



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANE YURI YOSHIARA

**ISOFLAVONAS E β -GLICOSIDASES DE SOJA:
GERMINAÇÃO, OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, HIDRÓLISE E
CONVERSÃO EM AGLICONAS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Londrina
2012

LUCIANE YURI YOSHIARA

**ISOFLAVONAS E β -GLICOSIDASES DE SOJA:
GERMINAÇÃO, OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, HIDRÓLISE E
CONVERSÃO EM AGLICONAS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elza Louko Ida

Londrina
2012

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Y65i Yoshiara, Luciane Yuri.
Isoflavonas e β -glicosidases de soja : germinação, otimização da
extração, hidrólise e conversão em agliconas e atividade antioxidante /
Luciane Yuri Yoshiara. – Londrina, 2012.
200 f. : il.

Orientador: Elza louko Ida.
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Análise – Teses. 2. Soja – Produtos – Teses. 3.
Isoflavonas – Teses. 4. Beta-glicosidase – Teses. 5. Soja – Compostos
orgânicos – Teses. 6. Soja – Antioxidantes – Teses. I. Ida, Elza louko. II.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa
de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641.002.61

LUCIANE YURI YOSHIARA

ISOFLAVONAS E β -GLICOSIDASES DE SOJA:
GERMINAÇÃO, OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, HIDRÓLISE
E CONVERSÃO EM AGLICONAS E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE



Prof.^a. Dr.^a. Elza Louko Ida
Universidade Estadual de Londrina



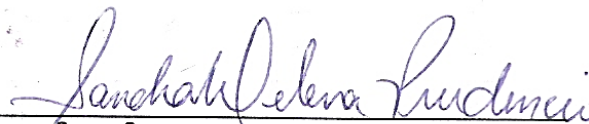
Prof.^a. Dr.^a. Marilde T. Bordignon Luiz
Universidade Federal de Santa
Catarina



Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate
Universidade Estadual de Ponta
Grossa



Prof.^a. Dr.^a. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina



Prof.^a. Dr.^a. Sandra Helena Prudencio
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 23 de agosto de 2012.

*"A dificuldade em se vencer um desafio vem da maneira que você olha para ele.
Olhe sempre com olhos de um gigante..."*

Yuri Lacerda

Aos meus pais, **Roberto Hideto Yoshiara** e **Hiseko Kubota Yoshiara**, pelo apoio e amor incondicionais, paciência e exemplos de vida.

Ao meu irmão **Alberto Yassuo Yoshiara** pelo apoio e carinho.

Ao **Walter Antônio Devanir Lembi**, amigo, namorado, noivo, amor, companheiro de viagens e congressos, pela paciência, compreensão, carinho e apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Dr^a. Elza Louko Ida pela confiança, dedicação, incentivo, principalmente por proporcionar a grande abertura de horizontes e ensinar tantas coisas para crescimento pessoal e profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária pelo apoio financeiro;

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por meio do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos pela infraestrutura e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, pelos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Massami Shimokomaki, pelo incentivo e exemplo científico, por me mostrar o outro lado dos eventos científicos, participando das comissões organizadoras dos primeiros três Simpósios sobre Avanços em Tecnologia de Carnes.

À Professora Dr^a. Mara Lúcia Luiz Ribeiro do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina pelo apoio, carinho e incentivo.

Aos Pesquisadores Dr^a. Mercedes Concórdia Carrão Panizzi e Ms. José Marcos Gontijo Mandarino do Centro Nacional de Pesquisa de Soja, EMBRAPA Soja, Londrina – Paraná, pelo apoio e fornecimento de matéria prima utilizada em todos os experimentos.

Aos Professores Dr. Dionísio Borsato e Dr. Fabio Yamashita pela ajuda nos planejamentos experimentais.

À Pós Doutoranda Dr^a. Josemeyre Bonifácio da Silva pela amizade, incentivo e colaboração.

Ao estagiário de iniciação científica Tiago Bervelieri Madeira, dedicado, companheiro, pelas horas de paciência, apoio logístico e por acreditar que tudo daria certo.

Aos estagiários de iniciação científica Ana Lúcia Miranda e Uenifer Couto, pelo acompanhamento e colaboração no presente trabalho.

À Sandra Rezende, secretária da Pós Graduação em Ciência de Alimentos e aos técnicos de laboratório, Dr^a. Elza Youssef Youssef, Neusa Cassula dos Santos, Nelson Heitor Fuzinato, Patrícia Sambatti e Berenice Figueiredo, pelo apoio.

À amiga Dr^a. Caroline Maria Calliari pelo incentivo, companheirismo, por me entender e compartilhar sonhos.

Aos meus amigos da pós graduação e colegas de laboratório por fazerem os dias ficarem mais leves, Luciana Pereira Lobato, Mariana Buranelo Egea, Cleiton Inácio Ramos, Neusa Seibel, Denis Fabrício Marchi, Neide Kamizake, Lyssa Sakanaka, Cláudio Ueno, Gislaine Silveira Simões, Gleice Rocha dos Santos Almeida, Patrícia Salomão Garcia, Igor Fernando Escanfelli da Silva, Cíntia Ladeira Handa e Daniele Honorato, Marsilvio Filho, Mônica Reis, Mariana Curi, Mary Carmen de Conte e Thiago Montagner Souza.

Aos funcionários do setor de segurança da Universidade Estadual de Londrina, por me atenderem pacientemente todas as vezes que precisei estar no laboratório fora de horário.

E a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização e concretização deste trabalho.

YOSHIARA, Luciane Yuri. **Isoflavonas e β -Glicosidasas de Soja: Germinação, Otimização da Extração, Hidrólise e Conversão em Agliconas e Atividade Antioxidante**. 2012. 200 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina – PR.

RESUMO

O processo de germinação da soja provoca alterações na composição química e no teor das diferentes formas de isoflavonas. O grão de soja contém as isoflavonas daidzina, genistina e glicitina que são encontradas sob quatro formas distintas, e denominadas de agliconas, glicosídicas, malonilglicosídicas e acetilglicosídicas, totalizando assim 12 formas de isoflavonas. Na maioria dos sistemas biológicos, as isoflavonas se comportam como estrógenos e apresentam propriedades como antitumorais, antioxidantes e antimutagênicas. O objetivo deste trabalho foi investigar as isoflavonas e β -glicosidasas de soja com relação à germinação, otimização da extração, hidrólise e conversão em agliconas, compostos fenólicos e atividade antioxidante. Sementes de soja (BRS 257) foram germinadas em câmaras germinadoras na presença e na ausência de luz por 72, 96, 120, 144 e 168 h, a 35°C e umidade relativa de 100%. As partes do eixo embrionário – cotilédone, hipocótilo, epicótilo e radícula – foram separadas para as análises de atividade de β -glicosidase, proteínas solúveis, teor de isoflavonas, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS. Foi otimizada a extração de isoflavonas utilizando um delineamento experimental simplex-centróide. Foi otimizada a extração da β -glicosidase de epicótilos de soja germinada por 144 h na presença de luz e esta enzima utilizada para otimização da conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas. O rendimento de β -glicosidase de cotilédones de soja germinada com luz por 96 h foi maior que o do epicótilo. A maior atividade específica de β -glicosidase ocorreu nos epicótilos de soja germinada com luz por 144 h, sendo recomendados como fonte alternativa desta enzima. Os cotilédones de soja germinada por 144 h resultaram em 91,05% de isoflavonas agliconas daidzeína e genisteína e 8,95% da forma glicosídica genistina, enquanto que o hipocótilo e radícula, embora em baixas concentrações, resultaram 100% das três formas de isoflavonas agliconas. A máxima extração de β -glicosidase de epicótilos de soja germinada ocorreu a 30°C e pH 5,0. A extração das diferentes formas de isoflavonas foi otimizada, sendo que os melhores extratores para malonilglicosídicas e totais foram água, acetona, etanol (2:1:1; v:v:v), para as glicosídicas, água, acetona e acetonitrila (2:1:1; v:v:v), e para as agliconas, água e acetona (1:1; v:v). A máxima conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas foi de 98,7% em farinha de cotilédone de soja desengordurada e ocorreu em pH 7,00 ou pH 7,61, a 35°C por 14 h. O cotilédone de soja germinada por 144 h e 35°C apresentou maior teor de compostos fenólicos e isoflavonas, e maior capacidade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e ABTS. Uma correlação positiva foi confirmada entre a capacidade antioxidante por ABTS e o teor de compostos fenólicos, bem como entre a capacidade antioxidante por DPPH e isoflavonas em equivalente agliconas.

Palavras – chave: Soja. β -glicosidase. Isoflavonas β -glicosídicas. Agliconas. Otimização.

YOSHIARA, Luciane Yuri. **Isoflavones and β -Glucosidase from Soybeans: Germination, Optimization of Extraction, Hydrolysis and Conversion in aglycones and Antioxidant Activity**. 2012. 200 p. Thesis (Doctor's degree in Food Science) -University of Londrina. Londrina -PR.

ABSTRACT

The germination process of soybean causes changes in chemical composition and content of various forms of isoflavones. Soybean contains isoflavones daidzein, genistein and glycitin that are found in four distinct ways, denominated aglycones, glycosides, and malonylglicosidics acetylglicosidics, totaling 12 forms of isoflavones. In most biological systems, isoflavones behave as estrogen and exhibit properties such as antitumor, anti-oxidant and antimutagenic. The objective of this work was to investigate the isoflavones and β -glucosidase from soybeans in relation to germination, optimization of the extraction, hydrolysis and conversion to aglycones and antioxidant activity. Soybean seeds (BRS 257) were germinated in chambers in the presence and absence of light for 72, 96, 120, 144, and 168 h at 35° C and relative humidity of 100%. Parts of the embryonic axis -cotyledon, hypocotyl, epicotyl and radicle -were separated for analysis of β -glucosidase activity, soluble proteins, isoflavone content, phenolic compounds content and antioxidant activity by DPPH and ABTS methods. The extraction of isoflavonas was optimized using a simplex-centroid experimental design. The extraction of β -glucosidase from epicotyls from germinated soybean was optimized and this enzyme used to optimize the conversion of isoflavone glucosides into aglycones. The yield of β -glucosidase from germinated soybean cotyledons with light for 96 h was greater than that of the epicotyl. The highest specific activity of β -glucosidase occurred in epicotyls from soybean germinated In the presence of light for 144 h, being recommended as an alternative source of this enzyme. The cotyledons from soybean germinated for 144 hours resulted in 91.05% isoflavone aglycones genistein and daidzein and 8.95% genistein glycoside form, while the hypocotyl and radicle, although in low concentrations, resulted in 100% of the three forms of isoflavones aglycones. The maximum extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls occurred at 30°C and pH 5.0. The extraction of the different forms of isoflavones was optimized, and the best extractor for malonylglicosidics and total isoflavones were water, acetone, ethanol (2:1:1, v: v: v) for glycosidics, water, acetone and acetonitrile (2 1:1, v: v: v), and aglycones, water and acetone (1:1, v: v). The maximum conversion of glycosidic isoflavones to aglucones was 98.7% in defattedsoybean cotyledon flour and occurred at pH 7.00 or pH 7.61 at 35°C for 14 h. The soybean cotyledon germinated for 144 h and 35°C showed a higher content of phenolic compounds and isoflavones, and higher antioxidant capacity evaluated by ABTS and DPPH methods. A positive correlation was confirmed between the antioxidant capacity by ABTS and phenolic content as well as between the antioxidant capacity by DPPH and isoflavones in aglycones equivalent.

Keywords: Soybean β -glucosidase. β -glycosidic isoflavones. Aglycones. Optimization.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 1.** Estrutura da semente de soja. Fonte: LIU, 200421
- Figura 2.** Estrutura química do flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. (Fonte: ANGELO e JORGE, 2007).....22
- Figura 3.** Estrutura química de 12 formas de isoflavonas da soja (LIU, 2004)26
- Figura 4.** Comparação das estruturas químicas do equol (metabólito da daidzina) e estradiol. (Fonte: SETCHELL, CASSIDY, 1999)..... 33
- Figura 5.** Partes de soja germinada a 144 h em câmara germinadora com luz, 100% de umidade relativa41
- Figura 6.** Planejamento experimental centróide simplex com 4 componentes.....51

ARTIGO CIENTÍFICO 1

- Figure 1.** β -glucosidase activity and protein content of BRS 257 soybean (A) cotyledons, (B) hypocotyls, (C) radicles and (D) epicotyls germinated for 168 h84

ARTIGO CIENTÍFICO 2

- Figure 1.** Isoflavone concentration (expressed as mg g^{-1} and in percentage) in radicles, hypocotyls, epicotyls and cotyledons of soybean (BRS 257) germinated for 72, 96, 120, 144, and 168 h at 35°C in the presence of light 103

ARTIGO CIENTÍFICO 3

- Figure 1.** Surface response for β -glucosidase extraction (UA mL^{-1}) from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light..... 125

Figure 2.	Profiles for predicted values and desirability for β -glucosidase extraction from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	126
Figure 3.	Surface response for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.	127
Figure 4.	Profiles for predicted values and desirability for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	128

ARTIGO CIENTÍFICO 4

Figure 1.	Arrangement of the simplex-centroid design with four components x_1 (water), x_2 (acetone), x_3 (ethanol) and x_4 (acetonitrile), as well as solvent mixture ratios in each assay (E).....	152
Figure 2.	Response surfaces of the optimized extraction of (A) glycosidic, (B) malonyl-glycosidic, (C) aglycone and (D) total isoflavones (x_1 : water, x_2 : acetone, x_3 : ethanol, x_4 : acetonitrile, y_1 = mg/g glycosidic isoflavones, y_2 = mg/g malonyl-glycosidic isoflavones, y_3 = mg/g aglycone isoflavones and y_4 = mg/g total isoflavones)	153
Figure 3.	Optimal ratio for extraction of glycosidic, malonyl-glycosidic, aglycone and total isoflavones using the desirability parameter (x_1 = water, x_2 = acetone, x_3 = ethanol, x_4 = acetonitrile, y_1 = glycosidic isoflavones, y_2 = malonyl-glycosidic isoflavones, y_3 = aglycone isoflavones and y_4 = total isoflavones	154

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1. Composição típica da soja	20
Tabela 2. Teor de Isoflavonas (mg/g) em partes de soja germinadas com e sem a presença de luz	39
Tabela 3. Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento fatorial composto central	46
Tabela 4. Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento fatorial composto central para otimização da conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas em farinha de cotilédone de soja (BRS 257) desengordurada utilizando β glicosidase de epicótilo de soja germinada por 144h na presença de luz.....	48

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Table 1. Specific β -glucosidase activity* of the radicles, epicotyls, hypocotyls and cotyledons of soybean germinated for 168 h (BRS 257)	85
Table 2. Total weight of soybean BRS 257 radicles, epicotyls, hypocotyls and cotyledons germinated for 168 h	85
Table 3. Twelve highest absolute β -glucosidase activities in soybean parts germinated for 168 h	86

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Table 1. Regression analysis and coefficient of determination for glycosidic, aglycone and total isoflavone concentration of different soybean (BRS 257) components germinated in the presence of light for 72, 96, 120, 144 and 168 h at 35°C and 100% relative humidity.....	100
---	-----

Table 2. Total isoflavone concentration and percentage of glycosidics and aglycone isoflavones of different soybean (BRS 257) components germinated in the presence of light for 72, 96, 120, 144 and 168 h at 35°C and 100% relative humidity	101
Table 3. Total isoflavone concentrations and their different forms in the germinated soybean(144 hours at 35°Cin the presence of light) and in the non-germinated soybean components.....	102

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Table 1. Independent variables and variation levels for the central composite design for optimization of the extraction of β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	119
Table 2. Independent variables and variation levels for the central composite design for optimization of the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	119
Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the extraction of β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	120
Table 4. Central composite design with two coded (x_1 e x_2) and decoded (X_1 e X_2) variables and the response function (Y) for extracted β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	121
Table 5. Validation of the model proposed for the extraction of β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	122
Table 6. Analysis of variance (ANOVA) for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	122

Table 7. Central composite design with 2 coded (x_3 e x_4) and decoded (X_3 e X_4) variables and the response function (W) for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	123
Table 8. Validation of the mathematical model for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light	123

ARTIGO CIENTÍFICO 4

Table I. Content of different soy isoflavone forms extracted using the simplexcentroid mixture design	149
Table II. Fit of linear, quadratic and special cubic models for the four isoflavone forms extracted using the simplex-centroid mixture design with four components (water, acetone, ethanol, and acetonitrile).....	150
Table III. Analysis of variance (ANOVA) of the special cubic model using the simplexcentroid mixture design with four components for optimization for the extraction of soy isoflavones	150
Table IV. Calculated and observed isoflavone content of glycosidic, malonyl-glycosidic, aglycone and total isoflavones extracted with optimal solvent mixtures for each form	151
Table V. Detection and quantification limits, accuracy, and precision of the chromatographic analysis of isoflavones	151
Table VI. Accuracy and precision coefficients of determination from extractions with optimally performing mixtures	152

ARTIGO CIENTÍFICO 5

Table 1. Total isoflavone in aglycone equivalents of the components of germinated and non-germinated soybean	167
---	-----

Table 2.	Phenolic content of the different components from the non-germinated and from germinated soybean embryonic axis	167
Table 3.	Antioxidant capacity measured by DPPH and ABTS methods of nongerminated soybeans and components of the embryonic axis of germinated soybeans	167
Table 4.	Correlation coefficients between the phenolic content, antioxidant capacity and content of soy isoflavones in non-germinated and the components of the embryonic axis of germinated soybeans	168

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA	20
3.2	COMPOSTOS FENÓLICOS	22
3.3	ISOFLAVONAS	24
3.3.1	Consumo de Fitoestrógenos e Biodisponibilidade	28
3.3.2	Benefícios das isoflavonas à saúde humana	30
3.4	B – GLICOSIDASE	35
3.5	O PROCESSO DE GERMINAÇÃO E ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DA SOJA	38
3.6	ATIVIDADE DE B -GLICOSIDASE DO EIXO EMBRIONÁRIO DE SOJA GERMINADA NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE LUZ	41
4.1.1	Germinação da Soja	41
4.1.2	Extração e determinação da atividade de β -glicosidase	42
4.1.3	Determinação de proteínas solúveis	42
4.1.4	Rendimento da atividade de β -glicosidase	43
4.1.5	Delineamento experimental e análise estatística	43
3.7	ALTERAÇÕES NO TEOR DE ISOFLAVONAS NO EIXO EMBRIONÁRIO DE SOJA GERMINADA NA PRESENÇA DE LUZ	43
4.2.1	Matéria prima e reagentes	43
4.2.2	Preparo de amostras e germinação da soja	43
4.2.3	Extração e quantificação de isoflavonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	44
3.8	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE B -GLICOSIDASE DE EPICÓTILO DE SOJA GERMINADA E DA CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS	45
4.3.1	Matéria prima e reagentes	45
4.3.2	Preparo de amostras e germinação da soja	45
4.3.3	Otimização da extração de β -glicosidase de epicótilo de soja germinada	46
4.3.4	Determinação de β -glicosidase de epicótilos de soja germinada	47
4.3.5	Otimização da conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas utilizando β -glicosidase de epicótilo de soja germinada	47

4.3.6	Extração e quantificação de isoflavonas por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (CLUAE)	48
4.3.7	Validação dos modelos matemáticos	49
3.9	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ISOFLAVONAS DE SOJA COM DIFERENTES SOLVENTES UTILIZANDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL SIMPLEX CENTRÓIDE	50
4.4.1	Material.....	50
4.4.2	Delineamento experimental de misturas simplex-centróide e análise de superfície de resposta para extração de isoflavonas.....	50
4.4.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	52
4.4.4	Avaliação do modelo otimizado	53
3.10	CORRELAÇÃO DE ISOFLAVONAS E COMPOSTOS FENÓLICOS COM A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES COMPONENTES DO EIXO EMBRIONÁRIO DE SOJA GERMINADA	53
4.5.1	Matéria Prima e Reagentes	53
4.5.2	Preparo de amostras e germinação de soja	53
4.5.3	Extração e determinação de compostos fenólicos.....	54
4.5.4	Extração e quantificação de isoflavonas por CLAE	54
4.5.5	Medidas de Capacidade Antioxidante	55
4.5.5.1	Determinação da capacidade antioxidante pelo seqüestro do radical livre DPPH [•]	55
4.5.5.2	Determinação da atividade antioxidante pelo seqüestro do radical livre ABTS ^{•+}	55
	REFERÊNCIAS	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1	73
5.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2	87
5.3	ARTIGO CIENTÍFICO 3	104
5.4	ARTIGO CIENTÍFICO 4	129
5.5	ARTIGO CIENTÍFICO 5	155
6	CONCLUSÕES	169
	ANEXO I	170

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merril) pertence à família das leguminosas e possui elevada importância comercial e nutricional (SILVA et al., 2006). Seu consumo tem sido incentivado, por constituir uma importante alternativa para a nutrição humana, sendo uma excelente fonte de proteína, energia, vitaminas lipossolúveis, principalmente vitamina E, minerais como ferro, cálcio e zinco e compostos antioxidantes. Além disso, é rica em ácidos graxos essenciais como o ácido linoleico, conhecido por auxiliar na redução do colesterol (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000).

Os Estados Unidos, maiores produtores mundiais do grão, na safra de 2010/2011 responderam pela produção de 90,6 milhões de toneladas de soja. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e na mesma safra, a cultura ocupou uma área de 24,2 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 75 milhões de toneladas. O Paraná é o segundo maior produtor de soja do Brasil, com 4,6 milhões de hectares e 15,4 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2012a). As estimativas para 2020/2021, realizadas pela Assessoria de Gestão Estratégica (AGE) indicam uma produção brasileira de 86,5 milhões de toneladas. Essa projeção é maior em cerca de 17,8 milhões de toneladas em relação ao que o Brasil deve produzir na safra de 2010/2011 (BRASIL, 2012). Segundo os últimos dados publicados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture – USDA, 2012), os Estados Unidos tiveram uma queda na produção do grão na safra 2011/2012, indicando que o Brasil será o maior produtor mundial de soja na safra 2012/2013.

A soja é muito empregada em diversos setores por seu baixo custo, alta disponibilidade e principalmente pela alta concentração de isoflavonas (de 1,2 a 4,2 mg/g de soja), cuja variação da concentração depende da cultivar, ano da colheita e fatores edafoclimáticos (AHLUWALIA; BHASIN; SESHADRI, 1953, CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1998, PARK et al., 2002; HARJO et al., 2007).

O grão de soja contém basicamente três tipos de isoflavonas que se apresentam naturalmente sob quatro diferentes formas, entre estas, as formas agliconas e glicosiladas, totalizando assim 12 formas distintas de isoflavonas (LIU, 2004). Estas isoflavonas se comportam como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, possuem diversas propriedades como antitumorais, antioxidantes e

antimutagênica (COWARD et al., 1993, LIGGINS et al., 2000, BROUNS, 2002; LEPRI et al., 2012). As isoflavonas são fitoestrógenos que possuem uma similaridade estrutural e funcional com o estrogênio humano e tem sido consumido no mundo inteiro através dos tempos. De todos os fitoestrógenos, as isoflavonas de soja tem sido as mais estudadas. Pelo consumo extensivo de produtos à base de soja na Ásia e Japão, há conhecimento sobre os aspectos de segurança alimentar, bem como as possíveis interações entre o consumo de isoflavonas de soja e diminuição do risco de certos tipos de doenças. Em países asiáticos, o consumo de isoflavonas de soja é estimado em 20 a 100 mg/dia (BROUNS, 2002).

As β -glicosidases (β -D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) catalisam a hidrólise das ligações β -glicosídicas entre dois núcleos de carboidratos ou um carboidrato e uma aglicona (ESEN, 1992, MORANT et al., 2008). A β -glicosidase pode ser obtida a partir do metabolismo de fungos (ITO et al., 2008, HORII et al., 2009), bactérias (HUR *et al.*, 2000) e plantas como milho, feijões e soja (SUZUKI et al., 2006; SUE et al., 2006; HAN; CHEN, 2008).

A germinação da soja por 72 h a 25°C, em presença de luminosidade aumentou a atividade de β -glicosidase e ocasionou alterações no teor de isoflavonas totais e de suas diferentes formas, sendo que pode ocorrer aumento ou diminuição no teor de isoflavonas nos cotilédones e radículas, respectivamente. Estas mudanças no conteúdo de isoflavonas dependem da fase de germinação da soja e do metabolismo das sementes (RIBEIRO et al., 2007).

Considerando os benefícios das isoflavonas à saúde humana e que os vários estudos que demonstraram que as formas agliconas possuem melhor biodisponibilidade que seus conjugados glicosilados, nesta pesquisa foram investigadas as isoflavonas e β -glicosidases de soja com relação à germinação, otimização da extração, hidrólise e conversão em agliconas e atividade antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar as isoflavonas e β -glicosidases de soja com relação à germinação, otimização da extração, hidrólise e conversão em agliconas, compostos fenólicos e atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade de β -glicosidases do eixo embrionário, compreendendo radículas, hipocótilos, epicótilos e cotilédones de soja durante germinação na presença e na ausência de luminosidade.
- Avaliar as mudanças no teor das diferentes formas de isoflavonas do eixo embrionário, compreendendo radículas, hipocótilos, epicótilos e cotilédones de soja durante germinação na presença de luminosidade.
- Otimizar a extração de β -glicosidases de epicótilos de soja germinada na condição mais favorável à sua biossíntese, utilizando um delineamento composto central.
- Otimizar a conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas utilizando as β -glicosidases de epicótilos de soja germinada na condição mais favorável à sua biossíntese, utilizando um delineamento composto central.
- Otimizar a extração das diferentes formas de isoflavonas usando o delineamento experimental simplex-centroide com quatro solventes de diferentes polaridades e quantificar por HPLC.
- Correlacionar o teor de isoflavonas em equivalentes agliconas, compostos fenólicos e atividades antioxidantes dos diferentes componentes da soja germinada na condição mais favorável à biossíntese de β -glicosidase.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOJA

Segundo historiadores, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária do continente asiático, na antiga região da Manchúria, atual China, e é um produto agropecuário de grande interesse devido à destacada aplicabilidade de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu elevado valor mercadológico. A soja é a leguminosa mais cultivada em diversas regiões do Brasil e do mundo (MELLO FILHO et al., 2004, IBGE, 2010).

A soja fornece nutrientes ao organismo humano e benefícios para a saúde e é considerada alimento funcional. É rica em proteínas, contém isoflavonas, saponinas, fitatos, inibidores de protease, fitosteróis, peptídeos com baixo peso molecular, oligossacarídeos e ácidos graxos poli-insaturados, que auxiliam na redução de riscos de doenças crônicas e degenerativas. Também constitui boa fonte de minerais como ferro, potássio, magnésio, zinco, cobre fósforo, manganês e vitaminas do complexo B (CARRÃO-PANIZZI et al., 1998).

Tabela 1. Composição típica da soja.

Componente	Em 100 g de soja
Proteínas	40%
Lipídeos	20%
Carboidratos	34%
Minerais	5%
Cálcio	230 mg
Fósforo	580 mg
Ferro	9,4 mg
Sódio	1,0 mg
Potássio	1900 mg
Magnésio	220 mg
Cobre	0,1 mg
Isoflavonas	10 a 500 mg

Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2012b).

Em média, a soja possui 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidratos (açúcares como glicose, frutose e sacarose, fibras e os oligossacarídeos como rafinose e estaquiose). Cada 100 g de grãos contêm 230 mg de cálcio, 580 mg de fósforo, 9,4 mg de ferro, 1 mg de sódio, 1900 mg de potássio, 220 mg de magnésio e 0,1 mg de cobre, etc. (EMBRAPA, 2012b) (Tabela

1) e outros compostos como cinzas (4%) e isoflavonas e fitoestrógenos (10 a 500 mg) (LIU, 2004). Segundo Fischer (2001), a proteína da soja é relatada como a única proteína vegetal de qualidade semelhante à de proteínas de origem animal, em função da presença dos aminoácidos essenciais para humanos. A composição do grão de soja ou de suas estruturas individuais é dependente de fatores como cultivar, época de plantio, fatores localização geográfica e condições ambientais.

O grão de soja é constituído de 8% de tegumento (casca), 90% de cotilédone 2% e de hipocótilo (Figura 1). O cotilédone é a parte morfológica que apresenta alto teor de proteínas e óleo e a casca apresenta teor de carboidratos mais elevado. O hipocótilo apresenta teor de proteínas semelhante ao encontrado no cotilédone (LIU, 2004).

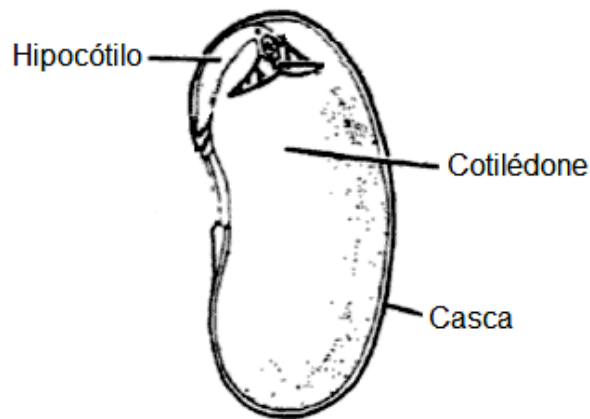


Figura 1. Estrutura da semente de soja. Fonte: LIU, 2004.

A soja contém substâncias denominadas de fitoquímicos, como os flavonoides, cujo consumo está relacionado à redução dos riscos de muitas doenças crônicas como as cardiovasculares, carcinogênicas e osteoporose (MESSINA; MESSINA, 1991, LICHTENSTEIN, 1998, MORAIS; SILVA, 2000, TAVARES et al., 2000, MONTEIRO et al., 2004). Mulheres asiáticas, consumidoras de soja em sua dieta tradicional, apresentaram melhores condições cardiovasculares e ósseas, quando comparadas com as ocidentais (BROUNS, 2002). Tanto a soja em grão quanto os produtos derivados como a farinha (kinako), o tofu ("queijo" de soja), o extrato solúvel ("leite"), a proteína texturizada (PTS ou "carne" de soja) e o missô possuem isoflavonas, cujos teores variam conforme os processos de elaboração (EMBRAPA, 2012b).

3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos apresentam em sua estrutura os grupos hidroxila característicos como substituintes de anéis aromáticos (HERNÁNDEZ; PRIETO GONZÁLES, 1999). Esta classe de compostos pode ser dividida em flavonoides (polifenóis), com esqueleto básico $C_6C_3C_6$, e não flavonoides (fenóis simples ou ácidos). Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes, as duplas ligações do anel e a dupla ligação da função oxo (carbono fazendo dupla ligação com o oxigênio) de algumas moléculas de flavonoides garantem a esses compostos, grande atividade antioxidante (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

A Figura 2 apresenta o exemplo da estrutura de dois compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides.

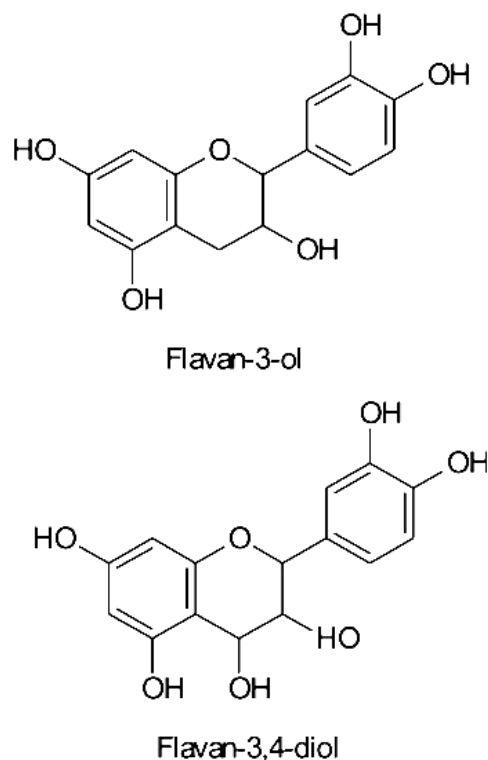


Figura 2: Estrutura química do flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. (Fonte: ANGELO e JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes em vários sistemas por sua habilidade de doar hidrogênio e elétrons e também por formar radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento em particular os lipídios (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Estes compostos são capazes de inibir a formação do oxigênio singlete, prevenir reações em cadeia pelo sequestro dos primeiros radicais formados, quelar íons metálicos impedindo sua ação catalisadora e decompor os produtos primários da oxidação para espécies não reativas (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos em muitos vegetais. Estes compostos de natureza complexa fazem parte como constituintes metabólicos de uma grande quantidade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Podem se apresentar na forma de pigmentos que são responsáveis pela cor dos alimentos ou como produtos secundários de metabolismo, provenientes de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Nos grãos de soja, o teor de compostos fenólicos é variável. Com 3,73 mg a 6,18 mg equivalente ácido gálico (EAG/g) na soja preta e entre 2,27 e 2,62 mg EAG/g na soja amarela. Em outras leguminosas pode variar entre 1,13 e 1,62 mg EAG/g na ervilha amarela; 1,04 a 1,53 mg EAG/g na ervilha verde; 1,28 a 6,89 mg EAG/g no feijão preto; 1,54 a 1,81 mg EAG/g no grão de bico e 1,02 a 7,53 mg EAG/g na lentilha (XU; CHANG, 2007).

Vários métodos são descritos para caracterizar a capacidade antioxidante em alimentos. No entanto, ainda não foi estabelecido um método universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser avaliada precisamente (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). A capacidade antioxidante da soja e de seus derivados foi avaliada pelos ensaios de DPPH (2,2 difenil-1- picrilhidrazil) (BARBOSA et al., 2006), co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico (PRATT; BIRAT, 1979, BARBOSA et al., 2006) e ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (YEN; LAI, 2003). Outros métodos como ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) também podem ser utilizados como alternativa para verificar a atuação dos componentes da soja como antioxidantes.

3.3 ISOFLAVONAS

Os flavonoides são grupos de compostos fenólicos provenientes de plantas que possuem um esqueleto de carbonos $C_6-C_3-C_6$ com dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia alifática de três carbonos, que normalmente é condensado para formar um pirano. As isoflavonas diferem dos flavonoides pois o segundo anel aromático está ligado à posição 3, e não na posição 2, do anel de pirano (Figura 3).

As isoflavonas são compostos originários do metabolismo secundário, com estrutura básica fenólica. Sua origem química está no ciclo dos ácidos orgânicos (WILDMAN, 2001), sendo formadas durante todo o período de enchimento do grão (desde 35 dias após o florescimento). As formas genistina e malonilgenistina aumentam suas concentrações no final do período de enchimento do grão, enquanto as formas daidzina e malonildaidzina aumentam durante todo o período de enchimento do grão (CARRÃO-PANIZZI et al., 1998).

As isoflavonas são essenciais para a sobrevivência das plantas leguminosas, protegendo-as contra o ataque de fitopatógenos pela ação antifúngica e também apresentam atividade antioxidante (VANETTEN et al., 1994; HSIEH, GRAHAM, 2001).

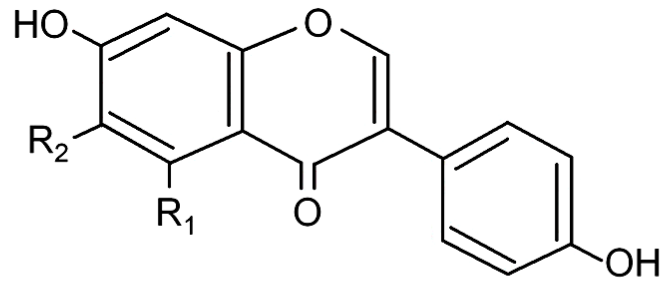
O grão de soja contém quatro diferentes formas de isoflavonas que se apresentam normalmente como glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina); acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina); malonilglicosiladas (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) e na forma estrutural não conjugada aglicona (daidzeína, genisteína e gliciteína), constituindo assim os 12 isômeros (Figura 3) (LIU et al., 2004).

As isoflavonas se comportam como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, especialmente em sintomas da menopausa e osteoporose (MURPHY, 1982, LIGGINS et al., 2000, TAKU et al., 2012). Em adição à sua atividade antiestrogênica, estes compostos possuem diversas propriedades, principalmente antitumoral (COWARD et al., 1993; LAMARTINIERE et al., 1995, FRITZ et al., 1998, LIGGINS et al., 2000, MARRELLI et al., 2012), antioxidante (BROUNS, 2002; PARK et al., 2001a, DIXIT et al., 2012) e antimutagênica (MIYAZAWA et al., 1999, LEPRI et al., 2012).

Ribeiro et al. (2007) descreveram que uma quantidade maior de

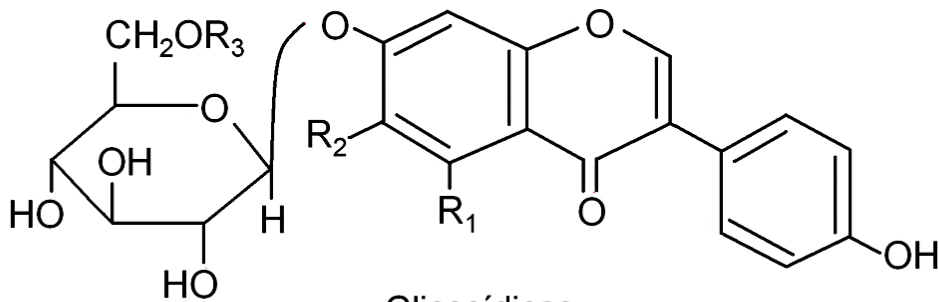
isoflavonas agliconas de soja foi obtida em grupos de maturidade precoce enquanto que a atividade de β -glicosidase não foi correlacionada com os grupos de maturidade. Nos grãos de soja as isoflavonas existem principalmente sob a forma glicosilada, ou seja, ligada à molécula de açúcar, na proporção aproximada de 3:6:1 de daidzina, genistina e glicitina, respectivamente (HARJO et al, 2007).

Na soja, a concentração de isoflavonas pode variar de 10 a 500 mg/100 g (COWARD et al., 1993) e depende das condições climáticas, forma de processamento e cultivar analisada (CARRÃO-PANIZZI et al., 1999). No grão, a composição de isoflavonas pode ser dividida de acordo com os seus componentes, ou seja, casca, cotilédone e hipocótilo. A concentração de isoflavonas no hipocótilo é 5,5 a 6 vezes maior do que no cotilédone, correspondendo a 10 a 20% do total de isoflavonas do grão, mesmo este representando somente 2% da massa total do grão. Entretanto, há no cotilédone 80 a 90% das isoflavonas do grão de soja, pelo fato desse representar maior proporção na planta (TSUKAMOTO et al., 1995).



Agliconas

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



Glicosídicas

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

Figura 3. Estrutura química de 12 formas de isoflavonas da soja (LIU, 2004).

Embora as formas glicosídicas daidzina e genistina (PARK et al., 2002) e malonilglicosídicas (KIM; CHUNG, 2007) estejam em maiores proporções no grão de soja, estas possuem menor atividade biológica do que as suas formas agliconas, daidzeína e genisteína. A absorção e retenção das isoflavonas pelo

organismo humano aumentam conforme a solubilidade em água. Assim, a genisteína é mais absorvida que a daidzeína que é mais absorvida do que a gliciteína (MURPHY; HENDRICH, 2002).

Para aproveitamento pelo organismo humano das formas glicosídicas, estas necessitam ser hidrolisadas. As isoflavonas β -glicosídicas são excelentes substratos para as β -glicosidases e seria esperado que os produtos hidrolisados fossem absorvidos no intestino delgado. Entretanto, as isoflavonas agliconas são absorvidas na parte proximal do intestino delgado como ocorre com muitos medicamentos de estrutura similar (PEÑALVO; NURMI; ADLERCREUTZ, 2004).

O efeito do processamento sobre o teor e perfil de isoflavonas em produtos de soja tem sido relatado na literatura. Jackson et al. (2002) verificaram que cada etapa de processamento pode contribuir para a perda de isoflavonas e descreveram que a recuperação de isoflavonas em tofu foi de aproximadamente 36% e de bebida de soja, de 54%, quando comparado ao grão de soja. Certos métodos de processamento como fervura, trituração e coagulação de proteínas no tofu não destroem significativamente a daidzina ou genistina, enquanto que outros métodos, como tostagem ou outros tratamentos em altas temperaturas, podem resultar numa perda de 15 a 21% de daidzina e genistina (FRANKE et al., 1995). O tratamento térmico, hidrólise enzimática e fermentação alteram significativamente a distribuição de isoflavonas em alimentos de soja (WANG; MURPHY, 1994), ou pode até ocorrer a remoção dessas substâncias dos alimentos (OKUBO; KOBAYASHI; TAKAHASHI, 1983). No caso das isoflavonas agliconas se mostram estáveis a temperaturas de até 150°C (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2007).

Embora a presença das formas acetilglicosídicas das isoflavonas esteja relacionada à aplicação de calor (FARMAKALIDIS; MURPHY, 1985), Jackson et al. (2002), reportaram que a presença de isoflavonas acetilglicosídicas foi observado durante todo o processamento de tofu e extrato aquoso, ou seja, desde a matéria prima até o produto final. Kim e Chung (2007) também descreveram que a presença de isoflavonas acetilglicosídicas foi observada em diferentes cultivares de soja antes e durante o processo de germinação.

A extração das isoflavonas de soja é frequentemente conduzida por solventes polares como etanol, metanol ou acetonitrila ou em combinação com água ou ácido. Os diferentes métodos de extração requerem tempo para procedimentos

de limpeza com o objetivo de minimizar as interferências em fases subsequentes de análise (HSU et al., 2010).

Hutabarat; Greenfield e Molholland (2001) concluíram que as isoflavonas de soja podem ser melhor extraídas utilizando solventes polares. Eldridge (1982), Barbuch et al. (1989) e Ikeda; Ohta e Watanabe (1995) verificaram que solução aquosa de metanol a 80% foi mais eficiente na extração das formas conjugadas das isoflavonas de soja e agliconas, contudo, acetonitrila, etanol e metanol puros não demonstraram boa capacidade de extração. Genovese e Lajolo (2001) ao determinarem o teor de isoflavonas em derivados de soja concluíram que o melhor solvente para extração, em termos de eficiência e praticidade, foi o metanol a 80% quando comparado com metanol a 70%, acetonitrila a 60 e 80% e estes combinados com HCl 0,1N e água destilada. Outros trabalhos (FARMAKALIDIS; MURPHY, 1985, GRIFFITH; COLLISON, 2001) descreveram que a solução aquosa de acetonitrila a 80% seria mais eficiente que metanol a 80%. Sem dúvida, a solução de metanol a 80% tem sido relatada como a mais empregada para a extração das isoflavonas de soja (COWARD; BARNES; SETCHELL, 1993, LIGGINS et al., 2000, GENOVESE; LAJOLO, 2001, PARK et al., 2002).

Os métodos por cromatografia são empregados na análise do teor de isoflavonas de soja devido à sua alta eficiência, rapidez e possibilidade de utilização de sistemas automatizados (CELEGHINI et al., 2001). Dentre essas metodologias, são usualmente citadas na literatura a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) (BARBOSA et al., 2006, CHEN et al., 2007, HARJO et al., 2007, ALEZANDRO et al., 2008, SAKTHIVELU et al., 2008, SHINDE et al., 2009, HORII, et al., 2009, PHAM; SHAH, 2009, ZAFRA-GOMÉZ et al., 2010), Cromatografia Gasosa (CG) (SETCHELL, 2001) e mais recentemente, Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (CLUAE ou UHPLC) (FIETCHER et al., 2010).

3.3.1 Consumo de Fitoestrógenos e Biodisponibilidade

Segundo Brouns (2002), uma das principais preocupações com relação à funcionalidade de alguns componentes vegetais no corpo humano é como esses componentes são realmente absorvidos no trato gastrointestinal, como são metabolizados e como alcançam seu alvo nos tecidos para exercer um efeito

favorável. A biodisponibilidade não representa apenas o processo de absorção e sim a absorção, distribuição, conversão metabólica para compostos bioativos no organismo e sua eliminação via urina e fezes. Testes clínicos bem controlados são feitos para determinar os níveis de fitoestrógenos no sangue, urina e fezes, bem como determinar o papel na circulação entero hepática desses componentes alimentares. Estes estudos sobre biodisponibilidade de fitoquímicos ainda são limitados pois há outros aspectos para serem considerados. Na natureza, assim como em alguns produtos processados, as isoflavonas, estão ligadas a um carboidrato (denominadas de gliconas: daidzina, genistina e glicitina) e apenas uma pequena fração apresenta-se como isoflavona não ligada (denominadas de agliconas: daidzeína, genisteína e gliciteína).

O efeito da presença da molécula de glicose sobre a velocidade de absorção de quercitina, por exemplo, um flavonoide presente em vegetais e com estrutura semelhante à das isoflavonas, foi confirmada quando a quercitina- β -glicosídica foi administrada em humanos saudáveis. O pico de concentração de quercitina em plasma humano foi cerca de 20 vezes maior e foi 10 vezes mais rápido quando comparado com o seu glicosídeo. Esses dados de farmacocinética sugerem que a forma glicosídica da quercitina foi absorvida no intestino delgado (STAHL et al., 2002).

Da mesma forma, Izumi et al. (2000) verificaram que as formas agliconas das isoflavonas são absorvidas mais rapidamente e em maior quantidade do que seus correspondentes glicosídicos, conforme estudos realizados em humanos que testaram a ingestão de baixa e alta quantidade de isoflavonas glicosídicas e agliconas por 2 e 4 semanas.

As isoflavonas agliconas possuem maior atividade biológica do que suas respectivas formas glicosídicas que são as principais formas encontradas no grão de soja e constituem de 50 a 90% dos flavonoides de farinha de soja (ELDRIDGE, 1982; FUKUTAKE et al., 1996). Somente as isoflavonas livres, não ligadas a moléculas de açúcar, conseguem atravessar a membrana plasmática, processo que ocorre passivamente via micelas. As malonil e acetilglicosil isoflavonas modificadas são substratos inadequados para a hidrólise enzimática e são absorvidas no intestino grosso, após hidrólise induzida por enzimas bacterianas no intestino (PARK, et al., 2001b).

As enzimas de bactérias intestinais podem ser responsáveis por reações de hidrólise. No lúmen, as bactérias convertem parte dessas agliconas em outras moléculas, mas existe grande variabilidade na eficiência digestiva das isoflavonas. Após a absorção, essas moléculas são incorporadas aos quilomícrons, que as transportam ao sistema linfático antes de entrar na circulação sanguínea. Os quilomícrons distribuem as isoflavonas em todos os tecidos extra-hepáticos, nos quais exercem seus efeitos metabólicos e retornam ao fígado como quilomícrons remanescentes. A retomada de isoflavonas da circulação ocorre passivamente e todas as células que contém receptores de estrogênio podem ser influenciadas por esta molécula. Quando estas moléculas são secretadas na bile pelo fígado, parte é reabsorvida pela circulação entero-hepática e parte é excretada com as fezes (ANDERSON; GARNER, 1997). Entretanto, a eliminação urinária das isoflavonas é maior e corresponde de 10 a 30% da circulação dietética (SETCHELL, 1998).

Após a ingestão, as formas malonil e acetil das isoflavonas não convertidas em glicosídicas são metabolizadas por bactérias intestinais, que removem a molécula de glicose, resultando nas respectivas agliconas. As formas agliconas são absorvidas pelos enterócitos, ou no caso da daidzeína, parte é convertida em equol e/ou metilangelolensina e são também absorvidos. Tem sido demonstrado que não são todos os indivíduos que possuem a capacidade de metabolizar daidzeína em equol, a razão exata não é bem conhecida. Porém, algumas pesquisas demonstraram que mulheres que excretam equol possuem um percentual maior de carboidratos, menor percentual de lipídeos e mais proteína vegetal na dieta diária. Assim, como o consumo desses componentes alimentares influenciaram no processo de fermentação no intestino grosso, pode-se supor que a flora bacteriana é essencial para a conversão das isoflavonas em agliconas e equol. O intestino delgado não apresenta relevância nesse aspecto, já que a parede intestinal não expressa atividade de β -glicosidase e não possui bactérias que expressem essa atividade, requerida para a conversão de glicosídicas em agliconas (BROUNS, 2002).

3.3.2 Benefícios das isoflavonas à saúde humana

Os alimentos funcionais contêm substâncias capazes de modular as respostas metabólicas do indivíduo, resultando em maior proteção e estímulo à

saúde. Promovem o bem-estar dos indivíduos, previnem o aparecimento precoce de doenças degenerativas e permitem aumentar a longevidade com qualidade de vida. Portanto, são alimentos que contêm uma ou mais substâncias capazes de atuarem no metabolismo ou na fisiologia do ser humano com promoção de benefícios à saúde (PACHECO; SGARBIERI, 2001).

No Brasil a legislação não permite as designações como suplemento alimentar, suplemento nutricional, complemento alimentar ou complemento nutricional e os produtos à base de soja encontrados no comércio não podem ser considerados alimentícios por apresentarem alegações medicamentosas ou terapêuticas conforme a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012) e GENOVESE et al. (2003).

Segundo a Legislação Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, alimento funcional é aquele que pode, além de funções nutricionais básicas quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para a saúde sem supervisão médica. As alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e à redução de risco a doenças. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças (BRASIL, 1999a). As alegações de propriedades funcionais relacionadas à soja incluem a proteína de soja, com a alegação de ajudar a reduzir o colesterol e a fibra alimentar, com a alegação de auxiliar o funcionamento do intestino. Nos rótulos dos alimentos de soja ou derivados, essas alegações devem vir acompanhadas da recomendação de associar o consumo da proteína de soja ou fibra a uma dieta saudável. Apesar de estudos indicando efeitos benéficos à saúde humana associados ao consumo de isoflavonas, os dizeres de rotulagem e o material publicitário dos produtos à base de soja não podem veicular qualquer alegação em função das isoflavonas, seja de conteúdo (“contém”), funcional, de saúde e terapêutica (prevenção, tratamento e cura de doenças) (ANVISA, 2012).

No entanto, algumas vantagens nutricionais podem ser obtidas pela substituição de alimentos de origem animal por alimentos à base de soja. A soja representa uma excelente fonte de proteína de alta qualidade, tem lipídeos com baixo teor de ácidos graxos saturados e uma grande quantidade de fibras. Assim, seu possível uso como alimento funcional torna-se interessante, já que o consumo de proteína de soja e sua fibra dietética parecem reduzir o risco de doença

cardiovascular e melhorar o controle glicêmico. Além do mais, as isoflavonas da soja estão associadas à diminuição de risco e tratamento de diferentes doenças. Dessa forma, a soja pode desempenhar papel importante na promoção da saúde (MATEOS-APARICIO et al., 2008).

As ações benéficas das isoflavonas estão associadas à sua capacidade antioxidante devido ao número de grupos hidroxila presentes na sua estrutura química. Essa capacidade decresce com a glicosilação ou a substituição do grupo hidroxila pelo grupo metoxila (NAIM et al., 1976). Assim, a atividade antioxidante da aglicona genisteína deve ser maior do que as formas glicosiladas (KAO; CHEN, 2006).

Os benefícios do consumo de soja na terapia de portadores de diabetes dependem do tipo de diabetes e de outros fatores como estilo de vida e necessidades metabólicas dos pacientes. Em diabéticos tipo 2, a soja pode ser uma boa opção devido aos efeitos sobre a hipertensão, hipercolesterolemia, aterosclerose e obesidade, doenças comuns nesses pacientes, além de diminuir a hiperfiltração renal, proteinúria e o risco de doenças renais. Uma das complicações mais comuns é o desenvolvimento de retinopatia diabética. Os efeitos angiogênicos da isoflavona podem ser valiosos contra essa desordem (JENKINS et al., 2003). Liu et al. (2010) estudaram o efeito de proteínas de soja com ou sem suplementação de isoflavonas sobre o controle glicêmico e sensibilidade à insulina em chinesas em período pós menopausal com pré diabetes ou diabetes nos estágios iniciais da doença. Os pesquisadores observaram que as mulheres tratadas por 3 ou 6 meses com proteína de soja com ou sem suplementação de isoflavonas não mostraram mudanças favoráveis para o controle glicêmico e resistência à insulina e afirmaram que este estudo randomizado não esclarece a hipótese de que a proteína de soja e isoflavonas possuam efeitos favoráveis no controle glicêmico e resistência à insulina entre chinesas na pós menopausa e que os efeitos favoráveis sobre a curva glicêmica de 2 h ainda precisa ser confirmada.

