimentícia pode ser obtida pela ação da β -glicosidase. A aplicação da gelana, um exopolissacarídeo produzido por *Sphingomonas paucimolis*, é limitada devido a sua alta viscosidade e baixa solubilidade, porém, a ação hidrolítica da β -glicosidase leva a formação de gelana de baixa viscosidade (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002). A β -glicosidase pode ser empregada também em produtos de soja atuando na modificação de isoflavonas, ou seja, na conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas (PARK et al., 2001b).

3.2.2.1 Aplicação da β -glicosidade em produtos de soja

A β -glicosidase é utilizada principalmente na produção de alimentos fermentados de soja, entre estes destacam-se o misô, natto, tempeh e shoyu. Esses produtos contêm predominantemente isoflavonas agliconas (LIU, 1997) obtidas pela ação das β -glicosidases microbianas nas isoflavonas glicosídicas.

A transformação de isoflavonas em produtos de soja não fermentados foi relatada por alguns autores. Segundo Matsuura, Obata e Fukushima (1989), a β -glicosidase endógena de soja tem capacidade de hidrolisar isoflavonas, porém, sua ação hidrolítica está relacionada com a hidratação do grão.

Matsuura e Obata (1993) observaram que as β -glicosidases de soja hidrolisaram as isoflavonas glicosídicas do leite de soja, sendo que genistina foi mais facilmente hidrolisada do que a daidzina.

Park et al. (2001b) converteram isoflavonas β -glicosídicas de farinha de soja desengordurada em agliconas pela fermentação em estado semi-sólido com *Aspergillus oryzae*. A conversão ocorreu principalmente a partir de 24 h de fermentação, sendo que em 48 h, a maioria das 724 mg/g de glicosil isoflavonas foram convertidas em agliconas (564 mg/g). Durante a fermentação, a quantidade total de isoflavonas agliconas aumentou cerca de 27 vezes, quando comparada com valores anteriores à fermentação.

Xie et al. (2003) analisaram a conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas em produtos comerciais de soja como o SoyLife (extrato de germen de soja) e o Soy Meal (farinha de soja) usando β -glicosidase comercial de *Penicillium multicolor*. As melhores condições encontradas para esta conversão foram pH 5,0, 50°C com 5 horas de incubação. Foram utilizadas 5 unidades de β -glicosidases por grama de extrato de germen de soja e 1,5 unidades para a farinha de soja.

Otieno e Shah (2007) compararam a transformação de isoflavonas em leite de soja utilizando β -glicosidases purificada de amêndoas e β -glicosidases produzidas por cepas probióticas do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. A adição de β -glicosidases promoveu um aumento no teor de isoflavonas agliconas, com diminuição do teor de isoflavonas glicosídicas.

Kao, Chien e Chen (2008) estudaram a conversão de isoflavonas glicosídicas de torta de soja em agliconas através da β -glicosidase de amêndoas. O maior teor de agliconas foi obtido com 5 U/mL de β -glicosidase em pH 5,0, incubada a 55°C por 2 h.

Pham e Shah (2009) compararam a transformação de isoflavonas em leite de soja utilizando β -glicosidase e β -galactosidase comerciais em diferentes concentrações durante 240 minutos. A β -glicosidase foi mais eficiente na hidrólise de isoflavonas do que a β -galactosidase. No mesmo tempo e na mesma concentração, as isoflavonas glicosídicas foram hidrolizadas por β -glicosidases em níveis mais elevados do que a β -galactosidase. Em geral, as reações com β -glicosidase ocorreram rapidamente nos primeiros 30 min de reação em todas as concentrações testadas, sendo que em 240 minutos, de 86,77 a 92,9% do total de isoflavonas glicosídicas foram hidrolizadas.

A atividade biológica das isoflavonas de soja está relacionada com a sua forma química, sendo aglicona melhor absorvida pelo organismo. A β -glicosidase presente na microflora intestinal é a enzima responsável pela modificação das formas das isoflavonas. Entretanto, sua ação é dependente de fatores individuais que alteram a capacidade do organismo em absorver estas isoflavonas. Na soja há predominância das isoflavonas

conjugadas e glicosídicas. Assim, considerando a importância e o potencial das isoflavonas agliconas da soja para a saúde humana, estudos sobre a purificação, caracterização e aplicação da β -glicosidase de soja em farinha de soja integral para produção de isoflavonas agliconas são de grande relevância para a indústria de produtos não fermentados de soja.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-prima

Foi utilizado como matéria-prima para os experimentos os cotilédones da cultivar de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill) BRS 213, safra 2002/2003, desenvolvida na Vitrine Tecnológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja, Londrina-PR.

4.1.1.1 Preparo da matéria-prima

Os grãos de soja foram selecionados para remoção dos danificados, manchados e de materiais estranhos. Em seguida, os componentes dos grãos foram obtidos mecanicamente e separados em cotilédones, gérmen e casca. Os cotilédones foram moídos e utilizados para extração, fracionamento e purificação de β -glicosidase, para a caracterização de propriedades bioquímicas e aplicação em farinha de soja integral.

4.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados foram de pureza analítica de diferentes procedências comerciais.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

Os procedimentos analíticos foram realizados em triplicata.

4.2.1 Determinação da Atividade de β -glicosidase

Para determinação de atividade de β -glicosidase nas fases de extração e purificação da enzima foi utilizado o substrato sintético p -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p -NPG) conforme descrito por Matsuura e Obata (1993). Foram utilizados 2 mL de p -NPG 1mM em tampão fosfato-citrato 100 mM, pH 5,0 em tubo de ensaio mantido em banho-maria a 30°C por 10 min para pré-incubação. 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), de coloração amarela, liberado nesta reação foi determinado por espectrofotometria a 420 nm. Em paralelo, uma curva padrão de p -NP (20–160 μ M) foi preparada para determinação da atividade da enzima. Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de β -glicosidase que liberou 1 μ M de p -NP min^{-1} , nas condições de ensaio.

4.2.2 Determinação de Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis das amostras foi quantificado pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando como padrão uma solução de albumina de soro bovino (BSA) (40–400 μ g/mL).

4.2.3 Determinação da Atividade Específica de β -glicosidase

A atividade específica foi definida pela relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e mg de proteínas, ou seja, UA mg⁻¹ de proteínas.

4.3 PURIFICAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA

Todas as etapas de purificação de β -glicosidase, apresentadas na Figura 6, foram realizadas entre 0 e 4°C.

4.3.1 Extração de β -glicosidase

A extração de β -glicosidase foi realizada conforme descrição de Matsuura e Obata (1993) utilizando 60 g de farinha de cotilédones de soja em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6, na proporção de 1:10 (peso/volume), com agitação lenta por 1 h a 4°C e posterior centrifugação a 4000 x g e 4°C por 15 min e acidificação do sobrenadante com HCl 0,1 N até pH 5,0 que novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB), sendo utilizado como fonte de enzima para fracionamento e purificação.

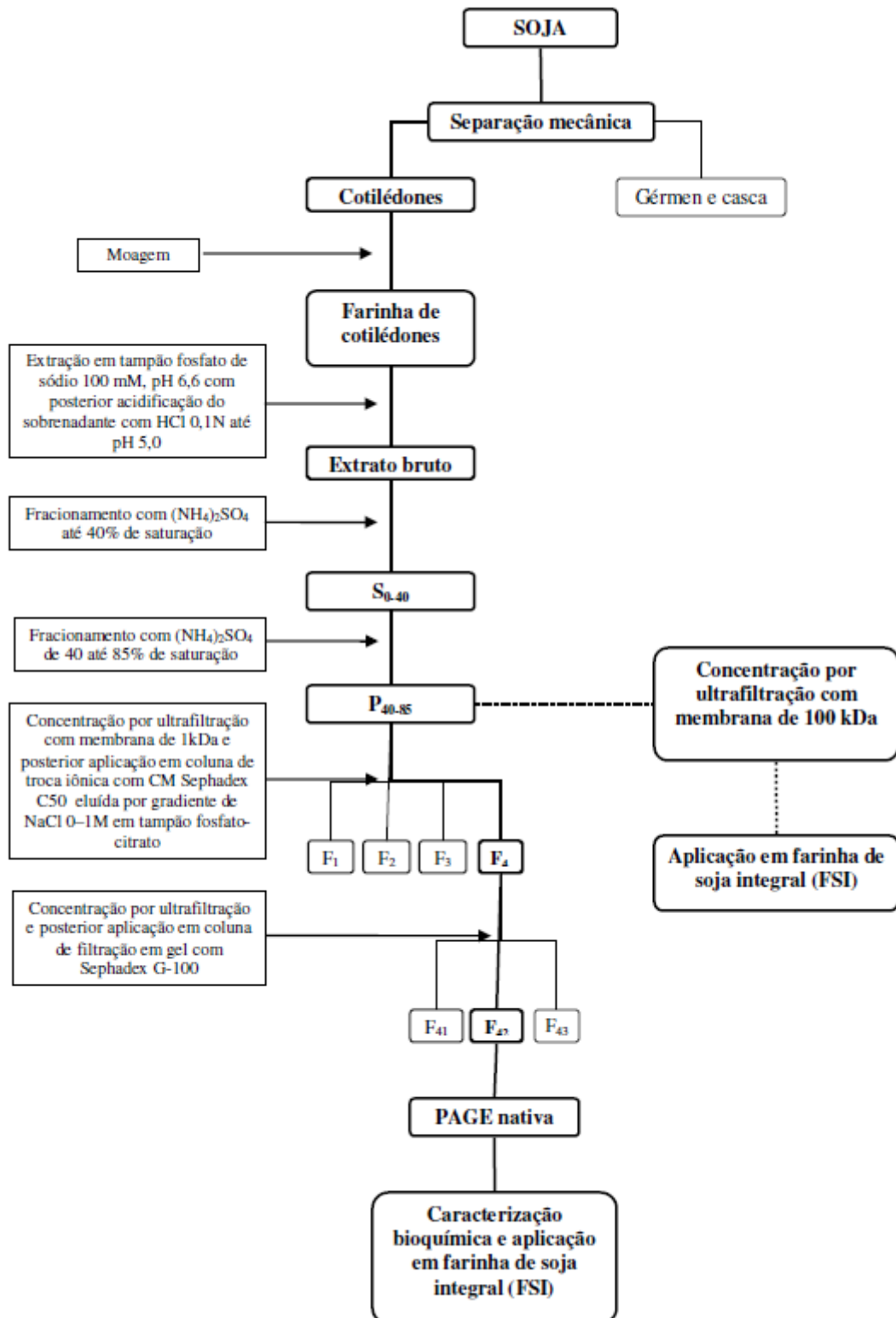


Figura 6 – Fluxograma de obtenção da β -glicosidase purificada e parcialmente purificada de cotilédones de soja.

4.3.2 Fracionamento com Sulfato de Amônio

As proteínas do extrato bruto foram precipitadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 até 40% e de 40 até 85%. Ao extrato bruto foi adicionado lentamente o sulfato de amônio até atingir 40% de saturação e mantido em repouso a 4°C até completa precipitação. O material foi centrifugado a 4000 x g por 15 min a 4°C. Ao sobrenadante (S₀₋₄₀) foi adicionado sulfato de amônio até 85% de saturação, mantido a 4°C e centrifugado conforme descrito. Os precipitados (P₀₋₄₀ e P₄₀₋₈₅), ressuspensos em tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0, e os sobrenadantes (S₀₋₄₀ e S₄₀₋₈₅) foram dialisados no mesmo tampão por 14 h a 4°C (RIBEIRO, 2006). Nos dialisados foram determinados a atividade de β -glicosidase (item 4.2.1) e teor de proteínas solúveis (item 4.2.2). Após as determinações, a fração P₄₀₋₈₅ apresentou maior atividade de β -glicosidase, sendo utilizada no processo de purificação por cromatografia e na aplicação da enzima em farinha de soja integral.

Para a purificação, a fração P₄₀₋₈₅ foi concentrada em célula de ultrafiltração (Amicon, modelo 8400 – Millipore) por retenção em membrana de exclusão molecular de 1 kDa (Celulose regenerada – Millipore) e aplicada em coluna de troca iônica.

Para a aplicação, a fração P₄₀₋₈₅ foi filtrada em célula de ultrafiltração com membrana de exclusão molecular de 100 kDa (PBHK, polietersulfona – Millipore), sendo o concentrado utilizado como fonte da β -glicosidase parcialmente purificada.

4.3.3 Cromatografia de Troca Iônica

A fração P₄₀₋₈₅ concentrada foi aplicada em coluna (2,5 cm x 55 cm) de troca iônica com CM Sephadex C-50, equilibrada previamente com tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0. Foi utilizado um fluxo de 27 mL h⁻¹ e coletadas frações de 3,5 mL por tubo de ensaio. Após a eluição da primeira fração protéica, foi aplicado um gradiente de NaCl 0–1 M no mesmo tampão. Nas frações eluídas foram realizadas leituras de absorvância a 280 nm, determinada a atividade de β -glicosidase (item 4.2.1) e traçado o perfil de separação da cromatografia de troca iônica. Nesta cromatografia foram separadas quatro frações protéicas

denominadas F₁, F₂, F₃ e F₄, conforme ordem de eluição. A fração F₄, com maior atividade específica de β -glicosidase, foi concentrada em membrana de 1 kDa e dialisada contra tampão fosfato-citrato 100 mM, pH 5,0 e aplicada em coluna de filtração em gel com Sephadex G-100.

4.3.4 Cromatografia de Filtração em Gel

A fração F₄ concentrada 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 100 mM, pH 5,0. Foi utilizado um fluxo de 17 mL h⁻¹ e coletadas frações de 2,3 mL por tubo de ensaio. Nas frações eluídas foram realizadas leituras de absorvância a 280 nm, determinada a atividade de β -glicosidase (item 4.2.1) e traçado o perfil de separação da cromatografia de filtração em gel. Nesta cromatografia foram separadas três frações protéicas denominadas F₄₁, F₄₂ e F₄₃. A fração F₄₂ apresentou maior atividade específica de β -glicosidase.

4.3.5 Ensaio de Homogeneidade por PAGE-nativa

As frações obtidas durante as etapas de purificação que apresentaram maior atividade específica de β -glicosidase foram analisadas por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 10% (PAGE) (DAVIS, 1964) em condições nativas utilizando tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,9 em sistema vertical com voltagem de 100 mV a temperatura de 4°C. Foram preparadas placas de dimensão de 101 mm x 106 mm x 1 mm com 8 poços e aplicados 20–30 μ g de proteínas de cada fração.

Após a eletroforese, as bandas protéicas foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) 10%, lavado 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 e posterior lavagem com água destilada. Em seguida, a revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio 0,28 M em formaldeído 0,37% até o aparecimento das bandas e interrompida com ácido acético 5%. O gel foi lavado com água destilada e seco entre duas folhas de celofane, mantidos em temperatura ambiente para secagem completa dos mesmos para fotodocumentação.

A fração F₄₂ apresentou na eletroforese apenas uma banda corada com prata sendo utilizada para a caracterização bioquímica parcial e aplicação em farinha de soja integral.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA β -GLICOSIDASE

A fração F₄₂ purificada foi caracterizada parcialmente e a sua atividade foi determinada conforme procedimento descrito no item 4.2.1.

4.4.1 Estimativa da Massa Molecular da β -glicosidase por Filtração em Gel

A massa molecular da β -glicosidase purificada foi estimada por filtração em gel em coluna (2,3 cm x 100 cm) com Sephadex G-100, equilibrada previamente com tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0. Foi utilizado um fluxo de 17 mL h⁻¹ e coletadas frações de 2,3 mL por tubo de ensaio e realizadas as leituras de absorvância a 280 nm. Os padrões protéicos utilizados foram β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo C (12,4 kDa). A blue dextran (2.000 kDa) foi utilizada para a determinação do volume morto.

A massa molecular foi estimada através da construção de um gráfico contendo na ordenada o *log* da massa molecula dos padrões, e na abscissa a razão V_e/V_o (onde, V_e = volume de eluição da coluna e V_o = volume morto). O valor de V_e de cada

amostra foi considerado como sendo a somatória dos volumes das frações coletadas desde a aplicação da amostra até a fração onde se registrou a maior leitura de absorvância.

4.4.2 Estimativa da Massa Molecular da β -glicosidase por SDS-PAGE

A massa molecular da β -glicosidase purificada também foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS) e mercaptoetanol conforme Laemmli (1970), com gel de empilhamento de 4% e gel separador de 10%, utilizando tampão Tris-HCl 1,5 M com SDS, pH 8,9 em sistema vertical com voltagem de 100 mV a temperatura de 4°C. Para o preparo da amostra, adicionou-se tampão de amostra 1:1 (v/v) e posteriormente, a amostra foi fervida por 10 minutos e aplicadas no gel.

A massa molecular foi estimada pela relação entre o *log* da massa molecular e a mobilidade relativa dos padrões que variaram de 180–6 kDa (BenchMarkTM Pré-Stained Protein Ladder, Invitrogen). O gel foi fixado, corado, revelado e fotografado conforme procedimento descrito no item 4.3.5.

