



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AMANDA ALEIXO MOREIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E ALGINATO DE SÓDIO
PARA CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS β -GLICOSÍDICAS
EM AGLICONAS**

AMANDA ALEIXO MOREIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E ALGINATO DE SÓDIO
PARA CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS β -GLICOSÍDICAS
EM AGLICONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia L. Ribeiro

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M838i Moreira, Amanda Aleixo.

Imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana-de-açúcar e alginato de sódio para conversão de isoflavonas β -glicosídicas em agliconas / Amanda Aleixo Moreira. – Londrina, 2014.
122 f. il.

Orientador: Mara Lúcia Luiz Ribeiro.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Enzimas – Aplicações industriais – Teses. 2. Alginatos – Teses. 3. Soja – Indústria – Teses. 4. Isoflavonas – Teses. 5. Enzimas imobilizadas – Teses. 6. Bagaço de cana – Teses. I. Ribeiro, Mara Lúcia Luiz. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

AMANDA ALEIXO MOREIRA

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR E ALGINATODE SÓDIO PARA CONVERSÃO DE
ISOFLAVONAS β -GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz
Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Sandra Helena Prudêncio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de maio 2014.

*Dedico esse trabalho ao meu marido
Claudinei Camargo Ferreira e meus
pais Sueli Aleixo Moreira e Maurício
Sebastião Moreira pelo apoio,
incentivo e carinho em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro, pela orientação, paciência e incentivo. Obrigada pela sua amizade sincera e confiança no meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEL, pela grande contribuição no meu desenvolvimento acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/MEC pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e CNPq, por meio do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), pelo apoio financeiro parcial na execução deste projeto.

À Embrapa – Soja, em nome do Pesquisador José Marcos G. Mandarino pelo fornecimento da amostra de soja utilizada neste trabalho.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM), em nome da Profa. Dra. Célia Guadalupe Tardelli de Jesus e técnico Osvaldo Capelo pelas análises de MEV.

Ao laboratório de Espectroscopia (ESPEC), em nome do Prof. Dr Henrique de Santana e técnica Danielly pelas análises de FTIR.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nome da Profa. Dra. Elza Louko Ida e Dra. Josemeyre Bonifácio da Silva pelas análises de isoflavonas das amostras.

Aos meus amigos Érika Mitsuo Kiyoko Teixeira, Louise Rejane Forghieri, Karina Maria Lima Milani e Pedro Enrique Alcade do Nascimento pela amizade, valiosas sugestões e pelos momentos de descontração.

Às estagiárias de Iniciação Científica Maria Fernanda Ferreira de Lima Mauro, Ana Camila Vaitkevicius Ferreira e Ellen Cristine Duarte Garcia pelo profissionalismo e comprometimento.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL): Nelson Janeiro Rodriguez, Sérgio Evangelista, Sandra Defende e aos colegas de laboratório pela colaboração e auxílio.

MOREIRA, Amanda Aleixo. **Imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana-de-açúcar e alginato de sódio para conversão das isoflavonas β -glicosídicas em agliconas.** 2014. 122f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A imobilização de enzimas é uma alternativa para sua reutilização e redução de custos na aplicação em processos industriais. A β -glicosidase (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) hidrolisa ligações β -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos. As isoflavonas são substratos dessa enzima que converte as isoflavonas β -glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam maior ação benéfica na saúde humana. O objetivo deste trabalho foi otimizar a imobilização da β -glicosidase de cotilédones de soja em bagaço de cana-de-açúcar e alginato de sódio, caracterizar a morfologia e determinar parâmetros cinéticos da enzima livre e imobilizada e aplicá-la em extrato comercial de soja. A β -glicosidase foi extraída de farinha de cotilédones de soja com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6 para obtenção do extrato bruto que foi fracionado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0–40 % e 40–85 % de saturação a 4 °C. A fração com maior atividade de β -glicosidase foi utilizada para imobilização em bagaço de cana tratados (água 60 °C, etanol 70 % e autoclavado a 121 °C por 15 min, NaOH e autoclavado a 121 °C por 15 min) e ativados com glutaraldeído 2,5 % e para imobilização em esferas e cápsulas de alginato de sódio. O bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído e as cápsulas de alginato foram selecionados para otimização da imobilização de β -glicosidase por metodologia de superfície de resposta. A região ótima das condições para imobilização foram: tempo de incubação de 6–12 h e glutaraldeído de 1–3 %, com rendimento máximo de 99 % para bagaço de cana e pH 4,5–6 e CaCl_2 de 20–60 mM, com rendimento máximo de 96 % para as cápsulas de alginato. A β -glicosidase livre e imobilizada apresentou condições ótimas de reação em pH 5,5 a 50 °C. A estabilidade térmica de β -glicosidase imobilizada foi superior à livre, sendo maior para a imobilizada em bagaço de cana que apresentou 15 % de atividade residual após 180 min de incubação a 70 °C. O K_m e V_{max} com substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo foram de 0,26 mM e 7,2 μmol de *p*-NP min^{-1} para enzima livre, 0,46 mM e 4,37 μmol de *p*-NP min^{-1} para imobilizada em bagaço e 0,48 mM e 1,39 μmol de *p*-NP min^{-1} para imobilizada em cápsulas de alginato. A enzima imobilizada em bagaço apresentou quinze reutilizações, com quatro sem perda de atividade e a imobilizada em cápsulas de alginato apresentou duas reutilizações. As análises por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier confirmaram a modificação dos suportes pelos tratamentos e a imobilização de β -glicosidase. A aplicação da β -glicosidase imobilizada no extrato comercial de soja foi eficiente na conversão de isoflavonas β -glicosídicas em agliconas.

Palavras-chave: Imobilização. β -glicosidase de soja. Bagaço de cana. Alginato de sódio. Otimização. Isoflavonas agliconas.

MOREIRA, Amanda Aleixo. **Immobilization of β -glucosidase from soybean in sugarcane bagasse and sodium alginate for the conversion of β -glucosides isoflavones in aglycones.** 2014. 122p. Dissertation (Master in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The immobilization of enzymes is an alternative for reuse and cost reduction in application in industrial processes. The β -glucosidase (β -D-glucoside glicohidrolase, EC 3.2.1.21) hydrolyzes β -glycosidic bonds of di- and/or oligosaccharides. Isoflavones are substrates of this enzyme that converts β -glucosides (genistin, daidzin and glycitin) and release the isoflavone aglycone isoflavones (genistein, daidzein and glycitein) that have greater beneficial effects on human health. The aim of this study was to optimize the immobilization of β -glucosidase from the cotyledons of soybean in sugarcane bagasse and sodium alginate, to characterize the morphology, determine the kinetic parameters of free and immobilized enzyme, and apply it in commercial extract of soybean. The β -glucosidase was extracted from cotyledons of soybean meal with sodium phosphate buffer 100 mM, pH 6.6 to obtain the crude extract that was fractionated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0–40 % to 40–85 % saturation 4 °C. The fraction with the highest activity of β -glucosidase was used for immobilization on treated sugarcane bagasse (60 °C water, 70 % ethanol and autoclaved at 121 °C for 15 min, NaOH and autoclaved at 121 °C for 15 min) and activated with 2.5 % glutaraldehyde and immobilization in sodium alginate beads and capsules. Sugarcane bagasse treated with NaOH, autoclaved and activated with glutaraldehyde and alginate capsules were selected to optimize the immobilization of β -glucosidase by response surface methodology. The optimum conditions for immobilization of the region were: incubation time 6–12 h and glutaraldehyde 1–3 %, with a maximum yield of 99 % for bagasse and pH 4.5–6 and CaCl_2 from 20–60 mM, with a maximum yield of 96 % for alginate capsules. The β -glucosidase immobilized and free submitted optimum reaction conditions at pH 5.5 at 50 °C. The thermal stability of immobilized β -glucosidase was superior to free, higher for immobilized on sugarcane bagasse showed that 15 % residual activity after 180 min incubation at 70 °C. The K_m and V_{max} with *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside substrate were 0.26 mM and 7.2 μmol of *p*-NP min^{-1} for free enzyme, 0.46 mM and 4.37 μmol of *p*-NP min^{-1} to immobilized bagasse and 0.48 mM and 1.39 μmol of *p*-NP min^{-1} to immobilized in alginate capsules. The enzyme immobilized on bagasse presented fifteen reuses with four without loss of activity and immobilized in alginate capsules showed two reuses. Analyses by scanning electron microscopy and Fourier transform infrared confirmed the modification of treatments and supports for immobilization of β -glucosidase. The application of immobilized β -glucosidase on commercial extract of soybean was efficient in the conversion of isoflavones β -glucosides into aglycones.

Keywords: Immobilization. β -glucosidase from soybean. Sugarcane bagasse. Sodium alginate. Optimization. Isoflavones aglycones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Interação enzima-suporte por ligação covalente	17
Figura 2-	Método multi-camada de encapsulação	19
Figura 3-	Camada por camada.....	19
Figura 4-	Estrutura química do alginato.....	23
Figura 5-	Formação do gel de alginato de cálcio	24
Figura 6-	Interação Glutaraldeído-Enzima.....	25
Figura 7-	Estrutura química geral das isoflavonas.....	28
Figura 8-	Fluxograma de obtenção da β -glicosidase de cotilédones de soja	36
Figura 9-	Tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar para imobilização da β -glicosidase	38
Figura 10-	Imobilização da β -glicosidase em bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído	39
Figura 11-	Imobilização da β -glicosidase de soja em esferas de alginato de sódio	43
Figura 12-	Imobilização da β -glicosidase de soja em cápsulas de alginato de sódio.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação e estrutura química das isoflavonas	28
Tabela 2-	Delineamento fatorial fracionado 25-1 para imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana.....	40
Tabela 3-	DCCR 2 ² das variáveis independentes para imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana	41
Tabela 4-	Delineamento fatorial completo 24 das variáveis independentes para imobilização de β -glicosidase de soja em cápsulas de alginato de sódio	45
Tabela 5-	DCCR 2 ² das variáveis independentes para imobilização de β -glicosidase de soja em cápsulas de alginato de sódio	46
Tabela 6-	DCCR 2 ² das variáveis independentes do pH e temperatura ótimos para determinação da atividade de β -glicosidase, UA.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ρ -NPG	ρ -nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo
ρ -NP	ρ -nitrofenol
UA	Unidade de atividade da enzima
BSA	Albumina de soro bovino
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
EB	Extrato bruto
P _{40-85 %}	Fonte de β -glicosidase
RI	Rendimento de imobilização, %
DCCR	Delineamento composto central rotacional
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
V _{max}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	15
3.1.1	Métodos de Imobilização de Enzimas	16
3.1.2	Suportes para Imobilização	20
3.1.3	Glutaraldeído	24
3.2	β -GLICOSIDASES	26
3.2.1	Aplicação de β - glicosidase	27
3.2.2	Imobilização de β - glicosidase	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MATERIAL	32
4.2	MÉTODOS	32
4.2.1	Determinação de Atividade de β - glicosidase	32
4.2.2	Determinação de Proteínas Solúveis	33
4.2.3	Determinação de Atividade Específica de β -glicosidase	33
4.2.4	Determinação de Açúcares Totais	33
4.2.5	Determinação da Composição Química da Fibra do Bagaço de Cana	34
4.2.6	Determinação de Isoflavonas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)	34
4.3	OBTENÇÃO DE β - GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA	35
4.3.1	Extração de β - glicosidase	35
4.3.2	Fracionamento do Extrato Bruto com Sulfato de Amônio	35
4.4	IMOBILIZAÇÃO DE B-GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	37
4.4.1	Tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar	37

4.4.2	Imobilização de β -glicosidase em Bagaço de Cana Tratado com NaOH Autoclavado e Ativado com Glutaraldeído	39
4.4.3	Otimização da Imobilização de β -glicosidase em Bagaço de Cana Tratado com NaOH, Autoclavado e Ativado com Glutaraldeído	41
4.5	IMOBILIZAÇÃO DE B-GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA EM ALGINATO DE SÓDIO	42
4.5.1	Imobilização de β -glicosidase de Soja em Esferas de Alginato de Sódio	42
4.5.2	Imobilização de β -glicosidase de Soja em Cápsulas de Alginato de Sódio	43
4.5.3	Otimização da Imobilização de β -glicosidase de Soja em Cápsulas de Alginato de Sódio.....	44
4.6	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS SUPORTES SEM E COM A ENZIMA IMOBILIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	47
4.7	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUPORTES SEM E COM A ENZIMA IMOBILIZADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	47
4.8	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA B-GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA LIVRE E IMOBILIZADA.....	47
4.8.1	Determinação de pH e Temperatura Ótimos	47
4.8.2	Determinação da Estabilidade Térmica	48
4.8.3	Determinação de Km e V_{max}	49
4.8.4	Determinação da Estabilidade Operacional.....	49
4.9	APLICAÇÃO DE B-GLICOSIDASE IMOBILIZADA EM BAGAÇO DE CANA OU CÁPSULAS DE ALGINATO NO EXTRATO DE ALGINATO NO EXTRATO DE SOJA	49
REFERÊNCIAS		50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO	62
5.2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	89
5.3	TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS	115
6	CONCLUSÕES	122

1 INTRODUÇÃO

As aplicações de enzimas em processos biotecnológicos apresentaram aumento significativo nos últimos anos, em virtude da tendência mundial da substituição dos procedimentos físico-químicos pelos enzimáticos. Tal tendência se deve a maior especificidade, menor custo energético, gerando poucos subprodutos e menos prejudicial ao meio ambiente.

Por outro lado, o uso de enzimas em processos biotecnológicos apresenta custo mais elevado que os processos químicos. Uma estratégia é a imobilização de enzimas em suportes atóxicos compatíveis com a enzima e substrato, que possibilita a retenção de atividade catalítica podendo ser reutilizada. Devido a diversidade estrutural das enzimas e suportes, vários métodos de imobilização têm sido propostos, sendo possível também a combinação de diferentes processos. Os métodos de ligação por adsorção e ligação covalente são os mais utilizados, uma vez que garantem a manutenção das características iniciais da enzima e elevada estabilidade. A estabilidade da ligação enzima-suporte pode ser aumentada com a utilização de glutaraldeído, reticulante que promove a ativação do suporte por ligações cruzadas reagindo rapidamente com grupos funcionais de proteínas.

Os suportes precisam ser estáveis frente às condições do processo, resistentes, de baixo custo e facilidade de manuseio. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado como suporte, é constituído de fibras lignocelulósicas com hidroxilas reativas acessíveis e baixo custo, por ser resíduo agroindustrial. O alginato de sódio é empregado nos processos de imobilização com os íons cálcio pela capacidade de formar géis fortes e estabelecer ligações entre as cadeias de alginato por interações iônicas.

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são importantes na indústria de alimentos, uma vez que hidrolisam isoflavonas β -glicosídicas em glicose e agliconas. As agliconas possuem funções benéficas mais acentuadas na prevenção de doenças crônicas e degenerativas.

A soja é destaque na economia brasileira, pela alta produtividade, com perspectiva para safra de 2013/2014 de 85 milhões de toneladas (CONAB, 2014a). Apresenta elevado teor de proteínas e isoflavonas, também é fonte de β -glicosidase, que pode ser extraída para aplicação exógena em produtos de soja não fermentados

tendo alta especificidade, agregando valor a esses produtos pelo aumento de isoflavonas agliconas.

Os produtos de soja fermentados como misô, natto, tempeh e shoyu são elaborados utilizando microrganismos capazes de produzir enzimas que podem clivar as isoflavonas β -glicosídicas em agliconas, por isso, tais produtos, geralmente, apresentam maior teor de isoflavonas agliconas. O teor médio de isoflavonas agliconas no grão de soja é de 2 % e 31 % para as isoflavonas β -glicosídicas.

Assim, considerando que a aplicação da β -glicosidase exógena em produtos de soja pode aumentar o teor de isoflavonas agliconas, que são benéficas para a saúde humana; que há poucos estudos sobre imobilização de β -glicosidase de soja e que a aplicação é de grande relevância para a indústria de produtos não fermentados de soja, o objetivo desse trabalho foi estabelecer as melhores condições para a imobilização da β -glicosidase de cotilédones de soja em bagaço de cana-de-açúcar e alginato de sódio e avaliar a aplicação da enzima imobilizada para conversão de isoflavonas β -glicosídicas em agliconas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições de imobilização da β -glicosidase de cotilédones de soja em bagaço de cana-de-açúcar e alginato de sódio, caracterizar a enzima livre e imobilizada e aplicá-la em extrato de soja para aumentar o teor de isoflavonas agliconas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter β -glicosidase de cotilédones de soja utilizando fracionamento com sulfato de amônio.

Otimizar as condições de imobilização da β -glicosidase em bagaço de cana-de-açúcar e alginato de sódio.

Determinar a morfologia dos suportes sem e com a enzima imobilizada utilizando microscopia eletrônica de varredura.

Determinar as ligações químicas dos suportes sem e com a enzima imobilizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

Determinar pH e temperatura ótimos, K_m e V_{max} e estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada.

Determinar a estabilidade operacional da enzima imobilizada.

Aplicar a enzima imobilizada em extrato comercial de soja e avaliar sua ação nas isoflavonas β -glicosídicas por cromatografia líquida de ultra eficiência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A utilização de enzimas como catalisadores biológicos resulta em poucos subprodutos, devido a sua elevada especificidade. No entanto, o trabalho com esses biocatalisadores, na maioria das vezes é um processo caro e sistemático, principalmente quando há necessidade de purificação. Além disso, são sensíveis a solventes, agitação, temperatura, pH etc, alterando sua estabilidade (NELSON; COX, 2011). A utilização de enzima livre em um processo industrial, sem purificação, acarreta a presença do biocatalisador como parte integrante do meio. Esse fato pode gerar alteração de sabor e ainda a necessidade de uma nova batelada de biocatalisador (SANGEETHA et al., 2005).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos insolúveis com retenção de sua atividade catalítica é uma estratégia para tornar essas biomoléculas mais atrativas do ponto de vista industrial. Sua utilização em processo contínuo, proporciona aumento da estabilidade, controle do sistema e reaproveitamento (OLIVEIRA et al., 1997; CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006). A enzima imobilizada, segundo a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas realizada em Henniker (EUA) em 1971, foi definida como biocatalisador fisicamente confinado ou localizado em uma região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica e que pode ser utilizada repetida ou continuamente. Este sistema consiste da enzima física ou quimicamente associada a um suporte (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000).

A imobilização de enzimas pode resultar em alterações das propriedades bioquímicas da enzima livre como pH e temperatura ótima, aumento da estabilidade e variações nos valores de K_m e V_{max} . Portanto, pesquisas são desenvolvidas para a otimização de processos, visando a aplicação de enzimas imobilizadas em larga escala (SANJAY; SUGUNAN, 2006; SPAHN; MINTEER, 2008; SU et al., 2010; JUNG et al., 2012; KHAN et al., 2012; ZHOU et al., 2013; RESHMI; SUGUNAN, 2013; LU; WEERASIRI; LEE, 2013).

Não existe um único sistema de imobilização, nem um suporte universal capaz de garantir resultados adequados para todos os processos. Vários métodos já foram desenvolvidos para imobilizar enzimas e para melhor escolha são consideradas as

características peculiares da enzima e as condições do sistema de imobilização. Os avanços científicos na área de imobilização indicam uma diversidade de suportes e técnicas de imobilização (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006; JUNG et al., 2012; KHAN et al., 2012; CHEN et al., 2012; LI et al., 2012; ZHANG et al., 2013; JADHAV; SINGHAL, 2014).

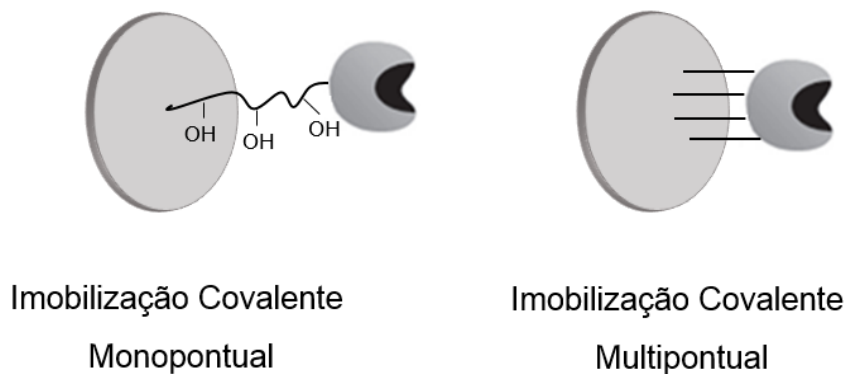
3.1.1 Métodos de Imobilização de Enzimas

Vários métodos de imobilização de enzimas têm sido propostos, sendo possível a combinação de diferentes processos. A adsorção é um dos métodos de imobilização de enzimas mais utilizados. É o método mais simples, antigo e barato. As interações físicas entre a enzima e o suporte ocorrem por forças de van der Waals, ligação iônica, ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica. Para imobilizar uma enzima por adsorção, uma solução contendo a biomolécula é misturada ao suporte, em condições estabelecidas de pH, força iônica, temperatura e tempo, conforme as características da enzima. Posteriormente, o material deve ser coletado e lavado para remover o que não foi adsorvido ao suporte (PAIVA et al., 2000). Este método é vantajoso, pois causa poucos danos à enzima e não necessita de modificações químicas no suporte ou na enzima. Entretanto, a ligação enzima-suporte é inespecífica e pode ocorrer perda da enzima durante a reação. Pode haver sobrecarga do suporte e fatores como fluxo e agitação podem provocar a desorção (BICKERSTAFF, 1997).

A ligação covalente é muito utilizada na imobilização de enzimas, devido a maior estabilidade da ligação enzima-suporte, feita por meio dos grupos funcionais presentes na superfície dos mesmos (KIM et al., 2006). Os grupos funcionais dos aminoácidos que podem estar envolvidos na ligação covalente com o suporte são: grupos amino (NH_2) da lisina e arginina; NH_2 terminal; grupos carboxílicos (COOH) do ácido aspártico e glutâmico; hidroxilas (OH) da serina e treonina e grupos sulfidrílicos (SH) da cisteína (MORENO et al., 1997; PEREZ et al., 2007). O grupo amino (NH_2) da lisina e NH_2 -terminal das proteínas são os mais utilizados na imobilização por ligação covalente, pois, encontram-se na superfície, são altamente reativos com aldeídos, epóxi, ciano brometo e na maioria das vezes não fazem parte do sítio ativo da enzima (MATEO et al., 2005).

A interação entre enzima e suporte pode ser monopontual, quando há somente uma ligação covalente enzima-suporte ou multipontual, quando a enzima se liga ao suporte por meio de várias ligações covalentes, aumentando a estabilidade pela ocorrência de suportes altamente ativados com espaçadores curtos e envolvendo múltiplos resíduos de aminoácidos na superfície da enzima (Figura 1).

Figura 1- Interação enzima-suporte por ligação covalente



Fonte: Adaptação de Mateo et al. (2007)

O pK dos aminoácidos deve ser considerado, pois a desprotonação torna os grupos químicos mais reativos. Dessa forma, quando o pH do processo de imobilização for neutro a interação enzima-suporte vai ocorrer predominantemente do grupamento NH_2 -terminal (pK 6,0–8,0). Se o pH for superior a 10 a interação é favorecida com o NH_2 da lisina (pK 10,5–10,7). A interação enzima-suporte mais estável ocorre com o NH_2 da lisina, que normalmente está na superfície da estrutura conformacional da enzima em quantidade superior ao NH_2 -terminal, isso possibilita a imobilização multipontual (MATEO et al., 2005). Essa ligação covalente multipontual promove a rigidez da estrutura da enzima imobilizada e reduz as mudanças conformacionais envolvidas na sua inativação (MOZHAEV et al., 1990). A desvantagem da imobilização multipontual é o pH elevado (pH = 10), que pode inativar as enzimas que são sensíveis às condições extremas de pH, temperatura e pressão (MATEO et al., 2005). A eficiência da imobilização por ligação covalente monopontual ou multipontual está associada à boa fixação da enzima ao suporte e a fácil interação com o substrato. Entretanto, em alguns casos, o baixo rendimento de

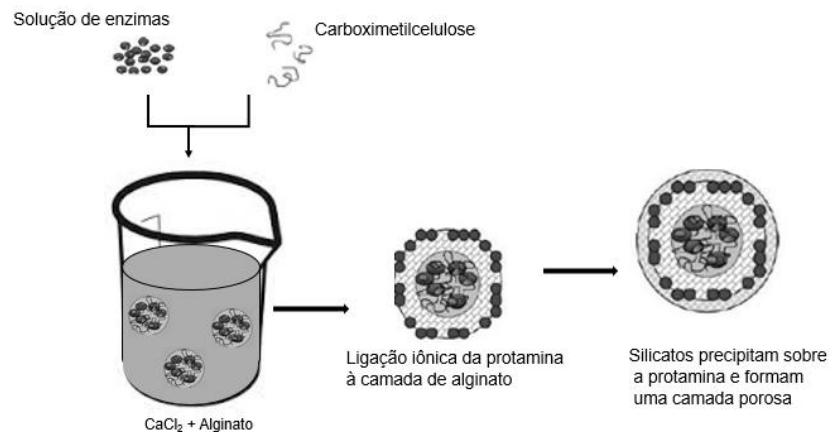
imobilização e o alto custo são desvantagens desse tipo de imobilização (GROSOVÁ et al., 2008).

A inclusão ou aprisionamento é um método baseado na retenção de enzimas na estrutura interna dos materiais poliméricos na forma de géis, esferas, cápsulas, fibras ou filmes (GROSOVÁ et al., 2008). O processo de imobilização consiste na preparação de solução contendo a enzima e o material polimérico, com posterior secagem ou polimerização (GEKAS; LÓPEZLEIVA, 1985). A massa molecular da enzima, do substrato e do produto devem ser avaliadas para que ocorra a retenção da enzima no suporte, entrada do substrato e saída do produto pelos poros (GROSOVÁ et al., 2008). O tamanho dos poros das matrizes poliméricas depende do tipo e, principalmente, da concentração do polímero utilizado na imobilização. Assim, quanto maior a concentração, menor a porosidade (TALEKAR; CHAVARE, 2012). Os poros podem ser classificados como macroporos, com diâmetros superiores a 50 nm; mesoporos, com diâmetros entre 2 e 50 nm; e microporos, com diâmetros inferiores a 2 nm (SUJKA; JAMROZ, 2007). Os poros de cápsulas de alginato 2 % apresentaram diâmetro de 100 nm (LÓPEZ-CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014).

A encapsulação é o método de imobilização que protege a enzima do meio externo por membranas semipermeáveis. A enzima fica livre na solução, mas restrita em um espaço. A principal desvantagem dessa técnica é a limitação difusional, uma vez que proteínas de elevada massa molecular não conseguem entrar ou sair da cápsula, podendo levar a ruptura da membrana. Dessa forma, apenas substratos e produtos de menor massa molecular podem passar livremente pela membrana semipermeável (LALONDE; MARGOLIN, 2002).

Outros métodos foram estudados para aperfeiçoar as técnicas de imobilização. Zhang et al. (2008) desenvolveram um método de imobilização em camadas por aprisionamento e encapsulação utilizando como suporte alginato (Figura 2). A técnica consistiu no gotejamento da mistura de enzima, carboximetilcelulose e CaCl_2 no alginato para formação das cápsulas de alginato de cálcio. Estas cápsulas reagiram com a proteína protamina de elevada massa molecular, por interação iônica. A precipitação de silicatos na superfície da cápsula formou uma camada rígida e porosa, prevenindo sua expansão ou compressão.

Figura 2- Método multi-camada de encapsulação



Fonte: Adaptação de Zhang et al. (2008)

O método de imobilização camada por camada ou *layer-by-layer* (Figura 3) tem recebido atenção por ser uma técnica eficiente no preparo de supermoléculas nanoestruturadas. Para seu desenvolvimento emprega-se nanodispositivos biológicos de estruturas em camadas com espessuras e sequências determinadas a partir de uma grande variedade de componentes. Mais de um tipo de enzima podem ser imobilizadas dentro dessas estruturas, que podem ser polímeros, filmes, lipídios, carboidratos, polieletrólitos, nanotúbulos de carbono dentre outras (ARIGA; JI; HILLI, 2010).

Figura 3- Camada por camada



Fonte: Adaptação de Ariga, Ji e Hill (2010)

3.1.2 Suportes para Imobilização

A escolha do suporte é muito importante para se obter um sistema de imobilização de enzimas capaz de corresponder às expectativas de um estudo. Os suportes precisam ser estáveis frente aos parâmetros de processo e ataque microbiano, resistentes quanto à durabilidade e a capacidade de reutilização, compatíveis com a enzima e substrato, além de possuírem funcionalidade química, baixo custo e facilidade de manuseio (BICKERSTAFF, 1997; PRADELLA, 2001).

Os suportes podem ser orgânicos constituídos de proteínas, polímeros naturais ou sintéticos e, inorgânicos, compostos por matrizes minerais ou manufaturadas. Os suportes inorgânicos são mais resistentes e mais estáveis que os suportes orgânicos. No entanto, os orgânicos possuem baixo custo, além de serem seguros e apresentarem bom potencial de uso (GOPINATH; SUGUNAN, 2004). Os suportes também podem ser classificados como porosos e não-porosos. Os porosos possuem maior capacidade de imobilização por terem grandes dimensões de área de contato e peso considerado baixo. Entretanto, a maior área disponível é a interna, dificultando a difusão, mas, existem suportes de poro controlado para superar esse problema, podendo ser adequado conforme a enzima, substrato e produto (CABRAL; KENNEDY, 1991). Os suportes não-porosos, são considerados inferiores em relação aos porosos por suas desvantagens, como área superficial muito baixa que restringe a área de imobilização. Para contornar essa desvantagem utilizam-se partículas finas. Entretanto, não podem ser utilizadas em sistemas contínuos do tipo coluna, por não suportarem pressões elevadas sem se compactar, nem em leitos fluidizados. A vantagem desse tipo de suporte é a inexistência de problemas difusionais, uma vez que a imobilização da enzima é localizada na superfície externa do suporte (CABRAL; KENNEDY, 1991).

3.1.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*. É proveniente da Nova-Guiné e cultivada no sul da Ásia para produção de xarope. A primeira evidência da utilização da cana-de-açúcar como açúcar sólido foi no ano 500 na Pérsia. No Brasil, em Pernambuco e São Paulo, a cana-de-açúcar foi trazida

pelos portugueses, no início do século XVI. Não houve muitas mudanças em seu cultivo até a década de 70, quando foi criado o Programa Brasileiro do Alcool (PROÁLCOOL), promovendo um grande aumento da área destinada ao cultivo da cana no Brasil. Além dos tratamentos culturais, programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar foram implantados com seleção de variedades consideradas produtivas e seus cruzamentos controlados. Os trabalhos de melhoramento genético no Brasil se iniciaram em 1966 com mais de 60 cruzamentos. As variedades obtidas na década de 70 foram substituídas por variedades mais produtivas e resistentes desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Institutos Agrônômicos que contribuem para o aumento da produtividade dessa cultura pelos programas de melhoramento genético (CESNIK, 2007). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (UNICA, 2014), sendo os maiores produtores da região Centro-Oeste, Sudeste e Paraná, na região Sul (CONAB, 2014b).

A produtividade média de cana-de-açúcar para a safra 2014/2015 foi de 73.569 kg/ha com previsão de 671,69 milhões de toneladas de cana moída, com aumento de 2 % em relação à safra 2013/2014, que foi de 658,82 milhões de toneladas. Da cana são obtidos açúcar, com produção estimada de 39,46 milhões de toneladas e etanol com produção estimada em 28,37 bilhões de litros, sendo que, 12,85 bilhões de litros serão de etanol anidro e 15,51 bilhões de litros serão de etanol hidratado (CONAB, 2014b). A indústria sucroalcooleira produz em média 260 kg de bagaço por tonelada de cana moída (UNICA, 2011). Uma possível utilização deste resíduo agroindustrial é como suporte na imobilização de enzimas (MENDES; CASTRO; GIORDANO, 2013). O bagaço é constituído de 40–50 % de celulose, 25–35 % de hemicelulose, 20–22 % de lignina, 5 % de cinzas e 4 % de proteínas (CUNHA, 2006).

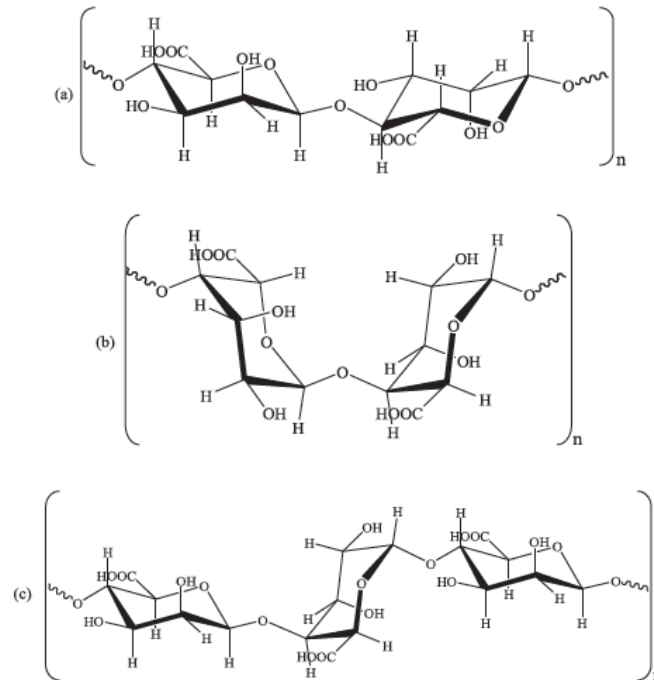
A estrutura do bagaço é de fibras lignocelulósicas que apresentam hidroxilas reativas acessíveis, podendo reagir com outros grupos funcionais polares, como, por exemplo, os presentes nas resinas fenólicas (TITA et al., 2002). Pelo fato do bagaço de cana apresentar hidroxilas livres reativas pode ser ligado a enzimas para imobilização. Essa característica do bagaço também é interessante para utilização de ativadores como glioxil e glutaraldeído formando um braço entre a enzima e o suporte (GUISÁN, et al., 1997). Para aumentar a eficiência da imobilização de enzimas em bagaço de cana alguns estudos relatam tratamentos prévios do bagaço (Quadro 1).

Quadro 1- Influência de tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar na eficiência de imobilização de enzimas

Tratamento do Bagaço	Enzima Imobilizada	Resultados	Autores
Oxidação: Ácido periódico	α -amilase	Rendimento de imobilização: 44 %, Estabilidade térmica: superior à livre Reuso: 10 vezes.	Varavinit, Chaokasem e Shobsngob (2002)
Designificação: H ₂ SO ₄ e NaOH	Papaína	Rendimento de imobilização: 0,64 e 0,34 %.	Rosa (2008)
Etanol 70 % e NaOH: - Ativação glioxil - Ativação amino - Ativação glutaraldeído	Invertase	Ativação: amino Eficiência de imobilização: próximo de 100 % Estabilidade térmica: 85 °C	Santos (2010)
NaOH a NaBH ₄ : - Ativação glutaraldeído - Ativação glicidol - Ativação epicloridrina	Lipase	Ativação: epicloridrina Eficiência de imobilização: 78 %	Mendes, Castro e Giordano (2013)

3.1.2.2 Alginato de sódio

O alginato é um heteropolissacarídeo encontrado tanto na matriz intercelular de algas marrons, quanto recobrando, extracelularmente, algumas espécies de bactérias. Foi descoberto em algas marrons (*Phaeophyta*) no final do século XIX e desde então tornou-se um importante produto industrial, usado em alimentos, materiais estéticos, indústria médica e farmacêutica (HAY et al., 2010). Sua estrutura química consiste de cadeias lineares de resíduos de ácido β -D-manurônico (M) unidos por ligações tipo (1→4) e resíduos de seu epímero, o ácido α -L-gulurônico (G), em várias proporções. Estes resíduos estão arrançados na forma de blocos de ácidos manurônico (M) ou gulurônico (G), que podem ser compostos por blocos de homopolímeros (GG e MM) junto com blocos alternados (MG) na mesma molécula (Figura 4) (DRAGET; SKJÅKBRÆK; SMIDSRØD, 1994).