Por outro lado, os receptores para insulina nas células são enzimas estimuladas por ela própria, com atividade de proteína tirosina quinase (ALBERTS et al., 1997). O cálcio (Ca^{2+}) intracelular está intimamente relacionado à secreção de insulina, que envolve a ativação de uma proteína quinase dependente de Ca^{2+} . A potencialização da secreção por agentes ativadores da proteína quinase parece envolver um aumento na sensibilidade do sistema secretório para o Ca^{2+}

(ASHCROFT, 1994). A genisteína vem sendo estudada como um composto regulador da secreção de insulina, devido ao efeito inibidor da proteína tirosina quinase, cuja liberação é controlada por mecanismos complexos de sinalização celular que envolvem a ação destes receptores (KAHN, 1998). Os efeitos benéficos que vêm sendo observados em estudos com animais e culturas de células sugerem que a genisteína pode ser uma alternativa no tratamento do diabetes, principalmente do tipo 2. Em concentrações não estimulatórias de glicose, a genisteína não afetou a liberação de insulina. Entretanto, em concentrações estimulatórias (mínimo de 20 µg/mL) a genisteína aumentou significativamente a liberação de insulina (ASHCROFT, 1994).

Com relação às doenças cardiovasculares (DCV), estudos mostram que o consumo regular de leguminosas diminui significativamente o risco de DCV. Estudos com soja reforçam que a substituição de proteína de origem animal pela proteína de soja reduz a concentração de colesterol total e de colesterol de baixa densidade (LDL) no plasma e diminui os níveis de triglicerídeos (ANDERSON; MAJOR, 2002). Há uma hipótese de que as isoflavonas ingeridas em uma dieta que contenha soja, possa inibir o desenvolvimento de aterosclerose devido às suas propriedades antioxidantes contra a oxidação do LDL colesterol, que gera a cascata de eventos que levam à produção dos ateromas. Além disso, as isoflavonas possuem efeito hipocolesterolêmico, que pode ser devido à interação das isoflavonas com os receptores de estrogênio devido à similaridade entre o estrogênio (estradiol) e as isoflavonas e seus respectivos metabólitos (Figura 4) (ANDERSON et al., 1999).

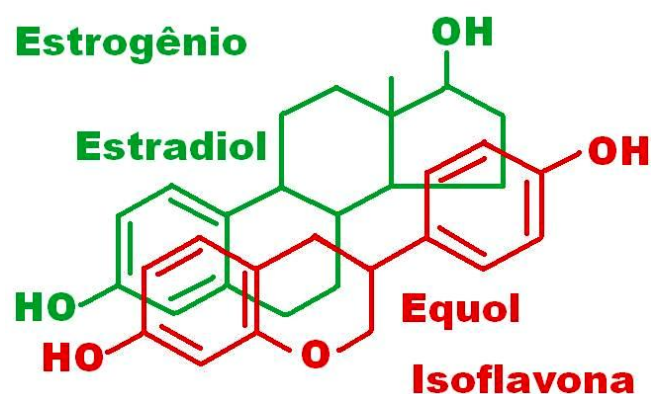


Figura 4. Comparação das estruturas químicas do equol (metabólito da daidzina) e estradiol. (Fonte: SETCHELL, CASSIDY, 1999)

Os diferentes estudos indicaram que para alcançar o efeito de diminuição de colesterol, é importante consumir a proteína de soja com sua fração natural de isoflavonas, pois a separação ou o isolamento dos componentes naturais da soja pode reduzir os efeitos benéficos das isoflavonas e proteínas (MATEOS-APARICIO et al., 2008).

Com relação aos efeitos das isoflavonas na diminuição de risco e tratamento de câncer, os dados existentes não são suficientes para concluir como o consumo de soja é benéfico nesses casos. Pesquisadores têm analisado as diferenças dietéticas entre Japão e as nações ocidentais para tentar explicar as variações nas taxas de mortalidade decorrentes do câncer (MATEOS-APARICIO et al., 2008). Segundo Craig (1997), o grão de soja contém alto teor de componentes com atividade anticancerígena, como fitatos, inibidores de protease, fitosteróis, saponina, ácidos fenólicos e isoflavonas, mas a maioria dos dados sugere que as isoflavonas são as responsáveis, devido à sua atividade estrogênica.

O crescimento de câncer de mama dependente ou não de estrogênio em células *in vitro*, tem sido inibido pela genisteína, mas as concentrações necessárias para a inibição *in vivo* ainda não estão estabelecidas. Há evidências de que as isoflavonas aumentam a atividade estrogênica em mulheres com risco de desenvolver câncer de mama e mulheres que já possuem a doença (TROCK et al., 2006).

Messina e Wood (2008) afirmaram que ainda há controvérsias com relação aos benefícios do consumo de isoflavonas e sua influência sobre o câncer. Apesar de existir um número considerável de investigações a respeito do potencial dos alimentos à base de soja na redução do risco de câncer, especialmente o de mama, a controvérsia se deve aos estudos baseados em experimentos *in vitro*. Esses estudos alegam que as isoflavonas podem estimular o crescimento de tumores sensíveis ao estrogênio já existentes. Há poucas evidências que sugerem que o pequeno efeito estrogênico das isoflavonas da dieta produza um impacto clínico relevante no tecido mamário de mulheres saudáveis. Outras evidências mostraram um decréscimo do risco de câncer de mama invasivo. Assim, apesar das controvérsias, Messina e Wood (2008) afirmaram que o consumo de isoflavonas na dieta normal (<100 mg/dia) parece não ter efeitos adversos sobre a promoção do câncer de mama em mulheres saudáveis ou em mulheres sobreviventes de casos de câncer de mama que não estejam mais em tratamento.

Já para câncer de próstata, os possíveis efeitos benéficos podem não estar associados aos receptores de estrogênio. O estrogênio causa a morte programada de células cancerígenas na próstata e inibe as enzimas associadas a diferentes processos no desenvolvimento do câncer (ADLERCREUTZ, 2002). Assim, os alimentos à base de soja podem ser um fator que contribui para a diminuição da mortalidade decorrente deste tipo de câncer. Segundo Adlercreutz; Mazur e Bartels (2000) a genisteína tem demonstrado reduzir a síntese de DNA em células de câncer de próstata de humanos *in vitro* e diminuir o desenvolvimento de câncer de próstata em ratos.

Segundo Mateos-Aparicio et al. (2008), existem também evidências do efeito protetor da soja contra câncer de cólon. Em estudos *in vitro*, produtos à base de soja têm mostrado um efeito antiproliferativo sobre vários tipos de células, incluindo as células do trato gastrointestinal. Os flavonoides da dieta demonstraram efeito antiproliferativo em células cancerígenas do cólon e essa propriedade pode estar relacionada com a habilidade de inibir o acúmulo de ácido ascórbico pelas células, que é utilizado durante a divisão celular. Mesmo assim, os autores relataram que há resultados mostrando que as isoflavonas não protegem contra o desenvolvimento de câncer de cólon e os estudos ainda são contraditórios.

Os alimentos à base de soja também estão associados à redução do risco de osteoporose. Estudos com isoflavonas e proteínas de soja sugerem que mulheres que se aproximam do período menopausal e que consomem proteína de soja rica em isoflavonas se beneficiam mais pelo aumento na densidade mineral óssea do que mulheres com dieta pobre em isoflavonas (ALEKEL et al 2010).

3.4 β -GLICOSIDASE

Segundo Izumi et al. (2000) as formas agliconas são absorvidas mais rapidamente no organismo do que as outras formas de isoflavonas. Assim, devido a este fato, muitos pesquisadores têm utilizado as enzimas β -glicosidases para a biotransformação das formas glicosiladas em agliconas. A conversão de β -glicosídeos em agliconas pode ocorrer com a utilização de β -glicosidase proveniente do metabolismo de microrganismos (fungos ou bactérias) ou do próprio grão de soja (Park et al., 2001b)

Em produtos *in natura* e processados, os fitoestrógenos estão

normalmente ligados a carboidratos e são denominados de glicosídeos. Exemplos de isoflavonas glicosídicas são a daidzina, genistina e glicitina. Uma pequena fração das isoflavonas são formas livres de fitoestrógenos e são denominadas de agliconas. As agliconas derivadas da daidzina, genistina e glicitina são a daidzeína, genisteína e gliciteína, respectivamente. As formas glicosídicas podem ainda ocorrer como conjugados acetil ou malonil, porém, apenas as formas agliconas, a forma biologicamente ativa, possui efeito estrogênico (Bokkenheuser; Winter, 1988, Pham; Shah, 2009).

As β -glicosidases (β -D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) compreendem um grupo heterogêneo de enzimas que catalisam as ligações β -glicosídicas entre dois núcleos de carboidratos ou um carboidrato e uma aglicona (ESEN, 1992; MORANT et al., 2008). Nos tecidos intactos das plantas, as β -glicosidases estão armazenadas separadamente do substrato e estão envolvidas em diversos aspectos da fisiologia da planta como a formação de produtos intermediários da lignificação da parede celular, degradação da parede celular do endosperma durante a germinação e a ativação de fitormônios e componentes de defesa (VANETTEN et al., 1994, HSIEH, GRAHAM, 2001; MORANT et al., 2008).

A β -glicosidase pode ser obtida a partir do metabolismo de fungos (ITO et al., 2008, HORII et al., 2009), bactérias (HUR et al., 2000) e plantas como milho, feijões e soja (SUZUKI et al., 2006; SUE et al., 2006; HAN; CHEN, 2008). O Japão, entre outros países orientais, utiliza há séculos na alimentação, a soja fermentada e, em países europeus e nos Estados Unidos, ocorre um crescente consumo desta leguminosa e seus derivados como um alimento funcional (PARK et al., 2002).

Hosel e Todenhagem (1980) observaram que a β -glicosidase encontrada em tecidos celulares da soja tem massa molecular igual 45 kDa, pH isoelétrico entre 4,2-4,4 e para atividade, a faixa de pH ótimo entre 5,2 e 6,0, sendo sua temperatura ótima de 50°C. Matsuura e Obata (1993) caracterizaram a enzima β -glicosidase-C, sua massa molecular foi estimada entre 81 kDa e 36 kDa e o pH isoelétrico ocorreu em 6,7 com atividade ótima em pH 4,5 e temperatura de 45°C.

Em vários estudos, as enzimas têm sido obtidas de cotilédones de soja, contudo, atividades de β -glicosidase relativamente altas também foram observadas em outras partes da planta, bem como as raízes e radículas (HSIEH, GRAHAM, 2001; SUZUKI et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006).

A hidrólise enzimática de glicosil isoflavonas de soja foi demonstrada com a utilização de enzimas produzidas por *Rhizopus oryzae* (GYÖRGY; MURATA; IKEHATA 1964, Park et al., 2002), *Rhizopus oligosporus* (EBATA et al., 1972, Park et al., 2002) e *Lactobacillus casei* (MATSUDA et al., 1994, Park et al., 2002). As β -glicosidases isoladas de mudas de soja são preferidas quando comparadas aos seus análogos microbianos, pois a β -glicosidase proveniente de radículas de soja germinada age exclusivamente sobre as formas conjugadas malonilglicosídicas e permite maior controle sobre a produção de isoflavonas agliconas que serão mais rapidamente absorvidas (SUZUKI et al., 2006).

Ao contrário da utilização de β -glicosidase de origem microbiana pouco se tem estudado o emprego de β -glicosidase do próprio grão. Matsuura; Sasaki e Murao (1995) verificaram que deixando os grãos de soja em maceração, as isoflavonas glicosiladas formavam por hidrólise as agliconas (daidzeína e genisteína) devido a ação da enzima β -glicosidase. Nos alimentos de soja fermentada (missô, tempeh) predominam as formas agliconas genisteína e daidzeína. Provavelmente, devido ao fato de que as glicosil isoflavonas são hidrolisadas à agliconas durante o processo de fermentação devido à ação da β -glicosidase (PEÑALVO; NURMI; ADLERCREUTZ, 2004, PARK et al., 2001b).

Ribeiro et al. (2006) descreveram que em soja (BR 213) germinada por 72 h a 25°C, o teor de isoflavonas totais aumentou significativamente e a atividade de β -glicosidase de radículas e cotilédones foi 3,3 e 2,3 vezes maior, respectivamente, quando as plantas foram germinadas sob luz. Assim, o processo de germinação pode ser um método alternativo satisfatório para aumentar a atividade de β -glicosidase e produzir isoflavonas agliconas. Mesmo que a quantidade de radículas seja menor que a quantidade de cotilédones resultante da germinação da soja, este pode ser um processo alternativo para obtenção de radículas com maior quantidade de β -glicosidase.

Muitas fontes de β -glicosidase tem sido investigadas e com mais de 140 fontes da enzima relatadas, como as fontes vegetais, microbianas, animais e seres humanos, e com diferentes atividades, pH de 2,5 a 10,0 e temperatura de 0°C a acima de 100°C (BRENDA, 2012).

3.5 O PROCESSO DE GERMINAÇÃO E ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DA SOJA

A germinação é uma alternativa para o processamento e consumo dos grãos (RIBEIRO et al., 2006). Este processo é realizado mediante condições apropriadas em que o eixo embrionário dá prosseguimento ao seu desenvolvimento que havia sido interrompido devido à maturidade fisiológica (CASTRO, BRADFORD, HILHORST, 2004).

As sementes germinam quando as condições para o crescimento são favoráveis e não apresentam nenhum tipo de dormência. A primeira condição para germinação é a exigência de água, além de condições adequadas de temperatura e luz. Assim, o processo de germinação se inicia pela embebição e reativação do metabolismo. Neste estágio é comum observar um padrão trifásico de absorção de água e hidratação. A fase inicial (Fase I) é um processo dirigido pelo gradiente de potencial hídrico entre a semente e o seu ambiente. Em geral, esta fase é rápida e puramente física que depende somente da ligação da água na matriz da semente seca. Quando toda a matriz atinge hidratação plena, o conteúdo de água na semente alcança um nível de platô e é mantido constante por um período chamado como intervalo ou fase de preparação e ativação (Fase II da embebição). Nesta fase, as células do interior das sementes não podem mais absorver água pois não podem mais se expandir. Durante a Fase II, são ativados os processos metabólicos requeridos para o crescimento do embrião e a conclusão do processo germinativo. A duração desta fase depende da temperatura e do potencial hídrico, nesta fase, as sementes tendem a se manter tolerantes à desidratação e dessecação. A Fase III é marcada por um aumento no conteúdo de água da semente, que acontece devido à absorção associada ao início do crescimento do embrião (concomitante com divisão celular e conseqüente alongamento embrionário – protusão da radícula). Uma vez iniciado o crescimento, as sementes perdem a tolerância à desidratação (CASTRO, BRADFORD, HILHORST, 2004).

O broto de soja, ou *moyashi* (em japonês) (soja com 6 ou 7 dias de germinação) se tornou um importante alimento vegetal em países como a Coreia (LEE et al., 2007), Japão, China e Estados Unidos (VIEIRA; NISHIHARA, 1992, LIU, 1997). Apesar do seu alto valor nutritivo, o broto de soja tem baixo custo de produção e é relativamente fácil de ser produzido. Muitos estudos descrevem sobre a técnica de cultivo, valor nutricional, melhoramento genético, prevenção contra

problemas que podem ocorrer durante o cultivo, qualidade e quantidade de brotos de soja. O teor de isoflavonas em brotos de soja verdes e amarelos, bem como o efeito da quantidade de luz sobre o teor de isoflavonas tem sido relatados (Tabela 1) (LEE et al., 2007).

Tabela 2: Teor de Isoflavonas (mg/g) em partes de soja germinadas com e sem a presença de luz

<i>Parte</i>	<i>Com luz</i>	<i>Sem luz</i>
Cotilédones	2,17	2,54
Hipocótilos	1,17	1,13
Radículas	2,40	2,58

Fonte: Adaptado de Lee et al., 2007

Segundo Buckeridge et al. (2004), no início da germinação, a reidratação dos tecidos da semente está normalmente relacionada ao reparo de estruturas que podem ter sido danificadas durante a secagem, como membranas e ácidos nucleicos. Esse processo envolve um grande gasto energético e, na maioria dos casos, as sementes quiescentes armazenam entre 2 e 5% do peso seco como sacarose. Em alguns casos, as sementes também acumulam oligossacarídeos da série da rafinose, que também são rapidamente degradados para a produção de energia. O processo de degradação ocorre na presença de enzimas hidrolíticas e é a partir desse ponto que se inicia o crescimento embrionário, cujo fim é produzir um organismo autotrófico.

Dentre as enzimas que são ativadas e atuam durante o processo de germinação, há as proteases e fitases (ABDULLAH; BALDWIN; MINOR, 1984, MOSTAFA; RAHMA, 1987), a invertase, alfa galactosidase entre outras que são responsáveis pela quebra de açúcares para obtenção de energia, as lipases que degradam os triglicerídeos armazenados em organelas denominadas corpos lipídicos (BUCKERIDGE et al., 2004); além dessas enzimas, a β -glicosidase, além de participar da degradação de glucanos de ligação mista (β -glucanos) para mobilização de glicose (BUCKERIDGE et al., 2004), é responsável pelo aumento do teor de isoflavonas agliconas (SANTOSH; BALASUBRAMANIAN; LALITA 1999). A obtenção desta enzima a partir do cotilédone de soja com atividades específicas

elevadas da β -glicosidase foi observada em outras partes da planta como, radícula, raízes e epicótilo (RIBEIRO et al., 2006).

Hsieh e Graham (2001) purificaram e caracterizaram a β -glicosidase extraída a partir das raízes de soja germinada por 7 a 9 dias. O extrato bruto das raízes apresentou elevada atividade específica de β -glicosidase, sendo aproximadamente 800 vezes maior do que do extrato do cotilédone. A β -glicosidase endógena de soja ou dos componentes do grão germinado podem ser extraídos e aplicados em produtos derivados de soja para obtenção de alimentos com boas propriedades funcionais (RIBEIRO et al., 2006).

O teor protéico da semente germinada mantém-se em torno de 100% da proteína inicial em base seca (FORDHAM; WELLS; CHEN, 1975). A germinação das sementes proporciona aumento do seu valor nutritivo, pela melhoria da digestibilidade protéica, redução do conteúdo de fitatos (AZEKE et al., 2011) e aumento da biodisponibilidade de vitaminas e minerais, principalmente vitamina C (WAI et al., 1947, FORDHAM; WELLS; CHEN, 1975, BORDIGNON et al., 1995).

Chi et al. (2005) observaram que o teor de proteínas, lipídeos, fibras, vitaminas e outros nutrientes, foi bem maior em brotos de soja verde (germinados na presença de luz) do que nos brotos comuns (amarelos, germinados sem a presença de luz), germinados por cerca de 5 a 7 dias. O esverdeado dos cotilédones é resultante da formação de clorofila induzida pela luz e diminui o valor de mercado dos brotos, pois os consumidores preferem cotilédones amarelados. Em tempos menores de germinação (48 h), também foi demonstrado aumento nos teores de lipídeos (de 22,05 para 23,11%) e proteínas (de 35,67 para 42,02%) (MARTINEZ et al., 2011).

O processo de germinação pode influenciar diferentemente o teor de isoflavonas entre cultivares. O teor das 12 formas de isoflavonas foi verificado em seis diferentes cultivares de soja em três estádios diferentes de desenvolvimento. Verificou-se um aumento das formas agliconas em todas as cultivares, alterações variadas no teor de isoflavonas glicosídicas e malonilglicosídicas e ausência ou quantidades muito pequenas de acetilglicosídicas (KIM; CHUNG, 2007).

A atividade de β -glicosidase e o teor de isoflavonas durante a germinação da soja tem sido pouco investigadas. Não há relatos na literatura sobre a extração de β -glicosidase de epicótilos de soja germinada e utilização dessa enzima para conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas.

MATERIAL E MÉTODOS

3.6 ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE DO EIXO EMBRIONÁRIO DE SOJA GERMINADA NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE LUZ

4.1.1 Germinação da Soja

Para cada um dos 10 experimentos, três blocos de cinco rolos de papel de germinação contendo 50 sementes de soja (BRS 257, cedidas pela Embrapa Soja – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Londrina, Paraná, Brasil) foram randomicamente colocados em duas câmaras de germinação. Em uma das câmaras, as sementes foram submetidas em um fotoperíodo de 10 h de iluminação natural (localização geográfica: -23° 19' 45.34", -51° 12' 7.45", dezembro de 2009) e na outra câmara de germinação, o fotoperíodo não foi aplicado. A temperatura foi mantida constante a 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) com uma umidade relativa de 100% por 72, 96, 120, 144 e 168 h. As radículas e epicótilos começaram a aparecer em 72 h de germinação.

Em cada tempo experimental, as radículas, epicótilos, hipocótilos e cotilédones (Figura 5) foram manualmente separados e liofilizados. As amostras foram moídas e armazenadas a -22°C para análises e as cascas foram descartadas.

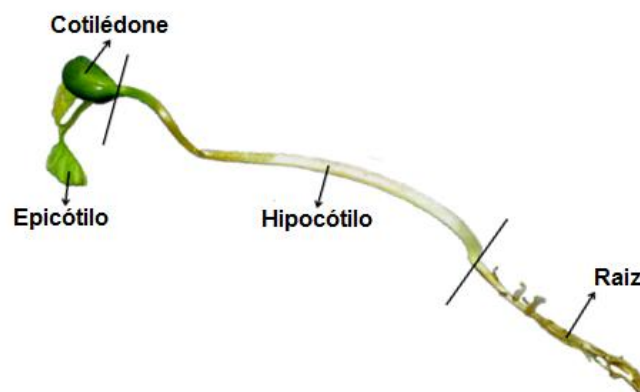


Figura 5. Partes de soja germinada a 144 h em câmara germinadora com luz, 100% de umidade relativa

Os hipocótilos e cotilédones foram também analisados antes da germinação para verificar a atividade da β -glicosidase antes do início do processo de germinação.

4.1.2 Extração e determinação da atividade de β -glicosidase

A β -glicosidase das amostras em cada tempo de germinação foi extraída de 100 mg de amostra com 1,5 mL de tampão citrato, 0,05 M, pH 4,5 contendo 0,1 M de NaCl por 1 h à temperatura ambiente conforme descrito por Carrão-Panizzi e Bordignon (2000). As amostras foram centrifugadas e determinadas a atividade da β -glicosidase e o teor de proteínas solúveis do sobrenadante. A atividade da enzima foi determinada de acordo com o método descrito por Matsuura; Sasaki e Murao (1995). Neste procedimento, 2 mL de p-nitrophenil- β -D-glucopiranosídeo (p-NPG) 1 mM em tampão fosfato-citrato 0,1 M e pH 5,0, foram transferidos para os tubos de ensaio e colocados em banho a 30°C por 10 min. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante obtido na extração foi adicionado à mistura e os tubos foram novamente colocados em banho a 30°C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M e a concentração de p-nitrofenol liberada durante a reação foi determinada medindo-se a absorvância em espectrofotômetro a 420 nm. Para quantificação, foi feita uma curva com 8 concentrações em triplicata de p-nitrofenol variaram de 20 a 160 μ M.

Uma unidade de atividade de enzima (UA) foi definida como a quantidade de β -glucosidase que libera 1 μ M de p-nitrofenol por minuto sob as condições do ensaio. Os resultados foram expressos como atividade de β -glicosidase (UA.g⁻¹) por grama de amostra seca e foram avaliados de acordo com o tempo de germinação. A atividade específica de β -glicosidase foi expressa como a relação entre a atividade de enzima e o teor de proteínas solúveis (UA.mg⁻¹)

4.1.3 Determinação de proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis do sobrenadante foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Os resultados foram expressos em mg de proteínas solúveis em base seca.

4.1.4 *Rendimento da atividade de β -glicosidase*

O rendimento da atividade de β -glicosidase foi calculado de acordo com o peso seco total obtido de cada componente do eixo embrionário em cada tempo de germinação.

4.1.5 *Delineamento experimental e análise estatística*

O experimento foi conduzido em blocos completos casualizados e três replicatas foram feitas para cada tempo de germinação sob condições de luz e ausência de luz. Foi feita uma análise de variância e as medias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foi realizada, também, a análise de regressão e os dados analisados com o software Statistica 8.0 (StatSoft, 2007).

3.7 ALTERAÇÕES NO TEOR DE ISOFLAVONAS NO EIXO EMBRIONÁRIO DE SOJA GERMINADA NA PRESENÇA DE LUZ

4.2.1 *Matéria prima e reagentes*

Foram utilizados grãos de soja *Glycine max* (L.) Merrill cultivar BRS 257, desenvolvida na Vitrine Tecnológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja em Londrina – PR. Todos os reagentes foram de grau analítico e grau HPLC e de diferentes procedências comerciais.

4.2.2 *Preparo de amostras e germinação da soja*

Os grãos de soja (BRS 257) foram submetidos a uma seleção prévia para remoção dos grãos danificados, manchados e materiais estranhos e então submetidos ao processo de germinação, conforme descrito por Yoshiara et al. (2011).

Foram preparados 15 rolos de papel Germitest contendo 50 sementes selecionadas de soja cultivar BRS 257 e colocados em estufa climatizada (Marconi, MA 835) a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e 100% de umidade relativa por 144 h com

fotoperíodo de 10 h por dia. Após o período de germinação, os componentes da soja germinada, como epicótilos, hipocótilos, raiz e cotilédones foram separados manualmente, liofilizados (Christ, 500), moídos (Ika, 33) e armazenados a -26°C até o momento da análise.

4.2.3 Extração e quantificação de isoflavonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O teor de isoflavonas foi determinado em triplicata em todos os componentes da soja germinada e comparado com a farinha de soja desengordurada não germinada preparada a partir das mesmas sementes utilizadas para a germinação.

Para extração das isoflavonas foram utilizados 100 mg de farinha de diferentes componentes do grão de soja germinado e liofilizados e de farinha de soja desengordurada não germinada. Estas foram colocadas em tubos de ensaio com 4,0 mL de etanol aquoso a 70% (v/v), contendo 0,1% (v/v) de ácido acético, mantidos à temperatura ambiente por 5 h, e agitados manualmente a cada 15 min conforme descrito por Carrão-Panizzi; Simão e Kikuchi (2003). O extrato foi centrifugado e o sobrenadante filtrado em membranas de nylon de 0,20 µm e 20 µL foram utilizados para separação e quantificação de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo Berhow (2002) com algumas modificações.

Foi utilizado um cromatógrafo (Shimadzu, LC-10AT VP, Kyoto, Japão) contendo forno (CTO-10AS VP) com temperatura controlada de 25°C e detector de arranjo de diodos (SPD-M10Avp). A eluição das isoflavonas foi realizada em coluna de fase reversa ODS (M) C18 (4 mm x 15 cm e partículas de 5 µm). O sistema gradiente foi linear e a condição inicial consistiu de 100% de água (pH 3,0 ajustado com ácido acético glacial) e 0% de acetonitrila. Em 25 min de eluição, foi atingida a proporção de 45:55 (água acidificada: acetonitrila) (v/v), em 27 min o gradiente atingiu 100% de acetonitrila retornou às condições iniciais em 35 min. O tempo de corrida foi de 40 min em uma vazão de 1 mL min⁻¹ e as isoflavonas foram separadas e detectadas a 260 nm.

A identificação e quantificação das isoflavonas glicosiladas e agliconas foi realizada por comparação com as curvas de calibração individuais para daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína. As curvas de

calibração foram obtidas plotando as concentrações dos padrões em função da área dos picos obtidos após as injeções de 20 µL. As concentrações das soluções padrão foram cuidadosamente escolhidas para atender a maior faixa de teor de isoflavonas nas amostras.

Para as isoflavonas cujos padrões puros não estavam disponíveis comercialmente, as curvas de calibração foram ajustadas com base nas diferenças de peso molecular. A quantificação das isoflavonas malonilglicosídicas (malonil daidzina, malonil glicitina e malonil genistina) foram calculadas com base nas curvas de calibração das isoflavonas glicosiladas correspondentes (daidzina, glicitina e genistina, respectivamente) utilizando a similaridade com das absorvidades molares, como descrito por Coward et al. (1998).

Os resultados para isoflavonas podem ser apresentados como equivalentes agliconas ou como a soma das diferentes formas (KLUMP et al., 2001). Neste experimento, os teores das isoflavonas estão apresentados individualmente e como a soma das diferentes formas, determinados em triplicata e expressos como mg g⁻¹ e, base seca.

3.8 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE B-GLICOSIDASE DE EPICÓTILO DE SOJA GERMINADA E DA CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS

4.3.1 *Matéria prima e reagentes*

Foram utilizados grãos de soja *Glycine max* (L.) Merrill cultivar BRS 257, desenvolvida na Vitrine Tecnológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja em Londrina – PR. Todos os reagentes foram de grau analítico e grau HPLC e de diferentes procedências comerciais.

4.3.2 *Preparo de amostras e germinação da soja*

Os grãos de soja (BRS 257) foram submetidos a uma seleção prévia para remoção dos grãos danificados, manchados e materiais estranhos e então submetidos ao processo de germinação, conforme descrito por Yoshiara et al. (2011).

Foram preparados 15 rolos de papel Germitest contendo 50

sementes selecionadas de soja cultivar BRS 257 e colocados em estufa climatizada (Marconi, MA 835) a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e 100% de umidade relativa por 144 h com fotoperíodo de 10 h por dia. Após o período de germinação, os componentes da soja germinada, como epicótilos, hipocótilos, raiz e cotilédones foram separados manualmente, liofilizados (Christ, 500), moídos (Ika, 33) e armazenados a -26°C até o momento da análise.

4.3.3 Otimização da extração de β -glicosidase de epicótilo de soja germinada

Testes preliminares de extração da β -glicosidase foram realizados, visando a aplicação da metodologia de superfície de resposta para definição do ponto central das variáveis temperatura e pH de extração. Assim, foi definido a temperatura de 30°C e pH igual a 5,0 como condição onde ocorreu maior extração da enzima. O tempo de extração de 50 min foi mantido constante.

Os efeitos de temperatura ($X_1 = 23, 25, 30, 35$ e 37°C) e pH ($X_2 = 3,6, 4,0, 5,0, 6,0$ e $6,4$) de extração da β -glicosidase dos epicótilos de soja germinados após 144 h foram investigados aplicando o planejamento fatorial composto central com cinco níveis de variação totalizando 11 ensaios que foram realizados aleatoriamente, conforme Tabela 2.

Tabela 3: Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento fatorial composto central

Variáveis independentes	Níveis de variação				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
$X_1 = \text{Temperatura } (^\circ\text{C})$	23	25	30	35	37
$X_2 = \text{pH}$	3,6	4,0	5,0	6,0	6,4

Para cada ensaio a extração da β -glicosidase foi utilizada a proporção de 1:15 (m/v) conforme Carrão-Panizzi e Bordignon (2000). Assim, a extração foi realizada com 100 mg de epicótilo de soja germinada e liofilizada e 1,5 mL de tampão citrato de sódio $0,1\text{mol L}^{-1}$ contendo NaCl $0,1\text{mol L}^{-1}$ nos respectivos pHs (X_1) e temperaturas (X_2). A agitação foi manual a cada 10 min por um período de 50 min. Posteriormente, foram centrifugados (Cientec, CT 600) por 15 min a 2500

g. A função resposta (Y), que corresponde a atividade de β -glicosidase extraída, foi determinada no sobrenadante obtido.

A função resposta (Y) foi avaliada e obtidos os parâmetros da ANOVA e superfície de resposta utilizando o programa STATISTICA 7.0 da *StatSoft, Inc.* e para otimização estimou-se o parâmetro de desejabilidade.

4.3.4 *Determinação de β -glicosidase de epicótilos de soja germinada*

O teor de β -glicosidase nos epicótilos de soja germinada por 144 h na presença de luz foi determinado conforme descrito no item 4.1.2.

4.3.5 *Otimização da conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas utilizando β -glicosidase de epicótilo de soja germinada*

Foram realizados testes preliminares de conversão de isoflavonas em agliconas de farinha de cotilédone de soja desengordurada utilizando β -glicosidase de epicótilo de soja germinada, para definição dos níveis das variáveis temperatura e pH, bem como o tempo de incubação a ser utilizado e a quantidade de enzima a ser adicionada. Assim, foram definidos como ponto central o pH igual a 5,5 e temperatura de 35°C. O tempo de incubação de 14 h e a adição de 5 UA de β -glicosidase foram mantidos constantes.

Foi aplicado um planejamento composto central com duas variáveis (temperatura e pH) e cinco níveis de variação (Tabela 3) em dois blocos. O primeiro bloco consistiu em um planejamento fatorial 2^2 , tendo como variáveis temperatura (20, 35, 50°C) e pH (4,0, 5,5 e 7,0). O segundo bloco consistiu no preparo dos pontos axiais do planejamento para verificação dos efeitos quadráticos.

Para conversão, foram preparados tubos de ensaio contendo 3,0 mL de farinha de cotilédone de soja desengordurada (cultivar BRS 257), com pHs ajustados utilizando soluções 0,1 M de fosfato de sódio bibásico e ácido cítrico, na proporção 1:10 (p/v) com adição de 5,0 UA de β -glicosidase de epicótilo de soja germinada por 144h na presença de luz. Os tubos contendo as amostras foram colocados sob agitação em shaker (25 rpm) com temperatura controlada por 14h.

Tabela 4. Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento fatorial composto central para otimização da conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas em farinha de cotilédone de soja (BRS 257) desengordurada utilizando β -glicosidase de epicótilo de soja germinada por 144h na presença de luz.

Variáveis independentes	Níveis de variação				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
$X_3 =$ Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	13,9	20,0	35,0	50,0	56,2
$X_4 =$ pH	3,39	4,00	5,50	7,00	7,61

Após o período de conversão, as amostras foram congeladas em freezer a -80°C , liofilizadas e submetidas à determinação de isoflavonas por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (CLUAE).

A função resposta ($Z = \% \text{ agliconas com relação ao total de isoflavonas extraídas}$) foi processada e obtidos os parâmetros da análise de variância e superfície de resposta utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2007).

4.3.6 *Extração e quantificação de isoflavonas por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (CLUAE)*

Para extração das isoflavonas foram utilizados 250 mg de farinha de diferentes componentes do grão de soja germinado e liofilizados e farinha de cotilédone de soja desengordurada não germinada.

As amostras foram colocadas em tubos de ensaio com 6,0 mL de mistura extratora (água, etanol e acetona, 1:1:1, v/v/v) e a extração foi feita em banho ultrassônico por 10 min a 60°C (Yoshiara et al, 2012). O extrato foi centrifugado e o sobrenadante filtrado em membranas de nylon de $0,20 \mu\text{m}$ e $1,4 \mu\text{L}$ utilizados para separação e quantificação de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra alta eficiência (CLUAE) segundo Berhow (2002) com algumas modificações.

Para separação e determinação de isoflavonas, foi utilizado um UPLC[®] (Waters, Acquity), sistema de injeção automática, forno com temperatura controlada de 35°C e detector de arranjo de diodos (DAD). A eluição das isoflavonas foi realizada em coluna de fase reversa BEH C18 (Waters, 2,1 mm x 50 mm,

partículas de 1,7 μm). Para a separação, utilizou-se um sistema de gradiente binário não linear com fase inicial de 90% de H_2O acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) e 10% de acetonitrila. Em 8 min de eluição, foi atingida uma proporção de 0% de H_2O e 100% de acetonitrila, retornando às condições iniciais em 9 min. O tempo total da corrida foi de 12 min. A vazão da fase móvel foi de $0,70 \text{ mL min}^{-1}$ e a temperatura da corrida mantida constante a 35°C . Para a detecção, foi utilizado um detector de arranjo de diodos da marca Waters ajustado ao comprimento de onda de 260 nm.

A identificação e quantificação das isoflavonas glicosiladas e agliconas foi feita por comparação com curvas padrão de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína. As concentrações das soluções padrão foram cuidadosamente escolhidas para atender a maior faixa de teor de isoflavonas nas amostras.

Para as isoflavonas sem padrões puros disponíveis, as curvas de calibração foram ajustadas com base nas diferenças de peso molecular. A quantificação das isoflavonas malonilglicosídicas (malonil daidzina, malonil glicitina e malonil genistina) foram calculadas com base nas curvas de calibração das isoflavonas glicosiladas correspondentes (daidzina, glicitina e genistina, respectivamente) utilizando a similaridade com dos coeficientes de extinção, como descrito por Coward et al. (1998).

O teor de isoflavonas agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína), foi determinado em triplicata e os resultados foram expressos em % agliconas com relação ao teor de isoflavonas totais.

4.3.7 Validação dos modelos matemáticos

Para avaliação do modelo matemático proposto, foi reproduzido o ensaio onde ocorreu maior extração da enzima. A melhor condição de extração ocorreu quando se utilizou $X_1 = 30,0^\circ\text{C}$ e $X_2 = 5,0$. Os valores calculados e observados foram comparados pelo teste t a 5 % de probabilidade.

3.9 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ISOFLAVONAS DE SOJA COM DIFERENTES SOLVENTES UTILIZANDO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL SIMPLEX CENTRÓIDE

4.4.1 *Material*

Os grãos de soja da cultivar BRS 257 foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa da Soja (EMBRAPA Soja). Os grãos foram moídos em moinho de facas (Ika, modelo A-11) e a farinha obtida foi desengordurada com hexano por 30 min à temperatura ambiente. A extração das isoflavonas foi realizada com 500 mg de farinha de soja desengordurada e 25 mL de cada solvente extrator. As amostras com os diferentes solventes extratores foram colocadas em banho ultrassônico à temperatura controlada de 60°C por 10 min (ROSTAGNO; PALMA; BARROSO, 2003) logo após, centrifugadas e os sobrenadantes filtrados em filtros Millex – LH (0,20 µm). Para injeção no cromatógrafo foram utilizados 10 µL de cada amostra.

4.4.2 *Delineamento experimental de misturas simplex-centróide e análise de superfície de resposta para extração de isoflavonas*

O planejamento experimental do tipo simplex-centróide, originalmente descrito por Scheffé (1963) é um planejamento para misturas que pode ser representado por um triângulo, para três componentes ou um tetraedro para quatro componentes. Para explorar as condições de mistura do espaço inteiro, as misturas usadas são os pontos situados nos vértices e no meio das arestas, no qual cada ponto representa uma combinação dos componentes da mistura. O planejamento simplex-centróide inclui mais um ponto no centro do triângulo ou de cada face do tetraedro (misturas de proporções iguais de 3 componentes) e, no caso de um planejamento de 4 componentes, um no centro espacial do polígono (o ponto central, composto por mistura de partes iguais dos 4 componentes). Este tipo de planejamento permite o ajuste do modelo do tipo cúbico especial com um número relativamente baixo de experimentos (CORNELL, 1990; CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Para avaliar a melhor condição para a extração das isoflavonas de soja foi utilizado o delineamento experimental simplex-centróide (Figura 1) com 4

solventes de diferentes graus de polaridade: água, acetona, etanol e acetonitrila, conforme descrito por Luthria; Biswas e Natarajan (2007), Rostagno; Palma e Barroso (2003) e Simões et al., (2002) totalizando 15 composições de solventes diferentes.

Os 15 experimentos foram ajustados a um modelo linear, quadrático ou cúbico para a obtenção dos coeficientes de regressão linear e analisados estatisticamente na modelagem das variáveis repostas (y)

$$y = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i<j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j + \sum_{i<j}^q \sum_{j<k}^q \sum_k^q b_{ijk}^* x_i x_j x_k + \dots + b_{12\dots q}^* x_1 x_2 \dots x_q$$

(Equação 1)

onde y = função da estimativa da resposta de interesse, b_i^* coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados, x_i = variáveis dependentes, sendo $1 > x_i > 0$ e $\sum x_i = 1,0$.

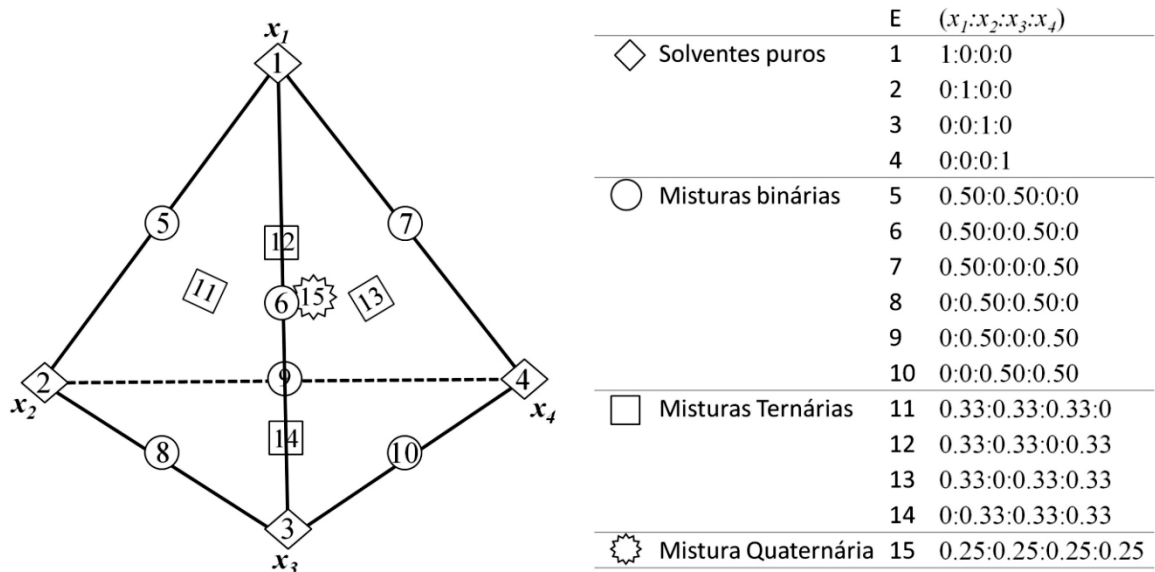


Figura 6. Planejamento experimental centróide simplex com 4 componentes

Para cada parâmetro estudado foram gerados gráficos de superfície de resposta. A qualidade do ajuste dos modelos aos dados experimentais foi verificada por meio da análise de variância (ANOVA), da regressão e coeficiente de determinação (R^2). Todas as análises e gráficos foram conduzidas utilizando o pacote estatístico STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

4.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises para determinar e quantificar as isoflavonas de soja foram realizadas de acordo com a metodologia de Berhow (2002), com algumas modificações. A separação e quantificação das isoflavonas foram conduzidas em coluna de fase reversa do tipo ODS C18 (Shimadzu, 4 mm x 15 cm, partículas de 5 μm) utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo LC-10AT VP (Kyoto, Japão), forno (CTO-10AS VP) e injetor semi-automático de amostras. Para a separação foi usado um sistema linear de gradiente binário com fase inicial de 100% de H_2O e 0% de acetonitrila. Em 25 min de eluição, foi atingida uma proporção de 45% de H_2O e 55% de acetonitrila. Em 27 min, o gradiente atingiu 100% de acetonitrila, retornando às condições iniciais novamente, em 35 min. O tempo total da corrida foi de 40 min. A vazão da fase móvel foi de 1 mL min^{-1} e a temperatura da corrida foi mantida constante a 25°C . Para a detecção, foi utilizado o detector de arranjo de diodos da marca Shimadzu, modelo SPD-M20A ajustado ao comprimento de onda de 260 nm.

A identificação das isoflavonas foi realizada por comparação com curvas individuais de padrão de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína (Sigma-Aldrich). A quantificação por padronização externa foi feita utilizando como referência, as curvas dos padrões. A concentração das isoflavonas malonilglicosiladas foi calculada a partir das curvas padrão dos seus correspondentes β -glicosídeos, utilizando a similaridade da absorvidade molar (COWARD et al., 1998). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg g^{-1} , em base seca.

Os parâmetros de exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação foram determinados para avaliar o desempenho do método de quantificação das isoflavonas por HPLC.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos seis padrões de isoflavonas foram determinados conforme o método descrito pelo International Conference on Harmonization - ICH (1996) com algumas modificações. Seis concentrações (0,1 a $0,003 \text{ mg.mL}^{-1}$) de cada um dos padrões de isoflavona (daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína) foram preparadas e cinco injeções foram feitas em cada concentração. Cinco curvas de calibração foram obtidas plotando a concentração versus a área obtida nos cromatogramas. A média

das inclinações (s) e os desvios padrões (σ) dos interceptos das curvas de calibração foram calculados. Os LD e LQ foram obtidos utilizando equações 2 e 3.

$$LD = 3,3 \times \sigma/s \quad (2)$$

$$LQ = 10,0 \times \sigma/s \quad (3)$$

A precisão e exatidão foram determinadas como recomendado pelo ICH (1996) e foram calculadas com base nas cinco curvas de calibração com seis concentrações conhecidas. Os resultados foram apresentados como coeficiente de variação (%CV) e % de recuperação, respectivamente.

4.4.4 Avaliação do modelo otimizado

Uma extração com o melhor sistema extrator para cada uma das diferentes formas de isoflavonas foi realizada para avaliação do modelo matemático (Equação 1). Os valores calculados e observados foram determinados no programa STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., 2007) e os resultados comparados pelo teste t a 5 % de probabilidade.

3.10 CORRELAÇÃO DE ISOFLAVONAS E COMPOSTOS FENÓLICOS COM A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES COMPONENTES DO EIXO EMBRIONÁRIO DE SOJA GERMINADA

4.5.1 Matéria Prima e Reagentes

A matéria prima e reagentes utilizados neste experimentos foram de mesma procedência dos descritos no item 4.2.1.

4.5.2 Preparo de amostras e germinação de soja

As amostras foram preparadas e germinadas conforme descrito no item 4.2.2.

4.5.3 *Extração e determinação de compostos fenólicos*

Os compostos fenólicos de todos os componentes do grão de soja germinados e farinha de soja desengordurada não germinada foram extraídos individualmente conforme descrito por Hung et al. (2009). A extração foi realizada com 1,0 g de amostra e 10,0 mL de etanol 80% (v/v), seguido de agitação por 20 min a 200 rpm em mesa agitadora (Marconi, RT 500) e temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 2500 g (Cientec, CT 6000) e coletado o sobrenadante. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes com 10,0 mL de etanol 80% (v/v) e os sobrenadantes foram combinados. O extrato contendo os compostos fenólicos livres foi concentrado em rota-evaporador (Tecnal, TE 210) até 10,0 mL e estocado a -26°C até o momento da análise. A quantificação de compostos fenólicos do concentrado foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu conforme descrito por Swain e Hillis (1959). Para reação colorimétrica foi utilizada uma alíquota de 0,5 mL de extrato diluído 1:3 (v/v) e adicionados 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v). A mistura foi incubada por 5 min em banho-maria a temperatura de 50°C. Posteriormente, mediu-se a absorvância a 760 nm usando etanol absoluto como branco. Uma curva padrão de ácido gálico (1,0 a 5,0 mmol L⁻¹) foi construída para comparação com as leituras das amostras. O resultado foi expresso como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra em base seca (mgEAG 100 g⁻¹).

4.5.4 *Extração e quantificação de isoflavonas por CLAE*

A extração e quantificação de isoflavonas foi realizada conforme descrito no item 4.2.3.

Os padrões utilizados para isoflavonas glicosídicas e agliconas foram adquiridos da Sigma-Aldrich e para malonil e acetil glicosídicas, da Sequoia Research Products.

Para este experimento, o teor de isoflavonas foi expresso em mg de equivalentes agliconas em 100g de amostra desengordurada em base seca (mg.100 g⁻¹), conforme descrito por Klump et al. (2001).

4.5.5 Medidas de Capacidade Antioxidante

4.5.5.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH[•]

Para avaliação da capacidade antioxidante foi utilizado o mesmo extrato utilizado na quantificação de compostos fenólicos (item 4.5.3). A capacidade antioxidante foi medida pelo sequestro do radical livre DPPH[•]. Neste método, a capacidade antioxidante dos diferentes extratos foi medida pela capacidade do composto avaliado em doar íons hidrogênio ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) relativamente estável segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações.

Em ambiente escuro, misturou-se 1,0 mL de tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 5,5, 1,0 mL de etanol absoluto, 0,5 mL do radical DPPH[•] 250 µmol L⁻¹ e 50,0 µL de amostra. As misturas foram mantidas em repouso no escuro por 30 min a temperatura ambiente e, posteriormente, a absorvância das soluções foram medidas a 517 nm. Foi utilizado como branco uma solução 1,0 mL de tampão acetato 100 mmol L⁻¹ e pH 5,5 com 1,50 mL de etanol absoluto. Preparou-se um controle positivo contendo todas as soluções, exceto a amostra. A quantificação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada por meio de uma curva padrão de Trolox (0,5 a 20 µmol L⁻¹). Os resultados foram expressos como µmol Trolox.g⁻¹ de amostra em base seca.

4.5.5.2 Determinação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre ABTS^{•+}

A atividade antioxidante nas amostras foi avaliada, também, pelo seqüestro do cátion radical ABTS^{•+} segundo o método proposto por Sanches-Gonzales;Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005) e utilizado o mesmo extrato para quantificação de compostos fenólicos (item 4.3.1). O cátion radical ABTS^{•+} foi preparado pela reação de uma solução ABTS 7,0 mmol L⁻¹, com persulfato de potássio 2,45 mM preparados 16 h antes da análise em ambiente escuro. A solução de ABTS^{•+} foi diluída com tampão fosfato de sódio pH 7,4 até a absorvância de 0,700 ± 0,020 a 730 nm. Em seguida, adicionou-se 10,0 µL de amostra a 4,0 mL da

solução diluída de ABTS^{•+}. Após 6 min de reação as absorvâncias foram lidas a 730 nm. Para quantificação da atividade antioxidante dos extratos foi utilizada uma curva padrão de Trolox (2,5 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$ de amostra em base seca.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.; BALDWIN, R.E.; MINOR, H. Germination effects on flatus-causing factors and antinutrients of mungbeans and two strains of small-seeds soybeans. **J Food Prot**, v.47, n.6, p.441-444, 1984.
- ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **Lancet Oncol**; v. 3, p. 364-373, 2002.
- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W.; BARTELS, P. Phytoestrogens and prostate disease. **J Nutr**,v. 130, p. 658-659, 2000.
- AHLUWALIA, V. K.; BHASIN, M. M.; SESHADRI, T. R. Isoflavones of soybeans. **Curr Sci**, v.22, p.263-265, 1953.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Células diferenciadas e a manutenção dos tecidos. In: _____. *Biologia Molecular da Célula*. 3ed., Porto Alegre: Artes Médicas. 1997. p. 1139-1195.
- ALEKEL, D. L.; VAN LOAN, M. D.; KOEHLER, K. J.; HANSON, L. N.; STEWART, J. W.; HANSON, K. B.; KURZER, M. S.; PETERSON, C. T. The Soy Isoflavones for Reducing Bone Loss (SIRBL) Study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal women. **Am J Clin Nutr**,v. 9,1 n. 1, p. 218-230, 2010.
- ALEZANDRO, M. R.; ALMEIDA, S. A.; MAIA, P. P.; CARVALHO, H. A.; AZEVEDO, L.; VIEIRA, E. P. Soja transgênica BRS243 RR: determinação de macronutrientes e das isoflavonas daidzeína e genisteína por CLAE. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 28, p.520-526, 2008.
- ANDERSON, J. J. B.; ANTHONY, M.; MESS, INA, M.; GARNER, S. C. Effects of phyto-oestrogens on tissues. **Nutr Res Rev**, v. 12, p.75–116, 1999.
- ANDERSON, J. J. B.; GARNER, S. C. The effects of phytoestrogens on bone. **Nutr Res**, v.17, p.1617–1632, 1997.
- ANDERSON, J. W.; MAJOR, A. W. Pulses and lipaemia, short-and long-term effect: potential in the prevention of cardiovascular disease. **Br J Nutr**,v. 88, p. 263-271, 2002.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Workshop sobre isoflavonas realizado em 29 de agosto de 2002**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/faq/al_isoflavonas.htm>. Acesso em 10 out 2002.

ANVISA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno.htm>>. Acesso em 13 jul 2012.

ASHCROFT, S. J. Protein phosphorylation and beta-cell function. **Diabetologia**, Berlin, v. 37, p. 21s-29, Supplement 2, 1994.

AZEKE, M. A.; ELSANHOTY, R. M.; EGIELEWA, S. J.; EIGBOGBO, M. U. The effect of germination on the phytase activity, phytase and total phosphorus contents of some Nigerian-grown grain legumes. **J Sci Food Agric**, v. 91, p. 75-79, 2011.

BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE; M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciênc Tecnol Aliment**, v.25, n.4, p. 921-926, 2006.

BARBUCH, R. J.; COUNTANT, J. E.; SETCHELL. K. D. R.; WELSH, M. B. The use of thermospray LC/MS/MS for the class identification and structural verification of phytoestrogens in soy protein preparations. **Biomed Environ Mass Spectrom**, v. 18, p. 973-7, 1989.

BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination: *Flavonoids in the living cel.* v. 505 (B.S. Buslig; J.A.E. Manthey, eds.) p. 61–76., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, 2002.

BOKKENHEUSER, V.D.; WINTER, J. Hydrolysis of flavonoids by human intestinal bacteria. **Prog Clin Biol Res**, v. 280, p. 143–145, 1988.

