

LÍLIAN DA SILVA FIALHO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
 α -GALACTOSIDASE EM SEMENTES DE *Tachigali multijuga* E
CLONAGEM PARCIAL DO GENE DA ESTAQUIOSE SINTASE DE
SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F438p
2007

Fialho, Lílian da Silva, 1979-

Purificação e caracterização de uma α -galactosidase em sementes de *Tachigali multijuga* e clonagem parcial do gene da estaquiose sintase de soja / Lílian da Silva Fialho. – Viçosa, MG, 2007.

xii, 140f. : il. ; 29cm.

Orientador: Sebastião Tavares de Rezende.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. α -galactosidase - Cinética. 2. *Tachigali multijuga* - Semente. 3. Hidrólise. 4. Enzimas - Aplicações industriais. 5. Soja. 6. Estaquiose. 7. Clonagem molecular. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.7

LÍLIAN DA SILVA FIALHO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
 α -GALACTOSIDASE EM SEMENTES DE *Tachigali multijuga*
E CLONAGEM PARCIAL DO GENE DA ESTAQUIOSE
SINTASE DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de agosto de 2007

Prof. Ieso de Miranda Castro

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof. Eduardo E. de Lima e Borges

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Presidente da banca)

À Deus,

Aos meus pais, José Luiz e Nely,

Ao Marcelo.

Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo, e os rios não te submergirão;
Se caminhares pelo fogo, não te queimarás, e a chama não te consumirá.
Pois eu sou o Senhor, teu Deus, o Santo de Israel, teu Salvador.

Isaías 43, 2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus e a Nossa Senhora por ter me dado esta oportunidade e por iluminar minha vida sempre.

À minha família, principalmente meu pai José Luiz que contribuiu para que eu chegasse até aqui.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos Laboratórios de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, de Análises Bioquímicas e de Sequenciamento e Análise de Fragmentos de DNA do BIOAGRO, onde o meu trabalho foi realizado.

Ao meu orientador, prof. Sebastião, pela oportunidade de aprendizado concedida, pela confiança e apoio e principalmente pelo companheirismo durante todo o trabalho e por ter contribuído para o meu crescimento intelectual e profissional.

Ao prof. Everaldo, pelo apoio, confiança e ajuda na realização deste trabalho.

Ao prof. Eduardo Borges, por ter dado todo apoio necessário no início deste trabalho.

Aos professores Maurílio, Luciano e Valéria por toda a contribuição concedida.

Às estagiárias Dayanny e Daniela por toda a ajuda e contribuição para a realização deste trabalho.

À Angélica pela amizade e ajuda necessária para superar os momentos difíceis.

A todos os amigos e amigas dos laboratórios pelo apoio, amizade e companheirismo.

A todos os funcionários pela amizade, atenção e presteza.

Ao Marcelo, pelo companheirismo, amizade, apoio e amor concedidos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LÍLIAN DA SILVA FIALHO, filha de José Luiz Fialho e Nely da Silva Fialho, nasceu em 28 de novembro de 1979, em Ponte Nova, MG.

Realizou seus estudos básicos em Pedra do Anta, MG.

Em março de 1998, iniciou o curso de graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, MG, concluindo o Bacharelado em setembro de 2002.

Em setembro de 2002, ingressou no Programa Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, mudando de nível para doutorado, em janeiro de 2004, na Universidade Federal de Viçosa, MG, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Doctor Scientiae*, em agosto de 2007, com defesa de tese.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. α -Galactosidases	5
2.2. α -Galactosidases de planta	6
2.3. Mecanismo de ação das α -galactosidases	8
2.4. Estrutura tridimensional da α -galactosidase	11
2.5. Galactooligossacarídeos (GO) em sementes de leguminosas	12
2.6. Papel fisiológico dos galactooligossacarídeos	14
2.7. Biossíntese dos galactooligossacarídeos	16
2.8. Hidrólise enzimática dos galactooligossacarídeos	19
2.9. Utilização das α -galactosidases em processos industriais	21
2.10. Variedades de soja com reduzido conteúdo de galactooligossacarídeos	22
2.11. Estaquiase sintase	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

CAPÍTULO 1

Purificação e caracterização cinética de uma α -galactosidase em sementes de *Tachigali multijuga* Benth

RESUMO	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

CAPÍTULO 2

Isolamento e clonagem de um fragmento do gene da estaquiose sintase em sementes de *Glycine max* L. Merrill

RESUMO	105
1. INTRODUÇÃO	106
2. MATERIAL E MÉTODOS	108
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
CONCLUSÕES GERAIS	139

RESUMO

FIALHO, Lílian da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007.
Purificação e caracterização de uma α -galactosidase em sementes de *Tachigali multijuga* e clonagem parcial do gene da estaquiose sintase de soja. Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Co-Orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Maurílio Alves Moreira.

A soja, devido ao seu alto valor nutricional, é mundialmente consumida na forma de óleo, margarinas, proteína texturizada e extrato hidrossolúvel. O extrato hidrossolúvel, conhecido como leite de soja, é uma alternativa alimentar para muitas pessoas com intolerância à lactose. No entanto, a presença dos galactooligossacarídeos (GO) restringe o consumo de soja e seus produtos derivados. A mucosa intestinal do homem e animais monogástricos não possui a enzima α -galactosidase necessária para hidrolisar as ligações α -1,6 dos resíduos de galactose presentes nos GO, desta forma estes oligossacarídeos não são digeridos causando diarreia, náuseas, e flatulência. Como parte de nosso esforço para aumentar o consumo de soja e produtos derivados pelo homem, este trabalho teve dois objetivos: purificar e caracterizar uma α -galactosidase de sementes de *Tachigali multijuga* e avaliar sua capacidade de hidrolisar os GO em leite de soja; e isolar, clonar e seqüenciar parte do gene que codifica a enzima estaquiose sintase (STS) de soja, para ser usada para seu silenciamento por técnicas de engenharia genética. A enzima α -galactosidase foi purificada por precipitação ácida, diálise, cromatografias de troca iônica e filtração em gel. A fração enzimática purificada foi analisada por eletroforese em gel SDS-PAGE e revelou uma única banda protéica com massa molecular de 38 kDa. Atividade máxima da α -galactosidase foi detectada em pH 5,0 - 5,5 a 50 °C. A enzima foi estável no pH 4,5 - 7,0 por 15 min a 40 °C, mas perdeu total atividade no pH 7,0 por 30 min a 40 °C. Cerca de 65 % de atividade original foi mantida após pré-incubação por 200 h a 35 °C. A meia-vida da α -galactosidase a 40 °C foi 17,6 h. A α -galactosidase apresentou especificidade absoluta para galactose ligada em posição α , e ela foi completamente inibida por SDS, Hg²⁺, Cu²⁺ e Ag⁺, e parcialmente inibida por D-galactose e melibiose. Os valores de K_M para hidrólise do pNP α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose foram 0,45; 5,37; 39,62 e 48,80 mM, respectivamente. A α -galactosidase foi inibida competitivamente por

galactose quando o $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ foi usado como substrato, com K_i de 2,74 mM. Os valores de energia de ativação estimados para os substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ e rafinose foram 13,86 e 4,75 kcal/mol, respectivamente. O tratamento da farinha desengordurada de soja com a α -galactosidase purificada de sementes de *Tachigali multijuga* resultou em 72 e 50 % de redução do conteúdo de rafinose e estaquiose, respectivamente, após incubação por 4 h a 40 °C. A enzima apresentou capacidade para hidrolisar goma de alfarroba e goma guar, sugerindo possível aplicação industrial para promover propriedades gélicas em polissacarídeos. A atividade de STS foi determinada durante o desenvolvimento da semente de soja e em sementes maduras. A quantificação de estaquiose foi feita por HPLC. O conteúdo de estaquiose na soja madura foi 4,10 % e a atividade específica da enzima STS foi 2,15 nkat/mg, usando rafinose e galactinol como substratos. Um fragmento do gene *STS* foi isolado por PCR usando cDNA de semente em combinação com *primers* degenerados. A análise do padrão de expressão por RT-PCR mostrou que o gene *STS* é expresso em todos os estádios de desenvolvimento do grão, além de folhas, caule e raiz. A clonagem de um fragmento de 983 pb no vetor *pGEM-T Easy* foi confirmada por seqüenciamento. A identidade do fragmento, usando a ferramenta *BLAST*, confirmou que a seqüência clonada se refere ao gene *STS*, que até então não tinha sido isolada e seqüenciada em soja. Este trabalho abre perspectivas para pesquisas biotecnológicas visando o desenvolvimento de variedades de soja, com reduzido conteúdo de estaquiose e então mais adequadas para o consumo humano.

ABSTRACT

FIALHO, LÍlian da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2007.

Purification and characterization of α -galactosidase from *Tachigali multijuga* seeds and partial cloning of soybean stachyose synthase gene.

Adviser: Sebastião Tavares de Rezende. Co-Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Maurílio Alves Moreira.

Because of its high nutritional value, soybean is worldwide consumed in the forms of oil, margarines, texturized protein and hydrosoluble extract. The hydrosoluble extract, known as soymilk, is also an alternative to dairy food for many lactose-intolerant people. However, the presence of galactooligosaccharides (GO) restricts the consumption of soybean and soy-derived products. The intestinal mucous membrane of humans and monogastric animals lacks the α -galactosidase enzyme that is necessary for the hydrolysis of α -1,6 bonds of galactosil residues present in GO, consequently these oligosaccharides are not digested causing diarrhea, nausea and flatulence. As part of our effort to increase the consumption of soybean and soy-derived products by humans, this work was developed with two goals: to purify and characterize one α -galactosidase from *Tachigali multijuga* seeds and evaluate its capacity for hydrolysing GO in soymilk; and to isolate, clone and sequence part of the gene that encodes the soybean stachyose synthase enzyme (STS), to be used for its silencing by genetic engineering techniques. The α -galactosidase enzyme was purified by acid precipitation, dialysis, ion exchange and gel filtration chromatographies. The purified enzymatic fraction was analyzed by electrophoresis in SDS-PAGE gel revealing only one protein band with estimated molecular mass of 38 kDa. Maximal α -galactosidase activity was detected at pH 5.0 – 5.5 and 50 °C. The enzyme was stable at pH 4.5 - 7.0 at 40 °C for 15 min, but lost its activity after incubation for 30 min at pH 7.0 at 40 °C. About 65 % of original activity was kept after pre-incubation at 35 °C for 200 h. Half-life of the α -galactosidase at 40 °C was 17.6 h. The α -galactosidase showed absolute specificity for galactose linked to the α position, and it was completely inhibited by SDS, Hg²⁺, Cu²⁺ and Ag⁺ and partially inhibited by D-galactose and melibiose. The K_M values for the hydrolysis of pNP α Gal, melibiose, raffinose and stachyose were 0.45, 5.37, 39.62 and 48.80 mM, respectively. The enzyme was inhibited

competitively by galactose when pNP α Gal was used as substrate, with K_i of 2.74 mM. Activation energies estimated for pNP α Gal and raffinose were 13.86 and 4.75 kcal/mol, respectively. The treatment of defatted soybean flour with the α -galactosidase purified from *Tachigali multijuga* seeds resulted in 72 and 50 % of reduction in raffinose and stachyose contents, respectively, after incubation at 40 °C for 4 h. The enzyme showed capacity to hydrolyze the locust bean gum and guar gum, suggesting that it can be used in the industry to improve gelling properties in polysaccharides. STS activity was determined during the development of soybean seed and in mature seeds. Stachyose quantification was carried out by HPLC. Stachyose content in mature soybean seeds was 4.10 % and STS specific activity was 2.15 nkat/mg, using raffinose and galactinol as substrates. A fragment of the STS gene was isolated by PCR using seed cDNA in combination with degenerated primers. The analysis of the expression patterns by RT-PCR showed that the STS gene is expressed in all seed developmental stages, as well as in leaves, stem and roots. The cloning of a 983 base-pair fragment in a pGEM-T Easy vector was confirmed by sequencing. The identity of the fragment, using BLAST analysis, confirmed that the cloned sequence referred to the STS gene, which had not been isolated and sequenced in soybeans until then. This work opens perspectives for biotechnological researches aiming at the development of soybean varieties with reduced stachyose content and therefore more suitable for human consumption.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os grãos de leguminosas são fontes importantes de óleo, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais e são usados em muitas partes do mundo para nutrição animal e humana (SKULINOVA et al., 2002). Dentre as leguminosas mais consumidas, a soja tem-se destacado.

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma espécie pertencente à família das leguminosas e é considerada excelente fonte de proteína para uso na nutrição humana e animal (GUIMARÃES et al., 2001). Os grãos de soja possuem alto conteúdo de lipídeos (15-25 %) e de proteínas (30-45 %), com uma composição de aminoácidos adequada à alimentação animal e humana. Apresentam também, carboidratos (20-35 %) e cerca de 5 % de cinzas (MOREIRA, 1999). Segundo COSTA e MORI (1978), a soja, pelas suas qualidades nutricionais, facilidade de adaptação a quase todas regiões do globo, alta produção e facilidade de cultivo, é considerada por muitos especialistas como um dos alimentos básicos para a população do futuro, por possuir alto valor nutritivo e baixo custo.

A soja constitui um dos produtos de maior importância na economia brasileira, ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, sendo responsável pela produção de mais de 49 milhões de toneladas por ano (VIANA, 2005).

A soja contém em suas proteínas, quantidade suficiente de quase todos os aminoácidos essenciais (COSTA e MIYA, 1972). Segundo BOOKWALTER

(1975), a qualidade nutricional de sua proteína pode ainda ser melhorada pela suplementação com metionina, aminoácido limitante da soja, e, segundo GOMES (1978), esta leguminosa possui considerável teor de minerais, principalmente de cálcio e fósforo, e de vitaminas do complexo B.

Dada a sua composição em nutrientes, a soja pode ser usada no combate à desnutrição, fornecendo energia, proteínas e outros nutrientes essenciais ao organismo, como ferro, potássio, fósforo, lecitina e vitamina E (PAES, 1994). O extrato hidrossolúvel, conhecido como leite de soja é um dos produtos protéicos obtidos de soja. O leite de soja é visto como um substituto de baixo custo para o leite de vaca em países em desenvolvimento e como um suplemento nutritivo para populações com intolerância à lactose (THIPPESWAMY e MULIMANI, 2002).

Apesar das excelentes características da soja, existem fatores que limitam o seu consumo e seus derivados. Dentre esses fatores destacam-se os inibidores de proteases, lectinas, proteínas alergênicas, ácido fítico e galactooligossacarídeos (GO) (SANNI et al., 1997; BELLAVAR e SNIZEK, 1999).

A ingestão de soja por humanos e animais monogástricos pode resultar em flatulência, náuseas, desconforto e diarréia. Os açúcares rafinose [α -D-galactopiranosil-(1,6)- α -D-glicopiranosil- β -D-frutofuranosídeo] e estaquiase [α -D-galactopiranosil-(1,6)- α -D-galactopiranosil-(1,6)- α -D-glicopiranosil- β -D-frutofuranosídeo], são os principais responsáveis por esses sintomas (WAGNER et al., 1976). A ausência da enzima α -galactosidase (EC 3.2.1.22 α -D-galactosil galactohidrolase) no trato intestinal humano e de outros animais monogástricos impede a hidrólise de rafinose, estaquiase e verbascose, oligossacarídeos presentes na soja e em outras leguminosas (STEGGERDA et al., 1966). Os GO não hidrolisados são conduzidos à parte posterior do intestino, onde são fermentados a CO₂, H₂ e CH₄ pela microflora (PRICE et al., 1988).

Desta forma, os GO presentes na soja e outras leguminosas restringem o consumo destes grãos como fonte protéica e de outros nutrientes. No intuito de aumentar a aceitabilidade da soja na alimentação, vários métodos são usados para a redução do teor dos GO. O tratamento enzimático é conseguido por meio da adição das enzimas α -galactosidases ao processamento dos derivados de soja. Essas enzimas hidrolisam as ligações α -1,6 que unem o resíduo de

galactose ao de glicose presentes nos GO, produzindo galactose e sacarose livres, açúcares facilmente hidrolisados e absorvidos (GUIMARÃES et al., 2001).