4.4.3 Efeito de Íons Metálicos e Compostos Orgânicos na Atividade da β -glicosidase

O efeito de íons metálicos e compostos orgânicos na atividade da β -glicosidase foi determinado nas condições ótimas de reação definidas como pH 5,0, 30 min e 30°C. A β -glicosidase purificada foi incubada em tampão fosfato citrato 100 mM, com a adição de íons metálicos utilizando os sais HgCl₂, AgNO₃, MnCl₂, CaCl₂, CoCl₂, ZnSO₄, CuSO₄ e de compostos orgânicos glucona- δ -lactona, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em concentrações de 1 e 10 mM. A atividade de β -glicosidase foi estimada conforme Matsuura e Obata (1993) e os resultados expressos em % de atividade de β -glicosidase em relação ao controle.

4.4.4 Efeito da Glicose na Atividade da β -glicosidase

O efeito da glicose na atividade da β -glicosidase foi realizado utilizando concentrações de 1, 10, 50, 100 e 150 mM, em p-NPG (1 e 2 mM). Os resultados foram expressos como unidade de atividade de β -glicosidase, ou seja, $\mu\text{M } \rho\text{-NP}/\text{min}$. A constante de inibição (K_i) foi determinada através da representação de Dixon (1953).

4.5 APLICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE PURIFICADA E PARCIALMENTE PURIFICADA EM FARINHA DE SOJA INTEGRAL

Os experimentos referentes à aplicação da β -glicosidase em farinha de soja integral (FSI) foram realizados com a enzima parcialmente purificada e purificada (F_{42}).

4.5.1 Tratamento da Farinha de Soja Integral (FSI)

Para a aplicação da β -glicosidase, a farinha de soja integral foi tratada sob diferentes condições: autoclavada ($121^\circ\text{C}/30 \text{ min}$), mantidas em banho fervente ($100^\circ\text{C}/1\text{h}$) e sem tratamento (condição ambiente -25°C).

4.5.2 Aplicação da β -glicosidase Parcialmente Purificada em FSI

Os experimentos de aplicação de β -glicosidase de cotilédones de soja em farinha de soja integral (FSI) foram realizados através de um planejamento experimental com esquema fatorial 2^2 (resolução full) com triplicata no ponto central e dois níveis (-1 e +1) (Tabela 4 e 5). Foi avaliada a influência das variáveis independentes tempo de incubação e

concentração da enzima sobre a liberação de glicose (variável dependente). As variáveis independentes foram selecionados de acordo com as condições descritas na literatura. Os ensaios de aplicação de β -glicosidase em FSI foram conduzidos aleatoriamente.

Tabela 4 – Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2 (resolução full).

Fator	Nível		
	-1	0	+1
Tempo (h)	2	4	6
Enzima (UA)	10	30	50

Tabela 5 – Planejamento fatorial 2^2 para duas variáveis independentes em dois níveis de variação (-1 e +1) e três repetições do ponto central (0).

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas	
	X ₁	X ₂	Tempo (h)	Enzima (UA)
1	-1	-1	2	10
2	+1	-1	6	10
3	-1	+1	2	50
4	+1	+1	6	50
5 (C)	0	0	4	30
6 (C)	0	0	4	30
7 (C)	0	0	4	30

A variável dependente ou função resposta foi determinada pelo método da glicose oxidase em sistema automatizado (Selectra 1, Vitalab/Merck). Neste procedimento, a glicose liberada pela hidrólise de isoflavonas glicosídicas foi quantificada por espectrofotometria a 420 nm e o resultado expresso como teor de glicose liberada ($Y = \mu\text{g}$ de glicose/g de FSI).

Foi realizado um planejamento fatorial para cada tratamento da FSI. Em um tubo de ensaio contendo 250 mg de FSI foram adicionados 1 mL de tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0 contendo a β -glicosidase, e incubado a 30°C. A concentração de enzima e o tempo da reação de cada ensaio foi de acordo com o planejamento experimental. Após o tempo de incubação, a atividade da enzima foi interrompida em banho fervente por 5 min e em seguida o material foi centrifugado a 4000 x *g* por 15 min. Do sobrenadante foi determinado o teor de glicose.

4.5.3 Aplicação da β -glicosidase Purificada em FSI

O tratamento da FSI que apresentou o melhor resultado na liberação de glicose após a aplicação da β -glicosidase parcialmente purificada foi escolhido para a aplicação da enzima purificada. Foi realizado um novo planejamento experimental nas mesmas condições, de acordo com o item 4.5.2.

4.5.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% e os mapas de superfície de resposta foram realizadas utilizando-se o software Statistica 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de dois artigos científicos e de trabalhos apresentados em eventos científicos

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO A

O artigo “Purificação e caracterização de β -glicosidase de cotilédones de soja” será submetido ao Food Science and Technology.

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO B

O artigo “Aplicação de β -glicosidase de cotilédones de soja em farinha de soja integral” será submetido à Ciência e Tecnologia de Alimentos.

5.3 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO A

O ARTIGO “PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA” SERÁ SUBMETIDO AO FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. AS NORMAS PARA PUBLICAÇÃO ESTÃO ANEXADAS APÓS O ARTIGO.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA

Rafael Fernandes Santos, Mara Lúcia Luiz Ribeiro

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA

Rafael Fernandes Santos¹, Mara Lúcia Luiz Ribeiro^{1*}

Resumo

As β -glicosidase (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) catalisa a hidrólise de ligações β -glicosídicas de di e/ou oligosacarídeos liberando glicose e uma aglicona. Esta enzima possui inúmeras funções endógenas nos vegetais podendo ser utilizada na hidrólise de isoflavonas glicosídicas em agliconas, que apresentam ação benéfica na saúde humana, atuando no controle e prevenção de doenças crônicas. O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar a β -glicosidase de cotilédones de soja. A β -glicosidase foi extraída a partir de farinha de cotilédones, fracionada com sulfato de amônio e purificada por cromatografias de troca iônica e de filtração em gel. A fração F₄₂ apresentou maior atividade específica de β -glicosidase com presença de uma única banda de proteína revelada por eletroforese nativa, demonstrando que o processo de purificação de β -glicosidase foi eficiente. A fração F₄₂ apresentou massa molecular de 53 kDa por filtração em gel e 33 kDa por eletroforese em condições desnaturantes. A atividade de β -glicosidase foi inibida por HgCl₂ 1 mM, glucona- δ -lactona 10 mM e glicose 150 mM em 84, 94 e 84%, respectivamente. O MnCl₂ 10 mM aumentou a atividade da enzima em 63%.

Palavras-chave: β -glicosidase. Cotilédones de soja. Purificação e caracterização.

1 INTRODUÇÃO

A β -glicosidase (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) catalisa a hidrólise de ligações β -glicosídicas entre dois resíduos de glicose, como na celobiose e outros oligossacarídeos com ligações β -glicosídicas, e das ligações entre glicose e aril ou alquil agliconas, como na maioria dos substratos naturais encontrados em plantas. Sua distribuição na natureza abrange os três domínios, podendo ser sintetizada por microrganismos, plantas e animais, constituindo o maior grupo entre as glicosil hidrolases (Esen, 2003).

¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR-Brasil. * Corresponding author: Tel/fax: 55 (43) 3371-4270. E-mail address: maraluciaribeiro@uel.br

A β -glicosidase tem sido foco de pesquisas por apresentarem um papel importante em processos biológicos e biotecnológicos (Czjzek et al., 2001, Morant et al., 2008). Nos vegetais, a β -glicosidase está envolvida no catabolismo de oligossacarídeos, na lignificação da célula, na produção de aromas (Czjzek et al., 2001, Opassiri, Cairns, Akiyama, Wara-Aswapati, Svasti & Esen, 2003), na ativação de componentes de defesa (Morant et al., 2008) entre outros.

Na indústria, a β -glicosidase atua como biocatalisador industrial, sendo aplicada na produção vinhos (Palmeri & Spagna, 2007, Villena, Iranzo & Pérez, 2007), suco de frutas (Cameron, Manthey, Baker & Grohmann, 2001, Sarry & Gunata, 2004), de celulose (Baldrian & Valaskova, 2008) e de alimentos, como por exemplo, em produtos de soja atuando na modificação de isoflavonas (Park, Aguiar, Alencar & Scamparini, 2001) que são conhecidas por suas atividades biológicas na prevenção e controle de doenças crônicas (Messina, 1999).

Diferentes β -glicosidasas de fontes vegetais, como a de milho (Han & Chen, 2008), centeio (Sue, Ishihara & Iwamura, 2000), arroz (Akiyaha, Kaku & Shibuya, 1998), maçã (Yu et al., 2007) e azeitona (Romero-Segura, Sans & Perez, 2009) já foram purificadas e caracterizadas. Porém, a β -glicosidase de soja foi pouco explorada e somente investigada por Matsuura e Obata (1993) no grão e por Hsieh e Graham (2001) e Suzuki et al. (2006) na raiz germinada. O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar a β -glicosidase de cotilédones de soja.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA-PRIMA

Foi utilizado como matéria-prima para os experimentos os cotilédones da cultivar de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill) BRS 213, safra 2002/2003, desenvolvida na Vitrine Tecnológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja, Londrina-PR.

2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.2.1 Determinação da Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético p -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p -NPG) conforme descrito por Matsuura et al. (1993). Em paralelo, uma curva padrão de p -NP (20–160 μ M) foi preparada para determinação da atividade da enzima. Uma unidade de atividade de β -glicosidase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ M de p -NP min^{-1} , nas condições de ensaio.

2.2.2 Determinação de Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis foi quantificado pelo método de Lowry, Rosebrough, Farr e Randall (1951) utilizando como padrão uma solução de albumina de soro bovino (BSA) (40–400 μ g/mL).

2.2.3 Determinação da Atividade Específica de β -glicosidase

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

2.3 PURIFICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA

2.3.1 Extração da β -glicosidase

A extração da β -glicosidase foi realizada conforme descrição de Matsuura et al. (1993) utilizando 60 g de farinha de cotilédones de soja em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6, na proporção de 1:10 (peso/volume), sob agitação lenta por 1h a 4°C e posterior centrifugação a 4000 x g e 4°C por 15 min. O sobrenadante foi acidificado com HCl 0,1 N até pH 5,0 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB), sendo utilizado como fonte de enzima para fracionamento e purificação.

2.3.2 Fracionamento da β -glicosidase com Sulfato de Amônio

As proteínas do extrato bruto foram fracionadas com sulfato de amônio de 0 a 40% e de 40–85% de saturação, sendo mantidas em repouso a 4°C até completa precipitação e separadas por centrifugação a 4000 x g por 15 min a 4°C. Os precipitados (P_{0–40} e P_{40–85}), ressuspensos em tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0, e os sobrenadantes (S_{0–40} e S_{40–85}) foram dialisados no mesmo tampão por 14 h a 4°C. Nos dialisados foram determinados a atividade de β -glicosidase e o teor de proteínas solúveis. Após as determinações, a fração P_{40–85} apresentou maior atividade de β -glicosidase, sendo concentrada em célula de ultrafiltração (Amicon, modelo 8400 – Millipore) por retenção em membrana de exclusão molecular de 1 kDa (Celulose regenerada – Millipore).

2.3.3 Cromatografia de Troca Iônica

A fração P_{40–85} concentrada foi aplicada em coluna (2,5 cm x 55 cm) de troca iônica com CM Sephadex C-50, equilibrada previamente com tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0. Foi utilizado um fluxo de 27 mL h⁻¹ e coletadas frações de 3,5 mL por tubo de ensaio. Após a eluição da primeira fração protéica, foi aplicado um gradiente de NaCl 0–1 M no mesmo tampão. Nas frações eluídas foram realizadas leituras de absorvância a 280 nm, determinada a atividade de β -glicosidase e traçado o perfil de separação da cromatografia de troca iônica. Nesta cromatografia foram separadas quatro frações protéicas denominadas F₁, F₂, F₃ e F₄, conforme ordem de eluição. A fração F₄, com maior atividade específica de β -glicosidase, foi concentrada em membrana de 1 kDa e dialisada contra tampão fosfato-citrato 100 mM, pH 5,0 e aplicada em coluna de filtração em gel com Sephadex G-100.

2.3.4 Cromatografia de Filtração em Gel

A fração F₄ concentrada 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 100 mM, pH 5,0. Foi utilizado um fluxo de 17 mL h⁻¹ e coletadas frações de 2,3 mL por tubo de ensaio. Nas frações eluídas foram realizadas leituras de absorvância a 280 nm, determinada a atividade de β -glicosidase e traçado o perfil de separação da cromatografia de filtração em gel. Nesta cromatografia foram separadas três frações protéicas denominadas F₄₁, F₄₂ e F₄₃. A fração F₄₂ apresentou maior atividade específica de β -glicosidase.

2.3.5 Ensaio de Homogeneidade por PAGE-nativa

As frações obtidas durante as etapas de purificação que apresentaram maior atividade específica de β -glicosidase foram analisadas por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 10% (PAGE) (Davis, 1964). Após a eletroforese, as bandas protéicas foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) 10% e reveladas por coloração com nitrato de prata (Nielsen & Brown, 1984).

2.4 CARACTERIZAÇÃO DA β -GLICOSIDASE

A fração F₄₂ apresentou na eletroforese apenas uma banda corada com prata sendo utilizada para a caracterização da β -glicosidase.

2.4.1 Estimativa da Massa Molecular da β -glicosidase por Filtração em Gel

A massa molecular da β -glicosidase purificada foi estimada por filtração em gel em coluna (2,3 cm x 100 cm) com Sephadex G-100, equilibrada previamente com tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0. Foi utilizado um fluxo de 17 mL h⁻¹ e coletadas frações de 2,3 mL por tubo de ensaio e realizadas as leituras de absorvância a 280 nm. Os padrões protéicos utilizados foram β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo C (12,4 kDa). A blue dextran (2.000 kDa) foi utilizada para a determinação do volume morto.

2.4.2 Estimativa da Massa Molecular da β -glicosidase por SDS-PAGE

A massa molecular da β -glicosidase purificada também foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS) e mercaptoetanol conforme Laemmli (1970), com gel de empilhamento de 4% e gel separador de 10%. A massa molecular foi estimada pela relação entre o *log* da massa molecular e a mobilidade relativa dos padrões que variaram de 180–6 kDa (BenchMarkTM Pré-Stained Protein Ladder, Invitrogen).

2.4.3 Efeito de Íons Metálicos e Compostos Orgânicos na Atividade da β -glicosidase

O efeito de íons metálicos e compostos orgânicos na atividade da β -glicosidase foi determinado nas condições ótimas de reação definidas como pH 5,0, 30 min e 30°C. A β -glicosidase purificada foi incubada em tampão fosfato citrato 100 mM, com a adição de íons metálicos utilizando os sais HgCl₂, AgNO₃, MnCl₂, CaCl₂, CoCl₂, ZnSO₄, CuSO₄ e de compostos orgânicos glucona- δ -lactona, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em concentrações de 1 e 10 mM. A atividade de β -glicosidase foi estimada conforme Matsuura et al. (1993) e os resultados expressos em % de atividade de β -glicosidase em relação ao controle.

2.4.4 Efeito da Glicose na Atividade da β -glicosidase

O efeito da glicose na atividade da β -glicosidase foi realizado utilizando concentrações de 1, 10, 50, 100 e 150 mM, em p-NPG (1 e 2 mM). Os resultados foram expressos como unidade de atividade de β -glicosidase. A constante de inibição (K_i) foi determinada utilizando a representação de Dixon (1953).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PURIFICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA

O EB obtido a partir de 60 g de farinha de cotilédones de soja foi primeiramente fracionado com sulfato de amônio de 0 até 40% de saturação a 4°C. Após a centrifugação, no sobrenadante, adicionou-se sulfato de amônio até 85% de saturação. O precipitado, denominado de P₄₀₋₈₅, foi ressuspenso e dialisado em tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0. Nesta fase de separação houve uma recuperação de proteínas de 24,6% e de atividade de β -glicosidase de 57% em relação ao EB (Tabela 1).

A fração P₄₀₋₈₅ foi aplicada em coluna de troca iônica com CM-Sephadex C50, equilibrada e eluída com tampão fosfato citrato 50 mM. Na eluição ocorreu a separação da fração F₁, com recuperação de 2% de proteínas e 1,8% de atividade de β -glicosidase (Tabela 1 e Figura 1). Após a aplicação do gradiente linear de NaCl 0–600 mM no mesmo tampão, foram separadas mais três frações (F₂, F₃ e F₄), com recuperação proteínas de 4, 0,8 e

1,1%, respectivamente. Das quatro frações obtidas na cromatografia de troca iônica, a fração F₁ e F₄ apresentaram atividade de β-glicosidase, sendo que na fração F₁ foram encontradas apenas 6,4% das enzimas recuperadas nesta etapa. A fração F₄ apresentou elevada atividade específica de β-glicosidase, com recuperação de 26,3% de atividade e purificação de 23 vezes (Tabela 1 e Figura 1), sendo utilizada na etapa seguinte de purificação.