BORDIGNON, J. R.; IDA, E. I.; OLIVEIRA, M. C. N.; MANDARINO, J. M. G. Effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxygenase-1 in seedings of three soybean cultivars, **Arch Latinoam Nutr**, Caracas, v.45, n. 3, p.222-226, 1995.

BRAND-WILLIAMS,W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET,C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci Technol**, v. 28, n.1, p.15-30, 1995.

BRASIL. Projeções do agronegócio - Brasil 2010/2011 a 2020/2021. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOE S%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%20_0.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOE%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%20_0.pdf)>. Acesso em 27ago 2012.

BRASIL. Resolução nº 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. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 03 de maio de 1999.

BRENDA – **The Comprehensive Enzyme Information System. EC 3.2.1.21 - beta-glucosidase.** Disponível em:<http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.21>. Acesso 14 mai 2012.

BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health food sector. **Food Res Int**, v. 35, p. 187–193, 2002.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S.; AIDAR, M. P. M. 2004. Mobilização de Reservas. In Germinação do básico ao aplicado, (FERREIRA, A. G., BORGHETTI, F., eds.) p. 163-185, Artmed, Porto Alegre.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. (2003). Planejamento de experimentos usando o Statistica. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BELÉIA, A. P.; KITAMURA, K.; OLIVEIRA, M.C.N. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesq Agropecu Bras**, v. 34, n.10, p.1787-1795, 1999.

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

CARRAO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K.; BELEIA, A. D.; OLIVEIRA, M. C. N. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybeans cultivars. **Breeding Sci.**, v. 48, p. 409-413, 1998.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. Soja: potencial de uso na dieta brasileira. Londrina: Embrapa-CNPSO, (Embrapa-CNPSO. Documento, 113), 1998.

- CARRÃO-PANIZZI, M.C.; SIMÃO, A.S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Pesq Agropecu Bras**, Brasília, v.38, n.8, p.897-902, 2003.
- CASTRO, R.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). Germinação de Sementes: Do básico ao aplicado. Porto Alegre – RS: Editora Artmed, p. 149-162, 2004.
- CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis coumarin in hidroalchoolic extracts of Mikania glomerata Spengel (guaco). **J Braz Chem Soc**, v. 12, p. 706-709, 2001.
- CHEN, L.; ZHAO, X.; FANG, L.; GAMES, D. E. Quantitative determination of acetyl glucoside isoflavones and their metabolites in human urine using combined liquid chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1154, p. 103-110, 2007.
- CHI, H. Y.; ROH, J. S.; KIM, J. T.; LEE, S. J.; KIM, M. J.; HAHN, S. J.; CHUNG, I. M. Light quality on nutritional composition and isoflavones content in soybean sprouts. **Korean J Crop Sci**, v. 50, p. 415-418, 2005.
- CORNELL, J. A. Experiments with mixtures: Designs, models and the analysis of mixtures data. Wiley, New York, 2nd ed., 1990.
- COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and theirb-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. **J Agric Food Chem**, v. 41, p. 1961–1967, 1993.
- COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **Am J Clin Nutr**, v. 68, p. 1486S-1491S.
- CRAIG, W. J. Phytochemicals: Guardians of our health. **J Am Diet Assoc**, v. 97, p. 199-204, 1997.
- DIXIT, A. K., BHATNAGAR, D., KUMAR, V., CHAWLA, D., FAKHRUDDIN, K., BHATNAGAR, D. Antioxidant potential and radioprotective effect of soy isoflavone against gamma irradiation induced oxidative stress. **J Funct Foods**, v. 4, n. 1, 197-206, 2012.

EBATA, J.; FUKUDA, Y.; HIRAI, K.; MURATA, K. β -Glucosidase involved in the antioxidant formation in tempe, fermented soybeans. **J Agric Chem Soc Jpn**, v. 46, p. 323–329, 1972.

ELDRIDGE, A. C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein-concentrates, and isolates. **J Am Chem Soc**, v. 30, n. 2, p. 353-355, 1982.

EMBRAPA (a). **A Soja. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** - Embrapa Soja. <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=22&cod_pai=16>. Acesso em 09 jun 2009.

EMBRAPA (b). **Soja na Alimentação – Composição Química e Propriedades**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja. <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php?pagina=23>. Acesso em 03 jul 2009.

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

FARMAKALIDIS, E.; MURPHY, P. A. Isolation of 6"-O-Acetylgenistin and 6"-O-Acetyldaidzin from toasted defatted soyflakes. **J Agric Food Chem**, v. 33, p. 385-389, 1985.

FIETCHER, G.; RABA, B.; JUNGMEYER, A.; MAYER, H. K. Characterization of isoflavone composition in soy-based nutritional supplements via ultra performance liquid chromatography. **Anal Chim Acta**, n. 672, p. 72-78, 2010.

FISCHER, M. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. **J Agric Food Chem**, v.49, n.09, p.4463-4469, 2001.

FORDHAM, J. R.; WELLS, C. E.; CHEN, L. H. Sprouting of seeds and nutrient composition of seeds and sprouts. **J Food Sci**, Chicago, v.40, v. 3, p.552-556, 1975.

FRANKE, A.; CUSTER, L.; CERNA. C.; NARALA, K. Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. **Proc Soc Exp Biol Med**, n. 208, p. 18-26, 1995.

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

- FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, H.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **Food Chem Toxicol**, v. 34, n. 5, p. 457-461, 1996.
- GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 21, p. 86-9, 2001.
- GENOVESE, M. I.; PINTO, M. S.; BARBOSA, A. C. L.; LAJOLO, F. M. Avaliação do teor de isoflavonas de “suplementos nutricionais à base de soja”. **Rev Bras Cienc Farmac**, v. 39, n. 2, p. 159-167, 2003.
- GRIFFITH, A. P., COLLISON, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reverse-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 913, p.397-413, 2001.
- GYÖRGY, P.; MURATA, V. K.; IKEHATA, H. Antioxidants isolated from fermented soybeans (tempeh). **Nature**, v. 202, p. 870-872, 1964.
- HAN, Y.; CHEN, H. Characterization of beta-glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. **Biores Technol**, v. 99, p. 6081-6087, 2008.
- HARJO, B.; WIBOWO, C.; ZHANG, E. J. N; LUO, K. Q; NG, K. M. Development of Process Alternatives for Separation and Purification of Isoflavones. **Ind Eng Chem Res**, v.46, p.181-189, 2007.
- HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E. A. Plantas que contienen polifenoles. **Rev Cubana Invest Biomed**, Ciudad de La Habana, v.18, n.1, p.12-14, 1999.
- HORII, K.; ADACHI, T.; MATSUDA, T.; TANAKA, T.; SAHARA, H.; SHIBASAKI, S.; OGINO, C.; HATA, Y.; UEDA, M.; KONDO, A. Improvement of isoflavone aglycones production using β -glucosidase secretory produced in recombinant *Aspergillus oryzae*. **J Mol Catal B-Enzym**, v. 59, p. 297–301, 2009.
- HOSEL, W.; TODENHAGEM, R. Characterization of a beta-glucosidase from a *Glycine max* which hydrolases coneferin and syringing. **Phytochem**, v. 19, n. 7, p. 1349-1353, 1980.

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with a high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochem**, v. 58, n. 7, p. 995-1005, 2001.

HSU, B. Y.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Analysis of soy isoflavones in foods and biological fluids: An overview. **J Food Drug Anal**, v. 18, n. 13, p. 141-154, 2010.

HUNG, P. V.; MAEDA, T.; MIYATAKE, K.; MORITA, N. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. **Food Res Int**, v.42, p.185–190,2009.

HUR, H.; LAY, J. Jr.; BERGER, R. D.; FREEMAN, J.; RAFFI, F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. **Arch Microbiol**, v. 174, p. 422-428, 2000.

HUTABARAT, L. S.; GREENFIELD, H.; MOLLHOLLAND, M. Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. **J Food Comp Anal**, v. 14, p. 43-58, 2001.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1679&id_pagina=1>. Acesso em 27 ago 2010.

IKEDA, R.; OHTA, N. E.; WATANABE, T. Changes in isoflavones at various stages of fermentation in defatted soybeans. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 42, p. 322-327, 1995.

ITO, J.; SAHARA, H.; KAYA, M.; HATA, Y.; SHIBASAKI, S.; KAWATA, K.; ISHIDA, S.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Characterization of yeast cell surface displayed *Aspergillus oryzae* β -glucosidase 1 high hydrolytic activity for soybean isoflavone. **J Mol Catal B-Enzym**,v. 55, p. 69–75, 2008.

IZUMI, T.; PISKULA, M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKE, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy Isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in Humans. **J Nutr**, v. 130, 1695-1699, 2000.

JACKSON, C. J. C.; DINI, J. P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H. P. V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZLE, D.; DEGRANDIS, S. Effects of processing in

the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochem**, v. 37, p. 1117-1123, 2002.

JENKINS, D. J. A.; KENDALL, C. W. C.; MARCHIE, A. Type 2 diabetes and vegetarian diet. **Am J Clin Nutr**, v. 78, p. 610-616, 2003.

KAHN, C. R. Secretion on cellular and molecular physiology. **JOSLIN Magazine**, v. 11, n. 3, p. 17. 1998 (Research report, 1997-98)

KAO, T.H.; CHEN, B.H. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 7544 – 7555, 2006.

KIM, J. A.; CHUNG, I. M. Change in isoflavone concentration of soybean (*Glycine max* L.) seeds at different growth stages. **J Sci Food Agric**, v. 87, p. 496–503, 2007.

KLUMP, S. P.; ALLRED, M. C.; MACDONALD, J. L.; BALLAM, J. M. Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study. **J AOAC Int**, v. 84, p. 1865-1883, 2001.

LAMARTINIERE, C. A.; MOORE, J.; HOLLAND, M.; BARNES, S. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 208, n. 1, p. 120-123, 1995.

LEE, S. J.; AHN, J. K.; KHANH, T. D.; CHUN, S. C.; KIM, S. L.; RO, H. M.; SONG, H. K.; CHUNG, I. M. Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 23, p. 9415-21, 2007.

LEPRI, S. R., LUIZ, R. C., ZANELATTO, L. C., SILVA, P. B. G., SARTORI, D., RIBEIRO, L. R., MANTOVANI, M. S. Chemoprotective activity of the isoflavones genistein and daidzein on mutagenicity induced by direct and indirect mutagens in altered HTC cells. **Cytotech**, 2012. DOI: 10.1007/s10616-012-94768.

LICHTENSTEIN, A. H. Soy protein, isoflavones and Cardiovascular disease risk. **J. Nutr**, v. 128, v. 10, p. 1598-1592, 1998.

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

- LIU, D.; HOMAN, L. L.; DILLON, J. S. Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. **Endocrinology**, v. 145, p. 5532-5539, 2004.
- LIU, K. Soy Isoflavones: Chemistry, processing effects, health benefits, and commercial production. In: _____. **Soy Beans as functional foods and ingredients**. Columbia: AOCS Press, 2004. 3, 57-72.
- LIU, K. Soybeans: chemistry, technology and utilization. **IPT**, p. 82–93, 1997.
- LIU, Z., CHEN, Y.; HO, S. C.; HO, Y. P.; WOO, J. Effects of soy protein and isoflavones on glycemic control and insulin sensitivity: a 6-mo double-blind, randomized, placebo-controlled trial in postmenopausal Chinese women with prediabetes or untreated early diabetes. **Am J Clin Nutr**, v. 91, p. 1394-401, 2010.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- LUTHRIA, D. L.; BISWAS, R.; NATARAJAN, S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. **Anal Nutr Clin Meth**, v.105, p.325–333, 2007.
- MARRELLI, M., TUDISCO, R., MASTELLONE, V., CONFORTI, F. A comparative study of phytochemical composition of genetically and non-genetically modified soybean (*Glycine max* L.) and evaluation of antitumor activity. **Nat Prod Res**, 2012. DOI: 10.1080/14789419.2012.673607.
- MARTINEZ, A. P. C.; MARTINEZ, P. C. C.; SOUZA, M. C.; CANNIATTI BRAZACA, S. G. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 31, n. 1, p. 23-30, 2011.
- MATEOS-APARICIO, I.; REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M., J.; ZAPATA-REVILLA, M. A. Soybean, a promising health source. **Nutr Hosp**, v. 23, n. 4, p. 305-312, 2008.
- MATSUDA, S.; NORIMOTO, F.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Solubilization of novel isoflavone glycoside hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*. **J Ferment Bioeng**, v. 77, p. 439-441, 1994.

- MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **J Food Sci**, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
- MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on beta-glucosidase from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, n. 9, p. 1623–1627, 1995.
- MELLO FILHO, O. L.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A.; REIS, M. S.; MASSONI, G. A.; PIOVESAN, N. D. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. **Pesqu Agropecu Bras**, v.39, n.5, p.445-450. 2004.
- MESSINA, M. J.; WOOD, C. E. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. **Nutr J**, v. 7, p. 17 doi:10.1186/1475-2891-7-17, 2008.
- MESSINA, M.; MESSINA, V. Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. **J Am Dietetic Assoc**, v.91, n.7, p.836-840, 1991.
- Miyazawa, M.; Sakano, K.; Nakamura, S.; Kosaka, H. Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill). **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 4, p. 1346-1349, 1999.
- MONTEIRO, J. B. R.; COSTA, N. M. B.; ESTEVES, E. A.; MILAGRES, K. H. Avaliação da qualidade protéica de dois formulados em pó, à base de soja enriquecidos com zinco, selênio e magnésio para utilização em nutrição enteral. **Cienc Tecnol Aliment**, v.24, n.1, p.006-010, 2004.
- MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L. Valor nutritivo e funcional da soja. **Rev Bras Nutr Clin**, v.15, n.2, p.306-315, 2000.
- MORANT, A. V.; JORGENSEN, K.; JORGENSEN, C.; PAQUETTE, S. M.; SANCHEZ-PEREZ, R.; MOLLER, B. L.; BAK, S. β -glucosidase as detonators of plant chemical defense. **Phytochem**, v. 69, p. 1795-1813, 2008.
- MOSTAFA, M. M.; RAHMA, E. H. Chemical and nutritional changes in soybeans during germination. **Food Chem**, v.23, p.257-275, 1987.
- MURPHY, P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. **Food Tech**, v.36, p. 60–64, 1982.

- MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Phytoestrogens in foods. **Adv Food Nutr Res**, v.44, p.195-246, 2002.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr**, v.95, p.1054, 2004.
- NAIM, M.; GESTETNER, B.; BONDI, A.; BIRK, Y. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavonas. **J Agric Food Chem**, n.24, p.1174-1177, 1976.
- OKUBO, K.; KOBAYASHI, Y.; TAKAHASHI, K. Improvement of soymilk and tofu process on the behavior of undesirable taste components such as glycosides. **Up to Date Food Process**, v. 18, p. 16-22, 1983.
- PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Alimentos Funcionais: conceituação e importância na saúde humana. In: Simpósio Brasileiro Sobre Os Benefícios Da Soja Para A Saúde Humana, 1., 2001, Londrina, 2001. Anais. Londrina: Embrapa Soja, p. 37-40. 2001.
- PARK, Y. K.(a); AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. **Cienc Tecnol Aliment**, v.3, n.3, p.156–160, 2001.
- PARK, Y. K.(b); AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de Isoflavonas de Soja. **Biotec Cienc Desenv**, n. 20, p. 12-14, 2001.
- PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR; S. M.; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil- -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 22 n. 2, p. 130-135, 2002.
- PEÑALVO, J. L; NURMI, T.; ADLERCREUTZ, H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. **Food Chem**, n. 87, p. 297-305, 2004
- PHAM, T. T.; SHAH, N. P. Hydrolysis of isoflavone glucosides in soy milk by β -galactosidase and β -glucosidase. **J Food Biochem**, 33, 38-60, 2009.
- PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. **J Food Sci**, v.44, n.6, p.1720-1722, 1979.

- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem**, v.53, p.4290-4302, 2005.
- RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. **J Food Comp Anal**, v. 20, n. 1, p. 19–24, 2007.
- RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. **J Food Biochem**, v. 30, p.453-486, 2006.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Microwave assisted extraction of soy isoflavones. **Anal Chim Acta**, v. 588, n. 2, p. 274-282, 2007.
- ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavonas. **J Chromatogr A**, v. 1012, p. 119–128, 2003.
- SAKTHIVELU, G.; DEVI, M. K. A.; GIRIDHAR, P.; RAJASEKARAN, T.; RAVISHANKAR, G. A.; NIKOLOVA, M. T.; ANGELOV, G. B.; TODOROVA, R. M.; KOSTURKOVA, G. P. Isoflavone composition, phenol content and antioxidant activity of Soybean seeds from India and Bulgaria, **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 6, p. 2090–2095, 2008.
- SANCHES-GONZALES, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG. A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffee brewed using different procedures (Italian, Espresso end Filter). **Food Chem**, v.90, p.133-139, 2005.
- SANTOSH, T. R.; BALASUBRAMANIAN, K. K.; LALITA, K. Enhancement of beta-glucosidase and beta-galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by exposure to the allelochemical mimosine. **J Agric Food Chem**, n. 47, p. 462-467, 1999.
- SCHEFFÉ, H. The Simplex-Centroid Design for Experiments with mixtures. **J Roy Stat Soc B Met**, v. 25, n. 2, p. 235-263, 1963.

- SETCHELL, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **Am J Clin Nutr**, v.134, n.6, p.1333S-1343S, 1998.
- SETCHELL, K.D.R., CASSIDY, A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. **J Nutr**; v. 129, p. 758-767, 1999.
- SHINDE, A. N.; MALPATHAK, N.; FULZELE, D. P. Studied enhancement strategies for phytoestrogens production in shake flasks by suspension culture of *Psoralea corylifolia*. **Biores Tech**, v. 100, p. 1833–1839, 2009.
- SILVA, M.S.; NAVES, M.M.V.; OLIVEIRA, R.B.; LEITE, O.S.M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.3, p.571-576, 2006.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 4 ed., Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed da UFSC, 2002.
- STAHL, W.; VAN DEN BERG, H.; ARTHUR, J.; BAST, A.; DAINY, J.; FAULKS, R. M.; GÄRTNER, C.; HAENEN, G.; HOLLMAN. P.; HOLST, B.; KELLY, F. J.; POLIDORI, M. C.; RICE-EVANS, C.; SOUTHON, S.; VAN VLIET, T.; VIÑA-RIBES, J.; WILLIAMSON, G.; ASTLEY, S. B. Bioavailability and Metabolism. **Mol Aspects Med**, v. 23, n. 1-3, p. 39-100, 2002.
- StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system). version 8.0. www.statsoft.com, 2007
- SUE, M.; YAMAZAKI, K.; YAJIMA, S.; NOMURA, T.; MATSUKAWA, T.; IWAMURA, H.; MIYAMOTO, T. Molecular and structural characterization of hexameric beta-D-glucosidases in wheat and rye. **Plant Physiol**, v. 141, p. 1237-1247, 2006.
- SUZUKI, H.; TAKAHASHI, S.; WATANABE, R.; FUKUSHIMA, Y.; FUJITA, N.; NOGUCHI, A.; YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K.; NISHINO, T.; NAKAYAMA, T. An isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings: purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization. **J Biol Chem**,v. 281, p. 30251–30259, 2006.
- SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*- the quantitative analysis of phenolic constituents. **J Sci Food Agric**, v.10, p.63-68, 1959.

TAKU, K., MELBY, M., KRONENBERG, F., KURZU, M., MESSINA, M. Extracted or synthesized soybean isoflavones reduce menopausal hot flash frequency and severity: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Menopause**, v. 19, n. 7, 776-790, 2012.

TAVARES, G. M.; PITANGA, K. C.; SILVA, M. A. T.; MORAIS, A. A. C. A soja como alimento funcional na prevenção do câncer. **Rev Bras Nutr Clín**, v.15, n.2, p.321-325, 2000.

TROCK, B. J.; HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE, R. Meta-Analysis of Soybean Intake and Breast Cancer Risk. **J Nat Cancer Inst**, v. 98, n. 7, p. 459-471, 2006.

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

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World Agricultural Supply and Demand Estimates. Disponível em: <www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.php>. Acesso em 27 ago 2012.

VANETTEN, H.; MANSFIELD, J. W.; BAILEY, J. A.; FARMER, E. E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. **Plant Cell**, v. 6, p. 1191-1192, 1994.

VIEIRA, R. F.; NISHIARA, M. K. Comportamento de cultivares de Mungo-verde (*Vigna radiata*) em Viçosa, Minas Gerais. **Rev Ceres**, v.39,n.221, p.60-83, 1992.

WAI, K. N. T.; BISHOP, J. C.; MACK, P. B.; COTTON, R. H. The vitamin content of soybeans and soybean sprouts as a function of germination time. **Plant Physiol**, v.22, n.2, p.117-126, 1947.

WANG, H. J.; MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **J Agric Food Chem**, v. 42, p. 1666-73, 1994.

WILDMAN, R.E.C. (Ed.). Handbook of nutraceuticals and functional foods. Boca Raton: CRC Press, 2001. 542 p.

XU, B.; CHANG, S.K.C.A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **J Food Sci**, v.72, n.2, p.159-166, 2007.

YEN, G. C.; LAI, H. H. Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. **J Agric Food Chem**, v.51, n.27, p.7892-7900, 2003.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA T. B.; RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C. IDA, E. I. β -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*) embryonic axis germinated in the presence or absence of light. **J Food Biochem** 2011. In Press. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2011.00585.x.

YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DELAROZA, F.; SILVA, J. B.; IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. **Int J Food Sci Nutr**. 2012. In Press. DOI: 10.3109/09637486.2012.690026.

ZAFRA-GÓMEZ, A.; GARBALLO, A.; GARCÍA-AYUSO, L. E.; MORALES, J. C. Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods. **Food Chem**, v. 123, p. 872-877, 2010.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram redigidos na forma de cinco artigos científicos, conforme segue:

- **Artigo Científico 1:** β -GLUCOSIDASE ACTIVITY OF SOYBEAN (*GLYCINE MAX*) EMBRYONIC AXIS GERMINATED IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF LIGHT..... 73
- **Artigo Científico 2:** CHANGES IN ISOFLAVONE CONCENTRATION IN THE EMBRYONIC AXIS OF SOYBEANS GERMINATED IN THE PRESENCE OF LIGHT 87
- **Artigo Científico 3:** OPTIMIZATION OF B-GLUCOSIDASE EXTRACTION FROM GERMINATED SOYBEAN (*GLYCINE MAX* (L.) MERRIL) AND CONVERSION OF GLYCOSIDIC ISOFLAVONES TO AGLYCONES..... 104
- **Artigo Científico 4:** OPTIMIZATION OF SOY ISOFAVONE EXTRACTION WITH DIFFERENT SOLVENTS USING THE SIMPLEX-CENTROID MIXTURE DESIGN..... 129
- **Artigo Científico 5:** CORRELATION OF ISOFLAVONES AND PHENOLICS COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT CAPACITY OF GERMINATED SOYBEAN COMPONENTS..... 155

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

**β -GLUCOSIDASE ACTIVITY OF SOYBEAN (*GLYCINE MAX*) EMBRYONIC AXIS
GERMINATED IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF LIGHT**

Yoshiara, LY. Madeira, TB, Ribeiro MLL, Mandarino JMG, Carrão-Panizzi MC, IDA
EI.

Situação: Publicado on-line em 30 de dezembro de 2011. Journal of Food
Biochemistry.

DOI: 10.1111/j.1745-4514.2011.00585.x

**β -GLUCOSIDASE ACTIVITY OF SOYBEAN (GLYCINE MAX) EMBRYONIC AXIS
GERMINATED IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF LIGHT**

¹YOSHIARA, L. Y., ¹MADEIRA, T. B.; ²RIBEIRO, M. L. L., ³MANDARINO, J. M.G.,
³CARRÃO-PANIZZI, M. C., ¹*IDA, E. I.

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina
*E-mail: elida@uel.br

²Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina - Rod.
Celso Garcia Cid, Km 380 - Zip Code: 86051-990, Londrina, PR, Brasil.

³Embrapa Soja - Rodovia Carlos João Strass S/Nº - Distrito de Warta - P.O. Box 231 - Zip
Code: 86001-970.

Keywords: β -D-glucoside glucohydrolase, aglycones, isoflavone, soybean germination, β -glucosidase

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the β -glucosidase activity of radicles, hypocotyls, cotyledons, and epicotyls of soybeans (*Glycine max*) grown in the presence and absence of light and to obtain an alternative source of β -glucosidase. Seeds were germinated in the presence and absence of light at various time points, and the radicles, epicotyls, hypocotyls and cotyledons were separated. The enzymatic activity in the epicotyls presented the highest activity at 144 h in the presence of light. Specifically, the enzymatic activity of the epicotyls was 6-fold higher than that of radicles and 12-fold higher than that of cotyledons. Interestingly, the specific activity of hypocotyls and cotyledons was 4.02 and 5.17-fold lower than that of epicotyls after 144 h of germination under light. The high specific activity of light-germinated epicotyls suggested that the purity of β -glucosidase from epicotyls is greater than β -glucosidase obtained from other parts of the plant.

PRACTICAL APPLICATIONS

Isoflavones are beneficial to human health. Specifically, isoflavones and estrogen have similar positive effects on the symptoms of menopause and osteoporosis. Moreover, isoflavones possess antioxidant and antitumoral properties against certain cancers. In nature,

the most common form of the isoflavone is the glucosilated form. Studies on the bioavailability of isoflavones indicate that these compounds behave similarly to estrogen in most biological systems and the aglycones forms are more bioavailable than their glycosides forms.

β -glucosidase is produced from the metabolism of fungi, bacteria, or soybeans, and is the only enzyme capable of hydrolyzing isoflavone glycosides to aglycones. Therefore, safe and effective methods for the synthesis of β -glucosidase must be developed to produce soy-based foods with high concentrations of aglycones isoflavones. Thus, the objective of the present study was to investigate the best conditions under which the greatest amount of β -glucosidase could be isolated from soybean.

INTRODUCTION

Isoflavones are natural plant estrogens that are structurally and functionally similar to human estrogen and have been consumed by humans throughout history. Among plant estrogens, soy isoflavones are the most commonly studied type of isoflavone. Because of the extensive consumption of soy-based foods in Asia and Japan, the long-term health effects of soy isoflavones are well-known, and correlations between soy isoflavone consumption and disease prevention have been established (Brouns, 2002).

In both natural and processed food products, plant estrogens are typically bound to carbohydrates and are referred to as glycones. Examples of glycone isoflavonoids include daidzin, genistin and glycetin. A small fraction of isoflavones are unbound plant estrogens and are referred to as aglycones. The aglycone derivatives of daidzin, genistin and glycetin are daidzein, genistein and glycitein, respectively. Glycones can occur in acetylated or malonylated forms; however, only aglycones, the biologically active form of isoflavones, have estrogenic effects (Bokkenheuser and Winter, 1988; Pham and Shah, 2009).

β -glucosidases (β -D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) comprise a heterogeneous group of enzymes that catalyze the hydrolysis of β -glucosidic bonds between two carbohydrate moieties or a carbohydrate and an aglucone (Esen, 1992; Morant, et al., 2008). In intact plant tissue, β -glucosidases are stored separately from the substrate and are involved in diverse aspects of plant physiology, such as the formation of intermediates in cell wall lignification, cell wall degradation of the endosperm during germination, and the

activation of phytohormones, defense compounds (Morant, et al, 2008; Ribeiro, et al, 2006; Hsieh and Graham, 2001; VanEtten, et al 1994.)

β -glucosidase hydrolyzes soybean isoflavones, releasing glucose and aglycone isoflavones, which are more bioavailable than their glycoside forms (Izumi, et al., 2000). Although the glycoside form of daizin and genistin are present in higher concentrations in soybeans (Ribeiro et al. 2007), daizin and genistin have shown lower biological activity than their aglycone forms (Park et al., 2002).

β -glucosidase can be produced through the metabolism of fungi (Horii, et al, 2009; Ito, et al, 2008), bacteria (Hur, et al, 2000) and plants such as corn, beans and soybeans (Suzuki, et al, 2006; Sue, et al, 2006; Han and Chen, 2008). In several studies, enzymes have been produced from soybean cotyledons; however, relatively high β -glucosidase activity has also been observed in other parts of the plant, such as the roots and the radicles (Hsieh and Graham, 2001; Suzuki et al, 2006; Ribeiro, et al, 2006).

β -glucosidases isolated from soybean seedlings are preferable over their microbial counterparts because β -glucosidase from seedling roots acts exclusively on malonylated conjugates, allowing for increased production of the more bioavailable aglycone isoflavone (Suzuki, et al, 2006).

Ribeiro et al. (2006) in our laboratory analyzed the β -glucosidase activity of radicles and cotyledons after 72 h of germination and found that the β -glucosidase activity of radicles and cotyledons was 3.3-fold and 2.3-fold higher, respectively, when plants were germinated under light conditions. The results demonstrated that germinated soybeans were a satisfactory alternative method to enhance β -glucosidase activity for the production of isoflavone aglycones. Although quantitatively the amount of radicle is lower than that of cotyledon soybean germination may be an alternative for obtaining radicles with highest β -glucosidase activity.

The objective of the present investigation was to extend these germination studies up to 168 h in the presence or absence of light on the β -glucosidase activity in the germinated soybeans embryonic axis comprising of radicles, epicotyls, hypocotyls and cotyledons. The components of germinated soybean were then evaluated to identify the best conditions for the β -glucosidase to reach the highest activity which could be isolated.

MATERIALS AND METHODS

Soybean germination

For each of the 10 experiments, three blocks of five germination paper rolls containing 50 seeds (BRS 257 cultivar, supplied by Embrapa Soybean – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Londrina, Brazil) were randomly placed into two germination chambers. In one germination chamber, the seeds were subjected to a photoperiod of 10 h of light, and in the other germination chamber, a photoperiod was not applied. The temperature was held constant at 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of 100% for 72, 96, 120, 144 or 168 h. Radicles and epicotyls began to appear at 72 h of germination.

At each time point, the radicles, epicotyls, hypocotyls and cotyledons were manually separated and freeze-dried. The samples were ground and stored at -22°C for analysis, and the seed coat was discarded.

The hypocotyls and cotyledons were also analyzed prior to germination to verify the β -glucosidase activity before starting the germination process.

Extraction and determination of β -glucosidase activity

β -glucosidase was extracted from a 100 mg sample with 1.5 mL of 0.05 M citrate buffer (pH 4.5) containing 0.1 M NaCl for 1 h at room temperature (Carrão-Panizzi and Bordignon, 2000). The samples were centrifuged, and the enzymatic activity and soluble protein content of the supernatant was analyzed.

The enzymatic activity was determined according to the method described by Matsuura et al. (1995). Briefly, 2 mL of 1 mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p-NPG) and 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 5.0) was transferred to test tubes and placed in a water bath at 30°C for 10 min. Supernatant (0.5 mL) was added and the test tubes were placed in a water bath at 30°C for 30 min. The reaction was stopped by adding 2.5 mL of 0.5 M sodium carbonate, and the concentration of p-nitrophenol released during the reaction was determined by measuring absorbance 420 nm using a spectrophotometer. For quantification, a p-nitrophenol (20 – 160 μM) calibration curve was previously prepared using known stock concentrations.

One unit of enzyme activity (UA) was defined as the amount of β -glucosidase that releases 1 μ M of p-nitrophenol/min under the experimental conditions. The results were expressed as β -glucosidase activity ($\text{UA}\cdot\text{g}^{-1}$) per dry weight of the sample and were evaluated according to the germination time. The specific activity of β -glucosidase was considered to be the ratio between the β -glucosidase activity and the soluble protein content and was expressed as UA per milligram of soluble protein ($\text{UA}\cdot\text{mg}^{-1}$).

Soluble protein analysis

The soluble protein content was determined according to the method described by Lowry et al. (1951), and bovine serum albumin was used as a standard. The results are presented as percent of soluble protein per g of sample on dry weight.

Yield of β -glucosidase activity

The yield of β -glucosidase activity was calculated according to the total dry weight obtained from each embryonic axis components at each germination time.

Experimental design and statistical analysis

The experiment was conducted according to a randomized complete block design, and three replications were conducted for each germination time in both light and no-light conditions. An analysis of variance was conducted, and the means were compared according to the Tukey test ($p < 0.05$). A regression analysis was also conducted and the data were analyzed with Statistica 8.0 software (StatSoft, 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

According to the results of the regression analysis, the β -glucosidase activity and protein content fit quadratic or cubic polynomial models, and all of the R^2 values were greater than 0.72 indicating a good statistic correlation for these variables. Variability in the β -glucosidase activity was observed among radicles, hypocotyls and cotyledons germinated in the presence and absence of light (Fig. 1). The β -glucosidase activity of the cotyledons increased from 0 to 144 h of growth, and the greatest activity was observed at 144 h. However, at 168 h, the β -glucosidase activity began to decline (Fig. 1A).

In samples germinated in the presence or absence of light, the maximum β -glucosidase activity of the hypocotyl was observed at 72 h and 96 h. The β -glucosidase activity began declining at 120 h of germination (Fig. 1B).

In radicles from seeds germinated in the presence of light, the β -glucosidase activity increased after 72 h of germination and the maximum enzymatic activity was observed at 144 h. In samples germinated in the absence of light, the β -glucosidase activity increased between 72 h and 144 h of growth and the maximum enzymatic activity was also observed at 144 h. However, at 168 h, the β -glucosidase activity of radicles germinated in the presence or absence of light began to decrease (Fig. 1C).

The epicotyl presented higher β -glucosidase activities than the other parts of the seedling (Fig. 1D). In seeds germinated in the presence of light, the β -glucosidase activity increased between 72 h and 144 h of growth and the highest activity was observed at 144 h. However, at 168 h, the β -glucosidase activity began to decrease. In samples germinated in the absence of light, the β -glucosidase activity increased from 72 to 96 h, and the highest activity was observed at 96 h of germination. A decrease in β -glucosidase activity was observed at 120 h and 144 h., although the enzyme activity increased again at 168 h of germination to a level that was not significantly different from the activity at 96 h ($p < 0.05$).

The results of the present study indicated that the highest β -glucosidase activities were observed in epicotyls and radicles at 144 h. According to Suzuki et al. (2006), β -glucosidase is located in the cell walls and intercellular space of soybean seedling roots. As a result, the roots display higher β -glucosidase activities than cotyledons and hypocotyls when the plant is germinated. β -glucosidase extracted from the roots can efficiently hydrolyze malonylated and non-malonylated forms of isoflavones, however, the malonylated form is the preferred substrate. Hsieh and Graham (2001) germinated soybeans for 216 h, and found that the specific activity of β -glucosidase for the malonylated form of genistein was greater than that of other forms. The authors hypothesized that the enzyme was involved in the release of daidzein and genistein, which play a central role in soybean defense.

The epicotyls, radicles and hypocotyls are part of the embryonic axis, which displays intensive meristematic growth, resulting in relatively high β -glucosidase activity in the cotyledon. In plants rich in nitrogen, photosynthesis provides an energetic advantage for the development of epicotyls into leaves, which accelerates growth and allows the plant to

become self-sufficient and to respond to environmental conditions. In plants, β -glucosidase activity is associated with many processes, including the defense against microbes, insects and parasitic plants (Buckeridge, et al, 2004). Thus, seeds germinated in the presence of light may have displayed relatively high β -glucosidase activities due to the role of β -glucosidase in defense mechanisms.

In other experiment, the concentration of genistein and daidzein, which are aglycone isoflavones, was higher in the stem and roots of different soy cultivars grown under natural conditions after 77 days (Romani et al. 2003), suggesting that the β -glucosidase activity was higher in these parts of the plant.

The specific activity of β -glucosidase was highly variable among samples over time (Table 1). The greatest variation in the specific activity was observed between light-germinated radicles and light-germinated epicotyls. The specific activity in hypocotyls and cotyledons was less variable and was 4.02 and 5.17-fold lower than that of the epicotyls, respectively, after 144 h of germination in the presence of light. The highest specific activity was observed in epicotyls germinated in the presence of light for 144 h, suggesting that β -glucosidase from the epicotyl is more concentrated than that of the other parts.

Because each part of the seedling contributes a different amount to the total seedling mass during germination (Table 2), the entire germinated seed must be considered in the quantification of β -glucosidase activity if large scale production of β -glucosidase is desired. Thus, the weight fraction of each particular plant part can be an alternative criterion for the selection of an enzyme source. In the current study, the yield of β -glucosidase was calculated based on the data shown in Tables 1 and 2 and the results indicated that the cotyledon presented the highest enzymatic activity at various germination times (Table 3). Alternatively, the highest β -glucosidase activity of the epicotyl was only the 11th highest overall activity.

To produce β -glucosidase on a large scale, the quantity and purity of the source must be considered, along with the amount of material required to extract and purify the enzyme. The yield of β -glucosidase from cotyledons germinated in the presence of light after 96 h was higher than that of the epicotyl. However, the specific activity of epicotyls germinated in the presence of light for 144 h was 5.17-fold greater than that of cotyledons germinated in the absence of light for more than 72 h. Therefore, epicotyls germinated in the

presence of light for 144 h are recommended as an alternative source of β -glucosidase because less material is required for the extraction and purification of the enzyme.

REFERENCES

BOKKENHEUSER, V.D. AND WINTER, J. Hydrolysis of flavonoids by human intestinal bacteria. 1988. *Prog. Clin. Biol. Res.* 280, pp. 143–145.

BROUNS, F. Soya isoflavones: a new and promising ingredient for the health food sector. 2002. *Food Res. Int.* 35, 187-193.

BUCKERIDGE, M. S., SANTOS, H. P., TINÉ, M. A. S., AIDAR, M. P. M. 2004. Mobilização de Reservas. In *Germinação do básico ao aplicado*, (FERREIRA, A. G., BORGHETTI, F., eds.) pp. 163-185, Artmed, Porto Alegre.

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

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

HAN, Y.; CHEN, H. Characterization of beta-glucosidase from corn stover and its application in simultaneous saccharification and fermentation. 2008. *Biores. Technol.* 99, 6081-6087.

HORII, K., ADACHI, T., MATSUDA, T., TANAKA, T., SAHARA, H., SHIBASAKI, S., OGINO, C., HATA, Y., UEDA, M., KONDO, A. Improvement of isoflavone aglycones production using β -glucosidase secretory produced in recombinant *Aspergillus oryzae*. 2009. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59, 297–301.

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

- HUR, H., LAY, J. Jr., BERGER, R. D., FREEMAN, J., RAFFI, F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. 2000. Arch. Microbiol., 174, 422-428.
- ITO, J., SAHARA, H., KAYA, M., HATA, Y., SHIBASAKI, S., KAWATA, K., ISHIDA, S., OGINO, C., FUKUDA, H., KONDO, A. Characterization of yeast cell surface displayed *Aspergillus oryzae* β -glucosidase 1 high hydrolytic activity for soybean isoflavone. 2008. J. Mol. Catal. B: Enzym. 55 (2008), pp. 69–75.
- IZUMI, T., PISKULA, M. K., OSAWA, S., OBATA, A., TOBE, K., SAITO, M., KATAOKE, S., KUBOTA, Y., KIKUCHI, M. Soy Isoflavone Aglycones are Absorbed Faster and in higher amounts than Their Glucosides in Humans. 2000. J Nutr., 130, 1695-1699.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. 1951 J. Biol. Chem., v. 193, p. 265–275.
- MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on beta-glucosidase from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. 1995. Biosci. Biotechnol. Biochem. v. 59, n. 9, p. 1623–1627.
- MORANT, A. V., JORGENSEN, K., JORGENSEN, C., PAQUETTE, S. M., SANCHEZ-PEREZ, R., MOLLER, B. L., BAK, S. β -glucosidase as detonators of plant chemical defense. 2008. Phytochemistry, 69, 1795-1813.
- PARK, Y. K., AGUIAR, C. L., ALNCAR, S. M., MASCARENHAS, H. A., SCAMPARINI, A. R. P. 2002. Conversão de malonil- β -glucosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 22 (2), 130 – 135.
- PHAM, T. T., SHAH, N. P. Hydrolysis of isoflavone glucosides in soy milk by β -galactosidase and β -glucosidase. 2009. J. Food Biochem., 33, 38-60.
- RIBEIRO, M. L. L; MANDARINO, J. M. G; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. J Food Biochem, v. 30, p.453-486, 2006.

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

ROMANI, A, VIGNOLINI, P., GALARDI, C., AROLDI, C., VAZZANA, C., HEIMLER, D. Polyphenolic Content in Different Plant Parts of Soy Cultivars Grown under Natural Conditions. 2003. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5301-5306.

StatSoft, Inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.

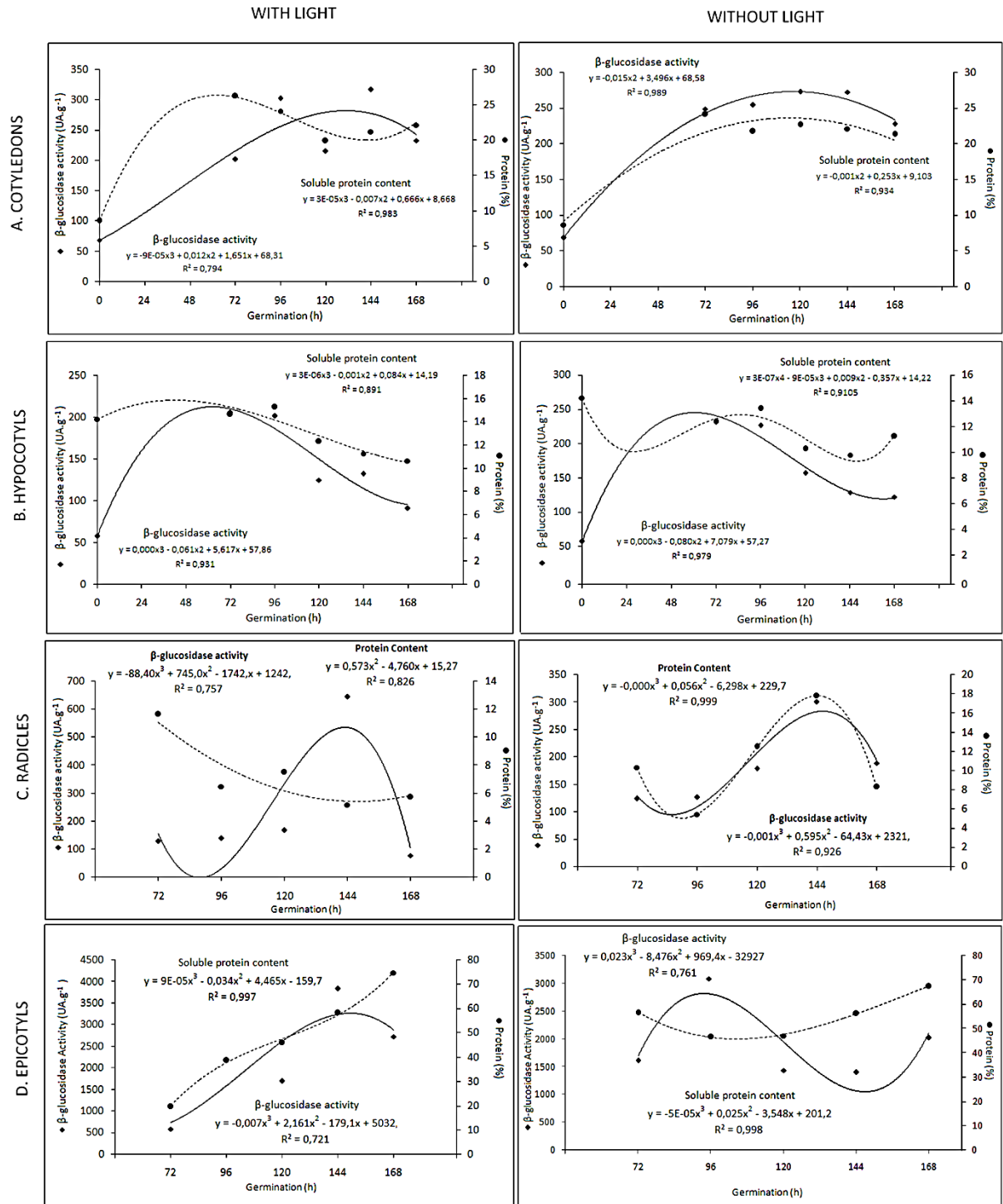
SUE, M.; YAMAZAKI, K.; YAJIMA, S.; NOMURA, T.; MATSUKAWA, T.; IWAMURA, H.; MIYAMOTO, T. Molecular and structural characterization of hexameric beta-D-glucosidases in wheat and rye. 2006. *Plant Physiol.* 141, 1237-1247.

SUZUKI H, TAKAHASHI S, WATANABE R, FUKUSHIMA Y, FUJITA N, NOGUCHI A, YOKOYAMA R, NISHITANI K, NISHINO T, NAKAYAMA T. An isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings: purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization. 2006. *J Biol Chem* 281: 30251–30259

VANETTEN, H., MANSFIELD, J. W., BAILEY, J. A., FARMER, E. E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. 1994. *Plant Cell*, 6, 1191-1192.

Acknowledgements

This work was partially funded by CNPq/MCT and Fundação Araucária/PR. LYY would like to thank CNPq for a graduate scholarship, and EII is a CNPq Research Fellows.



β -glucosidase activity determined with p-nitrophenyl- β -D-glucopiranoside as substrate for 30 min at 30°C, Matsuura, et al., 1995

Fig. 1.

β -GLUCOSIDASE ACTIVITY AND PROTEIN CONTENT OF BRS 257 SOYBEAN COTYLEDONS, HYPOCOTYLS, RADICLES AND EPICOTYLS GERMINATED FOR 168 H

TABLE 1.

SPECIFIC β -GLUCOSIDASE ACTIVITY* OF THE RADICLES, EPICOTYLS, HYPOCOTYLS AND COTYLEDONS OF SOYBEAN GERMINATED FOR 168 H (BRS 257)

Germination (h)		Radicles	Epicotyls	Hypocotyls	Cotyledons
0 h		-	-	0.41±0.00 ^f	0.12±0.00 ^d
72 h	L	0.83±0.12 ^b	2.99±0.29 ^c	1.41±0.09 ^{b,c}	1.37±0.36 ^{a,b,c}
	WL	0.93±0.16 ^b	3.47±1.02 ^c	1.28±0.03 ^{c,d,e}	1.68±0.11 ^a
96 h	L	1.72±0.63 ^b	5.34±1.12 ^b	1.34±0.23 ^{c,d}	1.26±0.21 ^{a,b,c}
	WL	2.74±0.48 ^b	5.98±0.15 ^b	1.69±0.17 ^b	1.22±0.09 ^{a,b,c}
120 h	L	1.52±0.03 ^b	2.75±0.24 ^c	1.04±0.12 ^{d,e}	1.35±0.12 ^{a,b,c}
	WL	4.02±0.65 ^b	3.54±0.33 ^c	1.06±0.18 ^{d,e}	1.33±0.14 ^{a,b,c}
144 h	L	7.59±3.79 ^a	8.69±0.43 ^a	2.16±0.02 ^a	1.50±0.22 ^{a,b}
	WL	1.70±0.13 ^b	2.92±0.45 ^c	1.09±0.02 ^{c,d,e}	1.31±0.06 ^{a,b,c}
168 h	L	1.86±0.35 ^b	3.00±0.42 ^c	0.97±0.09 ^e	1.14±0.16 ^{b,c}
	WL	2.17±0.11 ^b	3.44±0.62 ^c	1.11±0.03 ^{c,d,e}	1.07±0.10 ^{b,c}

Values with different letters in the same column are significantly different according to the Tukey test ($p < 0.05$). L: germinated in the presence of light; WL: germinated in the absence of light. * The results are expressed in units of β -glucosidase activity (reaction conducted with p-nitrophenyl- β -D-glucopiranoside as substrate for 30 min at 30°C, Matsuura, at al., 1995) per milligram of dry soluble protein (Lowry, at al., 1951) (UA.mg⁻¹SP)

TABLE 2

TOTAL WEIGHT OF SOYBEAN BRS 257 RADICLES, EPICOTYLS, HYPOCOTYLS AND COTYLEDONS GERMINATED FOR 168 H

Germination (h), (total weight (g))	% part			
	Radicle	Epicotyl	Hypocotyl	Cotyledon
72 L, (94.41±5.25)	13.54	0.43	6.93	61.11
72 WL, (127.64±2.99)	19.32	0.85	17.98	49.44
96 L, (123.94±1.00)	7.69	0.92	24.58	51.16
96 WL, (147.24±3.03)	12.96	1.14	26.68	44.73
120 L, (149.90±4.24)	11.32	1.20	31.19	45.09
120 WL, (161,32±2.27)	14.65	1.23	27.64	41.60
144 L, (169.37±2.80)	12.45	1.82	27.86	41.25
144 WL, (169,16±9.17)	15.41	1.85	29.27	39.89
168 L, (190,35±4.42)	12.28	2.39	34.83	40.90
168 WL, (179.23±3.69)	17.36	2.30	31.59	39.29

L: germinated in the presence of light; WL: germinated in the absence of light

TABLE 3

TWELVE HIGHEST ABSOLUTE β -GLUCOSIDASE ACTIVITIES IN SOYBEAN PARTS
GERMINATED FOR 168 H

Sample	Total UA *
96 L, COT	5,547.87 ^a
144 L, COT	4,704.69 ^{a,b}
72 WL, COT	4,440.52 ^b
120 WL, COT	4,371.14 ^{b,c}
96 WL, COT	4,201.84 ^{b,c,d}
72 L, COT	4,083.46 ^{b,c,d}
144 L, COT	3,973.73 ^{b,c,d,e}
168 L, COT	3,337.41 ^{c,d,e}
168 WL, COT	3,281.77 ^{d,e}
120 L, COT	2,967.35 ^{e,f}
168 L, EPY	2,109.59 ^{f,g}
144 L, EPY	1,859.72 ^{g,h}

Values with different letters in the same column are significantly different according to the Tukey test ($p < 0.05$). COT: cotyledon; EPY: epicotyl, RAD: radicle; L: germinated in the presence of light; WL: germinated in the absence of light. * UA: Units of activity are based on the total weight of the germinated parts, determined with p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as substrate for 30 min at 30°C, Matsuura, et al., 1995)

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

CHANGES IN ISOFLAVONE CONCENTRATION IN THE EMBRYONIC AXIS OF SOYBEANS GERMINATED IN THE PRESENCE OF LIGHT

YOSHIARA, Luciane Yuri; MADEIRA, Tiago Bervelieri; SILVA, Josemeyre Bonifácio da; MANDARINO, José Marcos Gontijo; CARRÃO-PANIZZI, Mercedes Concórdia; IDA, Elza Louko

Situação: Em submissão ao Journal of Food Biochemistry.

**CHANGES IN ISOFLAVONE CONCENTRATION IN THE EMBRYONIC AXIS OF
SOYBEANS GERMINATED IN THE PRESENCE OF LIGHT**

ISOFLAVONES PRESENT IN GERMINATED SOYBEAN EMBRYONIC AXIS

YOSHIARA, LucianeYuri¹; MADEIRA, Tiago Bervelieri¹; SILVA, Josemeyre Bonifácio da¹; MANDARINO, José Marcos Gontijo²; CARRÃO-PANIZZI, Mercedes Concórdia²;
IDA, Elzalouko^{1*}.

¹Department of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, CEP 86051-980, Londrina – Paraná - Brazil. Tel.: +55(43)3371-4080, Londrina - Paraná - Brazil.²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSO. Rod. Carlos João Strass - Distrito de Warta Londrina – Paraná - Brazil, Caixa Postal 231 - CEP 86001-970, *elida@uel.br

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the changes in the concentration of different forms of isoflavones present in soy components germinated for 168 h at 35°C in the presence of light and 100% relative humidity. The isoflavone concentration present in the radicles, hypocotyls, epycotyls, and cotyledons were determined by HPLC and evaluated by regression analysis. The concentration of glycosidic isoflavones and total aglycones in the germinated soybean embryonic axis (168 h of germination) followed mostly quadratic and cubic models with good fit to the experimental data. In the soybean cotyledons, which germinated for 144 h, 91.05% of the aglycone isoflavones were daidzein and genistein, and 8.95% of the glycosidic forms was

genistin. The hypocotyls and radicles had 100% of the three types of aglycones but at low concentrations.

Keywords: germinated soybean, β -glucosidase, isoflavones, aglycones

INTRODUCTION

In soybeans, there are 12 different isoflavones categorized into 4 groups: the β -glycosides (e.g., daidzin, genistin and glycitin), which have a glucose moiety linked to a flavonoid, the acetylglycosidic (e.g., acetyldaidzin, acetylgenistin and acetylglycitin) and malonylglycosidic compounds (e.g., malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglycitin), which are conjugated forms, and the aglycones (e.g., daidzein, genistein and glycitein), which do not have any glucose molecules linked to the flavonoid molecule¹. The glycosylated forms are more predominant than the aglycones among the isoflavones present in soybeans and soyfoods².