Neste sentido, várias pesquisas são conduzidas para identificar fontes de α -galactosidases com potencial para aplicações biotecnológicas, principalmente para a redução dos teores de GO em soja e seus derivados. As α -galactosidases de microrganismos são amplamente utilizadas porque são mais susceptíveis para aplicações tecnológicas, principalmente por ter localização extracelular, pH ótimo ácido e estabilidade térmica (VIANA, 2005). No entanto, também há grande interesse por α -galactosidases de plantas, com a finalidade de aplicação em processos industriais.

Outros métodos para a redução do conteúdo de GO em produtos de soja ou outras leguminosas, além da hidrólise enzimática já foram utilizados. Dentre estes, destacam-se técnicas como a hidratação dos grãos (MULYOWIDARSO et al., 1991; ABDEL-GAWAD, 1993; SANNI et al., 1997), cozimento (SILVA e BRAGA, 1982; SAT e KELES, 2002; PUGALENTI et al., 2006), fermentação (SUPARMO, 1987; REHMS e BARZ, 1995), germinação (REDDY e SALUNKHE, 1980; ABDULLAH et al., 1984; YAKLICH, 1985) e, extração dos GO com água (KU et al., 1976) e com etanol (MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2006). Entre estes, o tratamento enzimático tem sido o mais indicado, por sua especificidade e condições brandas de processamento (RUIZ et al., 1995).

Outra alternativa para a eliminação dos GO em soja e em seus derivados é por meio da manipulação genética de plantas, que pode alterar a síntese de um ou mais componentes importantes da via metabólica que conduz à síntese dos GO. Na via de biossíntese dos GO, as principais enzimas envolvidas são a galactinol sintase (EC 2.4.1.123 UDP-galactose: mio-inositol galactosil transferase, GS), rafinose sintase (EC 2.4.1.82 galactinol: sacarose galactosiltransferase, RFS) e estaquiose sintase (EC 2.4.1.67 galactinol: rafinose galactosiltransferase, STS).

Em soja, rafinose e estaquiose são os oligossacarídeos mais abundantes (NEUS et al., 2005), sendo que a estaquiose está presente em níveis muito maiores que a rafinose. Portanto, a enzima estaquiose sintase (STS) tem um papel importante na via de síntese destes açúcares. Esta enzima é a responsável pela adição de um resíduo de galactose do galactinol para a rafinose por meio de uma ligação α -1,6, liberando estaquiose e mio-inositol como produto

(PETERBAUER et al., 2002). O silenciamento do gene que codifica a enzima STS deve impedir a síntese de estaquiose em soja, contribuindo para a redução dos GO.

No entanto, ainda não está disponível em bancos públicos de dados, *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI), a seqüência do gene que codifica a enzima STS de soja, sendo grande o interesse no isolamento, clonagem e seqüenciamento de, pelo menos, um fragmento deste gene. Estas informações poderão tanto acrescentar conhecimentos científicos como permitir que técnicas de engenharia genética possam ser utilizadas para a produção de soja e seus derivados mais adequados para o consumo humano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. α -Galactosidases

Em 1895, Bau e Fischer e Lindner isolaram preparações enzimáticas (melibiases) a partir do sedimento de leveduras que hidrolisavam o dissacarídeo melibiose. O nome melibiase foi posteriormente mudado para α -galactosidase por Weidenhagen, que estudou a especificidade de ação da enzima usando açúcares com resíduos α -D-galactosil não-redutor terminal (DEY e PRIDHAM, 1972)

A reação catalisada pela α -galactosidase está apresentada na Figura 1.

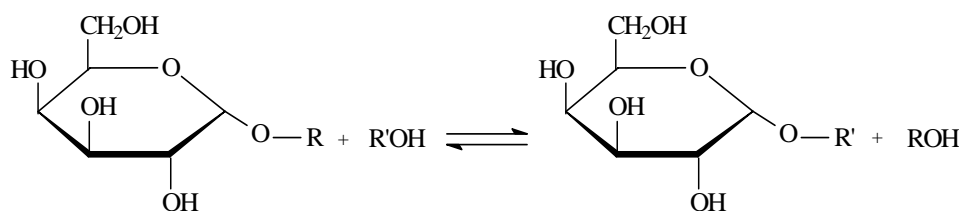


Figura 1 - Esquema da reação catalisada pela α -galactosidase.

A molécula hidroxílica aceptor, $\text{R}'\text{OH}$, é comumente a água, embora R e R' possam ser grupos alifáticos ou aromáticos. Sob condições especiais, a

síntese *de novo* pode ocorrer usando a D-galactose como doador. Esse processo geralmente tem sido observado quando a enzima é incubada com altas concentrações de monossacarídeos, resultando em moléculas derivadas da polimerização da glicose e galactose (SPANGENBERG et al., 2000).

As α -galactosidases distribuídas entre as várias espécies de plantas são geralmente consideradas como participantes na degradação de reservas de GO e galactomananas da parede celular. As galactomananas são polissacarídeos que são completamente hidrolisados durante a germinação em seus monossacarídeos constituintes, manose e galactose, que são absorvidos para o crescimento do embrião e subseqüentemente usados como fonte de carbono visando o fornecimento de energia para vários processos metabólicos (REID e MEIER, 1973).

2.2. α -Galactosidases de planta

As α -galactosidases de grãos de café foram uma das primeiras a serem parcialmente purificadas e caracterizadas bioquimicamente (COURTOIS e PETEK, 1966; GOLDEN et al., 1993). Nos relatos iniciais, esta enzima foi descrita como ocorrendo em duas isoformas (I e II) possuindo diferentes massas moleculares (28 e 36,5 kDa).

As α -galactosidases de plantas usualmente atuam junto com endo- β -mananases (EC 3.2.1.78) e β -manosidases (EC 3.2.1.25) para hidrolisar galactomananas, principalmente durante a germinação das sementes (MARRACINI et al., 2005).

A enzima α -galactosidase, dependendo da fonte vegetal, apresenta maior afinidade por um dos substratos, GO ou galactomanana. As α -galactosidases de cotilédones de sementes de leguminosas exibem uma maior afinidade para os GO e mostram somente atividade mínima contra galactomananas. A provável função das α -galactosidases de cotilédones é degradar os GO durante a germinação e no início do desenvolvimento da plântula (HERMAN e SHANNON, 1985).

Múltiplas formas das α -galactosidases de plantas apresentam diferenças em suas propriedades bioquímicas e cinéticas e exibem diferentes especificidades por substratos sintéticos e naturais (DEY e PRIDHAM, 1972; KIM

et al., 2002). Segundo LAHUTA (2000), sementes maduras contêm algumas formas de α -galactosidases que diferem na sua massa molecular e atividade, indicando que o número de formas da enzima pode estar relacionado ao estado fisiológico da semente.

Várias α -galactosidases de plantas já foram purificadas, como as α -galactosidases de sementes de *Cassia sericea* Sw. (BHASKAR et al., 1990); de *Coffea canephora* (HAIBACH et al., 1991); de *Phaseolus vulgaris* (DHAR et al., 1994); de *Lupinus albus* (CUADRA et al., 1994); de *Ceratonia siliqua* (KONTOS e SPYROPOULOS, 1996); de *Artocarpus hirsuta* (GURJAR et al., 1998); de *Cucumis melo* (GAO e SCHAFFER, 1999); de *Glycine max* (GUIMARÃES et al., 2001; VIANA et al., 2005); de *Platimiscium pubescens* (OLIVEIRA et al., 2005); de caule de *Colocasia esculenta* (CHIEN e LIN-CHU, 1991) e de raízes de *Verbascum thapsus* L. (BOM et al., 1998).

O interesse por α -galactosidases de plantas, visando aplicação em processos industriais é muito grande. Segundo SOMIARI e BALOGH (1992) as galactosidases de fungos são obtidas mais facilmente devido à sua localização extracelular e seu amplo perfil de estabilidade, sendo, portanto viável sua produção em grande escala. No entanto, quando se trata de um processo fermentativo, no qual ocorre a adição das células vivas ao produto desejado para a produção da α -galactosidase, e, conseqüentemente a hidrólise dos GO, fontes microbianas da enzima podem ter seu uso limitado devido à capacidade que alguns microrganismos tendem a produzir substâncias tóxicas. As α -galactosidases têm o uso indicado, especialmente nas indústrias de alimentos, para hidrólise dos GO presentes em produtos derivados de soja (MULIMANI, et al., 1997; GUIMARÃES et al., 2001; VIANA et al., 2005).

Várias pesquisas têm sido realizadas visando selecionar fontes vegetais de α -galactosidases que possam ser utilizadas em processos enzimáticos. No entanto, ainda existe pouca informação sobre espécies nativas brasileiras, tanto em relação à atividade de α -galactosidase quanto à composição bioquímica da semente. OLIVEIRA et al. (2005) descreveram a composição bioquímica e a atividade de α -galactosidase em 10 espécies florestais arbóreas nativas (Tabela 1). Estas informações permitiram selecionar algumas espécies promissoras para aplicações biotecnológicas. A espécie *Platymiscium pubescens* apresentou em

suas sementes alta atividade de α -galactosidase em relação às outras espécies. Por ter sido considerada promissora fonte da enzima α -galactosidase, foi selecionada para estudo pelo mesmo autor. As informações contidas na Tabela 1 também foram referências para a escolha da espécie *Tachigali multijuga* estudada neste trabalho.

Tabela 1 - Teores de umidade, lipídeos e proteínas e atividade de α -galactosidase em sementes maduras de soja e de espécies florestais. A atividade enzimática foi determinada no extrato bruto usando o substrato sintético ρ NP α Gal.

Espécies florestais	Umidade (%)	Lipídeos (%)	Proteína (%)	Ativ. de α -galactosidase (mM.min ⁻¹)
<i>Cassia grandis</i>	9,19 ± 0,14	1,64 ± 0,05	46,18 ± 1,98	0,24
<i>Schizolobium parahyba</i>	8,54 ± 0,10	4,08 ± 0,27	48,63 ± 0,24	0,36
<i>Tachigali multijuga</i>	6,69 ± 0,07	2,38 ± 0,08	36,37 ± 0,22	0,73
<i>Tabebuia serratifolia</i>	12,00 ± 0,54	22,96 ± 0,38	24,25 ± 0,11	0,13
<i>Tabebuia velaneda</i>	9,94 ± 0,35	21,38 ± 0,36	20,98 ± 0,14	0,14
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	4,82 ± 0,06	1,15 ± 0,04	50,30 ± 0,31	0,13
<i>Platymiscium pubescens</i>	13,53 ± 0,57	4,67 ± 0,18	43,90 ± 0,76	0,93
<i>Chorisia speciosa</i>	20,55 ± 0,88	31,12 ± 0,15	44,00 ± 0,15	0,32
<i>Caesalpinia peltophoroides</i>	9,69 ± 0,57	28,92 ± 0,28	25,22 ± 0,41	0,32
<i>Cedrela fissilis</i>	8,84 ± 0,21	16,07 ± 0,24	43,04 ± 0,42	0,23
<i>Glycine max</i>	11,05 ± 0,45	18,80 ± 0,39	41,45 ± 0,24	0,16

2.3. Mecanismo de ação das α -galactosidases

Até o início da década de 70, havia poucos relatos sobre o mecanismo de ação das α -galactosidases devido ao pouco conhecimento da química e cinética das enzimas de diversas fontes (DEY e PRIDHAM, 1972). Estudos de ressonância magnética nuclear e polarimetria com α -galactosidases de *Cajanus indicus* e amêndoa doce mostravam claramente que os resíduos α -D-galactosil liberados possuíam a mesma configuração anomérica do substrato.

Após vários estudos, observou-se que o mecanismo de ação da α -galactosidase de amêndoas doce assemelhava-se às hidrólises alcalina e ácida, e podia ser atribuído à presença de grupos básicos e ácidos no sítio ativo. Esses grupos foram identificados como grupos carboxil do aspartato (desprotonado) e imidazol da histidina (protonado), respectivamente. Com base nesses resultados um mecanismo de ação em duas etapas foi proposto para a α -galactosidase de amêndoa doce (DEY e PRIDHAM, 1972). Segundo esse mecanismo, a ligação glicosídica terminal da D-galactose presente no substrato é clivada pela ação conjunta dos grupos carboxil e imidazol da enzima. Em seguida, ocorre a reação com uma molécula aceptora ($R'OH$) que pode ser a água ou um álcool alifático, resultando na hidrólise ou transferência dos produtos. Neste mecanismo, a configuração do carbono anomérico é mantida (DEY e PRIDHAM, 1972) conforme representado na Figura 2.

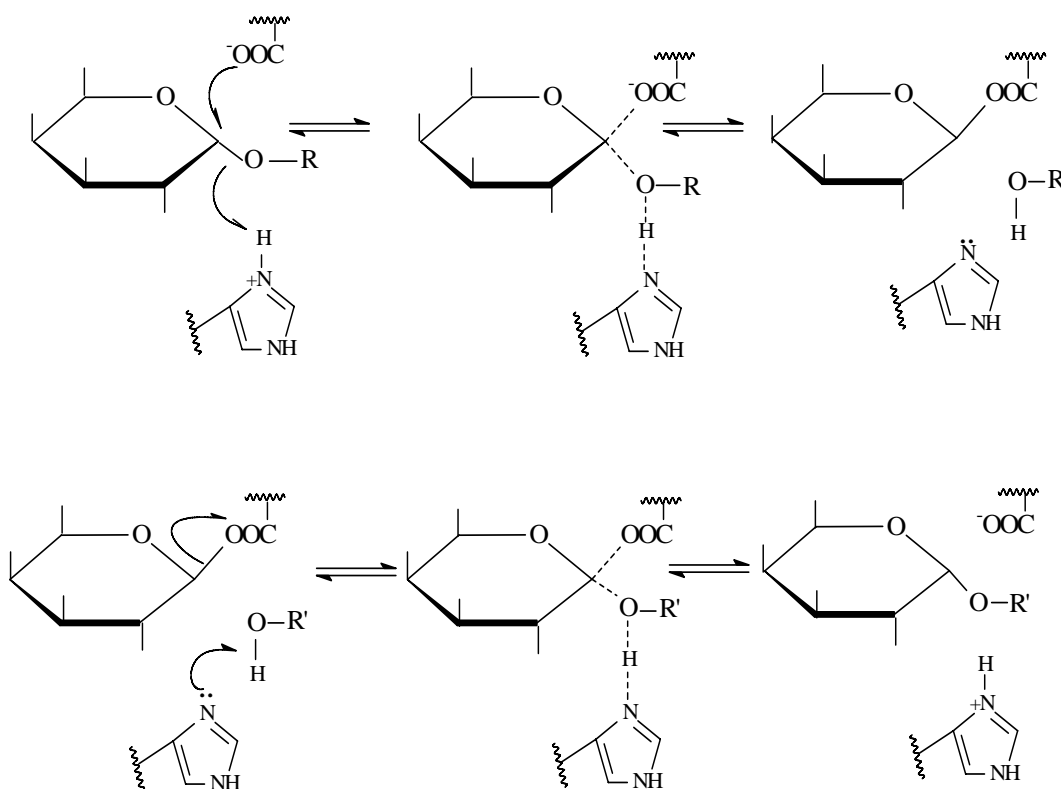


Figura 2 - Mecanismo de ação de duas etapas postulado por Dey (citado por DEY e PRIDHAM, 1972) para a α -galactosidase de amêndoa doce.

Estudos de modificação química da α -galactosidase de côco, realizados por MATHEW e BALASUBRAMANIAM (1987) indicaram a presença de dois grupos carboxil do aspartato, resíduos de tirosina e triptofano e a ausência do grupo imidazol da histitina no sítio ativo da α -galactosidase ou próximo a ele. Com base nesses experimentos de modificação química e nos resultados dos estudos cinéticos, estes autores propuseram um novo mecanismo de ação para a α -galactosidase (Figura 3). Neste mecanismo, o produto permanece com a mesma configuração do substrato.