Figura 4- Estrutura química do alginato

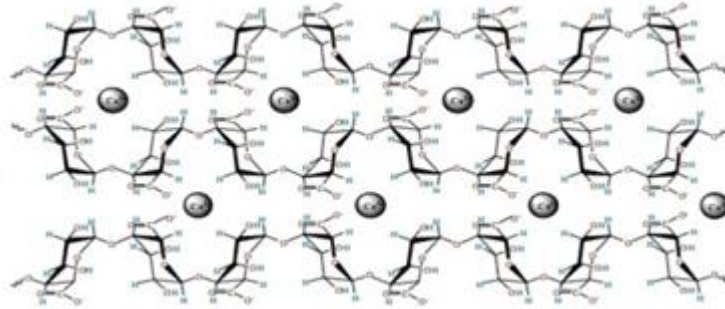
(a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos; (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; (c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados.

Fonte: Adaptação de Kawaguti e Sato (2008)

Os alginatos se diferenciam pelo conteúdo e sequência desses polímeros, influenciando na flexibilidade da cadeia, solubilidade e estabilidade do gel formado. Dentre as diferenças estão os blocos alternados MG que formam cadeias mais flexíveis e mais solúveis em pH ácido. A estabilidade do gel está relacionada ao conteúdo de blocos G, que em grande quantidade apresentam alta porosidade e menor inchamento após secagem. Já os alginatos com grande quantidade de M são mais macios e com poros menores (ERTESVÁG; VALLA, 1998).

No processo de imobilização, os íons cálcio são amplamente empregados, pela capacidade de formar géis fortes e estabelecer ligações entre as cadeias de alginato por interações iônicas, formando uma estrutura reticulada que retém água proporcionando maior estabilidade ao gel. O processo de formação do gel de alginato conforme o modelo *egg-box* de Clark e Ross-Murphy (1987), está relacionado com as interações de segmento G com íons de cálcio que são alinhados lado a lado, originando uma cavidade. Os íons de cálcio se unem às cadeias, estabelecendo uma rede tridimensional (Figura 5).

Figura 5- Formação do gel de alginato de cálcio



Ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa (modelo *egg-box*).

Fonte: Adaptado de Kawaguti e Sato (2008)

Devido a essas propriedades, o alginato pode ser aplicado em diversos setores. Na imobilização de enzimas o alginato de sódio é muito utilizado por gelificação iônica, sendo único polissacarídeo que contém, naturalmente, grupos carboxílicos em cada constituinte residual, além de ser um método simples, não tóxico, biodegradável e barato (MOHAPATRA; MONDAL; PATI, 2007).

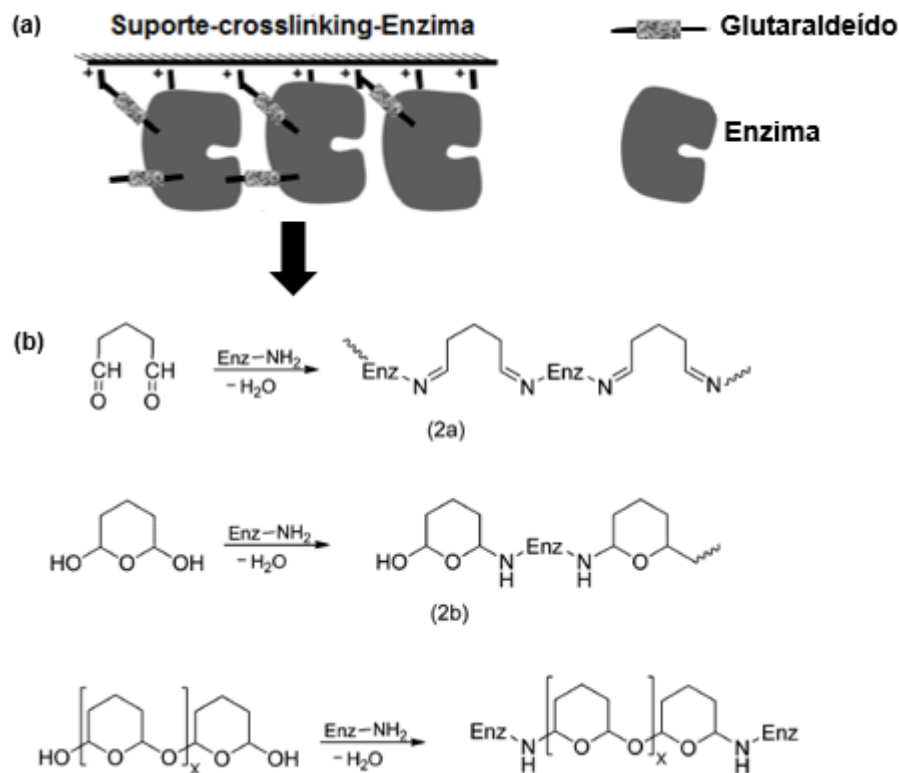
3.1.3 Glutaraldeído

O glutaraldeído é um dos reagentes mais utilizados nos processos de imobilização de enzimas. É um potente agente de reticulação da proteína, ativador de suportes e agente de ligação cruzada entre enzima e suporte. O glutaraldeído pode se polimerizar e reagir com a enzima em diferentes porções, envolvendo grupos amino primários das proteínas, tióis, fenóis, imidazoles (BARBOSA et al., 2014). As principais estruturas relacionadas com a ligação cruzada de proteínas ou enzimas ainda não foram totalmente elucidadas. Algumas estruturas propostas podem ser visualizadas na Figura 6.

A diversidade de reações observadas na Figura 6b, indica que o glutaraldeído não é limitado a um mecanismo por apresentar um equilíbrio em suas formas conformacionais monomérica e polimérica e pela capacidade de toda estrutura poder reagir diferente com a proteína. Em condições ácidas e neutras os grupos aldeído do glutaraldeído reagem com proteínas e podem formar bases de Schiff,

entretanto, em condições ácidas as bases de Schiff são insatáveis. Quando adicionado em solução básica pode ocorrer a polimerização do glutaraldeído com formação de bases de Schiff entre os grupos aldeídos da molécula que também apresenta menor estabilidade que a base de Schiff em condições neutras, pois a ligação C-C apresenta perda de ressonância (MIGNEAULT et al., 2004).

Figura 6- Interação Glutaraldeído-Enzima



(a) Interação suporte-glutaraldeído-enzima; (b) possíveis reações glutaraldeído-enzima em condição neutra.

Fonte: Adaptação de Barbosa et al. (2014)

A utilização de glutaraldeído pode ser intramolecular, promovendo ligações cruzadas entre os aminoácidos das proteínas. Para esta reação ocorrer o glutaraldeído é adicionado após a imobilização da enzima ou na solução de enzima livre (HABIBI et al., 2006). A reação também pode ser intermolecular com ligações covalentes cruzadas entre moléculas (suporte-glutaraldeído-proteína). Nesta reação o suporte é pré-ativado com glutaraldeído promovendo uma ponte que será ligada a

enzima (KUMAR; KANWAR, 2011). Nas duas formas de reações ocorre aumento de estabilidade da biomolécula (HABIBI et al., 2006; KUMAR; KANWAR, 2011).

3.2 β -GLICOSIDASES

As β -glicosidases (β -D-glicosídio glicohidrolase, EC 3.2.1.21) são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas β -1,4 de di e/ou oligossacarídeos e glicosídeos conjugados, liberando glicose (BHATIA et al., 2002). São encontradas em bactérias (SESTELO et al., 2004), fungos (BELANCIC et al., 2003), animais (PONTOH; LOW, 2002) e plantas (GERARDI et al., 2001). Nas plantas podem atuar na hidrólise de precursores de hormônios (LEXA et al., 2003; SARRY; GUNATA, 2004), no amadurecimento de frutos (FAURE, 2002), na germinação de sementes e desenvolvimento de embriões (OPARISSI et al., 2003), além da emissão de aromas em flores (HAYASHI et al., 2004). Participam das interações patógeno-planta (HAERTER; VOEGELE, 2004) e herbívoro-planta (BHATIA et al., 2002).

As β -glicosidases catalisam reações de hidrólise de ligações β -glicosídicas, principalmente, em glicosídeos de baixa massa molecular (BHATIA et al., 2002), sendo que a origem, a função e a localização da enzima refletem na afinidade pelo substrato (WOODWARD; WISEMAN, 1982). As β -glicosidases podem atuar em ligações β -glicosídicas de diferentes moléculas em condições de alta concentração de substrato e baixa atividade de água (BHATIA et al., 2002).

Essas enzimas são divididas em três grupos relacionados com a especificidade ao substrato: aril β -glicosidases, que atuam em aril-glicosídeos; celobiasas verdadeiras, que hidrolisam celobiose e β -glicosidases com ampla especificidade ao substrato que é a grande maioria das β -glicosidases (BHATIA et al., 2002). Além disso, podem ser identificadas pela similaridade das sequências de aminoácidos e nos padrões de enovelamento destas enzimas (SOUZA, 2009). O mecanismo de ação das β -glicosidases é baseado na hidrólise enzimática de ligações β -glicosídicas que compreende inversão ou retenção do carbono anomérico. Essas enzimas são importantes pela diversidade de aplicações em diferentes setores industriais que envolvem processos biotecnológicos (CAIRS; ESEN, 2010).

3.2.1 Aplicação de β -glicosidases

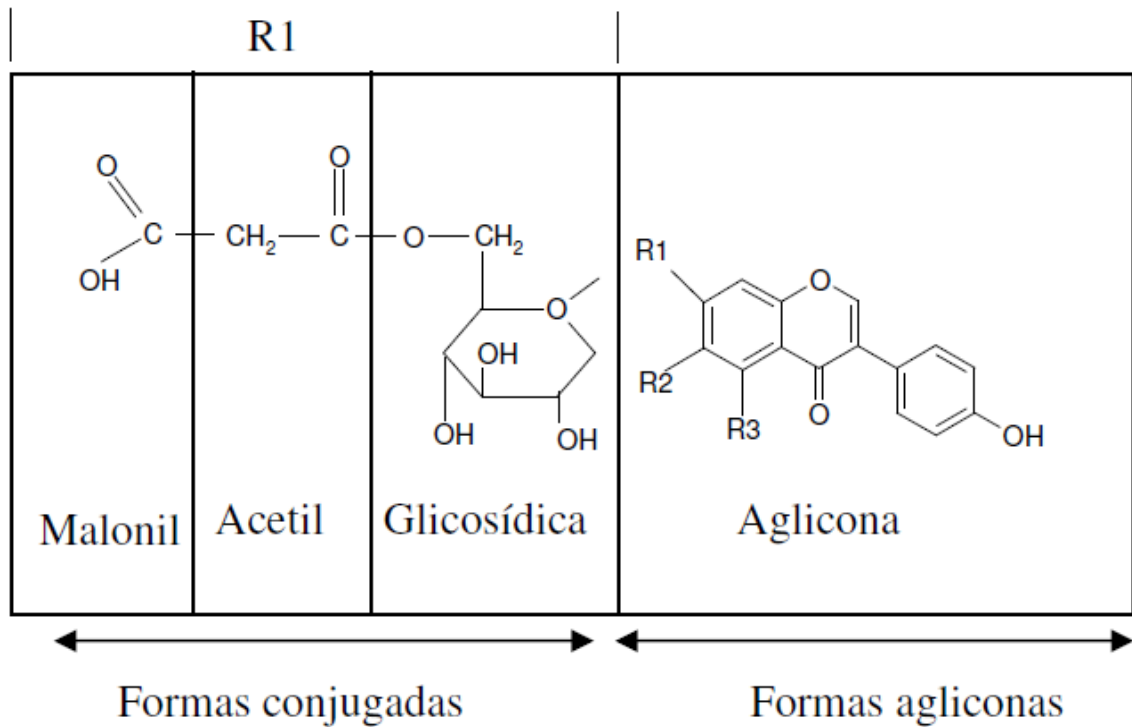
Na indústria de alimentos as β -glicosidases desempenham papel nos processos biotecnológicos como o uso em sacarificação e fermentação (HAN; CHEN, 2008), na produção de aromas (OPASSIRI et al., 2003; SARRY; GÜNATA, 2004) em chás (SU et al, 2010), vinhos (PALMERI; SPAGNA, 2007), sucos de frutas (MAICAS; MATEO, 2005) e celulose (BALDRIAN; VALASKOVA, 2008).

As isoflavonas são substratos importantes da β -glicosidase. São compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides, encontradas principalmente em leguminosas e fabáceas. Na soja, o teor de isoflavonas é elevado correspondendo 0,3 a 0,8 % do peso seco do grão (JUNG; MURPHY; SALA, 2008). Considerando a massa do grão de soja, os cotilédones representam cerca de 90 % de seu peso, indicando que a maior parte das isoflavonas está nos cotilédones (FERRARI; DEMIATE, 2001; RIBEIRO et al., 2007).

A concentração de isoflavonas totais no grão de soja pode variar de acordo com o ambiente, a variabilidade genética da cultivar e a interação desses fatores durante o desenvolvimento da leguminosa (CARRÃO-PANIZZI et al., 2003; LEE et al., 2003; LEE et al., 2007). Quanto à estrutura química, as isoflavonas são distribuídas em quatro formas, as quais apresentam três isômeros cada, totalizando 12 isômeros de isoflavonas (Figura 7 e Tabela 1). As agliconas, daidzeína, gliciteína e genisteína não apresentam glicose. Quando glicosiladas, tem-se os β -glicosídeos, daidzina, glicitina e genistina. Há também, as formas acetilglicosídicas, 6"-O-acetildaidizina, 6"-O-acetilglicitina e 6"-O-acetilgenistina e as formas malonilglicosídicas 6"-O-malonil-daidizina, 6"-O-malonil-glicitina e 6"-O-malonil-genistina (LIU, 1997; KAO; CHIEN; CHEN, 2008; ROSTAGNO et al., 2009).

As isoflavonas podem desempenhar funções em humanos, dentre elas, anticarcinogênica (BOERSMA et al., 2001; KIM et al., 2005; QIN et al., 2006; WHITE et al., 2010; LI et al., 2011; HILLMAN et al., 2011), indutora de apoptose (LI et al., 2011), atividade imunológica (SAKAI; KOGISO, 2008) e anti-inflamatória (SAKAI et al., 2011).

Figura 7- Estrutura química geral das isoflavonas



Fonte: Rostagno et al. (2009)

Tabela 1- Classificação e estrutura química das isoflavonas

		R1	R2	R3
AGLICONAS	Genisteína	H	H	OH
	Daidzeína	H	H	H
	Gliciteína	H	OCH ₃	H
GLICOSÍDIOS	Genistina	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	OH
	Daidzina	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	H
	Glicitina	C ₆ O ₅ H ₁₁	OCH ₃	H
ACETIL GLICOSÍDIOS	A-Genistina	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃	H	OH
	A-Daidzina	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃	H	H
	A-Glicitina	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃	OCH ₃	H
MALONIL GLICOSÍDIOS	M-Genistina	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₂ COOH	H	OH
	M-Daidzina	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₂ COOH	H	H
	M-Glicitina	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₂ COOH	OCH ₃	H

Fonte: Adaptado de Kao, Chien e Chen (2008)

As isoflavonas também promoveram a diminuição do colesterol e

triglicerídeos sérico, com prevenção de doenças cardiovasculares (LOVATI et al., 2000; RIMBACH et al., 2008), apresentaram efeito estrogênico diminuindo os sintomas típicos da menopausa (ALLRED et al., 2001; DORNSTAUDER et al., 2001; MUELLER et al. 2004; PIOVESAN et al. 2004), melhora no cabelo, estado da pele, humor, libido, sono e cansaço (LIPOVAC et al., 2011). Além disso, Teekachunhatean et al. (2011) ressaltaram que a administração de isoflavonas melhora a densidade óssea, prevenindo a osteoporose. Essas atividades biológicas das isoflavonas são mais acentuadas nas formas agliconas que nas β -glicosídicas (KAO; CHIEN; CHEN, 2008).

A biodisponibilidade das isoflavonas da soja em humanos depende do metabolismo, hábitos alimentares, etnia e microbiota intestinal, sendo que esses fatores promovem alterações nas β -glicosidases intestinais que clivam as isoflavonas β -glicosídicas em agliconas (ISMAIL; HAYES, 2005). Quando são metabolizadas, as formas acetil e malonil são convertidas às β -glicosídicas no trato gastro intestinal após a ingestão. Estas são hidrolisadas pela β -glicosidase das bactérias intestinais liberando aglicona e glicose (SETCHELL et al., 2002). Em adultos, a concentração plasmática máxima após a ingestão de isoflavonas agliconas é de 4 a 7 horas, enquanto que as β -glicosídicas são absorvidas em até 11 horas, devido à necessidade de hidrólise prévia para posterior absorção (SETCHELL et al., 2001).

Dessa forma, considerando que a composição de isoflavonas na soja corresponde a 31 % de β -glicosídeos (daidzina, glicitina e genistina) e 2 % de agliconas (daidzeína, gliciteína e genisteína) (RIBEIRO et al., 2007) e que a forma aglicona é mais benéfica ao organismo humano (KAO; CHIEN; CHEN, 2008), a aplicação de β -glicosidase exógena em produtos de soja, poderá hidrolisar β -glicosídeos em agliconas. Em alimentos fermentados de soja como misô, natto, tempeh e shoyu, as β -glicosidases microbianas atuam nas isoflavonas β -glicosídicas para obtenção de isoflavonas agliconas (LIU, 1997), as quais apresentam maior atividade biológica (KAO; CHIEN; CHEN, 2008).

Mase, Mori e Yokoe (2004) purificaram e aplicaram a β -glicosidase de *Aspergillus pulverulentus* YM-80 no processamento do tofu. O teor de isoflavonas agliconas aumentou de 5 mg 100 g⁻¹ de soja para 56,9 mg 100 g⁻¹, enquanto que as isoflavonas β -glicosídicas apresentaram decréscimo do teor de 63,5 mg 100 g⁻¹ para 4,7 mg 100 g⁻¹, indicando eficácia na hidrólise de β -glicosidase. Entretanto, a ação

desta enzima nas formas malonil e acetilglicosídicas não foi eficiente. Sumarna (2010) investigou a atividade de β -glicosidase em extrato de soja fermentado com sete variedades de *Lactobacillus*. A fermentação foi eficiente para a aumentar a qualidade funcional do extrato de soja. As cepas utilizadas apresentaram atividade de β -glicosidase e o teor de isoflavonas agliconas aumentou de 27,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 101,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ao utilizar a *L. plantarums*. Chen, Wei, Chi (2011) observaram que a β -glicosidase produzida por *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium longum* na fermentação da farinha de soja desengordurada aumentou o teor de isoflavonas agliconas em 52 % e 60 %.

Além das β -glicosidases microbianas, a soja é uma fonte viável desta enzima para aplicação em produtos de soja. A β -glicosidase endógena da soja hidrolisa as isoflavonas β -glicosídicas em agliconas. A atividade da enzima varia com a cultivar de soja e não há correlação com a concentração de isoflavonas no grão. As condições ambientais influenciam a concentração de isoflavonas, mas não afetam a atividade enzimática (CARRÃO-PANIZZI; BORDINGNON, 2000).

Matsuura e Obata (1993) e Ribeiro et al. (2007) purificaram a β -glicosidase de cotilédones de soja e as condições ótimas obtidas para a enzima foram pH 5,0 a 45 °C. Hsieh e Graham (2001) observaram que a esta enzima de raiz de soja apresentou pH ótimo de 6,0 a 30 °C.

Os principais obstáculos para a aplicação comercial de enzimas são seu baixo rendimento, baixa estabilidade e alto custo de produção. Assim a imobilização da β -glicosidase é uma alternativa, uma vez que este processo pode reduzir custos pela reutilização da biomolécula, possibilidade de operação contínua e controle da formação do produto com processamento simples (GARGOURI et al., 2004; SHEN; XIA, 2004; NAGAMOTO et al., 2005).

3.2.2 Imobilização de β -glicosidases

A imobilização de β -glicosidases de diferentes fontes tem sido relatada. Maitan (2011) imobilizou β -glicosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de sódio e observou 90 % de atividade a 50 °C por 60 min, com aumento de 3 vezes a estabilidade térmica em relação à enzima livre. A utilização da

β -glicosidase imobilizada na produção de etanol aumentou a eficiência de hidrólise da celulose do bagaço de cana.

Borges (2011) imobilizou β -glicosidase de *Trichoderma reesei* em diferentes suportes sólidos visando a obtenção de um derivado ativo e estável para uso em reações de hidrólise de bagaço de cana para produção do etanol de segunda geração. O melhor derivado foi a enzima imobilizada por adsorção em resina poliacrílica funcionalizada com grupos carboxílicos que alcançou rendimento de imobilização de 71 % após quatro horas de reação. Outros trabalhos podem ser observados no Quadro 2.

Quadro 2- Imobilização de β -glicosidase considerando os suportes, métodos empregados e principais resultados obtidos

Fonte	Suporte	Métodos	Resultados	Autores
Amêndoas	Partículas coloidais de terra	Adsorção	Imobilização: maior Km e estabilidade térmica e menor V_{max}	Yan et al. (2010)
<i>Aspergillus niger</i>	Alginato	Aprisionamento	Atividade: 93,6 % e 73,3% depois de 42 dias	Su et al. (2010)
Amêndoas	Poliestireno aminados quitosana	Lig. Covalente	Imobilização: 24 vezes maior com o glutaraldeído.	Zhang et al. (2011)
	Poliestireno aminados quitosana-glutaraldeído			
<i>Aspergillus niger</i>	Agarose (reativos: polietilenoimina, glioxil e amino epoxi)	Adsorção iônica	Imobilização adsorção com amino epoxi: 80 % e 200 vezes maior a estabilidade	Vieira et al. (2011)
		Lig. Covalente		
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Acrílico (Eupergit® C, Eupergit® C250L, cryogel)-glutaraldeído	Lig. Covalente	Imobilização Cryogel: 91% Reuso: 10 vezes Estabilidade: 3 meses	Khan et al. (2012)
Amêndoas	Espumas Sílica-glutaraldeído	Lig. Covalente Cruzada	Reuso: 10 vezes	Reshmi e Sugunan (2013)
<i>Aspergillus niger</i>	Alginato	Aprisionamento	Aplicação: 63,7 % de aumento da isoflavona genisteína	Zhang et al. (2013)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Alginato	Aprisionamento	Imobilização: próximo de 100 % em todos os suportes Reuso da DEAE: 5 vezes	Pessela et al. (2014)
	CNBr-agarose	Lig. Covalente		
	MANAEAgarose	Adsorção iônica		
	DEAE-cellulose	Adsorção iônica		

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foi utilizado como matéria-prima os cotilédones da cultivar de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill), BRS 213, safra 2010/2011, desenvolvida na Embrapa Soja, Londrina, Paraná, acondicionados sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os grãos de soja foram selecionados para remoção dos danificados, manchados e de materiais estranhos. Posteriormente, os cotilédones foram separados da casca e do gérmen do grão de soja, moídos em moinho analítico (IKA-A11 Basic) e a farinha obtida foi tamisada em tamis de 20 mesh para extração e purificação parcial de β -glicosidase, utilizada no processo de imobilização. Foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar fornecido por garapeiros e alginato de sódio obtido de *macroscitis pirifera*, de viscosidade média (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) como suportes para imobilização da enzima e os reagentes utilizados nos experimentos foram de pureza analítica ou grau HPLC.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 Determinação de Atividade de β -glicosidase

Para determinação de atividade de β -glicosidase nas diferentes etapas do trabalho, foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) conforme Matsuura e Obata. (1993). Para análise de atividade de β -glicosidase livre 1 mL de *p*-NPG 1 mM em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0 foi mantido em banho-Maria a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Decorrido este tempo, foram adicionados 0,25 mL de amostra a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,25 mL de carbonato de sódio 500 mM. Dessa forma, o *p*-nitrofenol liberado na reação, de coloração amarela, foi determinado por espectrofotometria a 420 nm. A quantificação da atividade da enzima foi realizada pela curva de calibração de *p*-nitrofenol (0,016–0,160 μmol). Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de β -glicosidase que libera 1 μmol de *p*-NP min^{-1} , nas condições de ensaio.

Para determinação de atividade da enzima imobilizada em bagaço de cana, o ensaio foi conduzido com adição de 4 mL do p-NPG 1 mM (tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0) em aproximadamente 0,1 g do suporte acondicionados em banho-Maria a 30 °C por 30 min. Posteriormente, o suporte foi filtrado a vácuo e em 1 mL do filtrado foi adicionado 1,25 mL de carbonato de sódio 500 mM. Para análise de atividade da enzima imobilizada em alginato de sódio foram utilizadas 4 esferas ou cápsulas e o ensaio foi conduzido nas mesmas condições de determinação de atividade da enzima imobilizada em bagaço de cana. Análises controle de reação foram realizadas pela substituição do substrato por tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0.

4.2.2 Determinação de Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis das amostras foi quantificado pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando como padrão uma solução de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) nas concentrações de 40–400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A determinação de proteínas nas amostras com a enzima imobilizada foi realizada nos extratos e nos filtrados, decorrentes da lavagem após o processo de imobilização.

4.2.3 Determinação de Atividade Específica de β -glicosidase

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

4.2.4 Determinação de Açúcares Totais

A determinação dos açúcares totais foi realizada nas águas de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar pelo método fenol sulfúrico segundo Dubois et al. (1956), empregando glicose (0–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão.

4.2.5 Determinação da Composição Química da Fibra do Bagaço de Cana

As análises realizadas para determinar a composição da fibra do bagaço de cana-de-açúcar, antes de depois do tratamento alcalino e térmico, foram: cinzas segundo técnica descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2006); celulose, lignina, hemicelulose determinada por fibra de detergente neutro (FDN) e fibra de detergente ácido (FDA) segundo Van Soest, Robertson e Lewis (1991).

4.2.6 Determinação de Isoflavonas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)

Após a aplicação da β -glicosidase imobilizada em extrato comercial de soja, as amostras foram filtradas, liofilizadas e desengorduradas com *n*-hexano (1:10, m/v) a 25 °C por 1 h com agitação contínua e rotativa, seguida por filtração a vácuo. Para a extração das isoflavonas, 300 mg de amostra desengordurada foram adicionadas à 6 mL de solução extratora (água, etanol e acetona, 1:1:1, v/v/v) e agitados a cada 15 min por 1 h a 25 °C. A mistura foi colocada em banho ultrassônico por 15 min a 25 °C conforme a metodologia descrita por Yoshiara et al. (2012). Em seguida, o extrato foi centrifugado (4°C, 794 x *g*, 15 min; Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante filtrado em membranas hidrofílicas de PVDF (Fluoreto de polivinilideno) com 0,22 μ m de tamanho de poro (Millex-GV, Millepore, Billerica, MA, USA) e, então, aplicado no Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE).

Para a separação e quantificação das isoflavonas por CLUE foi utilizado o cromatógrafo UPLC® (Acquity UPLC® System, Waters, EUA), equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária, forno com temperatura controlada de 35 °C e detector com arranjo de diodos (DAD), controlado pelo software *Empower 3*. A eluição das amostras foi conduzida em coluna de fase reversa Acquity™ UPLC BEH 18 (50 mm x 2,1 mm d.i.; 1,7 μ m de diâmetro de partícula; Waters), com fase móvel constituída de um sistema gradiente binário, com fase inicial de 90 % de solução aquosa de ácido acético pH 3 (solvente A) e 10 % de acetonitrila (solvente B). Em 8 min de eluição foi atingida uma proporção de 0 % do solvente A e 100 %

do solvente B, retornando às condições iniciais em 9 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. A vazão da fase móvel foi de 0,70 mL min⁻¹ e o sistema de detecção foi constituído por um detector com arranjo de diodos (DAD-Waters), ajustado ao comprimento de onda de 260 nm.

A identificação de cada forma química de isoflavona nos cromatogramas foi realizada por comparação dos espectros de absorção e tempos de retenção dos seus respectivos padrões. A quantificação foi realizada por integração das áreas dos picos e padronização externa (área x concentração) utilizando padrões individuais de isoflavonas: 6''-O-acetilglicosídeos e 6''-O-malonilglicosídeos (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japão), β -glicosídeos e agliconas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Para cada amostra foram realizadas três corridas cromatográficas. O teor de isoflavonas foi expresso por $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato comercial de soja.

4.3 OBTENÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA

4.3.1 Extração de β -glicosidase

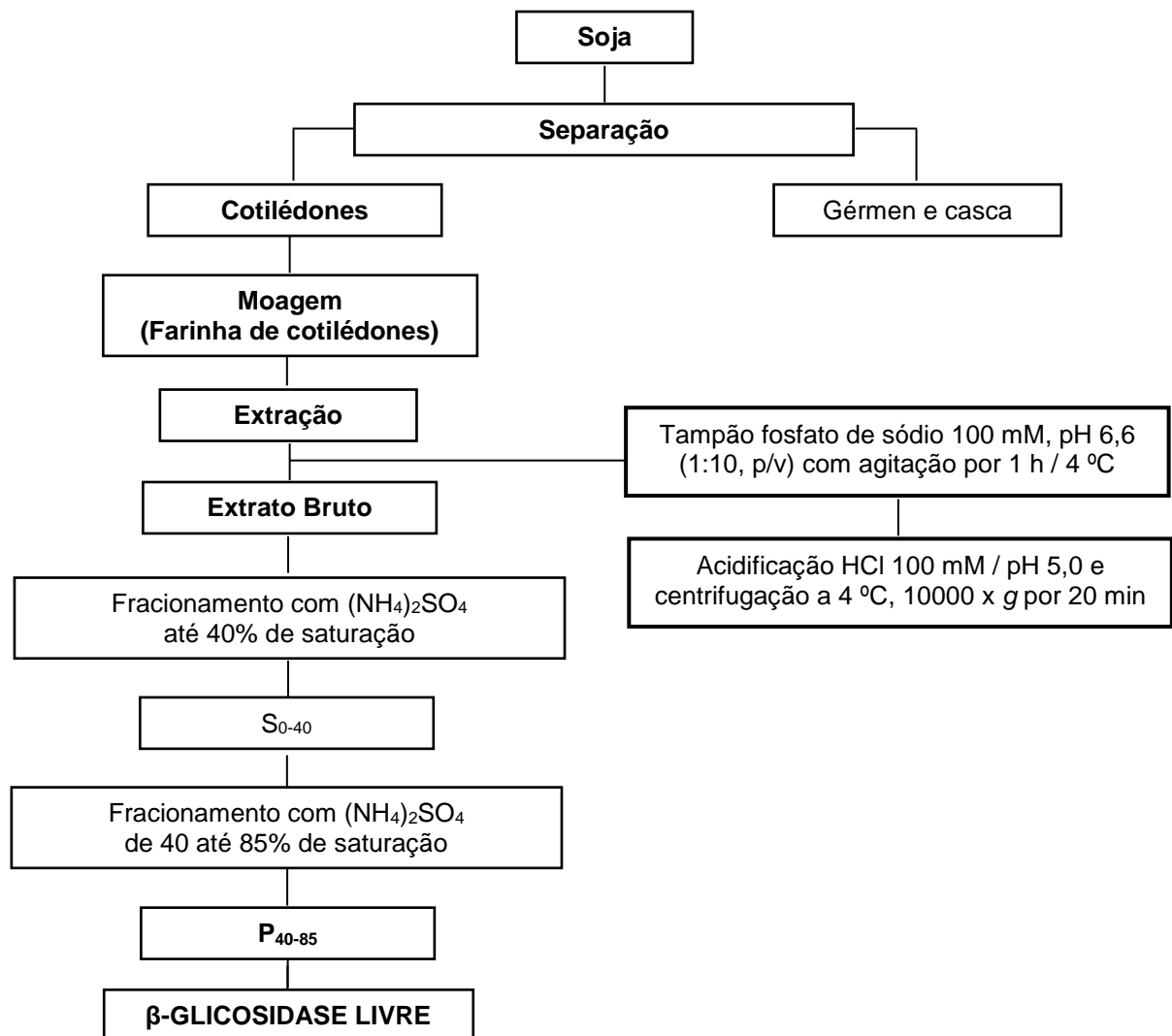
A extração de β -glicosidase foi realizada conforme descrição de Matsuura e Obata (1993) com a seguinte modificação: centrifugação de 4000 x g para 10000 x g. Foram utilizados 60 g de farinha de cotilédones de soja (item 4.1) e tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6 (1:10, p/v), sob agitação por 1 h a 4 °C e centrifugação a 4 °C, 10000 x g por 20 min (ultracentrífuga *Beckman Coulter* Modelo optima XE-100). O precipitado foi descartado e o sobrenadante acidificado com HCl 100 mM até pH 5,0 que novamente foi centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB), sendo utilizado como fonte de β -glicosidase para fracionamento.

4.3.2 Fracionamento do Extrato Bruto com Sulfato de Amônio

As proteínas do extrato bruto foram precipitadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 até 40 % e de 40 até 85 %. Ao extrato bruto foi adicionado lentamente o sulfato de amônio até atingir 40 % de saturação e mantido em repouso a 4 °C por 12 h para completa

precipitação. O material foi centrifugado conforme item 4.3.1. Ao sobrenadante (S_{0-40}) foi adicionado sulfato de amônio até 85 % de saturação, mantido a 4 °C por 12 h e centrifugado (item 4.3.1). Os precipitados (P_{0-40} e P_{40-85}), ressuspensos em tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0, e os sobrenadantes (S_{0-40} e S_{40-85}) foram dialisados no mesmo tampão por 14 h a 4 °C (SANTOS et al., 2013). Os dialisados foram analisados quanto à atividade de β -glicosidase (item 4.2.1) e teor de proteínas solúveis (item 4.2.2). Após as determinações, a fração P_{40-85} apresentou maior atividade de β -glicosidase, sendo utilizada como fonte de enzima livre no processo de imobilização em bagaço de cana-de-açúcar e alginato de sódio. Os procedimentos de extração e purificação parcial de β -glicosidase de cotilédones de soja estão resumidos no fluxograma apresentado na Figura 8.

Figura 8- Fluxograma de obtenção da β -glicosidase de cotilédones de soja



4.4 IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.4.1 Tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar

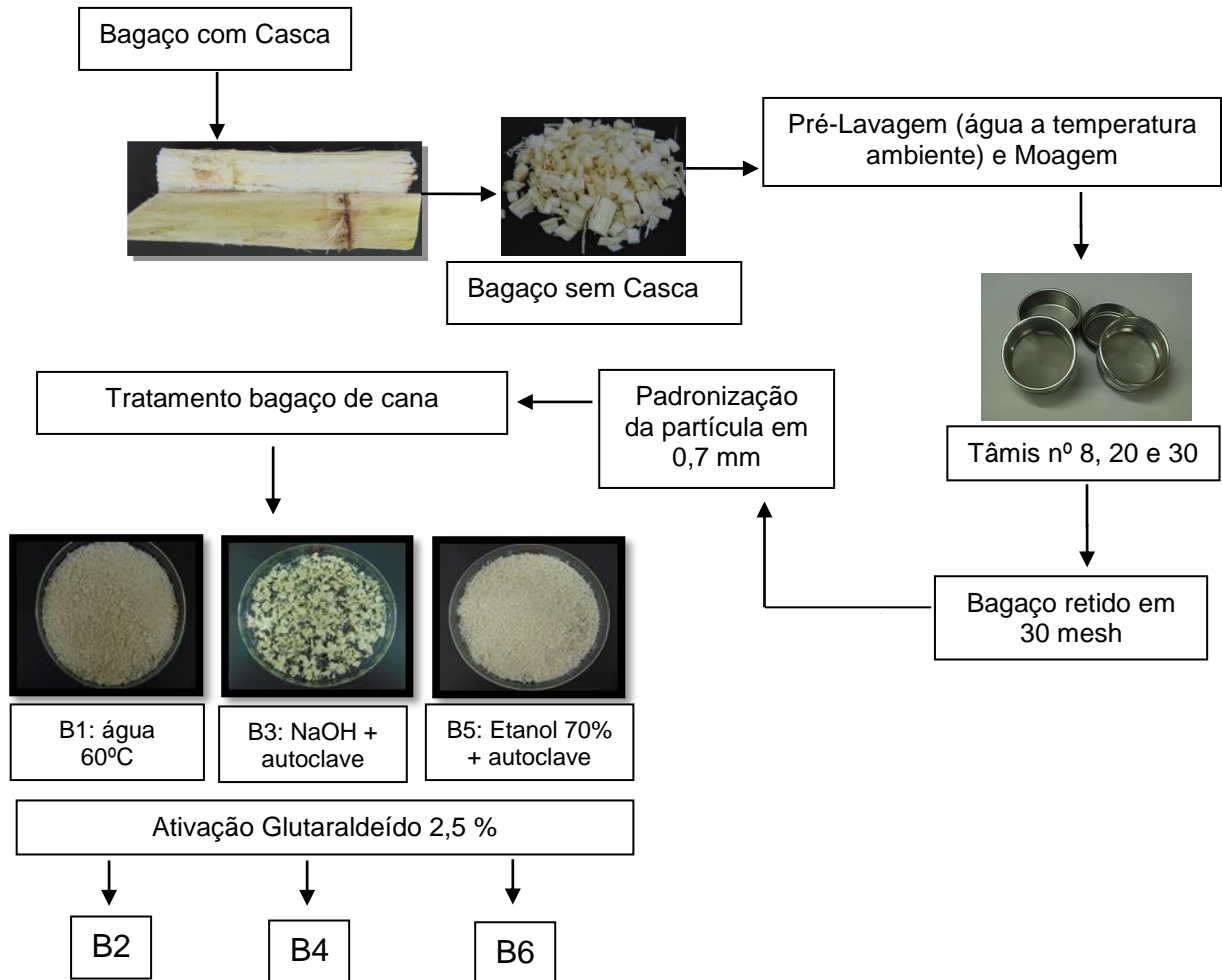
A polpa do bagaço de cana-de-açúcar prensado foi retirada, cortada, pré-lavada com água a temperatura ambiente, seca a 60 °C em estufa com circulação e renovação do ar (Marconi, MA 035) e moída para padronização do tamanho da partícula por tamisação em diferentes malhas nº 8, 20 e 30. O bagaço retido em 30 mesh com tamanho da partícula de 0,7 mm foi selecionado para imobilização. Para a retirada total dos açúcares, o bagaço foi lavado 20 vezes com água destilada a 60 °C e enxaguado exaustivamente com água destilada a temperatura ambiente. Para confirmação da retirada de açúcares a última água de lavagem foi avaliada quanto a presença de açúcares totais (item 4.2.4).