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

Fases de Purificação	Proteínas solúveis		Atividade de β-glicosidase			
	mg	Recuperação (%)	Atividade ¹ (UA)	Recuperação (%)	Atividade Específica ²	Fator de Purificação
Extrato Bruto	2.782,6	100,0	2.402,8	100,0	0,9	1,0
Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ P _(40-85%)	684,8	24,6	1.370,3	57,0	2,0	2,3
CM Sephadex C50						
F ₁	55,1	2,0	42,5	1,8	0,8	0,9
F ₂	112,1	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F ₃	22,4	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
F ₄	31,6	1,1	632,3	26,3	20,0	23,2
Sephadex G-100 – Fração F ₄						
F ₄₁	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F ₄₂	2,7	0,1	255,2	10,6	93,8	108,7
F ₄₃	10,8	0,4	21,4	0,9	2,0	2,3

¹ UA = μM -nitrofenol/min; ² UA/mg de proteína

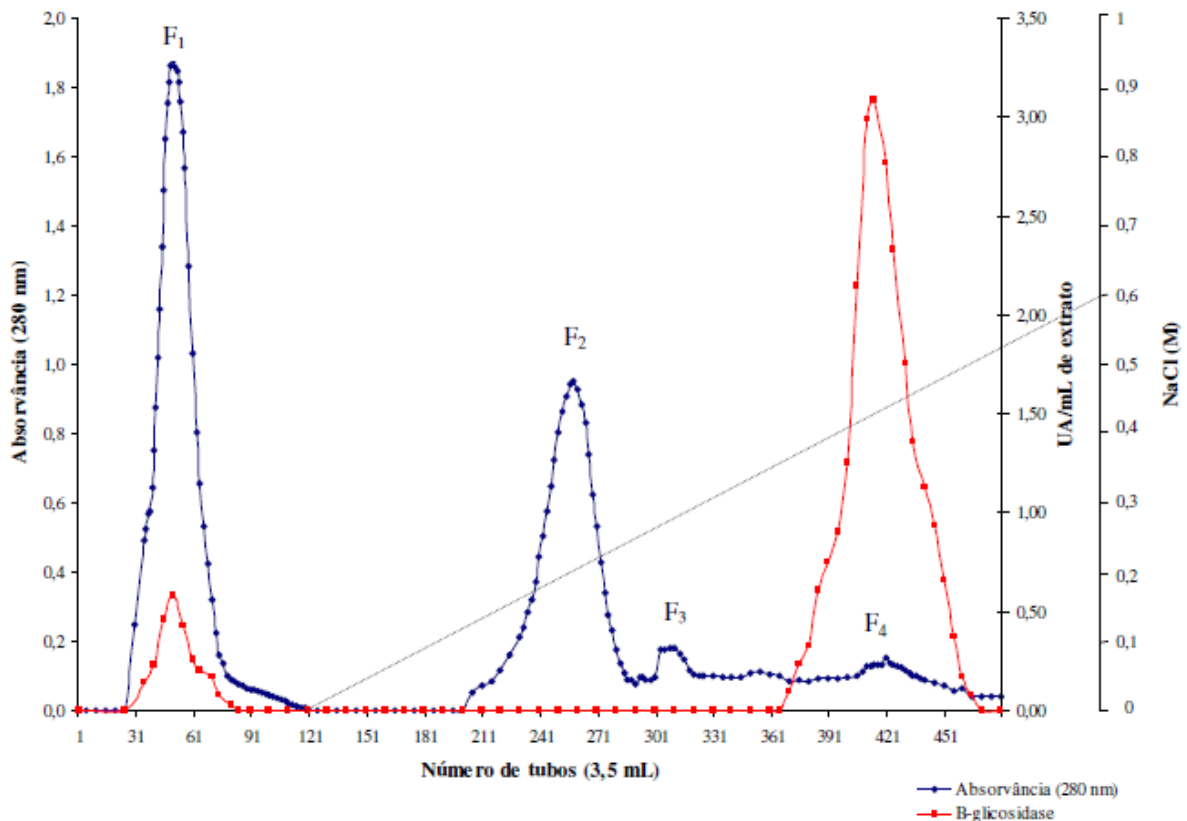


Figura 1 – Cromatografia de troca iônica com CM Sephadex C50 da fração P₄₀₋₈₅, proveniente do extrato de cotilédones de soja, eluída com gradiente linear de NaCl 0–600 mM em tampão fosfato citrato 50 mM, com fluxo de 27 mL h⁻¹.

A fração F₄ foi aplicada em coluna de filtração em gel com Sephadex G-100 eluída com tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0. Na eluição ocorreu a separação de três frações protéicas (F₄₁, F₄₂ e F₄₃) (Figura 2). A fração F₄₂ apresentou elevada atividade específica de β -glicosidase com recuperação de 10,62% e fator de purificação de 108 vezes em relação ao extrato bruto (Tabela 1).

Matsuura et al. (1993) purificaram a β -glicosidase do grão de soja e observaram a separação de três frações (A, B e C) com atividade de β -glicosidase. Do total de enzimas recuperadas na cromatografia de troca iônica, 12,5% foram encontradas na fração A, representando as enzimas que não se ligaram a resina. Após a aplicação do gradiente de NaCl foram obtidas as frações B e C, com 6 e 22% de recuperação da atividade de β -glicosidase, respectivamente. A diferença no número de frações com atividade de β -glicosidase pode estar relacionada à característica da matéria-prima utilizada.

Em relação à recuperação final da β -glicosidase, os resultados foram semelhantes aos de Matsuura et al. (1993), que tiveram uma recuperação final de 9%, sendo

2% referente a enzima β -glicosidase B e 7% a β -glicosidase C, com fator de purificação de 87,5 e 95,5 vezes em relação ao extrato bruto, respectivamente. Hsieh et al. (2001) purificaram a β -glicosidase da raiz da soja, tendo uma recuperação final de 20%, com fator de purificação de 20 vezes em relação ao extrato bruto.

A purificação da β -glicosidase foi acompanhada por eletroforese nativa em gel de poliacrilamida. Foram aplicadas de 20 a 30 μ g de proteínas em cada poço do gel. Nesta eletroforese observou-se que desde o EB até a cromatografia de filtração em gel ocorreu a separação de várias frações de proteínas, sendo que a fração F₄₂ apresentou apenas uma banda protéica, demonstrando que o processo de purificação da β -glicosidase foi eficiente (Figura 3).

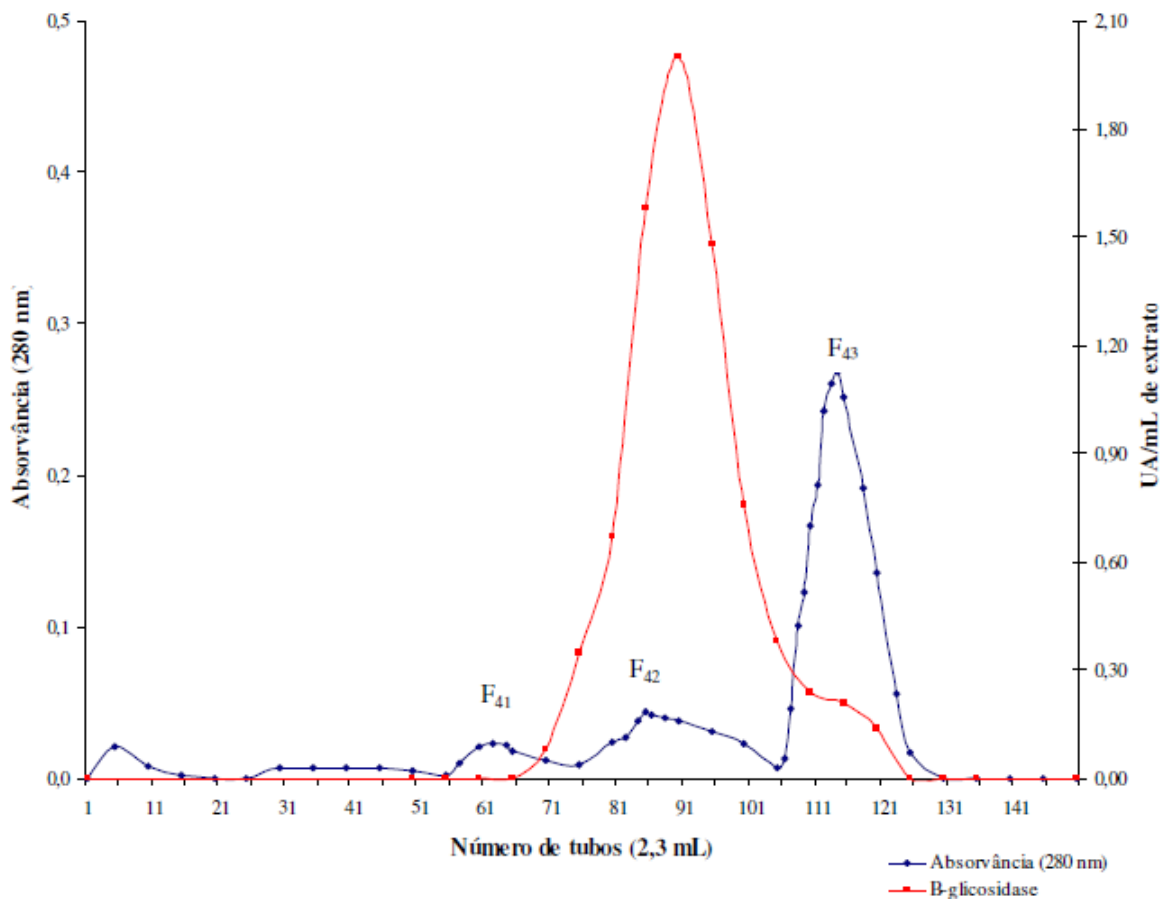


Figura 2 – Cromatografia de filtração em gel com Sephadex G100 da fração F₄, eluída em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0, com fluxo de 17 mL h⁻¹. Vo = 131,1 mL.

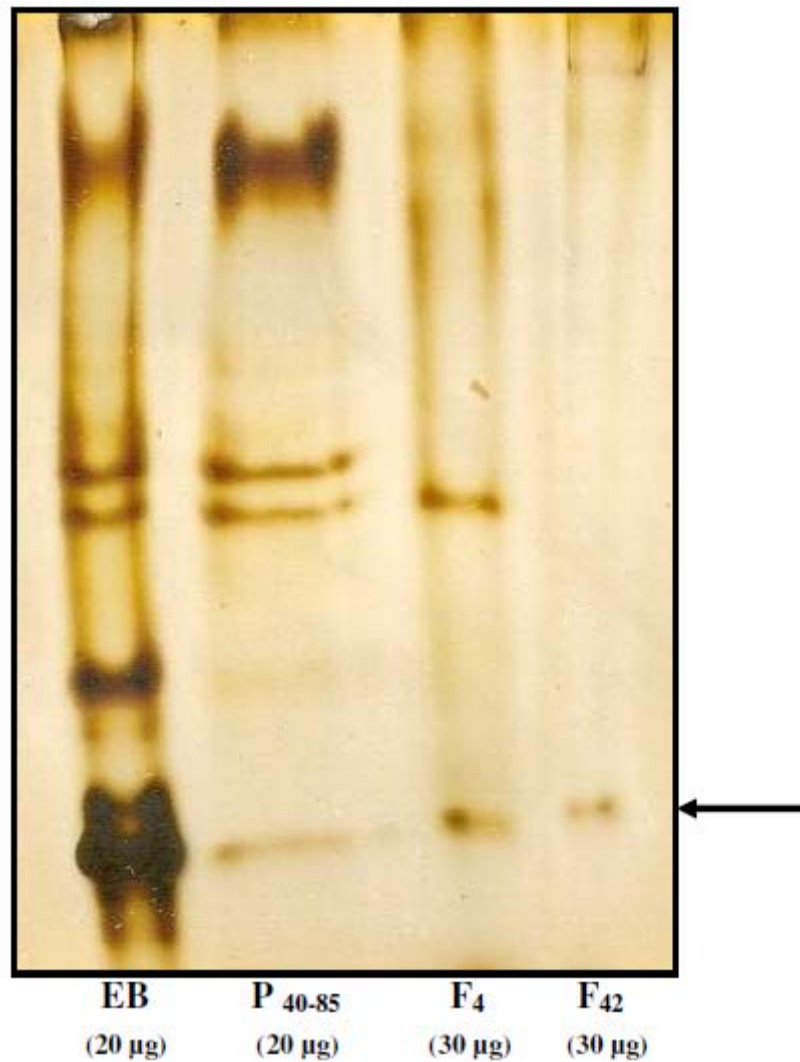


Figura 3 – Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida das diferentes fases de purificação da β -glicosidase de cotilédones de soja.

3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA β -GLICOSIDASE

3.2.1 Determinação da Massa Molecular da β -glicosidase

A massa molecular da enzima nativa foi estimada por filtração em gel com Sephadex G-100 calibrada com padrões de massa molecular conhecida. A partir da equação da reta obtida ($y = -1,0951x + 3,4535 - R^2 = 0,9703$), estimou-se a massa molecular da β -glicosidase nativa em 53 kDa. A massa molecular também foi estimada por SDS-PAGE, que revelou uma única banda de proteína com mobilidade relativa correspondente a massa molecular de aproximadamente de 33 kDa (Figura 4), indicando que a enzima é um dímero.

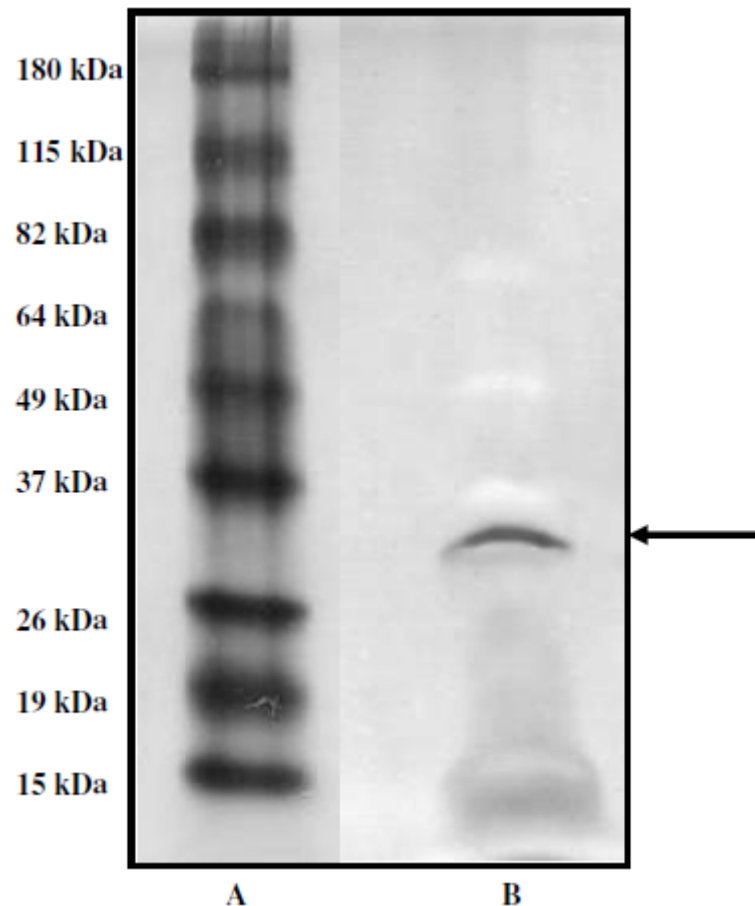


Figura 4 – SDS-PAGE em gel de poliacrilamida da enzima β -glicosidase purificada de cotilédones de soja. (A) Padrões de massa molecular conhecidas. (B) β -glicosidase purificada.

Estes resultados coincidem com os publicados por Matsuura et al. (1993) que estimaram a massa molecular da β -glicosidase nativa por filtração em gel em 52 kDa. Em estudos posteriores, Matsuura, Sasaki e Murao (1995), através de filtração em gel por HPLC e SDS-PAGE, obtiveram uma massa molecular de 81 e 36 kDa, respectivamente.

A massa molecular encontrada para a β -glicosidase de cotilédones de soja na sua forma nativa é semelhante a de milho (Esen, 1992, Han et al., 2008), arroz (Akiyama et al., 1998) e bagaço da laranja (Cameron et al., 2001). No entanto, outras β -glicosidasas vegetais possuem massas moleculares superiores, sendo formadas por subunidades, como por exemplo, a β -glicosidade de raiz de soja que possui 2 subunidades de 80 e 75 kDa (Hsieh et al., 2001), a de centeio que é um oligômero formado por 5 subunidades de 60 kDa (Sue et al., 2000) e a de baunilha que é formada por 4 subunidades de 50 kDa (Odoux, Chauwin & Brillouet, 2003).

Segundo Hsieh et al. (2001), muitas β -glicosidasas contém subunidades idênticas ou não idênticas sendo que o número de subunidades pode variar de 2 a 10,

dependendo da enzima. A família 1 das β -glicosidases possui uma estrutura terciária muito semelhante e com forte tendência a formar homo e heterooligômeros. As estruturas quaternárias da família 1 exibem várias formas de oligômeros como dímeros, tetrâmeros, octâmeros ou grandes agregados formados por diferentes números de subunidades (Kim & Kim, 2004).