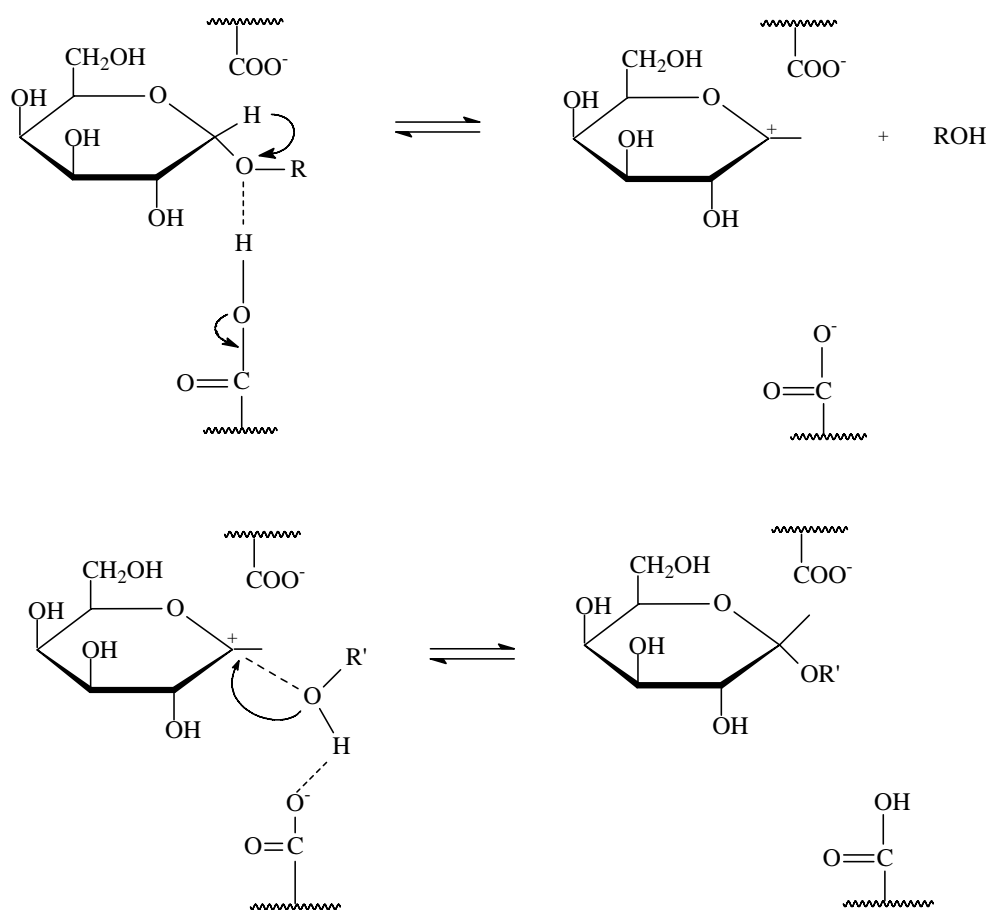


Figura 3 - Mecanismo de ação para α -galactosidase de côco sugerido por MATHEW e BALASUBRAMANIAM, 1972.

No mecanismo de ação proposto para a α -galactosidase, o grupo com pK_a de 3,8 é um grupo carboxil presente na forma ionizada para estabilizar um carbocátion intermediário, e, a presença deste grupo ionizado protege o carbocátion do ataque direcionado por um nucleófilo, permitindo que o produto retenha a mesma configuração anomérica do substrato. A molécula de galactose assume uma configuração de meia cadeira quando o carbocátion é formado. O grupo com pK_a de 6,5 é um grupo carboxílico perturbado que está presente na forma protonada e está envolvido na doação de um próton. Este grupo carboxílico é perturbado devido ao ambiente hidrofóbico produzido pela presença de resíduos de triptofano e tirosina em sua vizinhança (MATHEW e BALASUBRAMANIAM, 1972).

2.4. Estrutura tridimensional da α -galactosidase

Até o momento, as estruturas primárias de mais de 50 α -galactosidases já foram identificadas. Recentemente, FUJIMOTO et al. (2003) cristalizaram e determinaram a estrutura tridimensional da α -galactosidase purificada de arroz. O modelo é de uma única cadeia de 362 resíduos de aminoácidos com um domínio catalítico (1-278) e um domínio C-terminal (279-362, Figura 4A). O domínio catalítico, descrito por esses autores, é uma estrutura barril $(\beta/\alpha)_8$ e o domínio C-terminal tem a estrutura do motivo “chave grega”. O sítio ativo está ao lado do domínio C-terminal, e tem uma molécula de D-galactose ligada. Os resíduos catalíticos encontrados na α -galactosidase de arroz são dois grupos carboxil do aspartato: 130 e 185.

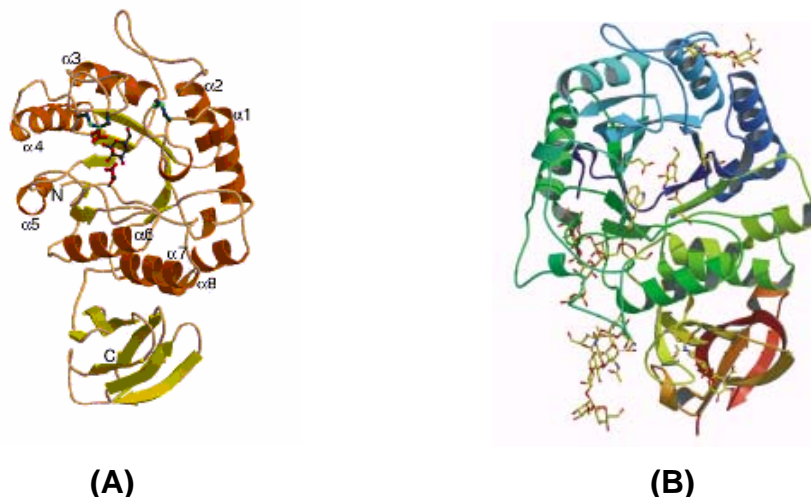


Figura 4 - Vista tridimensional da fita-modelo das α -galactosidases de arroz (A) e de *Trichoderma reesei* (B) complexadas com a D-galactose.

Também GULOBEV et al. (2004) cristalizaram e determinaram a estrutura tridimensional da α -galactosidase do fungo *Trichoderma reesei* e seu complexo com seu inibidor competitivo, a β -D-galactose (Figura 4B). O modelo cristalográfico descrito para a α -galactosidase consistiu de dois domínios. O domínio A catalítico, N-terminal (resíduos 1-320), com uma topologia em barril $(\beta/\alpha)_8$ e o domínio B, C-terminal (resíduos 320-417), formado por uma estrutura de oito fitas β antiparalelas contendo o motivo “chave grega” (Figura 4B). A proteína apresenta quatro sítios de N-glicosilação localizados no domínio A catalítico. A molécula de galactose se liga no centro do domínio A catalítico.

2.5. Galactooligossacarídeos (GO) em sementes de leguminosas

As leguminosas constituem uma fonte importante e barata de proteína e energia para os países do terceiro mundo (MULIMANI e DEVENDRA, 1998). As leguminosas contêm duas ou três vezes mais proteínas que os cereais, além de serem boa fonte de carboidratos na dieta (MACHAIAH e PEDNEKAR, 2002).

Dentre as leguminosas mais consumidas destacam-se os grãos de soja (*Glycine max* L. Merrill). A soja possui alto valor nutritivo, por conter, em suas proteínas, quantidade suficiente de quase todos os aminoácidos essenciais (COSTA e MIYA, 1972). Apesar de seu alto valor nutricional, uma série de

fatores antinutricionais, tais como inibidor de tripsina, ácido fítico e GO estão presentes nos grãos (SANNI et al., 1997).

De acordo com TRUGO et al. (1995) é importante determinar a composição de diferentes cultivares de soja para selecionar aqueles com altos níveis de proteína e óleo e baixo conteúdo de GO. Em seus estudos foi encontrado na soja var. Doko um conteúdo de 0,7 e 4,1 g% para rafinose e estaquiose, respectivamente. Em soja var. TGX536-02D o conteúdo de rafinose e estaquiose encontrados foram de 1,22 e 3,41 %, respectivamente (EGOUNLETY et al., 2003). Devido à presença dos GO nas sementes de soja, a ingestão dos grãos pode provocar flatulência em humanos.

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) também é um alimento básico em vários países, constituindo importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas, ácidos graxos insaturados e micronutrientes (DESHPANDE, 1992; ACEVEDO et al., 1994; SAT e KELES, 2002). Entretanto, fatores antinutricionais estão presentes no grão, como polifenóis, ácido fítico, inibidor de proteases, inibidor de α -amilase, lectinas, taninos, saponinas e GO (LYIMO et al., 1992). FIALHO et al. (2006) determinaram a composição bioquímica de 10 cultivares de feijoeiros com o objetivo de selecionar aquele com alto conteúdo de proteínas e óleo, e baixo conteúdo de GO. Os resultados demonstraram que entre os 10 cultivares de feijoeiro estudados, o cultivar Perry Marrow apresentou alta concentração de proteínas e baixo conteúdo de GO, e, portanto foi indicado para consumo humano.

As sementes de ervilha (*Pisum sativum*) têm um baixo conteúdo de GO, desde que as sementes sejam colhidas após total desenvolvimento, mas antes do processo de maturação (EKVALL et al., 2005). Durante o desenvolvimento da semente, sacarose é acumulada. A maturação ocorre principalmente após a colheita e é caracterizada pelo acúmulo dos GO e amido (DAVEBY et al., 1993). EKVALL et al. (2006) encontraram em ervilhas um conteúdo de carboidratos de baixa massa molecular, nos quais estão incluídos sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose, de 250 g/Kg de matéria seca. O açúcar sacarose foi dominante e correspondeu a 96 % dos carboidratos. O conteúdo de GO encontrado foi de 5,5 g/Kg, dos quais rafinose, estaquiose e verbascose corresponderam à 44, 35 e 22 %, respectivamente.

Em outras leguminosas, como o amendoim, BRYANT et al., (2004) encontraram um conteúdo médio de proteína e óleo de 26,6 e 43,1 %, respectivamente, em 33 cultivares estudados. De acordo com estes autores, somente sacarose, rafinose e estaquiose estavam presentes nos extratos solúveis dos 33 cultivares. A sacarose foi a mais abundante variando de 2,84 a 6,74 %. Rafinose foi o menos abundante com concentrações variando de 0,12 % para níveis não detectados, e a concentração de estaquiose variou de 0,27 a 0,61 % nos grãos.

Sementes de lupin são fonte de polissacarídeos (30 - 40 %), óleo (5 - 15 %) e proteínas (FALUYI et al., 2000). Em lupin, os níveis de ácido fítico e saponinas são menores que em soja (PETTERSON e FAIRBROTHER, 1996). Além disso, lectinas e inibidor de proteases, que podem reduzir a digestibilidade protéica, são encontrados em menores quantidades em lupin que em outras leguminosas (PETTERSON et al., 1997). Devido à sua composição nutricional e propriedades funcionais satisfatórias, a farinha de lupin pode ser usada na produção de comidas fermentadas. No entanto, lupin também contém os GO, que são causadores de flatulência. Estes açúcares estão presentes na semente fresca numa faixa de 7 a 15 %, e isto tem levado muitas pessoas a restringirem o uso do lupin na alimentação (MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2006).

2.6. Papel fisiológico dos galactooligossacarídeos

Os galactooligossacarídeos (GO) são um grupo de oligossacarídeos que são sintetizados em muitas espécies de plantas (HINCHA et al., 2003). Durante a germinação das sementes, os oligossacarídeos são fontes primárias de energia, e substratos para a síntese de outros compostos como os galactosil ciclitolos (LAHUTA et al., 2000).

Os GO são os segundos carboidratos solúveis mais abundantes nas plantas. Eles são sintetizados e depositados nos órgãos de armazenamento, como as sementes e os tubérculos, durante o processo de maturação, e são mobilizados durante os primeiros estágios da germinação (DEY, 1990).

Dentre as múltiplas funções que exercem em plantas, os GO servem como carboidratos de transporte no floema e como agentes crioprotetores de órgãos durante a aclimatização ao frio (KARNER et al., 2004). Acredita-se que o papel

primário dos GO é servir como carboidratos de reserva, transportando energia para os pontos de crescimento dos vegetais (DINNI et al., 1989; CHATTERTON et al., 1990). Os GO são carboidratos não redutores, solúveis em água e são usados por muitas plantas para estoque, translocação, fonte de carbono e proteção contra diferentes estresses (INAN HAAB e KELLER, 2002).

De acordo com DEY (1980), o endosperma de leguminosas armazena principalmente dois tipos de carboidratos de reserva: os GO, os quais são armazenados nos vacúolos; e galactomanana, armazenada na parede celular. Esses oligossacarídeos ocorrem no endosperma e no embrião de sementes de leguminosas e são hidrolisados durante a germinação, resultando em acúmulo temporário de galactose livre e sacarose nesses tecidos.

Os GO também apresentam um papel importante ao conferir tolerância a dessecação e estoque das sementes, principalmente quando é aumentado os níveis desses açúcares (STEADMAN et al., 1996). Nos estágios iniciais de dessecação da semente ocorre acúmulo de sacarose, mas como esse açúcar sozinho não é suficiente para a tolerância à dessecação, a presença dos GO é requerida para evitar a cristalização da sacarose, e para promover formação do estado vítrio (KOSTER e LEOPOLD, 1988; OBENDORF, 1997). Foi proposto que rafinose e sacarose estão envolvidas na vitrificação citoplasmática em sementes maduras, estabilizando estruturas macromoleculares sensíveis. Em adição, os GO interagem com a membrana no estado seco por substituir moléculas de água na camada de hidratação da parte hidrofílica dos lipídeos impedindo o rompimento da fase lipídica (ZUTHER et al., 2004).

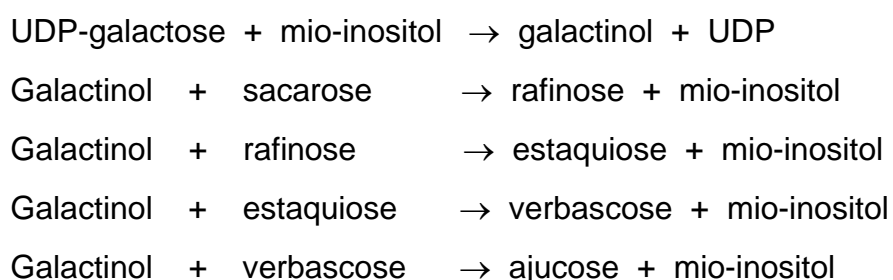
Em algumas plantas, os GO se acumulam nas sementes juntamente com os galactosil ciclitolos ((HORBOWICZ et al., 1998). Os galactosil ciclitolos são carboidratos solúveis não redutores, frequentemente encontrados em quantidades similares ou maiores que os GO em sementes de algumas leguminosas como lentilha (*Lens culinaris*), grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e soja (*Glycine max*) (HORBOWICZ e OBENDORF, 1994). Ambas as famílias de α -galactosídeos têm funções comuns. Eles são considerados carboidratos de reserva para a germinação das sementes, participam na aquisição da tolerância à dessecação e na viabilidade das sementes (PETERBAUER e RICHITER, 1998).

Segundo OBERDORF et al. (1998), em soja, folhas e tecidos de talos jovens acumulam os galactosil ciclitolos, que incluem o D-pinitol (3-O-metil-D-mio-

inositol) e em menor quantidade D-ononitol (4-O-metil-D-mio-inositol), sequoyitol (5-O-metil-mio-inositol), bornesitol (1-O-metil-D-mio-inositol), *D-chiro*-inositol, e mio-inositol. As sementes de soja madura contêm D-pinitol, *D-chiro*-inositol, D-ononitol e mio-inositol livres e seus derivados galactopnitol A (O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-4-O-metil-D-*chiro*-inositol), ciceritol (O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-4-O-metil-D-*chiro*-inositol), galactopinitol B (O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O-metil-D-*chiro*-inositol), fagopiritol B1 (O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- *D-chiro*-inositol) e galactinol (O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-L-mio-inositol).