O bagaço obtido, tratado com água 60 °C (B₁), submetido aos tratamentos: ativação com glutaraldeído (B₂), tratado com NaOH e autoclavado (B₃), tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído (B₄), tratado com etanol 70 % e autoclavado (B₅), tratado com etanol 70 %, autoclavado e ativado com glutaraldeído (B₆), (Figura 9).

O tratamento alcalino do bagaço de cana foi realizado com NaOH 500 mM (1 g : 40 mL) com agitação de 120 rpm por 24 h (incubadora shaker Cientec, CT-712) segundo Santos et al. (2008). Para o tratamento alcoólico do bagaço foi utilizado etanol 70 % (1 g : 40 mL) conforme Santos (2010). O tratamento térmico foi realizado após o tratamento químico em autoclave a 121 °C por 15 min (SANTOS et al., 2008; SANTOS, 2010). A ativação dos bagaços de cana foi realizada com glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7 a 25 °C por 30 min a 70 rpm.

Para a imobilização da β -glicosidase foram utilizados 1 g de suporte tratado em diferentes condições e extratos da enzima contendo 0,7 mg mL⁻¹ de proteína com 5,72 10⁻³ UA mL⁻¹ ou 1,4 mg mL⁻¹ de proteínas com 11,44 10⁻³ UA mL⁻¹, com atividade específica de 8,17 10⁻³ UA mg⁻¹. Os extratos foram diluídos em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7. O sistema foi mantido a 4 °C e 70 rpm em mesa agitadora (Quimis, Q225M) por 6 h para as duas concentrações de proteína.

Figura 9- Tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar para imobilização da β -glicosidase



A atividade de β -glicosidase e o teor de proteínas foram determinados conforme itens 4.2.1 e 4.2.2. O rendimento de imobilização (RI) foi expresso como $(\text{atividade específica da enzima imobilizada} / \text{atividade específica da enzima livre}) \times 100$ (equação 1).

$$\text{RI (\%)} = \frac{\text{atividade específica da enzima imobilizada} \times 100}{\text{atividade específica da enzima livre}} \quad (\text{equação 1})$$

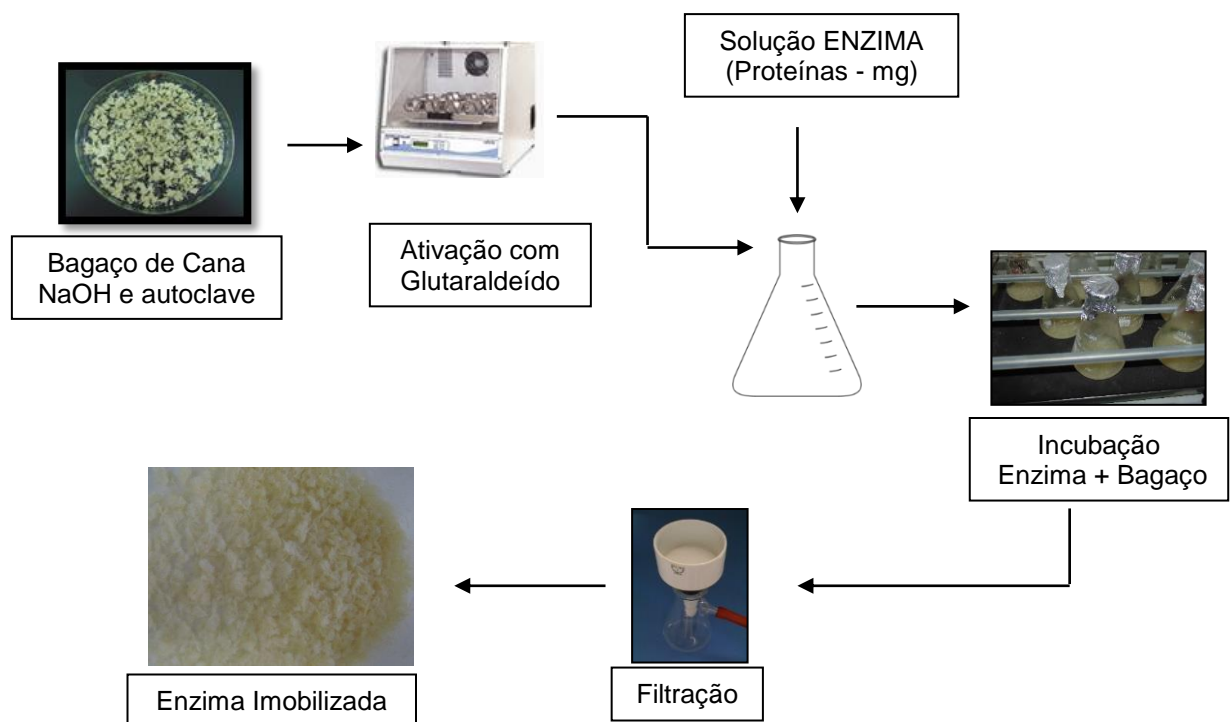
Para avaliar os efeitos dos tratamentos do bagaço de cana no RI foi realizado um planejamento experimental inteiramente casualizado com três repetições de cada tratamento, totalizando 18 experimentos realizados aleatoriamente. Análise de variância (ANOVA) e teste de tukey ($p \leq 0,05$) foram

utilizados para avaliação dos resultados pelo programa Statística 7.0. Assim, o tratamento do bagaço de cana com maior rendimento de imobilização foi selecionado para otimizar as condições de imobilização de β -glicosidase.

4.4.2 Imobilização de β -glicosidase em Bagaço de Cana Tratado com NaOH Autoclavado e Ativado com Glutaraldeído

O suporte selecionado para avaliar condições imobilização foi o bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído (B4), (Figura 10).

Figura 10- Imobilização da β -glicosidase em bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído



Para avaliar a influência de condições de imobilização no RI foi aplicado um delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} para testes exploratórios. Foram realizados 16 experimentos e 3 repetições no ponto central com as variáveis independentes codificadas (x_1 , x_2 , x_3 , x_4 e x_5) e as variáveis decodificadas (X_1 = proteínas, mg mL^{-1} ; X_2 = pH; X_3 = rpm; X_4 = glutaraldeído, % e X_5 = tempo de incubação, h) e seus níveis de variação (Tabela 2).

Tabela 2- Delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} para imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana

Experimentos	Variáveis codificadas e decodificadas				
	$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$	$x_3(X_3)$	$x_4(X_4)$	$x_5(X_5)$
1	-1(0,5)	-1(4,5)	-1(70)	-1(0,5)	1(6)
2	1(1,5)	-1(4,5)	-1(70)	-1(0,5)	-1(2)
3	-1(0,5)	1(7,5)	-1(70)	-1(0,5)	-1(2)
4	1(1,5)	1(7,5)	-1(70)	-1(0,5)	1(6)
5	-1(0,5)	-1(4,5)	1(150)	-1(0,5)	-1(2)
6	1(1,5)	-1(4,5)	1(150)	-1(0,5)	1(6)
7	-1(0,5)	1(7,5)	1(150)	-1(0,5)	1(6)
8	1(1,5)	1(7,5)	1(150)	-1(0,5)	-1(2)
9	-1(0,5)	-1(4,5)	-1(70)	1(2,5)	-1(2)
10	1(1,5)	-1(4,5)	-1(70)	1(2,5)	1(6)
11	-1(0,5)	1(7,5)	-1(70)	1(2,5)	1(6)
12	1(1,5)	1(7,5)	-1(70)	1(2,5)	-1(2)
13	-1(0,5)	-1(4,5)	1(150)	1(2,5)	1(6)
14	1(1,5)	-1(4,5)	1(150)	1(2,5)	-1(2)
15	-1(0,5)	1(7,5)	1(150)	1(2,5)	-1(2)
16	1(1,5)	1(7,5)	1(150)	1(2,5)	1(6)
17	0(1)	0(6)	0(110)	0(1,5)	0(4)
18	0(1)	0(6)	0(110)	0(1,5)	0(4)
19	0(1)	0(6)	0(110)	0(1,5)	0(4)

X_1 (proteínas, mg mL⁻¹); X_2 (pH); X_3 (rpm); X_4 (glutaraldeído, %); X_5 (tempo de incubação, h)

Para este delineamento, a função resposta Y_1 (RI, %) foi expressa conforme equação 1. As variáveis independentes e os níveis de variação foram selecionados conforme Varavinit, Chaokasem e Shobsngob (2002), Vieira et al. (2011) e Borges (2011). O delineamento e a fórmula geral do modelo de superfície de resposta (equação 2) foram realizados pelo software *Statistica 7.0*.

$$y_1 = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{15} X_1 X_5 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{25} X_2 X_5 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{35} X_3 X_5 + \beta_{45} X_4 X_5 + \varepsilon \text{ (equação 2)}$$

Onde:

y = Função resposta experimental;

x_1, x_2, x_3, x_4 e x_5 = Níveis codificados das variáveis independentes;

β = Coeficientes codificados pelo modelo de superfície de resposta;

ε = Resíduo (erro experimental)

4.4.3 Otimização da Imobilização de β -glicosidase em Bagaço de Cana Tratado com NaOH, Autoclavado e Ativado com Glutaraldeído

Após a análise dos resultados obtidos no primeiro delineamento (item 4.4.2) foram fixadas as condições de 1 mg mL⁻¹ de proteínas, 110 rpm e pH 7. Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2² foi realizado para avaliar a influência das variáveis independentes (X_1 = tempo de incubação, h e X_2 = glutaraldeído, %) com 4 pontos axiais e 5 repetições do ponto central, totalizando 13 experimentos (Tabela 3).

Tabela 3- DCCR 2² das variáveis independentes para imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana

Experimentos	Variáveis codificadas e decodificadas	
	$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$
1	-1(4)	-1(1,5)
2	-1(4)	1(3,5)
3	1(12)	-1(1,5)
4	1(12)	1(3,5)
5	-1,41(2)	0(2,5)
6	1,41(14)	0(2,5)
7	0(8)	-1,41(1)
8	0(8)	1,41(4)
9	0(8)	0(2,5)
10	0(8)	0(2,5)
11	0(8)	0(2,5)
12	0(8)	0(2,5)
13	0(8)	0(2,5)

X_1 (tempo de incubação, h) e X_2 (glutaraldeído, %)

Para este segundo delineamento, a função resposta Y_1 (RI, %) foi expressa conforme equação 1. O delineamento e a fórmula geral do modelo quadrático de superfície de resposta (equação 3) foram realizados pelo software *Statistica 7.0*.

$$y_1 = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \text{ (equação 3)}$$

4.5 IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA EM ALGINATO DE SÓDIO

4.5.1 Imobilização de β -glicosidase de Soja em Esferas de Alginato de Sódio

A imobilização de β -glicosidase em esferas de alginato de sódio foi realizada pelas metodologias aprisionamento direto, aprisionamento-crosslinking, crosslinking-aprisionamento e crosslinking-aprisionamento-crosslinking de Su et al. (2010) e Zhang et al. (2013) modificados.

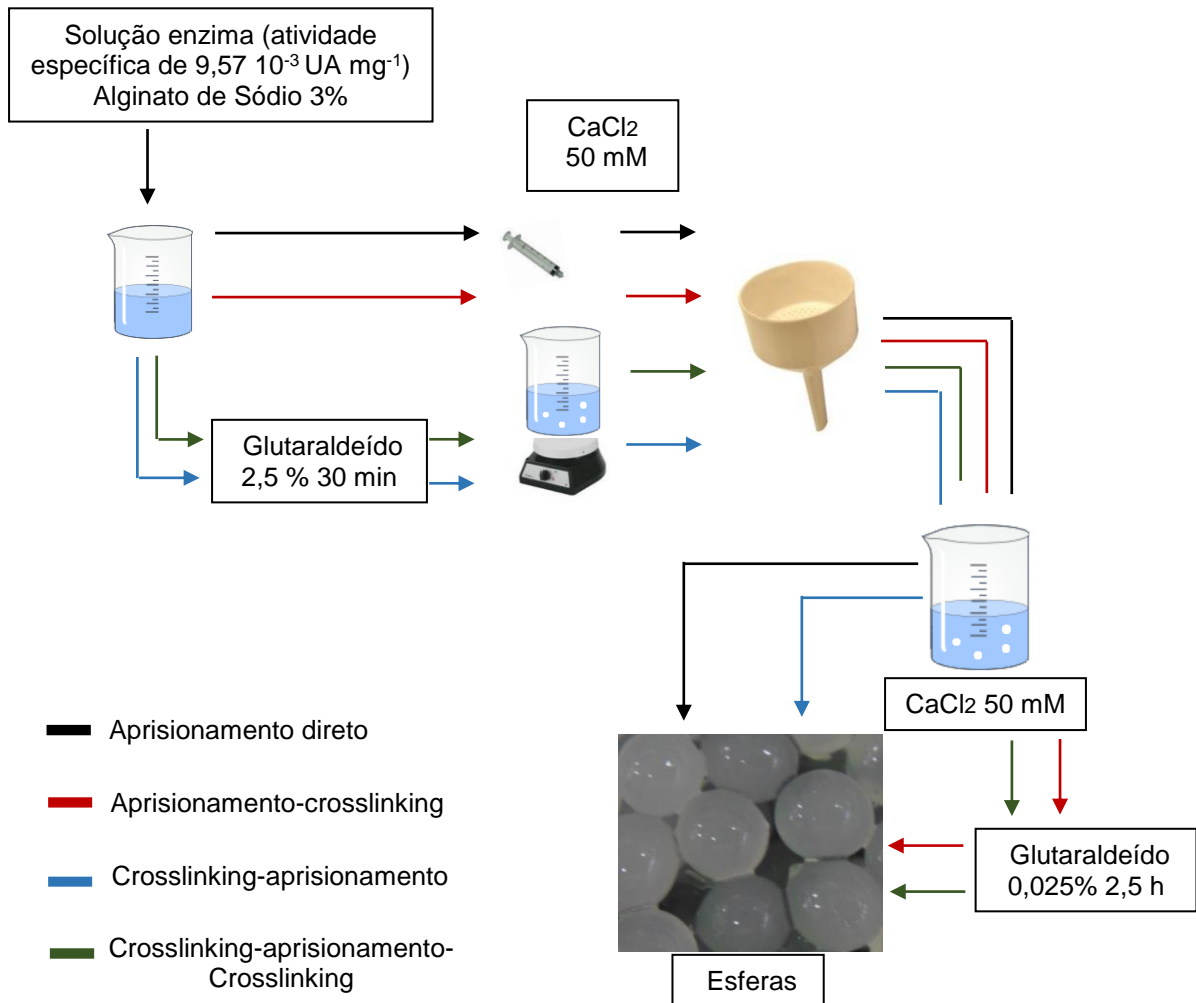
Para a metodologia de aprisionamento direto foram utilizados 0,54 mL de solução de β -glicosidase (1 mg proteínas mL⁻¹ e 9,57 10⁻³ UA mL⁻¹) misturada com 9,46 mL de alginato de sódio 3 %. A mistura foi gotejada em CaCl₂ 50 mM (tampão fosfato citrato 50 mM pH 5) com uma seringa para a formação das esferas, separadas da solução de CaCl₂ por filtração. Para aumentar a estabilidade, as esferas foram adicionadas em nova solução de CaCl₂ 50 mM por 1 h a 4 °C e 100 rpm em mesa agitadora (Quimis Q225M), mantidas em repouso por 16 h. Posteriormente, foram filtradas, separadas e lavadas três vezes com tampão fosfato citrato 50 mM pH 5,0 (Figura 11).

No aprisionamento-crosslinking, após aprisionamento direto, as esferas foram reticuladas com glutaraldeído a 0,025 %, por 2,5 h. Em seguida, foram separadas e lavadas três vezes com tampão fosfato citrato 50 mM pH 5,0 e acondicionadas no mesmo tampão a 4 °C (Figura 11).

No crosslinking-aprisionamento foi preparada uma mistura contendo 0,54 mL solução de β -glicosidase (1 mg proteínas mL⁻¹ e 9,57 10⁻³ UA mL⁻¹), 9,46 mL de alginato de sódio 3 % e 1,3 mL de glutaraldeído 2,5 %, mantida a 4 °C e 100 rpm por 30 min. A mistura final foi usada conforme aprisionamento direto (Figura 11)

Para a metodologia crosslinking-aprisionamento-crosslinking foi realizada uma combinação dos procedimentos crosslinking-aprisionamento e aprisionamento-crosslinking (Figura 11).

Figura 11- Imobilização da β -glicosidase de soja em esferas de alginato de sódio



4.5.2 Imobilização de β -glicosidase de Soja em Cápsulas de Alginato de Sódio

A imobilização de β -glicosidase em cápsulas de alginato de sódio foi realizada pelas metodologias adsorção direta, adsorção-crosslinking, crosslinking-adsorção e crosslinking-adsorção-crosslinking de Su et al. (2010) e Zhang et al. (2013) modificados.

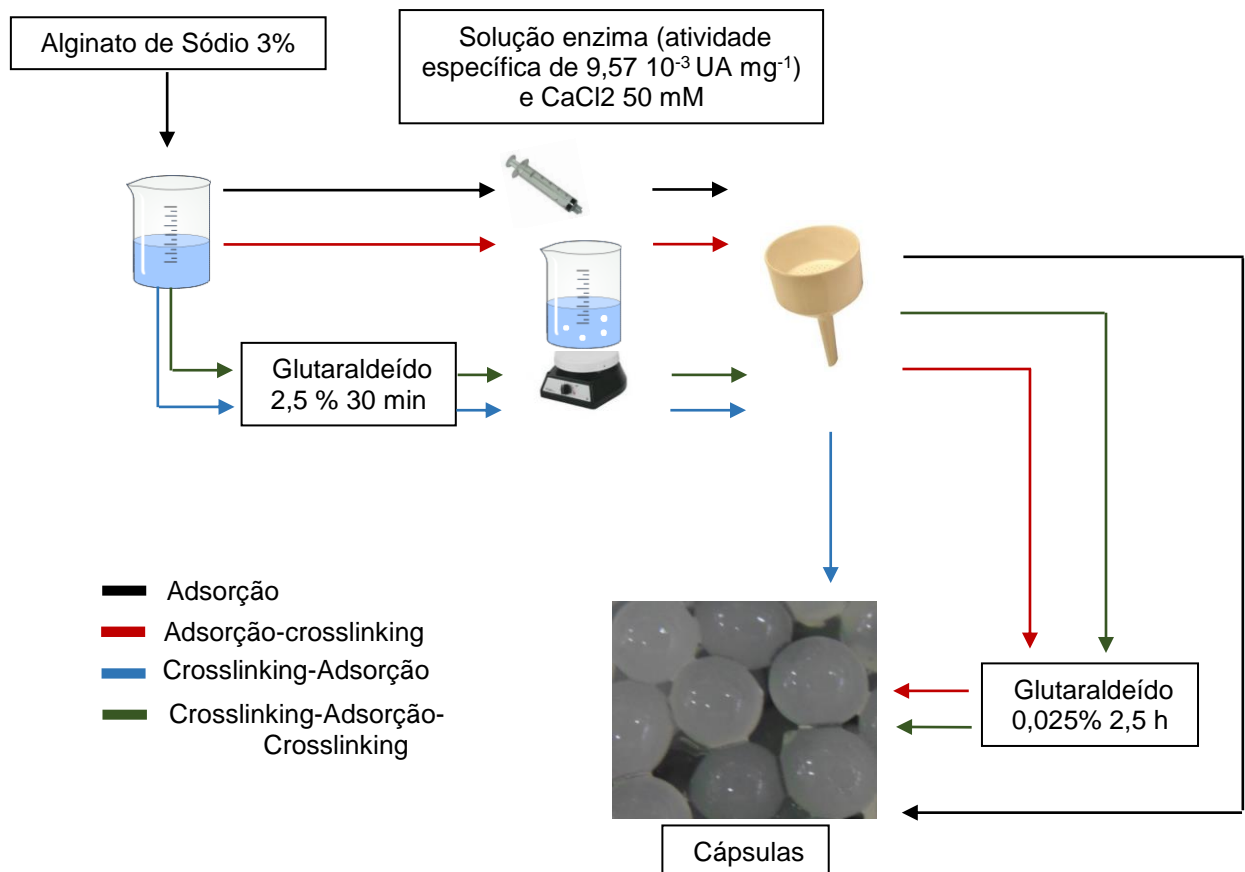
Para a metodologia de adsorção direta, 10 mL de alginato de sódio 3 % em uma seringa foi gotejado em uma solução de β -glicosidase ($1 \text{ mg proteínas mL}^{-1}$ e $9,57 \cdot 10^{-3} \text{ UA mL}^{-1}$) diluída em CaCl_2 50 mM para a formação das cápsulas. As cápsulas foram agitadas por 1 h a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e 100 rpm em mesa agitadora (Quimis Q225M), mantidas em repouso por 16 h, filtradas, separadas e lavadas três vezes com tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0 (Figura 12).

Na adsorção-crosslinking, após a adsorção direta, as cápsulas foram reticuladas com glutaraldeído 0,025 % e 100 rpm por 2,5 h, separadas e lavadas três vezes com tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0 (Figura 12).

No crosslinking-adsorção foi preparada uma mistura contendo 10 mL de alginato de sódio 3 %, 1,3 mL de glutaraldeído 2,5 % mantidas a 4 °C e 100 rpm por 30 min. Após, o procedimento foi realizado conforme adsorção (Figura 12).

Para a metodologia crosslinking-adsorção-crosslinking foi realizada uma combinação dos procedimentos crosslinking-adsorção e adsorção-crosslinking (Figura 12).

Figura 12- Imobilização da β -glicosidase de soja em cápsulas de alginato de sódio



4.5.3 Otimização da Imobilização de β -glicosidase de Soja em Cápsulas de Alginato de Sódio

A metodologia selecionada para avaliar as condições de imobilização foi a crosslinking-adsorção-crosslinking (cápsulas). Para avaliar a influência de condições no RI foi aplicado um delineamento fatorial completo 2^4 para testes exploratórios.

Foram realizados 16 experimentos e 3 repetições do ponto central com as variáveis independentes codificadas (x_1 , x_2 , x_3 e x_4) e as variáveis decodificadas (X_1 = pH; X_2 = CaCl₂, mM; X_3 = proteínas, mg mL⁻¹; X_4 = glutaraldeído, %) e seus níveis de variação (Tabela 4).

Tabela 4- Delineamento fatorial completo 2⁴ das variáveis independentes para imobilização de β-glicosidase de soja em cápsulas de alginato de sódio

Experimentos	Variáveis codificadas e decodificadas			
	$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$	$x_3(X_3)$	$x_4(X_4)$
1	-1(4)	-1(30)	-1(1)	-1(0,05)
2	1(6)	-1(30)	-1(1)	-1(0,05)
3	-1(4)	1(70)	-1(1)	-1(0,05)
4	1(6)	1(70)	-1(1)	-1(0,05)
5	-1(4)	-1(30)	1(2)	-1(0,05)
6	1(6)	-1(30)	1(2)	-1(0,05)
7	-1(4)	1(70)	1(2)	-1(0,05)
8	1(6)	1(70)	1(2)	-1(0,05)
9	-1(4)	-1(30)	-1(1)	1(0,1)
10	1(6)	-1(30)	-1(1)	1(0,1)
11	-1(4)	1(70)	-1(1)	1(0,1)
12	1(6)	1(70)	-1(1)	1(0,1)
13	-1(4)	-1(30)	1(2)	1(0,1)
14	1(6)	-1(30)	1(2)	1(0,1)
15	-1(4)	1(70)	1(2)	1(0,1)
16	1(6)	1(70)	1(2)	1(0,1)
17	0(5)	0(50)	0(1,5)	0(0,075)
18	0(5)	0(50)	0(1,5)	0(0,075)
19	0(5)	0(50)	0(1,5)	0(0,075)

X_1 (pH); X_2 (CaCl₂, mM); X_3 (proteínas, mg mL⁻¹) e X_4 (glutaraldeído, %)

Para este delineamento, a função resposta Y_1 (RI, %) foi expressa conforme equação 1. O delineamento e a fórmula geral do modelo linear de superfície de resposta (equação 4) foram realizados pelo software *Statistica 7.0*.

$$y_1 = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \varepsilon \text{ (equação 4)}$$

Após a análise dos resultados obtidos no delineamento fatorial completo 2^4 foram fixadas as condições de 1 mg de proteína e glutaraldeído 0,075 %. Um DCCR 2^2 foi realizado para avaliar a influência das variáveis independentes (X_1 = pH e X_2 = CaCl₂, mM) com 4 pontos axiais e 5 repetições do ponto central, totalizando 13 experimentos (Tabela 5). Para este delineamento, a função resposta Y_1 (RI, %) foi expressa conforme equação 1 e a fórmula geral do modelo quadrático de superfície de resposta foi realizada conforme a equação 3.

Tabela 5- DCCR 2^2 das variáveis independentes para imobilização de β -glicosidase de soja em cápsulas de alginato de sódio

Experimentos	Variáveis codificadas e decodificadas	
	$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$
1	-1(4)	-1(30)
2	-1(4)	1(70)
3	1(6)	-1(30)
4	1(6)	1(70)
5	-1,41(3,5)	0(50)
6	1,41(6,5)	0(50)
7	0(5)	-1,41(20)
8	0(5)	1,41(80)
9	0(5)	0(50)
10	0(5)	0(50)
11	0(5)	0(50)
12	0(5)	0(50)
13	0(5)	0(50)

X_1 (pH) e X_2 (CaCl₂, mM)

4.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS SUPORTES SEM E COM A ENZIMA IMOBILIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A caracterização morfológica dos suportes utilizados no processo de imobilização foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os bagaços de cana tratados foram secos a 60 °C em estufa com circulação e renovação do ar (Marconi modelo MA 035). O bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído com a enzima imobilizada foi liofilizado. As esferas e cápsulas de alginato de sódio com e sem a enzima imobilizada foram acondicionadas em tampão cacodilato 100 mM com 2,7 mL de ácido pícrico 0,56 %, glutaraldeído 4 % e fraturadas com nitrogênio líquido.

Posteriormente, as amostras foram montadas em fita de carbono em stub de alumínio, recobertas com uma camada de ouro de 25 nm (Sputter Coater SDC 050 - BALTEC), observadas em microscópio eletrônico de varredura operando em vácuo sob feixe de elétrons com aceleração de 10 kV (FEI Quanta 200) e obtidas três imagens representativas em diferentes pontos de cada amostra analisada.

4.7 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUPORTES SEM E COM A ENZIMA IMOBILIZADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Análises de FTIR foram realizadas a fim de caracterizar os suportes e confirmar a ligação de β -glicosidase nos mesmos. Medições FTIR foram realizadas utilizando pastilhas de KBr (brometo de potássio) em espectrômetro FTIR (IR Prestige-21 Shimadzu, USA). Os espectros FTIR foram adquiridos com resolução espectral de 100 scans de 2 cm⁻¹ registadas pelo Software IRSolution 1.60SU2.

4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA β -GLICOSIDASE DE COTILÉDONES DE SOJA LIVRE E IMOBILIZADA

4.8.1 Determinação de pH e Temperatura Ótimos

A determinação de pH e temperatura ótimos da atividade de β -glicosidase livre e imobilizada em suporte foi realizada pelo DCCR 2², incluindo 4 pontos axiais com 5 repetições do ponto central, totalizando 13 experimentos (Tabela 6).

O pH variou de 3,0–8,0 (tampão fosfato citrato e fosfato de sódio 100 mM) e a temperatura de 25–75°C com incubação segundo item 4.2.1. A função resposta Y_2 (atividade de β -glicosidase, UA) apresentou fórmula geral do modelo quadrático de superfície de resposta conforme equação 3.

Tabela 6- DCCR 2^2 das variáveis independentes do pH e temperatura ótimos para determinação da atividade de β -glicosidase, UA

Experimentos	Variáveis codificadas e decodificadas	
	$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$
1	-1(4)	-1(35)
2	-1(4)	1(65)
3	1(7)	-1(35)
4	1(7)	1(65)
5	-1,41(3)	0(50)
6	1,41(8)	0(50)
7	0(5,5)	-1,41(25)
8	0(5,5)	1,41(75)
9	0(5,5)	0(50)
10	0(5,5)	0(50)
11	0(5,5)	0(50)
12	0(5,5)	0(50)
13	0(5,5)	0(50)

X_1 (pH) e X_2 (Temperatura, °C)

4.8.2 Determinação da Estabilidade Térmica

A β -glicosidase livre, imobilizada em bagaço de cana tratado e cápsulas de alginato foram pré-incubadas a 30, 50 e 70 °C na ausência de substrato, em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,5 por 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 220 e 240 min (GRADE, 2011). Amostras de enzima livre e imobilizada foram retiradas do meio de incubação nos intervalos de tempo determinados e analisadas quanto à atividade residual de β -glicosidase (%) nas condições ótimas de pH (5,5) e temperatura (50 °C).

4.8.3 Determinação de K_m e V_{max}

Os valores de K_m e V_{max} , foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk conforme descrição de Nelson e Cox (2011). Foram preparados tubos contendo p-NPG de 0,1–20 mM com concentração constante da enzima ($8,17 \cdot 10^{-3}$ UA mL⁻¹). Posteriormente, a atividade de β -glicosidase (UA) foi determinada nas condições ótimas de pH (5,5) e temperatura (50 °C).

4.8.4 Determinação da Estabilidade Operacional

Para determinar a estabilidade operacional da β -glicosidase imobilizada, 0,1 g de bagaço de cana e quatro cápsulas de alginato de sódio foram incubados com 4 mL de p-NPG 1 mM consecutivamente e analisados quanto a atividade residual de β -glicosidase (%) nas condições ótimas de pH (5,5) e temperatura (50 °C).

4.9 APLICAÇÃO DE β -GLICOSIDASE IMOBILIZADA EM BAGAÇO DE CANA OU CÁPSULAS DE ALGINATO NO EXTRATO DE SOJA

A aplicação de β -glicosidase imobilizada em extrato comercial de soja foi realizada com 0,4 g de bagaço de cana ou 10 cápsulas de alginato de sódio. Para cada suporte foram adicionados 10 mL de extrato comercial de soja com tempos de contato de 30 a 120 min, nas temperaturas de 25 °C e 50 °C. O extrato comercial de soja sem a β -glicosidase imobilizada foi utilizado como controle. Após os experimentos, as amostras foram filtradas para a separação da enzima-suporte, liofilizadas e submetidas à análise de isoflavonas por CLUE (Item 4.2.5).

REFERÊNCIAS

- ALLRED, C. D.; ALLRED, K. F.; JU, Y. H.; VIRANT, S. M.; HELFERICH, W. G. Soy Diets Containing Varying Amounts of Genistein Stimulate Growth of Estrogen dependent (MCF – 7) Tumors in a Dose-dependent Manner. **Cancer Research**, v. 61, n. 13, p. 5045–5050, 2001.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18 ed Revision 1. Airlingtonn, 2006.
- ARIGA, K.; JI, Q.; HILL, J. P. Enzyme-Encapsulated Layer-by-Layer Assemblies: Current Status and Challenges Toward Ultimate Nanodevices. **Advances in Polymer Science**, v. 229, p. 51–87, 2010.
- BALDRIAN, P.; VALASKOVA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 501–521, 2008.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R., RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583-1600, 2014.
- BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M. J.; AGOSIN, E. β -glucosidase from the native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 5, p. 1453–1459, 2003.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial b-glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 22, p. 375–407, 2002.
- BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells: Methods in Biotechnology**. Human Press, New Jersey, 1997, 367 p.
- BOERSMA, B.J.; BARNES, S.; KIRK, M.; WANG, C.C.; SMITH, M, KIM, H.; XU, J.; PATEL, R.; DARLEY-USMAR, V.M. Soy isoflavones and cancer – metabolism at the target site. **Mutation Research**, v. 480–481, p. 121–127, 2001.
- BORGES, D. G. **Preparação de derivados de β -glicosidase por imobilização em suportes sólidos derivarizados**. 2011. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. São Carlos, 2011.
- CABRAL, J. M. S; KENNEDY, J. F. “**Covalent and coordination immobilization of proteins**” in **Protein immobilization**. R. Taylor Ed; New York, 13, 1991. p. 73–104.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Biocatalizadores imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 36, jan./jun., 2006.

CAIRS, J. R. K.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 3389–3405, 2010.

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. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 897–902, 2003.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDINGNON, J.R. Activity of β -glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 873–878, maio, 2000.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, n. 23, p. 60–70, 2006.

CESNIK, R. Melhoramento da cana-de-açúcar: marco sucro-alcooleiro no Brasil. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**, 2007. Disponível em: <http://www.comciencia.br/comciencia/?section=8&id=256>. Acesso em: Junho de 2014.

CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Advances in Polymer Science**, v. 83, p. 57–192, 1987.

CHEN, L.; HU, Y. D.; LI, N.; ZONG, M. H.; Cross-linked enzyme aggregates of β -glucosidase from *Prunus domestica* seeds. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 1673–1678, 2012.

CHEN, T. R. WE, Q. K.; CHI, Z. X. Effect of oligosaccharides and isoflavones aglycones in defatted soy meal fermented by *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium longum*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 15, p. 2011–2018, 2011.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Levantamento grãos safra 2013/2014**. 2014a. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 25 de abril de 2014.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Levantamento cana-de-açúcar safra 2014/2015**, 2014b. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 25 de abril de 2014.

CUNHA, M. A. A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliemondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. 2006. 120f. (Tese de doutorado em Biotecnologia Industrial) Escola de engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

DORNSTAUDER, E.; JISA, E.; UNTERRIEDER, I.; KRENN, L.; KUBELKA, W.; JUNGBAUER, A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts

(Menoflavon®) intended for large scale use in hormone replacement therapy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 78, p. 67–75, 2001.

DRAGET, K. I.; SKJÅK BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 31–38, 1994.

DUBOIS, M., GILLES, M., HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ERTESVÁG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 85–91, 1998.

FAURE, D. The Family-3 glycoside hydrolases: from housekeeping functions to host-microbe interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.1485–1490. 2002.

FERRARI, R. A.; DEMIATE, I.M. Isoflavonas de soja – uma breve revisão. **Biology Health Sciences**, v. 7, n.1, p. 39–46, 2001.

GARGOURI, M.; SMAALI, I.; MAUGARD, T.; LEGOY, M. D.; MARZOUKI, N. Fungus β -glycosidases: immobilization and use in alkyl- β -glycoside synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 29, p. 89–94, 2004.

GEKAS, V.; LÓPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, London, v. 20, p. 2–12, 1985.

GERARDI, C.; BLANDO, F.; SANTINO, A.; ZACHEO, G. Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. **Plant Science**, v. 160, n. 5, p. 795–805, 2001.

GOPINATH, S.; SUGUNAN, S. Leaching studies over immobilized α -amylase. Importance of the nature of enzyme attachment. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 83, n. 1, p. 79–83, 2004.

GRADE, L. C. **Imobilização de β -glicosidase de soja em quitosana**. 2011. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2011.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. **Czech Journal of Food Science**, v. 26, p. 1–14, 2008.

GUISÁN, J.M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUCEDA, E. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In: BICKERSTAFF, G.F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, c. 30, 1997, p. 261–275.