Because of their chemical structure, the aglycones have a higher biological activity than the glycosidic forms. The glycosidic form is the major isoflavone found in soybeans, representing 50 to 90% of all the total flavonoids present in soy flour^{3,4}. In humans, the aglycones are absorbed faster than the glycosidic forms and possess a higher biological activity⁴. The presence of aglycones in soybeans is a result of β -glucosidase activity. Matsuura et al.⁵ found that during the hydration process of soybeans, the glycosidic isoflavones are converted into aglycones by the action of this enzyme.

The consumption of germinated seeds, which are referred to as "sprouts", is widespread especially in countries like Japan, China and the United States. In Brazil, there is a considerable demand for different types of germinated seeds^{6,7}. Germination is a process that increases the nutritional value of the seed by improving

its protein digestibility, decreasing its phytate content and increasing the bioavailability of minerals and vitamins, particularly vitamin C⁸⁻¹⁰. During the soybean germination process, various enzymes are activated including proteases, phytases^{11,12} and β -glucosidase¹³⁻¹⁵. The highest activity of β -glucosidase was detected in soybean epicotyls germinated for 144 h in the presence of light¹⁵. Therefore, the soybean germination process may increase the aglycone content, thereby leading to the development of functional foods¹⁴.

The germination process of soybeans causes changes in both the concentration and form of total isoflavones; the concentration may increase and decrease in the cotyledons and radicles, respectively. Thus, changes in the isoflavone concentration depend on both the germination period and the physiological metabolism of the seeds¹⁴.

The aim of this study was to evaluate the changes in the concentration of different forms of isoflavones present in soybeans, which had germinated for 168 h at 35°C in the presence of light and 100% relative humidity.

EXPERIMENTAL

Materials and Reagents

The seeds used were soybean *Glycine max* (L.) Merrill (cultivar BRS 257), provided by Embrapa Soja in Londrina, Paraná State, Brazil. All reagents were of analytical or HPLC grade.

Germination Process of Soybean

The germination process of soybeans (BRS 257) was conducted as described by Yoshiara et al.¹⁵. At each germination time point (72, 96, 120, 144 and 168 h)

radicles, hypocotyls, cotyledons and epicotyls were manually separated and freeze dried (Christ, 500); the coats were discarded. The radicle and epicotyls began to germinate after 72 h. All germinated soybean components were ground (Ika, 33) and stored at -22°C until further analysis. For comparison purposes, non-germinated soybeans, which were lyophilized, milled, and defatted, were used.

Extraction and quantification of isoflavones by high performance liquid chromatography (HPLC)

The isoflavone concentration from the non-germinated (defatted and milled) and the germinated soybeans were determined in triplicate. For the isoflavone extraction, 100 mg of the samples were placed in test tubes and 4.0 mL of aqueous ethanol 70% (v/v), containing 0.1% (v/v) acetic acid, were added. The test tubes were maintained at room temperature for 5 h and agitated manually every 15 min as described by Carrão-Panizzi et al.¹⁶. The test tubes were centrifuged and the supernatants were filtered through nylon membranes (0.20µm); 20 µL of the supernatant were used for the isoflavone separation and quantification by high performance liquid chromatography (HPLC) according to Berhow¹⁷, after some modifications.

The HPLC instrument (Shimadzu, LC-10AT VP, Kyoto, Japan) was used with an oven (CTO-10AS VP), a temperature setting of 25°C and a diode array detector (SPD-M10A VP). Isoflavones were eluted from a reversed-phase ODS (M) C18 column (15 cm x 4 mm I.D., 5 µm-particle size). The linear gradient consisted initially of 100% water, which was adjusted to pH 3.0 with glacial acetic acid, and 0% of acetonitrile. After 25 min, the gradient was changed to 45% acidified water and 55% acetonitrile (v/v); after 27 min, the gradient consisted of 100% acetonitrile; and after

35 min, the gradient was 100% acidified water. The run time was 40 min at a 1 mL min⁻¹ flow rate; isoflavones were separated and detected at 260 nm.

The identification and quantification of the glycosidic and aglycone isoflavones were performed by using external standard curves for daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein and genistein. Standard curves were obtained by plotting the concentration of the standards as a function of the peak area in the HPLC obtained from 20 µL injections. The standard concentrations were carefully chosen to cover the possible isoflavone concentrations. For the isoflavones without pure standards, the standard curves were adjusted on the basis of differences in molecular weight.

The quantification of malonylglycosidic isoflavones (e.g., malonyldaidzin, malonylglycitin and malonylgenistin) was made based on the standard curves of the corresponding β-glycosidic isoflavones (i.e., daidzin, glycitin and genistin, respectively) using the similarity of the molar extinction coefficients as described by Coward et al.¹⁸. The isoflavone concentration results can either be presented as aglycone equivalents or as the sum of the different isoflavone forms¹⁹. In the present work, the concentrations of the glycosidic and aglycone isoflavones are shown as the sum of each compound within each group of isoflavones. The isoflavone concentrations were determined in triplicate, and the results were expressed as mg g⁻¹ on a dry-matter basis.

Statistical analysis

The experiment was conducted according to a randomized complete block design; three replications were conducted for each germination time. An analysis of variance was conducted, and the means were compared by Tukey's test (p<0.05). A

regression analysis was also conducted and the data were analyzed with the Statistica 8.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA)²⁰.

RESULTS AND DISCUSSION

The regression analysis (Table 1) showed that the concentration of glycosidic isoflavones (sum of glycosidic daidzin forms: glycitin, genistin, malonyldaidzin, malonylglycitin and malonylgenistin), aglycones (daidzein, genistein and glycitein) and total isoflavones (sum of glycosides and aglycones) followed quadratics, cubics and a linear models (aglycones from radicles, y_{R-Agly}), with coefficients of determination above 0.86, which is indicative of a good correlation in the adjustment of the proposed models. The low correlation coefficient ($R^2 = 0,57$) of y_{C-gly} (glycosidic isoflavones from cotyledons) is associated with an insignificant concentration of glycosidic isoflavones after a 144 h germination, followed by an increase after 168 h of germination. However, at 144 h there was a significant increment in the concentration of isoflavone aglycones (y_{C-agly}); a high correlation coefficient ($R^2 = 0.87$) was obtained.

The isoflavone profile obtained from the regression analysis (Table 1) showed that differences in isoflavone content exist between the radicles, hypocotyls, and cotyledons of soybean germinated in the presence of light (Fig. 1). The highest concentration of glycosides in radicles (Fig. 1R) was observed in 12 h of germination (5.11 mg g^{-1}), in hypocotyls (Fig. 1H) the highest concentration of glycosidic isoflavones were observed before germination (22.92 mg g^{-1}), in the epicotyls (Fig 1E) the highest concentration of these isoflavones was observed in 144 h of germination (1.77 mg g^{-1}), and in the cotyledons (Fig. 1C), in 168 h of germination (5.46 mg.g^{-1}). The aglycone profile was different in all the soybean components. In the

hypocotyl and radicles, the highest aglycone isoflavone concentration occurred in 72 h of germination (0.55 mg g^{-1} and 1.53 mg g^{-1} , respectively). However, the highest aglycone isoflavone concentration in the epicotyls occurred after 168 h of germination (0.96 mg g^{-1}) and in the cotyledons at 120 h of germination (0.89 mg g^{-1}).

During the 72, 96, 120, 144, and 168 h germination process, the acetylglycosidic forms were absent in all the components of the germinated seed; these results agree with those of Kudou et al.² who described that the acetylglycosidic compounds emerge only after heat treatment. According to these authors², the conversion of the malonylglycosidic to the acetylglycosidic isoflavones occurs by de-esterification reactions in which the malonyl forms, which are thermally unstable at 80°C , are converted into other glycosidic forms.

During the soybean germination process (Table 2), the highest concentration of total isoflavones was observed in the radicles after 120 h of germination (5.59 mg g^{-1}), at 0 h of germination in the hypocotyls (23.31 mg g^{-1}) and after 168 h of germination in the epicotyls (2.53 mg g^{-1}) and cotyledons (6.14 mg g^{-1}). Soybean isoflavone content is predominant in the cotyledon¹⁴. According to Rhodes²¹, the high total isoflavone concentration in soy cotyledon might be related with a defense mechanism against pests because this seed component is responsible for promoting plant growth and development. In 100 g of sample, the hypocotyl isoflavone concentration is higher than that present in the cotyledon. However, isoflavone concentration should be calculated relative to the total weight of the germinated soybean. The hypocotyls from the non-germinated soybean represent only 7% of the total seed weight, while the cotyledon represents 41% of the germinated seed weight (144 or 168 h of germination)¹⁵. Table 2 shows that in the germinated soybean cotyledons (144 and 168 h of germination), the total isoflavone concentration was

1.64 mg g⁻¹ and 6.14 mg g⁻¹, respectively. It is noteworthy that the aglycone isoflavones, during the 144 and 168 h germination times, represented 91.05% and 11.05% relative to the total isoflavones present in germinated soybean cotyledons, respectively. Therefore, to achieve a higher concentration of aglycone isoflavones it is important to germinate the soybean cotyledons for 144 h at 35°C under 10 h of daily light with 100% relative humidity. Under these conditions, the germinated soybean cotyledons were investigated for their isoflavone profile (Table 3).

The total isoflavone concentration of the non-germinated soybean was 2.73 ± 0.00 mg g⁻¹, while the soybean components after 144 h of germination (Table 3) showed the following levels: epicotyl (2.12 ± 0.06 mg g⁻¹), cotyledon (1.64 ± 0.02 mg g⁻¹), hypocotyl (0.43 ± 0.01 mg g⁻¹) and radicle (0.41 ± 0.00 mg.g⁻¹). The high total isoflavone concentration in the germinated soybean epicotyls was also observed by Ribeiro et al.¹⁴ who investigated the germination of soybean BRS 213 for up to 72 h at 35°C in the presence of light. The total isoflavone concentration of non-germinated soybeans was similar to that obtained by Carrão-Panizzi, et al.¹⁶, who reported levels of 1.65 mg g⁻¹ (cultivar BR 36) and 3.03 mg g⁻¹ (cultivar BRS 155) in soybeans undergoing no heat treatment. These authors¹⁶ stated that the changes the total isoflavone concentration are related to the cultivar type, climatic factors and the processing conditions of the grains.

Among the malonylglycosidic isoflavones in the non-germinated soybeans, malonylgenistin predominates with 42.51% (1.16 ± 0.00 mg g⁻¹), followed by malonyldaidzin (0.77 ± 0.01 mg g⁻¹) and malonylglicitin (0.22 ± 0.00 mg g⁻¹). The glycosidic isoflavones daidzin (0.27 ± 0.00 mg g⁻¹) and genistin (0.21 ± 0.00 mg g⁻¹) had lower concentrations compared to the malonylglycosidic compounds. The acetylglycosidic compounds (acetyldaidzin, acetylgenistin and acetylglicitin) were

absent. However, the aglycones daidzein ($0.01 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$) and genistein ($0.01 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$) were in low concentrations, and glycitein was absent.

It is noteworthy that in the soybean cotyledon germinated for 144 h at 35°C in the presence of light and 100% relative humidity, 91.05% of the aglycone forms were daidzein ($0.89 \pm 0.01 \text{ mg g}^{-1}$) and genistein ($0.60 \pm 0.01 \text{ mg g}^{-1}$), 9% of the glycosidic isoflavones was genistin ($0.15 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$) and the other isoflavone forms were absent.

The epicotyl appeared after a 72 h germination; in 144 h germination, the malonylglycosidic isoflavones were the most predominant forms, and the glycosidic isoflavone glycitin and all the forms of acetylglycosidic compounds were absent (Table 4). Among the glycosidic forms, there was no glycitin and the contents of daidzin ($0.09 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$) and genistin ($0.08 \pm 0.03 \text{ mg g}^{-1}$) were relatively low compared to the corresponding malonylglycosidic forms. The germinated soybean epicotyl was the only component that contained daidzein ($0.16 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$), glycitein ($0.13 \pm 0.01 \text{ mg g}^{-1}$) and genistein ($0.06 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$); the aglycone form of glycitein was only found in this component. Kudou et al.² analyzed different parts of soybean and also reported that the epicotyl was the only component that had the aglycone glycitein (0.15 mg g^{-1}).

The hypocotyls and radicles of germinated soybeans (144 h) showed only two forms of aglycone isoflavones: 76.74% ($0.33 \pm 0.01 \text{ mg g}^{-1}$) and 85.71% ($0.36 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$) were in the form of daidzein, respectively, and 22.6% ($0.10 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$) and 14.29% ($0.06 \pm 0.00 \text{ mg g}^{-1}$) were genistein, respectively; glycitein was absent (Table 3).

The aglycone isoflavone concentration of hypocotyls and radicles was 0.84 mg g^{-1} and that of the cotyledons was 1.64 mg g^{-1} . Relative to the total weight of the

germinated soybean (144 h in the presence of light¹⁵), the weight of the hypocotyls and radicles and that of the cotyledons is 40.31% and 41.25%, respectively. The germinated soybean cotyledons constitute a good source of aglycone isoflavones because their concentration is twice as high as that present in the hypocotyls and radicles.

CONCLUSIONS

The content of glycosidic, aglycone and total isoflavones in the soybean components germinated for up to 168 h at 35°C in the presence of light and 100% relative humidity, followed quadratic and cubic models. In the soybean cotyledons germinated for 144 h, 91.05% of the total isoflavones were genistein and daidzein, and 8.95% of the glycosidic forms was genistin. The hypocotyls and radicles, although in low concentrations, had 100% of the three types of aglycones.

Acknowledgements

This work was partially funded by CNPq/MCT and Fundação Araucária / PR. LYY would like to thank CNPq for a graduate scholarship, and EII is a CNPq Research Fellow.

REFERENCES

- 1 Liu K, Soy Isoflavones: Chemistry, processing effects, health benefits, and commercial production. In: _____. Soy Beans as functional foods and ingredients. Columbia: AOCS Press, 3, 57-72 (2004).
- 2 Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K, Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max Merrill*). Agric Biol Chem, **55**: 2227-2233(1991).

- 3 Eldridge AC, Determination of isoflavones in soybean flours, protein-concentrates, and isolates. *Journal of the American Chemical Society*. **183**: 90 (1982).
- 4 Fukutake M, Takahashi H, Ishida K, Kawamura H, Sigimura T, Wakabayashi K, Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food Chemical Toxicol.* **34**(5): 457-461 (1996).
- 5 Matsuura M, Obata A, Fukushima D, Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control. *J Food Sci*, **54**(3):602-605 (1989).
- 6 Vieira RF, Nishihara MK, Comportamento de cultivares de Mungo-verde (*Vigna radiata*) em Viçosa, Minas Gerais. *Revista Ceres, Viçosa*, **39**(221): 60-83 (1992).
- 7 Liu K, Soybeans: chemistry, technology and utilization. IPT.82–93 (1997).
- 8 Wai KNT, Bishop JC, Mack PB, Cotton RH, The vitamin content of soybeans and soybean sprouts as a function of germination time. *Plant Physiol*, **22**(2): 117-126 (1947).
- 9 Fordham JR, Wells CE, Chen LH, Sprouting of seeds and nutrient composition of seeds and sprouts. *J Food Sci*, **40**(3): 552-556 (1975).
- 10 Bordignon JR, Ida EI, Oliveira MCN, Mandarino JMG, Effect of germination on the protein content and the level of specific activity of lipoxygenase-1 in seedlings of three soybean cultivars. *Arch Latinoam Nutr*, **45**(3):222-226 (1995).
- 11 Abdullah A, Balswin RE, Minor H, Germination effects on flatus-causing factors and nutrients of mungbeans and two strains of small-seeds soybeans. *J Food Prot*, **47**(6): 441-444 (1984).
- 12 Mostafa MM, Rahma EH, Chemical and nutritional changes in soybeans during germination. *Food Chem*, **23**:257-275 (1987).

- 13 Santosh TR, Balasubramanian KK, Lalita K, Enhancement of beta-glucosidase and beta-galactosidase of *Trigonellafoenum-graecum* by spposure to the allelochemicalmimosine. J Agric Food Chem, **47**:462-467 (1999).
- 14 Ribeiro MLL, Mandarino JMG, Carrão-Panizzi MC, Oliveira MCN, Campo CBH, Nepomuceno AL, Ida EI, β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. J Food Biochem, **30**:453-486 (2006).
- 15 Yoshiara LY, Madeira TB, Ribeiro MLL, Mandarino JMG, Carrão-Panizzi MC, Ida EI, β -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*) embryonic axis germinated in the presence or absence of light. J Food Biochem, DOI: 10.1111/j.1745-4514.2011.00585.x (2011).
- 16 Carrão-PanizziMC, Simão AS, Kikuchi A, Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. Pesqu Agropecu Bras, **38**(8):897-902 (2003).
- 17 Berhow MA, Modern analytical Techniques for flavonoid determination. Flavonoids in the living cell, Kleur Academic, Plenum Publishers. 505, New York, pp. 61-76 (2002).
- 18 Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S, Genistein, daidzein, and their beta-glucoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and asian diets. J Agric Food Chem, **41**:1961-1967 (1993).
- 19 Klump SP, Allred MC, MacDonald JL, Ballam JM, Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study. J AOAC Int. **84**(6):1865-83 (2001).
- 20 StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com, 2007.

21 Rhodes MJC, Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. Proc Nutr Soc, **55**:371-384 (1996).

Table 1. Regression analysis and coefficient of determination for glycosidic, aglycone and total isoflavone concentration of different soybean (BRS 257) components germinated in the presence of light for 72, 96, 120, 144 and 168 h at 35°C and 100% relative humidity.

Germinated component	Isoflavone Form	Models	R ²
Radicles	Glycosidic	$y_{R-Gly} = 3 \cdot 10^{-5}X^3 - 0,01X^2 + 1,1625X - 36,732$	0.86
	Aglycones	$y_{R-Agly} = -0,0016X + 0,6703$	0.97
	Total	$y_{R-Total} = -0,0006X^2 + 0,0809X + 3,0539$	0.80
Hypocotyls	Glycosidic	$y_{H-Gly} = 0,0014X^2 - 0,3653X + 22,626$	0.99
	Aglycones	$y_{H-Agly} = 3 \cdot 10^{-6}X^3 - 0,0009X^2 + 0,0654X + 0,3913$	0.93
	Total	$y_{H-Total} = 0,0013X^2 - 0,3535X + 23,139$	0.99
Epicotyls	Glycosidic	$y_{E-Gly} = -10^{-5}X^3 + 0,0045X^2 - 0,511X + 18,229$	0.87
	Aglycones	$y_{E-Agly} = 0,0001X^2 - 0,0167X + 0,6409$	0.92
	Total	$y_{E-Total} = 0,0003X^2 - 0,0372X + 1,112$	0.92
Cotyledons	Glycosidic	$y_{C-Gly} = 10^{-5}X^3 - 0,0029X^2 + 0,1647X + 3,4774$	0.57
	Aglycones	$y_{C-Agly} = -2 \cdot 10^{-6}X^3 + 0,0006X^2 - 0,0258X + 0,0323$	0.87
	Total	$y_{C-Total} = -8 \cdot 10^{-7}X^3 - 0,0001X^2 + 0,0251X + 3,5514$	0.93

The glycosidic isoflavones result from the sum of the glycosidic isoflavones (i.e., daidzin, glycitin, genistin) and the malonylglycosidic isoflavones (i.e., malonyldaidzin, malonylglycitin and malonylgenistin); the aglycones result from the sum of daidzein, glycitein and genistein.

Table 2: Total isoflavone concentration and percentage of glycosidics and aglycone isoflavones of different soybean (BRS 257) components germinated in the presence of light for 72, 96, 120, 144 and 168 h at 35°C and 100% relative humidity.

Germination time		Radicles	Hypocotyls	Epicotyls	Cotyledons
0 h	Total (mg.g ⁻¹)	-	23.31±1.36	-	3.56±0.03
	%glycosidic	-	98.36	-	99.37
	%aglycones	-	1.64	-	0.63
72 h	Total (mg.g ⁻¹)	5.57±0.08	4.06±0.09	nd	4.37±0.03
	%glycosidic	90.09	62.26	nd	91.78
	%aglycones	9.91	37.74	nd	8.22
96 h	Total (mg.g ⁻¹)	5.20±0.08	1.13±0.00	nd	3.89±0.01
	%glycosidic	90.10	25.75	nd	81.92
	%aglycones	9.90	74.25	nd	18.08
120 h	Total (mg.g ⁻¹)	5.59±0.08	0.59±0.01	0.35±0.00	4.02±0.00
	%glycosidic	91.48	52.00	0.00	77.78
	%aglycones	8.52	48.00	100.00	22.22
144 h	Total (mg.g ⁻¹)	0.41±0.00	0.43±0.01	2.12±0.06	1.64±0.02
	%glycosidic	0.00	0.00	83.84	8.95
	%aglycones	100.00	100.00	16.16	91.05
168 h	Total (mg.g ⁻¹)	0.40±0.00	0.75±0.02	2.53±0.04	6.14±0.01
	%glycosidic	0.00	26.82	62.24	88.95
	%aglycones	100.00	73.18	37.76	11.05

The radicles and epicotyls appeared at 72 h of germination. The isoflavone concentration of epicotyls at 72 h and 96 h were not determined. The glycosidic isoflavones result from the sum of the glycosidic isoflavones (i.e., daidzin, glycitin, genistin) and the malonyl glycosidic isoflavones (i.e., malonyldaidzin, malonylglycitin and malonylgenistin); the aglycones result from the sum of daidzein, glycitein and genistein.

Table 3.Total isoflavone concentrations and their different forms in the germinated soybean(144 hours at 35°Cin the presence of light) and in the non-germinated soybean components.

	Non-germinated	Germinated Soybean BRS 257			
	soybeans	Cotyledons*	Epicotyls*	Hypocotyls*	Radicles*
Daidzin	0.27 ± 0.01 ^c	0.00 ^d	0.09 ± 0.00 ^e	0.00 ^c	0.00 ^c
Glycitin	0.09 ± 0.00 ^e	0.00 ^d	0,00 ^h	0.00 ^c	0.00 ^c
Genistin	0.21 ± 0.00 ^d	0.15 ± 0.00 ^c	0.08 ± 0.02 ^{e,f}	0.00 ^c	0.00 ^c
Malonyldaidzin	0.77 ± 0.01 ^b	0,00 ^d	0.70 ± 0,00 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c
Malonylglycitin	0.22 ± 0.00 ^d	0,00 ^d	0.03 ± 0.00 ^g	0.00 ^c	0.00 ^c
Malonylgenistin	1.16 ± 0.00 ^a	0,00 ^d	0.89 ± 0.03 ^a	0.00 ^c	0.00 ^c
Acetyldaidzin	0,00 ^g	0,00 ^d	0,00 ^h	0.00 ^c	0.00 ^c
Acetylglycitin	0,00 ^g	0,00 ^d	0,00 ^h	0.00 ^c	0.00 ^c
Acetylgenistin	0,00 ^g	0,00 ^d	0,00 ^h	0.00 ^c	0.00 ^c
Daidzein	0.01 ± 0.00 ^f	0.89 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.00 ^c	0.33 ± 0.01 ^a	0.36 ± 0.00 ^a
Glycitein	0,00 ^g	0,00 ^d	0.13 ± 0.01 ^d	0.00 ^c	0.00 ^c
Genistein	0.01 ± 0.00 ^f	0.60 ± 0.01 ^b	0.057 ± 0.00 ^f	0.10 ± 0.00 ^b	0.06 ± 0.00 ^b
TOTAL	2.73 ± 0.00	1.64 ± 0.02	2.12 ± 0.06	0.43 ± 0.01	0.41 ± 0.00

* Values represent mean ± standard deviation of the respective isoflavone concentration expressed as mg g⁻¹. Different letters within the same column represent a significant difference by Tukey test at 5% probability.

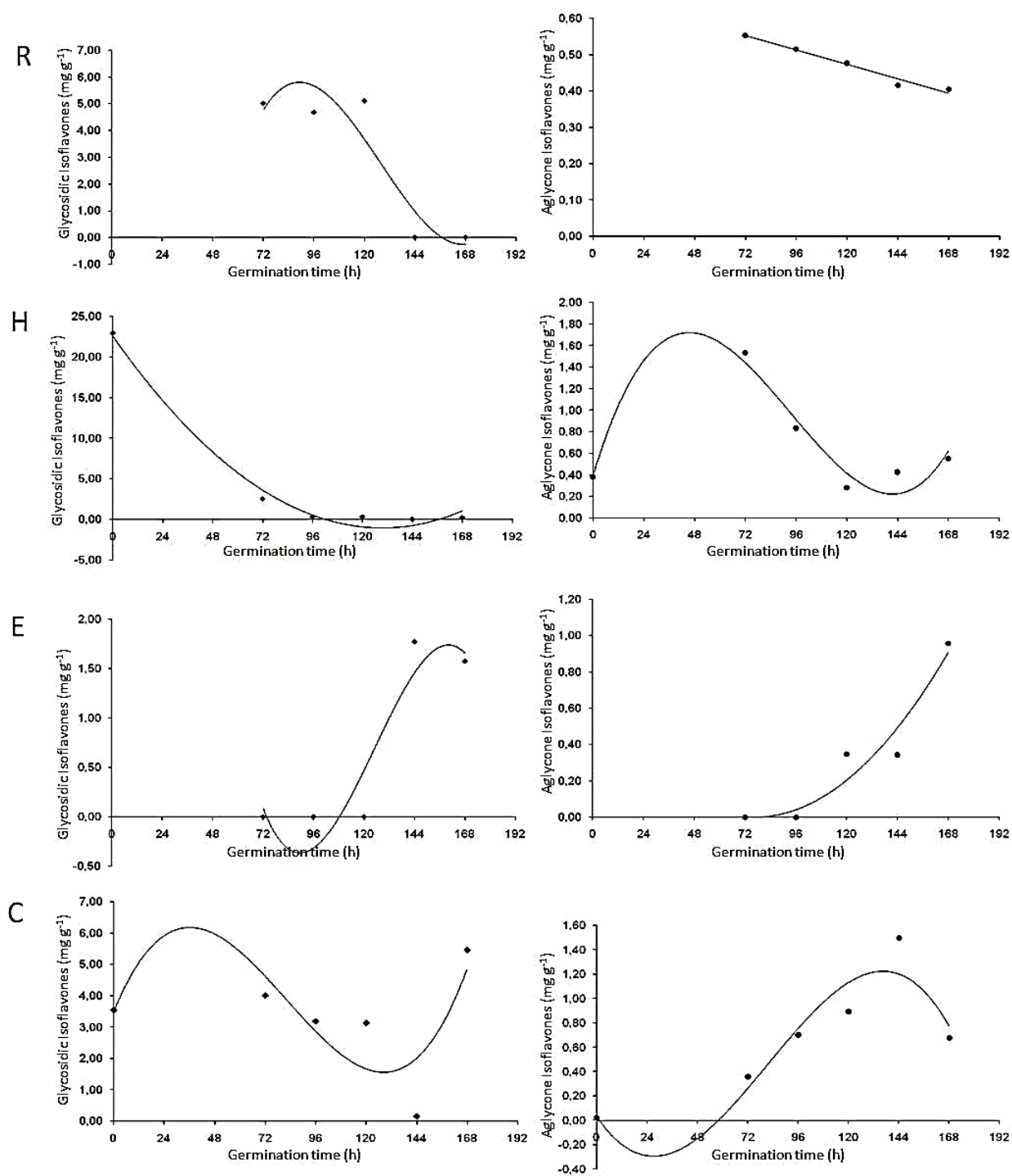


Figure 1. Isoflavone concentration (expressed as $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and in percentage) in radicles (R), hypocotyls (H), epicotyls (E) and cotyledons (C) of soybean (BRS 257) germinated for 72, 96, 120, 144, and 168 h at 35°C in the presence of light.

5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3

OPTIMIZATION OF B-GLUCOSIDASE EXTRACTION FROM GERMINATED SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merril) AND CONVERSION OF GLYCOSIDIC ISOFLAVONES TO AGLYCONES

Luciane Y Yoshiara; Tiago B Madeira; Josemeyre B da Silva; Elza I Ida

Situação: Em submissão ao Phytochemical Analysis.

**Optimization of β -glucosidase extraction from germinated soybean (*Glycine max* (L.)
Merril) and conversion of glycosidic isoflavones to aglycones**

Germinated soybean β -glucosidase extraction and glycosidic isoflavones conversion

Luciane Y Yoshiara; Tiago B Madeira; Josemeyre B da Silva; Elza I Ida

Introduction - Soybean (*Glycine max*) germination under different germination conditions has led to the discovery that epicotyls from germinated seeds have enhanced β -glucosidase activity for use in the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones.

Objective - The aim of this work was to optimize both the extraction of β -glucosidase from epicotyls of soybean germinated for 144 h in the presence of light and the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones.

Material and methods - The effects of temperature and pH on the extraction of β -glucosidase were investigated by applying central composite design (CCD). The optimized enzyme was used to convert glycosidic isoflavones to aglycones under different temperatures and pHs.

Results - For the extraction of β -glucosidase and isoflavone conversion, the linear effect of pH and the quadratic effect of pH and temperature were significant. The maximum extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls occurred at 30°C and pH 5.0 in the presence of 0.1 mol L⁻¹ sodium citrate buffer and 0.1 mol L⁻¹ NaCl. The maximum conversion of glycosidic isoflavones into aglycones, 98.7%, occurred when aglycones were produced from defatted soybean cotyledon flour at 35°C and pH 7.00 or 7.61 for 14 h.

Conclusions – This study has shown that β -glucosidase can be best extracted at 30°C, pH 5.0 using a sodium citrate buffer with 0.1 mol L⁻¹ of NaCl and this enzyme can be used for conversion of almost all the glycosidic isoflavones present in soy flour.

**Optimization of β -glucosidase extraction from germinated soybean (*Glycine max* (L.)
Merril) and conversion of glycosidic isoflavones to aglycones**

Germinated soybean β -glucosidase extraction and glycosidic isoflavones conversion

Luciane Y Yoshiara; Tiago B Madeira; Josemeyre B da Silva; Elza I Ida*.

Department of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia
Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, CEP 86051-980, Londrina – Paraná -
Brazil. Tel./Fax: +55(43)3371-4080. *elida@uel.br

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) germination under different germination conditions has led to the discovery that epicotyls from germinated seeds have enhanced β -glucosidase activity for use in the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones. The aim of this work was to optimize both the extraction of β -glucosidase from epicotyls of soybean germinated for 144 h in the presence of light and the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones. The effects of temperature and pH were investigated by applying central composite design (CCD). For the extraction of β -glucosidase and isoflavone conversion, the linear effect of pH and the quadratic effect of pH and temperature were significant. The maximum extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls occurred at 30°C and pH 5.0 in the presence of 0.1 mol L⁻¹ sodium citrate buffer and 0.1 mol L⁻¹ NaCl. The maximum conversion of glycosidic isoflavones into aglycones, 98.7%, occurred when aglycones were produced from defatted soybean cotyledon flour at 35°C and pH 7.00 or 7.61 for 14 h.

Keywords: *Glycine max* (L.) *Merril*, germinated soybean, β -glucosidase, aglycone isoflavones, epicotyl

INTRODUCTION

Isoflavones are recognized in human health due to their biological properties; in plants, isoflavones have antifungal properties that protect against pathogen attack and also have antioxidant activity (Hsieh and Graham, 1980). Epidemiological studies have shown that isoflavones may help reduce the risk of some chronic diseases (Sugano, 2006). In humans, a higher incidence of some cancers, such as breast and colon cancer, and some types of heart disease occur in Western populations that consume smaller quantities of soy isoflavones. Moreover, according to Brandi (1997), isoflavones may reduce bone loss, reduce the risk of osteoporosis and attenuate the symptoms of menopause in women. Isoflavones are characterized as phytoestrogens, due to the similarity between their chemical structure and molecular weight and that of the group of female sex hormones known as estrogens, which are secreted by ovarian cells (Adlercreutz and Mazur, 1997).

Soybean isoflavones can be found in 12 different forms: the β -glycosidics, which have a glucose unit linked to the benzene ring (e.g., daidzin, genistin and glycitin); β -glycosidic conjugated forms, acetylglycosidics (e.g., acetyldaidzin, acetylgenistin and acetylglycitin) and malonylglycosidics (e.g., malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglycitin); and the aglycone form (e.g., daidzein, genistein and glycitein), which is not linked to glucose (Liu, 2004). In soybeans, the glycosidic forms of isoflavones are present in larger quantities than the aglycone forms (Kudou et al., 1991). The only edible source of high levels of isoflavones is soybeans. The distribution and content of different isoflavones are influenced by multiple factors, such as genetic variety, growth location and crop year (Wang and Murphy, 1994). The isoflavone content of 18 soybean cultivars from different maturity groups ranging from 71.11 to 174.30 mg 100 g⁻¹ (Ribeiro et al., 2007). Isoflavone content varies across soybean seed components: the coat contains almost no isoflavones; hypocotyls contain high concentrations; and cotyledons contain 80–90% of the total isoflavones in the seed (Tsukamoto et al., 1995).

In humans, aglycone isoflavones are absorbed faster than the glycosidic forms (Izumi et al., 2000) and have stronger biological activity (Fukutake et al., 1996). The presence of aglycone isoflavones in soybeans is a result of the activity of β -glucosidase. During the hydration of soybeans, this enzyme hydrolyzes glycosidic isoflavones to aglycones (Matsuura et al., 1989).

Therefore, in soy products, there is a high demand for and interest in increasing the amount of aglycone isoflavones by applying β -glucosidase for the conversion of glycosidic isoflavones to their aglycone forms (Kuo et al., 2006, Phimonphan et al., 2007). β -glucosidase

(β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) catalyzes the hydrolysis of β -glycosidic di- and/or other glycoside conjugates and oligosaccharides, such as isoflavones, releasing glucose and producing the aglycone. This enzyme is commonly found in plants or can be derived from the metabolism of fungi and bacteria (Esen, 1992).

In intact plant tissue, β -glucosidase is stored in compartments separate from its substrate and plays a role in plant physiology in the degradation and lignification of cell walls during germination, as plant growth regulators and in the activation of defense components (Hsieh and Graham, 1980, Morant et al., 2008).

During the germination process, the activation of enzymes such as β -glucosidase can occur, increasing the aglycone isoflavone content (Santosh et al., 1999). The endogenous β -glucosidase from soybeans or germinated soybean components can be extracted and applied in soy products to obtain food with good functional properties (Ribeiro et al., 2006). In germinated soybeans, β -glucosidase with high specific activity was observed in the cotyledon and other plant parts such as the radicles, roots and epicotyls (Ribeiro et al., 2006, Yoshiara et al., 2011). However, in radicles germinated for 7 or 9 days, the crude extract exhibited a specific activity that was 800-fold higher than that of the crude extract from the cotyledon (Hsieh and Graham, 1980). In epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light at 35°C, the specific activity of the crude β -glucosidase extract was 72.42-fold higher than that of the cotyledon extract from ungerminated soybeans and 5.79-fold higher than that of the crude cotyledon extract from germinated soybeans under the same conditions. Therefore, epicotyls were recommended as a source of endogenous β -glucosidase for application in glycosidic isoflavone hydrolysis to obtain alglycones (Yoshiara et al., 2011).

The extraction of endogenous β -glucosidases and the use of this enzyme for isoflavone conversion have not been well explored in comparison with microbial enzyme production, purification and uses for isoflavone conversion. The central composite design (CCD) method is an experimental design that is used in response surface methodology to construct a second-order model for the response variable without needing a complete three-level factorial experiment. Response surface methodology (RSM), which was originally described by Box and Wilson (1951), permits the reduction of the number of experimental trials needed to evaluate multiple parameters and their interactions, thus reducing time and labor. RSM is a group of statistical and mathematical techniques that has been successfully used for developing, improving and optimizing processes (Barros-Neto et al., 2003).

Due to the importance of this enzyme, the objective of this work was to use CCD to optimize the extraction of β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light at 35°C and the conversion of glycosidic isoflavones into aglycones.

MATERIAL AND METHODS

Materials

For germination, soybean seeds of the cultivar BRS 257 were used. For the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones, soybean cotyledon flour of the same cultivar was used. Both samples were developed at the Experimental Farm of Embrapa Soybean in Londrina – PR - Brazil. The isoflavone standards for daidzin, glycitin, genistin and daidzein, glicitein and genistein were purchased from Sigma-Aldrich® (Saint Louis, MO, USA), and the malonyl standards for isoflavones (malonyldaidzin, malonylglycitin and malonylgenistin) were obtained from Sequoia Research Products (Pangbourne, United Kingdom). All reagents were analytical or HPLC grade, regardless of commercial origin.

Soybean germination process

Soybean seeds were previously selected, and the germination procedure was conducted as described by Yoshiara and collaborators¹⁹. In this process, 15 germination paper rolls with 50 seeds were placed in a germination chamber (Marconi, MA 835, Brazil), and the seeds were subjected to a photoperiod of 10 h of light. The temperature was maintained at 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) with a relative humidity of 100% for 144 h. The epicotyls were manually separated, freeze-dried (Christ, ALPHA 1-4 LD plus, Germany), ground (A11 Basic Mill, Ika, Brazil) and stored at -26°C until analysis.

CCD-based optimization

β -glucosidase extraction from germinated soybean epicotyls

The effect of temperature ($X_1 = 23, 25, 30, 35$ and 37°C) and pH ($X_2 = 3.6, 4.0, 5.0, 6.0$ and 6.4) on the extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls was evaluated by applying the CCD with 5 levels of variation in a total of 11 assays (Table 1). The response function (Y) was expressed as extracted β -glucosidase activity. The extraction assays for β -glucosidase activity were performed as described by Carrão-Panizzi and Bordignon²² with 0.1 mol L^{-1} sodium citrate buffer with 0.1 mol L^{-1} NaCl at various pH values (X_1) and temperatures (X_2) according to the experimental design. The extraction was performed with 100 mg of germinated soybean epicotyls and 1.5 mL sodium citrate buffer and periodically

vortexed over 50 min. Then, the samples were centrifuged (Cientec, CT 600, Brazil) for 15 min at 2500 g. The β -glucosidase activity was then determined (response function Y) in the extract.

Conversion of glycosidic isoflavones to aglycones with β -glucosidase extracted from germinated soybean epicotyls

To investigate the conversion of glycosil isoflavones to aglycones with the β -glucosidase extracted and optimized from epicotyls, a central composite design (CCD) was used with 2 variables (X_3 = temperature and X_4 = pH) and 5 variation levels (Table 2) in 2 blocks. The first block consisted of a 2^2 factorial design, a total of 7 assays (assays 1 - 7), and 2 variables with 3 variation levels (X_3 = 20, 35 and 50°C) and (X_4 = pH 4, 5,5 and 7,0). The second block was performed to verify the quadratic effects in a total of 6 assays (assays 8 - 13), containing the axial points of the CCD (X_3 = 13,9 and 56.2°C and X_4 = pH 3.39 and 7.61). The hydrolysis time was kept constant at 14 h. The assays were performed at random with defatted soybean cotyledon flour in 3.0 mL buffer (1:10, p/v). The pH values were adjusted according to the design with 0,1 M sodium phosphate and 0.1 M citric acid solutions. To each test tube, 5.0 units of β -glucosidase activity from germinated soybean epicotyls was added and shaken at 25 rpm for 14 h at the temperatures described in the design (Table 2). Then, the samples were freeze-dried, the isoflavone content was determined by ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC), and the response function was expressed as W = % aglycones obtained relative to the total isoflavone content extracted from the soybean cotyledon flour.

Statistical analysis.

STATISTICA 8.0 software(StatSoft, 2007) was used to determine the effects of independent variables, to calculate the regression coefficient (R^2) and analysis of variance (ANOVA) and to build the response surfaces at 5% significance. Data were adjusted to a second-order polynomial model (Equation 1):

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad \text{Equation (1),}$$

where y is the response variable, x_1 and x_2 are the coded process variables, and β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} , and β_{12} are the regression coefficients.

Validation of the models

To evaluate and validate the mathematical model, a new assay was performed under the conditions ($X_1 = ^\circ\text{C}$ and $X_2 = \text{pH}$) that yielded the best extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls and the conversion condition ($X_3 = ^\circ\text{C}$ and $X_4 = \text{pH}$) that resulted in the highest % aglycones. The observed model was obtained experimentally, and the calculated (\hat{y} and \hat{w}) values were determined using the proposed model. The model was validated when the observed responses were within the confidence interval of the model.

Determination of β -glucosidase activity

The enzymatic activity was determined according to the method described by Matsuura et al. (1995) with some modifications. Briefly, 0.4 mL of 16 mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside and 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 5.0) was transferred to a test tube and placed in a water bath at 30°C for 10 min. The sample (0.1 mL) was added, and the test tubes were placed in a water bath at 30°C for 30 min. The reaction was stopped by adding 0.5 mL 0.5 M sodium carbonate, and the concentration of p-nitrophenol released during the reaction was determined by measuring the absorbance at 420 nm with a spectrophotometer. For quantification, a p-nitrophenol (20–160 mM) calibration curve was previously prepared using known stock concentrations. One unit of enzyme activity (UA) was defined as the amount of β -glucosidase that releases 1 mM p-nitrophenol min^{-1} under the experimental conditions. The results were expressed as units of β -glucosidase activity (UA mL^{-1}) per milliliter of sample.

Extraction and determination of isoflavones by UHPLC

Isoflavones were extracted from 250 mg of defatted cotyledon soy flour after conversion with 6 mL of an extraction solvent (water, ethanol and acetone, 1:1:1, v/v/v). The extraction was performed in an ultrasonic bath at 60°C for 10 min (Yoshiara et al, 2012), followed by centrifugation and filtration (Millex–LH filters; 0.20 μm) of the supernatant.

To separate and quantify the isoflavones, 1.4 μL was used, and the chromatographic conditions were adapted from HPLC as described by Berhow (2002) to ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) (Acquity UPLC[®] System, automatic system injection, oven with controlled temperature at 35°C and a diode array detector, Waters, United States). To separate isoflavones, a reverse-phase column, BEH C18 (Waters, 2.1 mm x 50 mm, 1.7 μm particles), was used. The elution was performed with a binary non-linear gradient with an initial phase of 90% acidified MilliQ[®] water (glacial acetic acid, pH 3.0) and 10%

acetonitrile. After 8 min of elution, 100% acetonitrile was reached, and the initial conditions were re-established at 9 min. The total run time was 12 min, the flow rate was 0.70 mL min⁻¹, and the temperature was kept constant at 35°C. A diode array detector (Waters) with a wavelength set at 260 nm was used.

The glycosidic and aglycone isoflavones were identified and quantified by comparison to individual external standard curves for daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein and genistein. Standards curves were obtained by plotting the standard concentration as a function of the peak area obtained from UPLC analysis of 1.4- μ L injections. The concentrations of standard solutions were carefully chosen to cover possible isoflavone contents. For isoflavones for which no pure standard was available, the standard curves were adjusted based on differences in molecular weight. The malonyl-glycosidic isoflavones (malonyldaidzin, malonylglycitin and malonylgenistin) were quantified based on the standard curves of the corresponding β -glycosidic isoflavones (daidzin, glycitin and genistin, respectively) using the similarity of the extinction coefficients as described by Coward, Smith, Kirk and Barnes (1998). The results for the aglycone isoflavones are shown as the percent of aglycones (daidzein, glycitein and genistein), determined in triplicate, and expressed as % aglycones in total isoflavones.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of β -glucosidase extraction from germinated soybean epicotyls

For the extraction of β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light at 35°C, the linear effect of the variable X_1 (°C) on the response function y (β -glucosidase activity) was not significant, while the linear effect of the variable X_2 (pH) was significant. However, the quadratic effect of the variables X_1 and X_2 was significant, whereas the interaction between the variables X_1 and X_2 was not significant (Table 3). These results indicate that variable X_2 (pH between 3.6 and 6.4) was essential for the extraction of β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light at 35°C.

The determination coefficient (R^2) of 0.94 indicates that 94% of the experimental data adequately fit the model. Thus, the polynomial model (Y) that represents the extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls is described as:

$$Y = 11.39 + 0.18x_1 - 1.29x_1^2 - 1.97x_2 - 3.48x_2^2 + 0.12x_1x_2 \quad (\text{Equation 2}),$$

where x_1 and x_2 are the coded variables and represent the temperature and pH, respectively, of the extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls.

According to Table 4, at temperatures of 30°C or 35°C and low pH values of 3.6 or 4.0 (assays 10 or 3), less β -glucosidase activity was extracted from germinated soybean epicotyls. However, at 23°C and pH 5.0 (assay 8), 25°C and pH 6.0 (assay 2), 30°C and pH 6.4 (assay 11) and 37°C and pH 5.0 (assay 9), the activity of the β -glucosidase extract increased. However, a higher β -glucosidase activity was extracted when the assays were performed at the central point, i.e., at 30°C and pH 5.0 (assays 5, 6 and 7).

The response surface (Figure 1) shows that the highest extraction of β -glucosidase (Y) from germinated soybean epicotyls occurred when X_1 (°C) was approximately 30°C and the pH (X_2) was approximately 5.0. A greater extraction of β -glucosidase (Y) from germinated soybean epicotyls occurred at temperatures ranging from $x_1 = -0.5$ ($X_1 = 27.5^\circ\text{C}$) and $x_1 = +0.7$ ($X_1 = 33.5^\circ\text{C}$) and pH values ranging from $x_2 = -0.1$ ($X_2 = 4.9$) and $x_2 = +0.5$ ($X_2 = 5.5$).

The temperature (X_1) and pH (X_2) conditions used as the experiment central point, 30°C and pH 5.0, coincided with the conditions for the maximum extraction of β -glucosidase based on the desirability parameter (Figure 2) of the proposed model. Therefore, the extraction of β -glucosidase should be performed at a temperature of 30°C and a pH of 5.0. Carrão-Panizzi and Bordignon (2000) used similar conditions to extract β -glucosidase from cotyledons from different soybean cultivars, using room temperature and a pH of 4.5 with 0.05 mol L⁻¹ sodium citrate buffer containing 0.1 mol L⁻¹ NaCl to determine β -glucosidase activity in soybean cultivars with different isoflavone contents. However, Matsuura and Obata (1995) partially purified and characterized β -glucosidase from cotyledons by using different conditions to extract β -glucosidase from soybean cotyledons, including lower temperatures (between -10 and 5°C) and pH 6.6 with 0.1 mol L⁻¹ sodium phosphate buffer and subsequent acidification of the supernatant to pH 5.0. The extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls has not been reported in the literature and the proposed model proved to be advantageous to establish the best conditions for the extraction of this enzyme.

Even though the condition of maximum extraction of β -glucosidase coincided with the center point, the proposed model was validated by conducting an additional experiment at the optimal point. The results observed (Table 5) for the extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls were within the confidence interval of the estimated response, confirming the validity of the model.

Optimization of the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones using β -glucosidase from soybean epicotyls

According to variance analysis (ANOVA), the linear effect of the variable X_4 (pH) and quadratic effects of the variables X_3 ($^{\circ}\text{C}$) and X_4 (pH) were significant. However, the effects of the block, linear variable X_3 ($^{\circ}\text{C}$) and the interaction of the variables X_3 ($^{\circ}\text{C}$) and X_4 (pH) on the response ($W = \% \text{ aglycones}$) were not significant (Table 6), and thus the terms were excluded from the model without damage to the model fit (R^2). The coefficient of determination (R^2) was 0.86, in other words, 86% of experimental data can be explained by the model. Thus, equation 3 can be described as:

$$W = 81.938 + 22.328x_4 - 11.231x_4^2 - 13.8562x_3^2 \quad (\text{Equation 3}),$$

where $W = \% \text{ aglycones}$ and x_3 and x_4 are the coded variables and represent the temperature and pH.

Before beginning the study of the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones, the aglycone content of the soybean cotyledon flour (BRS 257) was determined to be 2.9%. The response function ($W = \% \text{ aglycones}$) (Table 7) was higher than 51% when a pH (X_4) at higher levels (0, +1 and +1.41) was used, which can be observed in assays 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12 and 13 at any temperature level (X_3), demonstrating the greater influence of pH on the response function ($W = \% \text{ of aglycones}$) and confirming the study of the effects (Table 6).

The response surface (Figure 3) includes a region in which greater than 80% aglycones occurred, i.e., a pH range between +0.5 and +1.5 ($6.25 < \text{pH} < 7.75$) and a temperature between +0.5 and 0.5 ($27.5 < T^{\circ}\text{C} < 42.5$). In addition, an optimum region can be noted in which W is at maximum % aglycones. The desirability parameter indicates two optimal points of maximum W ($W = 98.7\% \text{ aglycones}$), i.e., when $x_3 = 0$ (35°C) and $x_4 = +1$ or +1.41 (pH = 7.00 and 7.61). One of these test points coincides with assay 9 ($Z = 98.7\% \text{ aglycones}$). These results are distinct from the optimum conditions of pH (between 5.2 and 6.0) and temperature (50°C) for β -glucosidase activity from soybean cell tissue described by Hosel and Todenhagen (1980) and by Matsuura and Obata (1993), who reported optimal activity at pH 4.5 and a temperature of 45°C for a soybean β -glucosidase-C.

While endogenous β -glucosidases represent a more secure source of β -glucosidases than microbial sources, endogenous β -glucosidases have been poorly explored when compared to the microbial conversion of β -glycosidic isoflavones to aglycones. In this study, the maximum aglycone isoflavones obtained was 98.7% when endogenous β -glucosidase from the epicotyls of germinated soybeans was used under the two conditions described above. The 100% conversion of glycosidic isoflavones to aglycones was described by

Mantovani et al. (2011) and Marazza et al. (2009), but both of these studies used β -glucosidase enzymes from microbial sources. Mantovani et al. (2011) used the β -glucosidase produced by fermentation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* in solid form and applied in methanol extracts of isoflavones extracted from soybean molasses for 30 min at 40°C. Marazza et al. (2009) used β -glucosidase produced via *Lactobacillus (L.) rhamnosus* CRL981 in a soy extract for 12 h at 37° C and obtained 100% conversion of glycosides to aglycone compounds. Xue, Song and Yu (2009) applied β -glucosidase from *Thermotoga maritima* to recombinant soybean flour for 3 h at 80°C to produce isoflavone aglycones and obtained an almost complete conversion of all isoflavone glycosides.

The proposed model was validated after re-testing in triplicate at the optimal point ($x_3 = 0$ (35°C) and $x_4 = +1.41$ (7.61)), and the response function was observed within the confidence interval of the model (Table 8).

CONCLUSION

The maximum extraction of β -glucosidase from germinated soybean epicotyls occurred at 30°C and pH 5.0 in the presence of 0.1 mol L⁻¹ sodium citrate buffer and 0.1 mol L⁻¹ NaCl.

The maximum conversion of glycosidic isoflavones into aglycones, 98.7%, occurred when aglycones were produced from defatted soybean cotyledon flour at 35°C and pH 7.00 or 7.61 for 14 h.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - "National Council of Technological and Scientific Development", CNPq, Brazil and Fundação Araucária/PR. LYY would like to thank CNPq for a graduate scholarship, and EII is a CNPq Research Fellow.

REFERENCES

- Adlercreutz, H.; Mazur, W. Phyto-estrogens and western diseases. *Annals of Medicine*. **1997**, 29(2), 95–102.
- Barros-Neto, B. De; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora Unicamp, 2003.
- Berhow, M. A. *Modern analytical Techniques for flavonoid determination. Flavonoids in the living cell*, Kleur Academic, Plenum Publishers. v.505, p.61-76. New York, 2002.