2.7. Biossíntese dos galactooligossacarídeos

Os GO são sintetizados durante a formação das sementes, e degradados durante o processo de germinação (KANDLER e HOLF, 1980; SARAVITZ et al., 1987). Eles são derivados da sacarose, e consiste da adição da galactose à sacarose por uma ligação α -1,6 formando a rafinose. Novas unidades de galactose são adicionadas por ligações α -1,6 ao terminal galactose para formar os tetra e pentassacarídeos estaquiase e verbascose, respectivamente (HINCHA et al., 2003). Portanto, os GO são considerados extensões da sacarose, variando apenas no número de resíduos de galactose (SPRENGER e KELLER, 2000). A via metabólica de síntese dos GO pode ser representada (DEY, 1985) como se segue:



Um esquema da via de síntese dos oligossacarídeos, bem como das enzimas envolvidas, está representado na Figura 5.

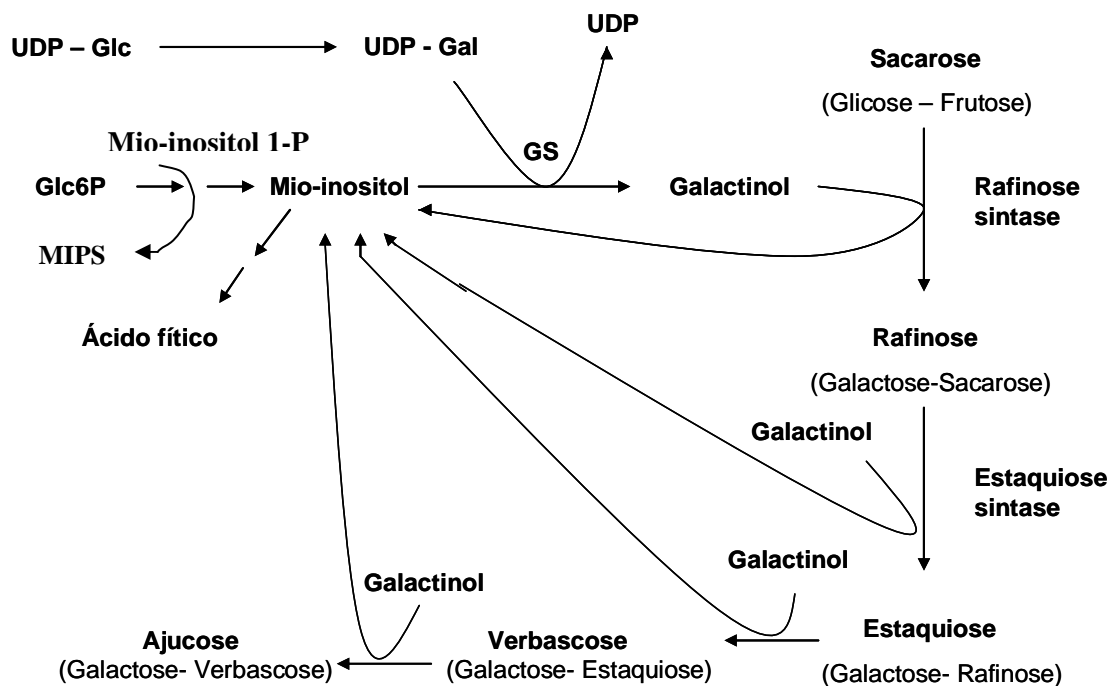


Figura 5 - Esquema da via metabólica de síntese dos oligossacarídeos de rafinose. UDP-Glc: uridina difosfato-glicose; UDP-Gal: uridina difosfato-galactose; UDP: uridina difosfato; Glc6P: glicose-6-fosfato. (Adaptado de SUAREZ et al., 1999).

A reação inicial é catalisada pela galactinol sintase (EC 2.4.1.123 UDP-galactose: mio-inositol galactosil transferase, GS), que requer Mn^{+2} para sua atividade (LIU et al., 1995). É produzido galactinol a partir de UDP-galactose e mio-inositol. A atividade de GS correlaciona-se positivamente com os níveis de GO em folhas e sementes. Esta enzima provavelmente regula os níveis dos oligossacarídeos de reserva em partes específicas das plantas (CASTILHO et al., 1990). Segundo RIBEIRO (2001), a atividade de GS de soja varia com o desenvolvimento da semente, sendo maior em sementes com 42,1% de matéria seca. Subseqüentemente à reação inicial, sintases específicas catalisam a síntese de cada membro da série, pela transferência da galactose do galactinol para a sacarose. Os açúcares rafinose e estaquiose, em soja, são formados pela catálise das enzimas rafinose sintase (EC 2.4.1.82 galactinol: sacarose galactosiltransferase, RFS) e estaquiose sintase (EC 2.4.1.67 galactinol: rafinose galactosiltransferase, STS) (SUAREZ et al., 1999).

Nas plantas superiores, a rafinose ocorre nas folhas, caules e órgãos de reserva. O nível nas folhas é baixo, mas é translocado e se acumula em altas

concentrações em órgãos de reserva durante o desenvolvimento da planta. Concomitantemente à perda de água, há aumento na concentração de rafinose em sementes maduras (DEY, 1985). Segundo o mesmo autor, em órgãos de reserva, rafinose pode ser utilizada como um precursor para a síntese de outros oligossacarídeos homólogos maiores ou ser hidrolisada por α -galactosidases e invertases.

Um dos mais abundantes tetrassacarídeos em plantas é a estaquiose. Em sementes, estaquiose é metabolizada durante a germinação com a finalidade de fornecer energia para o desenvolvimento do embrião. Em raízes e sementes, estaquiose pode ser armazenada como açúcar ou pode ser transformada em outros oligossacarídeos de cadeia maior como a verbascose e ajucose. Estaquiose é reconhecida como o maior açúcar de reserva e transporte em leguminosas (DEY, 1985). Verbascose e ajucose são os penta e hexassacarídeos, respectivamente. Estes oligossacarídeos coexistem com rafinose e estaquiose na maioria das leguminosas e estão presentes em órgãos de reserva (DEY, 1985, 1990). Verbascose também ocorre no floema de muitas espécies de plantas. A função fisiológica da verbascose em sementes tem sido pouco estudada. Como os outros GO, rafinose e estaquiose, verbascose pode atuar como um agente protetor na secagem durante a maturação ou como reserva de carbono para a germinação (PETERBAUER et al., 2003).

Apesar dos GO exercerem funções fisiológicas importantes, a presença desses açúcares em altas concentrações em sementes maduras de leguminosas constitui um fator antinutricional em humanos que se alimentam dos grãos. A atividade da galactinol sintase (GS) é induzida e aumentada quando as plantas são submetidas a baixas temperaturas, ou quando as sementes maduras iniciam o processo de perda de água no final do desenvolvimento. O bloqueio da expressão do gene que codifica a GS reduziria o fluxo de carbono na via, inibindo parcial ou completamente a síntese dos GO. Sendo assim, a redução da atividade de GS poderia diminuir os problemas nutricionais associados com os GO, mas poderia resultar também em plantas e/ou sementes que se tornariam susceptíveis ao estresse ambiental. Uma estratégia mais adequada seria a manipulação de cada etapa individual da via (JONES et al. 1999).

2.8. Hidrólise enzimática dos galactooligossacarídeos

A α -galactosidase (EC 3.2.1.22 α -D-galactosil galactohidrolase) catalisa a clivagem de resíduos α -1,6 terminais de uma grande faixa de substratos, incluindo oligossacarídeos lineares e ramificados, polissacarídeos e substratos sintéticos como o p -nitrofinil- α -D-galactopiranosídeo (p NP α Gal) (ADEMARK et al., 2001).

A hidrólise enzimática dos GO pode ser conseguida pela catálise das enzimas α -galactosidases que são específicas para ligações α -1,6 que une os resíduos de galactose à sacarose, rafinose, estaquiase e verbascose, e também por invertases, enzimas específicas para a ligação β -1,2 que une frutose à glicose nos mesmos oligossacarídeos acima citados.

Um esquema da via de degradação dos oligossacarídeos, bem como das enzimas envolvidas, está representado na Figura 6 .

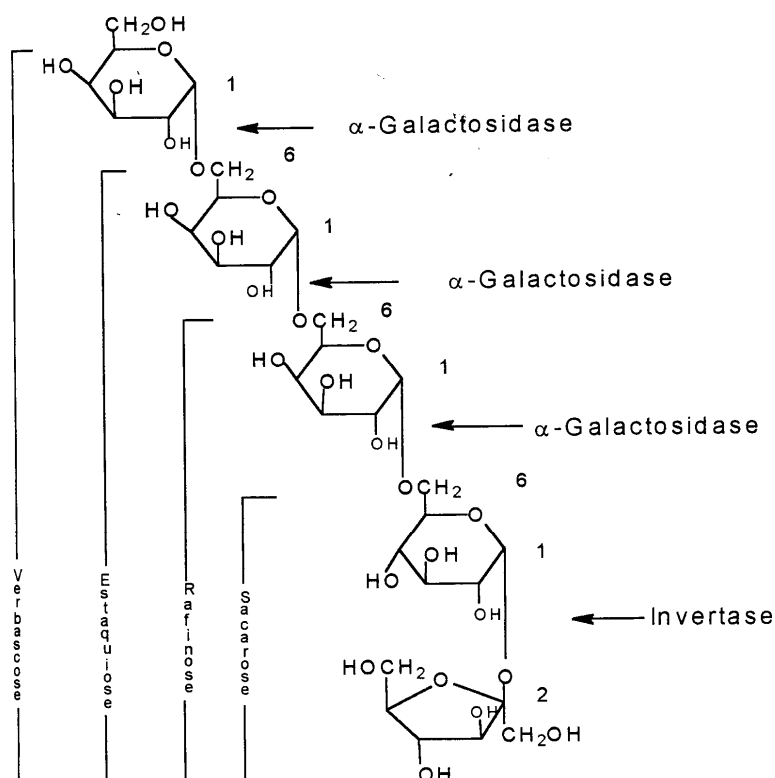


Figura 6 - Galactooligossacarídeos e sítios de clivagem para as enzimas hidrolíticas invertase e α -galactosidase (Retirado de REZENDE, 1998).

Existem vários relatos sobre a utilização de α -galactosidases de origem vegetal e microbiana na degradação dos oligossacarídeos presentes em extrato hidrossolúvel de soja, também conhecido como leite de soja, e em outras farinhas obtidas de leguminosas (SOMIARI e BALOGH, 1995; MULIMANI et al., 1997).

Várias pesquisas visando o estabelecimento de processos para a remoção dos GO no leite de soja com a utilização de enzimas já foram realizados. CRUZ e PARK (1982) estudaram a produção de α -galactosidases pelo fungo *Aspergillus oryzae* e sua aplicação na hidrólise dos GO no leite de soja. Com o mesmo objetivo, THIPPESWAMY e MULIMANI (2002) imobilizaram em gel de poliacrilamida a α -galactosidase de *Gibberella fujikuroi* para redução dos GO no leite de soja. VIANA et al. (2006) reduziram completamente o conteúdo de rafinose e estaquiose no leite de soja após 4 h usando a α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV1.

Estudos utilizando fontes vegetais para a obtenção de α -galactosidases para uso em processos de hidrólise dos GO em leite de soja, ainda são escassos se, comparados com as fontes microbianas. CRUZ e SILVA (1986) avaliaram a atividade α -galactosidases e invertases durante o processo germinativo de *Glycine max*, e, testaram a redução dos GO no leite de soja pela adição de pequenas proporções de grãos de soja germinados na formulação do produto. Segundo os autores, não houve um decréscimo substancial de rafinose e estaquiose. GUIMARÃES et al. (2001) obtiveram expressiva redução dos GO em leite de soja pelo tratamento com α -galactosidase de sementes germinadas de soja var. Doko.

MULIMANI e DEVENDRA (1998) testaram três técnicas para redução dos GO: embebição, cocção dos grãos e tratamento enzimático com enzima obtida de *Cassia sericea*, concluindo que o último tratamento foi o mais eficiente, conseguindo hidrólise total dos GO após 3 horas. Entretanto, nenhum processo enzimático seguro, eficiente e economicamente satisfatório, utilizando enzimas nativas ou recombinantes, está disponível até o momento.

2.9. Utilização das α -galactosidases em processos industriais

As α -galactosidases apresentam grande potencial em várias aplicações industriais. Além do uso na hidrólise de rafinose e estaquiase de leite de soja (THANANUNKUL et al., 1976), tais enzimas podem ser usadas, por exemplo, na hidrólise de rafinose de xarope de açúcar de beterraba para melhorar o valor do melado (KOBAYASHI e SUZUKI, 1972). Além disso, o xarope de beterraba é largamente utilizado para a produção comercial de leveduras pela conveniência comercial (BURROWS, 1979).

As α -galactosidases podem promover hidrólise de numerosas galactomananas, por exemplo, em goma guar, que contem em torno de 40 % de galactose com ligações α -1,6 em uma cadeia β -manosil (SOMIARI E BALOGH, 1993). Modificações em galactomananas com as α -galactosidases têm sido usadas para melhorar as propriedades gélidas desses polissacarídeos (BULPIN et al., 1990). As α -galactosidases também estão envolvidas em modificação de materiais derivados da madeira porque galactomananas e galactoglicomananas são os grupos principais de hemiceluloses em plantas (CLARKE et al., 2000).

A enzima α -galactosidase pode ter aplicação na medicina (TOPALOGU et al., 1999). Algumas α -galactosidases de eucariotos são capazes de remover resíduos de galactose α -1,3 terminais de glucanas, o que apresenta um potencial uso médico em terapia de transfusão na conversão de sangue grupo B para O (ZHU e GOLDSTEIN, 1994; PUCHART et al., 2000; VARBANETS et al., 2001). Vários são os estudos realizados na tentativa de conversão de sangue grupo B para O. HOBBS et al. (1996) estudaram a atividade da α -galactosidase de soja sobre o sangue grupo B. A enzima hidrolisou o terminal α -D-galactosil do antígeno B sob uma variedade de condições, convertendo-o em antígeno H. A conversão do antígeno B para antígeno H produziu sangue tipo O que é um doador universal. Também CHIEN e LIN-CHU (1991) isolaram uma α -galactosidase de sementes de *Colocasia esculenta* capaz de converter sangue grupo B em O. A enzima apresentou uma boa atividade na clivagem das ligações α -1,3 nos grupos finais de α -D-galactosil transformando sangue grupo B em O.

Segundo PUCHART et al. (2000), outra aplicação industrial das α -galactosidases é na usina açucareira. Pequenas quantidades de rafinose e/ou

estaquiose afetam negativamente a cristalização da sacarose. Esses açúcares podem ser facilmente eliminados e convertidos à sacarose pelo tratamento com a α -galactosidase, porém é importante que o modo de ação e a estabilidade das α -galactosidases sejam conhecidos, para uso a nível industrial. Outra possível aplicação dessa enzima α -galactosidase é na indústria de papel e de polpa, onde galactosidases podem aumentar a clarificação da polpa, efeito de endo- β -1,4-mananases na polpa de papel Kraft.

2.10. Variedades de soja com reduzido conteúdo de galactooligosacarídeos

Uma planta de soja com reduzido conteúdo de rafinose e estaquiose, e alta quantidade de sacarose foi identificada por KERR e SEBASTIAN (2000). Estes autores demonstraram que a redução desses oligossacarídeos na planta PI200508 é controlada pelo alelo recessivo *mips* (gene que codifica a enzima mio-inositol 1-fosfato sintase). Quando frangos foram alimentados com ração preparada com soja de linhas que continham o genótipo *MIPS MIPS* e de linhas que continham o genótipo *mips mips*, a matéria seca digerida foi significativamente maior para a ração preparada com soja de linhas *mips* (PARSONS et al., 2000).

O alelo recessivo *mips* foi incorporado dentro de variedades de soja comercial. Estes cultivares são usados como fonte de proteínas e alimento. No entanto, os cultivares contendo o alelo *mips* têm um rendimento menor que os cultivares convencionais contendo o alelo *MIPS*, isto pode ter sido devido a uma influência negativa causada pelo alelo *mips*, ou devido ao fato do alelo não ter sido incorporado dentro de um cultivar muito produtivo. NEUS et al. (2005) demonstraram que as linhas *mips* têm significativamente menos rafinose e estaquiose, e, aumentado conteúdo de sacarose que as linhas *MIPS*. A soja foi capaz de se adaptar a redução desses açúcares sem afetar a morfologia das folhas, o tamanho da planta e as características da semente.