HABIBI, A. E.; KHAJEH, K.; NADERI-MANESH, H.; RANJBAR, B.; NEMAT-GORGANI. Thermostabilization of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by chemical cross-linking. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 434–442, 2006.

HAERTER, A. C.; VOEGELE, R. T. A novel beta-glucosidase in *Uromyces fabae*: feast or fight? **Current Genetics**, v. 45, p. 96–103, 2004

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

HAY, D. H.; REHMAN, Z.; GHAFOR, A.; RHEM, B. H. A. Bacterial biosynthesis of alginates **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 752–759, 2010.

HAYASHI, S.; YAGI, K.; ISHIKAWA, T.; KAWASAKI, M.; ASAI, T.; PICONE, J.; TURNBULL, C.; HIRATAKE, J.; SAKATA, K.; TAKADA, M.; OGAWA, K.; WATANABE, N. Emission of 2-phenylethanol from its β -D-glucopyranoside and the biogenesis of these compounds from [$^2\text{H}_8$] L-phenylalanine in rose flowers. **Tetrahedron**, v. 60, p. 7005–7013, 2004.

HILLMAN, G. G.; SINGH-GUPTA, V.; AL-BASHIR, A. K.; YUNKER, M. C. J.; SARKAR, F. H.; ABRAMS, J.; HAACKE, E. M. Monitoring Sunitinib-Induced Vascular Effects to Optimize Radiotherapy Combined with Soy Isoflavones in Murine Xenograft Tumor1. **Translational Oncology**, v. 4, n. 2, p. 110–121, apr., 2011.

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

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

JADHAV, B. S.; SINGHAL, R. S. Pullulan-complexed α -amylase and glucosidase in alginate beads: Enhanced entrapment and stability. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 49–56, 2014.

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

JUNG, Y. R.; SHIN, H. Y.; SONG, Y. S.; KIM, S. B.; KIM, S. W. Enhancement of immobilized enzyme activity by pretreatment of β -glucosidase with cellobiose and glucose. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 702–706, 2012.

KAN, S.; LINDAHL, S.; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 28–38, 2012.

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

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v. 31, p. 134–143, 2008.

KATCHALSKI-KATZIR, E; KRAEMER, D. M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 10, p. 157–176, 2000.

KHAN, S.; LINDAHL, S.; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 28–38, 2012.

KIM, M.I.; HAM, O.H.; OH, S.; PARK, H.G.; CHANG, H.N.; CHOI, S. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized sílica nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 62–68, 2006.

KIM, J.K.; KIM, S.H.; HAHN, S.J.; CHUNG, M. Changing soybean isoflavone composition and concentrations under two different storage conditions over three years. **Food Research International**, v. 38, p. 435–444, 2005.

KUMAR, A.; KANWAR, S.S. Synthesis of Isopropyl Ferulate Using Silica-Immobilized Lipase in an Organic Medium. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

LALONDE, J.; MARGOLIN, A. **Immobilization of enzymes**. In: Drauz K, Waldmann H(eds) Enzyme catalysis in organic chemistry, 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim, p. 163–184, 2002.

LEE, S.J.; AHN, J.K.; KHANH, T.D.; CHUN, S.C.; KIM, S.L.; RO, H.M.; SONG, H.K.; CHUNG, I.L. Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9415–9421, 2007.

LEE, S.J.; YAN, W.; AHN, J.K.; CHUNG, I.M. Effects of year, genotype and their interactions on various soybeans isoflavones. **Field Crops Research**, v. 81, p. 181–192, 2003

LEXA, M.; GENKOV, T.; MALBECK, J.; MACHÁCKOVÁ, I.; BRZOBOHATÝ. Dynamics of endogenous cytokinin pools in tobacco seedlings: a modeling approach. **Annals of Botany**, v. 91, p. 585–597, 2003.

LI, Y.; CAO, X.; QIAN, X.; CHEN, Y.; LIU, S. Immobilization of laccase in N-doped carbon hollow spheres/chitosan composite film for electrochemical detection of kraft lignin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 686, p. 7–11, 2012.

LI, Y.; KONG, D.; BAO, B.; AHMAD, A.; SARKAR, F. H. Induction of Cancer Cell Death by Isoflavone: The Role of Multiple Signaling Pathways. **Nutrients**, Basel, v. 3, p. 877–896, 2011.

LIPOVAC, M.; CHEDRAUI, P.; GRUENHUT, C.; GONCAN, A.; KURZ, C.; NEUBER, B.; IMHOF, M. Effect of Red Clover Isoflavones over Skin, Appendages, and Mucosal Status in Postmenopausal Women. **Obstetrics and Gynecology International**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**, New York. Chapman & Hall, 537 p, 1997.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Release of yerba mate antioxidants from corn starch–alginate capsules as affected by structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 150–157, 2014.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; GIANAZZA, E.; ARNOLDI, A.; KUROWSKA, E.; CARROLL, K. K.; SIRTORI, C. R. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in help G2 cells. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2543–2549, 2000.

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

LU, J.; WEERASIRI, R. R.; LEE, I. Carbon nanotubes tuned foam structures as novel nanostructured biocarriers for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 181–188, 2013.

MAICAS, S.; MATEO, J. J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 322–335, 2005.

MAITAN, G. P. **Produção, purificação e caracterização de β -glicosidases livre e imobilizada de *Debaryomyces hansenii* UFV-1**. 2011, 105f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MASE, T.; MORI, S.; YOKOE, M. Purification, characterization, and a potential application of β -glucosidase from *Aspergillus pulverulentus* YM-80. **The Japanese Society of Applied Glycoscience**, Kakamigahara, v. 51, p. 211–216, 2004.

MATEO, C.M.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; GRAZU, V.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 456–462, 2005.

MATEO, C.; GRAZU, V.; PESSELA, B.C.C.; MONTES, T.; PALOMO, J.M.; TORRES, R.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.

Advances in the 77 design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. **Biochemical Society Transactions**, Dublin, v. 35, p. 1593–1601, 2007.

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

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245–251, 2013

MESSING, R. A. **Immobilized enzymes for industrial reactors**. Academic Press: New York, 232 p., 1975.

MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MOHAPATRA, P. K. D.; MONDAL, K. C.; PATI, B. R. Production of tannase by the immobilized cells of *Bacillus licheniformis* KBR6 in Ca-alginate beads. **Journal Applied Microbiology**, v. 102, p. 1462–1467, 2007.

MORENO, J.M.; HERNANIZ, M.J.; SANCHES-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, M.T.; BUSTOS, M.T.; SANCHES, M.E.; BELLO, J.F. Covalent immobilization of pure lipases A and B from *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.2, p.177-184, 1997.

MOZHAEV, V. V.; MELIK-NUBAROV, N. S.; SERGEEVA, M. V.; SIKRNI, V.; MARTINEK, K. Strategy for stabilising enzymes. I. Increasing stability of enzymes via their multipoint interaction with a support. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 3, n. 3, p. 179–187, 1990.

MUELLER, S. O.; SIMON, S.; CHAC, K.; METZIER, M.; KORACH, K. S. Phytoestrogens and Their Human Metabolites Show Distinct Agonistic and Antagonistic Properties on Estrogen Receptor α (ER α) and ER β in Human Cells. **Toxicol Sci**, v. 80, p. 14–25, 2004.

NAGAMOTO, H.; MATSUSHITA, Y.; SUGAMOTO, K.; MATSUI, T. Preparation and properties of gelatin-immobilized β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 69, p. 128–136, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Savier, 5 ed., 2011.

OLIVEIRA, A. C.; ROSA, M. F.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells and *Rhizomucor miehei* lipase for the production and extractive biocatalysis of ethanol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 16, n. 6, p.349–353, 1997.

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

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 27, p. 187–204, 2000.

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

PEREZ, V.H.; SILVA, G.S.; GOMES, F.M.; CASTRO, H.F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p.13–19, 2007.

PIOVESAN, A. C.; SIMÕES, R. S.; MOSQUETE, R.; SIMÕES, M. J.; JUNIOR, J. M. S.; BARACAT, E. C. Efeitos das Isoflavonas no Tecido Mamário. **Femina**, v. 32, p. 759–763, 2004.

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

PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: ed. Edgard Blucher, cap. 16, p. 355–372, 2001.

QIN, L. Q.; XU, J. Y.; WANG, P. Y.; HOSHI, K. Soyfood intake in the prevention of cancer risk in women: a meta-analysis of observational epidemiological studies. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**, Tokyo, v. 52, p. 428–436, 2006.

RESHMI, R.; SUGUNAN, S. Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glucosidase on nanoporous silica foams. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, n. 86, p. 111–118, 2013.

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

RIMBACH, G.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; FRANK, J.; FUCHS, D.; WENZEI, U.; DANIEL, H.; HALL, W. L.; WEINBERG, P. D. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1308–1319, 2008.

ROSA, H. **Técnicas de reciclo de proteases visando a desfloculação celular de *Saccharomyces cerevisiae***. 2008, 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista – Unesp, Rio Claro, 2008.

- ROSTAGNO, M. A.; VILLARESA, A.; GUILLAMÓNA, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZA, J.A. Review: Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography**, v. 1216, n. 1, p. 2–29, 2009.
- SAKAI, T.; FUROKU, S.; NAKAMOTO, M.; SHUTO, E.; HOSAKA, T.; NISHIOKA, Y.; SONE, S. Soy isoflavone equol perpetuates dextran sulfate sodium-induced acute colitis in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokushima, v. 75, n. 3, p. 593–595, 2011.
- SAKAI, T.; KOGISO, M. Soy isoflavones and immunity. **The Journal of Medical Investigation**, v. 55, p. 167–173, 2008.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1085–1088, 2005.
- SANTOS, R. F.; OLIVEIRA, C. F.; VARÉA, G. S.; ORRADI DA SILVA, M. L. C.; IDA, E.I.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; RIBEIRO, M. L. L. Purification and characterization of soy cotyledon β -glucosidase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 302–312, 2013.
- SANTOS, A. F. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho– UNESP. Araraquara, 2010.
- SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 542–548, 2008.
- SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. **Food Chemistry**, v. 94, p. 573–579, 2006.
- SARRY, J. E.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, p. 509–521, 2004.
- SESTELO, A. B. F.; POZA, M.; VILLA, T. G. β -glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 20, p. 633–637, 2004.
- SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B. E.; KIRSCHNER, A. S.; HEUBI, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 447–453, 2002.
- SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B. E.; BRASHEAR, W. T.; KIRSCHNER, A. S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J. E.

Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1362–1375, 2001.

SHEN, X.; XIA, L. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1363–1367, 2004.

SOUZA, F. H. M. **Caracterização da atividade β -glicosidásica de *Humicola insolens***. 2009. 84f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SPAHN, C.; MINTEER, S. D. Enzyme Immobilization in Biotechnology. **Recent Patents on Engineering**, v. 2, n. 3, p. 195–200, 2008.

SU, E.; XIA, T.; GAO, L.; DAI, Q.; ZHANG, Z. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 83–89, 2010.

SUJKA, M.; JAMROZ, J. Starch granule porosity and its changes by means of amylolysis. **International Agrophysics**, v. 21, p. 107–113, 2007.

SUMARNA. Hydrolysis of bioactive isoflavone in soymilk fermented with β -glucosidase producing lactic acid bacteria from local fermented foods of Indonesian. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 6, n.1, p. 30–40, 2010.

TALEKAR, S.; CHAVARE, S. Optimization of immobilization of α -amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free α -amylase. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 1–5, 2012.

TEEKACHUNHATEAN, S.; PONGNAD, P.; ROJANASTHEIN, N.; MANOROT, M.; SANGDEE, C. Effects of Vitamin D plus Calcium Supplements on Pharmacokinetics of Isoflavones in Thai Postmenopausal Women. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

TITA, S. P. S.; PAIVA, J. M. F.; FROLLINI, E. Resistência ao impacto e outras propriedades de compósitos lignocelulósicos: matrizes termofixas fenólicas reforçadas com fibras de bagaço de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 4, p. 228–239, 2002.

UNICA - União das Indústrias de Cana-de-açúcar. **Setor Sucroenergético**, São Paulo, 2014, Disponível em: <http://www.unica.com.br/linhadotempo/index.html>. Acesso em: 25 de abril de 2014.

UNICA - União das Indústrias de Cana-de-açúcar. In: BERTELLI, L. G. Um Fantástico Potencial. **Convidados**, São Paulo, 2011, Disponível em: <http://www.unica.com.br/convidados/5337876920338419546/um-fantastico-potencial/>. Acesso em: 25 de abril de 2014.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

- VARAVINIT, S.; CHAOKASEM, N.; SHOBSNGOB, S. Immobilization of a thermostable alpha-amylase. **Science Asia**, v. 28, p. 247–251, 2002.
- VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M.; ZANIN, G. M.; TARDIOLI, P. W.; MATEO, C.; GUISSÁN, J. M. β -glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reative groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 47–53, 2011.
- VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- WHITE, R. W. V.; TSODIKOV, A.; STAPP, E. C.; SOARES, S. E.; FUJII, H.; HACKMAN, R. M. Effects of a High Dose, Aglycone-Rich Soy Extract on Prostate-Specific Antigen and Serum Isoflavone Concentrations in Men With Localized Prostate Cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 8, p.1036–1043, 2010.
- WOODWARD, J.; WISEMAN, A. Fungal and other β -D-glucosidases- their properties and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 73–79, 1982.
- YAN, J.; PAN, G.; DING, C.; QUAN, G. Kinetic and thermodynamic parameters of β -glucosidase immobilized on various colloidal particles from a paddy soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 298–303, 2010.
- YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DELAROZA, F.; SILVA, J. B.; IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 9, p. 978–986, 2012.
- ZHANG, D. Y.; ZU, Y. G.; FU, Y. J.; LUO, M.; WANG, W.; GU, C. B.; YAO, X. H. Application of immobilized enzymes to accelerate the conversion of genistin to genistein in pigeon pea root extracts and the evaluation their antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, n. 42, p. 409–415, 2013.
- ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, J.; LI, L.; YU, C.; HEI, T. Surface derivatization with spacer molecules on glutaraldehyde-activated amino-microplates for covalent immobilization of β -glucosidase. **Applied Surface Science**, n. 57, p. 2712–2716, 2011.
- ZHANG, Y.F.; WU, H.; LI, J.; LI, L.; JIANG, Y.J.; JIANG, Y.; JIANG, Z.Y. Protamine templated biomimetic hybrid capsules: efficient and stable carrier for enzyme encapsulation. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 20, p. 1041–1048, 2008.
- ZHOU, Y.; WAG, L.; WU, T.; TANG, X.; PAN, S. Optimal immobilization of β -glucosidase into chitosan beads using response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1–13, 2013.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de artigo científico e de trabalhos apresentados em eventos científicos.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo “Otimização das condições de imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana-de-açúcar para conversão das isoflavonas β -glicosídicas em agliconas” será submetido à revista Food Chemistry.

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo “Imobilização de β -glicosidase de soja em esferas e cápsulas de alginato de sódio” será submetido à revista Carbohydrate Polymers.

5.3 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo “Otimização das condições de imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana-de-açúcar para conversão das isoflavonas β -glicosídicas em agliconas” será submetido à revista Food Chemistry.

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA CONVERSÃO DAS ISOFLAVONAS β -GLICOSÍDICAS EM AGLICONAS

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR-Brasil

Autor para correspondência: Tel/fax: 55 (43) 3371-4270

E-mail: maraluciaribeiro@uel.br

Resumo

O bagaço de cana-de-açúcar, resíduo agroindustrial, foi utilizado como suporte para imobilização de β -glicosidase, propondo um sistema catalítico econômico. A β -glicosidase de cotilédones de soja foi obtida por precipitação fracionada com sulfato de amônio e imobilizada por ligação covalente em bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído. As condições de imobilização foram otimizadas por metodologia de superfície de resposta e sua aplicação em extrato comercial de soja foi avaliada pela determinação de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência. O rendimento de imobilização foi de 99 %. O pH e temperatura ótimos para atividade de β -glicosidase livre e imobilizada foram 5,5 a 50 °C utilizando p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. O K_m e V_{max} foram de 0,26 mM e 7,2 $\mu\text{mol min}^{-1}$ para a β -glicosidase livre e 0,46 mM e 4,37 $\mu\text{mol min}^{-1}$ para imobilizada. O sistema imobilizado foi reutilizado 15 vezes e a estabilidade térmica apresentou atividade residual de 15 % em 70 °C após 180 min. O teor total de agliconas em extrato de soja tratado com a β -glicosidase imobilizada aumentou 25 % após incubação de 120 min a 50 °C.

Palavras chave:

Bagaço de cana-de-açúcar
Imobilização
 β -glicosidase de soja
Isoflavonas

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar para obtenção de açúcar e etanol (UNICA, 2014). A produtividade média de cana-de-açúcar para a safra 2014/2015 foi 73.569 kg/ha com previsão de 671,69 milhões de toneladas de cana moída (CONAB, 2014). Essa atividade sucroalcooleira gera subprodutos como o bagaço com produção média de 260 kg por tonelada de cana moída (UNICA, 2011). Apesar da indústria utilizar este resíduo como fonte de energia, o excedente de bagaço atinge 20 % do total gerado, causando problemas ambientais (Teixeira, Pires & Nascimento, 2007).

Pesquisas são desenvolvidas para utilização desse resíduo como ração animal (Teixeira, Pires & Nascimento, 2007), suplementação em meio de cultura de microrganismos (Rajagopalan, He & Yang, 2014), produção de cerâmica (Teixeira, Magalhães, Arenales, Souza, Romero & Rincón, 2014), adsorvente (Pehlivan, Tran, Ouédraogo, Schmidt, Zachmann & Bahadir, 2013), compósitos poliméricos (Carvalho Neto et al., 2014) e imobilização de células (Shaharuddin, Muhamad, Seng, Zahan & Khairuddin, 2014) e enzimas (Mendes, Castro & Giordano, 2013). Além disso, o bagaço de cana-de-açúcar é uma fonte de energia verde com

pesquisas e investimentos para produção de etanol de segunda geração (Khuong, Kondo, Leon, Anh, Shimizu, & Kamei, 2014).

As Isoflavonas são compostos fenólicos, pertencentes ao grupo dos flavonóides, encontradas principalmente na soja e derivados. Apresentam quatro formas distintas, agliconas, β -glicosídicas, acetilglicosídicas e as formas malonilglicosídicas (Kao, Chien & Chen, 2008).

Estudos sobre isoflavonas tem atraído atenção devido aos seus potenciais benefícios que melhoram a saúde, incluindo atividade anticarcinogênica (Hillman et al., 2011), diminuição do colesterol e triglicerídeos sérico, com prevenção de doenças cardiovasculares (Rimbach et al., 2008) e efeito estrogênico diminuindo os sintomas típicos da menopausa (Piovesan, Simões, Mosquete, Simões, Júnior & Baracat, 2004). Essas atividades biológicas das isoflavonas são mais acentuadas nas formas agliconas que nas β -glicosídicas (Kao, Chien & Chen, 2008), são metabolicamente mais ativas e podem ser absorvidas mais rapidamente e em maiores quantidades (Kawakami, Tsurugasaki, Nakamura & Osada, 2005). Estes resultados sugeriram que a ingestão de alimentos ricos em agliconas podem ser mais eficazes na manutenção da saúde. Entretanto, o teor de agliconas na soja corresponde a aproximadamente 2 % (Ribeiro et al., 2007). Assim, técnicas para aumentar o teor de isoflavonas agliconas nos alimentos de soja são cada vez mais empregadas.

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) podem ser utilizadas para hidrolisar as isoflavonas glicosídicas em agliconas, estudos de purificação e aplicação em produtos de soja dessas enzimas de fungos (Yang, Wang, Yan, Jiang, & Li, 2009) e bactérias (Li, Jiang, Fan & Liu, 2012) têm sido relatados. Além disso, a β -glicosidase extraída de cotilédones de soja foi purificada e caracterizada por Santos et al. (2013) para hidrólise das isoflavonas β -glicosídicas em agliconas. Entretanto, como a utilização da enzima livre é limitada por fatores econômicos, a imobilização apresenta uma alternativa viável na indústria de alimentos, principalmente, pela possibilidade de reutilização da enzima (Carvalho, Canilha & Silva, 2006).

Como não existe um único sistema de imobilização, nem um suporte universal capaz de garantir resultados adequados para todos os processos, uma vez que há diversas variáveis envolvidas que devem ser controladas (Carvalho, Canilha & Silva, 2006), a metodologia de superfície de resposta (MSR) pode ser adotada para

otimização dos parâmetros nos processos de imobilização. A MSR utiliza ferramentas estatísticas e matemáticas para eficiência e economia do processo, úteis para o desenvolvimento, melhoria e otimização da resposta de interesse que é influenciada por múltiplas variáveis (Calado & Montgomery, 2003).

Este estudo teve como objetivo otimizar as condições de imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana tratado utilizando MSR, realizar a caracterização química e morfológica do suporte com e sem enzima imobilizada e aplicá-la em extrato aquoso de soja, para obtenção de um produto com maior teor de isoflavonas agliconas.

2. Material e Métodos

2.1. Material

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido de garapeiros. A soja [Glycine max (L.) Merrill], BRS 213 safra 2010/2011, fornecida pela Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brasil, mantida a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi utilizada para obtenção de β -glicosidase. Para determinação da atividade de β -glicosidase foi utilizado o p -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p -NPG) e para determinação de proteínas solúveis, albumina de soro bovino (BSA), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Foi utilizado extrato comercial de soja. Para a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) foram utilizados padrões de isoflavonas malonil e acetil conjugados (Wako Puré Chemical Industries, Osaka, Japão) e isoflavonas β -glicosídicas e agliconas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Outros reagentes foram de grau analítico ou HPLC.

2.2. Determinação de Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase livre (1 mL) e imobilizada (0,1 g) foi determinada utilizando p -NPG 1mM como substrato em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5. A reação foi incubada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min e interrompida com Na_2CO_3 500 mM. O p -nitrofenol liberado na reação foi determinado por espectrofotometria a 420 nm utilizando uma curva de calibração de p -NP (0,016–0,160 μmol), (Matsuura & Obata, 1993). Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de β -glicosidase que libera 1 μmol de p -NP min^{-1} , nas condições de ensaio.

2.3. Determinação de proteínas solúveis e atividade específica

O teor de proteínas solúveis dos extratos e filtrados foi quantificado pelo método de Lowry, Rosebrough, Farr & Randall (1951).

A atividade específica da β -glicosidase livre e imobilizada foi definida pela relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e mg de proteínas (UA mg⁻¹ de proteínas).

2.4. Tratamento do bagaço de cana

A polpa do bagaço de cana *in natura* foi retirada, cortada, lavada com água destilada e seca em estufa (Marconi, MA 035) a 60 °C. Posteriormente, foi moída e sua partícula padronizada em 0,7 mm por tamização. Após, foi lavada com água destilada a 60 °C para retirada de açúcares, acompanhado da determinação de açúcares totais na água de lavagem (Dubois Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956). O bagaço obtido foi denominado de B1 (tratado com água 60 °C) e este foi submetido aos tratamentos: ativação com glutaraldeído (B₂), NaOH 500 mM por 24 h e autoclavado (B₃), NaOH 500 mM por 24 h, autoclavado e ativado com glutaraldeído (B₄), etanol 70 % e autoclavado (B₅), etanol 70 %, autoclavado e ativado com glutaraldeído (B₆). A autoclavagem foi realizada a 121 °C por 15 min e a ativação realizada com glutaraldeído 2,5 %, pH 7 e 70 rpm por 30 min.

2.5. Obtenção da β -glicosidase de soja

A β -glicosidase foi extraída da farinha de cotilédones de soja com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6 (1:10 p/v) para obtenção do extrato bruto (Matsuura & Obata, 1993) que foi fracionado com (NH₄)₂SO₄ de 0–40 % e 40–85 % de saturação a 4 °C (Santos et al., 2013). Após diálise das frações, foram determinados a atividade de β -glicosidase e teor de proteínas solúveis. A fração denominada de P₄₀₋₈₅ com maior atividade de β -glicosidase foi utilizada como fonte de enzima livre para imobilização em bagaço de cana.

2.6. Caracterização morfológica do bagaço de cana

Amostras de bagaços de cana *in natura*, submetidos a diferentes tratamentos foram secos e fixados em fita de carbono em stub de alumínio, recobertas com uma camada de ouro de 25 nm (Sputter Coater SDC 050 - BALTEC) e observadas em microscópio eletrônico de varredura operando em vácuo sob feixe

de elétrons com aceleração de 10 kV (FEI, modelo Quanta 200). Foram obtidas três imagens representativas de cada amostra em diferentes pontos.

2.7. Caracterização química do bagaço de cana

Para caracterizar os suportes foram realizadas análises por FTIR utilizando pastilhas de KBr (brometo de potássio) em espectrômetro FTIR (IR Prestige-21 Shimadzu, USA). Os espectros FTIR foram obtidos com resolução espectral de 100 scans de 2 cm^{-1} registrados pelo Software IRSolution 1.60SU2.

2.8. Composição química da fibra de bagaço de cana

Para determinar a composição química da fibra de bagaço de cana após tratamento alcalino e térmico foram realizadas análises de cinzas (*Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 2006*); celulose, lignina e hemicelulose determinada por fibra de detergente neutro (FDN) e fibra de detergente ácido (FDA) (Van Soest, Robertson & Lewis, 1991).

2.9. Imobilização em bagaço de cana

Para a imobilização da β -glicosidase, 1 g de bagaço de cana tratado (B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆) foi incubado com a enzima livre diluída em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7, com atividade específica de $8,17 \cdot 10^{-3}\text{ UA mg}^{-1}$. O sistema foi mantido a 70 rpm, 4 °C por 6 h. O rendimento de imobilização (RI) foi expresso como (atividade específica da enzima imobilizada/atividade específica da enzima livre) \times 100.

2.9.1 Delineamentos experimentais

O bagaço de cana tratado (item 2.4.) que apresentou maior rendimento de imobilização foi utilizado para análises exploratórias por delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} . Foi avaliada a influência das variáveis independentes proteínas (0,5–1,5 mg mL⁻¹), pH (4,5–7,5), rpm (70–150), glutaraldeído (0,5–2,5 %) e tempo de incubação (2–6 h) e suas interações na função resposta Y_1 (RI, %). Após a análise dos resultados obtidos nesse delineamento, as variáveis proteína, pH e rpm foram fixadas em 1 mg mL⁻¹, 7 e 110. Para otimizar a imobilização da β -glicosidase foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 para avaliar a influência e interação das variáveis independentes tempo de incubação (2–14 h) e

glutaraldeído (1–4 %). As funções resposta Y_1 e Y_2 (RI, %) foi avaliada pelo modelo matemático $y = \beta_0 + \sum \beta_{ii}x_i + \sum \beta_{iii}x_i^2 + \sum \beta_{ii}x_ix_j + \varepsilon$ (equação 1), onde y (função resposta), x_i, x_j (variáveis codificadas), β (coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta) e ε (erro experimental).

2.10. Efeitos do pH, temperatura e concentração de p-NPG na atividade de β -glicosidase

Para determinação do pH (3–8) e temperatura (25–75 °C) ótimos foi utilizado um DCCR 2², com funções resposta Y_3 e Y_4 (atividade de β -glicosidase livre e imobilizada, UA), avaliada conforme modelo matemático expresso na equação 1. O efeito da concentração de p-NPG (0,1 a 20 mM) na enzima livre e imobilizada foi determinado em pH 5,5 a 50 °C por 30 min. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de p-NP min}^{-1}$ e os valores de K_m e V_{max} foram estimados pelo método gráfico de Lineweaver-Burk.

2.11. Estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada

A estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada foi avaliada pela incubação da enzima a 30, 50 e 70 °C em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,5 em diferentes intervalos de tempo (0–240 min). A atividade da β -glicosidase foi medida pelo ensaio da atividade residual determinada a 50 °C por 30 min.

2.12. Reutilização da β -glicosidase imobilizada

Para avaliação da reutilização, a β -glicosidase imobilizada em bagaço de cana tratado e ativado com glutaraldeído 2,5 % foi utilizada por 15 vezes consecutivas e a atividade residual determinada por p-NPG 1 mM, pH 5,5 a 50 °C por 30 min.

2.13. Aplicação de β -glicosidase imobilizada em extrato de soja

A β -glicosidase imobilizada foi adicionada ao extrato comercial de soja em tempos de contato de 30 a 120 min, em 25 e 50 °C. Como controle, foi utilizado o extrato de soja sem a aplicação da enzima imobilizada. Para a extração das isoflavonas, os extratos tratados foram liofilizados e desengordurados com hexano (1:10, v/v).

2.14. Determinação do teor de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

Para a extração das isoflavonas, foram utilizados 300 mg de extrato comercial de soja liofilizado e desengordurado para a adição de 6 mL de solução extratora (água, etanol e acetona, 1:1:1, v/v/v), agitados a cada 15 min por 1 h a 25 °C. Após, a mistura foi colocada em banho ultrassônico por 15 min a 25 °C (Yoshiara et al., 2012). Em seguida, o extrato foi centrifugado (4°C, 794 x g, 15 min; Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante filtrado em membranas hidrofílicas de PVDF com 0,22 µm de tamanho de poro (Millex-GV, Millepore, Billerica, MA, USA) e aplicado no Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE).

Para a separação e quantificação das isoflavonas por CLUE foi utilizado o cromatógrafo UPLC® (Acquity UPLC® System, Waters, EUA), equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária, forno com temperatura controlada de 35 °C e detector com arranjo de diodos (DAD), controlado pelo software *Empower 3*. A eluição das amostras foi conduzida em coluna de fase reversa Acquity™ UPLC BEH 18 (50 mm x 2,1 mm d.i.; 1,7 µm de diâmetro de partícula; Waters), com fase móvel constituída de um sistema gradiente binário, com fase inicial de 90 % de solução aquosa de ácido acético pH 3 (solvente A) e 10 % de acetonitrila (solvente B). A vazão da fase móvel foi de 0,70 mL min⁻¹ e detector com arranjo de diodos (DAD-Waters), ajustado ao comprimento de onda de 260 nm. A identificação e quantificação de cada forma química de isoflavona nos cromatogramas foi realizada por comparação dos espectros de absorção e integração das áreas dos picos com padronização externa (área x concentração) utilizando padrões individuais de isoflavonas. O teor de isoflavonas foi expresso por µg mL⁻¹ de extrato de soja.

2.15. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo software STATISTICA 7.0. Após a análise das funções resposta (Y_1 ; Y_2 ; Y_3 e Y_4) a análise de variância (ANOVA) da regressão, coeficientes de determinação (R^2), superfície de resposta e parâmetros de desejabilidade foram gerados.

O teste de Tukey, nível de significância de 5 %, foi utilizado para comparação de médias (triplicata) da imobilização da β -glicosidase em bagaços tratados e isoflavonas.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização morfológica dos bagaços de cana submetidos a diferentes tratamentos

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterização morfológica do bagaço de cana *in natura*, bagaços tratados com água 60 °C, etanol 70 % e autoclavado, NaOH e autoclavado. As amostras de bagaços de cana tratados apresentaram diferenças morfológicas em relação ao bagaço *in natura* (Figura 1). A morfologia do bagaço de cana *in natura* caracteriza-se por apresentar formas reticuladas com saliências e reentrâncias organizadas (Figura 1a). Estas características também foram relatadas por Fávoro, Ganzerli, Carvalho Neto, Silva & Radovanovic. (2010) e Carvalho Neto et al. (2014). A morfologia dos bagaços de cana tratados com água (Figura 1b) e com etanol 70 % e autoclavado (Figura 1c) não diferiram de forma acentuada do bagaço de cana *in natura*.

O bagaço tratado com NaOH e autoclavado apresentou modificações morfológicas com desestruturação da macroestrutura do bagaço e do complexo lignina-hemicelulose-celulose e visualização de fibras de celulose (Figura 1d). Pires, Reis, Carvalho, Siqueira & Bernardes (2006) relataram a desestruturação do bagaço tratado com NaOH e Castanón-Rodríguez, Torrestiana-Sánchez, Montero-Lagunes, Portilla-Arias, Ramírez de León & Aguilar-Uscanga (2013) observaram essa desestruturação do bagaço com tratamento ácido e alcalino.

O bagaço tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído 2,5 % (Figura 2a) não apresentou modificação aparente da fibra em relação ao bagaço tratado sem ativação (Figura 1d). Após o processo de imobilização da β -glicosidase nesse suporte tratado e ativado, observam-se aglomerados, indicando a possível imobilização da enzima destacados com setas pretas (Figura 2b). Chen, Lo, Liu, Yu, Chou & Cheng (2013) e Chen, Lo, Su, Chou & Cheng (2012) relataram a presença de aglomerados de β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* imobilizada em borra de café e microesferas de vidro.

3.2. Caracterização química dos bagaços de cana

Os espectros de FTIR dos bagaços de cana-de-açúcar estão apresentados na Figura 3. Há evidências de que ocorreram mudanças nos grupamentos químicos das fibras de bagaço *in natura* e tratadas. Verifica-se a presença de bandas em 1725 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} nas fibras do bagaço *in natura*, lavado com água a 60 °C e tratado

com etanol e autoclavado (Figura 3a, b, c). Estas bandas são referentes ao estiramento C=O e C-O-C, características de lignina e hemicelulose presente nestes bagaços. No espectro de FTIR do bagaço tratado com NaOH e autoclavado observa-se o desaparecimento destas bandas (Figura 3d). Este resultado evidencia a remoção parcial de lignina e hemicelulose com o tratamento alcalino e térmico (Tabela 1). Fávoro et al. (2010) e Carvalho Neto et al. (2014) também observaram o desaparecimento de bandas características de lignina e hemicelulose em bagaço de cana-de-açúcar tratado com NaOH.

No espectro de FTIR do bagaço de cana tratado com NaOH e ativado com glutaraldeído (Figura 3e) não se observa modificações químicas relevantes na estrutura, em relação ao bagaço tratado e não ativado (Figura 3d). O bagaço tratado contendo a β -glicosidase imobilizada resultou em um espectro (Figura 3f) com bandas em 1656 cm^{-1} e 1460 cm^{-1} que podem indicar a presença de amidas I e II associadas com o estiramento e vibração de C=O e de N-H e C-N, respectivamente. Segundo Serefoglou et al. (2008) e Zhou, Pan, Wei, Wang & Liu (2013) bandas no intervalo de 1412 cm^{-1} a 1660 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de grupamentos amida de peptídios característicos de β -glicosidase. Portanto, confirma-se a imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído.

3.3. Composição química da fibra do bagaço de cana tratado com NaOH e autoclave

Para confirmar da desestruturação do bagaço de cana tratado com NaOH e autoclave foram realizadas análises de composição química da fibra (Tabela 1). O tratamento do bagaço de cana com NaOH e NaOH autoclavado promoveu uma redução significativa ($p \leq 0,05$) no teor de lignina e hemicelulose de 3,5 vezes e 2 vezes. A autoclavagem influenciou na redução de hemicelulose e não diferiu significativamente ($p \geq 0,05$) no teor de lignina. Resultados semelhantes foram observados por Pires et al. (2006) e Khuong et al. (2014). O teor de cinzas não apresentou variação significativa ($p \geq 0,05$) e o teor de celulose aumentou em 1,62 vezes com os tratamentos.

A associação da celulose, lignina e hemicelulose presentes no bagaço de cana limita a sua utilização como suporte para imobilização de enzima, uma vez que reduz a área de contato devido ao elevado grau de complexidade da estrutura da fibra (Khuong et al., 2014). Portanto, a redução desses componentes ocorrida no

tratamento alcalino e térmico, possibilitou uma maior interação enzima-substrato resultando rendimentos de imobilização superiores (Tabela 2).

3.4. Imobilização de β -glicosidase

3.4.1. Rendimentos de imobilização de β -glicosidase em bagaços de cana tratados

Os rendimentos de imobilização (RI) de β -glicosidase de soja em bagaços de cana submetidos a tratamentos químico e térmico variaram de 62 % a 98 % (Tabela 2). O RI para o tratamento B₄, foi em média 1,5 vezes superior ($p \leq 0,05$) ao tratamento B₁. Portanto, o tratamento alcalino (NaOH) e térmico (autoclave) do bagaço aumentou a interação da enzima com o suporte aumentando o rendimento de imobilização. O menor RI foi observado no B₅, em média 1,17 vezes inferior ($p \leq 0,05$) ao B₁. Os RI para os tratamentos B₂, B₃ e B₆ não diferiram significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

A ativação dos suportes com glutaraldeído (B₂, B₄ e B₆) aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) o rendimento de imobilização em média de 1,2; 1,2 e 1,5 em relação aos suportes não ativados (Tabela 2). Su, Xia, Gao, Dai & Zhang (2010) e Zhang et al. (2013) observaram aumento de 2 e 2,8 vezes na atividade de β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* imobilizada em alginato de sódio ativado com glutaraldeído.