- Box, G. E. P.; Wilson, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. **1951**, 13(1), 1-45.
- Brandi, M. L. Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. *Calcified Tissue International*. **1997**, 61, S5-S8.
- Carrão-Panizzi, M. C.; Bordignon, J. R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2000**, 35(5), 873–878.
- Coward L.; Smith M.; Kirk M.; Barnes S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, 68(6 Suppl), 1486S-1491S.
- Esen, A. Purification and partial characterization of maize (*Zea Mays L.*) β -glucosidase. *Plant Physiology*. **1992**, 98, 174-182.
- Fukutake , M.; Takahashi, H.; Ishida K.; Kawamura, H.; Sugimura T.; Wakabayashi, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food and Chemical Toxicology*. **1996**, 34(5), 457-461.
- Hosel, W.; Todenhagem, R. Characterization of a beta-glucosidase from a *Glycine max* which hydrolases coneferin and syringing. *Phytochemistry*. **1980**, 19(7), 1349-1353.
- Hsieh, M. C.; Graham, T. L. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with a high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*. **1980**, 58, 995-1005.
- Izumi, T.; Piskula, M. K.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Kataoke, S.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. Soy Isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in Humans. *J Nutr.* **2000**, 130, 1695-1699.
- Kudou, S.; Fleury, Y.; Welti, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okubo, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agricultural and Biological Chemistry*, **1991**, 55, 2227-2233.
- Kuo L. C.; Cheng W. Y.; Wu R. Y.; Huang C.J.; Lee K. T. Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by *Bacillus subtilis natto*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2006**, 73:314–320.
- Liu, K. Soy isoflavones: Chemistry, processing effects, health benefits, and commercial production. In *Soybeans as functional foods and ingredients*, K. Liu, Ed., AOCS Press : Champaign, IL., 2004, 52–72.
- Mantovani D.; Cardozo Filho L.; Corazza M. L.; Zanin G. M.; Tazinafo M. N.; Costa S. C. Presença de isoflavonas glicosídicas em resíduo Industrial e sua bioconversão enzimática para

- transformação em compostos isoflavonas agliconas. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. **2011**, 05(02), 606-617.
- Marazza J. A.; Garro, M. S.; Giori G. S. Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. *Food Microbiology* **26**. **2009**, 333-339.
- Matsura M.; Obata, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyse daidzein and genistein. *J. Food Sci.* **1993**, 58(1), 144-147.
- Matsuura M.; Obata A.; Fukushima D. Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control. *J Food Sci.* **1989**, 54(3), 602-605.
- Matsuura, M.; Sasaki, J.; Murao, S. Studies on beta-glucosidase from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1995**, 59(9), 1623-1627.
- Morant, A. V.; Jorgensen, K.; Jorgensen, C.; Paquette, S. M.; Sanchez-Perez, R.; Moller, B. L.; Bak, S. β -glucosidase as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*. **2008**, 69, 1795-1813.
- Phimonphan C.; Thipwarin R.; Jisnuson S.; Cairns J. R. K. Hydrolysis of soybean isoflavonoid glycosides by *Dalbergia* b-glucosidases. *J Agric Food Chem.* **2007**, 55, 2407-2412.
- Ribeiro, M. L. L.; Mandarino, J. M. G.; Carrão-Panizzi, M. C.; Oliveira, M. C. N.; Campo, C. B. H.; Nepomuceno, A. L.; Ida, E. I. Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *J. Food Comp. Anal.* **2007**, 20(1), 19-24.
- Ribeiro, M. L. L.; Mandarino, J. M. G.; Carrão-Panizzi, M. C.; Oliveira, M. C. N.; Campo, C. B. H.; Nepomuceno, A. L.; Ida, E. I. β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. *J. Food Biochem.* **2006**, 30, 453-486.
- Santosh, T. R.; Balasubramanian, K. K.; Lalita, K. Enhancement of beta-glucosidase and beta-galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by exposure to the allelochemical mimosine. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 462-467.
- StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com, 2007.
- Sugano, M. Nutritional implications of soybean. In *Soy in Health and Disease Prevention*; Sugano, M., Ed., Boca Raton, FL: CRC Press, 2006; 3-16.
- Tsukamoto, C.; Shimada, S.; Igita, K.; Kudou, S.; Kokubun, M.; Okubo, K.; Kitamura, K. Factors affecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1184-1192.

Wang, H.J., Murphy. P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 166-1673.

Xue Y.; Song X.; Yu J. Overexpression of β -glucosidase from *Thermotoga maritima* for the production of highly purified aglycone isoflavones from soy flour. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 25, 2165-2172.

Yoshiara L. Y.; Madeira T. B.; Delaroza F.; Silva J. B.; Ida E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2012**. In Press. DOI: 10.3109/09637486.2012.690026.

Yoshiara, L. Y.; Madeira T. B.; Ribeiro, M. L. L.; Mandarino, J. M. G.; Carrão-Panizzi, M. C. Ida, E. I. β -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*) embryonic axis germinated in the presence or absence of light. *J. Food Biochem.* **2011**. In Press. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2011.00585.x.

Table 1. Independent variables and variation levels for the central composite design for optimization of the extraction of β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

Independent variables	Variation levels				
	-1.41	-1	0	+1	+1.41
$X_1 =$ Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	23	25	30	35	37
$X_2 =$ pH	3.6	4.0	5.0	6.0	6.4

Table 2. Independent variables and variation levels for the central composite design for optimization of the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

Independent variables	Variation levels				
	-1.41	-1	0	+1	+1.41
$X_3 =$ Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	13.9	20.0	35.0	50.0	56.2
$X_4 =$ pH	3.39	4.00	5.50	7.00	7.61

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the extraction of β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

Variation source	SS	GL	MS	F Test	P	R²
X ₁ (T°C) (linear)	0.558	1	0.558	0.659	0.428	0.94
X ₁ (T°C) (quadratic)	19.038	1	19.038	22.492	0.002	
X ₂ (pH) (linear)	62.340	1	62.340	73.650	0.000	
X ₂ (pH) (quadratic)	137.038	1	137.038	161.900	0.000	
interaction X ₁ X ₂	0.120	1	0.120	0.142	0.711	
Error	13.543	16	0.846			
Total	214.527	21				

SS = Sum square. DF = Degrees of freedom. MS = Mean square. T°C = temperature in °C.

Table 4. Central composite design with two coded (x_1 e x_2) and decoded (X_1 e X_2) variables and the response function (Y) for extracted β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

Assays	Coded Variables		Decoded Variable		Response Function (Y)
	x_1	x_2	T(°C) (X_1)	pH (X_2)	β -glucosidase activity (UA mL ⁻¹)
	1	-1	-1	25.0	4.0
2	-1	1	25.0	6.0	17.66
3	1	-1	35.0	4.0	6.22
4	1	1	35.0	6.0	16.72
5	0	0	30.0	5.0	22.36
6	0	0	30.0	5.0	22.98
7	0	0	30.0	5.0	22.98
8	-1.41	0	23.0	5.0	16.52
9	1.41	0	37.0	5.0	20.66
10	0	-1.41	30.0	3.6	5.76
11	0	1.41	30.0	6.4	13.94

Table 5. Validation of the model proposed for the extraction of β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

Optimum	Y_{Calculated}¹	Y_{Observed}¹
X ₁ = 30°C e	11.39 ^a	11.32 ± 0.21 ^a
X ₂ = pH 5.0		

The same letters in the same line indicate results included in the confidence interval of the generated model; ¹Activity of β -glucosidase expressed as UA min⁻¹. The value of **Y_{Calculated}** was obtained from Equation 1.

Table 6: Analysis of variance (ANOVA) for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

Variation source	SS	DF	MS	F test	P	R²
Block	22.050	1	22.050	0.17864	0.683680	0.86
(X ₄) pH (Linear)	4217.201	1	4217.201	34.16513	0.000385	
(X ₄) pH (Quadratic)	872.759	1	872.759	7.07055	0.028848	
(X ₃) T°C (Quadratic)	1328.402	1	1328.402	10.76189	0.011179	
Error	987.486	8	123.436			
Total	7231.600	12				

SS = Sum square. DF = Degrees of freedom. MS = Mean square. T°C = temperature in °C.

Table 7. Central composite design with 2 coded (x_3 e x_4) and decoded (X_3 e X_4) variables and the response function (W) for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

Assays	Block	Coded		Decoded		Response function
		Variables		Variables		(W)
		x_3	x_4	T(°C) (X_3)	pH (X_4)	% Aglycones*
1	1	-1	-1	20.0	4.00	47.5
2	1	+1	-1	50.0	4.00	44.6
3	1	-1	+1	20.0	7.00	68.6
4	1	+1	+1	50.0	7.00	84.0
5 (c)	1	0	0	35.0	5.50	88.6
6 (c)	1	0	0	35.0	5.50	79.0
7 (c)	1	0	0	35.0	5.50	88.6
8	2	0	-1.41	35.0	3.39	11.6
9	2	0	+1.41	35.0	7.61	98.7
10	2	-1.41	0	13.9	5.50	48.6
11	2	+1.41	0	56.2	5.50	47.1
12 (c)	2	0	0	35.0	5.50	85.0
13 (c)	2	0	0	35.0	5.50	88.3

*% aglycone isoflavones relative to total isoflavones extracted, determined by ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC).

Table 8. Validation of the mathematical model for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

Optimum	Z_{Calculated}¹	Z_{Observed}¹
X ₃ = 35°C e	91.98 ^a	89.94 ± 0.59 ^a
X ₄ = pH 7.61		

The same letters in the same line indicate results included in the confidence interval of the generated model; ¹% Aglycones. The value of **Z_{Calculated}** was obtained from Equation 2.

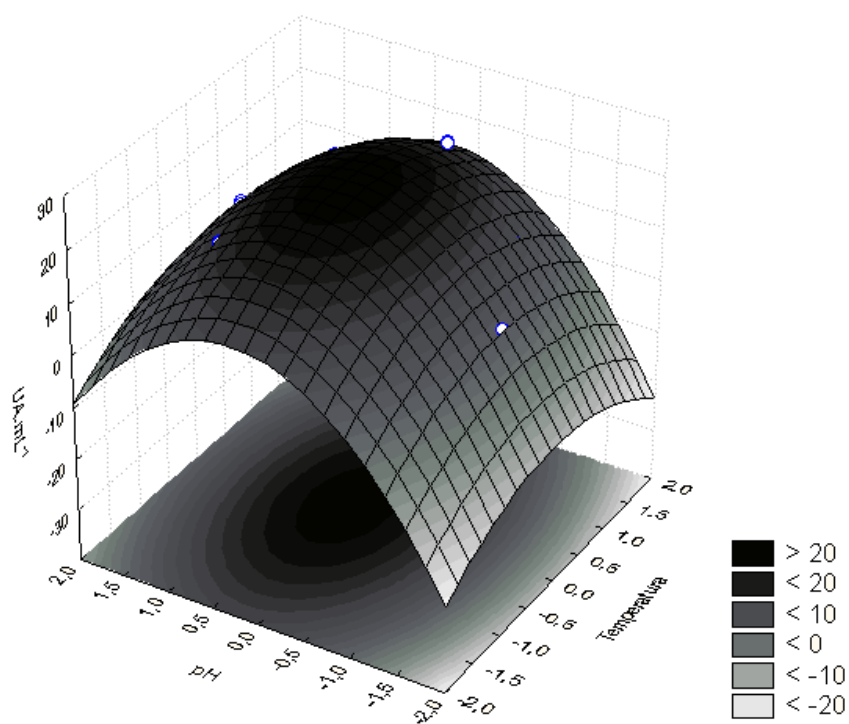


Figure 1. Surface response for β -glucosidase extraction (UA mL⁻¹) from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

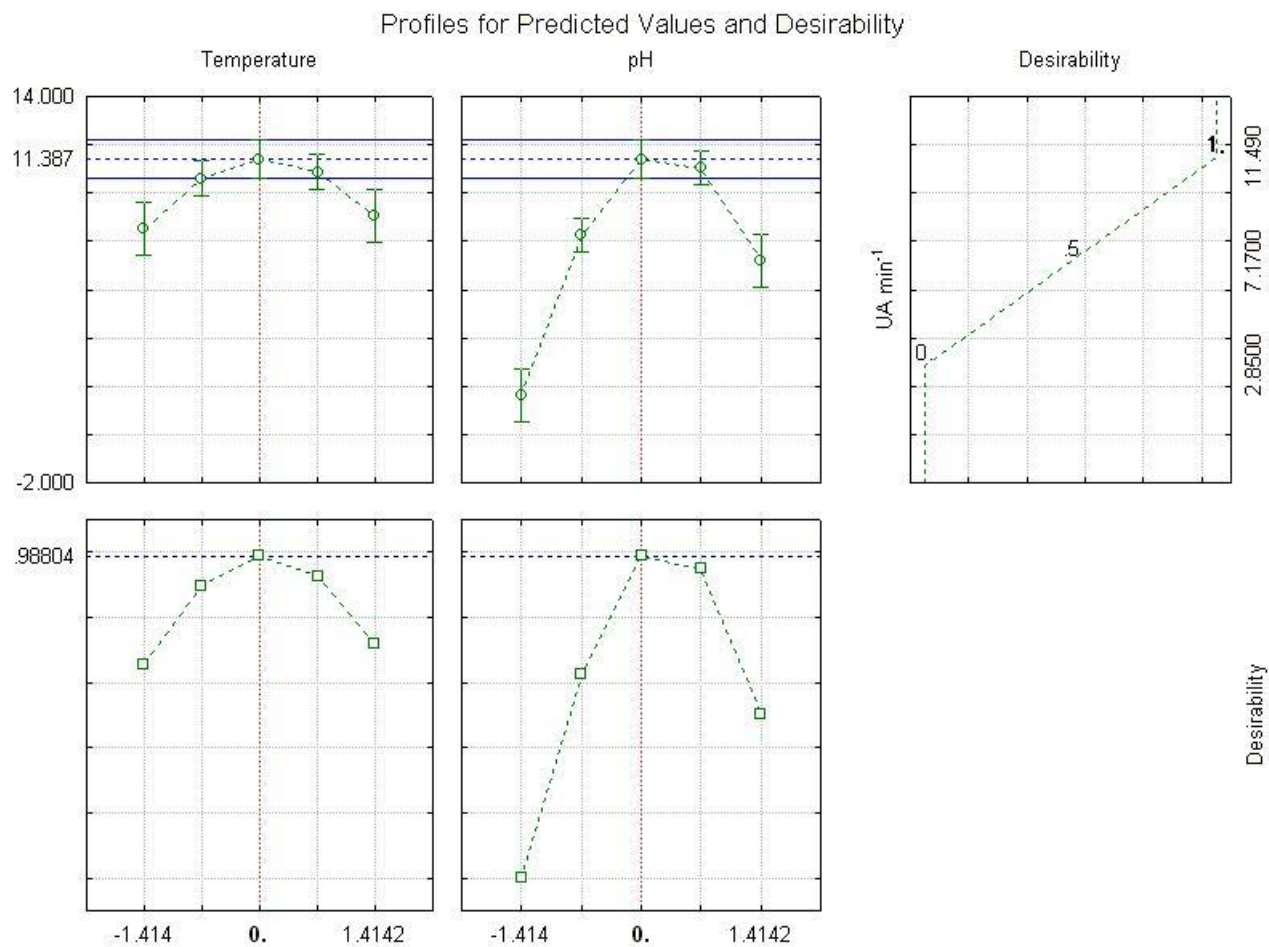


Figure 2: Profiles for predicted values and desirability for β -glucosidase extraction from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

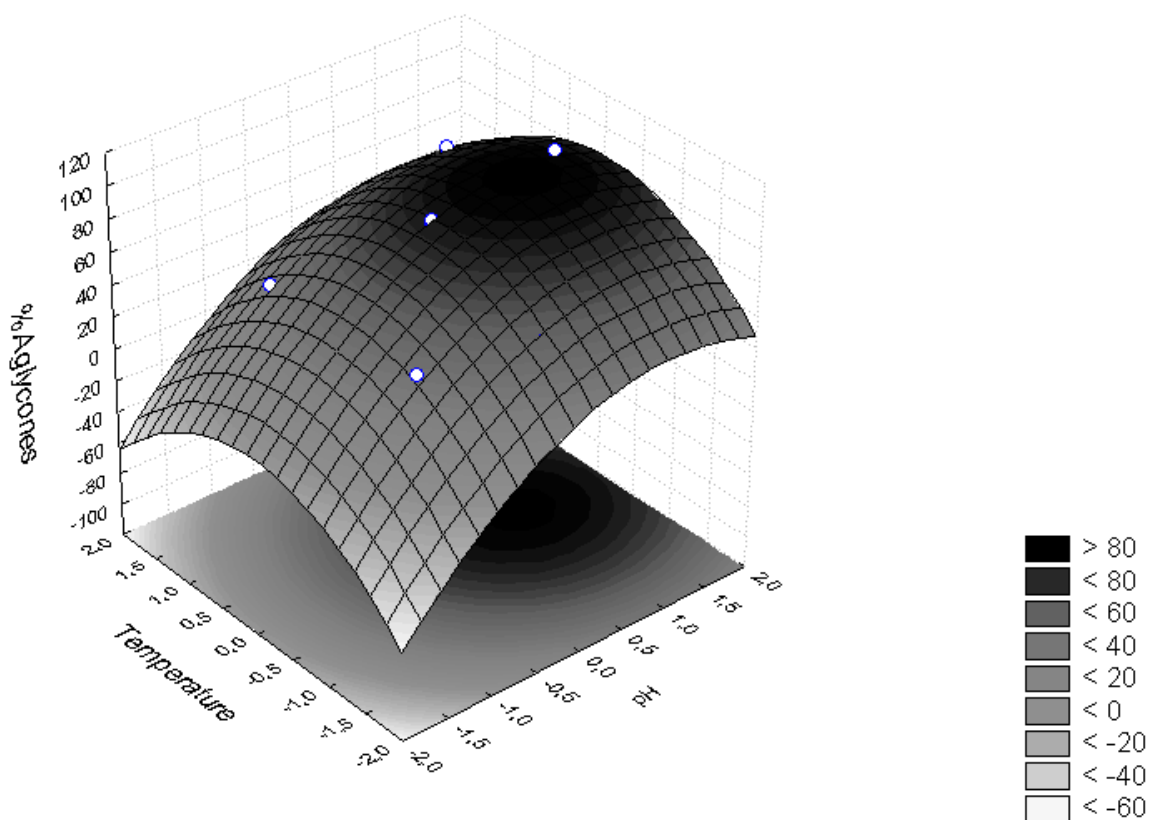


Figure 3. Surface response for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

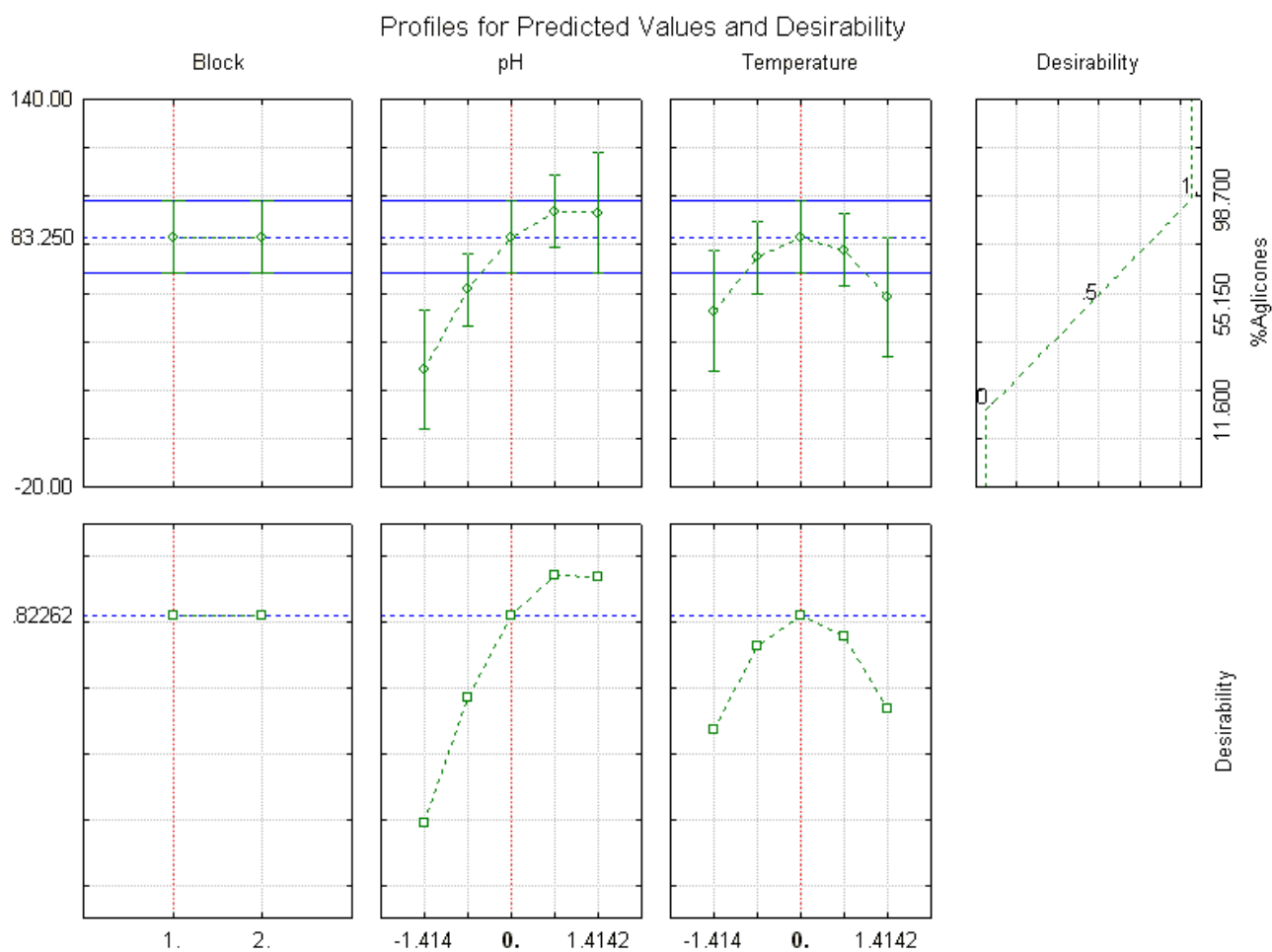


Figure 4. Profiles for predicted values and desirability for the conversion of glycosidic isoflavones to aglycones in defatted soybean cotyledon flour using β -glucosidase from epicotyls from soybeans germinated for 144 h in the presence of light.

5.4. ARTIGO CIENTÍFICO4

OPTIMIZATION OF SOY ISOFLAVONE EXTRACTION WITH DIFFERENT SOLVENTS USING THE SIMPLEX-CENTROID MIXTURE DESIGN

YOSHIARA, LUCIANE YURI; MADEIRA, TIAGO BERNELIERI; DELAROZA, FERNANDA; DA SILVA, JOSEMEYRE BONIFÁCIO; IDA, ELZA IOUKO.

Situação: Publicado on-line em 24 de maio de 2012. International Journal of Food Sciences and Nutrition

DOI: 10.3109/09637486.2012.690026

Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design

YOSHIARA, LUCIANE YURI¹; MADEIRA, TIAGO BERVELIERI¹; DELAROZA, FERNANDA¹; DA SILVA, JOSEMEYRE BONIFÁCIO¹; IDA, ELZA IOUKO^{1*}.

¹Department of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, CEP 86051-980, Londrina – Paraná - Brazil. Tel.: +55(43)3371-4080. *E-mail: elida@uel.br

Keywords: *soybean, solvent extraction, response surface methodology, HPLC*

Abstract

The objective of this study was to optimize the extraction of different isoflavone forms (glycosidic, malonyl-glycosidic, aglycone and total) from defatted cotyledon soy flour using the simplex-centroid experimental design with four solvents of varying polarity (water, acetone, ethanol and acetonitrile). The obtained extracts were then analyzed by high-performance liquid chromatography. The profile of the different soy isoflavones forms varied with different extractions solvents. Varying the solvent or mixture used, the extraction of different isoflavones was optimized using the centroid-simplex mixture design. The special cubic model best fitted to the four solvents and its combination for soy isoflavones extraction. For glycosidic isoflavones extraction, the polar ternary mixture (water, acetone and acetonitrile) achieved the best extraction; malonyl-glycosidic forms were better extracted with mixtures of water, acetone and ethanol. Aglycone isoflavones, water and acetone mixture were best extracted and total isoflavones, the best solvents were ternary mixture of water, acetone and ethanol.

Introduction

Several studies have been published that confirm the association between the biological properties of soy isoflavones and risk reduction or prevention of various diseases, such as breast cancer (Sarkar and Li, 2003) and prostate cancer (Lund et al., 2004), osteoporosis (Arjmandi, Alekel, Holis and Amin, 1996), menopause symptoms (Messina and Hughes, 2003, Haron et al., 2011) and cardiovascular disease (Zhuo, Melby and Watanabe, 2004). Besides the benefits of isoflavones for women, studies have shown benefits for men with no effects on fertility (Celec et al., 2007). These biological properties are most prominent when isoflavones are present in the aglycone form (Liggins et al., 2000).

Soybeans are the only edible plant source of high levels of isoflavones, and the distribution and content of different isoflavones are influenced by multiple factors, such as genetics variety, growth location and crop year (Wang and Murphy, 1994). The isoflavones content of 18 soybean cultivars from different maturity groups ranges from 71.11 to 174.30 mg/100 g (Ribeiro et al., 2007). Isoflavones content varies across the soybean seed components: the coat has almost no isoflavones; hypocotyls have high concentrations; and cotyledons have 80-90% of the total isoflavones in the seed (Tsukamoto et al., 1995). Soy isoflavones are found in different chemical forms, namely, aglycones (genistein, daidzein and glicitein), β -glycosidic (genistin, daidzin and glicitin), malonyl-glycosidic (malonylgenistin, malonyldaidzin and malonylglicitin) and acetyl-glycosidic (acetylgenistin, acetyldaidzin and acetylglicitin); there are twelve different isoflavone forms in all (Liu, 2004).

These twelve free and conjugated isoflavone forms have been extracted, separated and quantified from different soybean samples and products. However, the development of a method to optimize extraction has been challenging, due to the wide polarity range of these isoflavones (Luthria, Biswas and Natarajan, 2007).

Extraction of isoflavones is performed under different conditions, and the different analytical methods used in these studies significantly influences isoflavone content results. Hutabarat, Greenfield and Mollholland (2001) showed that isoflavones were optimally extracted with polar solvents. Rostagno, Palma and Barroso (2004) compared the extraction efficiency of different ethanol and methanol mixtures in water and concluded that optimal extraction of isoflavones was achieved with ethanol in water. Lin and Giusti (2005) concluded that optimal extraction of isoflavones was achieved with 58% non-acidified acetonitrile. However, Luthria, Biswas and Natarajan (2007) investigated four previously optimized mixtures and three new solvent mixtures for the extraction of soy isoflavones using different extraction devices and observed that both the content and profile of isoflavones varied significantly with the extraction conditions and solvent. The best extraction solvent was dimethyl sulfoxide:ethanol:water (1:14:5, v/v/v) using a pressurized liquid extraction device. Genovese and Lajolo (2001) concluded that the best solvent for isoflavone extraction was 80% methanol when compared to 70% methanol, 60% and 80% acetonitrile with HCl 0.1N and water. Nevertheless, Griffith and Collison (2001), determined that 80% acetonitrile showed to be more efficient than 80% methanol.

After the extraction of isoflavones with different solvents, HPLC is the most widely used technique for separation and quantification of the twelve isoflavone forms due to its high efficiency, sensitivity, speed and ability to use automated systems (Zafra-Gomez, Garballo, García-Alyuso and Morales, 2010). However, ultra-performance liquid chromatography (UPLC[®] or UHPLC) is a more advanced technique for the separation and quantification of isoflavones, due to its speed and use of fewer samples and solvents than HPLC (Fletcher, Raba, Jungmayr and Mayer, 2010).

The results of these studies about the best composition for isoflavone extraction have not been conclusive, and it is essential to determine an appropriate solvent composition that

optimizes the extraction of the different isoflavone forms and quantifies their levels with greater precision and reproducibility.

The extraction of soy isoflavones with different solvent mixtures can be optimized using experimental models with a reduced number of assays. Thus, the simplex-centroid mixture design can be useful for this purpose. According to Cornell (1990), in experiments with mixtures, the q number of components (x_i) that compose the mixture are the independent variables such that $\sum x_i = 1$. The coordinate system used for x_i values ($i = 1, 2, 3 \dots q$) is called simplex, and the geometric description of the spatial representation will depend on the q number of components (x_i), which may assume a line for $q = 2$, an equilateral triangle for $q = 3$, or a tetrahedron for $q = 4$. The mixtures used are the points located in the vertices and in the middle of the edges, where each point represents a combination of equal parts of the mixture's components. When designing mixtures with four components, the central point is included in the spatial center of the polygon to fit a special cubic model with a relatively low number of experiments. Mixture responses are determined by the ratio assumed between components and not by the amount of each component (Cornell, 1990; Calado and Montgomery, 2003).

The response surface analysis (RSA), first proposed by Box and Wilson (1951), enables evaluation of the effects of two or three factors and their interaction on response functions. According to Barros-Neto, Scarminio and Bruns (2003), RSA enables the development, improvement and optimization of processes, including methodologies for the extraction and analysis of food components.

Thus, the objective of this study was to optimize the extraction of different soy isoflavone forms using the simplex-centroid experimental design with four solvents of varying polarity and to quantify these isoflavones by HPLC.

Material and methods

Reagents

For sample preparation, all reagents used were analytical-grade and were obtained from different sources. For HPLC extraction and analysis, the reagents were HPLC-grade and the glucosides and aglicones isoflavones standards were purchased from Sigma-Aldrich®.

Sample preparation

Soybeans (BRS 257 cultivar) were provided by the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, National Soybean Research Center (EMBRAPA Soybean). Soybeans were processed into flour using a knife mill (Ika, model A-11), and the flour was defatted with hexane for 30 min at room temperature.

Simplex-centroid design for extraction of isoflavones

The simplex-centroid design was used to optimize the extraction of soy isoflavones (Scheffé, 1963) with four solvents of varying polarities: (1) water, (2) acetone, (3) ethanol and (4) acetonitrile in fifteen different mixtures (Figure 1). Points 1, 2, 3 and 4 (vertices) of the tetrahedron correspond to pure solvents (water, acetone, ethanol, and acetonitrile, respectively). Points 5, 6, 7, 8, 9 and 10 (edges) are equal volume mixtures of the solvents. Points 11, 12, 13 and 14 (the center of each face) are ternary mixtures of the solvents, and finally, point 15 (center) corresponds to the equal volume mixture of the four solvents.

The extraction of isoflavones was performed using 500 mg of defatted soy flour and 25 mL of each extraction solvent (Figure 1). The extraction was carried out in an ultrasonic bath at 60°C for 10 min (Rostagno, Palma and Barroso, 2003) followed by centrifugation and filtration (Millex-LH filters; 0.20 µm) of the supernatant. The content of the different soy isoflavone

forms extracted from filtrates (response functions y_i) was analyzed by HPLC, as described above, and was expressed as mg/g of sample on a dry-matter basis.

In total, 15 assays were conducted, and the response functions (y_1 , y_2 , y_3 and y_4) obtained were analyzed using Statistica 8.0 software (StatSoft Inc., 2007). The canonical model of Scheffé (1963) (Equation 1) was adjusted to the experimental data and linear, quadratic and special cubic models were tested to obtain the respective regression coefficients.

$$y_i = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i<j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j + \sum_{i<j}^q \sum_{j<k}^q \sum_k^q b_{ijk}^* x_i x_j x_k + \dots + b_{12\dots q}^* x_1 x_2 \dots x_q \quad (1)$$

Where y_i is the response function of the observed data, b_i is the coefficient estimated by the least-squares method and x_i is the dependent variable with $1 > x_i > 0$ and $\sum = 1.0$.

Response surface graphs and desirability parameters were generated for each response function investigated to optimize the extraction of soy isoflavones. The analysis of variance (ANOVA) of the regressions and the coefficients of determination (R^2) were used to compare the fit of the models against the experimental data. The repetitions provided the degrees of freedom to calculate the pure error and subsequently the lack of fit test. All analyses were performed and all graphs were created using STATISTICA 8.0 software (StatSoft Inc. 2007).

For evaluation of the model, a new extraction assay was performed with the best extraction mixture for each isoflavone form to evaluate and validate the mathematical model. The calculated (\hat{y}_n) and observed (y_n) values were determined using STATISTICA 8.0 software (StatSoft Inc., 2007), and the results were compared using a t-test at a 5% significance level.

Determination of soy isoflavone content by HPLC

The separation and quantification of isoflavones from defatted soy flour were performed using HPLC according to the methodology described by Berhow (2002) with modifications. A chromatograph (Shimadzu, model LC-10AT VP; Kyoto, Japan), an oven (CTO-10AS VP), a semi-automatic sample applicator and an ODS C18-type reverse phase column (Shimadzu, 4 mm x 15 cm, 5 μ m particles) were used. Twenty microliters of each filtered sample were injected. A linear gradient system with an initial phase of 100% acidified water with glacial acetic acid up to pH 3.0 and 0% acetonitrile was used for elution and separation of the isoflavones. After 25 min of elution, the acetonitrile/water solution reached a 55/45% ratio. After 27 min, the gradient reached 100% acetonitrile, and after 35 min, the gradient returned to initial conditions. Total run time was 40 min. The flow rate of the mobile phase was 1 ml/min, and the run temperature was kept constant at 25°C. A diode array detector (Shimadzu, model SPD-M20A) with the wavelength set at 260 nm was used.

Identification and quantification of the glycosidic and aglycone isoflavones was performed by comparison to individual external standard curves for daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glicitein and genistein. Standards curves were obtained by plotting the standard concentration as a function of peak area obtained from HPLC analysis of 20 μ l injections. The concentrations of standard solutions were carefully chosen to cover possible isoflavone contents. For isoflavones without pure standard, the standard curves were adjusted based on differences in molecular weight. The quantification of malonyl-glycosidic isoflavones (malonyl daidzin, malonyl glycitin and malonyl genistin) were calculated based on the standard curves of the corresponding β -glycosidic isoflavones (daidzin, glycitin, genistin, respectively) using the similarity of the extinction coefficients as described by Coward, Smith, Kirk and Barnes (1998). The results for isoflavones can be presented in aglycone equivalents or as the sum of the different forms (Klump, Allred, Macdonald and Ballam, 2001). In the present work, glycosidics, malonyl-glycosidics and aglycones are shown as the

sum of each compound within each group of isoflavones, determined in triplicate, and the results are expressed as mg/g on a dry-matter basis.

The following parameters were determined to evaluate the performance of the isoflavone quantification method by HPLC using the optimized extraction system: accuracy, precision, detection limit and quantification limit.

Both the detection limit (DL) and quantitation (QL) of six isoflavones standards were determined based on a method described by the International Conference on Harmonization - ICH (1996) with some modifications. Six concentrations (0,1 to 0,003 mg/ml) of each isoflavone standard were prepared and five injections performed for each concentration. Five calibration curves were obtained by plotting concentration against area. The mean of the slopes (s) and standard deviations (σ) of the intercepts of the calibration curves were calculated. Both DL and QL were obtained using the following formula:

$$DL = 3.3 \times \sigma/s \quad (2)$$

$$QL = 10 \times \sigma/s \quad (3)$$

The precision and accuracy were determined as recommended by ICH (1996). Based on five calibrations curves with six known concentrations, the precision and the accuracy was calculated and presented as coefficient of variation (%CV) and % recovery, respectively.

Results and Discussion

Optimization of soy isoflavone extraction

The models of equations y_1 , y_2 , y_3 and y_4 from the mean values of the glycosidic (y_1), malonyl-glycosidic (y_2), aglycone (y_3) and total (y_4) forms extracted from defatted soy (Table I) were determined in the fifteen assays using the simplex-centroid mixture design (Figure 1). The special cubic model best fit the four response functions analyzed (Table II).

Response functions are expressed as mean values of glycosidic (y_1), malonyl-glycosidic (y_2), aglycone (y_3) and total (y_4) isoflavone forms in defatted soy flour. Response functions y_1 , y_2 and y_4 showed lack of fit significant (Table III), but the mean square of the pure error was low (0.044-0.436), suggesting that the model can be used with caution. The significant lack of fit should not be considered relevant when the mean square of the pure error is low (Box and Draper, 1987), because the total residue of the model is decomposed into pure error and lack of fit (Barros-Neto, Scarminio and Bruns, 2003). Response function y_3 did not show a significant lack of fit, suggesting that the model adequately fit the experimental data. The high coefficients of determination (R^2), which were above 0.96 (Table II), indicate that all response functions adequately fit the experimental data, and the models can be used for predictive purposes in the extraction of different isoflavone forms using different solvent mixtures.

For glycosidic isoflavones, the quadratic terms x_1x_2 , x_1x_3 , and x_1x_4 and the polynomial term $x_1x_2x_4$ were significant, while the linear terms x_1 , x_2 , x_3 , and x_4 and the polynomial terms $x_1x_2x_3$, $x_1x_3x_4$, and $x_2x_3x_4$ were not significant but contributed to the fit of the model and were therefore kept in the equation (Equation 4). The other terms were excluded.

$$y_1 = 0.7603x_1 + 0.2848x_2 + 0.3248x_3 + 0.6368x_4 + 5.8988x_1x_2^* + 10.0188x_1x_3^* + 6.5148x_1x_4^* + 8.4747x_1x_2x_3 + 37.7787x_1x_2x_4^* - 18.4113x_1x_2x_4 + 2.5295x_2x_3x_4(4)$$

Where y_1 is expressed in mg/g of glycosidic isoflavones, *Significant ($p < 0.05$), x_1 is water, x_2 is acetone, x_3 is ethanol and x_4 is acetonitrile.

The polar ternary mixture consisting of water (x_1), acetone (x_2) and acetonitrile (x_4) in a 1:1:1 ratio ($x_1:x_2:x_4$) achieved the best extraction (Table I) and yielded a \hat{y}_1 value of 3.60 mg/g of glycosidic isoflavones extracted (Equation 4). The \hat{y}_1 value was close to the observed y_1 (3.60 mg/g of glycosidic isoflavones, assay twelve) (daidzin, genistin and glicitin),

confirming that this solvent was the most efficient. However, when using pure acetone (x_2), which is less polar, the \hat{y}_1 was 0.28 mg/g glycosidic isoflavones. Thus, the extraction was less efficient when the \hat{y}_1 was compared to the observed y_1 (0.18 mg/g glycosidic isoflavones, assay two). Luthria et al. (2007) achieved the best extraction of glycosidic soy isoflavones when using ethanol:water (9:1, v/v).

For malonyl-glycosidic isoflavones (y_2), the linear, quadratic and special cubic models were statistically significant, but special cubic model achieved the highest R^2 (0.987). In this model, linear terms x_1 and x_3 , quadratic terms x_1x_3 and x_1x_4 and polynomial terms $x_1x_2x_3$ and $x_1x_2x_4$ were significant, while terms x_1 , x_3 , x_1x_2 and $x_1x_3x_4$ were not significant but contributed to the fit of the model, and therefore they were kept in Equation 5.

$$y_2 = 4.7378x_1^* - 0.1183x_2 + 1.3057x_3^* - 0.0102x_4 + 2.6715x_1x_2 + 11.8235x_1x_3^* + 12.8155x_1x_4^* + 55.7509x_1x_2x_3^* + 57.5989x_1x_2x_4^* + 14.3569x_1x_3x_4 \quad (5)$$

Where y_2 is expressed in mg/g of malonyl-glycosidic isoflavones, *Significant ($p < 0.05$), x_1 is water, x_2 is acetone, x_3 is ethanol and x_4 is acetonitrile.

The best extraction was achieved with mixtures of water (x_1), acetone (x_2) and ethanol (x_3) or water (x_1) and ethanol (x_3). The \hat{y}_2 of malonyl-glycosidic forms (malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglicitin) was 5.54 and 5.98 mg/g of malonyl-glycosidic isoflavones extracted, respectively. The \hat{y}_2 was close to the observed y_2 (assays eleven and six) of 5.98 and 5.88 mg/g, respectively, and therefore these extraction mixtures were the most efficient for the extraction of malonyl-glycosidic forms. When using pure acetone (x_2) or the binary mixture of acetone (x_2) and acetonitrile (x_4), the \hat{y}_2 was 0.00 mg/g of malonyl-glycosidic isoflavones, while the observed y_2 (assays two and nine) was 0.00 and 0.00 mg/g of malonyl-glycosidic isoflavones, respectively. Thus, the binary mixture of acetone (x_2) and acetonitrile (x_4) or pure acetone (x_2) are not recommended for the extraction of malonyl-glycosidic forms. Nevertheless, Kao and Chen (2002) obtained different results and observed

that the optimal extraction of isoflavones from defatted soy flour was achieved with the mixture of acetone and 0.1M HCl and agitation for 2 h.

For the extraction of aglycone isoflavones (y_3), some terms were excluded for the best fit of the special cubic model ($R^2 = 0.980$), and the significant terms were x_1 (linear), x_1x_2 (quadratic) and $x_1x_2x_3$ (polynomial). The other terms were not significant but contributed to the fit of the model, and therefore they were kept in Equation 6.

$$y_3 = 0.9046x_1^* + 0.0944x_2 + 0.0824x_3^* + 0.0523x_4 + 10.2138x_1x_2^* - 0.9622x_1x_3 - 1.3018x_1x_4 - 0.0218x_2x_3 + 14.5506x_1x_2x_3 - 32.5544x_1x_2x_4^* + 3.5116x_1x_3x_4 - 3.7534x_2x_3x_4(6)$$

Where y_3 is expressed in mg/g of aglycone isoflavones, *Significant ($p < 0.05$), x_1 is water, x_2 is acetone, x_3 is ethanol and x_4 is acetonitrile.

Aglycone isoflavones (y_3) (daidzein, genistein and glicitein) are less polar than other isoflavones and were best extracted using a water-acetone mixture. The \hat{y}_3 obtained from this mixture was 3.05 mg/g of aglycone isoflavones, which was close to the observed value in assay 5 (3.01 mg/g). Therefore, this mixture was the most efficient for the extraction of aglycone isoflavones. When using the mixture of acetone (x_2) and acetonitrile (x_4), the estimated \hat{y}_3 was 0.07 mg/g, and the observed y_3 was 0.01 mg/g of aglycone isoflavones extracted. Thus, the mixture of acetone (x_2) and acetonitrile (x_4) is not recommended for extraction of aglycones. Lin and Giusti (2005) used the mixture of acetonitrile and water (58:42, v/v) and achieved better results than with 80% methanol, which is a solvent of intermediate polarity.

For the extraction of total isoflavones (y_4), the best fit was achieved with the special cubic model ($R^2 = 0.977$). Quadratic terms x_1x_2 , x_1x_3 , and x_1x_4 , linear term x_1 and polynomial terms $x_1x_2x_4$ and $x_2x_3x_4$ were significant (Equation 7). Similar to the model proposed for

extraction of malonyl-glycosidic isoflavones (y_2), several terms were also excluded, and non-significant terms that contributed to the fit of the model were kept in the equation.

$$y_4 = 6.4127x_1^* + 0.2924x_2 + 1.7493x_3 + 0.7093x_4 + 18.6675x_1x_2^* + 20.7317x_1x_3^* + 17.9317x_1x_4^* + 79.5773x_1x_2x_3 + 63.5873x_1x_2x_4 - 7.3944x_2x_3x_4(7)$$

Where y_4 is expressed in mg/g of total isoflavones, *Significant ($p < 0.05$), x_1 is water, x_2 is acetone, x_3 is ethanol and x_4 is acetonitrile.

The best extraction solvents for total isoflavones (y_4) were the ternary mixtures of water (x_1), acetone (x_2) and ethanol (x_3) (assay 11), or water (x_1), acetone (x_2) and acetonitrile (x_4) (assay 12). The \hat{y}_4 was 10.70 mg/g with extractions of 10.85 mg/g (assay 11) and 9.60 mg/g (assay 12). According to Luthria, Biswas and Natarajan (2007), the extraction profile of total soy isoflavones determined by HPLC varied significantly when the extraction was performed with different solvents and methods, and the best extraction was achieved with dimethyl sulfoxide:ethanol:water (5:75:25, v/v/v) using the pressurized liquid extraction method.

The analysis of the equations, response surface graphs (Figure 2) and desirability parameters (Figure 3) for optimizing the extraction of isoflavones showed that glycosidic forms (y_1) were best extracted with the ternary mixture of water (x_1), acetone (x_2) and acetonitrile (x_4) (2:1:1, $x_1:x_2:x_4$). Conversely, malonyl-glycosidic (y_2) and total (y_4) isoflavones were best extracted using a mixture of water (x_1), acetone (x_2) and ethanol (x_3) at (2:1:1, $x_1:x_2:x_3$). Moreover, aglycone forms (y_3) were best extracted by less polar mixtures such as water (x_1) and acetone (x_2) (1:1, $x_1:x_2$). All ratios determined by the desirability parameters (Figure 3) were similar to those predicted experimentally in assays 12, 11 and 5, respectively (Table I).

Thus, Figure 3 shows the following optimal ranges for the different extraction solvents of soy isoflavones: 25-50% water, acetone or acetonitrile for glycosidic isoflavones (Figure 3, y_1); 50-75% water, 0-25% acetone and 25-50% ethanol for malonyl-glycosidic forms (Figure 3, y_2); 25-75% water or acetone for aglycone forms (Figure 3, y_3); and 25-75% water, 25-50% acetone and 0-50% ethanol for total isoflavones (Figure 3, y_4).

In this study, the extraction of isoflavones from defatted soy flour using pure organic solvents (ethanol, acetone and acetonitrile) was not efficient, suggesting that the use of these extraction solvents in binary or ternary mixtures with water could be more advantageous. Griffith and Collison (2001) used 50% acetonitrile, 80% methanol and 60% acidified acetonitrile aqueous solutions to optimize the extraction of soy isoflavones, and optimal results were achieved with 60% acidified acetonitrile. Thus, the best solvents for the extraction of different soy isoflavone forms were mixtures with water at 50% v/v or less (assays 5, 6, 7, 11, 12, 13 and 15), as also noted in \hat{y}_1 , \hat{y}_2 , \hat{y}_3 and \hat{y}_4 .

Genovese and Lajolo (2001) evaluated four solvent mixtures (70% and 80% methanol, 70% and 80% acetonitrile) for the extraction of isoflavones in soy products and observed that the most efficient and practical solvent was the 80% methanol aqueous solution. Nevertheless, several studies have used only methanol for the extraction of soy isoflavones (Genovese, Pinto, Barbosa and Lajolo, 2003; Harjo, et al. 2007) or an extraction with acidified acetonitrile followed by resuspension in methanol (Alejandro, et al., 2008) or through extraction with only ethanol (Horii et al. 2009, Kao, Chieng and Chen, 2008). These extraction methods using one solvent followed by drying and resuspension in another solvent are time-consuming and lead to variations in results.

In this study, the best solvents for the extraction of different soy isoflavone forms were mixtures with water at 50% v/v or less (assays 5, 6, 7, 11, 12, 13 and 15), as also noted in \hat{y}_1 , \hat{y}_2 , \hat{y}_3 and \hat{y}_4 .

Evaluation of the model

The assays where the best extraction was achieved, i.e., the optimal extraction points for each isoflavone form were determined, were repeated experimentally to validate the proposed mathematical model. The results for the content of glycosidic, malonyl-glycosidic, aglycone and total isoflavone forms, both calculated and experimental, showed no significant differences (Table IV), which validates the proposed mathematical model.

Performance of the isoflavone quantification method by HPLC

Detection limits (DL) for isoflavones ranged from 0.000082 mg/ml for daidzein to 0.000546 mg/ml for glicitein, while quantification limits (QL) ranged from 0.000249 mg/ml for daidzein to 0.001653 mg/ml for glicitein. The coefficients of variation ranged from 0.45 to 13.58% for accuracy and from 0.73 to 23.12% for precision of the method (Table V). The method also exhibited high recovery rates (100.89-105.99%) (Table VI). These values are higher than the ones reported by Kao and Chen (2006), who proposed an improved methodology for the determination of isoflavones in soy flour by HPLC, with recovery rates ranging from 57.4 to 85.9%.

Conclusions

The extraction of the different isoflavone forms was optimized using special cubic models that best fit the experimental data. The profiles of the different soy isoflavone forms varied with different extraction solvents. The malonyl-glycosidic and total forms are more polar and therefore were best extracted with water:acetone:ethanol(2:1:1). Glycosidic isoflavones, which have intermediate polarity, were best extracted with water, acetone and acetonitrile (2:1:1), and the less polar aglycone forms were optimally extracted with water and acetone (1:1).

Acknowledgments

This work was partially funded by CNPq/MCT and Fundação Araucária/PR. LYY would like to thank CNPq for a graduate scholarship, and EII is a CNPq Research Fellow.

Declaration of interest: This Research was partially funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - "National Council of Technological and Scientific Development", CNPq, Brazil and Fundação Araucária/PR. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Alezandro MR, Almeida SA, Maia PP, Carvalho HA, Azevedo L, Vieira EP. (2008). Soja transgênica BRS243 RR: determinação de macronutrientes e das isoflavonas daidzeína e genisteína por CLAE. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28: 520-526.
- Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Cuo P, Kukreja SC. (1996). Dietary, soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126: 161-167.
- Barros-Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. (2003). *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas: Editora Unicamp.
- Berhow MA. (2002). Modern analytical techniques for flavonoid determination: Flavonoids in the living cell. v. 505 (B.S. Buslig; J.A.E. Manthey, eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, 61-76.
- Box GEP, Draper NR. (1987). *Empirical Model Building and Response Surfaces*, John Wiley & Sons, New York, NY.

- Box GEP, Wilson KB. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *J Roy Stat Soc B Met* 13:1-45.
- Calado V, Montgomery D. (2003). *Planejamento de experimentos usando o Statistica*. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais.
- Celec P, Ostatníková D, Hodosy J, Putz Z, Kúdela M. (2007). Increased one week soybean consumption affects spatial abilities but not sex hormone status in men. *Int J Food Sci Nutr* 58:424-428.
- Cornell JA. (1990). *Experiments with mixtures: Designs, models and the analysis of mixtures data*. Wiley, New York, 2nd ed.
- Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr* 68:1486S-1491S.
- Fletcher G, Raba B, Jungmayr A, Mayer HK. (2010). Characterization of isoflavone composition in soy-based nutritional supplements via ultra performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 672:72-78.
- Genovese MI, Lajolo FM. (2001). Determinação de isoflavonas em derivados de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21: 86-9.
- Genovese MI, Pinto MS; Barbosa ACL, Lajolo FM. (2003). Avaliação do teor de isoflavonas de suplementos nutricionais à base de soja. *Rev Bras Ciênc Farm* 39:159-167.
- Griffith AP, Collison MW. (2001). Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reverse-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 913: 397-413.
- Harjo B, Wibowo C, Zhang EJM, Luo KQ, Ng KM. (2007). Development of Process Alternatives for Separation and Purification of Isoflavones. *Ind Eng Chem Res* 46:181-189.

Haron H, Ismail A, Shahar S, Azlan A, Peng LS. (2011). Apparent bioavailability of isoflavones in urinary excretions of postmenopausal Malay women consuming tempeh compared with milk. *Int J Food Sci Nutr* 62:642-650.

Horii K, Adachi T, Matsuda T, Tanaka T, Sahara H, Shibasaki S, Ogino C, Hata Y, Ueda M, Kondo A. (2009). Improvement of isoflavone aglycones production using β -glucosidase secretory produced in recombinant *Aspergillus oryzae*. *J Mol Catal B-Enzym* 59:297-301.

Hutabarat LS, Greenfield H, Mollholland M. (2001). Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybean products from Australia and Indonesia. *J Food Comp Anal* 14:43-58.

International Conference on Harmonization [ICH] – Guideline on the validation of analytical procedures: Methodology Q2B. (1996). Minister of Public Works and Government Services Canada.

Kao TH, Chen BH. (2002). An improved method for determination of isoflavones in soybean powder by liquid chromatography. *Chromatographia* 56:423-430.

Kao TH, Chieng JT, Chen BH. (2008). Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide. *Food Chem* 107:1728-1736.

Kao, TH, Chen, BH. (2006). Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54:7544-7555.

Klejdus B, Mikelová R, Adam V, Zehnálek J, Vacek J, Kizek R, Kubáň V. (2004). Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of genistin and daidzin in soybean food samples after accelerated solvent extraction with modified content of extraction cell, *Anal Chim Acta* 517:1-11.

Klump SP, Allred MC, Macdonald JL, Ballam JM. (2001). Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study. *J AOAC Int* 84: 1865-1883.

- Liggins J, Bluck LJC, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA. (2000). Daidzein and genistein contents of vegetables. *Brit J Nutr* 84:717–725.
- Lin F, Giusti M. (2005). Effects of Solvent Polarity and Acidity on the Extraction Efficiency of Isoflavones from Soybeans (*Glycine max*), *J. Agr. And Food Chem* 53:3795-3800.
- Liu K. (2004). Soy isoflavones: Chemistry, processing effects, health benefits, and commercial production. In K. Liu (Ed.), *Soybeans as functional foods and ingredients* Champaign, IL: AOCS Press, 52-72.
- Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, Setchell KD, Lephart ED, Handa RJ. (2004). Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. *Biol Reprod* 70:1188-1195.
- Luthria DL, Biswas R, Natarajan S. (2007). Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods* 105:325–333.
- Messina MJ, Hughes C. (2003). Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplement for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flash frequency. *J Med Food* 6:1-11.
- Ribeiro MLL, Mandarino JMG, Carrão-Panizzi MC, Oliveira MCN, Campo CBH, Nepomuceno AL, Ida EI. (2007). Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *J Food Comp Anal* 20:19-24.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J Chromatogr A* 1012:119–128.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. (2004). Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Anal Chim Acta* 522:169–177.
- Sarkar FH, Li Y. (2003). Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest* 21:744-757.