Em soja, mais de 60 % do fósforo inorgânico está na forma de fitato ou ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato). O fosfato presente no fitato não é absorvido por animais não-ruminantes porque eles não possuem a enzima fitase, necessária para hidrolisar o fitato. Portanto, é comum suplementar os

produtos de soja com fósforo inorgânico, ou com a enzima fitase para aumentar a disponibilidade de fósforo. A adição de fósforo inorgânico aumenta o custo da alimentação, e, o fosfato presente no fitato que não é digerido é eliminado nos excrementos pelos animais contribuindo para a poluição dessas áreas (MEIS et al., 2003). Portanto, várias pesquisas foram conduzidas para obter uma variedade de soja com baixo conteúdo de fitato.

Em plantas, a via biossintética dos GO e fitato usa o mio-inositol 1-fosfato, como intermediário, portanto, o mio-inositol livre é um substrato comum para as duas vias. O mio-inositol 1-fosfato é sintetizado pela enzima mio-inositol 1-fosfato sintase (EC 5.5.1.4, MIPS) a partir de glicose-6-P. O mio-inositol 1-fosfato pode ser convertido em fitato, a forma mais abundante de fosfato em sementes (RABOY et al., 2001; RABOY, 2002), ou ser convertido em mio-inositol e depois em galactinol pela enzima galactinol sintase. Neste caso, o mio-inositol 1-fosfato é direcionado para a via de síntese dos GO.

A busca por variedades com reduzido conteúdo de fitato, levou alguns autores a manipularem o gene da MIPS, com o objetivo de bloquear a síntese de mio-inositol 1-fosfato, e conseguir reduzir o conteúdo de fitato. Como consequência, as variedades de soja manipuladas apresentaram fenótipo de baixo conteúdo de GO.

SEBASTIAN et al. (2000) obtiveram linhas mutantes de soja com grande decréscimo nos níveis de rafinose e estaquiose. Um alelo recessivo, *mips*, desenvolvido por mutagênese química no gene da enzima mio-inositol 1-fosfato sintase (MIPS) causou significativamente redução no conteúdo dos GO e fitato em sementes de soja. As linhas de soja com o genótipo *mips mips* apresentaram um conteúdo de rafinose e estaquiose de 10 e 5 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente, enquanto as linhas de soja convencionais, contendo o genótipo *Mips Mips*, apresentaram um conteúdo de rafinose e estaquiose de 20 e 75 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, respectivamente.

HITZ et al. (2002) observaram que uma mutação induzida no gene que codifica a enzima mio-inositol 1-fosfato sintase, em sementes de soja, confere um fenótipo com nível elevado de fosfato inorgânico, e, conseqüente decréscimo de fitato e GO. A mutação resultou na troca de um resíduo de aminoácido, lisina 396, para asparagina. Esta troca causou decréscimo na atividade específica da mio-inositol 1-fosfato sintase de aproximadamente 90%, e, conseqüentemente o

decréscimo de mio-inositol 1-fosfato. O genótipo originado apresentou reduzido conteúdo de GO e não teve problemas com o vigor da muda, mas as suas sementes não foram viáveis. Em estudos posteriores, HITZ et al. (2004) conseguiram uma soja viável, que produz sementes com reduzidos níveis de GO e ácido fítico.

Uma nova variedade de soja com reduzido conteúdo de fitato foi obtida pelo estudo de NUNES et al. (2006). Estes autores conseguiram através da técnica RNA de interferência (RNAi) silenciar o gene que codifica a enzima mio-inositol 1-fosfato sintase (*GmMIPS1*) em soja. Os resultados demonstraram que o silenciamento do gene *GmMIPS1* foi efetivo e a variedade mutante teve uma redução drástica de fitato (94,5 %). Os autores ressaltaram a importância comercial da soja transgênica, por esta apresentar elevado nível de fósforo e alta redução de fitato. Nenhum estudo sobre o conteúdo dos GO na variedade mutante foi realizado.

Segundo OBENDORF et al. (1998), o potencial da estaquiose em produzir problemas gastrointestinais iniciou a pesquisa por genótipos de soja com baixo conteúdo de estaquiose. Até o presente momento, as variedades mutantes de soja que apresentam redução no conteúdo dos GO, foram obtidas de estudos que envolvem o gene da enzima mio-inositol 1-fosfato sintase. Esta enzima atua no início da via de biossíntese dos GO, causando alteração na quantidade de todos os componentes envolvidos na via.

Até o momento, não foram desenvolvidos trabalhos para reduzir apenas a quantidade de estaquiose, uma vez que em sementes de soja, este açúcar é mais abundante que a rafinose (GUIMARÃES et al., 2001; VIANA et al., 2005), e, é o principal causador de flatulência em humanos. A busca por uma variedade de soja que apresente redução nos níveis de estaquiose é de grande interesse, e isto requer o conhecimento da seqüência e a manipulação do gene que codifica a enzima estaquiose sintase.

2.11. Estaquiose sintase

A estaquiose sintase (EC 2.4.1.67, STS) foi originalmente descrita em sementes de feijões (TANNER e KANDLER, 1968), mas foi purificada pela primeira vez de extrato de folhas de melão (HOLTHAUS e SCHMITZ, 1991). A

STS é uma das enzimas envolvidas na via biossintética dos GO. Durante a síntese de estaquiose, a rafinose é substrato para a enzima STS que adiciona uma unidade de galactose do galactinol para a rafinose formando os produtos mio-inositol e estaquiose (PETERBAUER et al., 2002).

Esta enzima já foi purificada e caracterizada por alguns autores. Em sementes do feijão Adzuki (*Vigna angulares*), cromatografia de filtração em gel revelou a presença de dois picos com atividade de STS, um pico com massa molecular aparente de 110 kDa e outro com 283 kDa. A análise destes picos por SDS-PAGE revelou que a STS é um único polipeptídeo 90 kDa, implicando que a proteína forma oligômeros ativos em condições não-desnaturantes, e por cromatofocalização estas formas ativas apresentaram valor de pI entre pH 4,7 - 5,0. A enzima apresentou atividade máxima na faixa de pH 6,5 - 7,0 a 35 °C, e sofreu forte inibição pelos íons Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} . A STS purificada catalisou a transferência do grupo galactosil do galactinol para a rafinose formando mio-inositol e estaquiose como produtos. O valor de K_M para a rafinose na presença de galactinol foi 38,6 mM (PETERBAUER e RICHTER, 1998). Em sementes maduras de lentilha (*Lens culinaris*), a enzima STS apresentou ser uma proteína monomérica com massa molecular de 88,6 kDa, por SDS-PAGE, com um pI em pH 4,8. O pH ótimo de atividade foi em pH 7,0, e a enzima purificada catalisou várias reações de transferência do galactosil, entre elas a síntese de estaquiose a partir de galactinol e rafinose, com um valor de K_M para a rafinose de 9,7 mM. (HOCH et al., 1999).

A enzima STS isolada de extrato de folhas de melão (*Cucumis melo*) é uma proteína com valor de pI em pH 5,1, e, apresentou duas subunidades de massa molecular de 45 e 50 kDa, após análise em SDS-PAGE. A enzima apresentou atividade máxima em pH 6,8 na temperatura de 32 °C. O valor de K_M para a rafinose foi de 3,3 mM e para o galactinol foi de 7,7 mM. O mio-inositol foi um forte inibidor competitivo com valor de k_i de 1,8 mM (HOLTHAUS e SCHMITZ, 1991). Em folhas de *Ajuga reptans* L. a enzima STS apresentou atividade máxima em pH 6,5 na temperatura de 30 °C. O valor de K_M para o galactinol foi 2,4 mM (na presença de 10 mM de rafinose) e o valor de K_M para a rafinose foi 4,8 mM (na presença de 5 mM de galactinol) (BACHMANN et al., 1994).

A via biossintética de rafinose e estaquiose é bem estabelecida, e é conhecida como galactinol dependente. Porém uma nova via, galactinol

independente, responsável para a síntese destes GO foi recentemente descrita em *Ajuga reptans* L. (BACHMANN et al., 1994; INAN HAAB e KELLER, 2002). As cadeias dos GO são alongadas de rafinose pela atividade da enzima galactan:galactan galactosiltransferase (GGT). Esta enzima GGT catalisa a transferência direta de um resíduo terminal de galactose de uma molécula de rafinose para a outra, resultando em sacarose e estaquiase (TAPERNOUX-LUTHI et al., 2004). Em *Ajuga reptans* L. esta galactosiltransferase solúvel é uma glicoproteína, apresentou atividade máxima em pH ácido, e está presente exclusivamente no vacúolo das folhas. Sua atividade correlaciona positivamente com a acumulação de GO de cadeia longa (BACHMANN e KELLER, 1995; BRAUN e KELLER, 2000). A atividade de GGT também foi detectada em folhas de *Coleus blumei* (GILBERT et al., 1997). Esta enzima presente em vacúolos de folhas ainda não foi encontrada em sementes (PETERBAUER et al., 2001). Estudos recentes demonstraram sua alta homologia com α -galactosidases ácidas de plantas, enzimas que pertencem as galactosilhidrolases da família 27 presentes nos vacúolos (TAPERNOUX-LUTHI et al., 2007). Até o presente momento, não se encontra na literatura descrição desta enzima em soja.

O gene da estaquiase sintase em soja ainda não foi seqüenciado. Encontra-se disponível em bancos de dados públicos (*GenBank* - www.ncbi.nlm.nih.gov), seqüências genômicas de cDNA da estaquiase sintase em outras espécies de leguminosas, dentre elas, *Vigna angularis* (acesso no. Y19024), *Pisum sativum* (acesso no. AJ512932), *Alonsoa meridionalis* (acesso no. AJ487030), *Stachys sieboldii* (acesso no. AJ344091) e *Pisum sativum* (acesso no. AJ311087). Modificações usando técnicas de engenharia genética podem facilitar a obtenção de variedades de soja com reduzido teor de estaquiase. No entanto, é necessário o conhecimento da seqüência de pelo menos um fragmento do gene da enzima estaquiase sintase de soja.

OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve dois objetivos visando reduzir os galactooligossacarídeos em soja:

- ✓ Purificar e caracterizar bioquímica e cinética, a enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* Benth, e verificar possível aplicação biotecnológica.
- ✓ Isolar, clonar e sequenciar pelo menos um fragmento do gene que codifica a enzima estaquiase sintase de soja, visando futuramente o seu silenciamento.

Portanto ele foi dividido em dois capítulos.

Capítulo 1:

Purificação e caracterização cinética de uma α -galactosidase em sementes de *Tachigali multijuga* Benth

Capítulo 2:

Isolamento e clonagem de um fragmento do gene da estaquiase sintase em sementes de *Glycine max* L. Merrill

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GAWAD, A.S. Effect of domestic processing on oligosaccharide content of some dry legume seeds. **Food Chemistry**, v.46, p.25-31, 1993.

ABDULLAH, A.; BALDWIN, R.E.; MINOR, H. Germination effects on flatus-causing factors and antinutrients of mungbeans and two strains of small-seeded soybeans. **Journal of Food Protection**, v.47, p.441-444, 1984.

ACEVEDO, E.; VELASQUE-CORONADO, L.; BRESSANI, R. Change in dietary fiber content and its composition as affected by processing of black beans (*Phaseolus vulgaris*, Tamazulapa variety). **Plant Foods for Human Nutrition**, v.46, p.139-145, 1994.

ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p.441-448, 2001.

BACHMANN, M.; MATILE, P.; KELLER, F. Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga reptans* L. Cold acclimation, translocation, and sink to source transition: Discovery of chain elongation enzyme. **Plant Physiology**, v.105, p.1335-1345, 1994.

BACHMANN, M.; KELLER, F. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. **Plant Physiology**, v.109, p.991-998, 1995.

BELLAVER, C.; SNIZEK, J.P.N. Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding. CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, PR. **Anais**, EMBRAPA-SPI, p.183-199, 1999.

BHASKAR, B.; RAMACHANDRA, G.; VIRUPAKSHA, T.K. α -Galactosidase of germinating seeds of *Cassia sericea* Sw. **Journal of Food Biochemistry**, v.14, p.45-59, 1990.

BOM, I.; WASSENAAR, D.; BOOT, J. Hybrid affinity chromatography of α -galactosidase from *Verbascum thapsus* L. **Journal of Chromatography A**, v.808, p.133-139, 1998.

BOOKWALTER, G.N. Fortification of dry soybean-based foods with DL-methionine. **Journal of Food Science**, v.40, p.266-79, 1975.

BRAUN, R.; KELLER, F. Vacuolar chain elongation of raffinose oligosaccharides in *Ajuga reptans*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.27, p.743-746, 2000.

BRYANT, R.J.; RAO, D.R.; OGUTU, S. α and β -Galactosidase activities and oligosaccharide content in peanuts. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.58, p.213-223, 2004.

BULPIN, P.V.; GIDLEY, M.J.; JEFFCOAT, R.; UNDERWOOD, D.J. Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant α -galactosidase. **Carbohydrate Polymers**, v.12, p.155-168, 1990.

BURROWS, S. Baker's yeast. In: ROSE, A.H. **Economic Microbiology**. London: Academic Press, p.31-64, 1979.

CASTILHO, E.M.; DE LÚMEN, B.O.; REYES, P.S.; DE LÚMEN, H.Z. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.38, p.351-355, 1990.

CHARTTERTON, N.J.; HARISOM, P.A.; THORNLEY, W.R.; BENNETT, J. H. Sucrosyloligosaccharides and cool temperature growth in 14 forb species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.28, p.167-172, 1990.

CHIEN, S.F.; LIN-CHU, M. The conversion of group B red blood cells into group B by an alpha-galactosidase from taro (*Colocasia esculenta*). **Carbohydrate Research**, v.217, p.191-200, 1991.

CLARKE, J.H.; DAVIDSON, K.; RIXON, J.E.; HALSTEAD, J.R.; FRANSEN, M.P.; GILBERT, H.J.; HAZLEWOOD, G.P. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase, and α -galactosidase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.53, p.661-667, 2000.

COSTA, S.I.; MIYA, E. Composição química e qualidade organoléptica das principais variedades de soja cultivadas no Brasil. **Divulgando a pesquisa**, v.1, p.1-3, 1972.

COSTA, S.I.; MORI, E.E. Principais formas de aproveitamento da soja na alimentação humana. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.56, p.27-49, 1978.

COURTOIS, J.E.; PETEK, F. α -Galactosidase from coffee beans. **Methods in Enzymology**, v.8, p.565-670, 1966.

CRUZ, R., SILVA, A.I. Soybean (*Glycine max*), endogenous alpha-galactosidase and invertase during the germinative process. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.29, p.435-443, 1986.

CRUZ, R.; PARK, Y.K. Production of fungal α -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. **Journal of Food Science**, v. 47, 1973-1975, 1982.

CUADRA, C. de LA; MUZQUIZ, M.; BURBANO, C.; AYET, G.; CALVO, R.; OSAGIE, A.; CUADRADO, C. Alkaloid, α -galactoside and phytic acid changes in germinating lupin seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.66, p.357-364, 1994.

DAVEBY, Y.D.; ABRAHAMSSON, M.; ÅMAN, P. Changes in chemical composition during development of three different types of peas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.63, p.21-28, 1993.

DE REZENDE, S.T. **Teores de oligossacarídeos de rafinose em soja, purificação e caracterização de invertases e α -galactosidases de microrganismos**. Universidade de Brasília, Brasília- DF, p.166. (Tese de D.S), 1998.

DESHPANDE, S. S. Food legumes in human nutrition: a personal perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.32, p.333-363, 1992.

DEY, P.M. Biochemistry of α -galactosidic linkages in the Plant Kingdom. **Advanced Carbohydrates Biochemistry**, v.37, p.284-311, 1980.

DEY, P.M. D-galactoside containing oligosaccharides. In: DEY, P.M.; DIXON, R.A. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants, **New York: Academic Press**, p.53-129, 1985.

DEY, P.M. In: Methods in plant biochemistry. **London: Academic Press**, p.189-218, 1990.

DEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. Biochemistry of α -galactosidases. **Advanced Enzymology**, v.36, p. 91-130, 1972.

DHAR, M.; MITRA, M.; HATA, J.; BUTNARIU, O.; SMITH, D. Purification and characterization of *Phaseolus vulgaris* α -D-galactosidase isozymes. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.34, p.1055-1062, 1994.

DINNI, A.; SIMONE, F.; RAIMUNDO, R.; SENATORE, F. Oligosaccharides in five different *Vicia faba* cultivars. **Biochemistry Systematic Ecological**, v.17, p.559-561, 1989.

EGOUNLETY, M.; AWORH, O.C. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). **Journal of Food Engineering**, v.56, p.249-254, 2003.

EKVALL, J.; STEGMARK, R.; NYMAN, M. Content of low molecular weight carbohydrates in vining peas (*Pisum sativum*) after blanching and freezing – Effect of cultivar and cultivation conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.691-699, 2005.

EKVALL, J.; STEGMARK, R.; NYMAN, M. Content of low molecular weight carbohydrates in vining peas (*Pisum sativum*) related to harvest time, size and brine grade. **Food Chemistry**, v.94, p.513-519, 2006.

FALUYI, M.A.; ZHOU, X.M.; ZHANG, F.; LEIBOVITCH, S.; MIGNER, P.; SMITH, D.L. Seed quality of sweet white lupin (*Lupinus albus*) and management practice in eastern Canada. **European Journal of Agronomy**, v.13, p.27-37, 2000.

FIALHO, L.S.; GUIMARÃES, V.M.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; DIAS, L.A.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; JOSÉ, I.C.; TAVARES, S.T. Biochemical composition and indigestible oligosaccharides in *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.61, p.87-89, 2006.

FUJIMOTO, Z.; KANEKO, S.; MOMMA, M.; KOBAYASHI, H.; MIZUNO, H. Crystal Structure of Rice α -Galactosidase Complexed with D-Galactose. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.20313-20318, 2003.

GAO, Z.; SCHAFFER, A.A. A novel alkaline-alpha-galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. **Plant Physiology**, v.119, p.979-987, 1999.

GILBERT, G.A.; WILSON, C.; MADORE, MA. Root-Zone salinity alters raffinose oligosaccharide metabolism and transport in *Coleus*. **Plant Physiology**, v.115, p.1267-1276, 1997.

GOLDEN, K.D.; JOHN, M.A.; KEAN, E.A. β -Galactosidase from *Coffea arabica* and its role in fruit ripening. **Phytochemistry**, v.34, p.355-360, 1993.

GOLUBEV, A.M.; NAGEM, R.A.P.; NETO, J.R.B.; NEUSTROV, K.N.; ENEYSKAYA, E.V.; KULMINSKAYA, A.A.; SHABALIN, K.A.; SAVEL'EV, A.N.; POLIKARPOV, I. Crystal Structure of α -Galactosidase from *Trichoderma reesei* and Its Complex with Galactose: Implications for Catalytic Mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v.339, p.413-422, 2004.

GOMES, P. **A soja**. São Paulo: Nobel, p.152, 1978.

GUIMARÃES, V.M.; DE REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; FELIX, C.R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p.67-73, 2001.

GURJAR, M.M.; KHAN, M.I.; GAIKWAD, S.M. α -Galactosidase binding lectin from *Artocarpus hirsuta*: characterization of the sugar specificity and binding site. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1381, p.256-264, 1998.

HAIBACH, F.; HATA, J.; MITRA, M.; DHAR, M.; HARMATA, M.; SUN, P.; SMITH, D. Purification and characterization of a *Coffea canephora* α -D-galactosidase isozyme. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.181, p.1564-1571, 1991.

HERMAN, E.M.; SHANNON, L.M. Accumulation and subcellular localization of α -galactosidase in developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, v.77, n.4, p.886-890, 1985.

HINCHA, D.K.; ZUTHER, E.; HEYER, A.G. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1612, p.172-177, 2003.

HITZ, W.D.; CARLSON, T.J.; KERR, P.S.; SEBASTIAN, S.A. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. **Plant Physiology**, v.128, p.650-660, 2002.

HITZ, W.D.; SEBASTIAN, S.A.; GRACE, D.J.; STREIT L.G. Soybean plant producing seeds with reduced levels of raffinose saccharides and phytic acid. **United States, Patente 20030074685**. Data da publicação: 07 Janeiro, 2004.

HOBBS, L.; MITRA, M.; PHILLIPS, R.; SMITH, D. The activity of a blood type B specific exoglycosidase from *Glycine max*. **Clinica Chimica Acta**. v.247, p.7-21, 1996.

HOCH, G.; PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Purification and characterization of stachyose synthase from Lentil (*Lens culinaris*) seeds: galactopinitol and stachyose synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.366, p.75-81, 1999.

HOLTHAUS, U.; SCHMITZ, K. Stachyose synthesis in mature leaves of *Cucumis melo*: purification and characterization of stachyose synthase (EC 2.4.1.67). **Planta**, v.184, p.525-531, 1991.

HORBOWICZ, M.; BRENAC, P.; OBENDORF, R.L. Fagopyritol B1, O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- D-*chiro*-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. **Planta**, v. 205, p.1-11, 1998.

HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R.L. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey. **Seed Science and Research**, v.4, p. 385-405, 1994.

INAN HAAB, C.; KELLER F. Purification and characterization of the raffinose oligosaccharide chain elongation enzyme, galactan:galactan galactosyltransferase (GGT), from *Ajuga reptans* leaves. **Physiologia Plantarum**, v.114, p.361-371, 2002.

JONES, D.A.; DUPONT, M.S.; AMBROSE, M.J.; FRIAS, J.; HEDLEY, L.C. The discovery of compositional variation for the raffinose family of oligosaccharides in pea seeds. **Seed Science Research**, v.9, p.305-310, 1999.

KANDLER, O.; HOLF, H. Metabolism and function of oligosaccharides. In: Biochemistry of plants. Carbohydrates, **Academic Press, New York, Kagawa University**, v.15, p.117-131, 1980.

KARNER, U.; PETERBAUER, T.; RABOY, V.; JONES, D.A.; HEDLEY, C.L.; RICHTER, A. *myo*-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1981-1987, 2004.

KERR, P.S.; SEBASTIAN, S.A. Soybean products with improved carbohydrate composition and soybean plants. **United States, Patente 6147193**. Data da publicação: 14 Novembro, 2000.

KIM, W.D.; KOBAYASHI, O.; KANEKO, S. SAKAKIBARA, Y.; PARK, G.G.; KUSAKABE, I.; TANAKA, H.; KOBAYASHI, H. α -Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) cells. **Phytochemistry**, v.61, p.621-630, 2002.

KOBAYASHI, H.; SUZUKI H. Studies on the decomposition of raffinose by α -galactosidase of mold. II. Formation of mold pellet and its enzyme activity. **Journal of Fermentation Technology**, v.50, p.625-632, 1972.

KONTOS, F. E.; SPYROPOULOS, C.G. Seed coat inhibits the production of α -galactosidase and endo- β -mannanase in the endosperm of developing carob seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.34, p.787-793, 1996.

KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugar and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v.88, p.829-832, 1988.

KU, S.; WEI, L.S.; STEIMBERG, M.P.; NELSON, A.I.; HYMOWITZ, T. Extraction of oligosaccharides during cooking of whole soybean. **Journal Food Science**, v.41, p.361-364, 1976.

LAHUTA, L.B.; GORECKI, R.J.; MICHALCZYK, D.; PIOTROWICZ-CIESLAK, A.I. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v.3, p.1-10, 2000.

LIU, J.J.; ODEGARD, W.; DE LÚMEN, B.O. Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf. Purification and N-terminal sequences. **Plant Physiology**, v.109, p.505-511, 1995.

LYIMO, M.; MUGULA, J.; ELIAS, T. Nutritive composition of broth from selected bean varieties cooked for various periods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.58, p.535-539, 1992.

MACHAIAH, J.P.; PEDNEKAR, M.D. Carbohydrate composition of low dose radiation-processed legumes and reduction in flatulence factors. **Food Chemistry**, v.79, p.293-301, 2002.

MARRACCINI, P.; ROGERS, W.J.; CAILLET, V.; DESHAYES, A.; GRANATO, D.; LAUSANNE, F.; LECHAT, S.; PRIDMORE, D.; PÉTIARD, V. Biochemical and molecular characterization of α -D-galactosidase from coffee beans. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.909-920, 2005.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; VIDAL-VALVERDE, C. Functional Lupin seeds (*Lupinus albus* L. And *Lupinus luteus* L.) after extraction of α -galactosides. **Food Chemistry**, v.98, p.291-299, 2006.

MATHEW, C.D.; BALASUBRAMANIAM, K. Mechanism of action of α -galactosidase. **Phytochemistry**, v.26, p.1299-1300, 1987.

MEIS, S.J.; FEHR, W.R.; SCHNEBLY, S.R. Seed source effect on field emergence of soybean lines with reduced phytate and raffinose saccharides. **Crop Science**, v.43, p.1336-1339, 2003.

MOREIRA, A.M. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR, **Anais**, EMBRAPA-SPI, p.99-104, 1999.

MULIMANI, V.H.; THIPPESWAMY, S.; RAMALINGAM. Enzymatic degradation of oligosaccharides in soybean flours. **Food Chemistry**, v.59, p.279-282, 1997.

MULIMANI, V.H.; DEVENDRA, S. Effect of soaking, cooking and crude α -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of red gram flour. **Food Chemistry**, v.61, p.475-479, 1998.

MULYOWIDARSO, R.K.; FLEET, G.H.; BUCKLE, K.A. Changes in the concentration of carbohydrates during the soaking of soybeans for tempe production. **International Journal of Food Science and Technology**, v.26, p.595-606, 1991.

NEUS, J.D.; FEHR, W.F.; SCHNEBLY, S.R. Agronomic and seed characteristics of soybean with reduced raffinose and stachyose. **Crop Science**, v.45, p.589-592, 2005.

NUNES, A.C.S.; VIANNA, G.R.; CUNEO, F.; AMAYA-FARFÁN, J.; CAPDEVILLE, G.; RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated silencing of the *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. **Planta**, v.224, p.125-132, 2006.

OBENDORF, R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research**, v.7, p.63-74, 1997.

OBENDORF, R.L., HORBOWICZ, M., DICKERMAN, A.M., BRENAC, P. AND SMITH, M. Soluble oligosaccharides and galactosyl cyclitols in maturing soybean seeds in Planta and in vitro. **Crop Science**, v.38, p.78-84, 1998.

OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, V.M.; BORGES, E.E.L.; FIALHO, L.S.; OLIVEIRA, M.G.A.A.; DE REZENDE, S.T. Purificação e caracterização de α -galactosidase de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli. **Revista Árvore**, v.29, n.4, p.535-543, 2005.

PAES, M.C.D. Princípios básicos de nutrição e uso da soja na alimentação humana. **EMBRAPA-CNPSo**, Londrina, PR, p.52, 1994.

PARSONS, C.M.; ZHANG, Y.; ARABA, M. Nutritional evaluation of soybean meals varying in oligosaccharide content. **Poultry Science**, v.79, p.1127–1131, 2000.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean. Purification and characterization of stachyose synthase. **Plant Physiology**, v.117, p.165-172, 1998.

PETERBAUER, T.; LAHUTA, L.B.; BLÖCHL, A.; MUCHA, J.; JONES, D.A.; HEDLEY, R.J.G.; RICHTER, A. Analysis of the raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition. **Plant Physiology**, v.127, p.1764-1772, 2001.

PETERBAUER, T.; MACH, L.; MUCHA, J.; RICHTER, A. Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. **Planta**, v.215, p.839-846, 2002.

PETERBAUER, T.; KARNER, U.; MUCHA, J.; MACH, L.; JONES, D.A.; HEDLEY, C.L.; RICHTER, A. Enzymatic control of the accumulation of verbascose in pea seeds. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p.1385-1391, 2003.

PETTERSON, D.S.; FAIRBROTHER, A.H. Lupins as a raw material for human foods and animal feeds. **Indonesian Food Nutrition Program**, v.3, p.35-41, 1996.

PETTERSON, D.S.; SIPSAS, S.; MACKINTOSH, J.B. The chemical composition and nutritive value of Australian pulses (2nd ed.). **Canberra: Grains Research and Development Corporation**, 1997.

PRICE, K.R.; LEWIS, J.; WYATT, G.M.; FENWICK, G.R. Flatulence-causes, relation to diet and remedies. **Nahrung**, v.32, p.609-626, 1988.

PUCHART, V.; VRŠANSKÁ, M.; BHAT, M.K.; BIELY, P. Purification and characterization of α -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1524, p.27-37, 2000.

PUGALENTHI, M.; SIDDHURAJU, V.; VADIVEL, V. Effect of soaking followed by cooking and the addition of α -galactosidase on oligosaccharides levels in different *Canavalia* accessions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.512-517, 2006.

RABOY, V.; YOUNG, K.A.; DORSCH, J.A.; COOK, A. Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.489-497, 2001.

RABOY, V. Progress in breeding low phytate crops. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p.503S-505S, 2002.

REDDY, N.R.; SALUNKHE, D.K. Changes in oligosaccharides during germination and cooking of black gram and fermentation of black gram/rice blend. **Cereal Chemistry**, v.57, p.354-360, 1980.

REHMS, H.; BARZ, W. Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempe-producing *Rhizopus fungi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p.47-52, 1995.

REID, J.S.G.; MEIER, H. Enzyme activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidases and β -mannosidase by the aleurone layer. **Planta**, v.112, p.301-308, 1973.

RIBEIRO, M. **Estabelecimento de um método colorimétrico para determinação da atividade de galactinol sintase, purificação parcial e caracterização da enzima de sementes de soja**. Universidade de Brasília, Brasília-DF, p.125. (Tese D.S), 2001.

RUIZ, A.; ACOSTA, M.; CISNEROS, F. Utilizacion de enzimas en los procesos de obtencion de leche y derivados de la soya. **Alimentaria**, v.33, p.127-132, 1995.

SANNI, A.I.; ONILUDE, A.A.; OGUNDOYE, O.R. Effect of bacterial galactosidase treatment on the nutritional status of soybean seeds and its milk derivative. **Nahrung**, v.41, p.18-21, 1997.

SARAVITZ, D.M.; PHARR, D.M.; CARTER, T.E Jr. (1987). Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, v.83, p.185-189, 1987.

SAT, I.G.; KELES, F. The effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of Seker a dry bean variety (*P. vulgaris*, L) grown in Turkey. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.1, p.206-208, 2002.

SEBASTIAN, S.A.; KERR, P.S.; PEARLSTEIN, R.W.; HITZ, W.D. Soybean germplasm with novel genes for improved digestibility. In DRACKLEY, J.K. (Ed.). Soy in animal nutrition. **Federation of Animal Science Societies, Savoy, IL**, p.56-74, 2000.

SILVA, H.C.; BRAGA, G.L. Effect of soaking and cooking on the oligosaccharide content of dry beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Journal of Food Science**, v.47, p.924-925, 1982.

SKULINOVA, M.; KADLEC, P.; KAASOVÁ, J.; DOSTÁLOVÁ, J.; ZÁTOPKOVÁ, M.; HOSNEDL, V.; HRACHOVINOVÁ, J. Microwave treatment and drying of germinated pea. **Czech Journal Food Science**, v.20, p.23-30, 2002.

SOMIARI, R.I.; BALOGH, E. Hydrolysis of raffinose and stachyose in cowpea (*Vigna unguiculata*) flour, using alpha-galactosidase from *Aspergillus niger*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.8, p.564-566, 1992.

SOMIARI, R.I.; BALOGH, E. Effect of soaking, cooking and crude α -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of cowpea flours. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.61, p.339-343, 1993.

SOMIARI, R.I.; BALOGH, E. Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.311-316, 1995.

SPANGENBERG, P.; ANDRÉ, C.; DION, M.; RABILLER, C.; MATTES, R. Comparative study of new α -galactosidases in transglycosylation reactions. **Carbohydrate Research**, v.329, p.65-73, 2000.