A concentração de proteínas no extrato de enzima utilizado para imobilização (0,7 mg mL⁻¹ e 1,4 mg mL⁻¹) não influenciou significativamente ($p \geq 0,05$) o RI em todos os tratamentos do bagaço de cana.

3.4.2. Otimização da imobilização em bagaços de cana tratado

A partir da definição das condições de tratamento do bagaço de cana (B₄), as condições de imobilização de β -glicosidase neste suporte foram exploradas por um delineamento fatorial fracionado 2⁵⁻¹. A análise de regressão e ANOVA para a função resposta ($Y_1 = \text{RI, \%}$) e o efeito das variáveis X₁ (proteína: 0,5–1,5 mg mL⁻¹), X₂ (pH: 4,5–7,5), X₃ (rpm: 70–150), X₄ (glutaraldeído: 0,5–2,5 %) e X₅ (tempo de incubação: 2–6 h) foram observadas. As variáveis X₁ e X₃ e as interações X₁X₃, X₁X₅, X₂X₅, X₃X₄ e X₃X₅ não foram significativas e o coeficiente de determinação (R²) foi 0,76 (Tabela 3). Os resultados da análise exploratória indicaram que o teor de proteínas (X₁) e rpm (X₃) não foram significativos e que o pH (X₂) apresentou efeito

positivo e significativo ($p \leq 0,05$), (equação 2). $y_1 = 1,39 + 4,86x_2 + 23,73x_4 + 6,90x_5 + 3,08x_1x_2 - 4,12x_1x_4 + 0,04x_2x_3 - 1,79x_2x_4 - 0,84x_4x_5$ (equação 2).

O RI da β -glicosidase de soja em bagaço de cana variou de 44 % a 99 %, sendo máximo nos pontos centrais, condições: $X_1 = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas, $X_2 = \text{pH } 6$, $X_3 = 110 \text{ rpm}$, $X_4 = \text{glutaraldeído } 1,5 \%$ e $X_5 = 4 \text{ horas de incubação}$. Considerando que as variáveis X_1 (proteína, mg mL^{-1}) e X_3 (rpm) não apresentaram efeitos significativos no RI, foram fixadas em $1 \text{ mg de proteína mL}^{-1}$ e 110 rpm . O pH foi fixado em 7 devido a maior estabilidade de tamponamento e eficiência observadas em testes preliminares de imobilização em bagaços tratados e em pH superior a 8, houve interferências nos resultados de imobilização de β -glicosidase de soja (dados não apresentados). Foi realizado um DCCR 2^2 que avaliou a influência das variáveis tempo de incubação, h (X_1) e glutaraldeído, % (X_2). A análise de regressão e Anova (Tabela 3) para a função resposta ($Y_2 = \text{RI, \%}$) indicaram efeitos linear e quadrático positivos e significativos ($p \leq 0,05$), (equação 3). $y_2 = 17,85 + 12,05x_1 - 0,61x_2 + 29,12x_1^2 - 6,06x_2^2 - 0,65x_1x_2$ (Equação 3).

A falta de ajuste do modelo (equação 3) foi significativa, entretanto, o R^2 de 0,92 indicou que 92 % dos dados experimentais foram explicados adequadamente ao modelo proposto e assim, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos. Foi realizada a construção da superfície de resposta e o perfil de desejabilidade. A região ótima para maior RI da β -glicosidase de soja em bagaço tratado e ativado foi para intervalo de 6–12 h de incubação e glutaraldeído de 1–3 % (Figura 4a), os parâmetros de desejabilidade, com maior RI (97 %) foram obtidos com 8 h de incubação e glutaraldeído de 2,5 % (Figura 4b), correspondendo ao RI obtido nos pontos centrais. Portanto, não houve necessidade de validação do modelo matemático.

Na Tabela 4, o RI de β -glicosidase de soja em bagaço de cana variou de 70 % a 99 % e foi maior nos experimentos dos pontos centrais (experimentos: 9–13) e também no experimento 3. A interação negativa entre tempo de incubação, h e glutaraldeído, % foi confirmada neste experimento 3, onde um maior tempo de incubação (1) e menor concentração de glutaraldeído (-1) resultou em maior RI.

Até o momento não foram publicados dados sobre imobilização de β -glicosidase de cotilédones de soja em bagaço de cana-de-açúcar. Este suporte submetido a diferentes tratamentos foi utilizado para imobilização de α -amilase de *Bacillus licheniformis* e lipase de *Thermomyces lanuginosus* com rendimento de

imobilização que variaram de 40 % a 79 % (Varavinit, Chaokasema & Shobsngob, 2002; Mendes, Castro & Giordano, 2013).

3.5. pH e temperatura ótimos da β -glicosidase livre e imobilizada

A influência do pH e temperatura na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada foi analisada pelo DCCR 2². A análise de regressão e ANOVA (Tabela 3) para função resposta (Y_3 e Y_4 = atividade de β -glicosidase livre e imobilizada, UA) indicaram efeitos das variáveis X_1 (pH: 3–8) e X_2 (temperatura: 25–75 °C) linear e quadrático, positivos e significativos ($p \leq 0,05$) e a interação X_1X_2 apresentou efeito positivo e significativo ($p \leq 0,05$) para a enzima livre (equação 4a) e imobilizada (equação 4b).

$$y_3 = -46,04 + 12,20x_1 - 1,29x_1^2 + 0,95x_2 - 0,012x_2^2 + 0,035x_1x_2 \text{ (equação 4a)}$$

$$y_4 = -43,92 + 11,44x_1 - 1,17x_1^2 + 0,88x_2 - 0,011x_2^2 + 0,025x_1x_2 \text{ (equação 4b)}$$

A falta de ajuste dos modelos (equações 4a, b) foi significativa. Entretanto, o R^2 foi de 0,96 (equação 4a) e 0,97 (equação 4b), indicando que 96 % e 97 % dos dados experimentais foram explicados adequadamente aos modelos propostos e assim, os modelos podem ser utilizados para fins preditivos. Foi realizada a construção das superfícies de resposta e perfis de desejabilidade. A região ótima para obtenção de maior atividade de β -glicosidase de soja livre e imobilizada foi para intervalo de pH 4–6 e temperatura de 30–60 °C (Figuras 4c, e), os parâmetros de desejabilidade, com maior atividade da β -glicosidase livre e Imobilizada (3,69 UA 10^{-3} e 4,47 UA 10^{-3}) foram obtidos em pH 5,5 a 50 °C (Figuras 4d, f), correspondendo à atividade da enzima obtida nos pontos centrais. Portanto, não houve necessidade de validação do modelo matemático.

O pH ótimo de 5,5 pode ser devido ao envolvimento de dois ácidos carboxílicos na atividade catalítica da β -glicosidase que deve estar desprotonada para exercer sua função e isto ocorre com maior facilidade quando o meio encontra-se menos ácido (Nam, Sung & Hwang, 2010). Su et al. (2010) avaliaram a β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* livre e imobilizada em alginato de sódio e observaram temperatura ótima de 55 °C e 45 °C, respectivamente. O pH ótimo de 6 foi observado para enzima livre e imobilizada.

3.6. Determinação de K_m e V_{max}

A velocidade de reação da β -glicosidase livre e imobilizada foi determinada em função da concentração do substrato sintético p-NPG em pH 5,5 a 50°C (Figura 5a). Os valores das constantes cinéticas da β -glicosidase livre e imobilizada foram K_m de 0,26 mM e 0,46 mM e V_{max} de 7,2 μmol de p-NP min^{-1} e 4,37 μmol de p-NP min^{-1} . Estes resultados indicaram uma redução de afinidade da β -glicosidase imobilizada pelo substrato p-NPG, em relação à enzima livre. Esta diferença de afinidade pode estar relacionada com os microambientes gerados pela interação enzima-suporte, promovendo mudanças conformacionais que afetam a função catalítica (Simões, Mori, Faria & Castro, 2011).

3.7. Estabilidade térmica e reutilizações da β -glicosidase imobilizada

A estabilidade térmica de β -glicosidase livre e imobilizada foi investigada após manutenção da enzima em diferentes tempos e temperaturas de incubação em pH 5,5 (Figura 5b). A enzima livre e imobilizada apresentaram estabilidade térmica a 30 °C, com redução de 16 % e 5 % de atividade após 240 min de incubação. Em 50 °C a enzima livre e imobilizada apresentaram redução de 78 % e 15 % de atividade em 60 min de incubação e após 240 min, a enzima imobilizada manteve 37 % da atividade inicial, enquanto a livre 6 %. Em 70 °C, a enzima livre não apresentou atividade após 20 min, enquanto a enzima imobilizada manteve 15 % de atividade após 180 min de incubação.

A redução de atividade da enzima livre foi superior a da enzima imobilizada, indicando que a imobilização favoreceu maior estabilidade térmica em relação à enzima livre. Segundo Wang, Su, Qi, Zhang & He (2010) a estabilidade térmica elevada em sistemas imobilizados pode ser explicada pelo aumento da rigidez da enzima, com preservação de sua estrutura terciária e conformacional em diferentes ambientes.

A reutilização da β -glicosidase imobilizada em bagaço de cana foi analisada por 15 vezes, com sua aplicação sucessiva em p-NPG. Na Figura 5c observa-se o comportamento de atividade a cada reutilização. Após 4 reutilizações, a enzima imobilizada manteve 84 % de sua atividade. Em 15 reutilizações a enzima imobilizada apresentou 13 % de sua atividade inicial.

3.8. Aplicação da β -glicosidase imobilizada em bagaço de cana em extrato comercial de soja

As formas de isoflavonas do extrato comercial de soja foram quantificadas por CLUE (Tabela 5) e seu teor foi $132,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ das formas β -glicosídicas, $23,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ das malonil glicosídicas e $5,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ das agliconas. As formas acetil glicosídicas, malonil glicitina, glicitina, gliciteína e daidzeína não foram detectadas. O teor de isoflavonas agliconas (genisteína) aumentou 17,9 % e 25 % ($p \leq 0,05$) após a aplicação da β -glicosidase de soja imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar (0,003 UA) no extrato comercial de soja, incubados a 25 °C e 50 °C por 120 min. Estes resultados foram superiores significativamente ($p \leq 0,05$) em relação aos tempos de incubação de 30 e 60 min. Estes resultados de conversão de β -glicosídios em agliconas pode ter sido influenciado negativamente pelo pH do extrato comercial de soja (7,2). Considerando que o pH ótimo da enzima imobilizada em bagaço de cana foi 5,5.

A taxa de conversão de isoflavonas obtida neste trabalho diferiu dos resultados apresentados na literatura. Handa, Couto, Vicensoti, Georgetti & Ida (2014) obtiveram um aumento de 2,6 a 3,5 vezes no teor de agliconas em extratos de isoflavonas tratados com extratos de β -glicosidase de *Monascus purpureus* (0,4 UA) e *Aspergillus oryzae* (0,4 UA). Chen et al. (2013) e Chen et al. (2012) aplicaram a β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* imobilizada em borra de café (0,62 UA) e microesferas de vidro (0,74 UA) no extrato de soja preta e observaram um aumento de 4 vezes no teor de agliconas. Yang et al. (2009) obtiveram um aumento de 10 vezes e 4,9 vezes no teor de agliconas quando aplicaram a β -glicosidase purificada de *Paecilomyces thermophila* (0,02 U) e amêndoas (0,02 U) no extrato de soja.

Porém, as diferenças observadas entre os trabalhos podem ser atribuídas às fontes da enzima, microbiana ou vegetal e às condições de purificação e imobilização. A atividade da enzima livre ou imobilizada é um fator importante na eficiência de conversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas. Assim, a aplicação da β -glicosidase imobilizada em bagaço de cana no extrato comercial de soja foi eficiente e superior na conversão de isoflavonas em relação aos dados observados na literatura.

4. Conclusão

A otimização da imobilização da β -glicosidase de cotilédones de soja em bagaço de cana-de-açúcar tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído foi eficiente e confirmada por MSR. As condições de imobilização para maior rendimento foram 1 mg de proteína mL⁻¹, pH 7, 110 rpm em 8 h de incubação e glutaraldeído de 2,5 %. A estabilidade térmica da enzima imobilizada foi superior a enzima livre, sendo possível reutilizá-la 4 vezes sem perda drástica de atividade e ocorreu redução de afinidade da enzima imobilizada pelo substrato ρ -NPG. A utilização de bagaço de cana-de-açúcar, um resíduo da agroindústria, como suporte de imobilização de enzima foi eficiente e fornece um sistema econômico e seguro para aplicação na indústria de alimentos.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa e Fundação Araucária pelo apoio financeiro. Aos laboratórios de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) e de Espectroscopia (ESPEC) pelas análises de MEV de FTIR.

Referências

- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. (2006). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (18 ed). Airlingtonn, (Revision 1).
- Calado, V., Montgomery, D.C. (2003). *Planejamento de experimentos usando o Statistica*. Rio de Janeiro: E-papers.
- Carvalho Neto, A.G.V., Ganzerli, T.A., Cardoso, A.L., Fávoro, S.L., Pereira, A.G.B., Giroto, E.M., & Radovanovic, E. (2014). Development of Composites Based on Recycled Polyethylene/Sugarcane Bagasse Fibers. *Polymer Composites*, 768-774.
- Carvalho, W., Canilha, L., & Silva, S.S. (2006). Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*, 23, 60–70.
- Castanón-Rodríguez, J.F., Torrestiana-Sánchez, B., Montero-Lagunes, M., Portilla-Arias, J., Ramírez de León, J.A., & Aguilar-Uscanga, M.G. (2013). Using high pressure processing (HPP) to pretreat sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1018–1024.
- Chen, K.I., Lo, Y.C., Liu, C.W., Yu, R.C., Chou, C.C., & Cheng, K.C. (2013). Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee grounds as an immobiliser for β -glucosidase. *Food Chemistry*, 139, 79–85.
- Chen, K.I., Lo, Y.C., Su, N.W., Chou, C.C., & Cheng, K.C. (2012). Enrichment of Two Isoflavone Aglycones in Black Soymilk by Immobilized β -Glucosidase on Solid Carriers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12540–12546.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). *Levantamento cana-de-açúcar safra 2014/2015*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 25 de abril de 2014.

Dubois, M., Gilles, M., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.

Fávaro, S.L., Ganzerli, T.A., Carvalho Neto, A.G.V., Silva, O.R.R.F., Radovanovic, E. (2010). Chemical, morphological and mechanical analysis of sisal fiber-reinforced recycled high-density polyethylene composites. *Express Polymer Letters*, 4(8), 465–473.

Handa, C.L., Couto, U. R., Vicensoti, A.H., Georgetti, S.R., & Ida. E.I. (2014). Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. *Food Chemistry*, 152, 56–65.

Hillman, G.G., Singh-Gupta, V., Al-Bashir, A.K., Yunker, M.C.J., Sarkar, F.H., Abrams, J., & Haacke, E.M. (2011). Monitoring Sunitinib-Induced Vascular Effects to Optimize Radiotherapy Combined with Soy Isoflavones in Murine Xenograft Tumor1. *Translational Oncology*, 4(2), 110–121.

Kawakami, Y., Tsurugasaki, W., Nakamura, S., & Osada, K. (2005). Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 205–212.

Kao, T.H., Chien, J.T., & Chen, B.H. (2008). Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 107, 1728–1736.

Khuong, L.D., Kondo, R., Leon, R., Anh, T.K., Shimizu, K., & Kamei, I. (2014) Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 62-68.

Li, G., Jiang, Y., Fan, X.J., & Liu, Y.H. (2012). Molecular cloning and characterization of a novel β -glucosidase with high hydrolyzing ability for soybean isoflavone glycosides and glucose-tolerance from soil metagenomic library. *Bioresource Technology*, 123, 15–22.

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

Matsuura, M., & Obata, A. (1993). β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*, 58(1), 144–147.

Mendes, A.A., Castro, H.F., & Giordano, R.L.C. (2013). Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. *Química Nova*, 36 (2), 245–251.

Nam, K.H., Sung, M.W., & Hwang, K.Y. (2010). Structural insights into the substrate recognition properties of beta-glucosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 391, 1131-1135.

Pehlivan, E., Tran, H.T., Ouédraogo, W.K.I., Schmidt, C., Zachmann, D., & Bahadir M. (2013). Sugarcane bagasse treated with hydrous ferric oxide as a potential adsorbent for the removal of As (V) from aqueous solutions. *Food Chemistry*, 138, 133-138.

Piovesan, A.C., Simões, R.S., Mosquete, R., Simões, M.J., Júnior, J.M.S., & Baracat, E.C. (2004). Efeitos das Isoflavonas no Tecido Mamário. *Femina*, 32, 759–763.

Pires, A.J.V., Reis, R.A., Carvalho, G.G.P., Siqueira, G.R., & Bernardes, T.F. (2006). Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(3), 953–957.

Rajagopalan, G., He, J., & Yang, K.L. (2014). Production, Purification, and Characterization of α -Amylase from Solventogenic *Clostridium* sp. BOH3. *Bioenergy Research*, 7, 132–141.

Ribeiro, M.L.L., Mandarino, J.M.G., Carrão-Panizzi, M.C., Oliveira, M.C.N., Hoffmann-Campo, C.B., Nepomuceno, A.L., & Ida, E.I. (2007). Isoflavone content and b-glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 19–24.

Rimbach, G., Boesch-Saadatmandi, C., Frank, J., Fuchs, D., Wenzel, U., Daniel, H., Hall, W.L., & Weinberg, P.D. (2008). Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1308–1319.

Santos, R.F., Oliveira, C.F., Varéa, G.S., Orradi, M.L.C.S., Ida, E.I., Mandarino, J.M.G., Carrão-Panizzi, M.C., & Ribeiro, M.L.L. (2013). Purification and characterization of soy cotyledon β -glucosidase. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 302–312.

Serefoglou, E., Litina, K., Gournis, D., Kalogeris, E., Tziaila, A.A., Pavlidis, I.V., Stamatis, H., Maccallini, E., Lubomska, M., & Rudolf, P. (2008). Smectite Clays as Solid Supports for Immobilization of β -Glucosidase: Synthesis, Characterization, and Biochemical Properties. *Chemical Material*, 20, 4106–4115.

Shaharuddin, S., Muhamad, I.I., Seng, K.F., Zahan, K.A., & Khairuddin, N. (2014). Potential use of biofibers for functional immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* NRRL 442. *Key Engineering Materials*, 594-595, 231-235.

Simões, A.S., Mori, R.Y., Faria, R., Mendes, A.A., & Castro, H.F. (2011). Performance of hybrid matrix silica-chitosan to immobilize microbial lipase from *Candida rugosa*. *Química Nova*, 34, 33-38.

Su, E., Xia, T., Gao, L., Dai, Q., & Zhang, Z. (2010). Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. *Food and Bioprocess Processing*, 88, 83–89.

Teixeira, R., Magalhães, R.S., Arenales, A., Souza, A.E., Romero, M., & Rincón, J.M. (2014). Valorization of sugarcane bagasse ash: Producing glass-ceramic materials. *Journal of Environmental Management*, 134, 15-19.

Teixeira, F.A., Pires, A.V., & Nascimento, P.V.N. (2007). Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. *Revista eletrônica de Veterinária*, 8 (6), 1-9.

UNICA - União das Indústrias de Cana-de-açúcar. (2014). Setor Sucroenergético, São Paulo, Disponível em: <http://www.unica.com.br/linhadotempo/index.html>. Acesso em: 25 de abril de 2014.

UNICA - União das Indústrias de Cana-de-açúcar. (2011). In: BERTELLI, L. G. Um Fantástico Potencial. *Convidados*, São Paulo, Disponível em: <http://www.unica.com.br/convidados/5337876920338419546/um-fantastico-potencial/>. Acesso em: 25 de abril de 2014.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 74(10), 3583–3597.

Varavinit, S., Chaokasem, N., & Shobsngob, S. (2002). Immobilization of a thermostable alpha-amylase. *Science Asia*, 28, 247–251.

Wang, F., Su, R., Qi, W., Zhang, M., & He, Z. (2010). Preparation and activity of bubbling-immobilized cellobiase within chitosan-alginate composite. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 40, 57-64.

Yang, S., Wang, L., Yan, Q., Jiang, Z., & Li, L. (2009). Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. *Food Chemistry*, 115(4), 1247–1252.

Yoshiara, L.Y., Madera, T.B., Delarozza, F., Silva, J.B., & Ida, E.I. (2012). Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 9, 978–986.

Zhang, D.Y. Zu, Y.G., Fu, Y.J., Luo, M., Wang, W., Gu, C.B., & Yao, X.H. (2013). Application of immobilized enzymes to accelerate the conversion of genistin to genistein in pigeon pea root extracts and the evaluation their antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 42, 409– 415.

Zhou, Y., Pan, S., Wei, X., Wang, L., & Liu, Y. (2013). Immobilization of β -glucosidase onto magnetic nanoparticles and evaluation os the enzymatic properties. *Bioresources*, 8(2), 2605–2619.

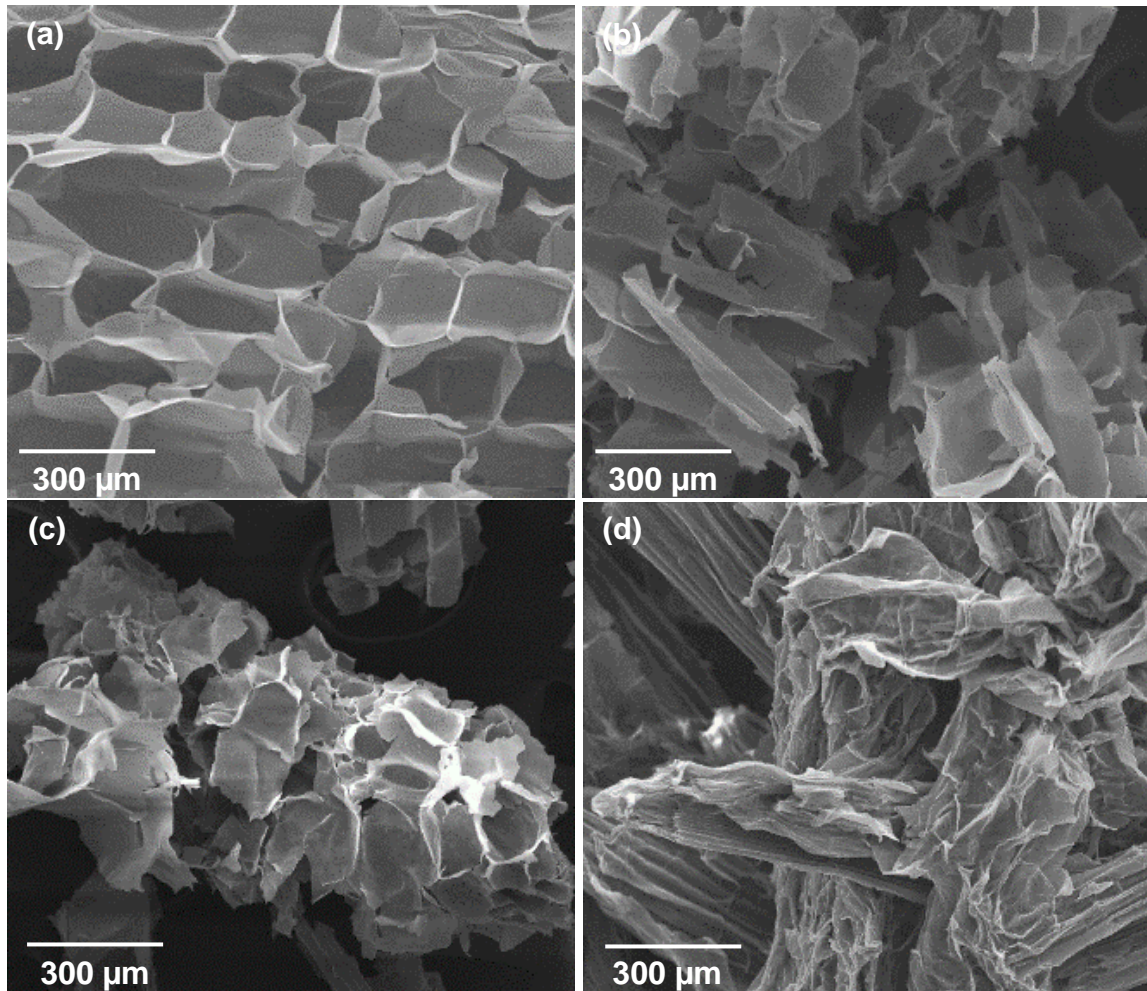


Figura 1- Micrografias dos bagaços de cana-de-açúcar *in natura* (a), tratados com água 60 °C (b), etanol 70% e autoclavado (c) e NaOH 500 mM e autoclavado (d).

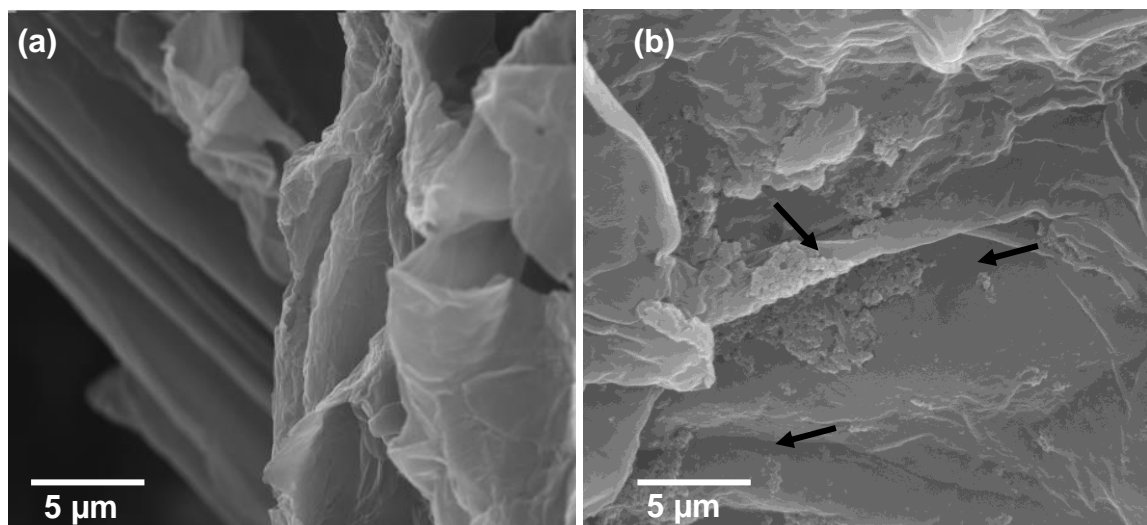


Figura 2- Micrografias do bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído 2,5 % (a) e com a β -glicosidase imobilizada (b).

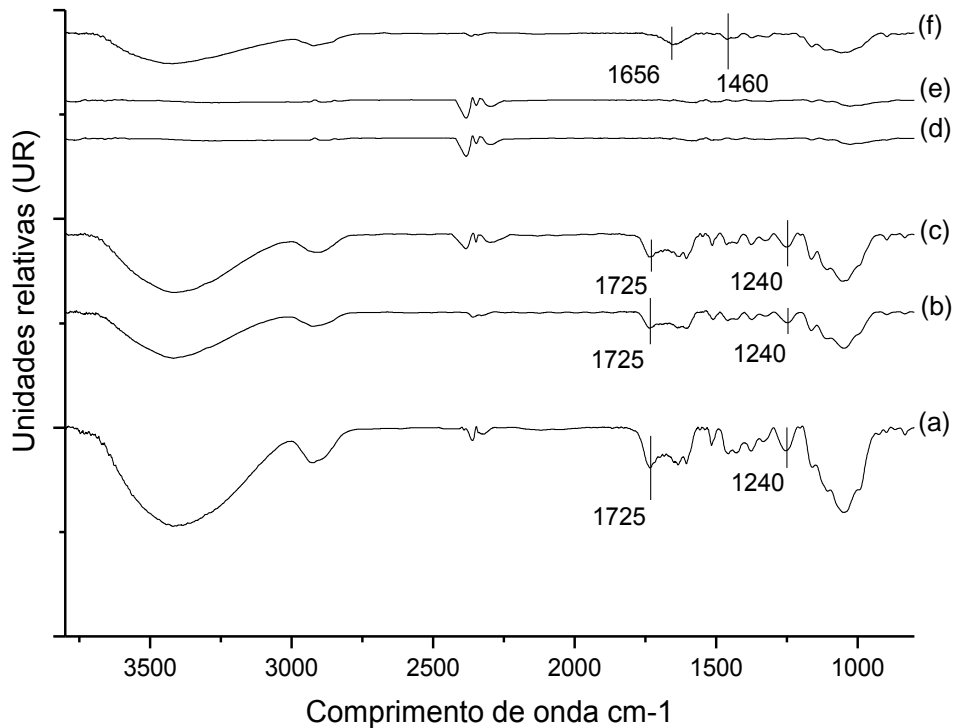


Figura 3- Espectros de FTIR dos bagaços de cana *in natura* (a), tratados com água a 60 °C (b), etanol 70 % e autoclavado (c), NaOH 500 mM e autoclavado (d), NaOH 500 mM, autoclavado e ativado com glutaraldeído 2,5 % (e), NaOH 500 mM, autoclavado, ativado com glutaraldeído 2,5 % e com a β -glicosidase imobilizada (f).

Tabela 1- Composição química da fibra do bagaço de cana

Tratamentos	Celulose (%)	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)
Bagaço lavado	45,6 C	5,6 A	42,6 A	0,79 A
Bagaço NaOH	59,5 B	1,9 B	34,5 B	0,66 A
Bagaço NaOH + autoclave	74,0 A	1,6 B	21,6 C	0,61 A

Teste de Tukey 5 % com CV= 1,6 %. Média das triplicatas seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si.

Tabela 2- Rendimento de imobilização de β -glicosidase de soja em bagaços de cana submetidos a tratamentos químico e térmico

Tratamentos	Proteínas (0,7 mg mL ⁻¹)	Proteínas (1,4 mg mL ⁻¹)
	RI (%)	RI (%)
B ₁ Água 60°C	66 Ac	62 Ac
B ₂ Água 60°C+Glutaraldeído 2,5 %	77 Ab	80 Ab
B ₃ NaOH 500 mM+ autoclave	79 Ab	81 Ab
B ₄ NaOH 500 mM+autoclave+Glutaraldeído 2,5 %	98 Aa	97 Aa
B ₅ Etanol 70 %+autoclave	56 Ad	53 Ad
B ₆ Etanol 70 %+autoclave+Glutaraldeído 2,5 %	82 Ab	83 Ab

B: 1 g de bagaço de cana; condições de autoclave 121 °C por 15 min; Teste de Tukey 5 % com CV= 6,14 %; RI= Rendimento de Imobilização (Atividade específica da enzima imobilizada/Atividade específica da enzima livre x 100); Média de RI, seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma linha ($p \geq 0,05$); Média de RI, seguidas de letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ($p \geq 0,05$).

Tabela 3- ANOVA para rendimento de imobilização e atividade de β -glicosidase livre e imobilizada em bagaço de cana

Fontes de Variação	SQ	GL	QM	F-valor	p-valor
<i>Delineamento 2⁵⁻¹ (Y₁= rendimento de imobilização - RI, %)</i>					
X ₂ pH	3277,562	1	3277,562	3277,562	0,000305
X ₄ Glutaraldeído	248,062	1	248,062	248,062	0,004007
X ₅ Tempo	1242,562	1	1242,562	1242,562	0,000804
X ₁ X ₂ (Proteína+pH)	85,562	1	85,562	85,562	0,011486
X ₁ X ₄ (Proteína+Glutaraldeído)	68,063	1	68,063	68,063	0,014376
X ₂ X ₃ (pH+rpm)	105,062	1	105,062	105,062	0,009384
X ₂ X ₄ (pH+Glutaraldeído)	115,563	1	115,563	115,563	0,008543
X ₄ X ₅ (Glutaraldeído+tempo)	45,563	1	45,563	45,563	0,021251
Lack of fit	1683,247	1	1683,247	1683,247	0,000594
Erro puro	2,000	2			
Total SQ	6909	18			
R ² = 0,76					
<i>DCCR 2² (Y₂= rendimento de imobilização - RI, %)</i>					
X ₁ Tempo (L)	56,941	1	56,941	56,941	0,001652
X ₁ Tempo (Q)	801,808	1	801,808	801,808	0,000009
X ₂ Glutaraldeído (L)	324,265	1	324,265	324,265	0,000056
X ₂ Glutaraldeído (Q)	304,257	1	304,257	304,257	0,000063
X ₁ X ₂ (Tempo+Glutaraldeído)	25,000	1	25,000	25,000	0,007490
Lack of fit	120,585	3	40,195	40,195	0,01912
Erro puro	4,000	4			
Total SQ	1488,923	12			
R ² = 0,92					
<i>DCCR 2² (Y₃= atividade β-glicosidase livre, UA)</i>					
X ₁ pH (L)	0,79	1	0,79	163,40	0,0002
X ₁ pH (Q)	97,76	1	97,76	20282,32	0,0000
X ₂ Temperatura (L)	9,30	1	9,30	1929,36	0,0000
X ₂ Temperatura (Q)	85,64	1	85,64	17766,96	0,0000
X ₁ X ₂ (pH+ Temperatura)	2,50	1	2,50	517,93	0,0001
Lack of fit	5,78	3	1,93	399,63	0,0002
Erro puro	0,019	4	0,005		
Total SQ	165,95	12			
R ² = 0,96					
<i>DCCR 2² (Y₄= atividade de β-glicosidase imobilizada, UA)</i>					
X ₁ pH (L)	0,77	1	0,77	189,30	0,0002
X ₁ pH (Q)	80,96	1	80,96	19989,69	0,0000
X ₂ Temperatura (L)	6,22	1	6,22	1536,02	0,0000
X ₂ Temperatura (Q)	68,12	1	68,12	16820,22	0,0000
X ₁ X ₂ (pH+ Temperatura)	1,25	1	1,25	309,73	0,0001
Lack of fit	3,74	3	1,25	307,56	0,0001
Erro puro	0,016	4	0,004		
Total SQ	132,0	12			
R ² = 0,97					

Parâmetros significativos ($p \leq 0,05$).

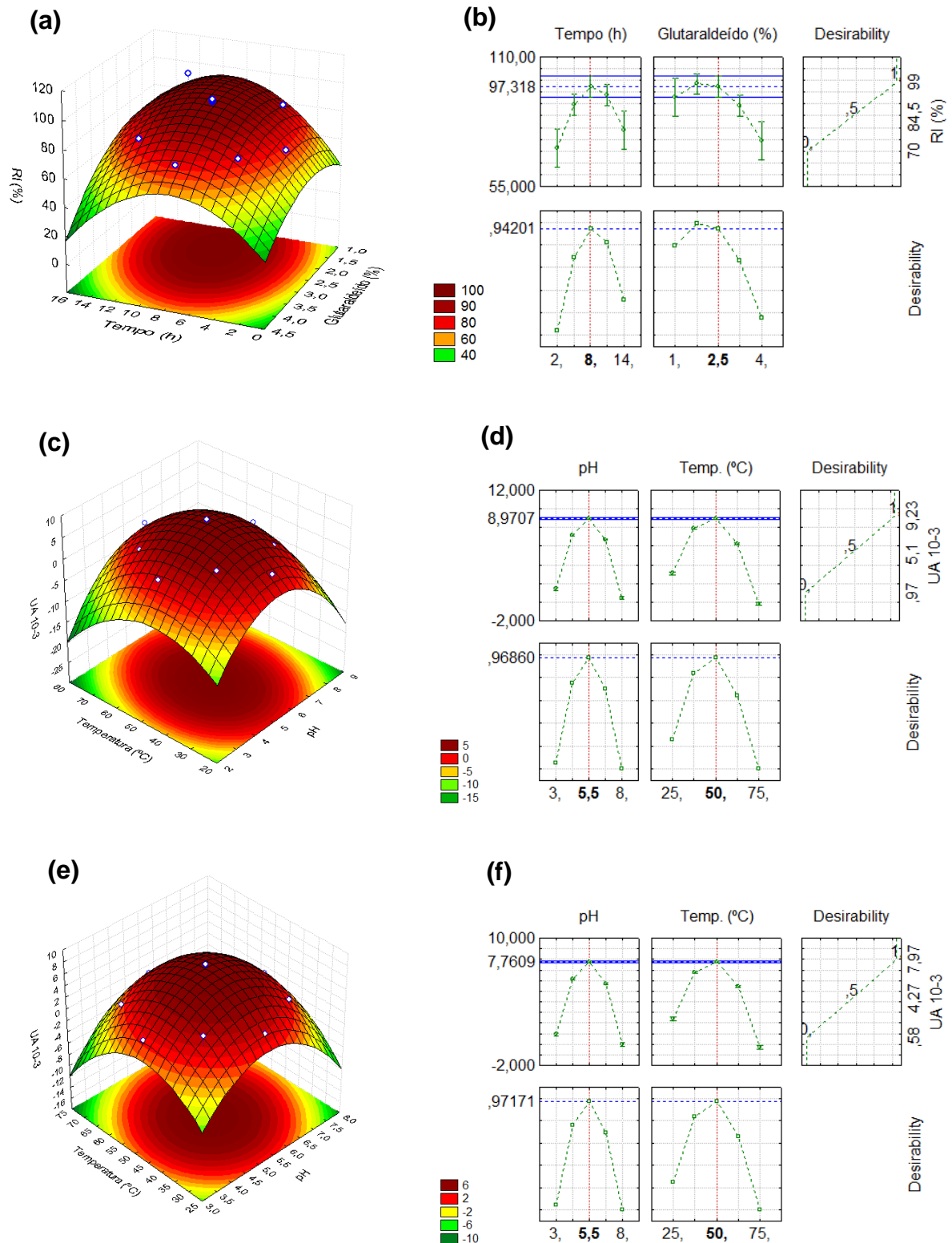


Figura 4- Superfícies de resposta e parâmetros de desejabilidade em função do tempo (h) e glutaraldeído (%) para RI (a), (b) e em função da temperatura e pH para determinação da atividade de β -glicosidase livre (c), (d) e imobilizada em bagaço de cana tratado e ativado (e), (f).