Scheffé H. (1963). The Simplex-Centroid Design for Experiments with mixtures. *J Roy Stat Soc B Met* 25(2)235-263.

StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system). (2007), version 8.0. www.statsoft.com.

Tsukamoto C, Shimada S, Igita K, Kudou S, Kokubun M, Okubo K, Kitamura K. (1995). Factors affecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J Agr Food Chem* 43:1184-1192.

Wang HJ, Murphy PA. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agr Food Chem* 42:166-1673.

Zafra-Gómez A, Garbalo A, García-Ayuso LE, Morales JC. (2010). Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods. *Food Chem* 123:872-877.

Zhuo XG, Melby MK, Watanabe S. (2004). Soy isoflavone intake lowers serum LDL cholesterol: a meta-analysis of 8 randomized controlled trials in humans. *J Nutr* 134:2395-400.

Table I. Content of different soy isoflavone forms extracted using the simplex-centroid mixture design.

Assay	Mixture $x_1:x_2:x_3:x_4$	y_1	y_2	y_3	y_4
1	(1:0:0:0)	0.77	4.75	0.91	6.44
2	(0:1:0:0)	0.18	0.00	0.11	0.29
3	(0:0:1:0)	0.22	1.51	0.07	1.81
4	(0:0:0:1)	0.68	0.00	0.05	0.73
5	(0.5:0.5:0:0)	1.92	2.88	3.01	7.81
6	(0.5:0:0.5:0)	2.97	5.88	0.21	9.05
7	(0.5:0:0:0.5)	2.25	5.47	0.11	7.83
8	(0:0.5:0.5:0)	0.49	0.27	0.04	0.80
9	(0:0.5:0:0.5)	0.35	0.00	0.01	0.36
10	(0:0:0.5:0.5)	0.37	0.54	0.06	0.96
11	(0.33:0.33:0.33:0)	2.80	5.98	2.07	10.85
12	(0.33:0.33:0:0.33)	3.60	5.72	0.28	9.60
13	(0:33:0:0.33:0.33)	1.99	5.61	0.37	7.97
14	(0:0.33:0.33:0.33)	0.77	0.50	0.08	1.35
15	(0.25:0.25:0.25:0.25)	1.76	4.40	0.15	6.32

x_1 : water, x_2 : acetone, x_3 : ethanol, x_4 : acetonitrile, y_1 = mg/g glycosidic isoflavones, y_2 = mg/g malonyl-glycosidic isoflavones, y_3 = mg/g aglycone isoflavones and y_4 = mg/g total isoflavones.

Table II. Fit of linear, quadratic and special cubic models for the four isoflavone forms extracted using the simplex-centroid mixture design with four components (water, acetone, ethanol, and acetonitrile).

Response function	Model	R ²
y_1	Linear	0.25
	Quadratic	0.84
	Special cubic	0.96
y_2	Linear	0.60
	Quadratic	0.91
	Special cubic	0.99
y_3	Linear	0.34
	Quadratic	0.84
	Special cubic	0.98
y_4	Linear	0.53
	Quadratic	0.93
	Special cubic	0.98

y_1 = mg/g glycosidic isoflavones, y_2 = mg/g malonyl-glycosidic isoflavones, y_3 = mg/g aglycone isoflavones and y_4 = mg/g total isoflavones.

Table III. Analysis of variance (ANOVA) of the special cubic model using the simplex-centroid mixture design with four components for optimization for the extraction of soy isoflavones.

Response	DF	SS	MS	F	p	R ²	Lack of Fit SS	MS
y_1	4	2.09	0.52	2.77	0.17	0.96	2.28	0.07
y_2	4	7.04	2.35	10.18	0.01	0.99	3.28	0.04
y_3	4	1.48	0.37	6.91	0.04	0.98	0.64	0.24
y_4	4	11.08	2.75	2.16	0.24	0.98	15.32	0.43

y_1 = glycosidic isoflavones, y_2 = malonyl-glycosidic isoflavones, y_3 = aglycone isoflavones and y_4 = total isoflavones, DF: degrees of freedom, SS: sum of squares, MS: mean square.

Table IV. Calculated and observed isoflavone content of glycosidic, malonyl-glycosidic, aglycone and total isoflavones extracted with optimal solvent mixtures for each form.

Response function	Optimal*	Calculated ¹	Observed ²
Y_1	$x_1:x_2:x_4$	3.26 ^a	3.46±0.20 ^a
Y_2	$x_1:x_2:x_3$	5.54 ^b	5.85±0.18 ^b
Y_3	$x_1:x_2$	3.05 ^c	3.08±0.10 ^c
Y_4	$x_1:x_2:x_3$	9.94 ^d	10.24±0.86 ^d

Different letters in the same row indicate significant differences (t test, $p < 0.05$; x_1 : water, x_2 : acetone, x_3 : ethanol, x_4 : acetonitrile); *Extraction solvent mixtures that yielded the best extraction of corresponding variables; y_1 = mg/g glycosidic isoflavones, y_2 = mg/g malonyl-glycosidic isoflavones, y_3 = mg/g aglycone isoflavones and y_4 = mg/g total isoflavones, ¹Isoflavone content expressed as mg/g; ²Mean isoflavone content expressed as mg/g ± standard deviation.

Table V. Detection and quantification limits, accuracy, and precision of the chromatographic analysis of isoflavones.

Isoflavone	Limits (mg/ml)		Accuracy	Precision
	Detection	Quantification	CV%	CV%
Daidzin	0.000429	0.001300	9.77	10.16
Glicitin	0.000196	0.000593	13.58	23.12
Genistin	0.000102	0.000310	2.61	4.08
Daidzein	0.000082	0.000249	1.30	2.12
Glicitein	0.000546	0.001653	0.45	0.73
Genistein	0.000239	0.000725	4.38	9.41

% CV: coefficient of variation.

Table VI. Accuracy and precision coefficients of determination from extractions with optimally performing mixtures.

Isoflavone*	Accuracy (%)	Precision (%CV)
y_1	105.99	10.99
y_2	105.65	6.02
y_3	100.89	6.25
y_4	103.02	15.98

*Only considers extractions with the best-performing mixtures. Accuracy is expressed as %recovery, %CV = Coefficient of variation. y_1 = glycosidic isoflavones, y_2 = malonyl-glycosidic isoflavones, y_3 = aglycone isoflavones and y_4 = total isoflavones.

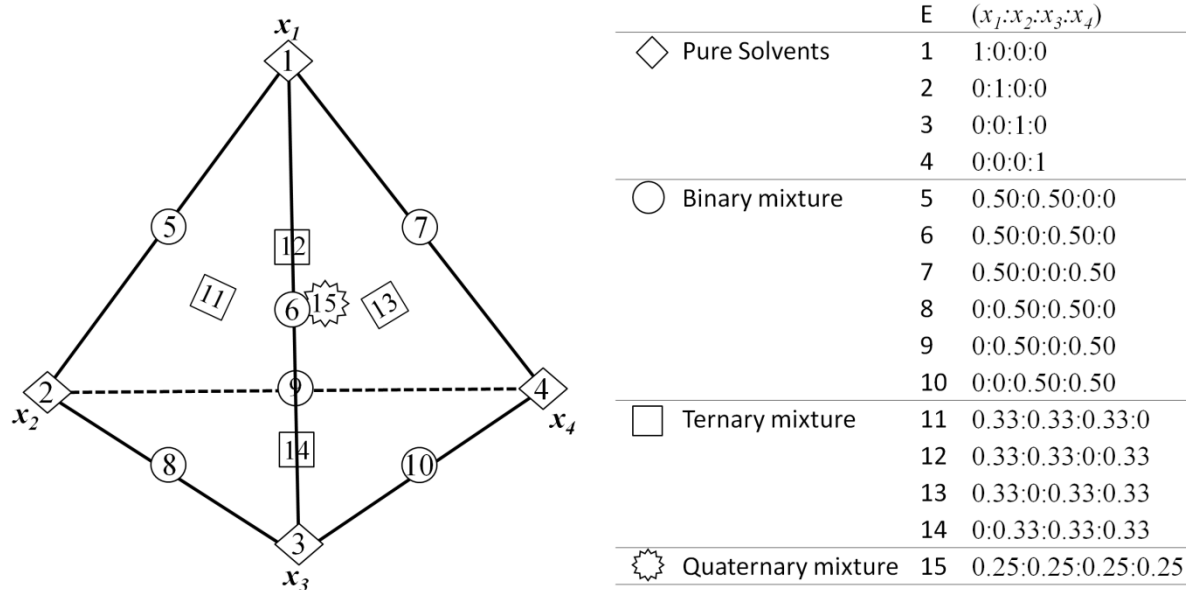


Figure 1. Arrangement of the simplex-centroid design with four components x_1 (water), x_2 (acetone), x_3 (ethanol) and x_4 (acetonitrile), as well as solvent mixture ratios in each assay (E).

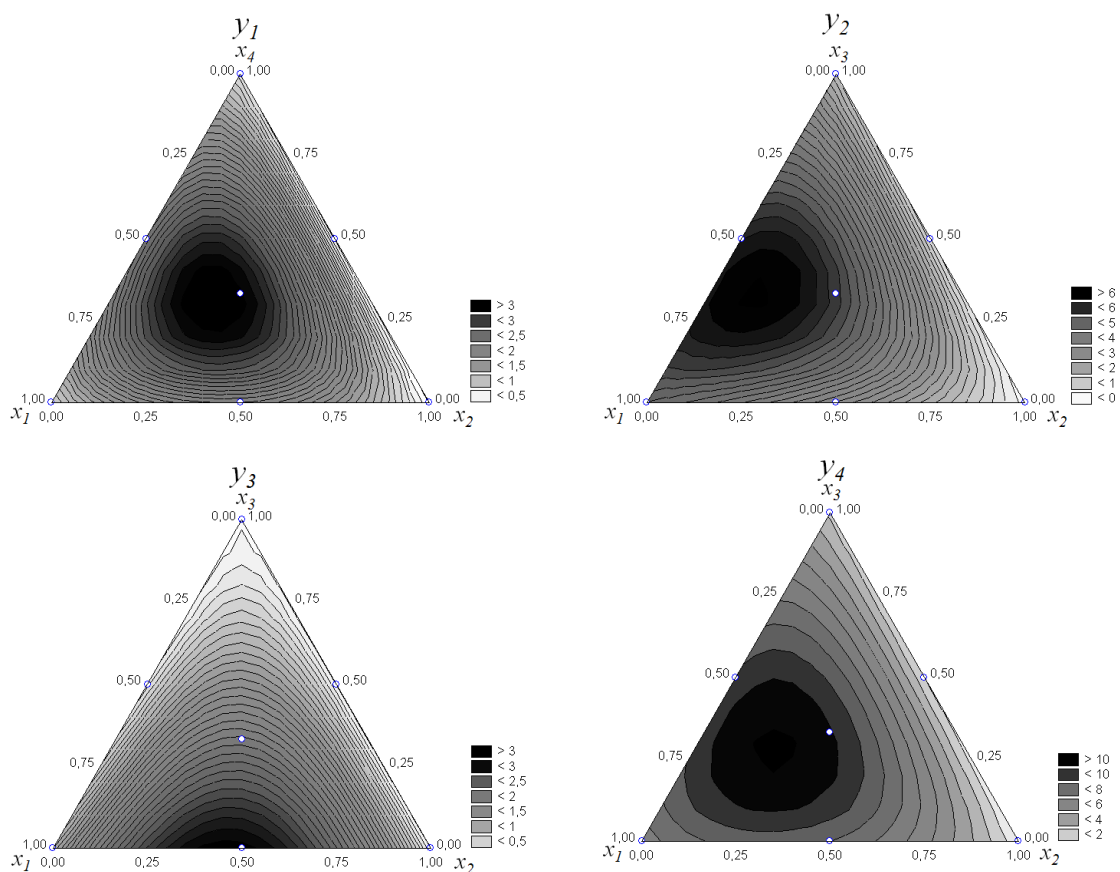


Figure 2. Response surfaces of the optimized extraction of (A) glycosidic, (B) malonyl-glycosidic, (C) aglycone and (D) total isoflavones (x_1 : water, x_2 : acetone, x_3 : ethanol, x_4 : acetonitrile, y_1 = mg/g glycosidic isoflavones, y_2 = mg/g malonyl-glycosidic isoflavones, y_3 = mg/g aglycone isoflavones and y_4 = mg/g total isoflavones).

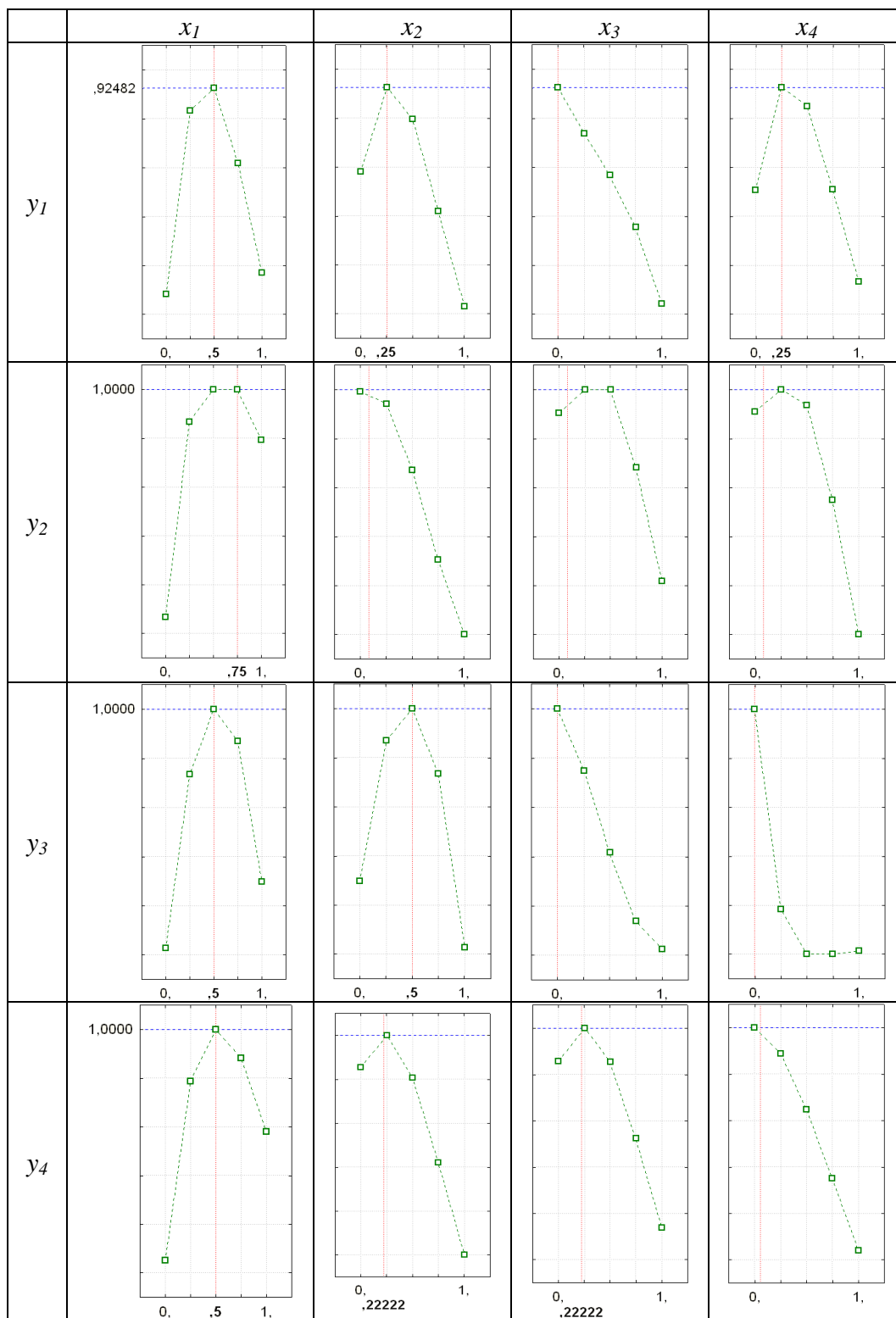


Figure 3. Optimal ratio for extraction of glycosidic, malonyl-glycosidic, aglycone and total isoflavones using the desirability parameter (x_1 = water, x_2 = acetone, x_3 = ethanol, x_4 = acetonitrile, y_1 = glycosidic isoflavones, y_2 = malonyl-glycosidic isoflavones, y_3 = aglycone isoflavones and y_4 = total isoflavones).

5.5 ARTIGO CIENTÍFICO 5

CORRELATION OF ISOFLAVONES AND PHENOLIC COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT CAPACITY OF GERMINATED SOYBEAN COMPONENTS

Luciane Yuri Yoshiara, Tiago Bervelieri Madeira, Josemeyre Bonifácio da Silva, Elza
louko Ida.

Situação: Em Submissão ao Journal of Food Composition and Analysis

CORRELATION OF ISOFLAVONES AND PHENOLICS COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT CAPACITY OF GERMINATED SOYBEAN COMPONENTS

YOSHIARA, Luciane Yuri; MADEIRA, Tiago Bervelieri, SILVA, Josemeyre Bonifácio da, IDA, Elza Iouko*. Department of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, CEP 86051-980, Londrina – Paraná - Brazil. Tel./Fax.: +55(43)3371-4080. *elida@uel.br

Abstract

The aim of this work was to examine the correlations among isoflavone content in aglycones, phenolic compounds and antioxidant activity in the different components of the embryonic axis of soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill, cultivar BRS257) germinated for 144 h, at 35°C, 100% relative humidity and in the presence of light. The content of isoflavones, phenolic compounds and antioxidant capacity (DPPH and ABTS) were determined, and the Pearson statistical test was applied to examine correlations. Germinated soybean cotyledons had higher isoflavone content (158.79±1.64 mg 100 g⁻¹), phenolic compounds (570.88±28.80 mg GAE 100 g⁻¹) and antioxidant capacity by DPPH (3.24±0.19 µmol Trolox g⁻¹) and ABTS (5.99±0.26 µmol Trolox g⁻¹) compared to non-germinated soybeans and the radicles, hypocotyls and cotyledons of germinated soybeans. The antioxidant capacity (determined by ABTS) and phenolic compounds and antioxidant capacity (determined by DPPH) and isoflavones expressed in equivalent aglycone showed a positive correlation. Soybeans germinated under these conditions are recommended as an alternative containing high levels of phenolic compounds and isoflavones.

Keywords: soybean isoflavones, germination, radicles, hypocotyls, epicotyls, cotyledons, DPPH free radical scavenging activity, ABTS radical cation, phenolic compounds

1. Introduction

The consumption of foods containing significant amounts of antioxidants may help to slow down premature aging and reduce the risk of diseases such as atherosclerosis, cancer, cirrhosis (Devi et al., 2009) and other diseases. Phenolic acids and polyphenolic compounds have antioxidant properties and can impact various biological systems due to their ability to donate protons and electrons. They also form stable radical intermediates, which prevent the oxidation of various food ingredients, in particular lipids (Brand-Williams et al., 1995; Tyug et al., 2010).

Isoflavones are phenolic compounds present in soybeans that have antioxidant properties and the ability to inhibit the action of free radicals that are related to many health problems (Barbosa et al., 2006). The soy isoflavones are secondary metabolites of plants and constitute a group of natural bioflavonoids exclusively produced by legumes (Fritsche & Steinhart, 1999). These compounds are associated with a reduced risk of various cardiovascular

38 diseases (Brouns, 2002), a reduction of bone loss and a reduction of menopausal symptoms in
39 women (Brandt, 1997).

40 The three forms of isoflavone aglycones from soy are daidzein, genistein and glycitein,
41 which result from the corresponding glycosidic forms due to loss of the β -glycoside group (Xu
42 et al., 2002) and have higher biological activity than their respective glycosidic forms (Eldridge,
43 1982; Fukutake et al., 1996). The total content of soy isoflavones may vary from 188.4 to 948.9
44 mg 100 g⁻¹ (Lee et al., 2003) and depends on the cultivar, climatic conditions and different
45 components of the seed (Chung et al., 2007). Daidzein and glycitin isoflavones predominate in
46 soybean seed coats and hypocotyls, while genistein and daidzein represent the major contents of
47 isoflavones in the cotyledons (Yue et al., 2010).

48 Soybeans also contain other types of phenolic antioxidants, such as vanillic, caffeic,
49 coumaric and syringic acid (Kim et al., 2006; Tsyg et al., 2010). These compounds are
50 responsible for the positive effects on cardiovascular disease and cancer. In soybeans, the
51 content of phenolic compounds may also vary between cultivars and the different components
52 of the seed. In black soybean, the total phenolic content varies from 3.73 to 6.18 mg of gallic
53 acid equivalents (GAE) g⁻¹, while yellow soybeans range from 2.27 to 2.62 mg GAE g⁻¹. The
54 hypocotyl content varies from 15.34 to 17.17 mg of catechin equivalents (CE) g⁻¹. The cotyledon
55 varies from 9.15 to 13.24 mg g⁻¹ and the seed coat from 7.30 to 9.78 mg CE g⁻¹ (Yue et al.,
56 2010).

57 Several methods are available to evaluate isoflavones and antioxidant activity in foods.
58 Because of its high sensitivity, speed and efficiency, high performance liquid chromatography
59 (HPLC) is frequently used to separate and quantify soy isoflavones (Zafra-Gómez et al., 2010).
60 However, a universal and precise method has not been established to determine antioxidant
61 activity (Prior et al., 2005). The antioxidant activity of soy and its derivatives was investigated
62 using tests for DPPH[•] (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Barbosa et al., 2006), co-oxidation of the
63 β -carotene/linoleic acid system (Barbosa et al., 2006; Pratt & Birat, 1979) and ORAC (Oxygen
64 Radical Absorbance Capacity) (Yen & Lai, 2003). Other methods such as ABTS^{•+} (2,2-azinobis
65 (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) are used as an alternative to evaluate the antioxidant
66 capacity of soybeans (Sanchez-González et al., 2005).

67 The isoflavones, phenolic antioxidant activity and the different components of soybeans
68 were described by Kim et al. (2007) who obtained an average total isoflavone content of 288.70
69 mg 100 g⁻¹ in the embryonic axis, 57.50 mg 100 g⁻¹ in the whole seed, 32.5 mg 100 g⁻¹ in the
70 cotyledon and 3.30 mg 100 g⁻¹ in the seed coat. Kim et al. (2006) found that the content of
71 phenolic compounds ranged from 7.06 to 50.00 mg g⁻¹ between the different components of soy,
72 and the average concentration of antioxidants, as measured by DPPH, was 42% and greatest in
73 the seed coat. However, the germinated soybean content of these compounds has not been
74 described.

75 During the soybean germination process, several changes take place. These include
76 increases in nutritional value, reduction of factors considered anti-nutritional (such as phytates
77 and lectins), increases in the bioavailability of vitamins and minerals (Trugo et al., 2000),
78 changes in the content of different forms of isoflavones (Ribeiro et al., 2006) and activation of
79 β -glucosidase (Santosh et al., 1999; Yoshiara et al., 2011). Yoshiara et al. (2011) recently
80 reported that after 144 h of soybean germination, β -glucosidase activity increased significantly
81 compared to non-germinated soybeans. The β -glucosidase hydrolyzes soy isoflavones, releasing
82 glucose and aglycones, which are more bioavailable and have higher biological activity (Izumi
83 et al., 2000). The process of soybean germination may be an alternative method to increase the
84 isoflavone aglycone content for use in the development of foods with better nutritional and
85 functional properties (Ribeiro et al., 2006).

86 The aim of this study was to examine the correlation between the isoflavone in aglycone
87 equivalents, phenolic compounds and antioxidant activity of different components of soybeans
88 germinated for 144 h at 35°C, 100% relative humidity and in the presence of light.

89

90 **2. Materials and methods**

91 *2.1 Materials and chemicals*

92 Seeds of the soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivar BRS 257 were developed at
93 Embrapa Soja in Londrina – PR - Brazil, harvested in 2008 and used for this study. Standards of
94 the isoflavones daidzin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein and genistein were obtained from
95 Sigma - Aldrich ® (St. Louis, MO, USA), and the malonyl-glycosides and acetyl-glycosides
96 were from Sequoia Research Products (Pangbourne, United Kingdom). Other reagents were
97 analytical and HPLC grade and from various commercial origins.

98

99 *2.2 Process of Soybean Germination*

100 For germination, 50 previously selected seeds were placed on germination paper and
101 maintained in a chamber (Marconi MA 835) with a relative humidity of 100% and a
102 temperature of 35±1°C for 144 h, with a photoperiod of 10 h per day, as described by Yoshiara
103 *et al.* (2011). After germination, the components of the embryonic axis of germinated soybeans
104 (epicotyls, hypocotyls, radicles and cotyledons) were manually separated, freeze-dried (Christ,
105 Alpha 1-4 LD plus, Germany) and milled (Analytical mill A11 Basic Mill, Ika, Brazil). The
106 samples were defatted with hexane for 30 min at room temperature and stored at -26 °C until
107 analysis. Non-germinated soybeans were used as a control.

108

109 *2.3 Isoflavone determination*

110 For isoflavone extraction, 100 mg of sample was placed in test tubes with 4.0 mL of
111 70% aqueous ethanol (v / v) containing 0.1% (v / v) acetic acid, maintained at room temperature

112 for 5 h and shaken manually every 15 min as described by Carrão-Panizzi et al. (2003). The
113 extract was centrifuged and the supernatant filtered through 0.20 µm nylon membranes, and 20
114 µL was used for separation and quantification of isoflavones by high performance liquid
115 chromatography (HPLC).

116 The separation and quantification of isoflavones from defatted soy flour were performed
117 using HPLC according to the methodology described by Berhow (2002) with modifications. A
118 chromatograph (Shimadzu, model LC-10AT VP; Japan), oven (Shimadzu, CTO-10AS VP,
119 Japan), semi-automatic sample applicator and ODS C18-type reverse phase column (Shimadzu,
120 4 mm x 15 cm, 5 µm particles, Japan) were used. Twenty microliters of each filtered sample
121 was injected. A linear gradient system with an initial phase of 100% acidified water with glacial
122 acetic acid up to pH 3.0 and 0% acetonitrile was used for elution and separation of the
123 isoflavones. After 25 min of elution, the acetonitrile/water solution reached a 55/45% ratio.
124 After 27 min, the gradient reached 100% acetonitrile, and after 35 min, the gradient returned to
125 the initial conditions. The total run time was 40 min. The flow rate of the mobile phase was 1
126 ml/min, and the run temperature was kept constant at 25°C. A diode array detector (Shimadzu,
127 SPD-M20A, Japan) with the wavelength set at 260 nm was used. Identification of the
128 isoflavones was performed by comparison to individual standard curves (Sigma-Aldrich) for
129 daidzin, glicitin, genistin, daidzein, glicitein and genistein. Quantification was performed by
130 external standardization and utilized the standard curve as a reference. The concentrations of
131 malonyl-glycosidic isoflavones were calculated from the standard curves of the corresponding
132 β-glycosidic isoflavones using the similarity of the extinction coefficients (Coward, Smith, Kirk
133 & Barnes, 1998). For the results, the mean of three replicates is expressed as mg aglycone
134 equivalents in 100 g of sample on a dry basis (mg EA 100 g⁻¹ sample on dry basis) according to
135 Song et al. (1998) and Klump et al. (2001).

136

137 *2.4 Total phenolic determination*

138 The extraction of phenolic compounds was performed according to Hung, Maeda,
139 Miyatake & Morita (2009) and quantified according to the Folin-Ciocalteu method described
140 by Swain & Hillis (1959). The extract was used for quantification of total phenolic and
141 antioxidant activity by DPPH and ABTS methods.

142 The standard curve was constructed with gallic acid at concentrations ranging from 1.0
143 to 5.0 mmol L⁻¹. For the results, the mean of three replicates is expressed as mg gallic acid
144 equivalents per 100 g sample on a dry basis (mg GAE 100 g⁻¹).

145

146 *2.5 Measures of antioxidant activities*

147 *2.5.1 1,1 Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical-scavenging activity method*

148 The ability of the compound to donate hydrogen ions to the free radical 2,2-diphenyl-1-
149 picrylhydrazyl (DPPH •) was measured according to the method of Brand-Williams et al.
150 (1995). The quantification of the extracts was performed using a standard curve of Trolox in
151 concentrations ranging from 0.5 to 20 mol⁻¹ L, and the average of three replicates is expressed in
152 μmol Trolox g⁻¹.

153

154 2.5.2 ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid]

155 The antioxidant activity was also assessed by sequestration of the cation radical ABTS⁺⁺ by the
156 method proposed by Sanchez-Gonzalez et al. (2005). A standard curve was constructed of
157 Trolox (2.5 to 20 mol⁻¹ L). The average of three replicates is expressed in μmol Trolox g⁻¹.

158

159 2.6 Statistics

160 The results were examined using analysis of variance (ANOVA) and Statistica 8.0
161 software (StatSoft, Inc. 2007). Values expressed as the mean ± standard deviation were
162 compared by the Tukey test at 5% probability. The Pearson's correlation at 5% significance was
163 applied among the phenolic compounds, isoflavones and antioxidant capacity by ABTS and
164 DDPH methods.

165

166 3. Results and discussion

167 The total isoflavone content (expressed in aglycone equivalents) in the non-germinated
168 soybean was smaller than the cotyledons germinated for 144 h in the presence of light at 35°C
169 (Table 1). In relation to the components of germinated soybean, the cotyledons showed higher
170 contents of total isoflavones when compared to the hypocotyls. However, the epicotyls and
171 radicles showed no significant differences in total isoflavone and were lower than the hypocotyl.
172 Higher levels of isoflavones in aglycone equivalents have been described by Carrão-Panizzi et
173 al. (2003) who found a range of 164.5 to 302.5 mg 100 g⁻¹ of isoflavones in aglycone
174 equivalents, whose variations were attributed to the type of cultivar, climatic factors and
175 processing form of soybeans.

176 The highest content of total isoflavones in soy cotyledon germinated at 35°C for 72
177 hours was observed by Ribeiro et al. (2006). In general, in soybean cotyledons, the high content
178 of total isoflavones may be linked to a defense mechanism against attack by insects and
179 phytopatogens because this component of the seed is responsible for promoting plant growth
180 and development (Rhodes, 1996). However, the total isoflavone content can vary between the
181 different components of germinated soybean as observed by Chung et al. (2007) and Yue et al.
182 (2010). Chung et al. (2007) verified that the total isoflavone content was higher in embryonic
183 tissue and reduced in soybean seed coats. However, Yue et al. (2010) concluded that the

184 isoflavone content was higher in the hypocotyl (81.43 mg 100 g⁻¹) than in the seed coats (16.94
185 mg 100 g⁻¹) and cotyledons (9.71 mg 100 g⁻¹).

186 The content of phenolic compounds expressed as gallic acid equivalents (Table 2) of the
187 various components of the germinated and non-germinated soybean differ from each other
188 (p<0,05), whereas the cotyledon showed a higher content, followed by the radicle, hypocotyl
189 and epicotyl. The non-germinated soybeans presented a lower content of phenolic compounds
190 (204.73 ± 5.08 mg GAE 100 g⁻¹) compared with individual components of the germinated
191 soybean. The phenolic compound content from non-germinated soybeans (204.73 ± 5.80 mg
192 GAE g⁻¹) was lower than lentils (244.00 mg GAE 100 g⁻¹) and black beans (320.00 mg GAE
193 100 g⁻¹), and higher than green peas (134.00 mg GAE 100 g⁻¹) and chickpeas (154.00 mg GAE
194 100 g⁻¹), as described by Xu & Chang (2007). With regard to different types of grain crops, the
195 phenolic content of non-germinated soybeans showed a higher content in maize (263.00 mg
196 GAE 100 g⁻¹) and a lower content in rice (94.06 mg GAE 100 g⁻¹), oat (111.09 mg GAE 100 g⁻¹)
197 and wheat (135.92 mg GAE 100 g⁻¹), according to Adom & Liu (2002). However, when
198 comparing the content of phenolic components such as germinated soybean cotyledons (570.88
199 mg GAE 100 g⁻¹), radicles (398.43 mg GAE 100 g⁻¹) and epicotyls (308.93 mg GAE 100 g⁻¹)
200 with the data described by Adom *et al.* (2002) and Xu *et al.* (2007), it was observed that the
201 content was higher, except for the black bean results (320.00 mg GAE 100 g⁻¹). Therefore, the
202 results of this study suggest that the process of soybean germination may be recommended
203 when a higher content of phenolic compounds is desired, mainly in the different components of
204 the embryonic axis of germinated soybean.

205 The antioxidant capacity (Table 3) assayed by the ABTS method in non-germinated
206 soybean seed was equal to the germinated soybean hypocotyls but differed from the other
207 components, and the germinated soybean cotyledons showed a higher antioxidant activity.
208 However, when evaluated by a DPPH[•] free radical scavenging assay, non-germinated soybeans
209 showed an antioxidant capacity equal to the epicotyl and root and differed from the cotyledons
210 and hypocotyl, and the germinated soybean cotyledons also showed a higher antioxidant
211 capacity. Barbosa *et al.* (2006) reported superior results of antioxidant capacity by the method of
212 free radical DPPH[•] in soybeans and soy flour, with values of 3.7 µmol Trolox g⁻¹ and 4.6 µmol
213 Trolox g⁻¹, respectively. Furthermore, by the DPPH[•] method, the yellow soybean showed low
214 antioxidant capacity (1.96 µmol Trolox g⁻¹), while the black soybean had high values (13.39
215 µmol Trolox g⁻¹) and also a higher content of phenolic compounds and flavonoids (Xu, &
216 Chang 2007), justifying the different antioxidant capacity results of the present work. These
217 results may also be related to the differences in the types of soybean and the processing (Carrão-
218 Panizzi *et al.*, 1999).

219 The high antioxidant capacity of germinated soybean cotyledon evaluated by the ABTS
220 and DPPH methods can be confirmed by the higher content of phenolic compounds (Table 1)

221 and total isoflavone aglycone equivalents (Table 2), which was also observed by Brand-
222 Williams et al. (1995) and Naim et al. (1976). According to Nicoli et al. (1999), the antioxidant
223 capacity is due to the presence of phenolic groups, which confer a greater ability to donate to the
224 radical hydrogen atom from the hydroxyl group and / or aromatic structure polyphenol, which
225 consequently has a higher ability to support the unpaired electron of displacement around the aromatic
226 ring. The two methods to evaluate the antioxidant capacity (DPPH and ABTS) can detect both electron
227 transfer and donation of hydrogen atoms (Prior et al., 2005). However, the ABTS method has
228 greater advantages in relation to the DPPH, including the ability to use a wide pH range,
229 solubility in both aqueous and organic solvents and short reaction time. However, both are also
230 useful in determining the antioxidant activity of natural products, provided that pigments, which
231 cause interferences in the colorimetric spectrum assay (Awika et al., 2003) are not present.

232 The phenolic compound content and antioxidant activity as measured by ABTS and
233 DPPH and the isoflavone aglycones and equivalent antioxidant capacity measured by the
234 method of DPPH showed significant positive correlations (Table 4). The same was observed by
235 Emmons & Peterson (1999). Thus, it was observed (Table 4) that the higher the content of
236 phenolic compounds, the greater the antioxidant capacity determined by the ABTS method and
237 the higher the isoflavone aglycone equivalents, the more antioxidant activity was determined by
238 DPPH. The analysis of all varieties of soybean investigated by Sung et al. (2010) also showed
239 significant positive correlations between antioxidant capacity measured by DPPH and FRAP
240 methods and isoflavone ($r = 0,92^{**}$ and 0.84^{**} , respectively). The same authors also noted a
241 correlation between high antioxidant activity by DPPH and the total phenolic compounds ($r =$
242 $0,97^{**}$). However, Sakthivelu et al. (2008) observed that antioxidant activity (DPPH) in 11
243 soybean varieties was not correlated with the total content of isoflavones and that a low
244 correlation was observed with the total phenolic compounds due to the low isoflavone aglycone
245 content (<5% of the total isoflavone).

246

247 **4. Conclusions**

248 In soybean cotyledons, a 144 h, 35°C and 100% relative humidity germination process
249 resulted in a higher content of phenolic compounds and isoflavones and higher antioxidant
250 capacity by ABTS and DPPH methods. The antioxidant capacity by ABTS and phenolic
251 compounds and antioxidant capacity by DPPH and isoflavones in aglycone equivalents showed
252 a positive correlation. Thus, soybeans germinated under these conditions can be recommended
253 as an alternative source of soybeans containing high levels of phenolic compounds and
254 isoflavones.

255

256

257

258 **5. Acknowledgements**

259 This work was partially funded by CNPq/MCT and Fundação Araucária / PR. LYY would like
260 to thank CNPq for a graduate scholarship, and EII is a CNPq Research Fellow.

261

262 **6. References**

263 Adom, K. K.; Liu, R.H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food*
264 *Chemistry*, 50, 6182-6187.

265 Awika, J. M.; Rooney, L.W.; Wu, X.; Prior, R. L.; Cisneros-Zevallos, L. (2003) Screening
266 methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products.
267 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657-6662.

268 Barbosa, A. C. L.; Hassimotto, N. M. A.; Lajolo, F. M., Genovese, M. I.(2006). Teores de
269 isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. *Ciência e Tecnologia de*
270 *Alimentos*, 26(4), 921-926.

271 Berhow, M. A. (2002). *Modern analytical Techniques for flavonoid determination. Flavonoids*
272 *in the living cell*, Kleur Academic, Plenum Publishers.505, 61-76.New York.

273 Brandt, M. L. (1997). Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of
274 chronic diseases. *Calcified Tissue International*, 61, S5-S8.

275 Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to
276 evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-WissenschaftTechnologie*, London, 28, 25-30.

277 Brouns, F. (2002). Soy isoflavones: a new and promising ingredient for the health food sector.
278 *Food Research International*, 35, 187–193.

279 Carrão-Panizzi, M. C.; Beléia, A. P.; Kitamura, K.; Oliveira, M. C. N. (1999). Effects of
280 genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil.
281 *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(10):1787-1795.

282 Carrão-Panizzi, M.C.; Simão, A.S.; Kikuchi, A. (2003). Efeitos de genótipos, ambientes e de
283 tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. *Pesquisa*
284 *Agropecuária Brasileira*, Brasília, 38(8), 897-902.

285 Chung, I. M.; Gwag, J. G.; Ma, K. H.; Yu, C. Y.; Jung, W. S.; Hong, S. B.; Kim, J. A. (2007).
286 Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-
287 with-rice and vegetable soybean (*Glycine max L.*) varieties. *Food Chemistry*, 102, 738-744.

288 Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. (1998). Chemical modification of isoflavones in
289 soyfoods during cooking and processing. *The American Journal of Clinical Nutrition*.
290 68:1486S-1491S.

291 Devi, M. K. A., Gondi, M., Sakthivelu, G., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A.
292 (2009). Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content
293 and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114 (3), 771-776.

- 294 Eldridge A. C. (1982). Determination of isoflavones in soybean flours, protein-concentrates,
295 and isolates. *Journal of the American Chemical Society*.183, 90.
- 296 Emmons, C.; Peterson, D. (1999). Antioxidant activity and phenolics contents of oat and hulls.
297 *Cereal Chemistry*, 76, 6, 902-906.
- 298 Fritsche, S., & Steinhart, H. (1999). Occurrence of hormonally active compounds in food: A
299 review. *European Food Research Technology*, 209, 153–179.
- 300 Fukutake , M.; Takahashi, H.; Ishida K.; Kawamura, H.; Sigimura T.; Wakabayashi, K. (1996).
301 Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food and Chemical*
302 *Toxicology*, 34(5), 457-461.
- 303 Hung, P. V.; Maeda, T.; Miyatake, K.; Morita, N.(2009). Total phenolic compounds and
304 antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International*,
305 42, 185–190.
- 306 Izumi, T., Piskula, M.K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoke, S., Kubota, Y.
307 And Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts
308 than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition*. 130,1695–1699.
- 309 Kim TJ, Sung CH, Kim YJ, Jung BM, Kim ER, Choi WS, Jung HK, Chun HN, Kim WJ, and
310 Yoo SH (2007) Effects of a soaking-fermentation-drying process on the isoflavone and γ -
311 aminobutyric acid contents of soybean. *Food Science and Biotechnology*. 16, 83–89.
- 312 Kim, J. A.; Jung, W. S.; Chun, S. C.; Yu, C. Y.; Ma, K. H., Gwag, J. A. (2006). A correlation
313 between the level of phenolic compounds and the antioxidant capacity in cooked-with-rice and
314 vegetable soybean (*Glycine max L.*) varieties. *European Food Research and Technology*,
315 224(2), 250-270.
- 316 Klump SP, Allred MC, Macdonald JL, Ballam JM. (2001). Determination of isoflavones in soy
317 and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography:
318 collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84: 1865-1883.
- 319 Lee, S. J.; Ahn, J. K.; Kim, S. H.; Kim, J. T.; Han, S. J.; Jung, M. Y.; Chung, I. M. (2003).
320 Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. *Journal of*
321 *Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3382-3389.
- 322 Naim, M.; Gestetner, B.; Bondi A.; Birk Y. (1976). Antioxidative and antihemolytic activities
323 of soybean isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24 (6), 1174-1177.
- 324 Nicoli, M. C.; Anese, M.; Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of
325 fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*,v.10, n.3, p.94-100.
- 326 Prior R.L.; Wu X.; Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of
327 antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural*
328 *and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- 329 Rhodes, M.J.C. (1996). Physiologically-active compounds in plant foods: an overview.
330 *Proceedings of the Nutrition Society*, 55, 371-384.

- 331 Ribeiro, M. L. L.; Mandarino, J. M. G; Carrão-Panizzi, M. C.; Oliveira, M. C. N.; Campo, C. B.
332 H.; Nepomuceno, A. L.; Ida, E. I. (2006). β -glucosidase activity and isoflavone content in
333 germinated soybean radicles and cotyledons. *Journal of Food Biochemistry*, 30, 453-486.
- 334 Sakthivelu, G., Akitha Devi, M.K., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A., Nikolova,
335 M.T., Angelov, G.B., Todorova, R.M.; Kosturkova, G.P.(2008). Isoflavone composition, phenol
336 content, and antioxidant activity of soybean seeds from India and Bulgaria. *Journal of*
337 *Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 2090–2095.
- 338 Sánchez-González, I.; Jiménez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F. (2005) “In vitro antioxidant
339 activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter)”, *Food*
340 *Chemistry*, 90(1-2), 133-139.
- 341 Santosh, T. R.; Balasubramanian, K. K.; Lalita, K. (1999). Enhancement of beta-glucosidase
342 and beta-galactosidase of *Trigonellafoenum-graecum* by sposure to the
343 allelochemicalmimosine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 462-467.
- 344 Song T, Barua K, Buseman G, Murphy PA. (1998). Soy isoflavone analysis: quality control and
345 a new internal standard. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6 Suppl), 1474S-
346 1479S.
- 347 StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: STATISTICA, Version 8, 2007.
- 348 Swain, T.; Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunusdomestica*- the quantitative
349 analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 10, 63-68.
- 350 Trugo, L.C.; Donangelo, C.M.; Trugo, N.M.F.; Bach-Knudsen, K.E. (2000). Effect of heat
351 treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. *Journal of Agricultural and Food*
352 *Chemistry*, 48, 2082-2086.
- 353 Tyug, T. S.; Prasad, K. N.; Ismail, A. (2010). Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in
354 soybean by-products. *Food Chemistry*, 123, 583-589.
- 355 Xu, B.; Chang, S.K.C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant
356 activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72(2), 159-
357 166.
- 358 Xu, Z.; Wu, Q.; Godber, J. S. (2002).Stabilities of daidzin, glycitin, genistin, and generation of
359 derivatives during heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (25), 7402–7406.
- 360 Yoshiara, L. Y.; Madeira T. B.; Ribeiro, M. L. L.; Mandarino, J. M. G.; Carrão-Panizzi, M. C.
361 Ida, E. I. (2011). β -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*) embryonic axis germinated in
362 the presence or absence of light. *Journal of Food Biochemistry*, (In Press). DOI:
363 10.1111/j.1745-4514.2011.00585.x.
- 364 Yue, X., Abdallah, A. M.; Xu, Z. (2010).Distribution of isoflavones and antioxidant activities of
365 soybean cotyledon, coat and germ. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34: 795–806.

366 Zafra-Gómez AA, Garballob A, García-Ayusob Le, Morales Jc. (2010). Improved sample
367 treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented
368 foods. *Food Chemistry*,123, 872-877.
369

370 **Table 1.** Total isoflavone in aglycone equivalents of the components of germinated and
 371 non-germinated soybean.

Samples		Total isoflavones (mg AE 100 g ⁻¹) ¹
Germinated soybeans	Epicotyls	127.28 ± 2.18 ^c
	Hypocotyls	42.80 ± 0.60 ^d
	Radicles	41.49 ± 0.09 ^d
	Cotyledons	158.79 ± 1.64 ^a
Non-germinated soybeans		148.30 ± 0.17 ^b

372 ¹Mean ± standard deviation aglycone equivalents and expressed as mg AE 100 g⁻¹ on a dry basis. Different letters in
 373 the same column represent a significant difference by the Tukey test at 5% probability.

374

375 **Table 2.** Phenolic content of the different components from the non-germinated and
 376 from germinated soybean embryonic axis.

Sample		Phenolic Compounds (mg GAE 100 g ^{-1*})
Germinated soybeans	Epicotyls	308.93 ± 3.77 ^c
	Hypocotyls	227.93 ± 1.00 ^d
	Radicles	398.43 ± 18.77 ^b
	Cotyledons	570.88 ± 28.80 ^a
Non-germinated soybeans		204.73 ± 5.80 ^c

377 ^{*}Average of three replicates ± standard deviation and expressed as mg Gallic Acid Equivalents 100 g⁻¹ on a dry basis.
 378 Different letters in the same column differ by the Tukey test at 5% significance.

379

380 **Table 3.** Antioxidant capacity measured by DPPH and ABTS methods of non-
 381 germinated soybeans and components of the embryonic axis of germinated soybeans.

Samples		ABTS ¹	DPPH ¹
Germinated soybeans	Epicotyls	3,89 ± 0,06 ^b	2,66 ± 0,10 ^b
	Hypocotyls	2,37 ± 0,05 ^d	1,10 ± 0,08 ^c
	Radicles	2,95 ± 0,00 ^c	2,78 ± 0,05 ^b
	Cotyledons	5,99 ± 0,26 ^a	3,24 ± 0,19 ^a
Non-germinated soybeans		2,52 ± 0,06 ^d	2,89 ± 0,01 ^b

382 ¹μmol Trolox g⁻¹ in dry basis ± standard deviation. Different letters in the same column represent a significant
 383 difference by the Tukey test at 5% significance.

384

385 **Table 4.** Correlation coefficients between the phenolic content, antioxidant capacity and
 386 content of soy isoflavones in non-germinated and the components of the embryonic axis of
 387 germinated soybeans.

	Phenolic Compounds	DDPH	ABTS	Isoflavones
Phenolic Compounds		0,53	0,88 ²	0,27
DDPH	0,53		0,65 ¹	0,65 ¹
ABTS	0,88 ²	0,55		0,62
Isoflavones	0,27	0,65 ¹	0,62	

388 ¹Significant values at p<0,05. ²Significant values at p<0.001.

389

6. CONCLUSÕES

- O rendimento de β -glicosidase de cotilédones de soja germinada com luz por 96 h foi maior que o do epicótilo.
- A maior atividade específica de β -glicosidase ocorreu nos epicótilos de soja germinada com luz por 144 h, sendo recomendados como fonte alternativa desta enzima.
- Os cotilédones de soja germinada por 144 h resultaram em 91,05% de isoflavonas agliconas daidzeína e genisteína e 8,95% da forma glicosídica genistina, enquanto que o hipocótilo e radícula, embora em baixas concentrações, resultaram 100% das três formas de isoflavonas agliconas.
- A máxima extração de β -glicosidase de epicótilos de soja germinada ocorreu a 30°C e pH 5,0, na presença de tampão citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e NaCl 0,1 mol L⁻¹.
- A extração das diferentes formas de isoflavonas foi otimizada, sendo que os melhores extratores para malonilglicosídicas e totais foi água, acetona, etanol (2:1:1; v:v:v), para as glicosídicas, água, acetona e acetonitrila (2:1:1; v:v:v), e para as agliconas, água e acetona (1:1; v:v).
- A máxima conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas foi de 98,7% em farinha de cotilédone de soja desengordurada e ocorreu em pH 7,00 ou pH 7,61, a 35°C por 14 h.
- O cotilédone de soja germinada por 144 h e 35°C apresentou maior teor de compostos fenólicos e isoflavonas, e maior capacidade antioxidante avaliados pelos métodos DPPH e ABTS.
- Uma correlação positiva foi confirmada entre a capacidade antioxidante por ABTS e o teor de compostos fenólicos, bem como entre a capacidade antioxidante por DPPH e isoflavonas em equivalente agliconas.

ANEXO I

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Atividade da β -glicosidase em extratos protéicos de soja comercial

Tiago Bervelieri Madeira (IC/CNPq), Luciane Yuri Yoshiara (Doutoranda/CNPq-UEL), Elza Louko Ida (Orientador), e-mail: elida@uel.br

Universidade Estadual de Londrina/Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/Centro de Ciências Agrárias

Palavras-chave: soja, β -glicosidase, isoflavonas, enzima.

Resumo:

As isoflavonas são compostos fenólicos presentes principalmente na soja e em seus derivados. Embora formas glicosiladas estejam em maiores proporções no grão de soja, as formas agliconas apresentam maior atividade biológica. A enzima β -glicosidase hidrolisa as isoflavonas glicosídicas e produz as agliconas que possuem ação anticarcinogênica e antioxidante. O objetivo deste estudo foi determinar a atividade da β -glicosidase em cinco extratos protéicos de soja comercial. Os extratos protéicos foram acidificados com solução de HCl 0,1N até pH 5,0, centrifugados e o sobrenadante utilizado para determinação do teor de proteínas solúveis e atividade da enzima. O teor de proteínas solúveis variou de 2,75 a 4,60 mg/mL e duas amostras não diferiram entre si ($p < 0,05$). A atividade da enzima diferiu significativamente ($p < 0,05$) em todas as amostras analisadas e variou de 0,38 a 0,97 UA/mg de proteínas.

Introdução

As isoflavonas são compostos fenólicos presentes principalmente na soja e em seus derivados. O grão de soja contém quatro diferentes formas de isoflavonas que se apresentam normalmente como glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina); acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina); malonilglicosiladas (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) e na forma estrutural não-conjugada como agliconas (daidzeína, genisteína e geliciteína) (KUDOU, et al., 1991).

Embora as formas glicosiladas estejam em maior proporção no grão de soja, a daidzina e genistina apresentam menor atividade biológica do que suas formas agliconas genisteína e daidzeína (RIBEIRO, et al., 2007)

As isoflavonas se comportam como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, especialmente em sintomas da menopausa e osteoporose (LIGGINS et al., 2000). Em adição, à sua atividade anti-estrogênica, estes compostos possuem outras propriedades, principalmente antitumoral (LIGGINS et al., 2000), antioxidante e antimutagênica (MIYAZAWA et al., 1999).

As isoflavonas quando consumidas, são hidrolisadas pelas β -glicosidases intestinais e convertidas a agliconas que são biologicamente ativas e estas são absorvidas ou fermentadas pela flora intestinal produzindo

seus metabólitos como genisteína, daidzeína e gliciteína. Devido à importância dessa enzima, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade de β -glicosidase de cinco extratos protéicos de soja comercial.

Materiais e Métodos

Matéria prima

Os extratos protéicos de soja, extrato aquoso de soja ou “leite de soja” foram obtidos no comércio local. Todas as amostras apresentavam-se em embalagem de 1L tipo Tetra Pak. O cotilédone da cultivar soja BRS 257 foi utilizada como controle do extrato protéico sem tratamento térmico.

Procedimentos analíticos

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os reagentes utilizados de grau analítico.

Determinação da atividade de β -glicosidase

O volume de 150mL dos extratos protéicos de soja na forma de emulsão aquosa foi acidificado com solução de HCl 0,1N até atingir pH 5,0 e posteriormente centrifugado sob refrigeração (Jouan BR 4i) a 4000 x g a 4°C por 15 min. No sobrenadante determinou-se a atividade de β -glicosidase utilizando o substrato p-nitrofenol- β -glucopranosídeo (p-NPg) conforme Matsuura e Obata (1993).

Os resultados foram expressos em Unidade de Atividade de enzima por miligrama de proteína (UA/mg). Uma UA de β -glicosidase foi definida como quantidade de enzima que liberou 1 μ M de p-NP/mim nas condições de ensaio.