SPRENGER, N.; KELLER, F. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. **The plant Journal**, v.21, p.249-258, 2000.

STEADMAN, K.; PRITCHARD, H.W.; DEY, P.M. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. **Annals of Botany**, v.77, p.667-674, 1996.

STEGGERDA, F.R.; DIMMICK, J.F. Effect of bean diet on concentration of carbon dioxide in flatus. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.19, p.120-124, 1966.

SUAREZ, F.L.; SPRINGFIELD, J.; FURNE, J.K.; LOHRMANN, T.T.; KERR, P.S.; LEVITT, M.D. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. **American Journal Clinical Nutrition**, v.69, p.35-139, 1999.

SUPARMO, M.P. Tempeh prepared from germinated soybeans. **Journal of Food Science**, v.52, p.1736-1737, 1987.

TANNER, W.; KANDLER, O. *myo*-Inositol, a cofactor in the biosynthesis of stachyose. **European Journal and Biochemistry**, v.4, p.233-239, 1968.

TAPERNOUX-LÜTHI, E.M.; BOHM, A.; KELLER, F. Cloning, functional expression, and characterization of the raffinose oligosaccharide chain elongation enzyme, galactan:galactan galactosyltransferase, from common bugle leaves. **Plant Physiology**, v.134, p.1377-1387, 2004.

TAPERNOUX-LÜTHI, E.M.; SCHNEIDER, T.; KELLER, F. The C-terminal sequence from common bugle leaf galactan:galactan galactosyltransferase is a non-sequence-specific vacuolar sorting determinant. **Federation of European Biochemical Societies**. Publicação online, 2007.

THANANUNKUL, D.; TANANKA, M.; CHICHESTER, C.O.; LEE, T.C. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by α -galactosidase within polyacrylamide gel. **Journal of Food Science**, v.41, p.173-175, 1976.

THIPPESWAMY, J.S.; MULIMANI, V.H. Enzymatic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized α -galactosidase from *Gibberella fujiduroi*. **Process Biochemistry**, v.38, p.635-640, 2002.

TOPALOGLU, A.K.; ASHLEY, G.A.; TONG, B.; SHABBEER, J.; ASTRIN, K.H.; ENG, C.M.; DESNIK, R.J. Twenty novel mutations in the α -galactosidase A gene causing Fabry disease. **Molecular Medicine**, v.5, p.806-811, 1999.

TRUGO, L.C.; FARAH, A.; CABRAL, L. Oligosaccharide distribution in Brazilian soya bean cultivars. **Food Chemistry**, v.52, p.385-387, 1995.

VARBANETS, L.D.; MALANCHUK, V.M.; BUGLOVA, T.T.; KUHLMANN R.A. *Penicillium* sp.23 α -galactosidase: purification and substrate specificity. **Carbohydrate Polymers**, v.44, p.357-363, 2001.

VIANA, P.A. **Caracterização cinético-bioquímica e aplicações biotecnológicas de α -galactosidases de *Debaryomyces hansenii* UFV-1**. Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG, p.170. (Tese M.S), 2005.

VIANA, S.F; GUIMARÃES, V.M.; JOSÉ, I.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; COSTA, N.M.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; DE REZENDE, S.T. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 93, p.665-670, 2005.

VIANA, P.A.; DE REZENDE, S.T.; MARQUES, V.M.; TREVIZANO, L.M.; PASSOS, F.M.L.; OLIVEIRA, M.G.A.; BEMQUERER, M.P.; OLIVEIRA, J.S.; GUIMARÃES, V.M. Extracellular α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2385-2391, 2006.

WAGNER, J.R.; BECKER, R.; GUMBMAN, R.; OLSON, A.C. Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose, oligosaccharides-free bean residue. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v.56, p.3-13, 1976.

YAKLICH, R.W. Effect of aging on soluble oligosaccharide content in soybean seeds. **Crop Science**, v.25, p.701-704, 1985.

ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase. **Gene**, v.140, p.227-231, 1994.

ZUTHER, E.; BUCHEL, K.; HUNDERTMARK, M.; STITT, M.; HINCHA, D.K.; HEYER, A.G. The role raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, v.576, p.169-173, 2004.

CAPÍTULO 1

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DE UMA α -GALACTOSIDASE EM SEMENTES DE *Tachigali multijuga* Benth

RESUMO

As α -galactosidases são enzimas que catalisam a clivagem de resíduos de D-galactose α -1,6 terminais de galactooligossacarídeos (GO) e outros polissacarídeos. Entre várias aplicações, a enzima é utilizada na hidrólise dos GO presentes em extratos hidrossolúveis de soja, pois estes açúcares causam desconforto intestinal e flatulência em humanos. Os objetivos deste trabalho foram purificar e caracterizar cineticamente uma α -galactosidase de sementes de *Tachigali multijuga* e avaliar seu potencial para aplicação biotecnológica. Os ensaios enzimáticos consistiram de uma mistura de reação contendo 650 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, 100 μ L de extrato enzimático e 250 μ L de p -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (p NP α Gal) 2 mM. A reação foi conduzida por 15 min a 40 °C e parada pela adição de 1 mL de Na₂CO₃ 0,5 M. Máxima atividade da α -galactosidase foi encontrada em pH 5,0-5,5 na temperatura de 50 °C. A enzima reteve 65% de atividade após 200 h de incubação a 40 °C. A α -galactosidase foi específica para hidrólise de resíduos de galactose α -1,6 terminais, e foi inibida totalmente por SDS, Hg²⁺, Cu²⁺ e Ag²⁺. Os valores de K_M para os substratos p NP α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose foram 0,45; 5,37; 39,62 e 48,80 mM, respectivamente. A inibição por D-galactose foi competitiva (K_i = 2,74 mM). Os valores estimados de Energia de Ativação foram 13,86 e 4,75 kcal/mol para os substratos p NP α Gal e rafinose, respectivamente. A α -galactosidase não hidrolisou eficientemente os GO presentes na farinha desengordurado de soja, mas foi capaz de hidrolisar goma guar e goma de alfarroba, indicando uma possível aplicação industrial.

Palavras-chave: *Tachigali multijuga* Benth; α -galactosidase; galactooligossacarídeos; goma guar; goma de alfarroba; farinha de soja.

1. INTRODUÇÃO

As α -galactosidases de plantas (α -D-galactoside galactohidrolase; EC 3.2.1.22) pertencem à família 27 das galactosil hidrolases, e ocorrem em sementes, frutos, folhas e tubérculos (KELLER e PHARR, 1996). Nas sementes, durante a germinação, uma função da enzima é na mobilização de resíduos de D-galactosil presentes nos galactooligossacarídeos (GO) como rafinose e estaquiose (GUIMARÃES et al., 2001). O metabolismo dos GO ocorre primeiramente via hidrólise pela α -galactosidase, que é uma exoglicosidase que hidrolisa resíduos de D-galactose ligados α -1,6. As sementes têm uma alta demanda por energia durante os estádios iniciais da germinação. Os GO desaparecem rapidamente após embebição da semente, e, sua quebra é freqüentemente completada antes da mobilização de polissacarídeos, indicando que eles podem apresentar um papel especial, fornecendo energia para a germinação (BLÖCHL et al., 2007). Em adição, a α -galactosidase é uma das três enzimas principais envolvidas na modificação ou degradação de galactomananas de parede celular, principalmente durante a germinação (REID e MEIER, 1973).

Entretanto, as α -galactosidases têm chamado a atenção em processos biotecnológicos devido à sua capacidade de hidrolisar rafinose em açúcar de beterraba, para facilitar a cristalização e, conseqüentemente, aumentar o rendimento da sacarose (GANTER et al., 1988). Também foi proposto o uso da

α -galactosidase para hidrolisar os GO em leite de soja e outras comidas derivadas de leguminosas (FALKOSKI et al., 2006). A presença dos GO em derivados de soja promove distúrbios gastrointestinais e redução na absorção de nutrientes em humanos e animais monogástricos, após consumo (VIANA et al., 2006). Esta enzima foi indicada na modificação de galactomananas para melhorar sua propriedade gélica (BULPIN et al., 1990). Algumas α -galactosidases de plantas são capazes de remover unidades de D-galactose terminal (ligações α -1,3) da superfície de carboidrato do grupo sanguíneo B, convertendo-o em grupo sanguíneo O (ZHU e GOLDSTEN, 1994).

As sementes da espécie florestal brasileira *Tachigali multijuga* Benth, uma leguminosa da família das Caesalpinoideae, demonstrou alta atividade de α -galactosidase durante a germinação após quebra de dormência (BORGES et al., 2004). Entretanto, poucos estudos têm sido feitos sobre esta espécie tropical.

Os objetivos deste trabalho foram purificar e caracterizar bioquímica e cineticamente a enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* e investigar possível aplicação biotecnológica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos e de Análises Bioquímicas, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Reagentes utilizados

Os reagentes, melibiose, rafinose, estaquiose, galactose, p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ NP α Gal), solução de 4 % (p/v) CuSO₄, goma guar e goma de alfarroba foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

Da Merk S. A. Indústrias Químicas foram obtidos os seguintes reagentes: ρ -nitrofenol (ρ NP), sacarose, glicose e AgNO₃.

As resinas cromatográficas DEAE-Sephacel Fast Flow e Sephadex G-150 Fast Flow foram obtidas da Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden.

Os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho apresentavam procedência e grau de pureza analíticos.

O extrato de soja desengordurado foi fornecido pela Empresa Bunge Alimentos S/A, Esteio – RS – Brasil. O extrato é um subproduto da extração de óleo a partir de sementes de soja, apresentando 59,5 % de proteínas, 32,3 % de carboidratos e 0,04 % de lipídios (VIANA, 2002).

2.2. Material genético

Foram utilizadas sementes de *Tachigali multijuga* fornecidas pelo Laboratório de Análises de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

2.3. Determinação da composição da semente de *Tachigali multijuga*

2.3.1. Determinação da matéria seca, lipídeos, carboidratos e cinzas

O teor de água nas sementes foi feito de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1976). Aproximadamente 3 g de amostra foram colocada em estufa a 105 °C, por 24 h. Após esse tempo, as amostras foram novamente pesadas e a matéria seca, determinada por diferença.

A extração de lipídeos foi feita em aparelho extrator de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito em Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1975)., com refluxo por 24 h.

A determinação da quantidade de carboidrato total e cinzas foi feita como descrito em Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1975).

2.3.2. Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl

A quantidade de proteínas nas sementes de *Tachigali multijuga* foi determinada de acordo com o método de Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total, descrito pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1975), com modificações. Após a fase de digestão, ao material digerido, foi adicionado peróxido de hidrogênio a 30 %, levando a mistura ao aquecimento por mais 30 min. Na fase de destilação, a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico a 4%. O fator de conversão de nitrogênio em proteína foi 6,25.

2.4. Quantificação dos galactooligossacarídeos (GO) nas sementes de *Tachigali multijuga*

2.4.1. Extração dos GO

A extração dos GO nas sementes de *Tachigali multijuga* foi conduzida como descrita por GUIMARÃES et al. (2001), com modificações. Aproximadamente 100 mg das amostras liofilizadas e pesadas em tubos tipo *ependorf* foram usadas para o processo de extração dos açúcares solúveis. A fração óleo, presente nas amostras foi retirada em 4 extrações com 1 mL de éter de petróleo a 42 °C, por 5 min. Os açúcares foram então extraídos em 3 etapas de tratamento com etanol 80 %, a 100 °C, por 5 min. Após cada extração feita com éter de petróleo ou álcool 80 %, a mistura foi submetida à centrifugação em centrífuga do tipo *Eppendorff* 5415C, 14.000 rpm, por 20 min. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C, os açúcares foram ressuspensos em 1 mL de etanol 80 % e congelados a - 20 °C. Após 24 h, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições já descritas, passadas em filtro Millipore de 0,45 micra de diâmetro e armazenadas a - 20 °C, para posterior análise por CLAE.

2.4.2. Determinação do teor de oligossacarídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os GO extraídos das sementes de *Tachigali multijuga* foram analisados por CLAE em cromatógrafo Shimadizu série 10A, equipado com detector de índice de refração, uma coluna em aço inox (25 X 0,465 cm) contendo a fase estacionária o grupo aminopropil (-NH₂). A mistura acetonitrila-água (80:20) em condições isocráticas foi a fase móvel. As análises foram realizadas a 35 °C sob o fluxo de 1 mL/min e todo o processo foi controlado por um computador acoplado ao sistema.

O método foi padronizado para determinação quantitativa dos açúcares solúveis presentes nos produtos derivados da soja. A partir de uma solução estoque formada pela mistura dos açúcares sacarose, rafinose e estaquiose nas concentrações de 4, 8 e 8 % (p/v), respectivamente, foram feitas diluições para obtenção das soluções padrão. Cada solução foi injetada no cromatógrafo líquido

para obtenção das curvas, correlacionando a área do pico com a concentração do açúcar na solução. As retas foram obtidas por regressão linear. Um volume de 20 µL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada açúcar presente foi identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenções e concentrações dos açúcares nas soluções padrão. Todos os cálculos foram feitos pelo computador acoplado ao sistema de CLAE, equipado com o programa LC-10 versão 2.2 para Windows.

2.5. Germinação das sementes

2.5.1. Quebra de dormência da semente

A quebra de dormência foi realizada com a mistura das sementes de *Tachigali multijuga* em ácido sulfúrico concentrado, agitando por 30 min. Após esse tempo, as sementes foram lavadas em água corrente em abundância. As sementes foram colocadas em papel toalha para secar.

2.5.2. Condições da germinação

As sementes foram selecionadas e colocadas para germinar em placas de *Petri* sobre duas folhas de papel *Germitest* previamente embebidas em água destilada, cobertas com uma terceira folha do papel também embebida em água. As placas foram colocadas em câmara de germinação a 27 °C, com umidade e luminosidade controladas. Nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 116 h, amostras de sementes foram retiradas da câmara de germinação e congeladas para posterior determinação da atividade da enzima α -galactosidase. Foram utilizados como fonte da enzima, os cotilédones e embriões.

2.6. Purificação da α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*

2.6.1. Preparo do extrato enzimático

A enzima α -galactosidase de *Tachigali multijuga* foi extraída das sementes germinadas por 108 h. As sementes foram trituradas em liquidificador. Para cada 3 sementes germinadas foram usados 10 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e centrifugadas a 15300 x g por 35 min, a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios de atividade de α -galactosidase e para a determinação da concentração de proteínas.

A α -galactosidase de sementes de *Tachigali multijuga* germinadas foi purificada de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1.

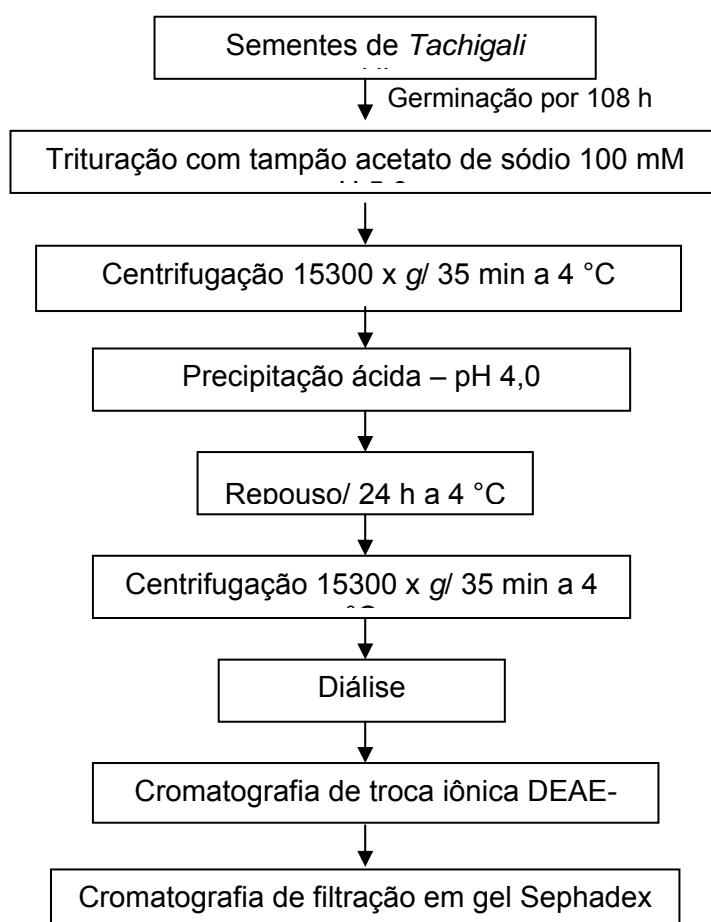


Figura 1 - Esquema das etapas de purificação da enzima α -galactosidase de sementes de *Tachigali multijuga* germinadas.