Tabela 4- DCCR 2² para imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana e função resposta Y₂ (RI, %)

Experimentos	Variáveis codificadas e decodificadas		Função resposta
	x ₁ (X ₁)	x ₂ (X ₂)	Y ₂
1	-1(4)	-1(1,5)	86
2	-1(4)	1(3,5)	76
3	1(12)	-1(1,5)	99
4	1(12)	1(3,5)	79
5	-1,41(2)	0(2,5)	70
6	1,41(14)	0(2,5)	74
7	0(8)	-1,41(1)	88
8	0(8)	1,41(4)	73
9	0(8)	0(2,5)	96
10	0(8)	0(2,5)	98
11	0(8)	0(2,5)	96
12	0(8)	0(2,5)	97
13	0(8)	0(2,5)	98

X₁ (tempo de incubação, h); X₂ (glutaraldeído, %) e Y₂ (rendimento de imobilização – RI, %) = Atividade específica da enzima imobilizada/Atividade específica da enzima livre × 100).

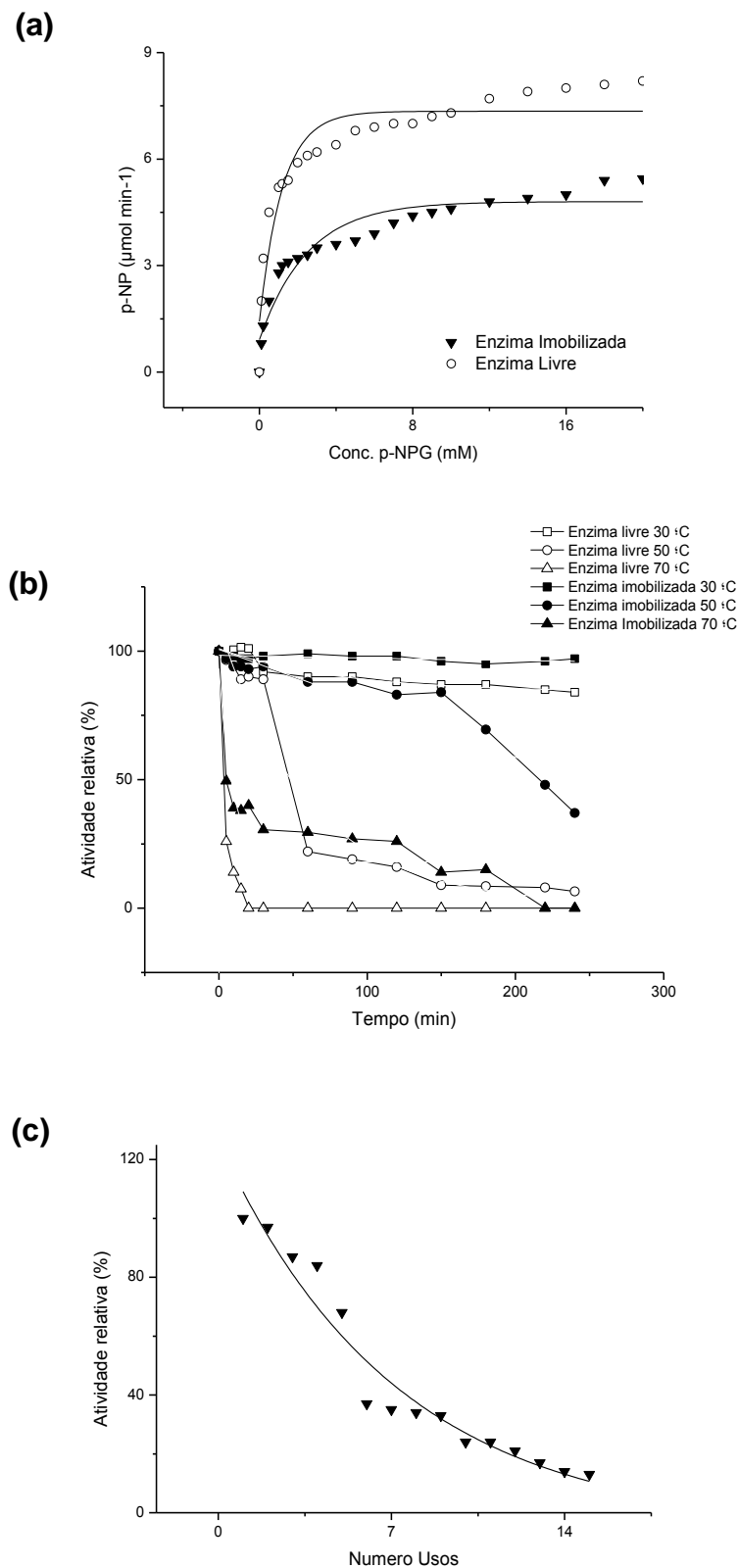


Figura 5- Efeito do p-NPG na atividade da enzima livre e imobilizada em bagaço de cana (a). Estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada em pH 5,5 (b) e reutilização da enzima imobilizada utilizando como substrato o p-NPG em pH 5,5, 50 °C por 30 min

Tabela 5- Teor de isoflavonas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em extrato de soja comercial sem e com β -glicosidase imobilizada em bagaço de cana ativada com glutaraldeído 2,5 %

Isoflavonas $\mu\text{g mL}^{-1}$	Controle	Tratamentos					
		min/25 °C			min/50 °C		
		30	60	120	30	60	120
Daidzina	52,73 A	48,46B	48,00 B	48,17 B	48,45 B	47,94 B	48,21 B
Genistina	79,42 A	67,70B	66,64 B	66,31 B	67,23 B	66,76 B	66,69 B
Malonil daidzina	12,75 B	12,74B	12,79 B	13,03 A	13,00 A	12,97 A	13,05 A
Malonil genistina	11,04 A	9,53B	9,50 B	9,00 C	9,55 B	9,52 B	8,98 C
Genisteína	5,60 D	6,09C	6,16 C	6,60 B	6,28 BC	6,62 B	7,00 A
Total agliconas	5,60	6,09	6,16	6,60	6,28	6,62	7,00
Total	161,84 A	144,52 B	143,09 B	143,11 B	144,51 B	143,81 B	143,93 B

Teste de Tukey 5 % com CV= 1,9 %. Média das triplicatas seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma linha ($p \geq 0,05$).

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo “Imobilização de β -glicosidase de soja em esferas e cápsulas de alginato de sódio” será submetido à revista Carbohydrate Polymers.

IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM ESFERAS E CÁPSULAS DE ALGINATO DE SÓDIO

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. Caixa Postal 6001, CEP 86.051-990, Londrina-PR-Brasil

Autor para correspondência: Tel/fax: 55 (43) 3371-4270

E-mail:maraluciaribeiro@uel.br

Resumo

A β -glicosidase de cotilédones de soja foi obtida por precipitação fracionada com sulfato de amônio e imobilizada em esferas e cápsulas de alginato de sódio. A imobilização da enzima em cápsulas apresentou maior rendimento de imobilização. As condições para imobilização da enzima em cápsulas de alginato de sódio pelo método crosslinking-adsorção-crosslinking foram otimizadas por metodologia de superfície de resposta e sua aplicação em extrato comercial de soja foi avaliada pela determinação de isoflavonas por cromatografia líquida de ultra eficiência. O rendimento de imobilização foi de 96 %. As condições ótimas para atividade de β -glicosidase livre e imobilizada foram pH 5,5 a 50 °C utilizando *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside como um substrato. O K_m e V_{max} foram de 0,26 mM e 7,2 $\mu\text{mol min}^{-1}$ para β -glicosidase livre e 0,48 mM e 1,39 $\mu\text{mol min}^{-1}$ para a imobilizada. O sistema foi reutilizado 3 vezes e a estabilidade térmica da enzima imobilizada foi superior a da enzima livre. A aplicação da β -glicosidase imobilizada em extrato comercial de soja a 50 °C por 120 min aumentou o teor de agliconas totais em 37,5 %.

Palavras chave:

Imobilização
 β -glicosidase de soja
Alginato de sódio
Isoflavonas

1. Introdução

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam a ligação β -glicosídica de oligossacarídeos e outros conjugados glicosídicos. São um grupo relevante de enzimas devido a diversidade de papéis biológicos em que estão envolvidas e suas generalizadas ocorrências em todos os tipos de organismos vivos (Bhatia, Mishra, & Bisaria, 2002). As β -glicosidases tem recebido atenção devido às suas potenciais aplicações em diversas áreas industriais, tais como indústrias de alimentos, rações, têxteis, detergentes, produtos farmacêuticos e bioetanol (Bhatia et al., 2002; Zhou et al., 2012).

As isoflavonas são compostos fenólicos, pertencentes ao grupo dos flavonóides, encontradas principalmente em soja, são substratos importantes da β -glicosidase, realiza hidrólise das isoflavonas β -glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) consideradas mais benéficas para a saúde humana (Kao, Chien & Chen, 2008), pois, são metabolicamente mais ativas e podem ser absorvidas mais rapidamente em maiores quantidades (Kawakami, Tsurugasaki, Nakamura & Osada, 2005). Dentre as atividades biológicas das isoflavonas destacam-se ação anticarcinogênica

(Hillman et al., 2011), redução dos níveis de colesterol e triacilgliceróis séricos, com prevenção de doenças cardiovasculares (Rimbach et al., 2008), efeito estrogênico diminuindo os sintomas típicos da menopausa (Piovesan, Simões, Mosquete, Simões, Júnior & Baracat, 2004) e melhora no cabelo, estado da pele, humor, libido, sono e cansaço (Lipovac et al., 2011).

Considerando o teor de agliconas na soja de aproximadamente 2 % (Ribeiro et al., 2007), a aplicação da β -glicosidase em produtos de soja pode ser empregada para aumentar o teor das mesmas, entretanto, para a indústria a utilização de enzima livre apresenta alto custo. Dessa forma, a imobilização de enzimas é uma alternativa para viabilizar a sua utilização, melhorando a eficiência de processos biotecnológicos, reduzindo os custos de produção (Canilha, Carvalho, Almeida & Silva, 2006) por aumentar a estabilidade e facilitar a separação do produto de reação (Su, Xia, Gao, Dai & Zhang, 2010).

O alginato é um biopolímero aniônico contendo resíduos de ácido β -D-manurônico (M) unidos por ligações tipo (1 \rightarrow 4) e resíduos de seu epímero, ácido α -L-gulurônico (G), em várias proporções. É uma das matrizes biopoliméricas mais utilizadas nos processos de imobilização, devido sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, simplicidade estrutural e capacidade para formar géis de três dimensões na presença de cálcio em soluções aquosas (Alipour, Montaseri & Tafaghod, 2010; Chan et al., 2011). Apesar da imobilização em alginato ser uma técnica simples, apresenta baixo rendimento de imobilização pelo desprendimento de enzimas do suporte, sendo economicamente inadequado para aplicações. Por isso, existe a necessidade de desenvolver uma metodologia eficiente (Tanriseven & Dogan, 2001).

A utilização da metodologia de superfície de resposta (MSR) pode ser uma ferramenta adequada para otimização das condições de imobilização. MSR é uma técnica que permite eficiência e economia do processo com o uso de ferramentas estatísticas para investigar as influências das variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação nas respostas para a otimização da resposta experimental (Calado & Montgomery, 2003).

Tendo em vista a importância da imobilização de enzimas e a obtenção de produtos de soja com elevado teor de isoflavonas agliconas, o objetivo desse trabalho foi avaliar metodologias de imobilização de β -glicosidase em esferas e cápsulas de alginato de sódio, otimizar as condições de imobilização da enzima em

cápsulas de alginato de sódio utilizando MSR, caracterizar química e morfologicamente o suporte com e sem enzima imobilizada e aplicá-la em extrato comercial de soja, para obtenção de um produto com maior teor de isoflavonas agliconas.

2. Material e Métodos

2.1. Material

Foi utilizado alginato de sódio obtido de *Macrosclerella pirifera* de viscosidade média (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], BRS 213, safra 2010/2011, fornecida pela Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brasil, mantida a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi utilizada para obtenção de β -glicosidase. Para determinação da atividade de β -glicosidase foi utilizado *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NPG) e para determinação de proteínas, albumina de soro bovino (BSA), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Foi utilizado extrato comercial de soja. Para a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) foram utilizados padrões de isoflavonas malonil e acetil conjugados (Wako Puré Chemical Industries, Osaka, Japão) e isoflavonas β -glicosídeos e agliconas (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Outros reagentes foram de grau analítico ou HPLC.

2.2. Determinação de Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase livre (1 mL) e imobilizada (4 esferas ou cápsulas) foi determinada utilizando *p*-NPG 1mM como substrato em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5. A reação foi incubada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min e interrompida com Na_2CO_3 500 mM. O *p*-nitrofenol liberado na reação foi determinado por espectrofotometria a 420 nm utilizando uma curva de calibração de *p*-NP (0,016 a 0,160 μmol), (Matsuura & Obata, 1993). Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de β -glicosidase que libera 1 μmol de *p*-NP min^{-1} , nas condições de ensaio.

2.3. Determinação de proteínas solúveis e atividade específica

O teor de proteínas solúveis dos extratos de enzima livre e filtrados obtidos da enzima imobilizada foi quantificado pelo método de Lowry, Rosebrough, Farr & Randall (1951).

A atividade específica da β -glicosidase livre e imobilizada foi definida pela relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e mg de proteínas (UA mg⁻¹ de proteínas).

2.4. Obtenção da β -glicosidase de soja

A β -glicosidase foi extraída da farinha de cotilédones de soja com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6 (1:10 p/v) para obtenção do extrato bruto (Matsuura & Obata, 1993) que foi fracionado com (NH₄)₂SO₄ de 0–40 % e 40–85 % de saturação a 4 °C (Santos et al., 2013). Após diálise das frações, foram determinados a atividade de β -glicosidase e teor de proteínas solúveis. A fração P₄₀₋₈₅, com maior atividade de β -glicosidase, foi utilizada como fonte de enzima livre para imobilização em alginato de sódio.

2.5. Imobilização de β -glicosidase em alginato de sódio

A imobilização de β -glicosidase em alginato de sódio foi realizada por métodos de aprisionamento para obtenção de esferas e métodos de adsorção para obtenção de cápsulas (Su et al., 2011; Zhang et al., 2013). Metodologias para obtenção de esferas e cápsulas foram testadas. O rendimento de imobilização (RI) foi expresso como (atividade específica da enzima imobilizada/atividade específica da enzima livre) \times 100.

2.5.1. Imobilização de β -glicosidase em esferas de alginato de sódio

Para a metodologia de aprisionamento direto foram utilizados 0,54 mL de solução de β -glicosidase (atividade específica de 9,57 10⁻³ UA mg⁻¹), misturada com 9,46 mL de alginato de sódio 3 %. A mistura foi gotejada em CaCl₂ 50 mM (tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5) com uma seringa para a formação das esferas, separadas posteriormente por filtração e adicionadas em nova solução de CaCl₂ 50 mM por 1 h a 4 °C e 100 rpm em mesa agitadora (Quimis Q225M), mantidas em repouso por 16 h. Posteriormente, foram filtradas, separadas e lavadas três vezes com tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0.

No aprisionamento-crosslinking, após aprisionamento direto, as esferas foram reticuladas com glutaraldeído a 0,025 % por 2,5 h. Em seguida, foram separadas e lavadas três vezes com tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0 e acondicionadas no mesmo tampão a 4 °C.

No crosslinking-aprisionamento foi preparada uma mistura contendo 0,54 mL solução de β -glicosidase (atividade específica de $9,57 \cdot 10^{-3}$ UA mg^{-1}), 9,46 mL de alginato de sódio 3 % e 1,3 mL de 2,5 % de glutaraldeído, mantida a 4 °C e 100 rpm por 30 min. A mistura final foi usada para aprisionamento conforme aprisionamento direto.

Para a metodologia de crosslinking-aprisionamento-crosslinking foi realizada uma combinação dos procedimentos crosslinking-aprisionamento e aprisionamento-crosslinking.

2.5.2. Imobilização de β -glicosidase em cápsulas de alginato de sódio

A imobilização da β -glicosidase de soja por adsorção direta foi realizada com 10 mL de alginato de sódio 3 % em uma seringa gotejado em uma solução de β -glicosidase (atividade específica de $9,57 \cdot 10^{-3}$ UA mg^{-1}), diluída em CaCl_2 50 mM para a formação das cápsulas. As cápsulas foram agitadas por 1 h a 4 °C e 100 rpm em mesa agitadora (Quimis Q225M), mantidas em repouso por 16 h, filtradas, separadas e lavadas três vezes com tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0.

Na adsorção-crosslinking, após a adsorção direta, as cápsulas foram reticuladas com glutaraldeído a 0,025 % por 2,5 h, separadas e lavadas três vezes com tampão fosfato citrato 50 mM, pH 5,0.

No crosslinking-adsorção foi preparada uma mistura contendo 1,3 mL de 2,5 % de glutaraldeído e 10 mL de alginato de sódio 3 %, mantida a 4 °C e 100 rpm por 30 min. Após, o procedimento foi realizado conforme adsorção.

Para a metodologia crosslinking-adsorção-crosslinking foi realizada uma combinação dos procedimentos crosslinking-adsorção mais adsorção-crosslinking.

2.5.3. Delineamentos experimentais

O método de imobilização da enzima em cápsulas por crosslinking-adsorção-crosslinking, que apresentou maior rendimento de imobilização, foi utilizado para análises exploratórias por delineamento fatorial completo 2^4 . Foi avaliada a influência das variáveis pH (4 a 6), CaCl_2 (30 a 70 mM), proteínas (1 a 2 mg mL^{-1}) e glutaraldeído (0,05 a 0,1 %) e suas interações na função resposta Y_1 (RI, %). Após a análise dos resultados obtidos nesse delineamento, as variáveis proteínas e glutaraldeído foram fixadas em 1 mg mL^{-1} e 0,075 %. Para otimizar a imobilização de β -glicosidase em cápsulas de alginato foi utilizado um Delineamento Composto

Central Rotacional (DCCR) 2² para avaliar a influência das variáveis independentes pH (3,5–6,5) e CaCl₂ (20–80 mM) e suas interações. As funções resposta Y₁ e Y₂ (RI, %) foram avaliadas conforme o modelo matemático $y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$ (equação 1), onde $x_i x_j$ (variáveis codificadas), β (coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta) e ε (erro experimental).

2.6. Caracterização morfológica do alginato de sódio

Amostras de cápsulas e esferas de alginato de sódio sem e com a β -glicosidase imobilizada foram mantidas em tampão cacodilato 100 mM com 2,7 mL de ácido pícrico 0,56 % e 4 % de glutaraldeído, fraturadas com nitrogênio líquido e fixadas em fita de carbono e stub de alumínio, recobertas com uma camada de ouro de 25 nm (Sputter Coater SDC 050 - BALTEC) e observadas em microscópio eletrônico de varredura operando em vácuo sob feixe de elétrons com aceleração de 10 kV (FEI, modelo Quanta 200). Foram obtidas três imagens representativas de cada amostra em diferentes pontos.

2.7. Caracterização química do alginato de sódio

Para caracterizar o suporte foram realizadas análises de FTIR utilizando pastilhas de KBr (brometo de potássio) em espectrômetro FTIR (IR Prestige-21 Shimadzu, USA). Os espectros FTIR foram obtidos com resolução espectral de 100 scans de 2 cm⁻¹ registrados pelo Software IRSolution 1.60SU2.

2.8. Efeitos do pH, temperatura e concentração de p-NPG na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada

Para determinação do pH (3–8) e temperatura (25–75 °C) ótimos foi utilizado um DCCR 2², com função resposta Y₃ e Y₄ (atividade de β -glicosidase livre e imobilizada, UA), avaliada conforme modelo matemático expresso na equação 1. O efeito da concentração de p-NPG (0,1 a 20 mM) na enzima livre e imobilizada foi determinado em pH 5,5 a 50 °C por 30 min. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de p-NP min}^{-1}$ e os valores de K_m e V_{max} foram estimados pelo método gráfico de Lineweaver-Burk.

2.9. Estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada

A estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada foi avaliada pela incubação da enzima a 30, 50 e 70 °C em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,5 em diferentes intervalos de tempo (0 a 240 min). A atividade da β -glicosidase foi medida pelo ensaio da atividade residual determinada a 50 °C por 30 min.

2.10. Reutilização da β -glicosidase imobilizada

Para avaliação da reutilização, a β -glicosidase imobilizada em cápsulas de alginato de sódio foi utilizada por 3 vezes consecutivas e a atividade residual determinada por p-NPG 1 mM, pH 5,5 a 50 °C por 30 min.

2.11. Aplicação de β -glicosidase imobilizada em extrato de soja

A β -glicosidase imobilizada foi adicionada ao extrato comercial de soja em tempos de contato de 30 a 120 min, em 25 °C e 50 °C. Como controle, foi utilizado o extrato de soja sem a aplicação da enzima imobilizada. Para a extração das isoflavonas, os extratos tratados foram liofilizados e desengordurados com hexano (1:10, v/v).

2.12. Determinação do teor de isoflavonas por cromatografia de ultra eficiência (CLUE)

Para a extração das isoflavonas, foram utilizados 300 mg de extrato comercial de soja liofilizado e desengordurado adicionado em 6 mL de solução extratora (água, etanol e acetona, 1:1:1, v/v/v) e agitados a cada 15 min por 1 h a 25 °C. Após, a mistura foi colocada em banho ultrassônico por 15 min a 25 °C (Yoshiara et al., 2012). Em seguida, o extrato foi centrifugado (4°C, 794 x g, 15 min; Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Alemanha) e o sobrenadante filtrado em membranas hidrofílicas de PVDF com 0,22 μ m de tamanho de poro (Millex-GV, Millepore, Billerica, MA, USA) e aplicado no Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE).

Para a separação e quantificação das isoflavonas por CLUE foi utilizado o cromatógrafo UPLC® (Acquity UPLC® System, Waters, EUA), equipado com injetor automático de amostras, bomba quaternária, forno com temperatura controlada de 35 °C e detector com arranjo de diodos (DAD), controlado pelo software *Empower 3*. A eluição das amostras foi conduzida em coluna de fase reversa Acquity™ UPLC BEH 18 (50 mm x 2,1 mm d.i.; 1,7 μ m de diâmetro de partícula; Waters), com fase

móvel constituída de um sistema gradiente binário, com fase inicial de 90% de solução aquosa de ácido acético pH 3 (solvente A) e 10% de acetonitrila (solvente B). A vazão da fase móvel foi de 0,70 mL min⁻¹ e detector com arranjo de diodos (DAD-Waters), ajustado ao comprimento de onda de 260 nm. A identificação e quantificação de cada forma química de isoflavona nos cromatogramas foi realizada por comparação dos espectros de absorção e integração das áreas dos picos com padronização externa (área x concentração) utilizando padrões individuais de isoflavonas. O teor de isoflavonas foi expresso por µg mL⁻¹ de extrato de soja.

2.13. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., 2007). Após a análise das funções resposta (Y_1 ; Y_2 ; Y_3 e Y_4) a análise de variância (ANOVA) da regressão, coeficientes de determinação (R^2), superfície de resposta e parâmetros de desejabilidade foram gerados.

O teste de Tukey, nível de significância de 5 %, foi utilizado para comparação de médias (triplicata) dos RI da β -glicosidase em esferas e cápsulas de alginato de sódio obtidas por diferentes metodologias e para o teor de isoflavonas.

3. Resultado e Discussão

3.1. Rendimento de imobilização de β -glicosidase em esferas e cápsulas de alginato de sódio por diferentes metodologias

Foram avaliados os rendimentos de imobilização (RI) de β -glicosidase em alginato de sódio por oito metodologias (Tabela 1). O RI do métodos utilizados para produção de esferas de alginato de sódio variou de 40 % a 70 %, enquanto que para as cápsulas, de 70 % a 88 %. O RI de β -glicosidase em cápsulas (crosslinking-adsorção-crosslinking) foi 2,2 vezes superior ao obtido por esferas (aprisionamento direto). O glutaraldeído desempenhou um papel importante na reação de ligação cruzada entre enzimas. Após sua adição ao alginato promoveu a ativação do suporte promovendo possível ligação covalente cruzada com a β -glicosidase durante o processo de imobilização, a adição do glutaraldeído após a formação das esferas e cápsulas contendo a enzima imobilizada possibilitou possível interação intramolecular das estruturas proteicas aumentando a estabilidade do sistema imobilizado, promovendo maior rendimento de imobilização (Kumar & Kanwar, 2011). Su et al. (2010) e Zhang et al. (2013) observaram que a adição de

glutaraldeído (2,5 % e 0,075 %) e (2,5 % e 0,025 %) no processo de imobilização de β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* em alginato de sódio aumentou em 3,2 e 2,8 vezes a atividade recuperada da enzima imobilizada, respectivamente.

3.2. Caracterização morfológica do alginato de sódio

A caracterização morfológica das esferas e cápsulas de alginato de sódio foi realizada por análises macro e microscópicas. As esferas (Figura 1a) e cápsulas (Figura 1b) de alginato de sódio produzidas por diferentes metodologias de imobilização de β -glicosidase apresentaram formato esférico com 0,5 mm a 0,6 mm de diâmetro, com elevada homogeneidade e uniformidade de tamanho.

A caracterização microscópica do alginato, alginato reticulado com glutaraldeído 2,5 %, esferas e cápsulas de alginato foi realizada por MEV (Figura 2). O alginato de sódio apresentou forma esponjosa (Figura 2a) e essa característica também foi relatada por Abd El-Ghaffar & Hashem (2013) que observaram a facilidade da entrada do substrato e saída do produto devido a essas estruturas. A incorporação de glutaraldeído ao alginato de sódio (Figura 2b) proporcionou uma modificação estrutural observada pela formação de pequenos aglomerados (setas tracejadas) em relação ao alginato (Figura 2a). O glutaraldeído é constituído por cinco moléculas de carbono, oito de hidrogênio e duas de oxigênio ($C_5H_8O_2$), realiza ligações cruzadas e pode se polimerizar. Com a adição desse composto ao alginato provavelmente ocorreu uma sobreposição de partículas (Barbosa, Ortiz, Berenguer-Murcia, Torres, Rodrigues & Fernandez-Lafuente, 2014).

A morfologia das esferas (Figura 2c) e cápsulas (Figura 2d) com β -glicosidase imobilizada apresentaram diferenças entre si, possivelmente, devido às diferentes etapas dos processos de imobilização. Nas esferas (Figura 2c) produzidas por crosslinking-aprisionamento-crosslinking e cápsulas de alginato (Figura 2d) produzidas para imobilização de β -glicosidase por crosslinking-adsorção-crosslinking são observados aglomerados (setas pretas) indicando a possível imobilização da enzima. Chen, Lo, Liu, Yu, Chou & Cheng (2013) e Chen, Lo, Su, Chou & Cheng (2012) também relataram a presença de aglomerados de β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* imobilizada em borra de café e microsferas de vidro. Abd El-Ghaffar & Hashem (2013) verificaram aglomerados de α -quimotripsina imobilizada em alginato de sódio.

3.2. Caracterização química do alginato de sódio

Os espectros de FTIR do alginato e alginato reticulado com glutaraldeído 2,5 % apresentaram diferenças em relação aos espectros das esferas produzidas por crosslinking-aprisionamento-crosslinking e cápsulas de alginato com a β -glicosidase imobilizada produzidas por crosslinking-adsorção-crosslinking (Figura 3). Há evidências de que ocorreram mudanças nos grupamentos químicos. Verifica-se a presença de bandas em 1725 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} no alginato (Figura 3a) e alginato reticulado com glutaraldeído 2,5 % (Figura 3b). Essas bandas são características de ácidos carboxílicos referentes à vibração e estiramento de C=O, estiramento C-O e presença de grupos OH, presentes na cadeia polimérica. As bandas no intervalo de 1550 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} são referentes à ligação C-O, atribuída ao alginato de sódio salificado, característica de íon carboxilato. Segato & Cavaleiro (2007) e Quiroga, Illanes, Ochoa & Barberis (2011) observaram a presença de bandas semelhantes nos espectros de alginato de sódio. Morais et al. (2013) relatou bandas de grupos de sal de carboxilato em alginato de cálcio. As bandas no intervalo de 1550 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} observadas no alginato reticulado com glutaraldeído 2,5 % (Figura 3b) apresentaram pequenas modificações em relação ao alginato (Figura 3a), possivelmente pela adição de glutaraldeído ao alginato de sódio.

No espectro FTIR das esferas (Figura 3c) e cápsulas (Figura 3d) contendo a β -glicosidase imobilizada, as bandas 1620 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} podem indicar a presença de amidas I e III associadas com o estiramento e vibração de C=O e de N-H e C-N com ligação N-H, respectivamente. Segundo Serefoglou et al. (2008) e Zhou, Pan, Wei, Wang & Liu (2013) bandas no intervalo de 1412 cm^{-1} a 1660 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de grupamentos amida de peptídios característicos de β -glicosidase. Portanto, a imobilização de β -glicosidase de soja em esferas e cápsulas reticuladas com glutaraldeído foi confirmada.

3.3.2. Otimização da imobilização de β -glicosidase em cápsulas de alginato de sódio

A imobilização de β -glicosidase em cápsulas de alginato de sódio obtidas por crosslinking-adsorção-crosslinking foi mais eficiente. Assim, foi utilizado um delineamento fatorial completo 2^4 para avaliar as condições de imobilização da enzima. A análise de regressão e ANOVA (Tabela 2) para a função resposta ($Y_1 = \text{RI, \%}$) e o efeito das variáveis X_1 (pH: 4 a 6), X_2 (CaCl_2 : 30 a 70 mM), X_3 (proteínas: 1 a 2 mg mL^{-1}) e X_4 (glutaraldeído: 0,05 a 0,1 %) foram observadas. As variáveis X_3 e

X_4 e as interações X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 , X_3X_4 não foram significativas e o coeficiente de determinação R^2 foi 0,78. Os resultados da análise exploratória indicaram que o teor de proteínas (X_3) e glutaraldeído (X_4) não foram significativos e que o pH e CaCl_2 apresentaram efeito positivo e significativo ($p \leq 0,05$) (equação 2).

$$y_1 = -120,178 + 42x_1 + 0,812x_2 - 0,325x_1x_2 \text{ (equação 2)}$$

O RI de β -glicosidase em cápsulas de alginato de sódio variou de 8 % a 92 %, sendo máximo nos pontos centrais, condições de $X_1 = \text{pH } 5$, $X_2 = \text{CaCl}_2 \text{ } 50\text{mM}$, $X_3 = 1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas e $X_4 = 0,075 \%$ de glutaraldeído e o RI também foi máximo no experimento com as condições de $X_1 = \text{pH } 6$, $X_2 = \text{CaCl}_2 \text{ } 30\text{mM}$, $X_3 = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas e $X_4 = 0,05 \%$ de glutaraldeído. Portanto, os parâmetros foram fixados em 1 mg mL^{-1} de proteínas e $0,075 \%$ de glutaraldeído. Foi utilizado um DCCR 2^2 para avaliar a influência das variáveis pH (X_1) e CaCl_2 , mM (X_2). A análise de regressão e ANOVA (Tabela 2) para a função resposta ($Y_2 = \text{RI, } \%$) indicaram efeitos linear e quadráticos positivos e significativo ($p \leq 0,05$). A interação X_1X_2 foi negativa e significativa ($p \leq 0,05$) e o modelo matemático proposto foi $y_2 = -917,06 + 366,85x_1 - 34,43x_1^2 + 5,27x_2 - 0,053x_2^2 - 0,213x_1x_2$ (equação 3).

A falta de ajuste do modelo (Equação 3) foi significativa. Entretanto, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,96, indicando que 96 % dos dados experimentais foram ajustados adequadamente ao modelo proposto e assim o modelo pode ser utilizado para fins preditivos. Foi realizada a construção da superfície de resposta e o perfil de desejabilidade. A região ótima para obtenção de maior RI da β -glicosidase em cápsulas de alginato de sódio foi para intervalo de pH 4,5–6 e CaCl_2 de 20–60 mM (Figura 4a) e os parâmetros de desejabilidade, com maior RI (96 %) foram obtidos com pH 5 e CaCl_2 50 mM (Figura 4b), correspondendo ao RI localizados nos pontos centrais. Portanto, não houve necessidade de validação do modelo matemático. O RI de β -glicosidase em cápsulas de alginato variou de 9 % a 96 %, sendo máximo nos pontos centrais (Tabela 3).

A estabilidade das cápsulas foi observada e após 14 dias acondicionadas em tampão pH 4 ($X_1 = -1$) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ verificou-se a dissolução completa. As cápsulas produzidas em pH 5 ($X_1 = 0$) apresentaram maior estabilidade, porém, em concentrações elevadas de CaCl_2 70 mM e 80 mM ($X_2 = 1$ e $1,41$) o RI foi reduzido para 9 % (Tabela 3). Resultados semelhantes foram relatados por Anwar, Qader, Raiz, Iqbal & Azhar (2009), Talekar & Chavare (2012) e Jadhav & Singhal (2014) que observaram redução de 2; 8,9 e 1,3 vezes na imobilização de proteases de

Bacillus subtilis KIBGE-HAS, de α -amilase (Diastase) e α -amilase de *Bacillus licheniformis* em alginato de sódio quando utilizaram elevadas concentrações de CaCl_2 .

Até o momento não foram publicados dados sobre a imobilização de β -glicosidase de cotilédones de soja em cápsulas de alginato de sódio. Su et al. (2010) e Zhang et al. (2013) imobilizaram β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* em esferas de alginato de sódio com rendimento de imobilização de 15 % a 72 %. Nosworthy, Kondyurin, Bilek & McKenzie (2014) imobilizaram a β -glucosidase de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* em grânulos de polietileno e obtiveram rendimento de imobilização de 66 %.

3.4. pH e temperatura ótimos da β -glicosidase livre e imobilizada

A influência do pH e temperatura na atividade da β -glicosidase livre e imobilizada foi analisada pelo DCCR 2². A análise de regressão e ANOVA (Tabela 2) para função resposta (Y_3 e Y_4 = atividade de β -glicosidase da enzima livre e imobilizada, UA) indicaram efeitos das variáveis X_1 (pH: 3–8) e X_2 (temperatura: 25–75 °C) linear e quadrático, positivos e significativos ($p \leq 0,05$) para a enzima livre e imobilizada. A interação X_1X_2 apresentou efeito positivo e significativo ($p \leq 0,05$) para a enzima livre (equação 4a) e negativo e significativo ($p \leq 0,05$) para a imobilizada (equação 4b).

$$y_3 = -46,04 + 12,2x_1 - 1,29x_1^2 + 0,95x_2 - 0,012x_2^2 + 0,035x_1x_2 \text{ (equação 4a)}$$

$$y_4 = -20,82 + 5,04x_1 - 0,38x_1^2 + 0,41x_2 - 0,004x_2^2 - 0,0096x_1x_2 \text{ (equação 4b)}$$

A falta de ajuste dos modelos (equações 4a, b) foi significativa. Entretanto, o R^2 foi de 0,96 (equação 4a) e 0,90 (equação 4b), indicando que 96 % e 90 % dos dados experimentais foram ajustados adequadamente aos modelos propostos e assim, os modelos podem ser utilizados para fins preditivos. Foi realizada a construção das superfícies de resposta e perfis de desejabilidade. A região ótima para obtenção de maior atividade de β -glicosidase de soja livre foi para o intervalo de pH 4–6 e pH 5–7 para imobilizada e temperatura de 30–60 °C para enzima livre e imobilizada (Figuras 4c, e), os parâmetros de desejabilidade, com maior atividade da β -glicosidase livre e Imobilizada ($3,69 \cdot 10^{-3}$ UA e $3,78 \cdot 10^{-3}$ UA) foram obtidos em pH 5,5 a 50 °C (Figura 4d, f), correspondendo à atividade da enzima obtida nos pontos centrais. Portanto, não houve necessidade de validação do modelo matemático.