Determinação do teor de proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis do sobrenadante foi determinado segundo método de Lowry *et al.* (1951). Os resultados foram expressos em miligramas de proteínas por mililitro de amostra (mg/mL).

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software BioEstat 5.0 (Inst. Mamirauá). Os resultados foram comparados utilizando o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta o teor de proteínas solúveis do sobrenadante de cinco extratos protéicos de soja comercial e da cultivar BRS 257.

Tabela 1 – Teor de proteínas solúveis de cinco extratos protéicos de soja comercial e da cultivar BRS 257.

Amostra	Teor de proteínas solúveis (mg/mL)
BRS 257	3,20 ± 0,09
IX	2,80 ± 0,06 ^d
X	2,75 ± 0,20 ^d
XI	4,30 ± 0,20 ^b
XII	3,40 ± 0,10 ^c
XIII	4,60 ± 0,10 ^a

Valores representam média ± desvio padrão de unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (UA/mg)
Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente (p<0,05)

O teor de proteínas solúveis de três extratos protéicos de soja comercial (Tabela 1) diferiu ente si (p<0,05) e dois extratos apresentaram o mesmo teor e menor que os outros três extratos. Entretanto, todos extatos apresentaram teor de proteínas conforme os padrões da RDC N°. 268, de 22 de setembro de 2005, que estabelecem como valores normais de concentração de proteínas em extratos de líquidos de soja o mínimo de 3% (BRASIL, 2005).

A Tabela 2 apresenta a atividade da β-glicosidase de cinco extratos protéicos de soja comercial e da cultivar BRS 257.

Tabela 2 – Atividade da enzima β-glicosidase de cinco extratos protéicos de soja comercial e da cultivar BRS 257.

Amostra	UA/mg
BRS 257	3,10 ± 0,01
IX	0,46 ± 0,01 ^d
X	0,38 ± 0,05 ^e
XI	0,86 ± 0,01 ^b
XII	0,80 ± 0,00 ^c
XIII	0,97 ± 0,01 ^a

Valores representam média ± desvio padrão de unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (UA/mg)
Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente (p<0,05)

Observa-se que a atividade da enzima diferiu significativamente em todas as amostras e variou de 0,38 a 0,97 UA/mg de proteína. As atividades da β-glicosidase dos cinco extratos protéicos comerciais não foram relacionadas com o teor de proteínas solúveis destas amostras. Ribeiro (2006) observou que em temperatura de 50°C, houve uma redução na atividade da enzima na ordem de 91% após vinte minutos de incubação e em temperatura superior a 60°C, a mesma apresentou baixa estabilidade, com redução de 95% de atividade após cinco minutos de incubação. Este fato pode estar relacionado com baixa atividade da enzima dos extratos, que previamente foram submetidos ao processo de pasteurização UHT. Desta forma, se os extratos protéicos de soja comercial contêm isoflavonas

glicosiladas, estas serão pouco hidrosiladas a agliconas devido à baixa atividade da própria β -glicosidase dos extratos.

Conclusões

Todos os extratos protéicos de soja comercial apresentaram baixa atividade de β -glicosidase que variaram significativamente entre si ($p < 0,05$).

Não houve relação direta entre o teor de proteínas solúveis e atividade da β -glicosidase nos extratos protéicos de soja comercial.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

BRASIL, RDC Nº. 268, de 22 de setembro de 2005. Fixa a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os Produtos Protéicos de Origem Vegetal. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

Kudou, S.; et al. (Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glycine max.* (L.) Merrill)). *J. Agric. Biol. Chem.* 1991. 55, 9, p.2227-2233

Liggins, J.; et al. (Daidzein and genistein content of fruits and nuts) *J. nut. Biochem.* 2000, 11, 326-331.

Lowry, O.H.; et al. (Protein measurement with folin phenol reagent) *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.

Matsuura, M.; Obata, A. (β -glicosidase from soybeans hydrolise daidzeína and genistina) *J. food sci.* 1993, 58, p 1623-1627.

Miyazawa, M. et al. (Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill)). *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, n. 4, p. 1346-1349, 1999.

Ribeiro, M. L.L. (Teor de isoflavonas e atividades de β -glucosidase em grãos de soja germinada e de diferentes grupos de maturação. Purificação e caracterização bioquímica parcial da β -glucosidase) Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Londrina, 2006.

BB18

ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE EM PRODUTOS DE SOJA



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

YOSHIARA, L. Y., MADEIRA, T. B., IDA, E. I.
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - DEPTO. DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
UEL - ROD. CELSO GARCIA CID, KM 380 - CEP: 86051-990, LONDRINA, PR, BRASIL.
E-MAIL: LYOSHIARA@HOTMAIL.COM

Introdução

As isoflavonas têm sido amplamente descritas devido à suas atividades biológicas. Podem possuir atividade estrogênica², antioxidante³ e antitumoral⁴ com atuação em doenças crônicas como cardiovasculares⁵ e osteoporose⁴. Estas atividades biológicas são mais acentuadas nas formas agliconas do que glicosiladas.

Em adultos, a concentração plasmática máxima após a ingestão de agliconas da soja ocorre entre 4 e 7 h. Sua absorção é rápida no estômago, duodeno e porção inicial do jejuno. Para os β -glicosídeos, este tempo é de 8 a 11 h e estes necessitam de hidrólise prévia, para posterior absorção pelo intestino delgado distal⁶. A hidrólise ocorre pela ação de β -glucosidases produzidas na microbiota intestinal⁷.

As β -glucosidases (β -D-glucosídeo glucohidrolase, EC. 3.2.1.21) catalisam a hidrólise de ligações β -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos, com liberação de glicose. É produzida por microrganismos e também encontrada em vegetais¹.

O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade de β -glucosidases de produtos comerciais à base de soja.

Material e Métodos

Foram analisadas quatro produtos comerciais de extrato solúvel de soja de diferentes marcas (ESS-I a ESS-IV), uma amostra comercial de proteína texturizada de soja granulada (PTS), uma amostra de soja em grão *in natura* (SGN). As amostras comerciais foram comparadas à análise do extrato bruto de cotilédones da cultivar de soja BRS 257.

Para a extração de β -glucosidases foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,6 na proporção de 1:10 (peso/volume), com agitação por 1h e centrifugação a 4000 g /15 min. O sobrenadante foi acidificado com HCl 0,1 N até atingir o pH 5,0 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante obtido e denominado de extrato bruto (EB) de β -glucosidases foi utilizado para análises.

O teor de proteínas solúveis foi determinado conforme Lowry et al. (1951)⁸. Para determinação de atividades de β -glucosidases, foi utilizado o substrato sintético p-nitrofenil- β -glucopiranosídeo (p-NPG) conforme descrição de Matsuura e Obata (1993)⁹.

Resultados e Discussão

Tabela 1: Teor de proteínas solúveis e atividades específicas de β -glucosidase de produtos comerciais de soja

Produtos de Soja	Proteínas mg/g	Atividade β -glucosidases (UA)	Atividade Específica (UA/mg)
ESS-I	3,14 \pm 0,28 ^b	1,27 \pm 0,12 ^b	0,4
ESS-II	3,44 \pm 0,41 ^b	0,70 \pm 0,01 ^d	0,2
ESS-III	2,54 \pm 0,12 ^c	0,78 \pm 0,04 ^d	0,3
ESS-IV	2,16 \pm 0,16 ^c	0,45 \pm 0,02 ^e	0,2
PTS	2,52 \pm 0,18 ^c	0,82 \pm 0,04 ^d	0,3
SGN	4,86 \pm 0,08 ^a	1,04 \pm 0,04 ^c	0,2
BRS 257	3,20 \pm 0,09 ^b	6,20 \pm 0,01 ^a	2,0

Os valores representam média \pm desvio padrão.

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes, diferem significativamente (p <0,05).

O extrato do grão *in natura* (SGN) apresentou maior teor de proteínas solúveis e diferiu significativamente de outras amostras. Porém, a atividade de β -glucosidases foi menor do que no extrato de cotilédones de soja BRS-257 e o extrato solúvel de soja comercial ESS-I.

A atividade de β -glucosidase foi maior na amostra controle (BRS-257) devido à ausência de tratamentos térmicos, que geralmente feitos durante os processos de produção destes produtos comerciais de soja.

Observa-se que o extrato ESS-I apresentou maior teor de proteínas e atividade de β -glucosidases com conseqüente atividade específica maior. Indicando, assim que para produção deste extrato, o tratamento térmico foi diferenciado dos demais ou há possibilidade de presença de isoenzimas com maior estabilidade a tratamento térmico.

Conclusão

Se as amostras comerciais analisadas possuírem isoflavonas glicosiladas, estas serão pouco hidrolizadas a agliconas devido à baixa atividade de β -glucosidase.

Referências

- ESEN, A. *Plant Physiol.*, v. 98, p. 174-182, 1992
- LAMARTINIERE, C.A., et al. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.66, n.1, p.22-28, 2002.
- BROUNS, *Food Res. Int.*, v. 35, p. 187-193, 2002.
- LIGGINS, et al. *British J. Nutr.*, v. 84, p. 717-725, 2000.
- ZHANG, J. *Nutr.*, Bethesda, v. 133, n. 9, p. 2874-2878, 2003
- SETCHELL et al., *J. Nutr.*, v. 131, p. 1362S-1375S, 2001.
- LIGGINS et al., *Analyt. Biochem.*, v. 264, p. 1-7, 1998.
- LOWRY, et al., 1951. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MATSUURA E OBATA, *J Food Sci.*, v.58, n.1, p 144-147, 1993.

Órgão Financiador: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

8º. SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS - SLACA
CAMPINAS - SP, NOV/2009

β -GLUCOSIDASE ACTIVITY OF SOYBEAN RADICLES IN GERMINATION



¹YOSHIARA, L. Y., ¹MADEIRA, T. B.; ¹MIRANDA, A. L., ²RIBEIRO, M. L. L., ³MANDARINO, J. M.G., ³CARRÃO-PANIZZI, M. C., ^{1*}IDA, E. I.

¹Food Science and Technology Department of The State University of Londrina -UEL. ²Biochemistry and Biotechnology Department of Parana State University in Londrina - UEL - Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Zip Code: 86051-990, Londrina, PR, Brasil. ³Embrapa Soybean - Rodovia Carlos João Strass S/Nº- Distrito de Warta - P.O. Box 231 - Zip Code: 86001-970. *E-mail: elida@uel.br.

INTRODUCTION

Isoflavones are compounds with benefits for human health and they are the mainly forms of glycosides in vegetables. β -glucosidase (β -D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) hydrolyses β -D-glucosides releasing glucose and aglicone isoflavones. These kind of isoflavones have higher biologic effect in humans than glucosidics forms of isoflavones. β -glucosidase is also used to convert glucosidics isoflavones into aglicones. These β -glucosidases could be originate from the metabolism either of fungi or bacteria or soybean. The aim of this work was to investigate the β -glucosidase activity in soybeans radicles during 168 h of germination with and without light to obtain an alternative source of enzyme.

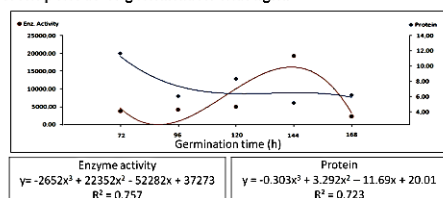
METHODOLOGY

Soybean (cultivar BRS 257) seeds were germinated following the standard model, utilizing two germination chambers (one with photoperiod of 10h of light and the other without light) at the temperature of 35 °C and relative humidity of 100% for different periods (72, 96, 120, 144 and 168 h). The radicles appeared at 72h. They were separated at each experimental time and freeze-dried. β -glucosidase from the radicles was extracted with citrate buffer containing NaCl (0,1M, pH 4,5). Soluble protein content was determined as described by LOWRY, et. al. (1951) and expressed as gram per 100 gram of sample in dry basis (%). β -glucosidase activity was determined using p-nitrophenyl-b-D-glucopiranoside as substrate, as described by Matsura and Obata (1993) and expressed as units of activity per gram of sample in 30 minutes in dry basis (UA.g⁻¹.30min⁻¹). β -glucosidase specific activity was the ratio between β -glucosidase activity and soluble protein content and it was expressed as UA per milligram of soluble protein (UA.mg⁻¹).

RESULTS AND DISCUSSION

In soy seeds cotyledons before germination, the protein content was 15.36% , the β -glucosidase activity was 4,399.17 UA.g⁻¹.30min⁻¹ and 0.97 UA.mg⁻¹ of soluble protein in dry basis. The Figures 1 and 2 show the protein content and enzyme activity of radicles in different times of germination.

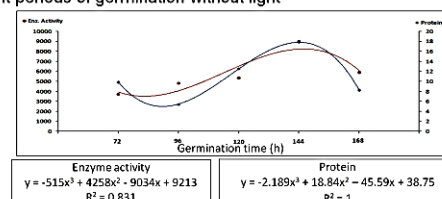
Fig. 1: Protein content¹ and β -glucosidase activity² in dry basis of radicles in different periods of germination with light.



¹ Protein content: expressed as %
² β -glucosidase activity: expressed as UA.g⁻¹.30min⁻¹

In seeds light germinated, β -glucosidase activity increased from 72h of growth and presented the maximum activity at 144h (19,333.36 UA.g⁻¹.30min⁻¹) (Fig. 1). Similarly, in samples germinated without light (Fig. 2), β -glucosidase activity increased from 72h to its maximum activity at 144h (9,018.84 UA.g⁻¹.30min⁻¹), thus approximately half value of those grown under light. At 168h, the β -glucosidase activity started to decline in both types of experiment.

Fig. 2: Protein content¹ and β -glucosidase activity² in dry basis of radicles in different periods of germination without light



¹ Protein content: expressed as %
² β -glucosidase activity: expressed as UA.g⁻¹.30min⁻¹

In cotyledons of seeds before germination, the β -glucosidase specific activity was 0.97 UA.mg⁻¹ of soluble protein in dry basis. In radicles of germinated seed, the specific activity of β -glucosidase increased from 72h of growth and achieved its highest level of enzymic activity at 144h of experiment in samples germinated under light and 120h in samples without light (Table 1).

Table 1: β -glucosidase specific activity in dry basis of radicles in different times of germination with and without light (UA.mg⁻¹).

Germination Time (h)	With light	Without Light
72	0,83± 0,12	1,29± 0,21
96	1,72± 0,63	3,27± 1,03
120	1,50± 0,01	4,02± 0,65
144	7,58± 3,79	2,23± 0,92
168	1,57± 0,62	2,17± 0,16

CONCLUSION

β -glucosidase activity was twice as much higher at 144h of experiment under light than without light demonstrating that radicles from soy germinated under light at this length of time was a good condition for β -glucosidase activity.

References

- ESEN, A. *Plant Physiol.*, v. 88, p. 174-182, 1992.
LAMARTINIÈRE, C.A., et al. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 66, n. 1, p. 22-28, 2002.
BROUNS, *Food Res. Int.*, v. 35, p. 187-193, 2002.
LIGGINS, et al. *British J. Nutr.*, v. 84, p. 717-725, 2000.
ZHANG, J. *Nutr.*, Bethesda, v. 133, n. 9, p. 2874-2878, 2003.
SETO-HELL et al. *J. Nutr.*, v. 131, p. 1362S-1375S, 2001.
LOWRY, et al. 1951. *J. Biol. Chem.*, v. 183, p. 265-275, 1951.
MATSUJARA & OBATA, *J. Food Sci.*, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
RIBEIRO, M. L. L., et al. *J. Food Biochem.*, v. 30, p. 453-486, 2006.
VILAS-BOAS, et al. *Ciência. Agrotec.*, v. 26, n. 1, p. 148-156, 2002.

Acknowledgements





Atividade da β -glicosidase e teor de proteínas solúveis nos diferentes componentes do grão de soja

Tiago Bervelieri Madeira (IC/CNPq), Luciane Yuri Yoshiara (Doutoranda/CNPq-UEL), Elza Louko Ida (Orientador), e-mail: elida@uel.br

Universidade Estadual de Londrina/Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/Centro de Ciências Agrárias

Ciências agrárias/ ciência e tecnologia de alimentos

Palavras-chave: enzima, isoflavona, aglicona

Resumo:

Isoflavonas são compostos fenólicos que possuem ação anticarcinogênica e antioxidante. As formas glicosiladas se apresentam em maior quantidade no grão de soja, porém suas formas agliconas possuem maior atividade biológica. A enzima β -glicosidase hidrolisa as isoflavonas glicosídicas e produz as agliconas. O objetivo deste estudo foi determinar a atividade da β -glicosidase e o teor de proteínas solúveis nos diferentes componentes do grão de soja e estimar as atividades específicas visando a extração da enzima para posterior aplicação. Os grãos foram hidratados por 15 min em água ultra-pura, e os cotilédones, hipocótilos e cascas foram separadas, secas ao ar e triturados. Para extração da enzima, foi utilizado tampão citrato-citrato 0,1 M pH 4,5 em NaCl 0,1 M por uma hora com agitação, e posterior centrifugação a 4000 x g por 15 min. No sobrenadante foi determinado o teor de proteínas solúveis e atividade da β -glicosidase utilizando o substrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo. O teor de proteínas solúveis foi significativamente ($p < 0,05$) diferente entre os três componentes analisados e variou entre 24,8 mg/g (casca) e 142,32 mg/g (hipocótilo). A atividade da β -glicosidase também diferiu significativamente ($p < 0,05$) nos três componentes do grão de soja e variou de 16,75 UA/g (casca) a 68,51 UA/g (cotilédone). A atividade específica, uma medida de pureza da enzima, variou de 0,41UA/mg (casca) a 0,92UA/mg (grão inteiro) e apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) entre todos os componentes do grão de soja.

Introdução

As isoflavonas β glicosídicas são formas comuns de fitoestrógenos, sendo predominantemente encontradas em leguminosas e especialmente abundantes na soja (THAM, et al., 1998) e é um dos substratos da β -glicosidase. O grão de soja contém quatro diferentes formas de isoflavonas que se apresentam como glicosiladas; acetilglicosiladas; malonilglicosiladas e na forma estrutural não-conjugada como agliconas (KUDOU, et al., 1991).

As isoflavonas glicosídicas como, genistina e daidzina, possuem menor atividade biológica do que suas formas agliconas como as genisteína



e daidzeína, e são as principais formas encontradas no grão de soja, constituindo de 50 a 90% dos flavonóides em farinha de soja (ELDBRIDGE, 1982;).

A β -glicosidase catalisa a hidrólise de terminais não redutores de compostos contendo resíduos de β -D-glicose, como isoflavonas glicosiladas, liberando glicose (ESEN, 1992). Em humanos, a hidrólise de isoflavonas presentes na soja ocorre pela ação da β -glicosidase produzida pela flora intestinal (LIGGINS et al, 1998). Devido à importância dessa enzima, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade de β -glicosidase e o teor de proteínas solúveis nos diferentes componentes do grão de soja da cultivar BRS 257 e estimar as atividades específicas visando a extração da enzima para posterior aplicação.

Materiais e métodos

Matéria prima

Foram utilizados grãos de soja, *Glycine Max L*, cultivar BRS-257, desenvolvida na Vitrine Tecnológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja em Londrina-PR.

Procedimentos analíticos

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os reagentes utilizados de grau analítico.

Extração e determinação da atividade de β -glicosidase

10 g de grãos de soja da cultivar BRS 257, foram hidratados com 100 mL de água ultra-pura por 15 min. Posteriormente os cotilédones, hipocótilos e cascas do grão de soja foram separados, secos ao ar e triturados. Para extração da enzima, foram utilizados 150 mg de amostras com tampão citrato-citrato 0,1 M pH 4,5 em NaCl 0,1 M, na proporção 1:15 (massa:volume) com agitação por uma hora. Em seguida, foram centrifugadas (centrifuga Jouan, modelo BR 4i) a 4000 x g a temperatura de 25°C por 15 min. Realizaram-se o mesmo procedimento de hidratação, trituração e extração para o grão inteiro.

Nos sobrenadantes e na água ultra-pura, determinou-se a atividade de β -glicosidase utilizando o substrato p-nitrofenol- β -glucopranosídeo (p-NPg) conforme metodologia descrita por Matsuura e Obata (1993).

Os resultados foram expressos em unidade de atividade (UA) de enzima por grama de amostra em base seca (UA/g). Uma UA de β -glicosidase foi definida como quantidade de enzima que liberou 1 μ M de p-NPg/mim nas condições de ensaio.

Determinação do teor de proteínas solúveis



O teor de proteínas solúveis foi determinado segundo método de Lowry *et al.* (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão. Os resultados foram expressos em mg de proteínas solúveis/g de amostra em base seca.

Atividade específica

Foi expressa como relação entre a atividade da enzima e o teor de proteínas solúveis, UA/mg

Análises estatísticas

O teste de Tukey ($p < 0,05$) foi aplicado para comparação de médias e utilizou-se o software Statistica 7.0 (StatSoft, 2007).

Resultados e Discussão

A atividade da β -glicosidase, o teor de proteínas solúveis e a atividade específica da β -glicosidase dos diferentes componentes da cultivar BRS 257 estão apresentadas na Tabela 1.

O teor de proteínas solúveis diferiu significativamente ($p < 0,05$), sendo o maior teor (142,32 mg/g), encontrado no hipocótilo e o menor teor, nas cascas (24,80 mg/g). A análise da água de hidratação dos grãos de soja demonstrou que a perda de proteínas solúveis não foi significativa.

Tabela 1 – Atividade de β -glicosidase, teor de proteínas solúveis e atividade específica de β -glicosidase no grão integral, cotilédones, hipocótilos e cascas da cultivar BRS 257 em base seca.

Componentes do grão de soja	Atividade de β -glicosidase (UA/g)	Proteínas solúveis(mg/g)	Atividade específica (UA/mg)
Grão inteiro	49,92 \pm 0,10 ^c	54,53 \pm 0,05 ^c	0,92 \pm 0,00 ^a
Cotilédone	68,51 \pm 2,23 ^a	86,37 \pm 5,44 ^b	0,80 \pm 0,05 ^b
Hipocótilo	59,79 \pm 2,19 ^b	142,32 \pm 1,25 ^a	0,41 \pm 0,01 ^d
Casca	16,75 \pm 0,00 ^d	24,80 \pm 1,27 ^d	0,68 \pm 0,03 ^c

Valores representam média \pm desvio padrão de unidade de atividade enzimática por grama de parte morfológica base seca (UA/g)

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

As atividades de enzima variaram significativamente de 16,75 UA/g (cascas) a 68,71 UA/g (cotilédones). Os componentes com maior teor de proteínas solúveis não apresentaram necessariamente maior atividade da enzima β -glicosidase. A atividade de enzima na água de hidratação foi considerada desprezível e abaixo dos limites de quantificação da técnica utilizada

Com relação ao grão inteiro, Ribeiro *et al.* (2007) observaram uma variação na atividade de β -glicosidase de 61,10 a 88,97 UA/g entre diferentes cultivares em diferentes grupos de maturação. Os valores se



apresentaram próximos aos obtidos neste experimento para a cultivar BRS 257.

De acordo com a Tabela 1, a atividade específica, uma medida de pureza da enzima, variou de 0,41 UA/mg (casca) a 0,92 UA/mg (grão inteiro). Apesar de o grão inteiro ter apresentado a maior atividade específica, o cotilédone apresentou atividade 1,37 vezes maior que o grão inteiro e a segunda maior atividade específica (0,80 UA/g).

Conclusões

Assim, para obtenção desta enzima para aplicação, seria conveniente a utilização dos cotilédones ou do grão inteiro para extração, já que os componentes analisados apresentaram maior atividade de β -glicosidase por grama de amostra e a maior atividade específica respectivamente.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

- Eldbridge, A. C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein-concentrates, and isolates. *J. amer. Chem. Soc.* 1982, 183, 90.
- Esen, A. Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glicosidase. *Plant. Physiol.* 1992, 98, 174-182.
- Kudou, S.; et al. Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (*Glycine max.* (L.) Merrill). *J. Agric. Biol. Chem.* 1991, 55, 9, 2227-2233
- Liggins, J.; et al. Extration and quantification of daidzein and genistein in food. *Analyt. Biochem.* 1998, 264, 1-7FFL
- Lowry, O.H.; et al. Protein measurement with folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
- Matsuura, M.; Obata, A. (β -glicosidase from soybeans hydrolise daidzeína and genistina) *J. food sci.* 1993, 58, 1623-1627
- Tham, D.M.; Gardener, C.D.; Haskell, W.L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 1998 v. 83, p. 2223-2235,
- Ribeiro, M.L.L.; et al. Isoflavone content and β -glicosidase activity in soybean cultivar of different maturity groups. *J. food comp. anal.* 2007, 20, 19-24



DESEMPENHO DA QUANTIFICAÇÃO DE β - GLICOSIDASE UTILIZANDO VOLUMES REDUZIDOS DE AMOSTRA

Ana Lúcia Miranda (PIBIC/Araucária-UEL), Luciane Yuri Yoshiara (doutoranda/CNPQ), Elza Louko Ida (orientadora)
elida@uel.br

Universidade Estadual de Londrina /Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/Londrina,PR

Ciências agrárias / ciência de alimentos

Palavras-chave: β -D-glicosídeo glicohidrolase, aglicona, determinação da atividade enzimática

Resumo

As formas agliconas das isoflavonas de soja são as que apresentam melhor biodisponibilidade no organismo. As β -glicosidases, provenientes do metabolismo de microorganismos ou do grão da soja, convertem as formas glicosiladas das isoflavonas em agliconas. Na metodologia usual para a determinação da atividade dessas enzimas são utilizadas alíquotas de 0,5 mL de amostra e para determinação de proteínas solúveis são utilizadas alíquotas de 1,0 mL. Ambos os volumes são elevados em relação à amostra total obtida durante uma extração. Com isso, o objetivo desta pesquisa foi adequar à metodologia usual utilizando volumes reduzidos de 0,1 mL, 0,2 mL, 0,25 mL e 0,3 mL de amostra para atividade enzimática e volumes de 0,2 mL e 0,3 mL e 0,5 mL de amostra para proteínas solúveis. Para a determinação da atividade de β - glicosidase foi utilizado o substrato p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p-NPG) e para determinação de proteínas solúveis foi utilizado a albumina de soro bovino como padrão. Para avaliar o desempenho da adequação do método, foi utilizado teste de Tukey ($p < 0,05$). Para as análises de atividade enzimática, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras de volumes 0,1 mL, 0,2 mL, 0,25 mL e 0,3 mL. Já na determinação de proteínas solúveis houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas amostras de 0,2 mL e 0,3 mL e somente o volume de 0,5 mL não demonstrou interferência na metodologia usual.

Introdução

As isoflavonas agliconas são as formas que possuem maior efeito biológico no organismo e por isso, muitos estudos são direcionados à biotransformação das formas glicosiladas em agliconas por meio da enzima β -glicosidase. Esta enzima é resultado do metabolismo de microorganismos (fúngico ou bacteriano) ou pode ser encontrada no próprio grão de soja (PARK et al, 2001).



Para determinação da atividade da enzima β -glicosidase, utiliza-se a metodologia descrita por Matsuura e Obata (1993). Nesta metodologia utilizam-se alíquotas de 0,5mL de amostra, que são relativamente elevadas em relação à amostra total obtida em uma extração, principalmente se for aplicado para acompanhar um processo de purificação da enzima que envolve várias etapas e quantificações.

Assim, o objetivo deste estudo foi adequar a metodologia de determinação de atividade da enzima β -glicosidase utilizando volumes reduzidos de amostras e avaliar também o desempenho do método.

Materiais e métodos

Matéria prima

Foram utilizados grãos de soja *Glycine max L*, cultivar BRS-257, desenvolvida na Vitrine Tecnológica da Fazenda Experimental da Embrapa Soja em Londrina-PR.

Preparo da amostra

Os grãos foram selecionados, para a remoção dos danificados ou manchados e de matérias estranhas. Em seguida, foram separadas as cascas, os cotilédones e os hipocótilos. Os cotilédones foram moídos e utilizados para a extração da enzima β -glicosidase.

Extração

Para extração de β -glicosidase foi utilizado tampão fosfato de sódio, 0,1 M pH 6,6 na proporção 1:10 (peso/volume), com agitação por 1 hora. Em seguida a mistura foi centrifugada a 4000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi acidificado com HCl 0,1 N até atingir o pH 5 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante obtido foi denominado de extrato bruto de β -glicosidase.

Determinação da atividade de β -glicosidase

A determinação da atividade de β -glicosidase foi feita conforme o procedimento descrito por Matsuura e Obata (1993). Para reduzir o volume da amostra utilizada durante as análises foi testado o desempenho do método utilizando volumes reduzidos de amostra (0,1 mL ; 0,2 mL; 0,25 mL e 0,3 mL). Proporcionalmente, foram reduzidos também os volumes das outras soluções utilizadas durante a análise (p-NPG e Na_2CO_3). Foi feita a análise da atividade enzimática utilizando o volume usual (0,5 mL) para comparação. Os resultados foram expressos como nível de atividade de β -glicosidase, ou seja, unidade de atividade (UA) por gramas de cotilédones moídos em base seca.



Determinação de proteínas solúveis

A determinação de proteínas solúveis foi feita segundo a metodologia descrita por Lowry, et al. (1951) utilizando volumes reduzidos de amostra de 0,2 mL; 0,3 mL e 0,5 mL; comparando-os com o volume original do método (1,0 mL). Os resultados foram expressos em mg de proteína solúvel por g de amostra em base seca.

Procedimentos analíticos

Para avaliação da metodologia, foram realizadas 5 repetições em triplicata para todas as análises de proteínas solúveis em dias diferentes, totalizando 15 repetições de cada volume reduzido. Já para determinação de atividade enzimática, foram realizadas 4 análises em triplicata em dias diferentes, totalizando 16 repetições para cada volume e uma análise em triplicata para confirmação dos resultados. Os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Análise Estatística

Os dados foram analisados e a comparação das médias foi feita através do teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade utilizando o software Statistica 8.0 (StatSoft, 2007).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta a atividade de β -glicosidase utilizando volumes reduzidos. As amostras de volumes reduzidos utilizadas na determinação da atividade de β -glicosidase, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$), portanto, mostra-se vantajoso utilizar o menor volume e de 0,1 mL de amostra para essa determinação.

Tabela 1: Atividade de β -glicosidase utilizando volumes reduzidos

Volume de amostra (mL)	β -glicosidase (UA/g bs)
0,1	44,83 \pm 3,75 ^a
0,2	44,93 \pm 1,54 ^a
0,25	44,45 \pm 1,81 ^a
0,3	43,71 \pm 3,14 ^a
0,5	44,26 \pm 3,34 ^a

Valores representam média \pm desvio padrão de unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (UA/g bs). Médias seguidas da mesma letra, não diferem significativamente ($p > 0,05$)

As amostras utilizadas para determinação de proteínas solúveis, mostraram variação significativa ($p < 0,05$) (Tabela 2), demonstrando interferência do volume de amostra utilizado no resultado da metodologia usual para volumes de 0,3 mL e 0,2 mL. Porém, para a amostra de volume de 0,5 mL, não houve interferência no resultado da metodologia usual e portanto, vantajoso o uso de volume menor.



Tabela 2: Teor de Proteínas solúveis utilizando volumes reduzidos.

Volume de amostra (mL)	Proteínas solúveis (mg/g bs)
0,2	53,6±4,64 ^{b,c}
0,3	51,74±2,95 ^c
0,5	55,54±3,66 ^{a,b}
1	58,04±2,55 ^a

Valores representam média ± desvio padrão de unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (mg/g bs) Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$)

Os resultados da Tabela 3 confirmam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os 5 volumes testados.

Tabela 3: Confirmação de resultados de atividade de β -glicosidase utilizando volumes reduzidos.

Volume de Amostra (mL)	β -glicosidase UA/g bs
0,1	43,81±1,41 ^a
0,2	44,98±1,44 ^a
0,25	43,85±1,08 ^a
0,3	44,4±1,79 ^a
0,5	43,99±1,60 ^a

Valores representam média ± desvio padrão de unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (UA/g bs) Médias com a mesma letra ,não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Conclusões

É vantajoso utilizar os volumes reduzidos de 0,1 mL para determinação de atividade de β -glicosidase e de 0,5 mL para determinação de proteínas solúveis, os quais não demonstraram interferência no resultado da metodologia usual.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina e a Fundação Araucária pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

- Lowry, O.H.; et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
- Matsuura, M.; Obata, A. β -glicosidase from soybeans hydrolyse daidzeína and genistina. *J. food sci.* 1993, 58, p 1623-1627.
- Park, Y.K.; Aguiar, C.L.; Alencar, S.M.; Mascarenhas, H.A.A&; Scamparini, A.R.P. Avaliação do teor de isoflavonas em soja brasileira. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, v3, n.3p. 156-160, 2001.



β-GLUCOSIDASE ACTIVITY OF SOYBEAN EPICOTYLS IN GERMINATION



¹YOSHIARA, L. Y., ¹MADEIRA, T. B.; ²RIBEIRO, M. L. L., ³MANDARINO, J. M.G., ³CARRÃO-PANIZZI, M. C., ¹IDA, E. I.

¹Food Science and Technology Department of The State University of Londrina -UEL. ²Biochemistry and Biotechnology Department of Parana State University in Londrina - UEL - Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Zip Code: 86051-990, Londrina, PR, Brasil. ³Embrapa Soybean - Rodovia Carlos João Strass S/Nº - Distrito de Warta - P.O. Box 231 - Zip Code: 86001-970. *E-mail: elida@uel.br.

INTRODUCTION

Isoflavones are compounds with benefits for human health and they are the mainly forms of glycosides in vegetables. β-glucosidase (β-D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3.2.1.21) hydrolyses β-D-glucosides releasing glucose and forming aglycone isoflavones. The aglycone isoflavone is the most bioavailable form of the glycosides. β-glucosidase that converts

glucopiranoside as substrate, as described by Matsuura and Obata (1993) and expressed as units of activity per gram of sample in 30 minutes in dry basis (UA.g⁻¹). β-glucosidase specific activity was the ratio between β-glucosidase activity and soluble protein content and it was expressed as UA per milligram of soluble protein (UA.mg⁻¹).

METHODOLOGY

Soybean (cultivar BRS 257) seeds were germinated following the standard model, utilizing two germination chambers (one with photoperiod of 10h of light and the other without light) at the temperature of 35 °C and relative humidity of 100% for different periods (72, 96, 120, 144 and 168 h). The epicotyls appeared at 72h. They were separated at each experimental time and freeze-dried. β-glucosidase from the samples was extracted with citrate buffer containing NaCl (0,1M, pH 4,5). Soluble protein content was determined as described by LOWRY, et. al. (1951) and expressed as g per 100 g

of sample in dry basis (%). β-glucosidase activity was determined using p-nitrophenyl-b-D-glucopiranoside as substrate, as described by Matsuura and Obata (1993) and expressed as units of activity per gram of sample in 30 minutes in dry basis (UA.g⁻¹). β-glucosidase specific activity was the ratio between β-glucosidase activity and soluble protein content and it was expressed as UA per milligram of soluble protein (UA.mg⁻¹).

RESULTS AND DISCUSSION

In the cotyledons of soybean seeds before germination, the protein content was 15.36%, the β-glucosidase activity was 146.64 UA.g⁻¹ and the specific activity was 0.97 UA.g⁻¹SP.

In seeds germinated under light conditions, the β-glucosidase activity of the epicotyls increased from 72h of growth to presented the maximum activity at 144h (3.84x10³ UA.g⁻¹); at 168 h, the β-glucosidase activity started to decline (Fig. 1).

In samples that were germinated without light, the β-glucosidase activity increased from 72h to reach its maximum activity at 96h (3.14x10³ UA.g⁻¹), and declined at 120 and 144h. It was observed that activity increased again at 168 h (2.72x10³ UA.g⁻¹ with no significant difference when compared to 96h) (Fig. 2).

Fig. 1: Protein content¹ and β-glucosidase activity² in dry basis of epicotyls in different periods of germination with light.

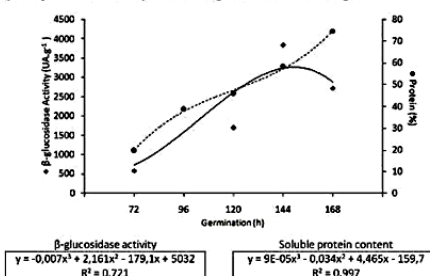
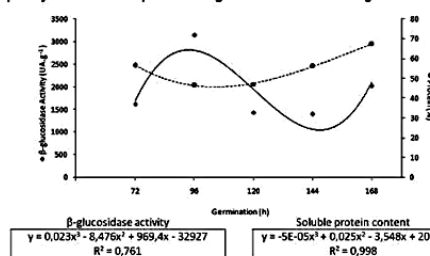


Fig. 2: Protein content and β-glucosidase activity in dry basis of epicotyls in different periods of germination without light.



The specific activity (Table 1) was higher at 144h of light germination (8.69 UA.g⁻¹ SP), almost 9 times higher than the cotyledons.

Table 1: β-glucosidase specific activity in dry basis of radicles in different times of germination with and without light.

Germination time (h)	β-glucosidase specific activity (UA.mg ⁻¹)	
	With light	Without light
72	2,99 ± 0,29 ^a	3,47 ± 1,02 ^a
96	5,34 ± 1,12 ^b	5,98 ± 0,15 ^a
120	2,75 ± 0,24 ^a	3,54 ± 0,33 ^a
144	8,69 ± 0,43 ^b	2,92 ± 0,46 ^a
168	3,00 ± 0,42 ^a	3,44 ± 0,62 ^a

Values with different superscript in the same column are significantly different at p<0.05

During the plant development, the photosynthesis can give some energetic advantages for development of epicotyls into first leaves of plants rich in nitrogen. This advantage confers accelerated growth allowing the plant to become self-sufficient quickly and be able to respond to environmental conditions. In plants, β-glucosidase activity involves, among several processes, the mechanisms of defense against microbes, insects and parasitic plants.

CONCLUSION

β-glucosidase activity of epicotyls germinated under light was 26 times higher at 144h than cotyledons without germination and 1.22 times higher than those germinated without light for 96h, showing that epicotyls from soybean germinated with light over 144h would be a good source of β-glucosidase.

References

- ESEN, A. *Plant Physiol.*, v. 98, p. 174-182, 1992.
 LAMARTINIERE, C.A., et al. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v. 66, n. 1, p. 22-28, 2002.
 BROUINS, *Food Res. Int.*, v. 35, p. 187-193, 2002.
 LOGGINS, et al. *British J. Nutr.*, v. 84, p. 717-725, 2000.
 ZHANG, J. *Nutr. Biochem.*, v. 133, n. 9, p. 2874-2878, 2003.
 SETCHELL, et al. *J. Nutr.*, v. 131, p. 1362S-1375S, 2001.
 LOWRY, et al. 1951. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
 MATSUURA & OBATA, *J. Food Sci.*, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
 RIBEIRO, M. L. L. et al. *J. Food Biochem.*, v. 30, p. 453-466, 2006.
 VILAS-BOAS, et al. *Ciência. Agrotec.*, v. 26, n. 1, p. 148-156, 2002.

Acknowledgements





EFFECT OF GERMINATION ON β -GLUCOSIDASE ACTIVITY OF SOYBEANS HYPOCOTYLS AND COTYLEDONS

¹YOSHIARA, Luciane Yuri, ^{1*}IDA, Elza Louko, ²RIBEIRO, Mara Lúcia Luiz,
³MANDARINO, José Marcos Gontijo, ³CARRÃO-PANIZZI, Mercedes Concórdia

¹Food Science and Technology Department of The State University of Londrina -UEL. ²Biochemistry and Biotechnology Department of The State University of Londrina - UEL - Rod. Celso Garcia Cid, Km 380 - Zip Code: 86051-990, Londrina, PR, Brasil. ³Embrapa Soybean - Rodovia Carlos João Strass S/Nº - Distrito de Warta - P.O. Box 231 - Zip Code: 86001-970. *E-mail: elida@uel.br

Methodology

Soybean (cultivar BRS 257) seeds were germinated following the standard model, utilizing two germination chambers (one with photoperiod of 10h of light and the other without light) at the temperature of 35 °C and relative humidity of 100% for different periods (72, 96, 120, 144 and 168 h). The hypocotyls and cotyledons were separated at each germination time and freeze-dried. β -glucosidase from the samples was extracted with citrate buffer containing NaCl (0,1M, pH 4,5). Soluble protein content was determined as described by LOWRY, et. al. (1951) and expressed as g per 100 g of sample in dry basis (%). β -glucosidase activity was determined using p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as substrate, as described by Matsuurra and Obata (1993) and expressed as units of activity per gram of sample in 30 minutes in dry basis (UA.g⁻¹). β -glucosidase specific activity was the ratio between β -glucosidase activity and soluble protein content and it was expressed as UA per milligram of soluble protein (UA.mg⁻¹).

Introduction

β -glucosidase (β -D-glucoside glucohydrolase, E.C.3.2.1.21) hydrolyses β -D-glucosides releasing glucose and forming aglycone isoflavones that are more bioavailable than the glycosides. Isoflavones are compounds with benefits for human health and they are the mainly forms of glycosides in vegetables. The β -glucosidase could be originated from the metabolism either of fungi or bacteria or vegetables as soybean. The aim of this work was to investigate the β -glucosidase activity in soybeans hypocotyls and cotyledons during 168 h of germination to obtain an alternative source of enzyme.

Results and Discussion

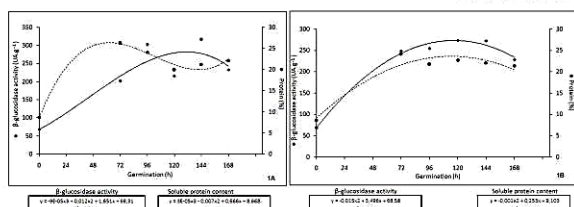


Fig. 1: Protein content and β -glucosidase activity in dry basis of cotyledons in different periods of germination with light (1A) and without light (1B)

In cotyledons of soybean seeds before germination, the protein content was 15.36%, the β -glucosidase activity, 146.64 UA.g⁻¹ and the specific activity, 0.97 UA.g⁻¹ SP.

The β -glucosidase activity from hypocotyls was higher at 72 h either in samples germinated with (206,45 UA.g⁻¹) or without light (231,61 UA.g⁻¹) and started to decline at 96 h of germination in both treatments (Fig 1).

Differently, the β -glucosidase activity from cotyledons increased from 72 h of growth to present the maximum activity at 144 h (317.11 UA.g⁻¹). At 168 h the β -glucosidase activity started to decline.

Table 1: β -glucosidase specific activity in dry basis of cotyledons and hypocotyls in different germination times with and without light (UA.mg⁻¹).

Germination time(h)	β -glucosidase specific activity (UA.mg ⁻¹)			
	Cotyledons		Hypocotyls	
	With Light	Without light	With Light	Without light
72	1,37 ± 0,36	1,68 ± 0,11	0,53 ± 0,05	1,10 ± 0,15
96	1,26 ± 0,21	1,22 ± 0,09	1,83 ± 0,33	1,72 ± 0,02
120	1,35 ± 0,12	1,33 ± 0,14	2,98 ± 0,21	5,50 ± 0,05
144	1,50 ± 0,22	1,31 ± 0,06	3,75 ± 0,57	3,29 ± 0,19
168	1,14 ± 0,16	1,07 ± 0,10	14,50 ± 1,83	2,89 ± 0,48

Values with different superscript in the same column are significantly different at p<0.05

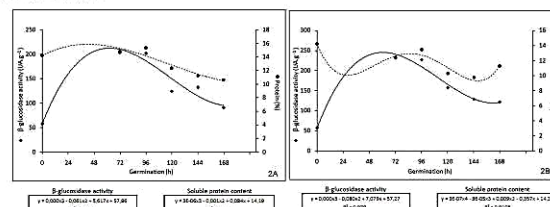


Fig. 2: Protein content and β -glucosidase activity in dry basis of hypocotyls in different periods of germination with light (2A) and without light (2B)

The specific activity (Table 1) was higher at 144h of light germination (2.16 UA.g⁻¹ SP) for hypocotyls and at 72h of germination without light (1.68 UA.g⁻¹ SP) for cotyledons.

The cotyledons are the reserve of nutrients and during development the photosynthesis can give some energetic advantages. This advantage confers accelerated growth allowing the plant to become self-sufficient quickly and be able to respond to environmental conditions.

In plants, β -glucosidase activity involves the mechanisms of defense against microbes, insects and parasitic plants. This could explain why germinated seeds without light have lower levels of β -glucosidase activity.

CONCLUSION

Enzyme activity of cotyledons at 144 h of light germination was 2.16 times higher than before germination and 1.37 times higher than hypocotyls germinated without light, showing that cotyledons from soybean germinated with light over 144h would be better than hypocotyls as a good source of β -glucosidase.

References

- ESEN, A. *Plant Physiol.*, v. 98, p. 174-182, 1992.
BROUNS, *Food Res. Int.*, v. 35, p. 187-193, 2002.
ZHANG, *J. Nutr.*, Bethesda, v. 133, n. 9, p. 2874-2878, 2003.
LOWRY, et al. 1951. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
RIBEIRO, M. L. et al. *J. Food Biochem.*, v. 30, p. 453-486, 2006.
LAMARTINIÈRE, C. A. et al. *BioSci Biotech Biochem.* v. 66, n. 1, p. 22-28, 2002.
LIGGINS, et al. *British J. Nutr.*, v. 84, p. 717-725, 2000.
SETCHELL et al., *J. Nutr.*, v. 131, p. 1362S-1375S, 2001.
MATSUURA & OBATA, *J. Food Sci.*, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
VILAS-BOAS, et al. *Ciênc. Agrotec.*, v. 26, n. 1, p. 148-156, 2002.

Acknowledgements



BIO 022



Influência da temperatura e pH sobre a extração da enzima β -glicosidase do epicótilo de soja germinada



MADEIRA, T. B., YOSHIARA, L. Y., IDA, E. I.
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
UEL – ROD. CELSO GARCIA CID, KM 380 - CEP: 86051-990, LONDRINA, PR, BRASIL.
E-MAIL: TIAGO_WARTA@HOTMAIL.COM

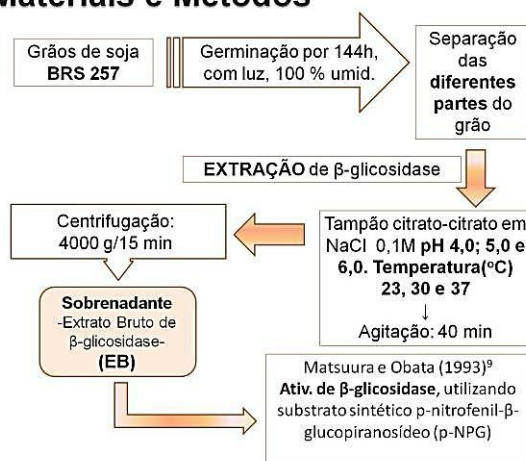
Introdução

A β -glicosidase catalisa a hidrólise de ligações β -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos, como as isoflavonas, com liberação de glicose originando agliconas. É comumente encontrada em vegetais como a soja ou produzida por alguns tipos de microrganismos¹.

As isoflavonas da soja têm sido amplamente descritas devido à suas atividades biológicas como, estrogênica, antioxidante e antitumoral ou atuação em doenças como osteoporose². As isoflavonas de fontes vegetais são encontradas em sua grande maioria, na forma glicosilada, porém a atividade biológica é mais acentuada na forma aglicona³.

Considerando a importância desta enzima, o objetivo deste estudo foi determinar a influência dos parâmetros temperatura (X_1) e pH (X_2) na etapa de extração por 40 min da β -glicosidase do epicótilo de soja cultivar BRS 257 germinado na presença de luz por 144h e 100% umidade relativa. Foi utilizado um planejamento experimental fatorial 3^2 com três repetições no ponto central. As função resposta observada (Y) e estimada (\hat{y}) foram expressas como atividade de β -glicosidase (UA.min⁻¹). As análises estatísticas foram realizadas com o software Estatística 5.0.

Materiais e Métodos



Resultados e Discussão

Pela análise de variância (ANOVA), as variáveis independentes temperatura (X_1) e pH (X_2) foram significativas ($p < 0,05$) sobre a atividade da enzima β -glicosidase. O modelo polinomial que melhor representou a atividade de β -glicosidase (Y) é dado pela equação conforme segue:

$$\hat{y} = 5,82 - 0,50x_1 + 0,98x_1^2 + 2,59x_2 - 1,72x_2^2 - 0,015x_1x_2 \quad (R^2=0,9672)$$

O modelo indica que as variáveis temperatura (X_1) e o pH (X_2) tem influência negativa e positiva respectivamente sobre a extração da enzima β -glicosidase.

Tabela 1. Ensaios de extração da β -glicosidase do epicótilo de soja cultivar BRS 257 germinado na presença de luz por 144h, função resposta observada (Y) e estimada (\hat{y}).

Ensaios de Extração*	X_1 Temperatura (°C)	X_2 pH	Y Atividades (UA.min ⁻¹)	\hat{y} Atividades (UA.min ⁻¹)
1	23	4,0	2,48	2,98
2	23	5,0	8,07	7,32
3	23	6,0	7,96	8,20
4	30	4,0	1,80	1,50
5	30	5,0	5,81	5,83
6	30	5,0	5,80	5,83
7	30	5,0	5,78	5,83
8	30	6,0	6,49	6,70
9	37	4,0	2,20	1,99
10	37	5,0	5,64	6,30
11	37	6,0	7,62	7,16

Nas condições de ensaio, as melhores condições de extração da β -glicosidase do epicótilo de soja germinado na presença de luz por 144h foi observada nos ensaios 2 e 3 onde os parâmetros temperatura (X_1) e pH (X_2) de extração, foram 23°C e 5,0, e 23°C e 6,0, respectivamente. Conforme pode ser observado na fig. 1 e previsto pelo modelo matemático.

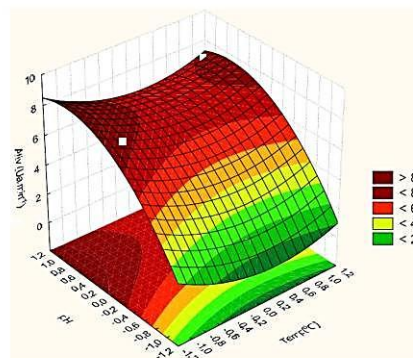


Figura 1: Superfície de resposta para atividade da β -glicosidase extraída em diferentes condições de temperatura e pH

Conclusão

A atividade da β -glicosidase extraída a partir de epicótilos de soja germinada, foi avaliada por um modelo matemático com bom ajuste aos dados experimentais. Nas condições de ensaio a maior extração da enzima β -glicosidase ocorreu quando as condições de extração, temperatura (x_1) e pH (x_2), foram 23°C e 5,0, respectivamente.

- Referências**
1. Esen, A. *Plant Physiol.* 1992, 98, 174-182.
 2. Lamartiniere, C.A., et al. *Biosci Biotech Bioch.* 2002, 66, 1, 22-28
 3. Park Y. K., et al. *Cien. Tec. Alim.* 2001, 3(3), 156-160.

Agradecimentos





EXTRAÇÃO DE ISOFLAVONAS GLICOSILADAS E AGLICONAS DE SOJA UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO CENTRÓIDE-SIMPLEX



Yoshiara, Luciane Yuri; Madeira, Tiago Bervelier; Ida, Elza Louko

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR - Brasil

INTRODUÇÃO

As isoflavonas comportam-se como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, especialmente em sintomas da menopausa e osteoporose (1). Em adição à sua atividade anti-estrogênica, estes compostos possuem diversas propriedades, principalmente antitumoral (1,2), antioxidante (3) e antimutagênica (4). O grão de soja contém as quatro diferentes formas de isoflavonas, como as glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina), malonilglicosiladas (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) e na forma não conjugada como as agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) (5) que constituem as 12 diferentes formas (6).

Para recomendações nutricionais é importante conhecer o teor dessas substâncias em alimentos. Entretanto, há necessidade de desenvolver e aperfeiçoar os métodos de extração e quantificação destas diferentes formas de isoflavonas. Devido a diferentes estruturas químicas das isoflavonas e seus radicais, a polaridade de cada forma é característica (6) e, portanto estas propriedades são relevantes e devem ser consideradas para extrações e quantificações.

Assim, o objetivo deste estudo foi estabelecer a melhor condição de extração de isoflavonas glicosiladas e agliconas utilizando o planejamento experimental do tipo centróide-simplex com quatro componentes (água, acetona, etanol e acetoneitrila) de diferentes graus de polaridade.

MATERIAL E MÉTODO

Foram pesados 0,5 g de farinha desengordurada de cotilédono soja (BRS 257) e adicionados 25 mL de cada solvente extrator, preparado seguindo o planejamento experimental do tipo centróide-simplex com quatro componentes (7,8): (A) água, (B) acetona, (C) etanol e (D) acetoneitrila, totalizando 15 diferentes composições de solventes, sendo que quatro corresponderam aos solventes puros água, acetona, etanol e acetoneitrila, seis foram misturas de volumes iguais desses solventes, quatro corresponderam a misturas ternárias desses solventes e um ponto central com mistura de volumes iguais dos quatro solventes.