3.2.2 Efeito de Íons Metálicos e Compostos Orgânicos na Atividade da β -glicosidase

O efeito de diferentes íons metálicos e compostos orgânicos na atividade da β -glicosidase foi avaliado por meio da atividade relativa da enzima incubada com estes compostos nas concentrações de 1 e 10 mM com p -NPG 1 mM (Tabela 2), nas condições ótimas de pH 5,0 e 30 min de incubação a 30°C.

A atividade da β -glicosidase foi fortemente inibida por $HgCl_2$ 1 mM e $CoCl_2$ 10 mM (84 e 75%, respectivamente). Com a adição de $CuSO_4$ 10 mM e $AgNO_3$ e $ZnSO_4$ 1 mM juntamente com o substrato sintético p -NPG, observou-se um efeito inibitório maior que 50% na atividade da β -glicosidase. No entanto, a adição de $ZnSO_4$ 10 mM, diminuiu a inibição da atividade da enzima quando comparada com a atividade com 1 mM deste composto (Tabela 2). A inibição por Ag^+ e Hg^{2+} sugere que o grupo sulfidrílico pode ter um papel essencial na atividade da β -glicosidase (Hsieh et al., 2001). Segundo Yang, Ning, Shi, Chang e Huan (2004), a importância do grupo SH-na β -glicosidase está relacionado com o fato de que os resíduos de cisteína estão envolvidos na estabilidade e na atividade da enzima. O efeito inibitório dos íons Ag^+ e Hg^{2+} em baixas concentrações pode ser explicado pelo fato deles interagirem com a cisteína, formando um complexo insolúvel com o enxofre, enquanto que outros íons formam complexos solúveis (Esen, 1992). A inibição por esses metais pode ser evitada na presença de β -mercaptoetanol (Hsieh et al., 2001).

O $MnCl_2$ nas concentrações de 1 e 10 mM aumentou a atividade de β -glicosidase em 10 e 63% (Tabela 2). O Mn^{2+} ser um efector positivo, podendo estar relacionado com o sítio ativo da β -glicosidase. Segundo Esen (2003), a presença de Mn^{2+} na estrutura cristalizada da mirosinase (β -S-glucosidase) sugere que este cátion divalente pode ser necessário para a atividade da enzima.

Tabela 2 – Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos na atividade da β -glicosidase

Íons metálicos (mM)		Atividade relativa (%) ¹	Compostos orgânicos (mM)		Atividade relativa (%) ¹
HgCl ₂	1	16	Glucona- δ - lactona	1	38
	10	n.d. ²		10	6
AgNO ₃	1	47	PMSF ³	1	78
	10	n.d. ²		10	64
ZnSO ₄	1	44	EDTA ⁴	1	79
	10	86		10	77
CuSO ₄	1	86			
	10	36			
CoCl ₂	1	90			
	10	25			
CaCl ₂	1	96			
	10	96			
MnCl ₂	1	110			
	10	163			

¹ Atividades expressas em percentagem de atividade calculada com p-NPG como substrato, no qual a enzima apresentou atividade de 100%

² n.d. – não determinado

³ PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila (em etanol 95%)

⁴ EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

A não inibição da β -glicosidase por Ca²⁺ é um ponto positivo pois esta enzima pode ser utilizada para quebrar a lactose, diminuindo os efeitos causados por este açúcar em indivíduos com intolerância a lactose (Pessela et al., 2003).

Entre os compostos orgânicos, a glucona- δ -lactona mostrou-se um forte inibidor de β -glicosidase, inibindo 94% da atividade da enzima na concentração de 10 mM. A glucona- δ -lactona tem sido descrita na literatura com um forte inibidor de β -glicosidase de diferentes fontes vegetais (Cameron et al., 2001, Hsieh et al., 2001, Matsuura et al., 1993). O PMSF e o EDTA tiveram um efeito moderado sobre a atividade da enzima, inibindo cerca de 20% da atividade da mesma (Tabela 2). O EDTA é utilizado em muitos testes bioquímicos para inibir a ação de proteases no extrato bruto devido sua capacidade de quelar íons metálicos (Mateo & Stefano, 1997). A não inibição pelo EDTA mostra que a enzima não depende de um cofator metálico em seu sítio ativo, porém, a baixa inibição pode estar relacionada a possível alteração das cargas dos aminoácidos do sítio ativo por esse composto orgânico (Harnpicharnchai, Champreda, Sornlake & Eurwilaichitr, 2009). Já o PMSF é um inibidor que interage com histidina e serina no sítio ativo. A não inibição por esse composto

indica que esses aminoácidos não possuem um papel essencial na atividade de β -glicosidase (Wolosowska & Synowiecki, 2004).

3.2.3 Efeito da Glicose na Atividade da β -glicosidase

A glicose mostrou ter efeito inibitório sobre a atividade da β -glicosidase. A atividade residual da β -glicosidase em p-NPG 1 mM foi de 16% quando incubada com glicose 150 mM. Porém, aumentando-se a concentração de p-NPG para 2 mM, a atividade residual foi de 29% (Figura 5). Desta forma, a glicose é um inibidor competitivo da β -glicosidase. Através da representação de Dixon (1953) foi possível estabelecer a constante de inibição (K_i) no valor de 2 mM. Assim, a β -glicosidase pode ser inibida pelos produtos formados após a sua ação (Sonia, Chadha, Badhan, Saini & Bhat, 2008).

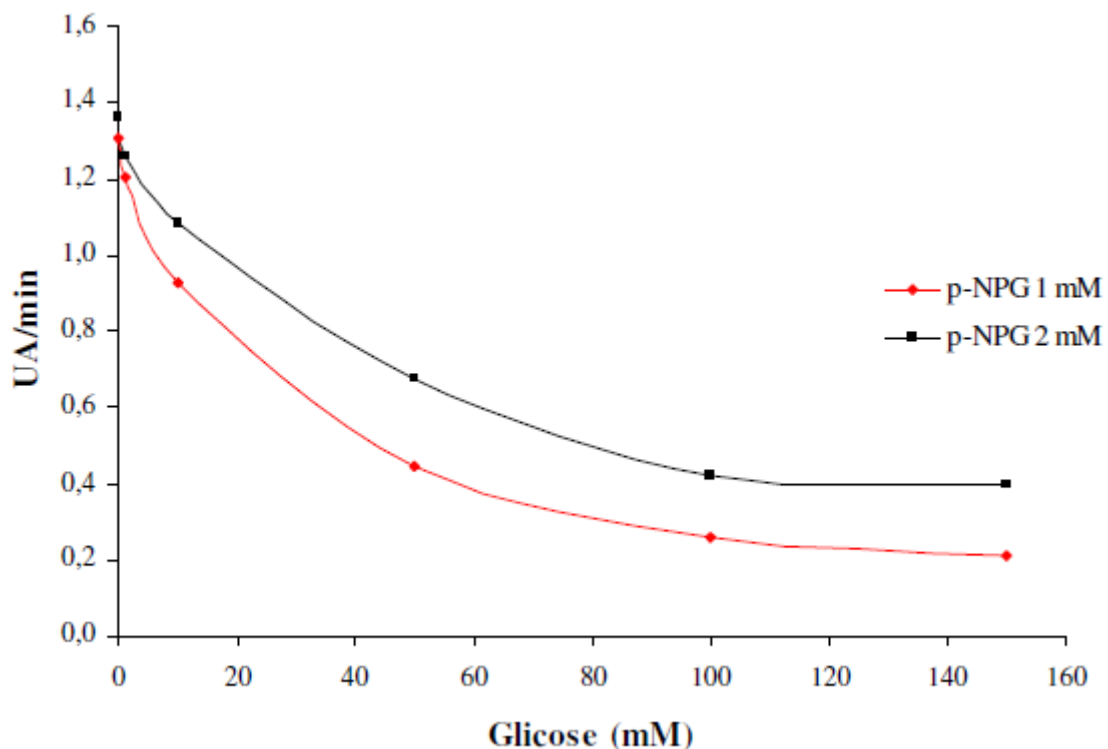


Figura 5 – Efeito da concentração da glicose sobre a atividade da β -glicosidase de cotilédones de soja.

Segundo Yang et al. (2004), a inibição competitiva pela glicose é uma característica comum das β -glicosidases, tanto vegetais quanto microbianas. Cameron et al. (2001) e Han et al. (2008) verificaram a inibição por glicose da β -glicosidase de bagaço de laranja e forragem de milho, respectivamente. No entanto, a β -glicosidase de baunilha não foi

inibida por glicose até 2 M (Odoux et al., 2003). Segundo Sonia et al. (2008), a maioria das β -glicosidases microbianas é fortemente inibida por glicose.

De acordo com Esen (2003), as β -glicosidases são inibidas por açúcares análogos como por exemplo a glucona- δ -lactona, substratos glicosídicos análogos e agliconas livres dos seus substratos, sendo que os locais de ligação no sítio ativo de agliconas e glucona são distintos. Assim, a ligação de açúcares e agliconas análogos com conformação meia-cadeira nesses sítios ativos podem inibir a atividade da enzima.

Este fato limita o uso desta enzima como agente hidrolítico em produtos de origem vegetal (Yang et al., 2004) e em processos industriais. Assim, a procura por β -glicosidases resistentes aos seus produtos de inibição e com alta estabilidade térmica tem crescido ultimamente (Leite, Alves-Prado, Cabral, Pagnocca, Gomes & Da-Silva, 2008). A compreensão da inibição ou ativação da β -glicosidase por diferentes compostos é fundamental para a sua aplicação em alimentos, uma vez que a matéria-prima é complexa e pode conter substâncias que inibem sua atividade.

Referências

- Akiyama, T., Kaku, H., & Shibuya, N. (1998). A cell wall-bound β -glucosidase from germinated rice: purification and properties. *Phytochemistry*, 48, 49–54.
- Baldrian, P., & Valaskova, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 501–521.
- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. S. (2002). Microbial β -glucosidases: Cloning, Properties and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 (4), 375–407.
- 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.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W. P., Bevan, D. R., Henrissat, B., & Esen, A. (2001). Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) β -glucosidase and a model of its complex with *p* nitrophenyl β -D-thioglucoside. *Biochemical Journal*, 354, 37–46.
- 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.
- Dixon, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochemical Journal*, 55, 170–171.
- Esen, A. (2003). β -Glucosidase. In: J. R. Whitaker; A. G. J. Voragem & D. W. S. Wong. *Handbook of Food Enzymology* (pp. 774–786). New York: Marcel Dekker Inc.
- Esen, A. (1992). Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. *Plant Physiology*, 98, 174–182.
- Harnpicharnchai, P., Champreda, V., Sornlake, W., & Eurwilaichitr, L. (2009). A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia sp.*, with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expression and Purification*, 67, 61–69.
- Han, Y., & Chen, H. (2008). Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 99, 6081–6087.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280, 309–316.
- Hsieh, M. C., & Graham, T. L. (2001). Partial purification and characterization of a soybean -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*, 58, 995–1005.
- Kim, S., & Kim, I. (2004). Oligomeric Structure of β -Glucosidases. *Journal of Photoscience*, 11, 121–127.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Leite, R. S. R., Alves-Prado, H. F., Cabral, H., Pagnocca, F. C., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2008). Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 391–395.
- Li, Y., Jiang, C., Wan, X., Zhang, Z., & Li, D. (2005). Purification and partial characterization of β -glucosidase from fresh leaves of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37, 363–370.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, 193, 265–275.
- Mateo, J. J., & Stefano, R. (1997). Description of the β -glucosidase activity in wine yeasts. *Food Microbiology*, 14, 583–591.
- Matsuura, M., & Obata, A. (1993). β -glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. *Journal of Food Science*. 58, 144–147.
- Matsuura, M., Sasaki, J., & Murao, S. (1995). Studies on β -glucosidases from soybean that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 1623–1627.
- Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 439–450.
- Morant, A. V., Jorgensen, K., Jorgensen, C., Paquette, S. M., Sánchez-Perez, R., Moller, B. L., & Bak, S. (2008). β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, 69, 1795–1813.
- Nielsen, B. L., & Brown, L. R. (1984). The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 141, 311–315.
- Opassiri, R., Cairns, J. R. K., Akiyama, T., Wara-Aswapati, O., Svasti, J., & Esen, A. (2003). Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. *Plant Science*, 165, 627–638.
- Odox, 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.
- Palmeri, R., & Spagna, G. (2007). β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 382–389.
- Park, Y. K., Aguiar, C. L., Alencar, S. M., & Scamparini, A. R. P. (2001). Biotransformação de isoflavonas de soja. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, 20, 12–14.
- Pessela, B. C. C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., Garcia, J. L., Carrascosa, A. V., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2003). The immobilization of a thermophilic β -

galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition. Complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 199–205.

Romero-Segura, C., Sans, C., & Perez, A. G. (2009). Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7983–7988.

Sarry, J. E., & Gunata, Z. (2004). Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry*, 87, 509–521.

Sonia, K. G., Chadha, B. S., Badhan, A. K., Saini, H. S., & Bhat, M. K. (2008). Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 599–604.

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.

Villena, M. A., Iranzo, J. F. U., & Pérez, A. I. B. (2007). Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 420–425.

Wolosowska, S., & Synowiecki, J. (2004). Thermostable β -glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products. *Food Chemistry*, 85, 181–187.

Yang, L., Ning, Z. S., Shi, C. Z., Chang, Z. Y., & Huan, L. (2004). Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing β -Glucosidase from endophytic bacterium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1940–1944.

Yu, H., Xua, J., Lu, W., & Lin, G. (2007). Identification, purification and characterization of β -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of *O*-glucosides. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 354–361.

Guide for Authors

An official journal of the Swiss Society of Food Science and Technology (SGLWT/SOSSTA) and the International Union of Food Science and Technology (IUFoST).

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.

Papers featuring animal trials are outside the scope of the journal and will not be considered for publication.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Submission for all types of manuscripts to *LWT -Food Science and Technology* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal,

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

Three types of peer-reviewed papers will be published:

Timely Reviews. These concise reviews 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, but should include all major findings and bring together reports from a number of sources. 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 reviews will receive priority in publication.

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 -Research papers and research notes

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://www.authors.elsevier.com/artworkinstructions>. 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>).

PREPARATION OF MANUSCRIPTS -Timely Reviews

Timely reviews on topics of interest to wide readership will be published. The reviews may address pertinent issues in food science, technology, processing, nutritional aspects of raw and processed foods and may include nutraceuticals, functional foods, use of "omics" in food quality, food processing and preservation, and food production. Articles should be focused on a narrow topic of interest. Topics to be covered should be at the cutting edge of science, well thought out, succinct, focused and clear. Ideally, the review should provide a view of the state of the art and suggest possible future needs and trends. All articles will be subjected to peer review process.

Submit an abstract of the proposed review to the Reviews Editor (Professor Shridhar Sathe, ssathe@fsu.edu for consideration prior to preparing the full length manuscript. Abstract of the proposed work should include the following:

- a. The abstract should identify the need for the proposed article, the intended audience, and five key words.
- b. Title (120 characters or less)
- c. Short abstract (≤ 300 words).
- d. Identify the address and contact information for the contact author. The contact information should include author name, postal address, telephone number, fax number, and email.
- e. Anticipated time needed to complete the proposed work once the initial abstract has been approved.

Manuscript Preparation

- a. All manuscripts must be electronically submitted through the journal web-site.
- b. Use 8.5 x 11" (or A4) page size.
- c. All lines and pages must be numbered.
- d. All text should be double-spaced.
- e. Set all margins at 1".
- f. Total manuscript length $\leq 3,000$ words (text portion).
- g. Total number of Tables ≤ 5 .
- h. Total number of figures ≤ 5 .
- i. Maximum number of references (including those cited in tables and figures) not to exceed 50.
- j. In the reference list identify five (5) key references (indicated by an * in front of the reference in the reference section). In two to three sentences explain why this reference is a key reference.
- k. All tables and figures must be prepared according to LWT style (please refer to instructions prior to this section).

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

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. 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://www.elsevier.com/copyright>). 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 at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. 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.

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO B

O ARTIGO “APLICAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA EM FARINHA DE SOJA INTEGRAL” SERÁ SUBMETIDO À REVISTA CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. AS NORMAS PARA PUBLICAÇÃO ESTÃO ANEXADAS APÓS O ARTIGO.

APLICAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA EM FARINHA DE SOJA INTEGRAL

APPLICATION OF β -GLUCOSIDASE FROM THE SOYBEAN COTYLEDONS IN INTEGRAL SOYBEAN MEAL

Rafael Fernandes Santos, Luciana Carvalho Grade, Mara Lúcia Luiz Ribeiro

APLICAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA EM FARINHA DE SOJA INTEGRAL

APPLICATION OF β -GLUCOSIDASE FROM THE SOYBEAN COTYLEDONS IN INTEGRAL SOYBEAN MEAL

Rafael Fernandes Santos¹, Luciana Carvalho Grade¹, Mara Lúcia Luiz Ribeiro¹

Relevância do trabalho

O consumo de soja, principalmente no Oriente, é elevado devido seus benefícios a saúde. Dentre os compostos funcionais da soja, as isoflavonas são as mais investigadas em relação a esses benefícios. Na soja, as isoflavonas estão predominantemente na forma conjugada e glicosídica com traços da forma aglicona. Porém, as isoflavonas agliconas são melhor e mais rapidamente absorvidas em relação as glicosídicas. A β -glicosidase presente na microflora intestinal é responsável pela modificação das formas das isoflavonas no organismo humano. Assim, a aplicação de β -glicosidase na indústria apresenta um grande potencial para a produção de alimentos de soja com alto teor de isoflavonas agliconas.