O pH ótimo de 5,5 pode ser devido ao envolvimento de dois ácidos carboxílicos na atividade catalítica da β -glicosidase que deve estar desprotonada para exercer sua função e isto ocorre com maior facilidade quando o meio encontra-se menos ácido (Nam, Sung & Hwang, 2010). Su et al. (2010) avaliaram a β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* livre e imobilizada em alginato de sódio e observaram temperatura ótima de 55 °C e 45 °C, respectivamente. O pH ótimo de 6 foi observado para enzima livre e imobilizada.

3.5. Determinação de K_m e V_{max}

A velocidade de reação da β -glicosidase livre e imobilizada foi determinada em função da concentração do substrato sintético p-NPG em pH 5,5 a 50°C (Figura 5a). Os valores das constantes cinéticas da β -glicosidase livre e imobilizada foram K_m de 0,26 mM e 0,48 mM e V_{max} de 7,2 $\mu\text{mol de p-NP min}^{-1}$ e 1,39 $\mu\text{mol de p-NP min}^{-1}$. Estes resultados indicaram uma redução de afinidade da β -glicosidase imobilizada pelo substrato p-NPG, em relação à enzima livre. Esta diferença de afinidade pode estar relacionada com os microambientes gerados pela interação enzima-suporte, promovendo mudanças conformacionais que afetam a função catalítica (Simões, Mori, Faria & Castro, 2011).

3.6. Estabilidade térmica e reutilizações da β -glicosidase imobilizada

A estabilidade térmica de β -glicosidase livre e imobilizada foi investigada após manutenção da enzima em diferentes tempos e temperaturas de incubação em pH 5,5 (Figura 5b). A enzima livre e imobilizada apresentaram estabilidade térmica a 30 °C, com redução de 16 % e 8 % de atividade após 240 min de incubação. Em 50 °C a enzima livre e imobilizada apresentaram redução de 78 % e 64 % de atividade em 60 min de incubação e após 240 min, a enzima imobilizada manteve 12 % da atividade inicial, enquanto a livre, 6 %. Em 70 °C, a enzima livre não apresentou atividade após 20 min, enquanto a enzima imobilizada manteve 12 % de atividade após 60 min de incubação.

A redução de atividade da enzima livre foi superior a da enzima imobilizada, indicando que a imobilização favoreceu maior estabilidade térmica em relação à enzima livre. Segundo Wang et al. (2010) a estabilidade térmica elevada em sistemas imobilizados pode ser explicada pelo aumento da rigidez da enzima, com preservação de sua conformacional em diferentes ambientes.

A β -glicosidase imobilizada em cápsulas de alginato foi utilizada por três vezes, com aplicação sucessiva em p-NPG em pH 5,5 a 50 °C. Na Figura 5c observa-se o comportamento de atividade a cada reutilização. Após duas reutilizações, a enzima imobilizada manteve 85 % de sua atividade. Em 3 reutilizações a enzima imobilizada apresentou 17 % de sua atividade inicial.

3.7. Aplicação da β -glicosidase imobilizada em cápsulas de alginato de sódio no extrato comercial de soja

O alginato de sódio pode ser utilizado pela indústria de alimentos para aumentar viscosidade e como emulsionante, sendo seguro para aplicação em alimentos (Su et al., 2010; Zhang et al., 2013). Assim, a β -glucosidase de soja imobilizada em cápsulas alginato de sódio pode ser aplicada em extrato comercial de soja para obter um produto com elevado teor de agliconas.

Os teores de isoflavonas do extrato comercial de soja quantificados por CLUE (Tabela 4) foram de 132,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ das formas β -glicosídicas, 23,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ das malonil glicosídicas e 5,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ das agliconas. As formas acetil glicosídicas, malonil glicetina, glicetina, gliciteína e daidzeína não foram detectadas. O teor de genisteína no extrato comercial de soja incubado com a enzima imobilizada (0,0025 UA) a 25 °C e 50 °C por 120 min aumentou 23,2 % e 37,5 % ($p \leq 0,05$). Estes resultados foram superiores ($p \leq 0,05$) em relação aos tempos de incubação de 30 e 60 min. Entretanto, estes resultados poderiam ser superiores. Considerando que o pH ótimo da enzima imobilizada em cápsulas de alginato de sódio foi 5,5 e o pH do extrato comercial de soja foi de 7,2, a conversão de β -glicosídios em agliconas pode ter sido influenciada negativamente, com redução na taxa de conversão das isoflavonas.

A taxa de conversão de isoflavonas glicosídicas em agliconas, observada neste trabalho, diferiu da relatada por Zhang et al. (2013) que obtiveram um aumento de 63,7 % no teor de agliconas no extrato de raiz de guandu após aplicação de β -glicosidase purificada de *Aspergillus niger* (0,3 U) imobilizada em esferas de alginato de sódio. Esta diferença observada pode ser atribuída às fontes da enzima, microbiana ou vegetal, às condições de purificação e as características que compõe o substrato. A atividade da enzima utilizada é um fator importante na eficiência de conversão das isoflavonas glicosídicas em agliconas. Assim, a

aplicação da β -glicosidase imobilizada em cápsulas de alginato de sódio no extrato comercial de soja foi eficiente.

4. Conclusão

Na imobilização da β -glicosidase de cotilédones de soja em alginato de sódio, as cápsulas produzidas apresentaram rendimentos de imobilização superiores às esferas. A otimização da imobilização das cápsulas foi eficiente e confirmada por MSR. As melhores condições de imobilização foram 1 mg mL⁻¹ de proteínas e 0,075 % de glutaraldeído em pH 5 e CaCl₂ 50 mM. A estabilidade térmica da enzima imobilizada foi superior a enzima livre, sendo possível reutilizá-la 2 vezes sem perda elevada de atividade e ocorreu redução da afinidade da enzima pelo substrato (p-NPG). A utilização de alginato de sódio como suporte de imobilização de enzima foi eficiente e pode ser aplicado na conversão de isoflavonas β -glicosídicas em agliconas.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa e Fundação Araucária pelo apoio financeiro. Aos laboratórios de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) e de Espectroscopia (ESPEC) pelas análises de MEV de FTIR.

Referências

- Abd El-Ghaffa, M.A., & M.S. Hashem, M.S. (2013). Calcium alginate beads encapsulated PMMA-g-CS nano-particles for α -chymotrypsin immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 92, 2095–2102.
- Alipour, S., Montaseri, H., & Tafaghodi, M. (2010). Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(2), 521–529.
- Anwar, A., Qader, S. A. U., Raiz, A., Iqbal, S., & Azhar, A. (2009). Calcium alginate: A support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. *World Applied Sciences Journal*, 7(10), 1281–1286.
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*, 4, 1583-1600.
- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. S. (2002). Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, Philadelphia, 22, 375–407.
- Calado, V., Montgomery, D.C. (2003). *Planejamento de experimentos usando o Statistica*. Rio de Janeiro: E-papers.

Carvalho, W., Canilha, L., & Silva, S.S. (2006). Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*, 23, 60–70.

Chan, E. S., Wong, S. L., Lee, P. P., Lee, J. S., Ti, T. B., Zhang, Z., et al. (2011). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 225–232.

Chen, K.I., Lo, Y.C., Liu, C.W., Yu, R.C., Chou, C.C., & Cheng, K.C. (2013). Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee grounds as an immobiliser for β -glucosidase. *Food Chemistry*, 139, 79–85

Chen, K.I., Lo, Y.C., Su, N.W., Chou, C.C., & Cheng, K.C. (2012). Enrichment of Two Isoflavone Aglycones in Black Soymilk by Immobilized β -Glucosidase on Solid Carriers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12540–12546.

Hillman, G.G., Singh-Gupta, V., Al-Bashir, A.K., Yunker, M.C.J., Sarkar, F.H., Abrams, J., & Haacke, E.M. (2011). Monitoring Sunitinib-Induced Vascular Effects to Optimize Radiotherapy Combined with Soy Isoflavones in Murine Xenograft Tumor1. *Translational Oncology*, 4(2), 110–121.

Jadhav, B.S., & Singhal, R.S. (2014). Pullulan-complexed α -amylase and glucosidase in alginate beads: Enhanced entrapment and stability. *Carbohydrate Polymers*, 105, 49–56.

Kawakami, Y., Tsurugasaki, W., Nakamura, S., & Osada, K. (2005). Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 205–212.

Kao, T.H., Chien, J.T., & Chen, B.H. (2008). Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 107, 1728–1736.

Kumar, A., Kanwar, S.S. (2011). Synthesis of Isopropyl Ferulate Using Silica-Immobilized Lipase in an Organic Medium. *Enzyme Research*, 2011, 1–8.

Lipovac, M., Chedraui, P., Gruenhut, C., Goncan, A., Kurz, C., Neuber, B., & Imhof, M. (2011). Effect of Red Clover Isoflavones over Skin, Appendages, and Mucosal Status in Postmenopausal Women. *Obstetrics and Gynecology International*, 2011, 1–6.

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

Matsuura, M., & Obata, A. (1993). β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*, 58(1), 144–147.

Morais, D.S., Rodrigues, M.A., Silva, T.I., Lopes, M.A., Santos, M., Santos, J.D., Botelho, C.M. (2013). Development and characterization of novel alginate-based hydrogels as vehicles for bone substitutes. *Carbohydrate Polymers*, 95, 134–142.

Nam, K.H., Sung, M.W., & Hwang, K.Y. (2010). Structural insights into the substrate recognition properties of beta-glucosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 391, 1131–1135.

Piovesan, A.C., Simões, R.S., Mosquete, R., Simões, M.J., Júnior, J.M.S., & Baracat, E.C. (2004). Efeitos das Isoflavonas no Tecido Mamário. *Femina*, 32, 759–763.

Quiroga, E., Illanes, C.O., Ochoa, N.A., Barberis, S. (2011). Performance improvement of araujiain, a cystein phytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads. *Process Biochemistry*, 46, 1029–1034.

Ribeiro, M.L.L., Mandarino, J.M.G., Carrão-Panizzi, M.C., Oliveira, M.C.N., Hoffmann-Campo, C.B., Nepomuceno, A.L., & Ida, E.I. (2007). Isoflavone content and β -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 19–24.

Rimbach, G., Boesch-Saadatmandi, C., Frank, J., Fuchs, D., Wenzel, U., Daniel, H., Hall, W.L., & Weinberg, P.D. (2008). Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1308–1319.

Santos, R.F., Oliveira, C.F., Varéa, G.S., Orradi, M.L.C.S, Ida, E.I., Mandarino, J.M.G., Carrão-Panizzi, M.C., & Ribeiro, M.L.L. (2013). Purification and characterization of soy cotyledon β -glucosidase. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 302–312.

Segato, M.P., Cavalheiro, É.T.G. (2007). Thermal analysis of ammonium, mono-, di- and triethanolammonium alginates. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 87, 737-741.

Serefoglou, E., Litina, K., Gournis, D., Kalogeris, E., Tziaila, A.A., Pavlidis, I.V., Stamatis, H., Maccallini, E., Lubomska, M., & Rudolf, P. (2008). Smectite Clays as Solid Supports for Immobilization of β -Glucosidase: Synthesis, Characterization, and Biochemical Properties. *Chemical Material*, 20, 4106–4115.

Simões, A.S., Mori, R.Y., Faria, R., Mendes, A.A., & Castro, H.F. (2011). Performance of hybrid matrix silica-chitosan to immobilize microbial lipase from *Candida rugosa*. *Química Nova*, 34, 33-38.

Su, E., Xia, T., Gao, L., Dai, Q., & Zhang, Z. (2010). Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. *Food and Bioprocess Technology*, 88, 83–89.

Tanriseven, A., & Dogan, S. (2001). Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry*, 36(1), 1081–1083.

Talekar, S., & Chavare, S. (2012). Optimization of immobilization of α -amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free α -amylase. *Recent Research in Science and Technology*, 4(2), 1–5.

Wang, F., Su, R., Qi, W., Zhang, M., & He, Z. (2010). Preparation and activity of bubbling-immobilized cellobiase within chitosan-alginate composite. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 40, 57-64.

Yoshiara, L.Y., Madera, T.B., Delarozza, F., Silva, J.B., & Ida, E.I. (2012). Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 9, 978–986.

Zhang, D.Y. Zu, Y.G., Fu, Y.J., Luo, M., Wang, W., Gu, C.B., & Yao, X.H. (2013). Application of immobilized enzymes to accelerate the conversion of genistin to genistein in pigeon pea root extracts and the evaluation their antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 42, 409– 415.

Zhou, Y., Pan, S., Wei, X., Wang, L., & Liu, Y. (2013). Immobilization of β -glucosidase onto magnetic nanoparticles and evaluation on the enzymatic properties. *Bioresources*, 8(2), 2605–2619.

Zhou, C., Qian, L., Ma, H., Yu, X., Zhang, Y., Qu, W., Zhang, X., & Xia, W. (2012). Enhancement of amygdalin activated with β -D-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis. *Carbohydrate Polymers*, 90, 516–523.

Tabela 1- Rendimento de imobilização da β -glicosidase de soja em alginato de sódio

SUPORTE	Métodos de imobilização	RI (%)
	Aprisionamento direto	40 _E
Alginato de sódio em esferas	Aprisionamento-crosslinking	42 _E
	Crosslinking-aprisionamento	48 _D
	Crosslinking-aprisionamento-crosslinking	70 _C
	Adsorção direta	70 _C
Alginato de sódio em cápsulas	Adsorção-crosslinking	78 _B
	Crosslinking-adsorção	80 _B
	Crosslinking-adsorção-crosslinking	88 _A

RI= Rendimento de Imobilização (Atividade específica da enzima imobilizada/Atividade específica da enzima livre $\times 100$); os dados foram expressos como média de três ensaios independentes; CV: 2,55 %; Teste de tukey 5 %; Média de RI, seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ($p \geq 0,05$).

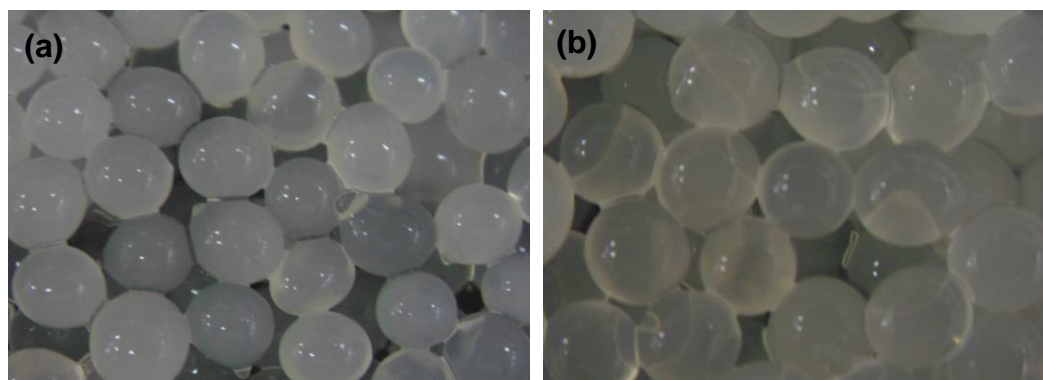


Figura 1- Imagens das esferas (a) e cápsulas (b) produzidas para imobilização em alginato de sódio

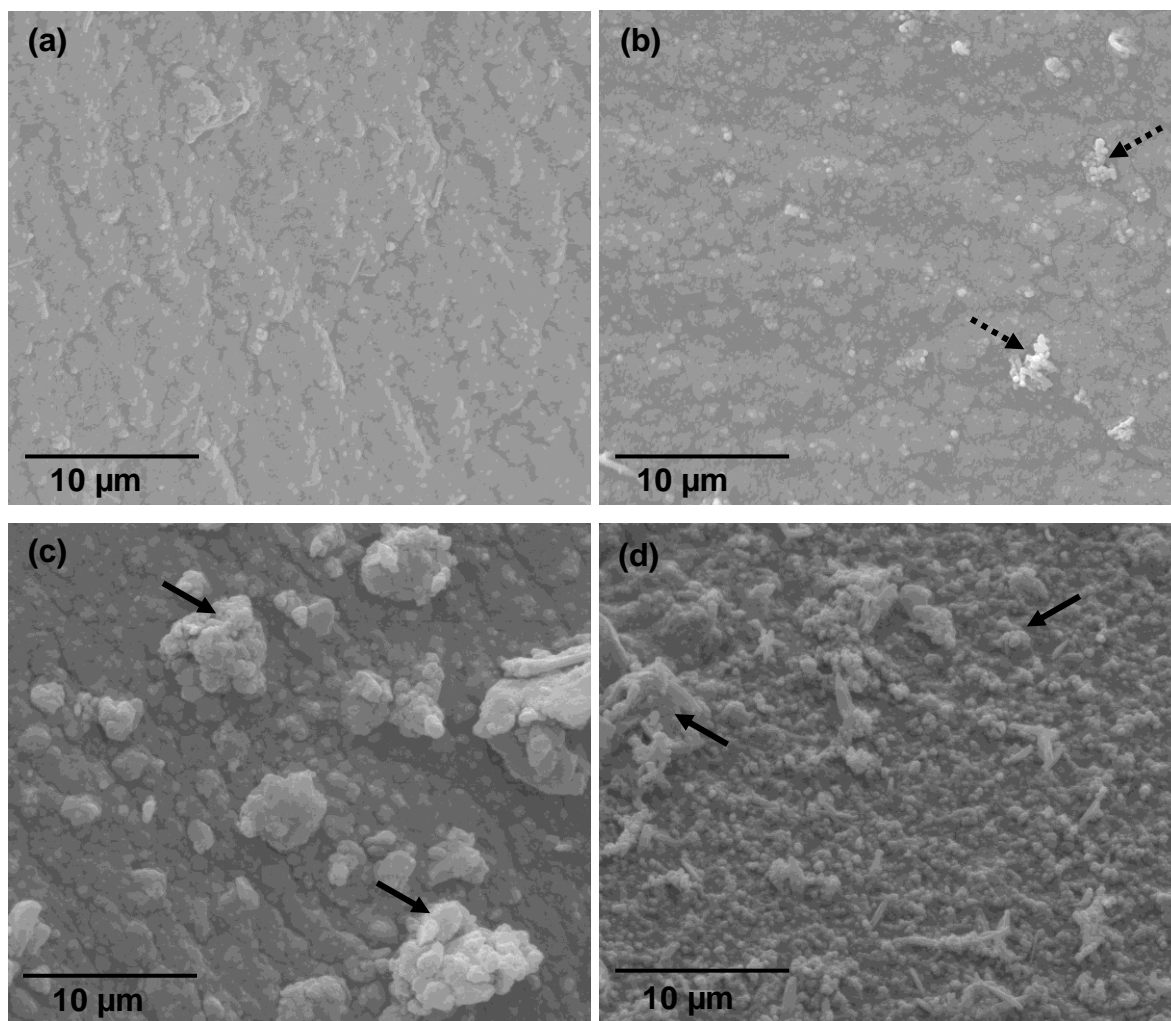


Figura 2- Micrografias do alginato de sódio (a), alginato de sódio reticulado com glutaraldeído 2,5 %, setas tracejadas - pequenos aglomerados de glutaraldeído (b), esferas (c) e cápsulas (d) de alginato de sódio, setas pretas - grandes aglomerados de enzimas.

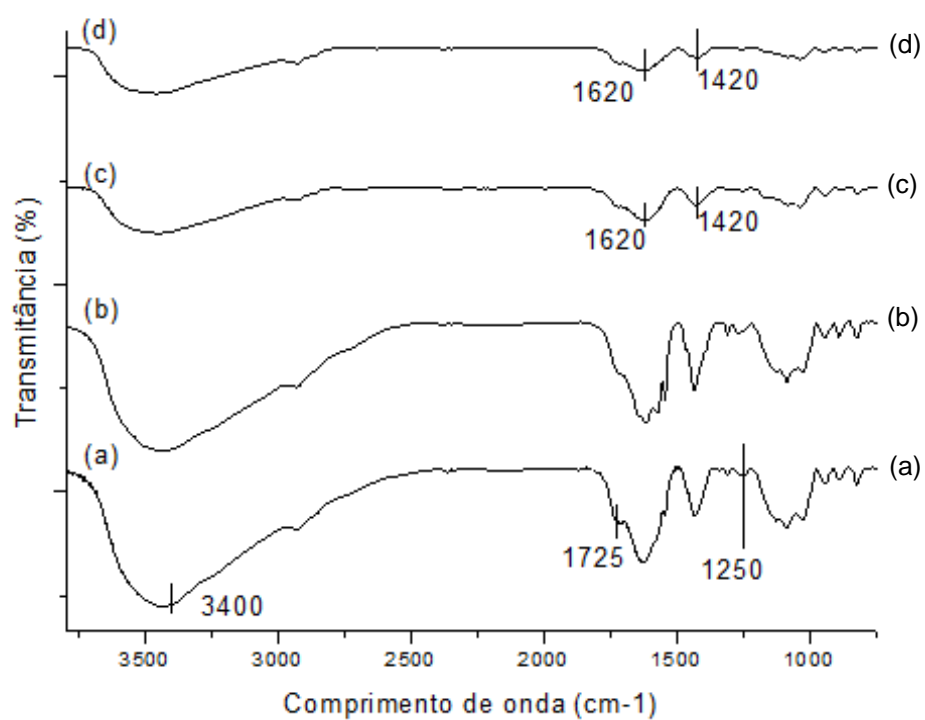


Figura 3- Espectros de FTIR do alginato controle (a), alginato controle e glutaraldeído (b), esferas de alginato de sódio (c), cápsulas de alginato de sódio (d)

Tabela 2- ANOVA para rendimento de imobilização e atividade de β -glicosidase livre e imobilizada em alginato de sódio

Fontes de Variação	SQ	GL	QM	F-valor	p-valor
<i>Delimitação 2⁴ (Y₁= rendimento de imobilização - RI, %)</i>					
X ₁ pH	10302,25	1	10302,25	30906,75	0,000032
X ₂ CaCl ₂	4032,25	1	4032,25	12096,75	0,000083
X ₁ X ₂ (pH+CaCl ₂)	676,00	1	676,00	2028,00	0,000493
Lack of fit	4214,78	6	702,46	2107,30	0,000474
Erro puro	0,67	2	0,33		
Total SQ	19226,95	18			
R ² = 0,78					
<i>DCCR 2² (Y₂= rendimento de imobilização - RI, %)</i>					
X ₁ pH (L)	1212,03	1	1212,03	4040,10	0,000000
X ₁ pH (Q)	9819,02	1	9819,02	32730,06	0,000000
X ₂ CaCl ₂ (L)	3832,97	1	3832,97	12776,57	0,000000
X ₂ CaCl ₂ (Q)	3686,29	1	3686,29	12287,63	0,000000
X ₁ X ₂ (pH+ CaCl ₂)	72,25	1	72,25	240,83	0,000101
Lack of fit	645,98	3	215,327	717,76	0,000006
Erro puro	1,20	4	0,300		
Total SQ	17468,92	12			
R ² = 0,96					
<i>DCCR 2² (Y₃= atividade β-glicosidase livre, UA)</i>					
X ₁ pH (L)	0,79	1	0,79	163,40	0,0002
X ₁ pH (Q)	97,76	1	97,76	20282,32	0,0000
X ₂ Temperatura (L)	9,30	1	9,30	1929,36	0,0000
X ₂ Temperatura (Q)	85,64	1	85,64	17766,96	0,0000
X ₁ X ₂ (pH+ Temperatura)	2,50	1	2,50	517,93	0,0001
Lack of fit	5,78	3	1,93	399,63	0,0002
Erro puro	0,019	4	0,005		
Total SQ	165,95	12			
R ² = 0,96					
<i>DCCR 2² (Y₄= atividade de β-glicosidase imobilizada, UA)</i>					
X ₁ pH (L)	3,18	1	3,18	224,49	0,0001
X ₁ pH (Q)	8,53	1	8,53	601,66	0,0000
X ₂ Temperatura (L)	1,82	1	1,82	128,63	0,0003
X ₂ Temperatura (Q)	8,74	1	8,74	616,96	0,0000
X ₁ X ₂ (pH+ Temperatura)	0,18	1	0,18	13,05	0,0225
Lack of fit	2,15	3	0,72	50,64	0,0012
Erro puro	0,057	4	0,014		
Total SQ	21,28	12			
R ² = 0,90					

Parâmetros significativos ($p \leq 0,05$).

Tabela 3- DCCR 2² para imobilização de β -glicosidase de soja em cápsulas de alginato de sódio para função resposta Y_2 (RI,%)

Experimentos	Variáveis codificadas e decodificadas		Função resposta
	$x_1(X_1)$	$x_2(X_2)$	Y_2
1	-1(4)	-1(30)	30
2	-1(4)	1(70)	9
3	1(6)	-1(30)	75
4	1(6)	1(70)	37
5	-1,41(3,5)	0(50)	10
6	1,41(6,5)	0(50)	29
7	0(5)	-1,41(20)	90
8	0(5)	1,41(80)	9
9	0(5)	0(50)	95
10	0(5)	0(50)	96
11	0(5)	0(50)	96
12	0(5)	0(50)	95
13	0(5)	0(50)	95

X_1 (pH); X_2 (CaCl₂, mM) e Y_2 (Rendimento de Imobilização – RI, %)= Atividade específica da enzima imobilizada/Atividade específica da enzima livre x 100).

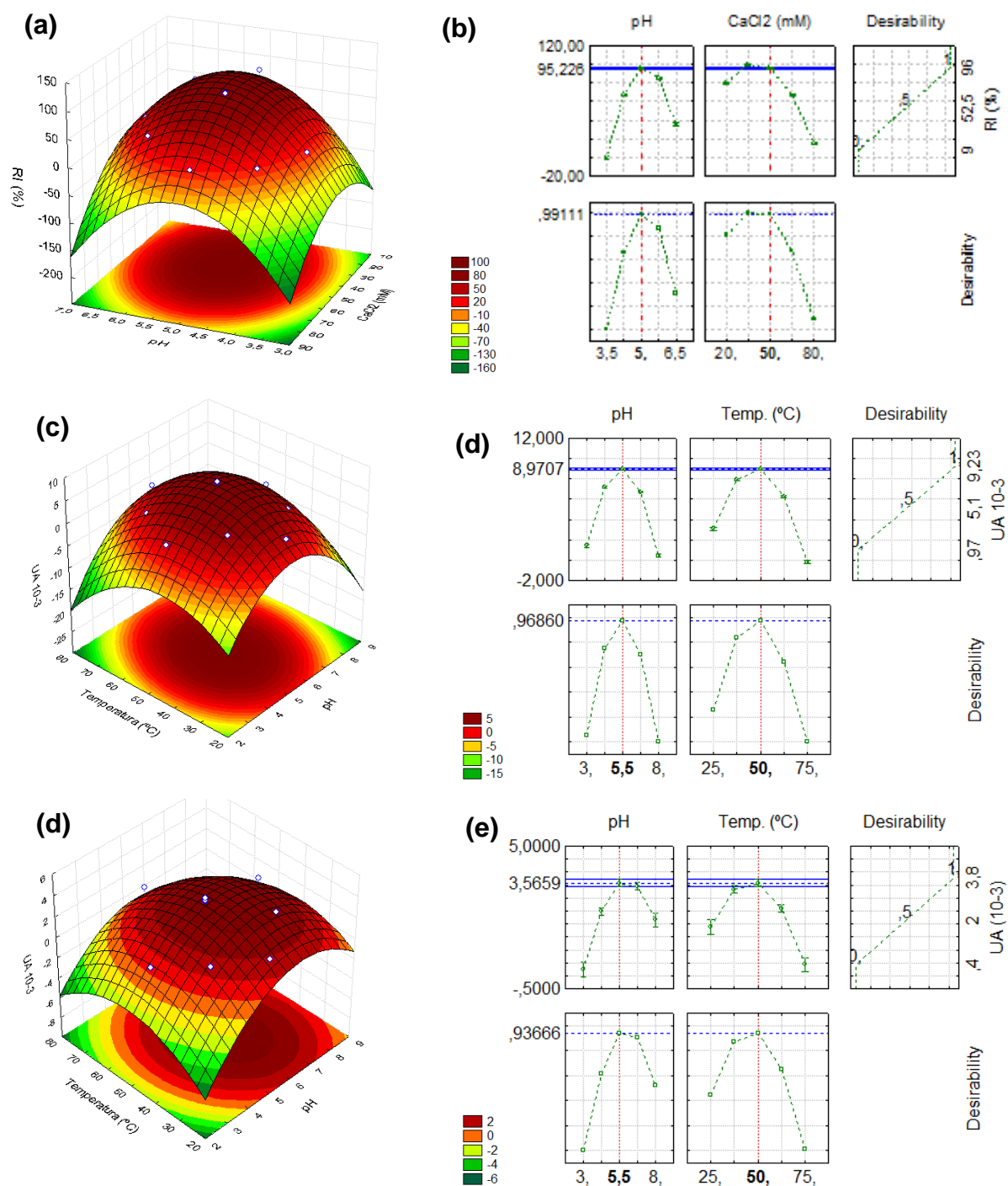


Figura 4- Superfícies de resposta e perfis para os valores previstos e desejabilidade em função do pH e concentração CaCl₂ para rendimento de imobilização (a), (b) e em função da temperatura e pH para determinação da atividade de β -glucosidase livre (c), (d) e imobilizada (e), (f).

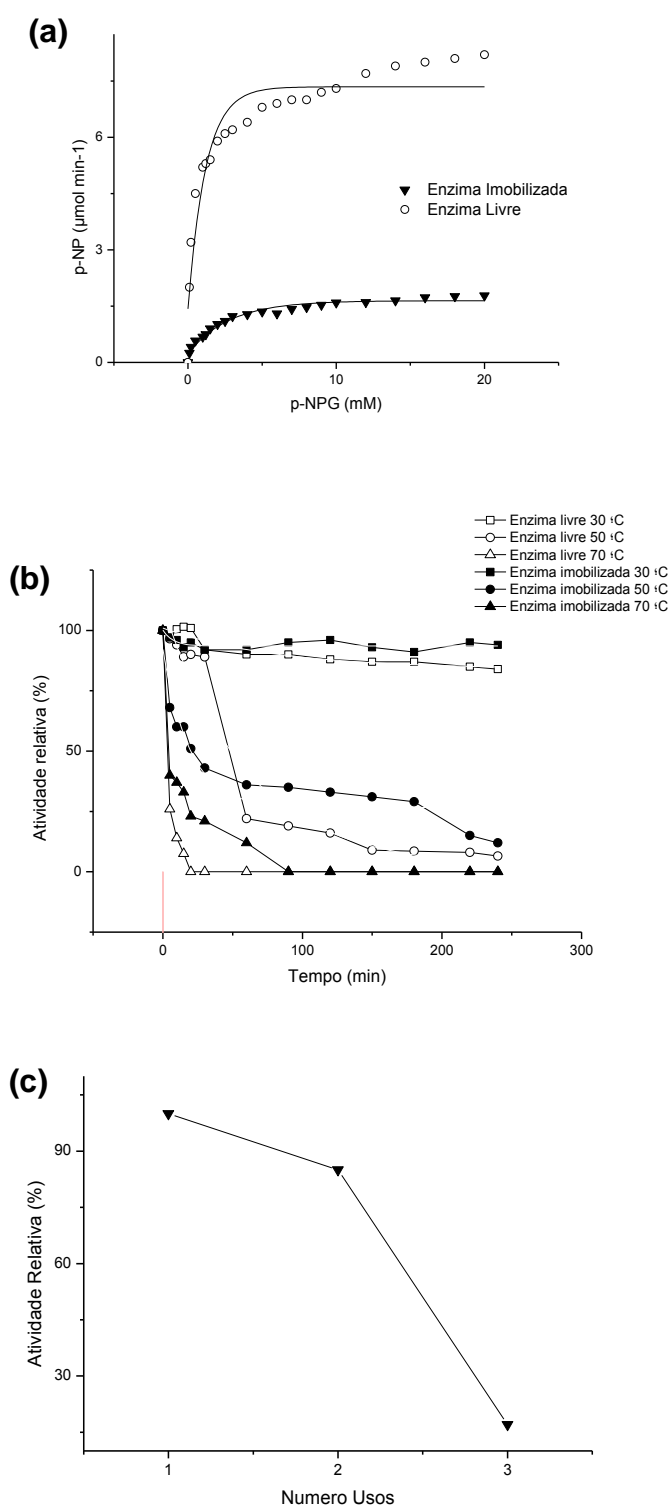


Figura 5- Efeito do p-NPG na atividade da enzima livre e imobilizada em cápsulas de alginato (a). Estabilidade térmica da β -glicosidase livre e imobilizada em pH 5,5 (b) e reutilização da enzima imobilizada utilizando como substrato o p-NPG em pH 5,5, 50 °C por 30 min

Tabela 4- Teor de isoflavonas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) em extrato de soja comercial sem e com β -glicosidase imobilizada em cápsulas de alginato de sódio

Isoflavonas $\mu\text{g mL}^{-1}$	Controle	Tratamentos					
		min/25 °C			min/50 °C		
		30	60	120	30	60	120
Daidzina	52,73 _A	50,88 _B	51,13 _B	49,48 _B	52,07 _A	49,05 _B	48,50 _B
Genistina	79,42 _A	76,81 _B	76,64 _B	74,31 _C	77,23 _B	76,76 _B	73,69 _C
Malonil daidzina	12,75 _C	12,63 _C	13,09 _B	14,03 _A	13,20 _B	14,07 _A	14,05 _A
Malonil genistina	11,04 _A	10,13 _B	10,10 _B	9,99 _{BC}	10,15 _B	9,95 _C	9,81 _C
Genisteína	5,60 _D	6,13 _C	6,37 _C	6,85 _B	6,37 _C	7,50 _A	7,70 _A
Total agliconas	5,60	6,13	6,37	6,85	6,37	7,50	7,70
Total	161,84 _A	156,58 _B	157,33 _B	154,66 _C	159,02 _A	157,33 _B	153,75 _C

Teste de Tukey 5 % com CV= 2,1 %. Média das triplicatas seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma linha ($p \geq 0,05$).

5.3 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

O trabalho intitulado “Testes preliminares com bagaço de cana-de-açúcar para imobilização de beta-glicosidase de cotilédones de soja” e “Interferência de lipídios na determinação de atividade de beta-glicosidase de soja obtida por ultrafiltração” foi apresentado no III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia - Londrina/PR em agosto de 2013.

O trabalho intitulado “Eficiência da ultrafiltração e precipitação fracionada para obtenção de β -glicosidase de soja parcialmente purificada” foi apresentado no 3º CPCB – Congresso Paranaense de Ciências Biomédicas – Londrina-PR em setembro de 2013.

O trabalho intitulado “Immobilized soybean β -glucosidase application in commercial soy drink” foi apresentado no ICSU - AMERICAS: International Conference on Soybean Utilization – Bento Gonçalves-RS em outubro de 2013.

O trabalho intitulado “Immobilization efficiency of soybean β -glucosidase on activated chitosan with 2.5 % glutaraldehyde” e Thermal stability and operational of immobilized soybean β -glucosidase on activated chitosan with glutaraldehyde” foi apresentado no 10º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - Campinas/SP em novembro de 2013.

Testes Preliminares com Bagaço de Cana-de-açúcar para Imobilização de beta-glicosidase de Cotilédones de Soja



Amanda Aleixo Moreira¹, Maria Fernanda Ferreira Lima de Mauro¹, Ana Camila Vaitkevicius Ferreira¹, Ellen Cristine Duarte Garcia¹, Geni da Silva Varéa¹, Mara Lúcia Luiz Ribeiro¹

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/Uel, Londrina – PR, email: maraluciaribeiro@uel.br

INTRODUÇÃO

A beta-glicosidase (beta-D-glicosídeo-glicohidrolase, EC 3.2.1.21) pertence a um grupo de hidrolases capazes de clivar as ligações beta-glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos. Esta enzima, amplamente distribuída na natureza, tem papel fundamental em muitos processos biológicos como a degradação de biomassa celulósica, hidrólise de glicolídeos e modificação de metabólitos secundários, como as isoflavonas. Entretanto, apresenta alto custo e dificuldade de recuperação da forma solúvel. Por isso, a imobilização de enzimas é uma alternativa para sua reutilização e redução de custos em processos industriais. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado como suporte por ser atóxico, além disso, é um importante recurso, devido preocupação com as questões ambientais e por apresentar redução de custos do processo.