A extração foi realizada por banho ultrassônico e temperatura controlada de 60°C. Os extratos centrifugados e filtrados em filtros de 0,20 µm e 20 µL foram utilizados para separação e quantificação das isoflavonas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo Berhow (9), com algumas modificações. Os sobrenadantes foram eluídos em coluna de fase reversa (ODS (M) C18 (Shimadzu, 4 mm x 15 cm, partículas de 5 µm) com um sistema de gradiente inicial de 100% de água acidificada (pH 3,0) e 0% de acetoneitrila. Em 25 min de eluição, foi atingida uma proporção de 45% de água e 55% de acetoneitrila. Em 27 min o gradiente atingiu 100% de acetoneitrila, retomando as condições iniciais em 35 min. As isoflavonas foram separadas e detectadas a 260nm, identificadas e quantificadas por comparação com curvas padrão de daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína e genisteína (Sigma-Aldrich). As funções-respostas foram expressas em mg/g de amostras e considerada como isoflavonas glicosiladas, a soma do teor de glicitina, daidzina e genistina e as isoflavonas agliconas, a soma do teor de gliciteína, daidzeína e genisteína. Os resultados foram processados, realizadas as análises de regressão e construídas as superfícies de respostas utilizando o programa STATISTICA 7.0 (10).

CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer a melhor condição de extração de isoflavonas utilizando o planejamento centróide-simplex cujos modelos matemáticos tiveram bons ajustes ($R^2 > 0,77$) aos dados experimentais. As melhores combinações de solventes para extração de isoflavonas foram água-etanol-acetoneitrila (1:1:1;v:v:v) para as glicosiladas e água-acetona (1:1;v:v) para as agliconas.

REFERÊNCIAS

- 1 Liggins J, Black LJC, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA. Daidzein and Genistein Contents of Vegetables. *British J. Nutr.* 2000; 84:717-725.
- 2 Lamartiniere CA, Moore J, Holland M, Barnes S, Lai H, Yen G. Neonatal Inhibitory Effect of Isoflavones on Peroxynitrite-Mediated Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Biosci Biotech Biochem.* 2002; 66(1):22-28.
- 3 Park YK, Aguiar CL, Alencar SM, Mascarenhas HAA, Scamparini ARP. Avaliação Do Teor De Isoflavonas em Soja Brasileira. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2001; 3(3):156-160.
- 4 Miyazawa M, Sakano K, Nakamura S, Kosaka H. Antimutagenic activity of isoflavones from soybeans seeds (*Glycine max* Merrill). *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47:1346-1349.
- 5 Park YK, Aguiar CL, Alencar SM, Mascarenhas HAA, Scamparini ARP. Conversão De Malonil-glicosil isoflavonas em isoflavonas Glicosiladas Presentes em Alguns Cultivares de Soja Brasileira. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2002; 22(2):130-135.
- 6 Ribeiro MLL, Mandarino JMG, Carrao-Panizzi MC, Oliveira MCN, Campo CBH, Nepomuceno AL, et al. β -Glucosidase Activity and Isoflavone Content in Germinated Soybean Radicles and Cotyledons. *J Food Biochem.* 2006; 30:453-466.
- 7 Luthnia DL, Bitwase R, Natarajan S. Comparison of Extraction Solvents and Techniques Used for the Assay of Isoflavones from Soybean Analytical. *Nutritional And Clinical Methods.* 2007; 105:325-333.
- 8 Benício-Neto B, Scaminio IS, Bruns RE. Círculo Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. Campinas: Editora Unicamp, 2003.
- 9 Berhow MA. Modern Analytical Techniques for Flavonoid Determination: Flavonoids in the Living Cell. V. 505 (S. Buslig, J.A.E. Mantney, Eds. Jp. 61-76). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, 2002.
- 10 Statsoft, Inc. 2007. *Statistica (Data Analysis Software System)*, Version 8.0. www.statsoft.com.
- 11 Hanjo B, Wibowo C, Zhang E, Luo KQ, Ng KM. Development of Process Alternatives for Separation and Purification of Isoflavones. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2007; 46:181-189.
- 12 Alcandria MR, Almeida SA, Maia PP, Carvalho HA, Azevedo L, Vieira EP. Soja Transgênica BRS243: Determinação de Macro nutrientes e das Isoflavonas Daidzeína e Genisteína por CLAE. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2008; 28(3):520-526.
- 13 Horii K, Adachi T, Matsuda T, Tanaka T, Sahara H, Shibasaki S, et al. Improvement of Isoflavone Aglycones Production Using β -Glucosidase Secretory Produced in Recombinant *Aspergillus Oryzae*. *J Molec Catal B: Enzymatic.* 2008; 69:297-301.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as duas funções-respostas analisadas, Y_1 = mg de isoflavonas glicosiladas extraídas/g de amostras e Y_2 = mg de isoflavonas agliconas extraídas/g de amostras, o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o modelo cúbico especial (Equações 1 e 2) de R^2 de 0,97 e 0,77, respectivamente.

$$Y_1 = 0,6542*(A) + 0,0310*(AC) + 0,0588*(E) + 0,0050*(ACN) + 3,7499*(A)(AC) + 8,5283*(A)(E) + 6,3244*(A)(ACN) - 23,1208*(A)(AC)(E) - 3,6062*(A)(AC)(ACN) + 14,5734*(A)(E)(ACN) + 6,4435*(A)(E)(ACN). \quad \text{Equação 1}$$

$$Y_2 = 2,9305*(A) + 0,1168*(AC) + 0,1943*(E) + 0,1486*(ACN) + 10,3401*(A)(AC) - 4,8890*(A)(E) - 4,5698*(A)(ACN) + 67,1905*(A)(E)(ACN) - 21,8799*(AC)(E)(ACN). \quad \text{Equação 2}$$

Onde, *significativo ($p < 0,05$), A (água), AC (acetona), E (etanol), ACN (acetoneitrila)

Os solventes utilizados no planejamento, em ordem decrescente de polaridade, foi água, acetoneitrila, etanol e acetona. Considerando os radicais químicos, foi possível verificar qual a forma de isoflavona foi mais polar. Assim, as isoflavonas glicosiladas foram as mais polares do que as agliconas, sendo melhor extraídas pela mistura de maior polaridade, uma combinação ternária de água, etanol e acetoneitrila. Já as isoflavonas menos polares, as agliconas, por uma combinação menos polar (água:acetona, 1:1 v/v).

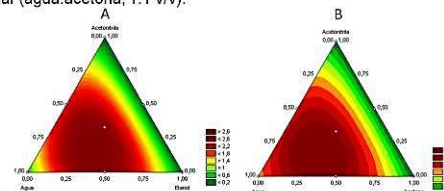


Figura 1: Superfícies de resposta das extrações de (A) Isoflavonas glicosiladas e (B) Isoflavonas agliconas.

Assim, utilizando o planejamento experimental do tipo centróide-simplex, foi possível estabelecer a melhor condição de extração de isoflavonas glicosiladas e agliconas (Figura 1). Com exceção da água, as extrações que utilizaram os solventes em suas formas puras, não apresentaram bons resultados de extração e a condição mais vantajosa foi a utilização de combinações binárias ou ternárias desses quatro solventes.

Muitos estudos utilizaram o metanol para extração de isoflavonas (3, 11), ou ressusponderam em metanol uma extração prévia feita com acetoneitrila, ou utilizaram uma solução extratora acidificada (12), ou utilizaram uma solução de etanol (13) e todas com um tempo maior de extração. Portanto, o modelo proposto mostrou-se vantajoso por consumir pouco tempo e dispensar etapas de secagem e ressuspenção de amostra.

Agradecimentos:



XVII ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS (ENAAL) E III CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS – CUIABÁ-MT, JUL/2011.



EXTRAÇÃO DE β-GLICOSIDASE DE EPICÓTILOS DE SOJA (*GLYCINE MAX*) GERMINADA

Tiago B. MADEIRA*; Luciane Y. YOSHIARA; Elza I. IDA

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

*tiago_warta@hotmail.com



INTRODUÇÃO

A soja pertence à família das leguminosas e é utilizada como fonte alimentar há mais de 5.000 anos devido ao seu elevado valor proteico (GOMES et al., 2005). Além disso, também possui em sua composição química, compostos polifenólicos como as isoflavonas que possuem importantes propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante (ESAKI et al., 1999), anti-fúngica (NAIM et al., 1974), anti-carcinogênica (COWARD et al., 1993) e estrogênica (MURPHY, 1982).

O teor de isoflavonas na soja varia de 0,1 a 0,5 mg/g (COWARD et al., 1993) e podem ser utilizados como substratos da enzima β-glicosidase. As glicosil isoflavonas como a glicetina, genisteína e daidzeína são as principais formas encontradas no grão de soja, constituindo de 50 a 90% dos flavonoides e possuem menor atividade biológica do que as suas formas agliconas como a glicetina, genisteína e daidzeína (ELDRIDGE, 1982; FUKUTAKE et al., 1996).

A β-glicosidase catalisa a hidrólise de ligações β-glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos e outros conjugados glicosídicos, como as isoflavonas, com liberação de glicose, originando as agliconas. Esta enzima é comumente encontrada em vegetais como a soja e também pode ser produzida por alguns tipos de microorganismos (ESEN, 1992).

Durante o processo de germinação dos grãos, ocorre a ativação de enzimas como a β-glicosidase, aumentando o teor de isoflavonas agliconas (SANTOSH et al., 1999). A obtenção desta enzima a partir do cotilédono de soja com atividades relativamente altas da β-glicosidase foi observada em outras partes da planta como, radícula, raízes e epicótilo (RIBEIRO et al., 2006; YOSHIARA et al., 2011). A β-glicosidase endógena de soja ou dos componentes do grão germinado podem ser extraídos e aplicados em produtos derivados de soja e utilizados como alimento com boas propriedades funcionais.

Devido à importância das isoflavonas agliconas de soja para a saúde humana e a obtenção destas formas é resultante da atividade de β-glicosidase, o objetivo deste trabalho foi encontrar as melhores condições de temperatura e pH para extração da β-glicosidase do epicótilo de soja germinado.

METODOLOGIA

Para germinação da soja, foram preparados rolos de papel Germitest contendo 50 sementes de soja (cultivar BRS 257, Embrapa Soja, Londrina-PR) e colocados em estufa climatizada a 35°C e 100% de umidade relativa, pelo período de 144 h com fotoperíodo de 10h de luz por dia. Após o período de germinação, os epicótilos foram separados manualmente, liofilizados, triturados e armazenados a -22°C até o momento da extração e determinação da atividade de β-glicosidase.

O planejamento experimental consistiu em cinco níveis para as variáveis independentes: temperatura do banho termostático (X₁) e pH de incubação (X₂) e na construção de um planejamento fatorial composto central, conforme apresentado na tabela 1.

Realizou-se um teste preliminar de extração da enzima β-glicosidase, visando a aplicação da metodologia de superfície de resposta e definiu-se o ponto central (30°C e pH 5,0) e o tempo de extração de 50 min. Para cada ensaio realizado, utilizaram-se 100 mg de epicótilo de soja triturado e liofilizado em 1,5 ml de tampão citrato-citrato 0,1 M contendo NaCl 0,1 M nos respectivos pHs e temperaturas dos ensaios. Seguiu-se a proporção amostra:solução tampão em 1:15, conforme Carrão-Panizzi e Bordignon (2000).

A função-resposta (Y igual a UA.min⁻¹) foi a atividade da β-glicosidase extraída em cada ensaio. Foi quantificada utilizando-se o substrato sintético p-nitrofenol-β-D-glucopiranosídeo conforme descrito por Matsuura e Obata (1993) e expressa em unidades de atividade de enzima por minuto (UA.min⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em duplicatas genuínas e as análises estatísticas foram realizadas pelo programa STATISTICA 7.0 da StatSoft, Inc., programado em sistemas Microsoft Windows para PC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância (ANOVA), as variáveis independentes temperatura (X₁) e pH (X₂) foram significativas (p<0,05) sobre a atividade da enzima (Tabela 2) e o modelo polinomial que melhor representou a atividade de β-glicosidase é dado pela Equação 1.

$$Y = 11,38 + 0,18(X_1) - 1,29(X_1)^2 - 1,97(X_2) - 3,48(X_2)^2 + 0,12(X_1)(X_2) \text{ (Equação 1). } (R^2 = 0,937)$$

Onde X₁ e X₂ são as variáveis codificadas de temperatura e pH, respectivamente.

O coeficiente de determinação alcançado (R² ajustado) foi igual a 0,937. Jokleja e May (1987) sugerem que para um bom ajuste de modelo, o R² ajustado deve estar em pelo menos de 0,80. Portanto, pode-se afirmar que o modelo polinomial obtido apresentou um bom ajuste aos dados experimentais.

As Figuras 1 e 2 apresentam as regiões de temperatura (X₁) e pH (X₂) que corresponderam às melhores condições de extrações da enzima β-glicosidase (Y).

As condições de temperatura (X₁) e pH (X₂) definidas como ponto central do experimento de 30°C e pH 5,0, coincidiram com as condições de máxima extração da enzima β-glicosidase previstas pelo modelo empírico. As condições de máxima extração encontradas foram coerentes com as empregadas por Carrão-Panizzi; Bordignon (2000), que utilizaram solução tampão citrato-citrato 0,05M contendo NaCl 0,1M à temperatura ambiente e pH 4,5 para extração da β-glicosidase do cotilédono de diferentes cultivares de soja.

Diferentemente, Matsuura e Obata (1993) realizaram a extração desta enzima a partir do cotilédono de soja, utilizando tampão fosfato-fosfato 0,1 M pH 6,6 com temperatura entre 5 e 10°C, com posterior centrifugação e acidificação do sobrenadante até pH 5,0, o qual foi novamente centrifugado para obtenção do extrato bruto de β-glicosidase. Necessitando, portanto, de um tempo maior de extração e temperaturas reduzidas.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a obtenção da β-glicosidase a partir do epicótilo de soja germinada. O modelo proposto mostrou-se vantajoso por dispensar etapas de extração e centrifugação a baixas temperaturas e obtenção de considerável atividade da β-glicosidase em um período relativamente curto a partir de uma pequena quantidade de amostra.

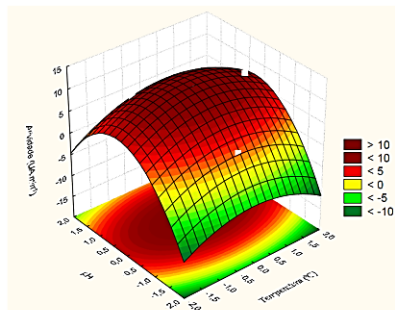


Figura 1. Superfície de resposta para extração da β-glicosidase a partir do epicótilo de soja germinada.

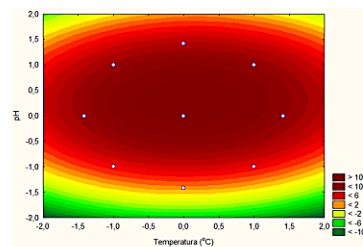


Figura 2.: Região de maior atividade de β-glicosidase e pontos experimentais indicados

Tabela 1. Planejamento composto central com duas variáveis e respectivas respostas da atividade da β-glicosidase extraída.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis não codificadas		Função Resposta (Y) Atividade de β-glicosidase (UA.min ⁻¹)
	X1	X2	T(°C)	pH	
1	-1	-1	25,0	4,0	4,08 ± 0,05 ^e
2	-1	1	25,0	6,0	8,83 ± 0,12 ^c
3	1	-1	35,0	4,0	3,11 ± 0,02 ^h
4	1	1	35,0	6,0	8,36 ± 0,04 ^d
5	0	0	30,0	5,0	11,18 ± 0,01 ^a
6	0	0	30,0	5,0	11,49 ± 0,02 ^a
7	0	0	30,0	5,0	11,49 ± 0,00 ^a
8	-1,41	0	23,0	5,0	8,26 ± 0,05 ^d
9	1,41	0	37,0	5,0	10,33 ± 0,12 ^b
10	0	-1,41	30,0	3,6	2,88 ± 0,04 ^h
11	0	1,41	30,0	6,4	6,97 ± 0,21 ^f

Os valores da função resposta (Y) estão expressos por média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) para a extração da β-glicosidase do epicótilo de soja germinada

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F	P	R ²
T (linear)	0,558	1	0,558	0,659	0,428	0,937
T (quadrático)	19,038	1	19,038	22,492	0,002	
pH (linear)	62,340	1	62,340	73,650	0,000	
pH (quadrático)	137,038	1	137,038	161,900	0,000	
Interação T x pH	0,120	1	0,120	0,142	0,711	
Erro	13,543	16	0,846			
Total	214,527	21				

CONCLUSÃO

A partir do epicótilo de soja germinada, as melhores condições de extração da enzima β-glicosidase foram avaliadas pelo modelo proposto com bom ajuste aos dados experimentais. A melhor extração de β-glicosidase, prevista pelo modelo e obtida experimentalmente, ocorreu na temperatura de 30°C e pH igual a 5,0.

REFERÊNCIAS

CARLÓ-ROZAS, M. C.; BALSALONCA, J. A. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultures affected by the environment. *Food Agric. Environ. Sci.* v. 5, p. 479-478, 2000.
 COWARD, R.; BARNES, F. C.; FLETCHER, R. E.; O'BRIEN, J. Genistein, daidzein, and their β-glucoside conjugates: anticarcinogenic activities in rat liver. *Food Cosmet. Toxicol.* v. 19, p. 1041-1045, 1981.
 ELDRIDGE, A. C. Determination of isoflavone in soybean flour, protein concentrate, and isolates. *J. Amer. Chem. Soc.* v. 80, p. 1888, 1958.
 ENRIK, M.; KAWABATA, S.; MURAKAMI, T. The present utilization of soybean products in human nutrition. *Brazil. Biotechnol. Biochem.* v. 43, p. 323-329, 1996.
 ENRIK, M. Purification and partial characterization of isoflavone β-D-glucosidase. *Plant Physiol.* v. 10, p. 174-182, 1972.
 FUKUTAKE, M.; YOSHIARA, L. Y.; PEREIRA, N. C. Determinação da Atividade da Enzima β-Glicosidase do Feno de Soja Desidratado e da Soja. *10º Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Saúde e Meio Ambiente*, 2006, Campinas, SP, UNICAMP, p. 1 - 6, 2006.
 GOMES, M. C.; PEREIRA, N. C. β-Glicosidase from soybean cotyledons and germination. *Food Chem.* v. 94, p. 457-461, 1996.
 JOKLEJA, J.; MAY, J. P. *Statistical Quality Design of Experiments*. Marcel Dekker, Inc., p. 407-466, 1987.
 MURPHY, G. H. β-Glucosidase from soybean cotyledons and germination. *Food Chem.* v. 10, p. 249-254, 1982.
 MURPHY, G. H. Purification and partial characterization of isoflavone β-D-glucosidase. *Food Chem.* v. 10, p. 457-461, 1996.
 NAIM, M.; GÖZTEPE, E.; ZILGIN, S.; BIRK, F. Isoflavone β-D-glucosidase: purification, characterization and antigenic activity. *J. Appl. Food Chem.* v. 22, p. 808-812, 2004.
 RIBEIRO, M. L.; MACHADO, M. G.; CARLÓ-ROZAS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CARVALHO, B. H.; PEREIRA, N. C.; PEREIRA, A. L.; IDA, E. I. β-Glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean isolates and cotyledons. *Food Biotech.* v. 30, p. 453-466, 2006.
 SANTOSH, B.; BHARGAVANARAYANA, K. P.; LAKSHMI, K. Enhancement of isoflavone and β-glucosidase activities in germinated soybean protein concentrate by application of biotechnology. *J. Appl. Food Chem.* v. 19, p. 1041-1045, 1999.
 STATSOFT. *STATISTICA for Windows*. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2007. versão 7.0. CD-ROM Windows System.
 YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; PEREIRA, N. C.; CARLÓ-ROZAS, M. C.; IDA, E. I. A comparison of the β-glucosidase activity of soybean (Glycine max) radicles, epicotils, hypocotyls and cotyledons in various stages of germination. *J. Food Biotech.* v. 2002.

Agradecimentos





XI ERSCTA

9 a 11
de outubro
de 2011

Realização



Organização



XI Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos

PRÊMIO sbCTA-PR DE INCENTIVO À PESQUISA RENATO JOÃO SOSSELA DE FREITAS

Certificamos que o trabalho

EXTRAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE EPICÓTILOS DE SOJA (GLYCINE MAX) GERMINADA

de autoria de

TIAGO MADEIRA; LUCIANE YOSHIARA; ELZA IDA

foi contemplado com o **4º Lugar** no XI Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos – XI ERSCTA, realizado no período de 09 a 11 de outubro de 2011, no Centro de Eventos CIETEP/FIEPR, em Curitiba – PR.

Curitiba, 11 de outubro de 2011

Sônia Cachoeira Stertz
Presidente do XI ERSCTA

Rupércio Alvares Cançado
Coordenador da Comissão Científica do XI ERSCTA

PREMIAÇÃO RECEBIDA PELO TRABALHO APRESENTADO NO XI ENCONTRO REGIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, CURITIBA / PR, 9 A 11 DE OUTUBRO DE 2011



XX Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC XX Encontro de Pesquisa – EPUEPG

LUMINOSIDADE, FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FARINHA DE SOJA INTEGRAL TORRADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Tiago Bervelieri Madeira (IC/CNPq), Luciane Yuri Yoshiara (Doutoranda/CNPq-UEL), Josemeyre Bonifácio da Silva (Pós-Doutoranda/CNPq-UEL) Elza Louko Ida (Orientador), e-mail: elida@uel.br.

Universidade Estadual de Londrina/Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/Centro de Ciências Agrárias

Ciências Agrárias/ Ciência e Tecnologia de Alimentos - 5.07.00.00-6.

Palavras-chave: compostos fenólicos, *Glycine max*, sequestro de radicais livres

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a luminosidade, teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante de farinha de soja integral e torrada em condições diferentes de temperaturas. A luminosidade foi avaliada pelo parâmetro L*, a capacidade antioxidante pelo método do sequestro de radicais livres DPPH• e o teor de compostos fenólicos solúveis pelo método espectrofotométrico. A luminosidade da farinha de soja integral e torrada diminuiu com elevadas temperaturas, enquanto que o teor de compostos fenólicos e percentual de inibição do radical DPPH• aumentou significativamente quando a farinha de soja integral foi preparada com elevadas temperaturas.

Introdução

A soja contém nutrientes que são benéficos para a saúde humana e, portanto é considerada como um alimento funcional. É rica em proteínas, contém isoflavonas, saponinas, fitatos, inibidores de protease, fitosteróis, peptídeos com baixo peso molecular, oligossacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados, que auxiliam na redução de riscos de doenças crônicas e degenerativas. Também, possui uma boa fonte de minerais como ferro, potássio, magnésio, zinco, cobre fósforo, manganês e vitaminas do complexo B (CARRÃO-PANIZZI et al., 1998).

Os alimentos de origem vegetal apresentam compostos não-nutrientes (fitoquímicos) com atividades biológicas conhecidas como promotoras da saúde, tais como atividades antioxidante, antiinflamatória e hipocolesterolêmica. Entre estes, podem ser citadas os compostos fenólicos e as isoflavonas da soja (HARBONE et al., 2000).

A farinha de soja integral tem sido utilizada em estudos relacionados aos efeitos positivos das substâncias presentes à saúde humana (WATANABE et al., 1998). Esses benefícios estão associados aos compostos fenólicos, principalmente às isoflavonas presentes na soja. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a luminosidade, teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante de farinha de soja integral preparada em diferentes temperaturas de tostagem.

Materials e métodos



XX Encontro Anual de Iniciação Científica - EAIC X Encontro de Pesquisa - EPUEPG

A farinha torrada de soja integral foi preparada a partir de 10 g de grãos de soja moídos (BRS 257) e tostada por 10 min em equipamento medidor de umidade por radiação infravermelha com temperaturas de: 105 °C, 125 °C, 145 °C, 165 °C e 185 °C. As farinhas de soja integrais obtidas foram avaliadas quanto à luminosidade (L^*) com colorímetro digital para verificação da torra. Em seguida, foi desengordurada com hexano por 30 min para análises do teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante.

Determinação do teor de compostos fenólicos

Para extração de compostos fenólicos segundo Adom et al. (2002), foram adicionados 10 mL de etanol 80% em 1 g de farinha desengordurada e precedeu-se agitação por 20 min em mesa agitadora a temperatura ambiente. A mistura obtida foi centrifugada em 2500 g e obtido o sobrenadante contendo os compostos fenólicos livres. Repetiu-se esse procedimento mais duas vezes e os sobrenadantes foram combinados e concentrados em rotaevaporador até 10 mL de extrato. Em seguida, o teor de compostos fenólicos foi determinado de acordo com Swain et al. (1959) utilizando reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente em ácido gálico em 100 g de amostra (mg EAG/100 g).

Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo sequestro do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra. A metodologia para determinação da capacidade doadora de íons hidrogênio ao radical livre estável DPPH foi feita segundo descrito por Brand-Williams et al. (1995) e o resultado expresso em % de inibição do radical DPPH.

Resultados e Discussão

O parâmetro L^* , ou seja, a luminosidade das amostras (Tabela 1) diminuiu conforme o aumento de temperatura do tratamento térmico na elaboração do produto, devido à reação de Maillard ou escurecimento não enzimático resultante da presença de aminoácidos e açúcares redutores das farinhas submetidas à torra. Na reação de Maillard é provável que os compostos fenólicos participam da reação tornando-se parte dos polímeros marrons, solúveis em água, denominados de melanoidinas (NUNES et al., 2001). Além disso, pode ocorrer a conversão de compostos fenólicos insolúveis em solúveis, após o tratamento com calor, contudo o mesmo não consegue romper as ligações covalentes dos compostos fenólicos (LEE et al., 2003) o que se pode explicar pelo aumento do teor de compostos fenólicos das farinhas de soja integrais na medida em que aumentou a temperatura de torra (Tabela 1).

Com relação à avaliação da capacidade antioxidante pelo percentual de inibição do radical DPPH, observou-se um aumento da capacidade antioxidante das farinhas de soja integral processadas em temperaturas mais elevadas.

Tabela 1 – Luminosidade, percentual de inibição DPPH e teor de compostos fenólicos de farinha de soja integral torrada em diferentes temperaturas.

Amostra	L^*	% inibição	Fenólicos (mg)
---------	-------	------------	----------------



XX Encontro Anual de Iniciação Científica - EAIC XX Encontro de Pesquisa - EPUPEG

		DPPH	EAG/100g)
T0	48,27±2,09 ^a	31,69±1,71 ^c	156,07±3,65 ^d
105	45,81±3,48 ^{a,b}	30,98±1,43 ^c	166,51±3,65 ^c
125	41,17±4,63 ^{a,b}	35,80±2,21 ^{b,c}	189,82±0,17 ^b
145	39,30±2,56 ^b	36,16±2,37 ^{b,c}	190,52±3,65 ^b
165	29,40±1,90 ^c	41,56±0,73 ^b	206,70±8,21 ^b
185	17,56±1,21 ^d	54,97±3,53 ^a	256,46±12,99 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). L*: parâmetro de luminosidade. T0 refere-se à farinha de soja integral antes do tratamento térmico.

De acordo com Turkmen et al. (2005) o calor empregado no processo de torra é suficiente para inativar as peroxidases que atuam como pró-oxidantes. Por outro lado, podem favorecer a formação de novos compostos, como os produtos da reação de Maillard que têm ação antioxidante. A cocção em calor seco aumenta a ação antioxidante de hortaliças, por propiciar a formação de novos compostos com ação antioxidante (Sultana et al., 2008). De acordo com Melo et al. (2009) o calor aplicado não altera de forma drástica a capacidade antioxidante de hortaliças.

Assim, evidencia-se que os processos de calor podem não alterar, aumentar ou reduzir a ação antioxidante do alimento. Na situação em que se observa aumento da ação antioxidante no alimento, o processamento propicia a oxidação parcial do composto bioativo que exibe maior habilidade em doar o átomo de hidrogênio ao radical a partir do grupo hidroxil e/ou a estrutura aromática do polifenol que apresenta maior capacidade em suportar o deslocamento do elétron desemparelhado em volta do anel (NICOLI et al., 1999).

Conclusões

A atividade antioxidante com relação ao seqüestro do radical DPPH• e teor de compostos fenólicos aumentou significativamente com o aumento da temperatura de processamento na obtenção das farinhas de soja integral e torradas em diferentes temperaturas. O parâmetro de luminosidade das amostras decresceu com o aumento da temperatura.

Agradecimentos

TBM agradece à Universidade Estadual de Londrina e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

ADOM, K. K.; LIU, R. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 21, p. 6182-6187, 2002.



XX Encontro Anual de Iniciação Científica - EAIC
XX Encontro de Pesquisa - EPUEPG

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CARRAO-PANIZZI, M. C.; KITAMURA, K.; BELEIA, A. D.; OLIVEIRA, M. C. N. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybeans cultivars. **Breeding Science**, v. 48, p. 409-413, 1998.

EMBRAPA receitas básicas. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/receitas.php?grupo=1>>. Acesso em 26 de julho de 2011.

HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p.481-504, 2000.

LEE S. C.; KIM J. H.; JEONG S. M.; KIM D. R.; HA J U.; NAM K.C. Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of rice hulls. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4400-4403, 2003.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; SANTANA, A. P. M. Capacidade antioxidante de hortaliças submetidas a tratamento térmico.. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 85-95, 2009.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 3, p. 94-100, 1999.

NUNES, M. F., COIMBRA, M. A. Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from Green and roasted Arabica coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.4, p.1773-1782, 2001.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; IQBAL, S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. **International Journal of Food Science Technology**, v. 43, n. 3, p. 560-567, 2008.

SWAIN, T.; HILLIS, W. T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.135-144, 1959.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. The effect of cooking methods on phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 713-718, 2005.

WATANABE, S., YAMAGUCHI, M., SOBUE, T., TAKAHASHI, T., MIURA, T., ARAI, Y., MAZUR, W., WAHALA, K., ADLERCREUTZ, H. Pharmacokinetics of Soybean Isoflavones in Plasma, Urine and Feces of Men after Ingestion of 60 g Baked Soybean Powder (Kinako). **Journal of Nutrition**, 10, p. 1710-1715, 1998.

8713



Universidade
Estadual de Londrina

EXTRAÇÃO DE ISOFLAVONAS TOTAIS E AGLICONAS DE SOJA UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL CENTRÓIDE-SIMPLEX

YOSHIARA, Luciane Yuri; MADEIRA, Tiago Bavelieri, IDA, Elza Louko

Universidade Estadual de Londrina, Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Rod. Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 6001, CEP 86051-980 Londrina/PR. E-mail: elida@uel.br



INTRODUÇÃO: As isoflavonas comportam-se como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, especialmente em sintomas da menopausa e osteoporose além de possuírem propriedade antitumoral, antioxidante e antimutagênica. O grão de soja contém quatro diferentes formas de isoflavonas: glicosídicas (daidzina, genisteína e glicetina), conjugadas acetilglicosídicas (acetildaidzina, acetilgenisteína e acetilglicetina), conjugada malonilglicosídicas (malonildaidzina, malonilgenisteína e malonilglicetina) e agliconas (daidzeína, genisteína e gliceteína). Sendo que as agliconas possuem maior atividade biológica. O objetivo deste estudo foi melhorar a extração de isoflavonas totais e agliconas utilizando um planejamento experimental do tipo centróide-simplex com quatro componentes.

MATERIALE E MÉTODOS

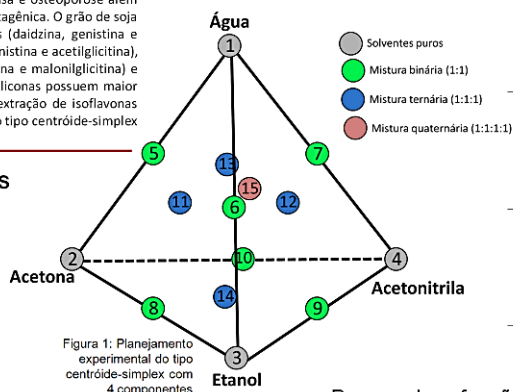
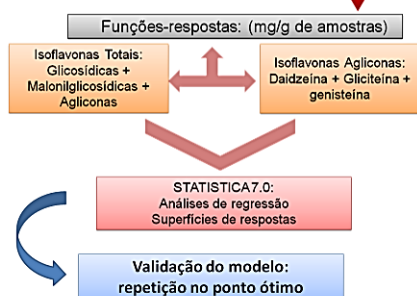
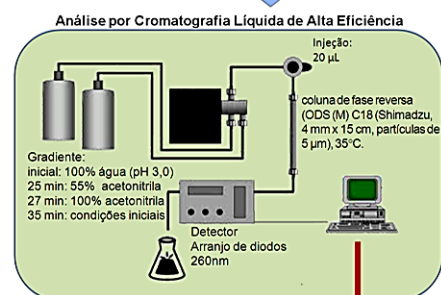
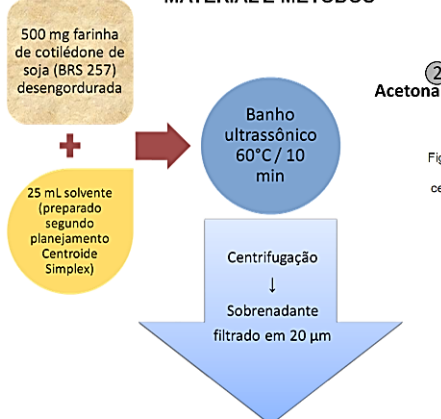


Figura 1: Planejamento experimental do tipo centróide-simplex com 4 componentes

RESULTADOS E DISCUSSÃO

$$Y_1 = 5,3773*(A) + 0,0716(AC) + 0,5450(E) + 0,222(ACN) + 26,4541*(A)(AC) + 9,6461*(A)(E) + 18,3563*(A)(ACN) + 56,2273*(A)(AC)(ACN) + 52,2587*(A)(E)(ACN) - 16,4713(AC)(E)(ACN)$$

$$Y_2 = 2,9305*(A) + 0,1168(AC) + 0,1943(E) + 0,1486(ACN) + 10,3401*(A)(AC) - 4,8890*(A)(E) - 4,5698*(A)(ACN) + 67,1905*(A)(E)(ACN) - 21,8799(AC)(E)(ACN)$$

Onde, *significativo ($p < 0,05$), A (água), AC (acetona), E (etanol), ACN (acetonitrila)

Para as duas funções-respostas ($Y_1 =$ mg de isoflavonas totais extraídas/g de amostra e $Y_2 =$ mg de isoflavonas agliconas extraídas/g de amostra) o modelo cúbico especial apresentou um bom ajuste aos dados experimentais com R^2 de 0,98 e 0,77, respectivamente.

As isoflavonas totais são mais polares do que as agliconas. A melhor extração das isoflavonas totais ocorreu com a mistura de maior polaridade, ou seja, água, etanol e acetonitrila. Enquanto que as agliconas foram melhor extraídas utilizando uma combinação menos polar, água:acetona (1:1 v/v).

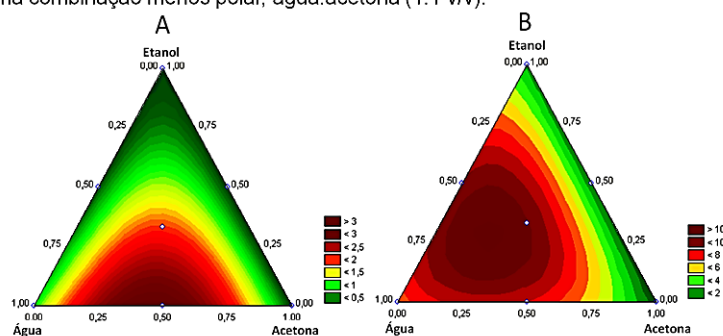


Figura 2: Superfícies de resposta das extrações de (A) Isoflavonas totais e (B) Isoflavonas agliconas.

Utilizando o planejamento experimental do tipo centróide-simplex (Figura 1) foi possível estabelecer a melhor condição de extração de isoflavonas totais e agliconas (Figura 2). A condição mais vantajosa para extração foram as combinações binárias ou ternárias dos quatro componentes. Os solventes em suas formas puras não apresentaram bons resultados de extração, com exceção da água. O modelo proposto mostrou-se vantajoso por definir uma melhor combinação de solventes para melhor extração de isoflavonas, consumir pouco tempo, dispensar etapas de secagem e ressuspensão de amostra.

Na validação dos modelos, não houve diferença significativa entre os resultados das funções respostas (Y_1 e Y_2) estimados e observados indicando uma boa correlação entre o modelo proposto com os dados experimentais.

CONCLUSÃO: Foi possível estabelecer a melhor condição de extração de isoflavonas da soja BRS257 utilizando o planejamento centróide-simplex cujos modelos matemáticos tiveram bons ajustes ($R^2 > 0,77$ e $0,98$) aos dados experimentais. As melhores combinações de solventes para extração de isoflavonas foram água-acetona-acetonitrila para as isoflavonas totais e água-acetona para as agliconas.

REFERÊNCIAS

- Liggins J, et al. *British J. Nutr.* 2000; 84:717-725.
- Lamartiniere CA, et al. *Biosci Biotech Biochem.* 2002; 66(1):22-28.
- Park YK, et al. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2001; 3(3): 156-160.
- Miyazawa M, et al. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47:1348-1349.
- Park YK, et al. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2002; 22(2):130-135.
- Ribeiro MLL, et al. *J. Food Biochem.* 2006; 30:453-466.
- Luftha DL, et al. *Analytical, Nutritional And Clinical Methods.* 2007; 105:325-333.
- Berlioni-Neto B, et al. Campinas: Editora Unicamp; 2003.
- Berhow MA. V. 505 (B.S. Buslig; J.A.E. Manthey, Eds.), p. 61-76. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Ny, 2002.
- Statsoft, Inc. 2007. *Statistica (Data Analysis Software System)*, Version 6.0. www.statsoft.com.
- Hajji B, et al. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2007; 46:181-189.
- Alexandro MR, et al. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2008; 28(3):520-526.
- Hori K, et al. *J. Molec. Catal. B: Enzymatic.* 2009; 59, 297-301.

Agradecimentos:



Uma unidade
Estadual de Londrina



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



Separation of Soybean (BRS 257) Endogenous β -glucosidase

Luciane Y. Yoshiara¹, Tiago B. Madeira¹, Josemeyre B. da Silva¹, Mara L. L. Ribeiro², Elza I. Ida^{1*}

¹Dept. of Food Science and Technology, ²Dept. of Biotechnology, ^{1,2}Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. *elida@uel.br

Introduction Isoflavones are known for their benefits for human health and they are in glycoside forms in vegetables. β -glucosidase catalyzes the hydrolysis of terminal non-reducing sugars releasing glucose and have high specificity for isoflavones. The aim of this work was to separate a soybean endogenous β -glucosidase from cultivar BRS 257.

Materials and Methods

β -glucosidase was extracted with phosphate buffer 0.05 M, pH 6,0 at 4°C from soybean cotyledons, (1:10, p:v) cultivar BRS 257. After centrifugation (15 min, 15000 g, 4°C), the supernatant was acidified to pH 5.0 with HCl 0.2 N and centrifuged again. The crude extract was taken to fractionation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at 0-40% saturation at 4°C. After new centrifugation, the supernatant fraction 0-40% was fractionated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ up to 80% saturation at 4°C. The precipitate fraction P_{40-80} was applied to a CM-Sephadex C-50 ion-exchange column (2.5 cm x 5.5 cm), equilibrated and previously conditioned with 0.5 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0, and followed by a NaCl gradient (0 – 1 M). The flow rate was 27 mL min⁻¹ and obtained the separation of only one fraction (F_{50}). The fraction F_{50} was dialyzed, freeze dried and applied to a Sephadex G-100 gel filtration column (2.5 x 100.0 cm) equilibrated with a 0.1 M citrate-phosphate buffer at pH 5.0. The elution flow was 17 mL min⁻¹ with phosphate-citrate buffer (0,1 M, pH 5,0) and resulted in one fraction F_{100} with high specific activity. The β -glucosidase activity was determined with *p*-nitrophenyl - β - D - glucopyranoside as substrate, the Soluble Protein, as described by Lowry et al. (1951) and the Specific β -glucosidase activity was calculated as the ratio between β -glucosidase activity and soluble protein content and expressed as UA per gram of soluble protein (UA.g⁻¹). The electrophoresis in polyacrylamide gels of fraction F_{100} was stained with Schiff reagent, to confirmed the presence of a separated band.

Results

Table 1: β -glucosidase activity in the crude extract and fractionation steps

	β -glucosidase activity (UA.mL ⁻¹)	Specific β -glucosidase activity (UA.mg ⁻¹)
Crude extract	3.42	0.9
P_{0-40}	3.80	0.1
P_{40-80}	96.56	1.3

The fraction P_{40-80} presented the highest β -glucosidase activity after extraction and fractionation and therefore was used for purification.

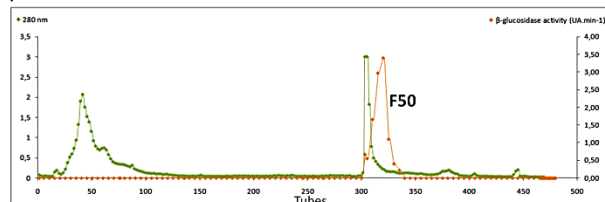


Figure 1: Chromatogram of the β -glucosidase separation from crude extract using liquid chromatography with CM-Sephadex C-50 ion exchange column (2.5 cm X 55.0 cm)

The first liquid chromatography (ion exchange) resulted in one fraction F_{50} with a β -glucosidase activity of 4.58 UA.mL⁻¹ and a specific β -glucosidase activity of 1.8 UA.mg⁻¹. This fraction was used in the next step of purification.

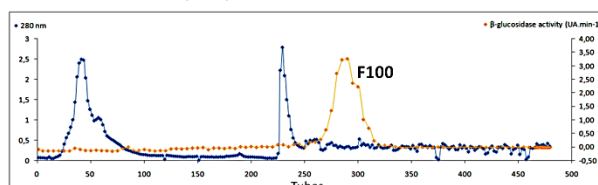


Figure 2: Chromatogram of the β -glucosidase separation from F_{50} using liquid chromatography with CM-Sephadex G-100 ion exchange column (2.5 cm X 100.0 cm)

The gel filtration chromatography resulted in one fraction F_{100} with a β -glucosidase activity of 12.08 UA mL⁻¹ and a specific β -glucosidase activity of 6.8 UA mg⁻¹, indicating a possible enzyme separation.

The electrophoresis in polyacrylamide gels of fraction F_{100} stained with Schiff reagent, confirmed the presence of a separated band with glycoprotein nature.

Conclusion

The separation of a fraction of glycoprotein nature with a high specific activity of β -glucosidase from soybean were obtained from chromatography in CM-Sephadex C50 followed by G100 and confirmed by electrophoresis in polyacrylamide gel stained with Schiff's reagent

- References** ESEN, A. *Plant Physiol.*, v. 98, p. 174–182, 1992
LAMARTINIERE, C. A., et al. *Biosci Biotech Bioch.*, v.66, n.1, p.22–28, 2002.
BROUNS, *Food Res. Int.*, v. 35, p. 187–193, 2002
LOWRY, et al. 1951. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265–275, 1951.
MATSUURA & OBATA, *J Food Sci.*, v.58, n.1, p 144-147, 1993.
RIBEIRO, M. L. L.; et al. *J. Food Biochem.*, v. 30, p.453-486, 2006.

Acknowledgements





Comparison of HPLC and UHPLC for Soy Isoflavones Quantification

Luciane Y. Yoshiara, Josemeyre B. da Silva, Elza I. Ida*

Dept. of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. *elida@uel.br

Introduction

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) were used to isoflavones separation and quantification. The UHPLC have full advantage to run separations using columns with smaller particles and higher flow rates for increased speed, with superior resolution and sensitivity. The aim of this work was to compare HPLC and UHPLC methods for soy isoflavones quantification.

Materials and Methods

HPLC

High Performance Liquid Chromatography

HPLC was performed in a Shimadzu chromatograph (LC-10AT VP; CTO-10AS VP, ODS C18-type reverse phase column, 4 mm x 15 cm, 5 µm particles) with injections of 20µL of isoflavones standards (daidzin, glycytin, genistin, daidzein, glycitein and genistein). A linear gradient system with an initial phase of 100% acidified water pH 3.0 (A) and 0% acetonitrile (B) was applied. Total run time was 40 min, the flow rate was 1 mL min⁻¹ and temperature was 25°C

UHPLC

Ultra High Performance Liquid Chromatography

For UHPLC, a Waters Acquity UPLC® system (reverse phase column Acquity UPLC® BEH C18, 2.1 mm x 50.0 mm x 1.7 µm particles) with injections of 1.4µL and a non-linear gradient with an initial phase of 90%/10% (A/B) was used. Total run time was 12 min, the flow rate, 0,7 mL min⁻¹ and temperature was 35°C.

Results

Table 1: Method performance

	HPLC	UPLC
Limits (µg mL⁻¹)		
• Detection		
○ Daidzin	0.429	0.231
○ Glycytin	0.196	0.029
○ Genistin	0.102	0.035
○ Daidzein	0.082	0.003
○ Glycitein	0.546	0.143
○ Genistein	0.239	0.239
• Quantification		
○ Daidzin	1.300	0.700
○ Glycytin	0,593	0.089
○ Genistin	0.310	0.107
○ Daidzein	0.249	0.009
○ Glycitein	1.653	0.434
○ Genistein	0.725	0.725
Accuracy (CV%)		
• Daidzin	9.77	0.87
• Glycytin	13.58	0.01
• Genistin	2.61	0.20
• Daidzein	1.30	0.04
• Glycitein	0.45	0.18
• Genistein	4.38	0.71
Precision (CV%)		
• Daidzin	10.16	0.85
• Glycytin	23.12	0.01
• Genistin	4.08	0.15
• Daidzein	2.12	0.05
• Glycitein	0.73	0.22
• Genistein	9.41	0.96

Table 2: Extraction and separation parameters

	HPLC	UPLC
Extraction (sample/solvent, w:v)	500mg : 25mL	500mg : 6mL
Sample injection (µL)	20.0	1.4
Run time (min)	40	12
Flow rate (mL min⁻¹)	1.0	0.7
Solvent volume (mL.run⁻¹)		
Total	40.0	8.4
Solvent A (H₂O)	34.95	5.38
Solvent B (Acetonitrile)	5.05	3.02
Solvent cost (US\$ run⁻¹)	8.02	2.07

Quantification limit(QL) for HPLC and UHPLC ranged from 0.249 to 1.300 µg mL⁻¹ and 0.009 - 0.725 µg mL⁻¹ and the detection limit (DL), from 0.082 to 0.546 and 0.003 - 0.239 µg mL⁻¹, respectively.

For UHPLC 14.3 times less sample were used, run time was 3.3 times faster with solvent saving.

The variation coefficient of precision and accuracy for HPLC was 23.12% and 13.58% and for UHPLC was < 1.00% for all isoflavone forms.

Conclusion

Considering the performance of the methods and the separation and quantification parameters, the UHPLC proved advantageous over HPLC.

References

- Yoshiara LY, Madeira TB, Delarozza F, Silva JB, Ida EI. 2012. Int. J. Food Sci. Nutr. [Epub ahead of print]. DOI: 10.3109/09637486.2012.690026.
Berthow MA. 2002. Kleur Academic, Plenum Publishers, v.505, p.61-76.
Fukutake M, Takahashi H, Ishida K, Kawamura H, Sugimura T, Wakabayashi K. 1996. Food and Chemical Toxicology, 34(5), 457-461
Carriño-Panizzi MC, Favoni SPS, Kikuchi A. 2002. Braz Arch Biol Technol 45:515-518
Griffiths AP, Collison MW. 2001. J Chromatogr. A. 913: 397-413

Acknowledgements





Sonication and Vortexing Extraction of Soy Isoflavones

Cintia L. Handa, Luciane Y. Yoshiara, Josemeyre B. da Silva, Elza I. Ida*

Dept. of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. *elida@uel.br

Introduction

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

Materials and Methods

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

Results and Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusion

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

References

- Yoshiara IS, Madureira TB, Delarozza F, Silva JB, Ida EI. 2012. Int. J. Food Sci. Nutr. [Epub ahead of print]. DOI: 10.3109/09637486.2012.690026.
Berthow MA. 2002. Kleur Academic; Plenum Publishers v.905, p.61-76.
Fukutake M; Takahashi H; Ishida K; Kawamura H; Sugimura T; Wakabayashi K. 1996. Food and Chemical Toxicology, 34(5), 457-461
Carrão-Panizzi MC, Favoni SPG, Kikuchi A. 2002. Braz Arch BiolTechnol 45:515-518
Griffith AP, Collison MW. 2001. J Chromatogr A 913: 397-413
Rostagno MA, Palma M, Barroso CG. 2003. J Chromatogr A 1012:119-128.

Acknowledgements



TEMPEH OBTAINED WITH YELLOW AND BLACK SOYBEAN GRAINS

Cristiane Wing Chong Borges, Josemeyre Bonifácio da Silva, Luciane Yuri Yoshiara, Elza Louko Ida.

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil.

Tempeh is a traditional fermented soybean food from Indonesia. Processing soybeans into tempeh by fermenting with the fungus *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* improves the texture, flavor, aroma of the product and the nutritional value by increasing the availability of isoflavone aglycones. To optimize the processing of tempeh is important to evaluate the content of isoflavones present in the different soybean grains cultivars and the fermented product obtained. Isoflavones may undergo changes in quantity and profile depending on the processing conditions. The aim of this study was analyzed the isoflavones profile, determined by ultra performance liquid chromatography (UPLC) in the yellow and black soybean grains and in the tempeh obtained from these grains. Tempeh was produced by hydration of soybean grains during 12 hours, cooking at 30 minutes and fermentation at 24 hours and at 37 °C. All experiments were performed in triplicate. The yellow soybean grains had a higher content of glycosides daidzin and genistin and their malonyl corresponding forms. The yellow soybean tempeh showed a higher content of daidzein and genistein. The total isoflavones contents observed in the yellow and black soybean grains are 106,6 mg/100 g and 65,3 mg/100 g respectively. Therefore, for a higher nutritional value tempeh is recommended to use the yellow soybean grains.

16TH WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY (16TH IUFOST) A SER REALIZADO EM FOZ DO IGUAÇU/PR DE 05 A 09 DE AGOSTO DE 2012.

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

Cíntia Ladeira Handa, Luciane Yuri Yoshiara, Josemeyre Bonifácio da Silva, Uenifer Couto, Aline Heloisa Vicensoti, Heloyse Hott Paulino, Sandra Regina Georgetti, Elza Louko Ida

Department of Food Science and Technology, Universidade Estadual de Londrina

Soybean has high isoflavone content with recognized for health benefits. Aglycone isoflavones have highest antioxidant activity and are more bioavailable than their glycoside forms. Fermentation process can be an alternative for glycoside isoflavone conversion into aglycones achieved by the catalytic action of β -glucosidase. The aim of this work was to investigate the effect of fermentation process with *Monascus purpureus* on defatted soybean flour (DSF) for the conversion of isoflavones into aglycones. For the semi-solid fermentation, the DSF was dispersed with distilled water (1:1; w:v), initial pH 6.0, and autoclaved at 121°C for 15 min. The substrate was inoculated with suspension of 10^7 spores, and incubated at 30°C for 48h. A control was prepared without inoculum. The bioprocess was monitored by the β -glucosidase activity using p-NPG as substrate. Isoflavones were determined using Waters Acquity UPLC[®] system (reverse phase column Acquity UPLC[®] BEH C18, 2.1mm x 50.0mm x 1.7 μ m particles) with a non-linear gradient with an initial phase of 90%/10% acidified water/acetonitrile. Total runtime was 12min, the flow rate, 0,7mL min⁻¹ and 35°C. The results indicated that the DSF induced β -glucosidase production by fungus and showed statistically significant difference ($p < 0.05$): fermented DSF ($150.62 \pm 0.38 \text{UA g}^{-1}$); DSF ($39.80 \pm 1.06 \text{UA g}^{-1}$) and control ($24.22 \pm 0.04 \text{UA g}^{-1}$). The concentration of aglycone isoflavones in relation to total isoflavones was 17.24% in the control, 14% in the DSF and 82.08% in the fermented DSF. The fermentation process of DSF with the fungus *M. purpureus* promoted the transformation of isoflavone glycoside into aglycones forms in 5.86 times.

16TH WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY (16TH IUFOST), FOZ DO IGUAÇU/PR DE 05 A 09 DE AGOSTO DE 2012.