Resumo

As isoflavonas são compostos fenólicos relacionados a benefícios a saúde. Estão presentes em muitos vegetais, principalmente na soja, onde são encontradas predominantemente nas formas conjugadas e glicosídicas no grão e nos produtos não fermentados e na forma aglicona nos produtos fermentados, sendo esta melhor absorvida em relação as glicosídicas. A β -glicosidase é responsável pela modificação das formas das isoflavonas e sua aplicação na indústria é de grande relevância na produção de alimentos de soja com alto teor de isoflavonas agliconas. O objetivo do trabalho foi aplicar β -glicosidase de cotilédones de soja em farinha de soja integral. A β -glicosidase purificada e parcialmente purificada foi aplicada em farinha

¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR-Brasil. * A quem a correspondência deve ser enviada: e-mail: maraluciaribeiro@uel.br tel/fax: 55 (43) 3371-4270.

de soja integral sob diferentes condições de tratamentos (autoclavada, mantida em banho fervente e sem tratamento) através de um planejamento experimental com esquema fatorial 2^2 onde foi avaliada a influência das variáveis tempo de incubação e concentração da enzima na liberação de glicose. Os melhores resultados obtidos com a aplicação da enzima foram em 6 horas de incubação, independente da concentração de enzima sendo que a β -glicosidase purificada mostrou-se mais ativa na liberação de glicose em relação à parcialmente purificada.

Palavras-chave: Aplicação. β -glicosidase. Farinha de soja integral.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a procura por alimentos derivados de soja tem aumentado devido a divulgação dos benefícios à saúde atribuídos ao consumo desta leguminosa. Entre os compostos funcionais da soja, as isoflavonas são as mais investigadas em relação a esses efeitos (ISMAIL; HAYES, 2005).

A forma química das isoflavonas é de grande importância, considerando que ela influencia na sua atividade biológica e na biodisponibilidade (SETCHELL; CASSIDY, 1999). Pesquisas mostram que a forma aglicona é absorvida mais rapidamente do que as isoflavonas glicosídicas (IZUMI et al., 2000). Porém, na soja, a maioria das isoflavonas estão na forma conjugada e β -glicosídica e em menor quantidade na forma aglicona (XIE et al., 2003). Nos produtos fermentados de soja há predominância das isoflavonas agliconas, enquanto que em produtos não fermentados estão presentes principalmente as formas β -glicosídicas conjugadas (LIU, 1997). As β -glicosidases (β -D-glicosídeos glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são hidrolases capazes de clivar ligação β -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos e outros conjugados glicosídicos. Estão presentes naturalmente na soja ou são produzidas por microrganismos inoculados em produtos fermentados, podendo hidrolisar as isoflavonas β -glicosídicas, liberando glicose e agluconas (WANG; MURPHY, 1996). Segundo Matsuura, Obata e Fukushima (1989), a β -glicosidase endógena de soja tem capacidade de hidrolisar isoflavonas, porém, sua ação hidrolítica está relacionada com a hidratação do grão.

A transformação de isoflavonas em produtos de soja não fermentados foi relatada por alguns autores. Park et al. (2001) converteram isoflavonas β -glicosídicas de farinha de soja desengordurada em agliconas pela fermentação em estado semi-sólido com *Aspergillus oryzae*. Xie et al. (2003) analisaram a conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas em produtos comerciais de soja como o SoyLife (extrato de germen de soja) e o Soy Meal (farinha de soja) usando β -glicosidase comercial de *Penicillium multicolor*. Matsuura e

Obata (1993) observaram que as β -glicosidases de soja hidrolisaram as isoflavonas glicosídicas do leite de soja, sendo que genistina foi mais facilmente hidrolisada do que a daidzina. O objetivo do trabalho foi aplicar β -glicosidase purificada e parcialmente purificada em farinha de soja integral para obtenção de um produto com elevado teor de isoflavonas agliconas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA β -GLICOSIDASE PURIFICADA

A β -glicosidase foi extraída de farinha de cotilédones de soja com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6, na proporção de 1:10 (p/v), com posterior centrifugação a 4000 x g, 4°C por 15 min. O sobrenadante foi acidificado com HCl 0,1N até pH 5,0 e centrifugado para obtenção do extrato bruto que foi fracionado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0–40% e 40–85%. Os precipitados (P_{0-40} e P_{40-85}), ressuspensos em tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0 e os sobrenadantes (S_{0-40} e S_{40-85}) foram dialisados no mesmo tampão. Nos dialisados foram determinados a atividade de β -glicosidase utilizando o substrato sintético p -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p -NPG) (MATSUURA; OBATA, 1993) e teor de proteínas solúveis (LOWRY et al., 1954). A fração com maior atividade de β -glicosidase (P_{40-85}) foi concentrada em célula de ultrafiltração (Amicon, modelo 8400 – Millipore) por retenção em membrana de exclusão molecular de 1 kDa (Celulose regenerada – Millipore) e aplicada em coluna de troca iônica com CM Sephadex C-50, eluída por gradiente de NaCl 0–1M em tampão fosfato-citrato. A fração com maior atividade específica de β -glicosidase (F_4) foi concentrada por membrana de 1 kDa e dialisada para aplicação em coluna de filtração em gel com Sephadex G-100. A PAGE-nativa (DAVIS, 1964) foi utilizada para acompanhar o processo de purificação. A coloração e revelação foi segundo Nielsen e Brown (1984) utilizando nitrato de prata. A fração F_{42} purificada foi utilizada para aplicação em farinha de soja integral (FSI)

2.2 OBTENÇÃO DA β -GLICOSIDASE PARCIALMENTE PURIFICADA

A β -glicosidase parcialmente purificada foi obtida pela extração e fracionamento com sulfato de amônio como descrito no item 2.1. Após o fracionamento, a

fração P₄₀₋₈₅ foi filtrada em célula de ultrafiltração (Amicon, modelo 8400 -Millipore) em membrana de exclusão molecular de 100 kDa (PBHK, polietersulfona – Millipore). O concentrado foi utilizado como fonte da β -glicosidase para aplicação em FSI.

2.3 TRATAMENTO DA FARINHA DE SOJA INTEGRAL (FSI)

Para a aplicação da β -glicosidase, a farinha de soja integral foi tratada sob diferentes condições: autoclavada (121°C/30 min), mantida em banho fervente (100°C/1h) e sem tratamento (condição ambiente -25°C).

2.4 APLICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE PARCIALMENTE PURIFICADA EM FSI

Os experimentos de aplicação de β -glicosidase parcialmente purificada em FSI foram realizados através de um planejamento experimental com esquema fatorial 2^2 (resolução full) com triplicata no ponto central e dois níveis (-1 e +1) (Tabela 1 e 2). Foi avaliada a influência das variáveis independentes tempo de incubação e concentração da enzima sobre a liberação de glicose (variável dependente). As variáveis independentes foram selecionadas de acordo com as condições descritas na literatura. Os ensaios de aplicação de β -glicosidase em FSI foram conduzidos aleatoriamente.

A variável dependente ou função resposta foi determinada pelo método da glicose oxidase em sistema automatizado (Selectra 1, Vitalab/Merck). Neste procedimento, a glicose liberada pela hidrólise de isoflavonas glicosídicas foi quantificada por espectrofotometria a 420 nm e o resultado expresso como teor de glicose liberada (Y = μ g de glicose/g de FSI).

Para cada tratamento da FSI foi realizado um planejamento experimental. Os ensaios foram feitos em tubos de ensaio contendo 250 mg de FSI onde foram adicionados 1 mL de tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0 contendo a β -glicosidase, e incubados a 30°C. A concentração de enzima e o tempo de incubação foram de acordo com o planejamento experimental. Após o tempo de incubação, a atividade da enzima foi interrompida em banho fervente por 5 min e em seguida o material foi centrifugado a 4000 x g por 15 min. Do sobrenadante foi determinado o teor de glicose.

Tabela 1 – Fatores e níveis do planejamento experimental

Fator	Nível		
	-1	0	+1
Tempo (h)	2	4	6
Enzima (UA)	10	30	50

Tabela 2 – Planejamento experimental com esquema fatorial 2^2 para duas variáveis independentes em dois níveis de variação (-1 e +1) e três repetições do ponto central (0)

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas	
	X ₁	X ₂	Tempo (h)	Enzima (UA)
1	-1	-1	2	10
2	+1	-1	6	10
3	-1	+1	2	50
4	+1	+1	6	50
5 (C)	0	0	4	30
6 (C)	0	0	4	30
7 (C)	0	0	4	30

2.5 APLICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE PURIFICADA EM FSI

O tratamento da FSI que apresentou o melhor resultado na liberação de glicose após a aplicação da β -glicosidase parcialmente purificada foi escolhido para a aplicação da enzima purificada. Foi realizado um novo planejamento experimental nas mesmas condições, de acordo com o item 2.4.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% e os mapas de superfície de resposta foram realizadas utilizando-se o software Statistica 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 APLICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE PARCIALMENTE PURIFICADA EM FSI

A β -glicosidase atua na ligação β -glicosídica das isoflavonas conjugadas liberando a fração aglicona e glicose. Assim, a liberação de glicose é diretamente proporcional à liberação de isoflavonas agliconas.

Os experimentos de aplicação de β -glicosidase parcialmente purificada em FSI foram realizados na farinha em três condições: autoclavada (121°C/30 min), mantida em banho-fervente (100°C/1h) e sem tratamento (condição ambiente -25°C). Foi investigado o efeito dos fatores (tempo de incubação e concentração da enzima) para a liberação de glicose, sendo os resultados expressos em nível de glicose liberada (μg de glicose/g de FSI). Os resultados obtidos utilizando a β -glicosidase parcialmente purificada nos diferentes tratamentos da FSI são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos utilizando a β -glicosidase parcialmente purificada

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas		Resposta (Y) μg de glicose/g de FSI		
	X ₁	X ₂	Tempo (h)	Enzima (UA/min)	sem tratamento*	100°C/1h*	autoclavada*
1	-1	-1	2	10	424	572	0
2	1	-1	6	10	2288	2556	24
3	-1	1	2	50	804	768	140
4	1	1	6	50	2280	2256	484
5 (C)	0	0	4	30	1872	1928	156
6 (C)	0	0	4	30	1836	1316	144
7 (C)	0	0	4	30	1600	1528	120

* Tratamento da FSI

Os dados do planejamento experimental foram analisados utilizando-se o programa Statistica 7.0. Através deste, determinou-se o efeito das variáveis independentes e sua significância estatística através do nível de confiabilidade (95%). As estimativas dos

efeitos principais e de interação das variáveis independentes sobre a variável dependente são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Efeitos das variáveis independentes sobre a variável dependente utilizando β -glicosidase parcialmente purificada

Variáveis	Sem tratamento*		100°C/1h*		Autoclavada*	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
Tempo	1.670,00	0,008559	1.736,00	0,006617	184,00	0,003763
Enzima	186,00	0,541136	-52,00	0,852516	300,00	0,000897
Tempo x Enzima	-194,00	0,525104	-248,00	0,405498	160,00	0,005631
<i>Lack of fit</i>	248141	0,215811	68963	0,865054	829,7	0,256689
R ²	0,92873		0,93958		0,99005	

* Tratamento da FSI

** Resultados em negrito são estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

Na Tabela 4 observa-se que tanto a FSI sem tratamento quanto a tratada em banho-fervente (100°C/1h), tiveram um efeito significativo ($p < 0,05$) somente para a variável tempo, com R² de 0,9287 e 0,9396, respectivamente. Isto indica que modelo descrito explica 92,9% e 94% da resposta encontrada. A variável tempo apresentou um efeito positivo na resposta de liberação de glicose, ou seja, um aumento deste fator acarreta em um aumento na resposta, enquanto que a concentração da enzima teve um efeito negativo. Além disso, o *lack of fit* não significativo ($p > 0,05$) demonstra que o modelo de regressão foi ajustado aos dados experimentais.

Para a FSI autoclavada (121°C/30 min), todos os efeitos foram significativos ($p < 0,05$), com R² de 0,99005, ou seja, o modelo explica 99% dos dados. Além disso, o *lack of fit*, não significativo, é outra indicação de que os dados estão ajustados ao modelo. Neste experimento, a variável tempo e enzima foram positivos, sendo que o aumento na concentração da enzima tem um efeito duas vezes maior do que o tempo.

A partir dos dados experimentais foram geradas superfícies de resposta (Figura 1) onde pode-se concluir que houve um aumento linear na liberação de glicose com o decorrer do tempo de incubação da enzima na FSI sem tratamento e na tratada em banho fervente (100°C/1h), sendo obtido neste último tratamento os melhores resultados. O maior teor de glicose liberada foi em 6 h de incubação, independentemente da concentração da

enzima, com média de liberação de 2.406 μg de glicose/g de FSI. Um aumento de 50% na liberação de glicose foi verificado entre 4 e 6 h de incubação, sendo que, a partir de 4,5 h, a liberação entra na região ótima.

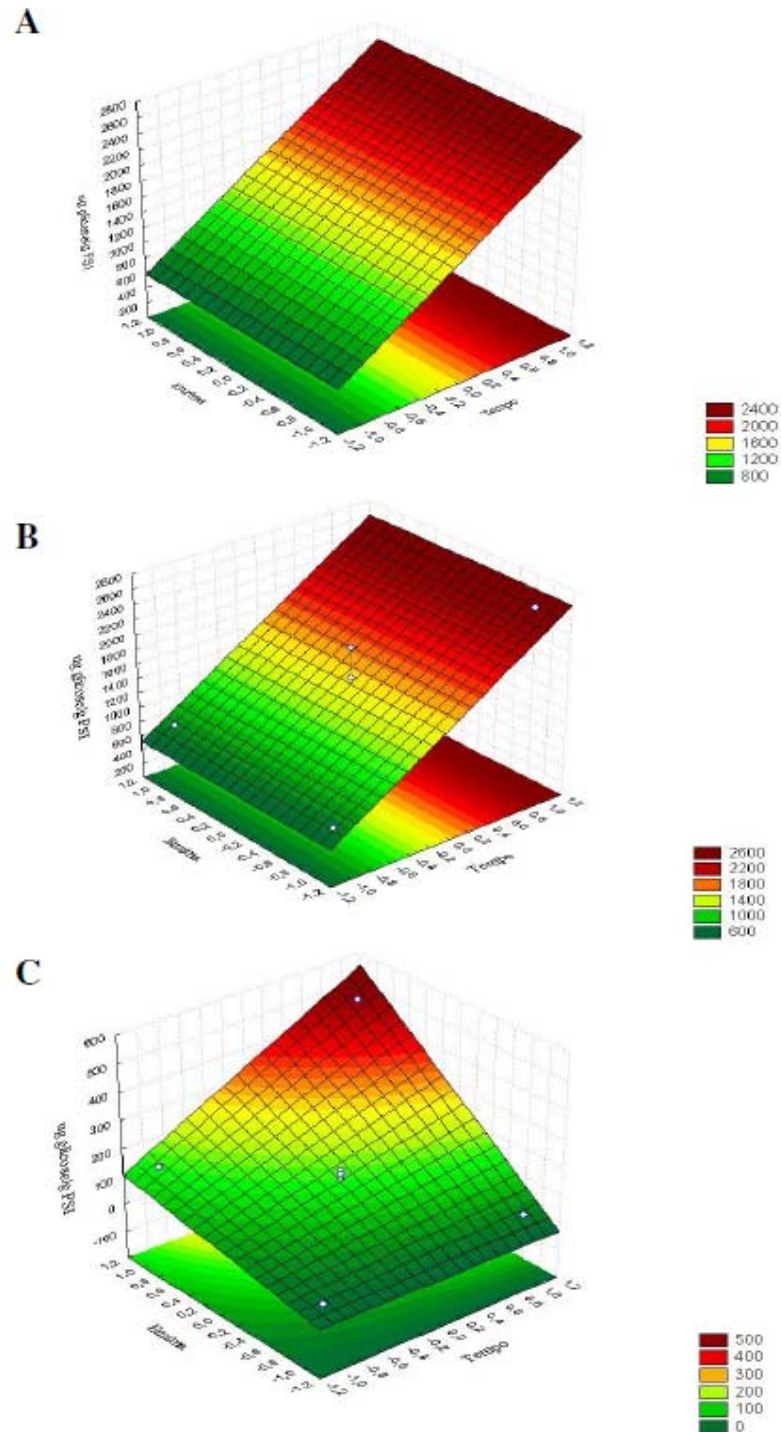


Figura 1 – Superfícies de resposta utilizando β -glicosidase parcialmente purificada. (A) sem tratamento; (B) banho-fervente (100°C)/1h; (C) autoclavada.