OBJETIVO

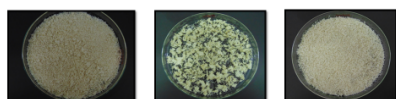
Avaliar o bagaço de cana submetido a tratamentos químicos e térmico para imobilização de beta-glicosidase de cotilédones de soja.

MATERIAL E MÉTODOS

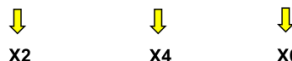
Tratamento Bagaço de Cana-de-açúcar



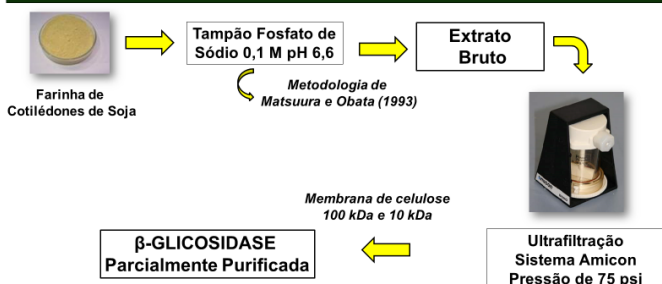
Tratamentos
 X1- Lavado com água a 60 °C
 X3- NaOH 0,5 M, 120 rpm por 24 h + Autoclave*
 X5- Etanol 70% + Autoclave*



Ativados com Glutaraldeído 2,5% por 30 min a 25 °C

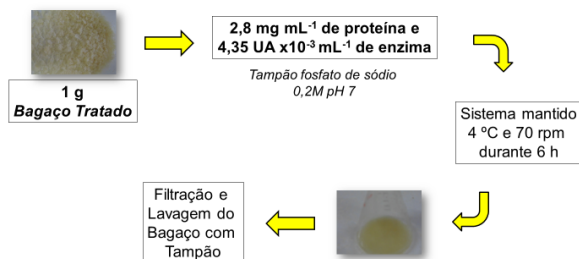


Obtenção de Beta-glicosidase



Determinação de atividade de beta-glicosidase com p-NPG (MATSUURA e OBATA 1993) e teor de proteínas solúveis (LOWRY et al., 1951)

Imobilização de Beta-glicosidase



$$\text{Rendimento de imobilização\%} = \frac{\text{atividade da enzima imobilizada}}{\text{atividade da enzima livre}} \times 100$$

Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) e teste de tukey ($p \leq 0,05$) dos resultados foram avaliados no programa Estatística 7.0.

RESULTADOS

Os rendimentos de imobilização de beta-glicosidase de cotilédones de soja em bagaços de cana submetidos a tratamentos químicos e térmico variaram de 48,5% a 76,1% (Tabela 1).

Tabela 1- Rendimento de imobilização de beta-glicosidase de cotilédones de soja em bagaços de cana submetidos a tratamentos químicos e térmico.

Tratamentos*	Proteína Imobilizada (mg)	**UA Imobilizada ($\times 10^{-3}$)	***AE ($\times 10^{-3}$)	Rendimento Imobilização (%)
X1	0,87 _D	2,11 _C	2,43	48,5
X2	1,44 _A	2,97 _{AB}	2,06	68,3
X3	0,93 _D	2,60 _{BC}	2,80	59,8
X4	1,24 _B	3,31 _A	2,66	76,1
X5	0,97 _{CD}	2,14 _C	2,20	49,2
X6	1,13 _{BC}	2,53 _{BC}	2,23	58,2

Extrato contendo Enzima Livre: 2,8 mg mL⁻¹ proteína, 4,35 x 10⁻³ UA mL⁻¹ e 1,55 x 10⁻³ AE.
 CV= 6,14% e teste de Tukey 5% com média de proteína imobilizada e UA imobilizada, seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ($p \leq 0,05$).
 *X1: bagaço de cana, (X2) bagaço de cana ativado com glutaraldeído, (X3) bagaço de cana tratado com NaOH e autoclavado, (X4) bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído, (X5), bagaço de cana tratado com etanol 70% e autoclavado (X6) bagaço de cana tratado com etano 70%, autoclavado e ativado com glutaraldeído em três repetições. Autoclavagem: 15 min a 121°C.
 **UA = μ mol de p-nitrofenol liberado por minuto de reação nas condições do ensaio.
 ***AE = Atividade Específica (UA/mg de proteínas).

CONCLUSÃO

Os tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar que resultaram em maior rendimento de imobilização de beta-glicosidase de soja foram o alcalino associado ao térmico, seguido de ativação do suporte tratado com glutaraldeído. O tratamento alcoólico do bagaço de cana não foi efetivo para aumento de rendimento de imobilização da enzima.

REFERÊNCIAS

- ESEN, A. **beta-glicosidase**. In: Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker Inc., 2003.
 GUISAN, J.M. Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Guisan JM editor. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, p. 1-13, 2006.
 LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**, New York. Chapman & Hall, 537 p, 1997.
 LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
 MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glicosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
 PIRES, A. J. V.; REIS, R. A.; CARVALHO, G. G. P.; SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 953-957, 2006.
 RESHMI, R.; SUGUNAN, S. Improved biochemical characteristics of crosslinked β -glicosidase on nanoporous silica foams. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, n. 86, p. 111-118, 2013.

Interferência de Lipídios na Determinação de Atividade de beta-glicosidase de Soja Obtida por Ultrafiltração



Amanda Aleixo Moreira¹, Maria Fernanda Ferreira Lima de Mauro¹, Ana Camila Vaitkevicius Ferreira¹, Ellen Cristine Duarte Garcia¹, Mara Lúcia Luiz Ribeiro¹

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UUEL, Londrina – PR, email: maraluciaribeiro@uel.br

INTRODUÇÃO

As beta-glicosidases hidrolisam as isoflavonas beta-glicosídicas presentes na soja (genistina, daidzina e glicetina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliceteína) que apresentam maior atividade biológica e efeitos benéficos à saúde humana. Considerando que a soja apresenta 2% de agliconas, é relevante sua aplicação em produtos de soja para obtenção de alimentos derivados com elevado teor de agliconas. Técnicas para separação de proteínas em meio aquoso como a ultrafiltração, que utiliza membranas com porosidade controlada, e precipitação fracionada com adição de sulfato de amônio podem ser utilizadas no processo de purificação destas enzimas.

OBJETIVO

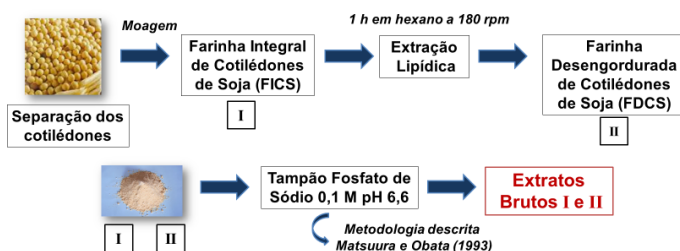
O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência da ultrafiltração e precipitação fracionada com sulfato de amônio na obtenção de beta-glicosidase de cotilédones de soja parcialmente purificada.

MATERIAL E MÉTODOS

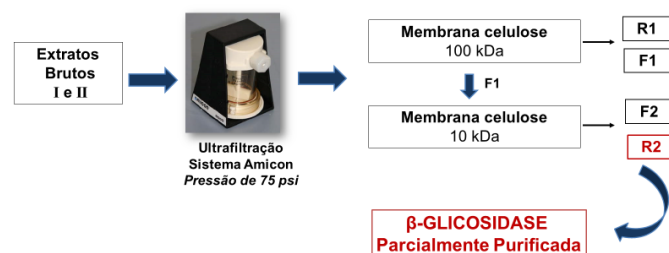
MATÉRIA PRIMA

Grãos da cultivar de soja BRS 213 fornecidos pela EMBRAPA/Soja.

Extração β -glicosidase de Cotilédones de Soja

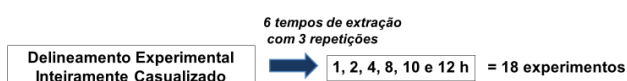


Purificação Parcial de beta-glicosidase por Ultrafiltração



FRAÇÕES: Determinação de atividade de beta-glicosidase com p-NPG (MATSUURA e OBATA 1993) e teor de proteínas solúveis (LOWRY et al., 1951)

Padronização do Tempo de Extração Lipídica



Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) e teste de tukey ($p \leq 0,05$) dos resultados foram avaliados no programa *Statística 7.0*.

RESULTADOS

As atividades de beta-glicosidase e teor de proteínas das frações obtidas na ultrafiltração de extratos de FICS e FDCS podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1- Atividade de beta-glicosidase e teor de proteínas das frações obtidas na ultrafiltração de extratos de farinha integral de cotilédones de soja (FICS) e farinha desengordurada de cotilédones de soja (FDCS) em membranas de celulose de 100 kDa e 10 kDa.

Amostra	Frações	Proteína		β -glicosidase	
		Mg	Atividade* (UA)	AE** ($\times 10^{-3}$)	Grau de Purificação***
FICS	EB	879,0 _A	0,54 _A	0,61 _A	1,00
	R ₂	101,5 _b	0,02 _b	0,20 _b	0,33
FDCS	EB	875,8 _A	0,50 _A	0,57 _A	1,00
	R ₂	237,3 _a	0,15 _a	0,63 _a	1,11

CV=5,04 e teste de Tukey 5%
Médias dos EB (extrato Bruto) com letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ($p \leq 0,05$).

Médias dos R2 (massa molar entre 10 kDa e 100 kDa) com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ($p \leq 0,05$).

*UA= μ mol de p-nitrofenol liberado por minuto de reação nas condições do ensaio

**AE= Atividade Específica (UA/mg de proteínas)

***Grau de purificação= (AE do R2/AE do EB)

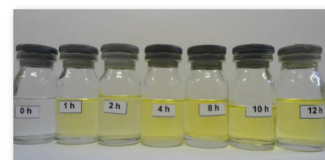
Como a atividade específica de beta-glicosidase foi superior para o extrato de FDCS, foi pesquisado o melhor tempo de extração a frio de lipídios utilizando um delineamento experimental inteiramente casualizado (Tabela 2).

Tabela 2- Atividade de beta-glicosidase e teor de proteínas em farinha desengordurada de cotilédones de soja (FDCS) em diferentes tempos de extração a frio de lipídios.

Extração de Lipídios (h)	Atividade ¹ UA mL ⁻¹ ($\times 10^{-3}$)	Proteína (mg mL ⁻¹)	Atividade Específica ($\times 10^{-3}$)
0	1,14 c	1,81 a	0,63
1	1,38 b	2,10 a	0,66
2	1,42 b	1,93 a	0,74
4	1,57 a	2,31 a	0,68
8	1,62 a	2,05 a	0,79
10	1,42 b	2,29 a	0,62
12	1,10 c	2,23 a	0,49

Na figura 1 pode ser observada a coloração do hexano após a extração lipídica.

Figura 1- Hexano após a extração lipídica de cada tempo.



CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

- PALMERI, R.; SPAGNA, G. Beta-Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 382-389, 2007.
- SHKINEV, V. M.; DZHERAYAN, T. G.; KARANDASHEV, V. K.; ARAKCHAA, K. D.; SPIVAKOV, B. Y. Membrane Filtration for the Continuous Fractionation of Species and Macromolecules. Component Distribution in the Arzhaan Spring Water. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 55, n. 2, p. 135-141, 2000.
- LIU, K. *Soybeans: chemistry, technology and utilization*, New York. Chapman & Hall, 537 p, 1997.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.



EFICIÊNCIA DA ULTRAFILTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO FRAZIONADA PARA OBTENÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA PARCIALMENTE PURIFICADA

Amanda Aleixo Moreira¹, Maria Fernanda Ferreira Lima de Mauro¹, Ana Camila Vaitkevicius Ferreira¹, Ellen Cristine Duarte Garcia¹, Mara Lúcia Luiz Ribeiro¹

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL, Londrina – PR, email: maraluciaribeiro@uel.br

INTRODUÇÃO

As β -glicosidases hidrolisam as isoflavonas β -glicosídicas presentes na soja (genistina, daidzina e gliciteína) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam maior atividade biológica e efeitos benéficos à saúde humana. Considerando que a soja apresenta 2% de agliconas, é relevante sua aplicação em produtos de soja para obtenção de alimentos derivados com elevado teor de agliconas. Técnicas para separação de proteínas em meio aquoso como a ultrafiltração, que utiliza membranas com porosidade controlada, e precipitação fracionada com adição de sulfato de amônio podem ser utilizadas no processo de purificação destas enzimas.

OBJETIVO

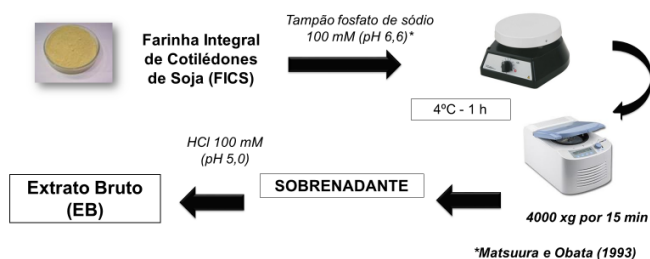
O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência da ultrafiltração e precipitação fracionada com sulfato de amônio na obtenção de β -glicosidase de cotilédones de soja parcialmente purificada.

MATERIAL E MÉTODOS

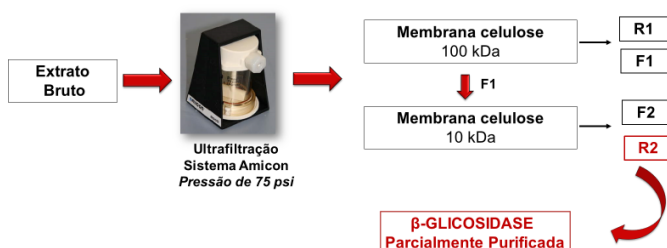
MATÉRIA PRIMA

Grãos da cultivar de soja BRS 213 fornecidos pela EMBRAPA/Soja.

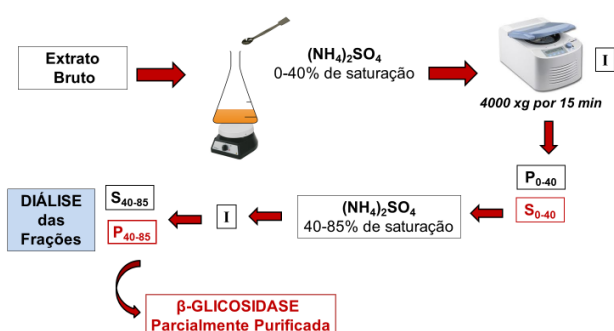
Extração β -glicosidase de Cotilédones de Soja



Purificação Parcial de β -glicosidase por Ultrafiltração



Purificação Parcial de β -glicosidase por Precipitação



Métodos Analíticos

Atividade de β -glicosidase → Segundo Matsuura e Obata (1993) utilizando substrato sintético p-NPG

Proteínas solúveis → Segundo Lowry et al. (1951) Utilizando padrão de BSA

Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) e teste de tukey ($p < 0,05$) dos resultados foram avaliados no programa Statística 7.0. Todas as etapas dos procedimentos foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS

A eficiência da ultrafiltração e precipitação fracionada com sulfato de amônio na obtenção de β -glicosidase de cotilédones de soja parcialmente purificada podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1- Eficiência da ultrafiltração e precipitação fracionada com sulfato de amônio na obtenção de β -glicosidase de cotilédones de soja parcialmente purificada.

Métodos	Frações	Proteína		β -glicosidase	
		mg	Atividade* (UA)	AE** ($\times 10^{-3}$)	Eficiência*** (%)
Ultrafiltração	EB	1489,5 _A	2,88 _A	1,93 _A	24
	R ₂	615,5 _a	0,69 _b	1,12 _b	
Precipitação	EB	1500,4 _A	3,04 _A	2,03 _A	77
	P _{40-85%}	263,0 _b	2,34 _a	8,90 _a	

CV= 6,50 e teste de Tukey 5%

Médias dos EB (extrato Bruto) com letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ($p < 0,05$).

Médias do R₂ e P_{40-85%} com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ($p < 0,05$).

R₂= Massa molar entre 10 kDa e 100 kDa

P_{40-85%}= Saturação de 85% das proteínas

*UA= μ mol de p-nitrofenol liberado por minuto de reação nas condições do ensaio

**AE= Atividade Específica (UA/mg de proteínas)

***Eficiência= (UA final/UA inicial EB $\times 100$)

CONCLUSÃO

A precipitação fracionada com sulfato de amônio foi o método mais eficiente para obtenção de β -glicosidase de soja parcialmente purificada.

REFERÊNCIAS

- LIU, K. Soybeans: chemistry, technology and utilization, New York. Chapman & Hall, 537 p, 1997.
 LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, v. 193, p. 265–275, 1951.
 MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glicosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*, v. 58, n. 1, p. 144–147, 1993.
 PALMERI, R.; SPAGNA, G. Beta-Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 382–389, 2007.
 RIBEIRO, M. L. L. Teor de isoflavonas e atividade de β -glicosidase em grãos de soja germinada e de diferentes grupos de maturação. *Purificação e caracterização bioquímica parcial da β -glicosidase*. 2006. 115f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
 SHKINEV, V. M.; DZHERAYAN, T. G.; KARANDASHEV, V. K.; ARAKCHAA, K. D.; SPIVAKOV, B. Y. Membrane Filtration for the Continuous Fractionation of Species and Macromolecules: Component Distribution in the Arzhan Spring Water. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 55, n. 2, p. 135–141, 2000.

Agradecimentos:





Immobilized soybean β -glucosidase application in commercial soy drink

Luciana C. Grade¹, Amanda A. Moreira¹, Geni S. Varea¹, José Marcos G. Mandarino²,
Josemeyre B. Silva³, Elza I. Ida³, Mara Lúcia L. Ribeiro^{1,*}

ICSU 2013



Mestrado em
Biotecnologia

¹Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Campus Universitário, Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil. ²Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, Acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta, Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, Paraná, Brasil. ³Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campus Universitário, Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil. *Correspondent author Email: maraluciaribeiro@uel.br

Abstract

The objective of this study was to apply β -glucosidase immobilized on commercial soy drink to evaluate the bioconversion of β -glycosidic isoflavones in aglycones. The β -glucosidase was obtained from soybean cultivar BRS 213 and immobilized in chitosan beads activated with 2.5% glutaraldehyde. Two chitosan beads containing immobilized β -glucosidase were incubated with 1 mL of commercial soy drink from 0 to 60 min, pH 5.5 and at 50°C. The isoflavones content were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The initial content of aglycones in commercial soy drink was 32.20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. After 60 min of immobilized enzyme application in the beverage it was observed an increase of 24% in the aglycones content probably due to the action of β -glucosidase which convert β -glycosides into aglycones. Therefore, application of β -glucosidase immobilized on chitosan in commercial soy drink was advantageous because the enzyme acted effectively in the bioconversion of isoflavones increasing the content of aglycones.

Introduction

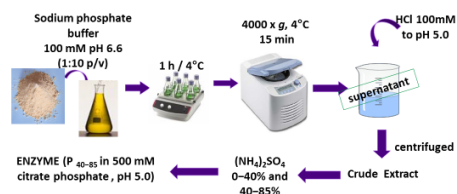
β -glucosidases (β -D-glucopyranoside glucohydrolases, E.C. 3.2.1.21) are enzymes that hydrolyzes β -glycosidic bonds to release glucose and hydrolyzes isoflavones to release aglycones. Soy isoflavones have biological properties associated with risk reduction or prevention of various chronic diseases. Aglycones forms exhibit higher biological activity and greater absorption properties than β -glycosides (Izumi et al., 2000). However, soy contains 2% of the aglycones in relation of the total isoflavones. Thus, application of endogenous β -glucosidase immobilized can be an alternative to promote the bioconversion of the β -glycosidic isoflavones to produce soy products with higher aglycones content. The immobilization of soybean β -glucosidase and its application has not been described.

Lately, immobilized enzymes have been developed in food industry for multiple utilization of enzymes to reduce operational costs (Chen et al., 2013). Chitosan is a suitable matrix for the enzymes immobilization because is biocompatible, available in various forms (gel, membrane, fiber and film), nontoxic, biodegradable, and resistant to chemical modifications (Gomathi et al., 2010; Yi et al., 2009). Therefore, chitosan has potential for application as biomaterial (Arnaud et al., 2010).

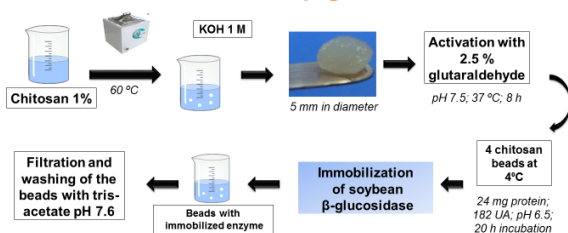
The objective of this study was to apply β -glucosidase immobilized in chitosan on commercial drink soy to evaluate the bioconversion of β -glycosidic isoflavones in aglycones.

Material and Methods

Extraction and Fractionation of β -glucosidase



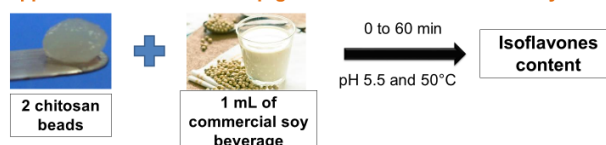
Immobilization of β -glucosidase



β -glucosidase activity and Isoflavones content determination

β -glucosidase activity was determined using p-NPG substrate according to the procedures described by Matsuura and Obata (1993). The isoflavones were extracted according to Carrão-Panizzi et al. (2002) and quantified by the method of Berhow (2002) using a liquid chromatograph (HPLC).

Application of immobilized β -glucosidase in commercial soy drink



Results and Discussion

β -glucosidase immobilized on chitosan beads activated with 2.5% glutaraldehyde was added to commercial soy drink and the isoflavones content were quantified (Table 1).

Table 1. Isoflavones content ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in commercial soy drink with the application of soybean β -glucosidase immobilized on chitosan beads activated with 2.5% glutaraldehyde*.

Incubation time (min)	β -Glycosides	Malonyl-glycosides	Aglycones
0	109.30a	27.90bc	32.20d
15	100.20c	27.50c	31.70d
30	102.40b	29.30 ^a	35.30bc
45	98.20d	29.20 ^a	36.10b
60	88.70g	26.10d	40.00a

*values obtained are an average of two repeats. Means followed by equal letters in the same column do not differ by Tukey's test at 5% probability.

After 60 min incubation with β -glucosidase, it was observed an increase of 24% in the aglycones content probably due the β -glucosidase activity that bioconverted the β -glucosides forms in aglycones. The β -glucosides and malonyl-glycosides contents decreased 18.8% and 6.4% respectively. Thus, addition of immobilized β -glucosidase to commercial soy drink was efficient to increase the aglycones content.

No reports about soybean β -glucosidase immobilization on chitosan beads and its addition to soy drinks were found.

Conclusion

Application of soybean β -glucosidase immobilized on chitosan beads activated with 2.5% glutaraldehyde and incubated for 60 min was effective for isoflavones bioconversion in commercial soy drink increasing the aglycones content.

Referências

- Arnaud, T.M.S., Barros-Neto, B., Diniz, F.B. J. *Den.*, 38, 848-852, 2010.
Berhow, M.A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B.S.; MANTHEY, J.A. (ed.). *Flavonoids in the living cell*. New York: Kluser Academic, 2002, 61-76.
Chen, K.L., Lo, Y.C., Su, N.W., Chou, C.C., Cheng, K.C. *J. Agr. Food Chem.*, 60, 51, 12540-12546, 2013.
Gomathi, P., Ragupathy, D., Choi, J. H., Yeum, J. H., Lee, S. C., Kim, J. C., Lee, S. H., Ghim, H. D. *ens. Actuators B*, doi: 10.1016/j.snb.2010.10.005, 2010.
Izumi, T., Piskula, M.K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., Kikuchi, M. *J.Nutrition*, 130, 1695-1699, 2000.
Matsuura, M., Obata, A. *J. Food Sci.*, 58, 1, 144-147, 1993.
Yi, S., Noh, J., Lee, Y. A. *J Mol. Catalysis B: Enz.*, 57, 123-129, 2009.

Agradecimentos



Code
9872

Immobilization efficiency of soybean β -glucosidase on activated chitosan with 2.5 % glutaraldehyde

Amanda Aleixo Moreira¹, Luciana Carvalho Grade¹, Geni da Silva Vará¹, Josemyre Bonifácio da Silva², Elza Louko Ida², Mara Lúcia Luiz Ribeiro¹



¹Biochemistry and Biotechnology Department/CCE/Uel, Londrina – PR, email: maraluciaribeiro@uel.br

²Food Science and Technology Department /CCA/Uel, Londrina - PR

INTRODUCTION

Immobilization of enzymes enable the industrial application, and the matrix used have be renewable and non toxic as the chitosan. β -glucosidases hydrolyze β -glucosides isoflavones (genistein, daidzein and glycitin) and release aglycones (genistein, daidzein and glycitein) that have beneficial effects on human health. The immobilized soybean β -glucosides can be applied in non fermented soy products producing functional foods with high content of aglycones.

OBJECTIVE

The aim of this study was evaluate the immobilization efficiency of soybean β -glucosidase on activated chitosan with 2.5 % glutaraldehyde.

MATERIALS AND METHODS

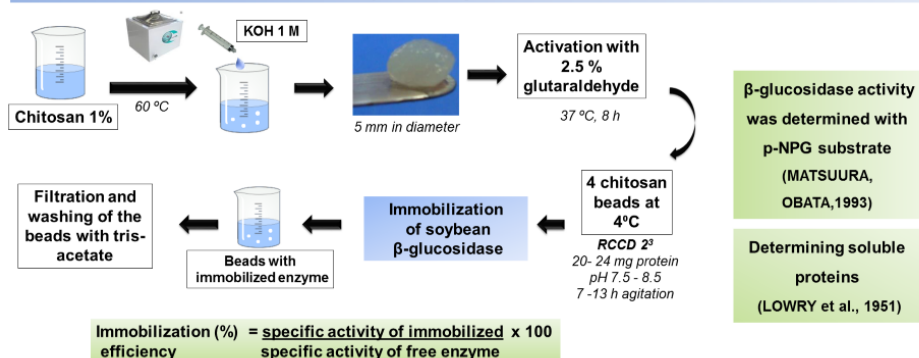
Central Composite Rotational Design (RCCD) 2³

Table 1- Experimental matrix for the central Composite Rotational Design (RCCD) 2³

Run	Time (h)	pH	Protein (mg)	Time (h)	pH	Protein (mg)
1	-1	-1	-1	7/13	5.5	9.52
2	-1	-1	1	7/13	5.5	20.24
3	-1	1	-1	7/13	7.5	9.52
4	-1	1	1	7/13	7.5	20.24
5	1	-1	-1	13/7	5.5	9.52
6	1	-1	1	13/7	5.5	20.24
7	1	1	-1	13/7	7.5	9.52
8	1	1	1	13/7	7.5	20.24
9	-1.68	0	0	0/20	6.5	14.88
10	1.68	0	0	20/0	6.5	14.88
11	0	-1.68	0	10/10	5.5	14.88
12	0	1.68	0	10/10	8.5	14.88
13	0	0	-1.68	10/10	6.5	5.95
14	0	0	1.68	10/10	6.5	23.81
15	0	0	0	10/10	6.5	14.88
16	0	0	0	10/10	6.5	14.88
17	0	0	0	10/10	6.5	14.88

*Time (h) shaking time / rest time during immobilization of the enzyme

Activation of chitosan with 2.5 % glutaraldehyde for immobilization of soybean β -glucosidase



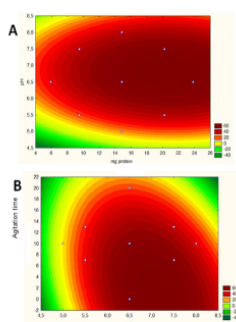
RESULTS AND DISCUSSION

Table 2- β -glucosidase immobilized on the chitosan beads four RCCD 2³

Run	Time (h)	pH	Protein (mg)	Immobilization (%)	\hat{y}	\hat{y}
1	7/13	5.5	9.52	10.59	6.82	
2	7/13	5.5	20.24	22.70	24.86	
3	7/13	7.5	9.52	32.66	30.42	
4	7/13	7.5	20.24	39.10	30.78	
5	13/7	5.5	9.52	12.19	11.00	
6	13/7	5.5	20.24	32.56	29.04	
7	13/7	7.5	9.52	41.55	34.60	
8	13/7	7.5	20.24	32.28	34.96	
9	0/20	6.5	14.88	3.62	9.51	
10	20/0	6.5	14.88	23.39	24.97	
11	10/10	5	14.88	11.88	13.08	
12	10/10	8	14.88	31.64	37.88	
13	10/10	6.5	5.95	25.03	29.73	
14	10/10	6.5	23.81	33.99	36.75	
15	10/10	6.5	14.88	24.92	25.48	
16	10/10	6.5	14.88	26.06	25.48	
17	10/10	6.5	14.88	26.78	25.48	

* \hat{y} (experimental response) and \hat{y} (estimated response) of RCCD

Figure 1- Contour curves for the effect of pH, protein content and time of agitation on the rate of immobilization of β -glucosidase on chitosan



According to regression parameters and analysis of variance, the variables evaluated showed a significant linear positive effect at a 5 % significance level on the immobilization efficiency.

The highest immobilization efficiency (%) of soybean β -glucosidase on chitosan beads activated with 2.5% glutaraldehyde was obtained with 20- 24 mg protein per 4 chitosan beads at pH 7.5 - 8.5 and coupling time of enzyme-matrix of 7 h agitation and 13 h time out at 4 °C.

$$\hat{Y} = 54,62 + 9,34 \times 1 - 3,71 \times 1^2 + 8,01 \times 2 - 11,02 \times 2^2 - 10,32 \times 3$$

$$R^2 = 0.77316$$

CONCLUSIONS

The immobilization efficiency was 20 times higher when compared with the enzyme on no acitvated chitosan with glutaraldehyde.

REFERENCES

- CHANG, M.; JUANG, R. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. *Biochemical Engineering Journal*, v.35, p. 93-98, 2007.
 ESEN, A. **β -glucosidase**. In: Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. *Handbook of Food Enzymology*. New York: Marcel Dekker, 2003. 1108p.
 FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits. *Food Reviews International*, v.20, n. 1, pp.51-75, 2004.
 LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
 MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.

Code
9836

Thermal stability and operational of immobilized soybean β -glucosidase on activated chitosan with glutaraldehyde

Luciana Carvalho Grade¹, Amanda Aleixo Moreira¹, Geni da Silva Varéa¹, Josemeyre Bonifácio da Silva², Elza Iouko Ida², Mara Lúcia Luiz Ribeiro¹



¹Biochemistry and Biotechnology Department/CCE/UEL, Londrina – PR, email: maraluciaribeiro@uel.br

²Food Science and Technology Department /CCA/UEL, Londrina - PR

INTRODUCTION

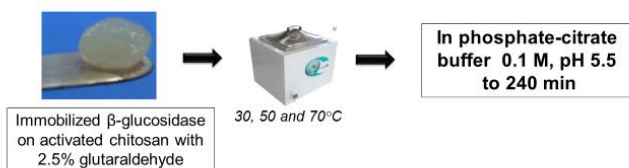
Studies on thermal stability and operational immobilized enzymes are essential for its application in food industry, considering the processing conditions. The application of immobilized in non fermented soy products is promising. The β -glucosidase hydrolyzes β -glucosides isoflavones in aglycones, increasing its level. Aglycones are associated with beneficial actions on human health.

OBJECTIVE

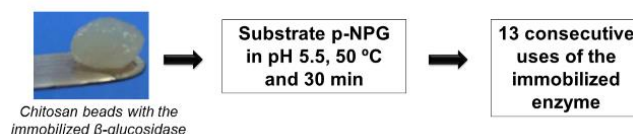
The objective of this study was to evaluate the thermal stability and operational immobilized β -glucosidase on activated chitosan with 2.5% glutaraldehyde.

MATERIALS AND METHODS

Thermal Stability of immobilized β -glucosidase



Operational Stability of immobilized β -glucosidase



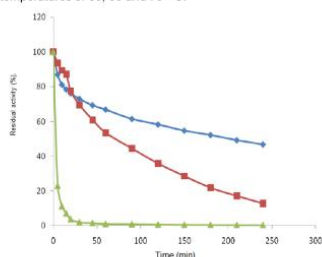
Analytical Methods

β -glucosidase activity with p-NPG substrate (MATSUURA, OBATA, 1993)

Determining soluble proteins (LOWRY et al., 1951)

RESULTS AND DISCUSSION

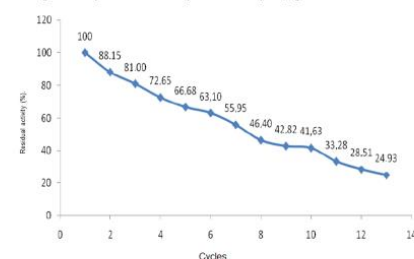
Figure 1- Stability of β -glucosidase under optimal conditions of pH and temperatures of 30, 50 and 70 °C.



The immobilized β -glucosidase presented a half-life of 1 h at 50°C and 3 h at 30°C. At 70°C, the immobilized enzyme showed a reduction of 77% of activity after 5 min of incubation (Figure 1). Reduction in activity of the immobilized enzyme were lower than for the free enzyme. At 50°C, β -glucosidase free lost 91% of activity after 20 min incubation while immobilized lost 87% after 4 h of incubation.

After 13 cycles of reuse of the immobilized enzyme was observed 75% of reduction of activity and half-life was approximately 7 cycles (Figure 2).

Figure 2- Operational stability in the activity of β -glucosidase immobilized



CONCLUSIONS

The reuse of the free enzyme is not possible and these results show that the immobilization process resulted thermal stability and operational to the β -glucosidase.

REFERENCES

- BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, G. D. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.877–882, 2006.
- CHANG, M.; JUANG, R. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase. *Biochemical Engineering Journal*, v.35, p.93-98, 2007.
- ESEN, A. β -glucosidase. In: Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. Handbook of Food Enzymology. New York: Marcel Dekker, 2003. 1108p.
- FARAJ, A.; VASANTHAN, T. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits. *Food Reviews International*, v.20, n.1, pp.51–75, 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.

6 CONCLUSÕES

A imobilização de β -glicosidase de cotilédones de soja em bagaço de cana-de-açúcar tratado apresentou efeitos lineares e quadráticos significativos, indicando que o máximo rendimento de imobilização foi obtido com 1 mg de proteína mL⁻¹, pH 7, 110 rpm em 8 horas de incubação com glutaraldeído 2,5 %. A região ótima para o rendimento de imobilização foi estimada em tempo de incubação de 6 a 12 h e concentração de glutaraldeído de 1 a 3 %.

Na imobilização em alginato de sódio as cápsulas produzidas apresentaram rendimentos de imobilização superiores às esferas, sendo estes otimizados com 1 mg de proteína mL⁻¹, glutaraldeído 0,075 % em pH 5 e CaCl₂ 50 mM por delineamentos estatísticos apresentando efeitos lineares e quadráticos significativos, com região ótima de rendimento de imobilização de β -glicosidase em cápsulas de alginato de sódio em pH 4,5 a 6 e concentração de CaCl₂ de 20 a 60 mM.

Os rendimentos de imobilização observados nos dois suportes foram elevados e as análises de MEV e FTIR apresentaram modificação da estrutura dos suportes pelos tratamentos e confirmaram a imobilização de β -glicosidase. O pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 50 °C para atividade de β -glicosidase foram os mesmos da enzima livre. A estabilidade térmica de β -glicosidase imobilizada foi superior à livre, sendo maior para a imobilizada em bagaço de cana e a imobilização reduziu a afinidade da enzima pelo substrato (p-NPG). A β -glicosidase imobilizada em bagaço de cana apresentou 4 reutilizações, sem perda drástica de atividade e a imobilizada em cápsulas de alginato de sódio apresentou 2 reutilizações. A aplicação da enzima de soja imobilizada em bagaço de cana e cápsulas de alginato no extrato comercial de soja foi eficiente para aumentar as isoflavonas agliconas.