Na FSI sem tratamento, a liberação de glicose mostrou-se semelhante (2.284 μg de glicose/g de FSI), sendo apenas 5% menor do que a da FSI tratada em banho fervente (100°C/1h). Em relação à FSI autoclavada (121°C/30 min), a liberação de glicose foi 5 vezes menor em relação aos resultados obtidos nos outros planejamentos. O melhor resultado para esse tratamento foi no tempo de incubação de 6 h com 50 UA de β -glicosidase, liberando 484 μg de glicose/g de FSI.

A farinha de soja integral foi tratada em diferentes condições de temperatura uma vez que há relatos de que a temperatura pode transformar as formas de isoflavonas. A forma de aquecimento empregada durante o processamento da soja interfere significativamente na transformação das formas químicas de isoflavonas. Segundo Wang e Murphy (1996), a extrusão com altas temperaturas e pressão favorecem a desesterificação dos conjugados malonilglicosídicos e formação de β -glicosídeos. Park et al. (2002) observaram uma redução média de 17,6 vezes no teor de malonil isoflavonas e um aumento nas concentrações de glicosil isoflavonas na extração de isoflavonas após tratamento térmico a 121°C por 40 min. Yuan et al. (2009) analisaram a mudança no perfil de isoflavonas no hipocótilo e cotilédones de soja durante o tratamento térmico em diferentes temperaturas. Os resultados mostraram que a forma malonilglicosídica na soja foi instável, sendo convertida nas formas acetilglicosídicas e β -glicosídicas, mais estáveis, através da descarboxilação e desesterificação. A forma malonilglicosídica não foi mais detectada após 25 min a 150°C e 60 min a 130°C. De acordo com Chien et al. (2005) os conjugados malonil são convertidos preferencialmente em acetil sob aquecimento seco e sob aquecimento úmido a conversão se dá em β -glicosídeos.

As β -glicosidases podem hidrolisar os β -glicosídeos, liberando glicose e agluconas (WANG; MURPHY, 1996). Desta forma, esperava-se que os melhores resultados fossem encontrados na FSI autoclavada. Os baixos teores de glicose liberada pode estar associado à alteração da cor da FSI após a autoclavação, ficando mais escura. Segundo Ribeiro e Seravalli (2004), as reações que provocam escurecimento dos alimentos podem ser enzimáticas, catalisada pela polifenoloxidase e não envolve carboidratos, ou não enzimática, envolvendo os fenômenos de caramelização e a reação de Maillard. Estes fenômenos podem liberar algum açúcar, substrato ou produto análogo que iniba a atividade da β -glicosidase, diminuindo a liberação de glicose e conseqüentemente a liberação de isoflavonas agliconas. De acordo com Esen (2003), as β -glicosidases são inibidas por açúcares análogos, como por exemplo, a glucona- δ -lactona, substratos glicosídicos análogos e agliconas livres dos seus

substratos. Estes resultados são preliminares, sendo necessárias análises do perfil de isoflavonas para que possam ser melhores compreendidos.

3.2 APLICAÇÃO DE β -GLICOSIDASE PURIFICADA EM FSI

O melhor resultado obtido com a aplicação de β -glicosidase parcialmente purificada foi encontrado com FSI mantida em banho fervente (100°C/1h), no entanto, a diferença em relação a farinha não tratada foi de apenas 5%, o que torna esse tratamento não necessário, já que eleva os custos da produção. Desta forma, a FSI sem tratamento foi escolhida para a aplicação da β -glicosidase purificada.

A aplicação da enzima purificada ocorreu nas mesmas condições da aplicação da β -glicosidase parcialmente purificada. Na Tabela 5 são apresentados os resultados obtidos utilizando a β -glicosidase purificada. O efeito das variáveis independentes sobre a resposta e a significância estatística através do nível de confiança de 95% foram analisados utilizando-se o Statistica 7.0. As estimativas dos efeitos principais e de interação das variáveis independentes sobre a variável dependente utilizando a β -glicosidase purificada são apresentados na Tabela 6.

Tabela 5 – Resultados obtidos utilizando a β -glicosidase purificada

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas		μg de glicose/g de FSI
	X ₁	X ₂	Tempo (h)	Enzima (UA/min)	FSI sem tratamento
1	-1	-1	2	10	1212
2	1	-1	6	10	2828
3	-1	1	2	50	960
4	1	1	6	50	2736
5 (C)	0	0	4	30	1608
6 (C)	0	0	4	30	1432
7 (C)	0	0	4	30	1952

Conforme observa-se na Tabela 6, o efeito foi significativo ($p < 0,05$) somente para o tempo, com R^2 de 0,9163, ou seja, 91,6% dos dados estão ajustados aos dados. O *lack of fit* não foi estatisticamente significante ($p > 0,05$), confirmando que o modelo de

regressão foi ajustado aos experimentos. A partir dos dados obtidos foi gerado um gráfico de superfície de resposta mostrado na Figura 2.

Tabela 6 – Efeitos das variáveis independentes sobre a variável dependente utilizando β -glicosidase purificada

Variáveis	Efeito	p
Tempo	1.696,00	0,010667
Enzima	-172,00	0,603287
Tempo x Enzima	80,00	0,805205
<i>Lack of fit</i>	124971	0,313114
R^2		0,91633

* Tratamento da FSI

** Resultados em negrito são estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

Com a aplicação da β -glicosidase purificada obteve-se um perfil linear semelhante ao observado na aplicação de β -glicosidase parcialmente purificada, sendo o maior teor de glicose liberada também encontrado em 6 horas de incubação, independentemente da concentração da enzima. No entanto, em comparação com os resultados obtidos nos ensaios com a enzima parcialmente purificada, houve um aumento na liberação de 24%. A enzima purificada mostrou-se mais ativa nas duas primeiras horas de incubação quando comparada com a parcialmente purificada.

A utilização de enzimas purificadas na indústria não é economicamente viável. Neste caso, o uso do extrato bruto é mais adequado, uma vez que a enzima bruta custa em torno de 1% do em relação às enzimas purificadas. No entanto, é certo que o ambiente pode afetar as enzimas. Diversos componentes do meio (como outras enzimas, inibidores ou sais) podem afetar a atividade e a termoestabilidade da enzima (LEITE et al., 2008)

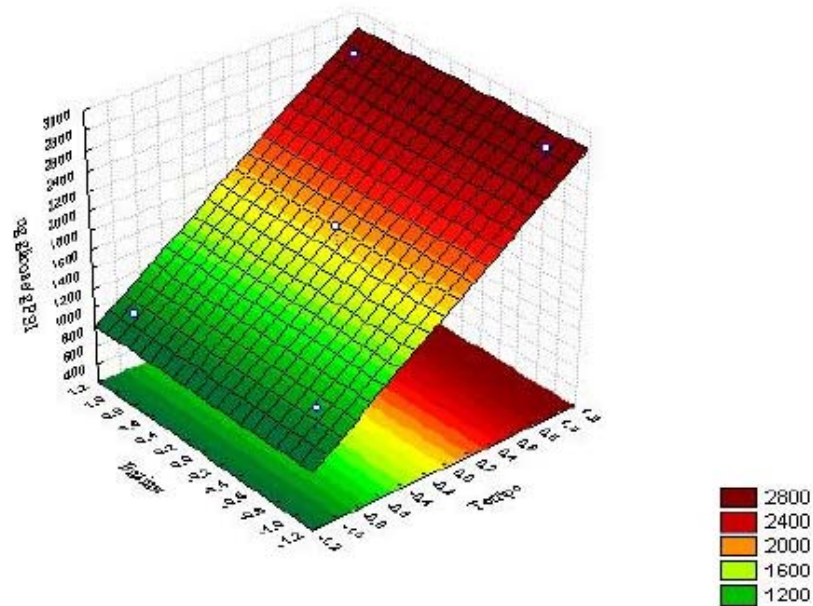


Figura 2 – Superfície de resposta utilizando β -glicosidase purificada

A aplicação do planejamento fatorial para avaliar a influência do tempo e da concentração da β -glicosidase endógena de soja na farinha de soja integral é inédito. Apesar dos planejamentos fatoriais do tipo $2k$ serem mais comuns, e que com um número reduzido de níveis não se explora de maneira completa uma grande região no espaço das variáveis, estes ainda se mostram vantajosos, pois permitem verificar tendências importantes para a realização de investigações posteriores.

CONCLUSÕES

A aplicação da β -glicosidase em FSI mostrou-se eficiente na liberação de glicose. Os tratamentos da farinha influenciaram na resposta dos planejamentos quando aplicada a β -glicosidase parcialmente purificada, sendo os melhores resultados obtidos com a FSI mantida em banho fervente (100°C/1h). Somente a variável tempo de incubação foi significativa, com 6 horas de incubação houve a maior liberação de glicose, independente da concentração de enzima utilizada. A β -glicosidase purificada mostrou-se mais ativa na liberação de glicose em relação à parcialmente purificada.

REFERÊNCIAS

- CHIEN, J. T.; HSIEH, H. C.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. **Food Chemistry**, v. 91, p. 425–434, 2005.
- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 404–427, 1964.
- ESEN, A. **β -Glucosidase**. In: Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker Inc., 2003.
- ESTEVEZ, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 43–52, 2001.
- FDA -FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food labeling: Health claims, soy protein and coronary heart disease. **Federal Register**, v. 64, 1999.
- ISMAIL, B.; HAYES, K. β -glucosidase activity toward different glycosidic forms of isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4918–4924, 2005.
- IZUMI, T.; PISKULA, M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1695–1699, 2000.
- LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391–395, 2008.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. IPT., 1997.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 144–147, 1993.
- NIELSEN, B. L.; BROWN, L. R. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 141, p. 311–315, 1984.
- PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 130–135, 2002.
- PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 20, p. 12–14, 2001b.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. Editora Edgard Blucher Ltda, 2004.
- SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 758–767, 1999.

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

YUAN, J.; LIU, Y.; PENG, J.; WANG, J.; LIU, X. Changes of isoflavone profile in the hypocotyls and cotyledons of soybeans during dry heating and germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9002–9010, 2009.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

NORMAS PARA A APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS CONTEÚDO DA PUBLICAÇÃO Artigos

Originais

Trabalhos que descrevam descobertas originais e de maior importância e devem ser escritos de maneira clara e sucinta. **Artigos originais não podem exceder 5.000 palavras (excluindo resumo, abstract, tabelas, figuras, legendas e referências) e preferencialmente não devem ultrapassar o limite conjunto de 7 figuras e tabelas.** Cada manuscrito deve fornecer palavras-chave, resumo de 200 palavras ou menos que delineie as principais descobertas da pesquisa, e ser acompanhado por uma folha de rosto e página de autoria.

Comunicações

Comunicações sobre tópicos de amplo interesse dentro da área de tecnologia de alimentos serão aceitas para avaliação desde que escritas de maneira clara e sucinta. **Comunicações não podem exceder 5.000 palavras (excluindo resumo, abstract, tabelas, figuras, legendas e referências) e preferencialmente não devem ultrapassar o limite conjunto de 7 figuras e tabelas.** Cada manuscrito deve fornecer palavras-chave, resumo de 200 palavras ou menos que delineie claramente os tópicos de amplo interesse abordados na comunicação, e ser acompanhado por uma folha de rosto e página de autoria.

FORMATAÇÃO DOS MANUSCRITOS

Primeira página

A primeira página de manuscritos submetidos deve conter obrigatoriamente as seguintes informações nesta ordem:

- **relevância do trabalho:** breve texto de no máximo 100 palavras que descreva sucintamente a relevância do trabalho;
- **título do trabalho:** em inglês e português, e título para cabeçalho;
- título para cabeçalho de página, com no máximo 15 palavras.

Página de autoria

A página de autoria do manuscrito deverá conter as seguintes informações:

- informação para correspondência do Autor para correspondência (endereço postal completo, números de telefone e FAX, e endereço de e-mail).
- nomes completos de todos os autores;
- nomes das instituições onde o trabalho foi desenvolvido.

Página do Resumo e palavras-chave

Todos os artigos e comunicações precisam obrigatoriamente vir acompanhados de um resumo. **Trabalhos devem incluir também o resumo em português. O resumo deve sempre:**

- estar em um único parágrafo de no máximo 200 palavras;
- explicitar claramente o objetivo principal do trabalho;
- se aplicável, descrever materiais, métodos e resultados;
- discutir possíveis implicações do trabalho;
- sumarizar as conclusões;
- ser legível também por não-especialistas da área;

- definir abreviações e siglas utilizadas;
- incluir de três a seis palavras-chave, evitando-se a utilização de termos já utilizados no título e resumo. O resumo não deve conter:
- notas de rodapé;
- dados e valores estatísticos significativos;
- referências bibliográficas.

Texto

O trabalho deverá ser dividido nas seguintes partes, quando apropriado, numeradas nessa ordem:

- 1. Introdução;
- 2. Material e métodos;
- 3. Resultados e discussão (podendo ser separados, se necessário);
- 4. Conclusões;
- 5. Referências bibliográficas;
- Agradecimentos;
- Tabelas;
- Figuras;
- Quadros.

No texto:

- abreviações, siglas e símbolos devem ser claramente definidos na primeira ocorrência;
- notas de rodapé não são permitidas;
- tabelas, figuras e quadros devem ser numerados com numerais arábicos seguindo a ordem em que são citados;
- títulos e subtítulos são recomendados, sempre que necessários, mas devem ser utilizados com critério, sem prejudicar a clareza do texto;
- equações devem ser geradas por programas apropriados e identificadas no texto com algarismos arábicos entre parêntesis na ordem que aparecem;
- as referências devem ser numeradas em ordem alfabética;
- as legendas das figuras e quadros devem estar em ordem numérica no final do texto.

Todo material submetido deve estar digitado em espaçamento duplo, em uma coluna somente e alinhado à esquerda, deixando as margens esquerda e direita de pelo menos 2,5 cm. As linhas devem estar numeradas sequencialmente, sendo esta numeração iniciada em cada página. As páginas devem ser numeradas seqüencialmente.

Nomes proprietários

Matérias-primas, equipamentos especializados e programas de computador utilizados deverão ter sua origem (marca, modelo, cidade, país) especificada.

Unidades de medida

- todas as unidades devem estar de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI);
- temperaturas devem ser descritas em graus Celcius.

Símbolos e abreviações

Defina símbolos, abreviações e siglas em sua primeira ocorrência, tanto no resumo quanto no texto. Abreviações criadas pelos autores devem ser evitadas, mas se utilizadas devem estar claramente definidas na primeira ocorrência, tanto no resumo quanto no texto.

Notas de rodapé

Notas de rodapé não devem ser utilizadas.

Referências Bibliográficas

Citações no texto

As citações bibliográficas inseridas no texto devem ser indicadas pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) em letra maiúscula, seguido(s) pelo ano da publicação (ex.: SILVA et al, 2005), sendo que:

- artigos com um ou dois autores, citam-se os sobrenomes de ambos;
- artigos com três ou mais autores, cita-se o sobrenome do primeiro autor, seguido da expressão “et al.”;
- se o nome do autor não é conhecido, cita-se a primeira palavra do título.

Lista de referências

Toda a literatura citada ou indicada no texto deverá ser listada em ordem alfabética. Artigos em preparação ou submetidos a avaliação não devem ser incluídos nas referências. A formatação das referências deve seguir o padrão estabelecido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) em “Regras Gerais de Apresentação” -NBR-6023, de agosto, 2002.

Segundo determinação da diretoria de publicações da SBCTA artigos aceitos cujas referências bibliográficas estejam fora do padrão determinado ou com informações incompletas **NÃO SERÃO PUBLICADOS** até que os autores tenham as referências totalmente adequadas às normas. **Exemplos de referências:**

Livros

BACCAN, N.; ALEIXO, L. M.; STEIN, E.; GODINHO, O. E. S. **Introdução à semimicroanálise qualitativa**, 6ª. edição. Campinas: EDUCAMP, 1995.

Capítulos de livro

SGARBIERI, V. C. Composição e valor nutritivo do feijão *Phaseolus vulgaris* L. In: BULISANI, E. A (Ed.) **Feijão: fatores de produção e qualidade**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. Cap. 5, p. 257-326.

Artigos em periódicos e anais

KINTER, P. K.; van BUREN, J. P. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenyl method. **Journal Food Science**, v. 47, n. 3, p. 756-764, 1982.

Artigos apresentados em encontros científicos

JENSEN, G. K.; STAPELFELDT, H. Incorporation of whey proteins in cheese. Including the use of ultrafiltration. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Factors Affecting the Yield of Cheese**. 1993, Brussels: International Dairy Federation Special Issue, n. 9301, chap. 9, p. 88-105.

Dissertações, teses e relatórios

CAMPOS, A C. **Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesófilo no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo minas frescal**. Campinas, 2000, 80p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Trabalhos em meio-eletrônico

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: _____. **Entendendo o meio ambiente**. São Paulo, 1999. v. 1. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/sma/entendendo/atual.htm>>. Acesso em: 8 mar. 1999.

Legislação

BRASIL. Portaria n. 451, de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 set. 1997, Seção 1, n. 182, p. 21005-21011.

Tabelas

As tabelas devem ser intituladas e citadas com numerais Arábicos e estar inseridas diretamente no corpo do texto no local de preferência. Caso o autor precise enviar a tabela em arquivo separado este deve ser nomeado de maneira clara (ex. tabela1.doc etc). As tabelas devem ser elaboradas utilizando-se o recurso de tabelas do programa Microsoft® Word, e devem:

- ter o número de algarismos significativos definidos com critério;
- ser em número reduzido para criar um texto consistente, de leitura fácil e contínua;
- não apresentar os mesmos dados na forma de gráfico e tabela;
- utilizar o formato mais simples possível, evitando sombreado, cores ou linhas verticais e diagonais;
- utilizar somente letras minúsculas sobrescritas para denotar notas de rodapé que informem abreviações, unidades etc. **Demarcar primeiramente as colunas e depois as linhas e seguir esta mesma ordem no rodapé;**

Figuras e quadros

Devem ser citados e numerados em ordem numérica utilizando-se numerais Arábicos. Enviar obrigatoriamente em arquivos separados, com a máxima qualidade possível. Enviar os arquivos preferencialmente no formato original em que foram gerados (TIF, XLS, EPS, BMP, JPG ou DOC). Os arquivos devem ser adequadamente identificados com o número citado na legenda (ex.: figura1.tif, figura2.eps, figura3.doc etc). Ao enviar figuras com fotos ou micrografias certifique-se que estas sejam escaneadas em alta resolução para que cada foto fique com no mínimo 1.000 *pixels* de largura. Para representar fichas, esquemas ou fluxogramas utilize quadros.

Trabalhos envolvendo humanos

Quando houver apresentação de resultados de pesquisas envolvendo seres humanos, citar o número do processo de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, conforme Resolução nº 196/96, de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde.

5.3 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

O trabalho intitulado “Atividade de β -glicosidase em diferentes leguminosas” foi apresentado na V Semana de Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina – Londrina/PR.

O trabalho intitulado “Obtenção de β -glicosidase purificada de cotilédones de soja” foi apresentado no 8º SLACA -Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos -“Ciência de Alimentos no mundo globalizado: novos desafios, novas perspectivas” – Campinas/SP.

O trabalho intitulado “Determinação da massa molecular de β -glicosidase de cotilédones de soja” foi apresentado no 8º SLACA -Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos -“Ciência de Alimentos no mundo globalizado: novos desafios, novas perspectivas” – Campinas/SP.

Anais da V Semana de Biotecnologia 1 - 2009
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - Universidade Estadual de Londrina
Disponível em <http://www.uel.br/eventos/semanabiotec/?content=trabalhos.htm>

ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE EM DIFERENTES LEGUMINOSAS

Rafael Fernandes Santos¹; Luciana Carvalho Grade¹; Mara Lucia Luiz Ribeiro².

¹ Mestrado em Biotecnologia – Depto. Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL

² Docente Depto. Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL – C.P. 6001, CEP 86.051-990,
Londrina – PR, e-mail: maraluciaribeiro@uel.br

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são enzimas capazes de dividir as ligações β -glicosídicas de di e/ou oligosacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos, liberando glicose. É encontrada em vegetais com inúmeras funções endógenas. Estas enzimas hidrolisam as isoflavonas β -glicosídias (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam ação benéfica na saúde humana. Assim, podem ser aplicadas em produtos não fermentados de soja, produzindo alimentos funcionais com teor elevado de agliconas. Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade de β -glicosidase em grãos de oito espécies de leguminosas. Amostras de feijão preto nacional, feijão fradinho, lentilha Canadá, ervilha, feijão-fava rajado vermelho, grão de bico, soja verde e soja BRS 213, obtidas de fonte comercial, foram previamente selecionadas. A partir de uma amostra de 100 g foram formados três blocos, cujas seqüências de preparo e análises foram sorteadas ao acaso para cada bloco. As amostras foram moídas para obtenção de farinha integral que continha casca, hipocótilo e cotilédone. A extração de β -glicosidase para determinação da atividade foi realizada em tubos de ensaio com 200 mg de farinha integral em 3 mL de tampão citrato 0,05 M, contendo NaCl 0,1 M e pH 4,5 por uma hora a temperatura ambiente e agitados em intervalos de 15 min. Após centrifugação (4000 g, 20 min a 4°C), os sobrenadantes foram utilizados para determinação de atividade, utilizando o substrato sintético p -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p -NPG) conforme procedimento descrito por Matsuura e Obata (1993). Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de β -glicosidase que liberou 1 μ M de p -NP min^{-1} , nas condições de ensaio. Os resultados, expressos em níveis de atividade de β -glicosidase, ou seja, UA g^{-1} de farinha integral, foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para a comparação das médias. Os níveis de atividade de β -glicosidase foram superiores no feijão-fava rajado vermelho, no grão de bico e na soja BRS 213. O feijão-fava rajado vermelho apresentou níveis de atividade da enzima dez vezes superior a soja BRS 213 (894,72 e 91,15 UA g^{-1} de farinha integral, respectivamente). Considerando a importância da β -glicosidase na obtenção de alimentos funcionais, o feijão-fava rajado vermelho apresentou-se como uma excelente fonte desta enzima.

Apoio financeiro: CAPES

ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE EM DIFERENTES LEGUMINOSAS



Rafael Fernandes Santos¹; Luciana Carvalho Grade¹; Mara Lucia Luiz Ribeiro²

¹Mestrado em Biotecnologia – Depto. Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL
²Docente Depto. Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL – C.P. 6001, CEP 86.051-990,
 Londrina – PR, e-mail: maraluciaribeiro@uel.br



INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicosidrolase, EC 3.2.1.21) compreendem um grupo heterogêneo de enzimas que são capazes de clivar as ligações β -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos¹, liberando uma aglicona e glicose. Nos vegetais, as β -glicosidases possuem inúmeras funções endógenas, como por exemplo a modificação de metabólitos secundários², como as isoflavonas, que estão sendo estudadas por seu potencial papel na prevenção e tratamento de doenças crônicas, como câncer de mama, próstata e cólon, na redução de riscos de doenças cardiovasculares³, entre outros.

As β -glicosidases tem sido utilizadas na hidrólise de isoflavonas β -glicosídicas (genistina, daidzina e glicetina) liberando as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliceteína). Estas enzimas estão recebendo uma atenção especial devido a sua aplicação biotecnológica e industrial podendo ser utilizada em produtos não fermentados à base de soja, produzindo alimentos funcionais com alto teor de agliconas proporcionando benefícios à saúde humana⁴.

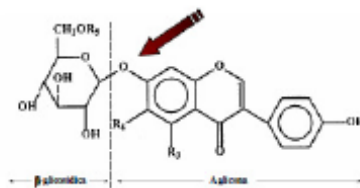


Figura 1. Estrutura das isoflavonas da soja e local de ataque da β -glicosidase.

OBJETIVO

Determinar a atividade de β -glicosidase em grãos de oito espécies de leguminosas.

METODOLOGIA

PREPARO DAS AMOSTRAS

Amostras de feijão preto nacional, feijão fradinho, lentilha Canadá, ervilha, feijão-fava rajado vermelho, grão de bico, soja verde e soja BRS 213, obtidas de fonte comercial, foram previamente selecionadas. A partir de uma amostra de 100 g foram formados três blocos, cujas seqüências de preparo e análises foram sorteadas ao acaso para cada bloco. As amostras foram moídas para obtenção de farinha integral que contém casca, hipocótilo e cotilédone⁵.

EXTRAÇÃO DA β -GLICOSIDASE

A extração de β -glicosidase das amostras para determinação de sua atividade foi realizada em tubos de ensaio com 200 mg de farinha integral em 3 mL de tampão citrato 0,05 M, contendo NaCl 0,1 M e pH 4,5 por uma hora a temperatura ambiente e agitados em intervalos de 15 min⁶. Em seguida, foram centrifugados (4000g, 20 min a 4°C) e obtidos os sobrenadantes ou extratos brutos para determinação da atividade da enzima.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE

Para determinação de atividade de β -glicosidase nos extratos brutos foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) conforme procedimento descrito por Matsuura e Obata (1993). 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 -glicosidase que liberou 1 μ M de *p*-NP min⁻¹, nas condições de ensaio. Os resultados, expressos em níveis de atividade de β -glicosidase, ou seja, UA g⁻¹ de farinha integral, foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para a comparação das médias.

RESULTADOS

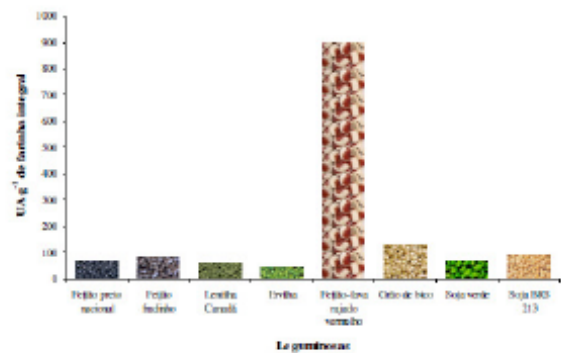


Figura 2. Atividade de β -glicosidase em diferentes leguminosas

Os níveis de atividade de β -glicosidase foram superiores no feijão-fava rajado vermelho, no grão de bico e na soja BRS 213. O feijão-fava rajado vermelho apresentou níveis de atividade da enzima aproximadamente sete vezes superior em relação ao grão de bico (894,72 e 128,4 UA g⁻¹ de farinha integral, respectivamente). Já em relação a soja BRS 213 foi dez vezes superior (894,72 e 91,15 UA g⁻¹ de farinha integral, respectivamente).

CONCLUSÃO

Considerando a importância da β -glicosidase na obtenção de alimentos funcionais, o feijão-fava rajado vermelho apresentou-se como uma excelente fonte desta enzima.

REFERÊNCIAS

- HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. 2001. *Phytochemistry*, v. 58, p. 995-1005.
- ESEN, A. 1992. *Plant Physiology*, v. 98, p. 174-182.
- MESSINA, M. J. 1999. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 70, p. 439-450.
- RIBEIRO, M. L. L. et al. 2007. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 1, p. 19-24.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDIGNON, J. R. 2000. *Pesq. Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 5, p. 873-874.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. 1993. *Journal of Food Science*, v. 58, p. 144-147.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: CAPES

OBTENÇÃO DE β -GLICOSIDASE PURIFICADA DE COTILÉDONES DE SOJA

SANTOS, R. F. (1); VARÉA-PEREIRA, G. (1); IDA, E. I. (2); RIBEIRO, M. L. L. (1).

(1) Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. (2) Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR-Brasil. E-mail: maraluciaribeiro@uel.br

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são enzimas que hidrolisam ligações β -glicosídicas sendo específicas para alguns substratos como as isoflavonas, com liberação de agliconas. Estas são conhecidas pelas suas atividades biológicas na prevenção e controle de doenças crônicas que comprometem a saúde humana. O objetivo deste trabalho foi obter β -glicosidase purificada de cotilédones de soja. A β -glicosidase foi extraída de farinha de cotilédones com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,6, na proporção de 1:10 (p/v), com posterior centrifugação (4000g, 4°C, 15 min). O sobrenadante foi acidificado com HCl 0,1N até pH 5,0 e centrifugado para obtenção do extrato bruto que foi fracionado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0–40% e 40–85%. Os precipitados, ressuspensos em tampão fosfato citrato 0,05M, pH 5,0 e os sobrenadantes foram dialisados no mesmo tampão. Para determinação da atividade enzimática foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG). A fração com maior atividade de β -glicosidase (P_{40-85}) foi aplicada em coluna de troca iônica com CM Sephadex C-50, eluída por gradiente de NaCl 0–1M em tampão fosfato-citrato. A fração com maior atividade específica de β -glicosidase foi liofilizada e dialisada para aplicação em coluna de filtração em gel com Sephadex G-100. A PAGE-nativa (DAVIS, 1964) foi utilizada para acompanhar o processo de purificação. A coloração e revelação foi segundo Nielsen e Brown (1984) utilizando nitrato de prata. A fração P_{40-85} foi separada em 3 frações protéicas (F_1 , F_2 e F_3) na coluna de troca iônica. A fração F_3 , que apresentou maior atividade específica de β -glicosidase, foi separada em 4 frações (F_{31} , F_{32} , F_{33} e F_{34}) na coluna de filtração em gel. Na eletroforese foi observada uma única banda de proteína na fração F_{32} , demonstrando que o processo de purificação de β -glicosidase foi eficiente.

Palavras Chave: β -glicosidase, purificação, cotilédones de soja.

OBTENÇÃO DE β -GLICOSIDASE PURIFICADA DE COTILÉDONES DE SOJA

SANTOS, R. F.¹; VARÉA, G. S.¹; IDA, E. I.²; RIBEIRO, M. L. L.¹

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE, ² Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990 Londrina-PR-Brasil. E-mail: maraluciaribeiro@uel.br

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolases, EC 3.2.1.21) são enzimas que hidrolisam ligações β -glicosídicas sendo específicas para alguns substratos como as isoflavonas, com liberação de agliconas¹. Estas são conhecidas por suas atividades biológicas na prevenção e controle de doenças crônicas como o câncer de mama, próstata e cólon e na redução de riscos de doenças cardiovasculares². O aumento do teor de agliconas pode ocorrer a partir da hidrólise das isoflavonas β -glicosídicas pela β -glicosidase.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi obter β -glicosidase purificada de cotilédones de soja.

METODOLOGIA

As etapas de obtenção de β -glicosidase purificada de cotilédones de soja podem ser observadas na Figura 1.

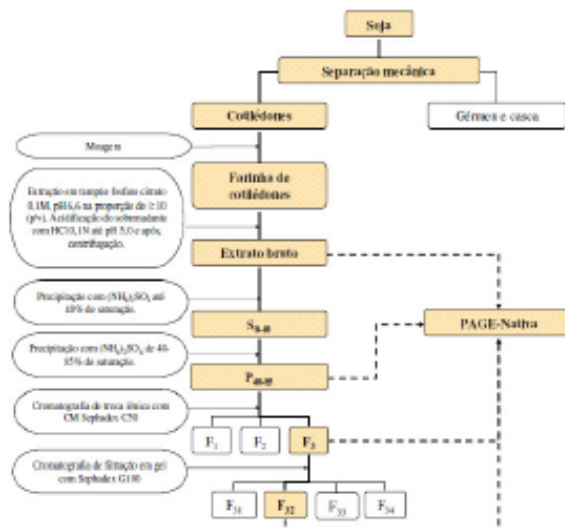


Figura 1. Fluxograma de obtenção da enzima β -glicosidase purificada de cotilédones de soja.

Em todas as etapas de purificação foram determinadas a atividade de β -glicosidase, utilizando o substrato sintético p-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (p-NPG) conforme procedimento descrito por Matsumura e Ohata (1993) e o teor de proteínas através do método de Lowry et al. (1951).

As frações com maior atividade específica (UA mg⁻¹ de proteínas) foram acompanhadas durante o processo de purificação através de PAGE-Nativa (DAVIS, 1964). O procedimento de coloração e revelação foi realizado conforme descrição de Nielsen e Brown (1984) utilizando nitrato de prata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração P₄₀₋₅₅, originada da precipitação com sulfato de amônio, foi a que apresentou maior atividade de β -glicosidase, sendo então utilizada para as subsequentes etapas de purificação. A fração P₄₀₋₅₅ foi separada em três frações protéicas (F₁, F₂ e F₃) na coluna de troca iônica (Figura 2A).

A fração F₃, que apresentou maior atividade específica de β -glicosidase, com recuperação de 26,07% e purificação de 16,7 vezes foi aplicada em coluna de filtração em gel, onde foi separada em quatro frações (F₁₁, F₁₂, F₁₃ e F₁₄) (Figura 2B), sendo que a fração F₁₂ apresentou elevada atividade específica de β -glicosidase, com recuperação de 6,58% e purificação de 51,98 vezes em relação ao extrato bruto.

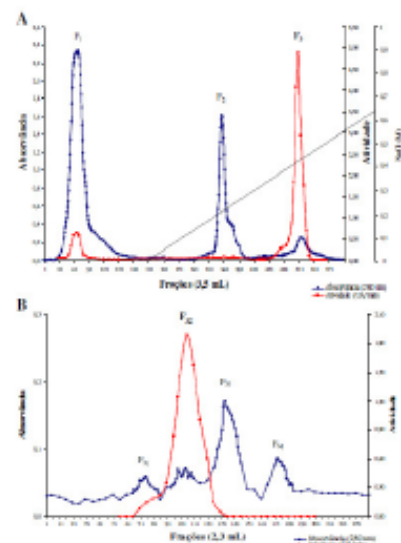


Figura 2. Perfil cromatográfico da β -glicosidase de cotilédones de soja. (A) Cromatografia de troca iônica com gradiente linear de NaCl 0-1M. (B) Cromatografia de filtração em gel.

Na eletroforese em gel de poli-acrilamida foi observada uma única banda de proteína na fração F₁₂ (Figura 3).

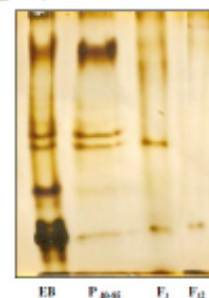


Figura 3. PAGE-Nativa das fases de purificação da enzima β -glicosidase de cotilédones de soja.

CONCLUSÃO

O processo de purificação de β -glicosidase de cotilédones de soja foi eficiente uma vez que a fração F₁₂ apresentou uma única banda de proteínas.

REFERÊNCIAS

1. HSEH, M. C.; GRAHAM, T. L. 2001. *Phytochemistry*, v. 58, p. 995-1005.
2. MESSINA, M. J. 1999. *American Journal Clinical Nutrition*, v. 70, p. 439-450.
3. MATSUMURA, M.; OHATA, A. 1993. *Journal of Food Science*, v. 58, p. 144-147.
4. LOWRY, O. H. et al. 1951. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275.
5. DAVIS, B. J. 1964. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 121, p. 404-427.
6. NIELSEN, B. L.; BROWN, L. R. 1984. *Analytical Biochemistry*, v. 141, p. 311-315.

AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: CAPES

DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA

SANTOS, R. F. (1); VARÉA-PEREIRA, G. (1); IDA, E. I. (2); RIBEIRO, M. L. L. (1).

(1) Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. (2) Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR-Brasil. E-mail: maraluciaribeiro@uel.br

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são enzimas capazes de clivar as ligações β -glicosídicas de di e/ou oligosacarídeos liberando uma aglicona. Esta enzima possui inúmeras funções endógenas nos vegetais, podendo ser utilizadas na hidrólise de isoflavonas glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) em agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam ação benéfica na saúde humana. O objetivo do trabalho foi determinar a massa molecular de β -glicosidase de cotilédones de soja. A β -glicosidase foi extraída de farinha de cotilédones com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,6 na proporção de 1:10 (p/v) com posterior acidificação do sobrenadante com HCl 0,1N até pH 5,0. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi fracionado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 40% e posteriormente até 85%. A fração contendo maior atividade da enzima foi dialisada e aplicada em coluna de troca iônica com CM Sephadex C-50 eluída por gradiente de NaCl 0–1M em tampão fosfato-citrato 0,05M, pH 5,0. Das frações separadas, a que apresentou maior atividade específica de β -glicosidase foi aplicada em coluna de filtração em gel com Sephadex G-100. A fração com maior atividade específica foi utilizada para a determinação da massa molecular através de SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970) com coloração e revelação conforme descrição de Nielsen e Brown (1984) utilizando nitrato de prata. Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) sendo uma unidade de atividade (UA) definida como a quantidade de β -glicosidase que liberou 1 μM de *p*-NP min^{-1} , nas condições de ensaio. O teor de proteínas solúveis foi determinado pelo método de Lowry (1951). A β -glicosidase apresentou uma massa molecular de aproximadamente 33 kDa.

Palavras Chave: β -glicosidase, soja, massa molecular.



DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA

SANTOS, R. F.¹; VARÉA, G. S.¹; IDA, E. I.²; RIBEIRO, M. L. L.¹

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

² Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos,
Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990
Londrina-PR-Brasil. E-mail: marulciaribeiro@uel.br

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicosidrolases, EC 3.2.1.21) são enzimas capazes de clivar as ligações β -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos¹ liberando uma aglicona. Esta enzima possui inúmeras funções endógenas nos vegetais, como por exemplo a modificação de metabólitos secundários² como as isoflavonas, podendo assim ser utilizada na hidrólise de isoflavonas glicosídicas (genisteína, daidzeína e gliciteína) em agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam ação benéfica na saúde humana³.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi determinar a massa molecular de β -glicosidase purificada de cotilédones de soja.

METODOLOGIA

As etapas de obtenção de β -glicosidase purificada de cotilédones de soja podem ser observadas na Figura 1.

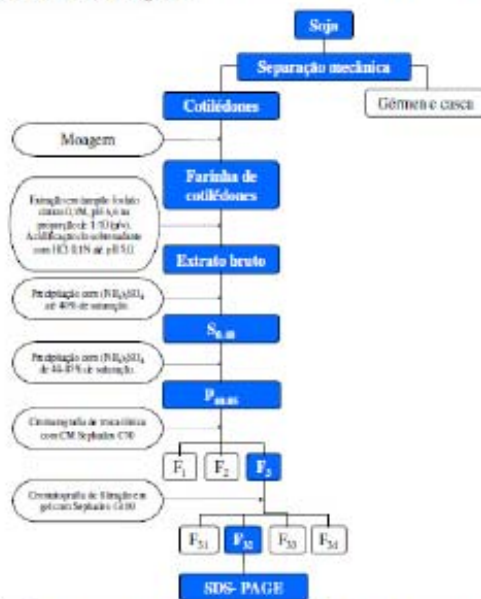


Figura 1. Fluxograma de obtenção da enzima β -glicosidase purificada de cotilédones de soja para determinação da massa molecular por SDS-PAGE.

DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR SDS-PAGE

A massa molecular do β -glicosidase purificada foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, conforme Laemmli (1970). A coloração e revelação foram realizadas conforme descrição de Nielsen e Brown (1984), utilizando nitrato de prata. A massa molecular foi estimada através da relação entre o \log da massa molecular e a mobilidade relativa dos padrões (180–6 kDa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A SDS-PAGE revelou uma banda de proteína com mobilidade relativa de 0,613, que corresponde a massa molecular de aproximadamente 33 kDa (Figura 2).

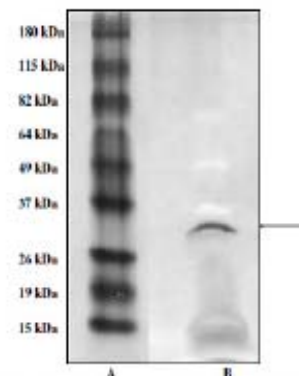


Figura 2. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida da enzima β -glicosidase purificada de cotilédones de soja. (A) Padrões proteicos e (B) enzima β -glicosidase purificada.

Resultado semelhante foi encontrado por Matsuura, Sasaki e Murão (1995), que obtiveram uma massa molecular de 36 kDa, através de SDS-PAGE, para β -glicosidase obtida de cotilédones de soja.

CONCLUSÃO

A β -glicosidase apresentou uma massa molecular de aproximadamente 33 kDa.

REFERÊNCIAS

1. HSEH, M. C.; GRAHAM, T. L. 2001. *Phytochemistry*, v. 58, p. 995-1005.
2. RYAN, A. 1992. *Plant Physiology*, v. 98, p. 174-182.
3. RIBEIRO, M. L. L. et al. 2007. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 20, n. 1, p. 19-24.
4. LAEMMLI, U. K. 1970. *Nature*, v. 227, p. 680-685.
5. NIELSEN, B. L.; BROWN, L. R. 1984. *Analytical Biochemistry*, v. 141, p. 311-315.
6. MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. 1995. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v. 59, p. 1623-1627.

AGRADECIMENTOS



CONCLUSÕES

A purificação de β -glicosidase de cotilédones de soja utilizando fracionamento com sulfato de amônio de 0-40 e 40-85%, cromatografia de troca iônica com CM-Sephadex C50 e filtração em gel com Sephadex G-100 foi eficiente.

A β -glicosidase purificada apresentou massa molecular de 53 kDa por filtração em gel e 33 kDa por eletroforese em condições desnaturantes.

A β -glicosidase purificada foi inibida por HgCl_2 1 mM, glucona- δ -lactona 10 mM e glicose 150 mM e ativada por MnCl_2 .

A aplicação da β -glicosidase purificada e parcialmente purificada em FSI mostrou-se eficiente na liberação de glicose. A β -glicosidase purificada mostrou-se mais ativa na liberação de glicose em relação à parcialmente purificada.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L. Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (*Glycine max* L.) e o efeito na atividade biológica *in vitro*. Campinas, 2004. **Tese** (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.
- AKIYAMA, T.; KAKU, H.; SHIBUYA, N. A cell wall-bound β -glucosidase from germinated rice: purification and properties. **Phytochemistry**, v. 48, p. 49–54, 1998.
- ANDERSON, J. J. B.; GARNER, S. C. G. The effects of phytoestrogens on bone. **Nutrition Research**, v. 17, n. 10, p. 1617–1632, 1997.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 jan. 2009.
- BALDRIAN, P.; VALASKOVA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 501–521, 2008.
- BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. M.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, I. et al. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 921–926, 2006.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidases: Cloning, Properties and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375–407, 2002.
- BRANDI, M. L. Natural and Synthetic Isoflavones in the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. **Calcified Tissue International**, v. 61, p. S5–S8, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 18*, de 30 de abril de 1999. Aprova o **Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos**. Brasília, 1999.
- BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health food sector. **Food Research International**, v. 35, p. 187–193, 2002.
- CAMERON, R. G.; MANTHEY, J. A.; BAKER, R. A.; GROHMANN, K. Purification and Characterization of a Beta-Glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia Fruit Tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4457–4462, 2001.
- CHIEN, J. T.; HSIEH, H. C.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. **Food Chemistry**, v. 91, p. 425–434, 2005.
- CHANG, S. K. C. Isoflavones from soybeans and soy foods. In: *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*. CRC Press, p. 39–69, 2002.
- CONAB -Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1961–1967, 1993.

CZYZEK, M.; CICEK, M.; ZAMBONI, V.; BURMEISTER, W. P.; BEVAN, D. R.; HENRISSAT, B.; ESEN, A. Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) β -glucosidase and a model of its complex with *p* nitrophenyl β -D-thioglucoside. **Biochemical Journal**, v. 354, p. 37–46, 2001.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.; OLIVEIRA, A. B. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Circular Técnica 43 – Embrapa Soja, 2007.

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

DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants. **Biochemical Journal**, v. 55, p. 170–171, 1953.

DIXON, R. A.; FERREIRA, C. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, p. 205–211, 2005.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

ESEN, A. **β -Glucosidase**. In: Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker Inc., 2003.

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

ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2986–3008, 2007.

ESTEVEZ, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 43–52, 2001.

FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean Isoflavones: Effects of Processing and Health Benefits. **Food Reviews International**, v. 20, p. 51–75, 2004.

FDA -FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food labeling: Health claims, soy protein and coronary heart disease. **Federal Register**, v. 64, 1999.

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

GERARDI, C.; BLANDO, F.; SANTINO, A.; ZACHEO, G. Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. **Plant Science**, v. 160, p. 795–805, 2001.

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

HAN, Y.; CHEN, H. Characterization of β -glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6081–6087, 2008.

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA, V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L. A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia sp.*, with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, v. 67, p. 61–69, 2009.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309–316, 1991

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

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

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

KANO, M.; TAKAYANAGI, T.; HARADA, K.; SAWADA, S.; ISHIKAWA, F. Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 2291–2296, 2006.

KAO, T. H.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1728–1736, 2008.

KAUFMAN, P. B.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H.; BOIK, J.; HOYT, J. E. A Comparative Survey of Leguminous Plants as Sources of the Isoflavones, Genistein and Daidzein: Implications for Human Nutrition and Health. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 3, p. 7-12, 1997.

KIM, S.; KIM, I. Oligomeric Structure of β -Glucosidases. **Journal of Photochemistry**, v. 11, p. 121–127, 2004.

KOROTKOVAL, O. G.; SEMENOVA, M. V.; MOROZOVA, V. V.; ZOROV, I. N.; SOKOLOVA, L. M.; BUBNOVA, T. M.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P. Isolation and Properties of Fungal β -Glucosidases. **Biochemistry (Moscow)**, 2009, v. 74, n. 5, p. 569–577,

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

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

- LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 391–395, 2008
- LI, Y.; JIANG, C.; WAN, X.; ZHANG, Z.; LI, D. Purification and partial characterization of β -glucosidase from fresh leaves of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 37, p. 363–370, 2005.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**. IPT., 1997.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, v. 193, p. 265–275, 1951.
- LUI, M. C. Y.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23 (Supl), p. 206–212, 2003.
- MATEO, J. J.; STEFANO, R. Description of the β -glucosidase activity in wine yeasts. *Food Microbiology*, v.14, p. 583–591, 1997.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. *Journal of Food Science*. v. 58, p. 144–147, 1993.
- MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. *Journal of Food Science*. v. 54, n. 3, p. 602–605, 1989.
- MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on β -glucosidases from soybean that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 59, p. 1623–1627, 1995.
- MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 70, p. 439–450, 1999.
- MESSINA, M. J. Soyfoods: their role in disease prevention and treatment. In: *Soybeans – Chemistry, technology and utilization*. Chapman e Hall, p. 442–469, 1997.
- MORAES, C. S.; PASTORE, G. M.; SATO, H. H.; PARK, Y. K. **Isoflavonas de soja e suas atividades biológicas**. Livraria Varela, 2009.
- MORANT, A. V.; JORGENSEN, K.; JORGENSEN, C.; PAQUETTE, S. M.; SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; MOLLER, B. L.; BAK, S. β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1795–1813, 2008.
- NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*, v. 123, p. 304–313, 2006.

NELTEL, P. Isoflavones: effects on cardiovascular risk and functions. **International Congress Series**, v. 1262, p. 317–319, 2004.

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

ODOUX, E.; CHAUWIN, A.; BRILLOUET, J. Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews) β -D-glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3168–3173, 2003.

OPASSIRI, R.; CAIRNS, J. R. K.; AKIYAMA, T.; WARA-ASWAPATI, O.; SVASTI, J.; ESEN, A. Characterization of a rice β -glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. **Plant Science**, v. 165, p. 627–638, 2003.

OTIENO, D. O.; SHAH, N. P. A comparison of changes in the transformation of isoflavones in soymilk using varying concentrations of exogenous and probiotic-derived endogenous β -glucosidases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 601–612, 2007.

PALMERI, R.; SPAGNA, G. β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 382–389, 2007.

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 130–135, 2002.

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

PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 20, p. 12–14, 2001b.

PESSELA, B. C. C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCIA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition. Complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 199–205, 2003.

PHAM, T.; SHAH, N. P. Hydrolysis of isoflavone glycosides in soy milk by β -galactosidase and β -glucosidase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, p. 38–60, 2009.

PONTOH, J.; LOW, N.H. Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 679–690, 2002.

PYO, Y.; LEE, T.; LEE, Y. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 38, p. 551–559, 2005.

RAIMONDI, S.; RONCAGLIA, L.; LUCIA, M.; AMARETTI, A.; LEONARDI, A.; PAGNONI, U. M.; ROSSI, M. Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by *Bifidobacterium* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 943–950, 2009.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. Editora Edgard Blucher Ltda, 2004.

RIBEIRO, M. L. L. Teor de isoflavonas e atividade de beta-glicosidase em grãos de soja germinada e de diferentes grupos de maturação. Purificação e caracterização bioquímica parcial da beta-glicosidase. Londrina, 2006. **Tese** (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.

RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPOS, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. **Journal of Food Biochemistry**, v. 30, p. 453–465, 2006.

RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPOS, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. 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.

ROMERO-SEGURA, C.; SANS, C.; PEREZ, A. G. Purification and characterization of an olive fruit β -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7983–7988, 2009.

SARRY, J. E.; GUNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, p. 509–521, 2004.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B. E.; KIRSCHNER, A. S.; HEUBI, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 447–53, 2002.

SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health¹. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 758–767, 1999.

SETCHELL, K.D. R. Absorption and metabolism of soy isoflavones – from food to dietary supplements and adults to infants. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 654S-655S, 2000.

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

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. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1362S–1375S, 2001.

- SONIA, K. G.; CHADHA, B. S.; BADHAN, A. K.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 599–604, 2008.
- SUE, M.; ISHIHARA, A.; IWAMURA, H. Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. **Plant Science**, v. 155, p. 67–74, 2000.
- SUE, M.; YAMAZAKI, K.; YAJIMA, S.; NOMURA, T.; MATSUKAWA, T.; IWAMURA, H.; MIYAMOTO, T. Molecular and structural characterization of hexameric β -D-Glucosidases in wheat and rye. **Plant Physiology**, v. 141, p. 1237–1247, 2006.
- VAYA, J.; TAMIR, S. The relation between the chemical structure of flavonoids and their estrogen-like activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1333–1343, 2004.
- VILLENA, M. A.; IRANZO, J. F. U.; PÉREZ, A. I. B. Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 420–425, 2007.
- WANG, H.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2377–2383, 1996.
- WOLOSOWSKA, S.; SYNOWIECKI, J. Thermostable β -glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products. **Food Chemistry**, v. 85, p. 181–187, 2004.
- XIE, L.; HETTIARACHCHY, N. S.; CAI, R.; TSURUHAMI, K.; KOIKEDA, S. Conversion of isoflavone glycosides to aglycones in SoyLife and Soymeal using β -glycosidase. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 2, p.427–430, 2003.
- YANG, L.; NING, Z. S.; SHI, C. Z.; CHANG, Z. Y.; HUAN, L. Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing β -Glucosidase from endophytic bacterium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1940–1944, 2004.
- YU, H.; XUA, J.; LU, W.; LIN, G. Identification, purification and characterization of β -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of *O*-glucosides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 354–361, 2007.
- YUAN, J.; LIU, Y.; PENG, J.; WANG, J.; LIU, X. Changes of isoflavone profile in the hypocotyls and cotyledons of soybeans during dry heating and germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9002–9010, 2009.
- ZUBIK, L.; MEYDANI, M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1459-1465, 2003.