2.6.2. Precipitação ácida

O sobrenadante do extrato protéico das sementes *Tachigali multijuga* germinadas foi, então, submetido a uma precipitação ácida com a adição de ácido cítrico até atingir pH 4,0. Após agitação por 30 min, o extrato foi novamente centrifugado sob as mesmas condições descritas acima.

2.6.3. Diálise

Após a precipitação ácida, o sobrenadante foi dialisado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 durante à noite a 4 °C.

2.6.4. Cromatografia de troca iônica

A amostra obtida após a diálise foi submetida à cromatografia de troca iônica, em uma coluna (17 x 3,0 cm) de DEAE-Sephacel Fast Flow, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5. As proteínas foram eluídas com 200 mL desse tampão, seguido por um gradiente salino crescente formado por 200 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 e 200 mL do mesmo tampão contendo 1 M de NaCl, a 4 °C, com fluxo de 40 mL/h. Frações de 4,0 mL foram coletadas. As frações eluídas apresentando atividade de α -galactosidase foram reunidas e concentradas pelo uso de um Amicon ultrafiltration cell model 8400 (Bedford, MA) com uma membrana com poro de 10 kDa.

2.6.5. Cromatografia de filtração em gel

A amostra contendo as frações reunidas com atividade de α -galactosidase, proveniente da cromatografia de troca iônica, foi submetida à cromatografia de filtração em gel em uma coluna (90,0 x 2,6 cm) de Sephadex G-150 equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,5. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão a 4 °C, com fluxo contínuo de 20 mL/h e coletadas em frações de 3,3 mL. As frações com atividade de α -galactosidase foram reunidas.

2.7. Determinação da atividade da α -galactosidase

2.7.1. Com o substrato sintético ρ NP α Gal

Para os ensaios de atividade da α -galactosidase com o substrato sintético ρ NP α Gal, as misturas de reações continham 650 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 μ L de solução ρ NP α Gal 2 mM e 100 μ L do extrato enzimático. As reações foram conduzidas por 15 min, em banho-maria a 40 °C e interrompidas pela adição de 1 mL de solução de Na₂CO₃ 0,5 M. Os valores de absorbância obtidos a 410 nm foram transformados em μ moles de ρ NP, utilizando uma curva padrão construída com 0-0,2 μ moles de ρ NP a partir de uma solução estoque de concentração 2 μ moles/mL. Este procedimento foi definido como ensaio padrão. Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de ρ NP por min, nas condições de ensaio.

2.7.2. Com açúcar não-redutor

Para os ensaios da atividade da α -galactosidase com o açúcar redutor, melibiose, a glicose liberada da reação foi determinada por meio do método da glicose oxidase (BERGMEYER e BERNT, 1974). O ensaio foi conduzido com 500-800 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 100 μ L de solução de açúcar redutor 10 mM (melibiose) e 100 μ L de extrato enzimático. A reação foi conduzida por 30 min a 40 °C sendo interrompida pela imersão dos tubos em banho de água fervente, por 5 min, sendo depois colocadas em água fria. Da mistura da reação foram coletados 150 μ L de cada tubo e adicionado 1 mL do reativo de glicose oxidase e incubados por 15 min a 37 °C. A concentração de glicose formada foi estimada espectrofotometricamente a 510 nm por uma curva padrão construída com 0-0,01 μ moles de glicose, utilizando-se uma solução estoque de concentração 1 mg/mL. Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de glicose por min, nas condições de ensaio.

2.7.3. Com açúcar redutor

Para os ensaios com os substratos sacarose, rafinose e estaquiose, as atividades da α -galactosidase foram determinadas medindo-se a quantidade de açúcar redutor produzida com o uso do reagente 3,5-dinitrossalicilato (DNS) pelo método de MILLER (1956). A mistura de reação continha 700-800 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 100-150 μ L de solução de substrato sacarose (100), rafinose (50 mM) ou estaquiose (150 mM) e 100 μ L de extrato enzimático. O ensaio foi conduzido por 30 min a 40 °C. Após este período, foi adicionado 1 mL do reagente DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e deixadas em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Os valores de absorvância obtidos a 550 nm foram transformados em μ moles de glicose, utilizando uma curva padrão construída com 0-2,0 μ moles de glicose, a partir de uma solução estoque de concentração 2 mg/mL. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por min, nas condições de ensaio.

2.7.4. Com outros substratos sintéticos

Os ensaios da atividade da α -galactosidase foram idênticos ao descrito no item 2.7.1, exceto que foram utilizados os substratos p -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (p NP β Gal), o -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (o NP β Gal), o -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (o NP β Glc), p -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (p NP α Glc), p -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (p NP β X), p -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (p NP α A) e p -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (p NP α M).

2.7.5. Com polímeros

Ensaio para atividade da α -galactosidase foram realizados com polímeros, como goma de alfarroba e goma guar (Sigma) como substratos, com o uso do reagente 3,5-dinitrossalicilato (MILLER, 1956), como descrito no item 2.7.3. O ensaio foi conduzido por 180 min, a 35 °C, sendo constituído de 300 μ L

do extrato enzimático, 500 μL de solução do polímero a 1 % (p/v) e 200 μL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0.

2.8. Determinação da concentração de proteína nos extratos enzimáticos

Os teores protéicos nas preparações enzimáticas da α -galactosidase foram determinados conforme descrito por BRADFORD (1976).

Uma mistura de reação contendo solução de proteínas (0-1300 μL) e 200 μL do reagente de Bradford foi deixada em repouso por 15 min a temperatura ambiente. A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm, e a concentração das proteínas foi obtida por uma curva padrão construída com 0-48 μg de albumina sérica bovina (BSA). O reagente de Bradford concentrado 5 vezes foi preparado misturando-se 250 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 125 mL de etanol 95 % (v/v) e 250 mL de ácido fosfórico 85 % (v/v). Após solubilização, o volume foi completado para 500 mL e agitado por 30 min, filtrando-se a solução em papel Whatman nº1. Este método baseia-se no desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o pigmento *Coomassie Brilliant Blue G-250*.

2.9. Determinação do grau de pureza e da massa molecular da α -galactosidase

2.9.1. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), contendo SDS e β -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970). Os minigéis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 mol/L, pH 8,8, para o gel separador e tampão Tris/HCl 0,5 mol/L, pH 6,8, para o gel empilhador, persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e, N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED). As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 80 V, em placas do Sistema Mini-Gel (Sigma Chemical Co.). As amostras submetidas à eletroforese foram,

anteriormente, precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 50 %, lavadas com acetona gelada e adicionadas ao tampão de amostra desnaturante 3 vezes concentrado (Tris/HCl, 0,19 M, pH 6,8, 2,3 % (p/v) de SDS, 1 % (v/v) de glicerol, 5 % (v/v) de β -mercaptoetanol e azul de bromofenol), fervidas durante 5 min e aplicadas no gel (LAEMMLI, 1970).

Os marcadores de massa molecular foram os seguintes: albumina sérica bovina (BSA) (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-P desidrogenase (36 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), Inibidor de tripsina (20,1) e α -Lactoalbumina (14,2 kDa). As massas moleculares das frações protéicas foram estimadas correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, os perfis de migração das proteínas-padrão (distância relativa percorrida no gel) com o logaritmo da massa molecular.

2.9.2. Coloração dos géis de eletroforese

As proteínas presentes nos géis foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por BLUM et al. (1987).

Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em 100 mL de solução fixadora (metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38 em volume) por no mínimo 2 h, seguido de 3 lavagens de 10 min com solução de etanol 50 %. Os géis foram lavados por 1 min, em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Os géis foram rapidamente lavados com água destilada e incubados, por 20 min, em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37 μ L de formaldeído 37 % (v/v) e lavados 3 vezes, por 30 segundos, com água destilada. Posteriormente, os géis foram tratados com a solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50 μ L de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas protéicas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético.

2.10. Caracterização enzimática

2.10.1. Efeito do pH

Para a determinação do valor de pH ótimo de atividade da α -galactosidase, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 2.7.1, exceto que, o ensaio foi realizado em diferentes valores de pH, utilizando-se tampões McIlvaine (McLLVAINE, 1921), na faixa de 3,0 a 7,0.

2.10.2. Efeito do pH na estabilidade e atividade da α -galactosidase

O efeito do pH na estabilidade da α -galactosidase foi testado incubando-se a enzima na faixa de pH 3,0 a 7,0 por 15 e 30 min a 40 °C. Após o período de incubação, a atividade da enzima foi conduzida como descrito no item 2.7.1.

2.10.3. Efeito da temperatura

Para a determinação da temperatura ótima de atividade da α -galactosidase, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 2.7.1, exceto o ensaio que foi conduzido em temperaturas compreendidas entre 30 e 60 °C.

2.10.4. Análise de termoestabilidade

A estabilidade térmica da α -galactosidase foi testada em várias temperaturas. Alíquotas (0-100 μ L) da enzima purificada juntamente com solução tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, foram pré-incubadas nas temperaturas de 35 °C (por 0-260 h), 40 °C (por 0-36 h), 45 e 50 °C (por 0-180 min). Após cada tempo de pré-incubação, 250 μ L do substrato pNP α Gal 2 mM foi adicionado e os ensaios para as atividades das α -galactosidases foram conduzidos como descrito no item 2.7.1.

2.10.5. Meia-vida da α -galactosidase

O ensaio para determinar a meia-vida da enzima, ou seja, o tempo necessário para que a atividade enzimática seja reduzida pela metade, foi feito utilizando-se 40 μ L da enzima purificada e 710 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. As misturas foram pré-incubadas nas mesmas temperaturas e tempos utilizados na determinação das termoestabilidades. Após cada tempo de pré-incubação, foram adicionados 250 μ L do substrato ρ NP α Gal 2 mM e os ensaios para as atividades das α -galactosidases foram conduzidos nas temperaturas de pré-incubação, como descrito no item 2.7.1.

2.10.6. Determinação da especificidade da α -galactosidase para diversos substratos

Ensaio enzimáticos foram realizados com diversos substratos sintéticos, naturais e polímeros com o objetivo de determinar a especificidade da enzima purificada.

A atividade da α -galactosidase foi estimada com outros substratos sintéticos, além do *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ NP α Gal), como *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ρ NP β Gal), *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (*o*NP β Gal), *o*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*o*NP β Glc), *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ NP α Glc), *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NP β X), *p*-nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (ρ NP α A) e *p*-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (ρ NP α M). Os ensaios foram realizados como descrito no item 2.7.4.

A atividade da α -galactosidase foi estimada com melibiose como descrito no item 2.7.2, com os açúcares rafinose e estaquiose como descrito no item 2.7.3 e, polímeros como gomo de alfarroba e goma guar, conforme descrito no item 2.7.5.

2.10.7. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase

Os efeitos de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase foram analisados utilizando-se 450 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 0-100 μ L das enzimas purificadas e 200 μ L de soluções 10 mM de cada um dos seguintes compostos: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), nitrato de prata, cloreto de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de potássio, sulfato de cobre, cloreto de cálcio, β -mercaptoetanol, cloreto de mercúrio, iodoacetamida, sacarose, melibiose, D-glicose e D-galactose. As misturas foram pré-incubadas em banho-maria por 15 min, a 40 °C e em seguida, foram adicionados 250 μ L do substrato ρ NP α Gal 2 mM e os ensaios padrão das atividades foram conduzidos conforme descrição no item 2.7.1.

2.10.8. Determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_M) e das velocidades máximas (V_{max})

Para obtenção dos valores de K_M e V_{max} , os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando-se concentrações crescentes dos substratos ρ NP α Gal, rafinose, estaquiose e melibiose. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos como descrito no item 2.7.1 e concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6; e 2 mM para ρ NP α Gal. A atividade da enzima com o substrato rafinose nas concentrações de 5; 7,5; 10; 12; 15; 20; 35; 50; 80; e 120 mM e estaquiose nas concentrações de 15; 25; 50; 75; 100; 150; e 200 mM foi medida pela formação de açúcar redutor com o uso do reagente 3,5-dinitrossalicilato (MILLER, 1956), como descrito no item 2.7.3. Com o substrato melibiose utilizaram-se as concentrações de 0,8; 1,2; 2,0; 3,5; 5,0; 8,0; 12; 25; 35 e 50 mM, sendo a atividade da enzima determinada pela formação de glicose livre utilizando-se o método da glicose oxidase (BERGMAYER e BERNT, 1974), como descrito no item 2.7.2.

Os valores de K_M e V_{max} foram calculados pela curva de velocidade em função da concentração de substrato, curva de Michaelis-Menten, pelo programa Sigma Plot , versão 9.0 para Windows.

2.10.9. Determinação da constante de inibição (K_i) da α -galactosidase

O valor de K_i foi determinado pela inclinação dos duplos recíprocos para o inibidor galactose, com a enzima purificada e o substrato ρ NP α Gal. Os ensaios das atividades enzimáticas com ρ NP α Gal foram realizados nas mesmas condições descritas no item 2.7.1, na ausência ou presença de 1,0; 2,0 e 3,0 mM de galactose, com concentrações de ρ NP α Gal que variaram de 0,1 a 1 mM.

2.10.10. Determinação da energia de ativação

A energia de ativação para o substrato ρ NP α Gal foi determinada utilizando o logaritmo da $V_{m\acute{a}x}$ nas temperaturas de 30, 35, 40, 45 e 50 °C e utilizando o gráfico de Arrhenius. Essas $V_{m\acute{a}x}$ foram determinadas utilizando os gráficos do duplo-recíproco em cada uma dessas temperaturas. Os ensaios para atividade foram realizados conforme descrito no item 2.7.1, sendo que os valores de concentração de substrato utilizados variaram entre 0,1 e 1 mM.

Para o substrato rafinose as temperaturas foram 35, 40, 45 e 50 °C, as concentrações de substrato variaram entre 12 e 75 mM e os ensaios foram realizados de acordo com o item 2.7.3.

2.11. Tratamento do extrato de soja desengordurado com a α -galactosidase

O extrato de soja desengordurado foi reconstituído em água na proporção de 1:10 (p/v), homogeneizado em agitador magnético por 10 min. Porções de aproximadamente 2 g do extrato reconstituído foram transferidas para erlenmeyers de 25 mL em triplicata. Foi adicionada, em cada erlenmeyer, uma quantidade de enzima correspondente a 8 U. Os erlenmeyers foram, então, incubados por 0, 4, 6 e 8 h em agitador rotatório com temperatura programada para 40 °C e 100 rpm.

Para a determinação da porcentagem de hidrólise dos GO presentes no extrato de soja desengordurado, essas preparações foram liofilizadas e os GO extraídos de 30 mg do pó obtido como descrito no item 2.4.1. Os GO foram quantificados como descrito no item 2.4.2. Os teores de GO determinados nos

extratos tratados com a enzima foram comparados àqueles das amostras não tratadas.

A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos GO presentes no extrato de soja desengordurado, em função do tempo de incubação com a enzima.

Uma unidade de atividade enzimática (1U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir um 1 μ mol de produto por min, nas condições de ensaio.

2.12. Tratamento de galactomananas com a α -galactosidase

A capacidade da α -galactosidase purificada de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* em hidrolisar polímeros de galactomanana foi verificada. Foi utilizado goma de alfarroba e goma guar como substrato para a enzima. Um volume de 0,5 mL de solução de enzima (3,1 U) foi misturado com 0,5 mL de solução de galactomanana 1 % (p/v). A mistura de reação foi incubada por à 40 °C por 0, 6, 12 e 24 h. Após o período de incubação, foi adicionado 1 mL do reagente DNS, as amostras foram fervidas por 5 min e deixadas em repouso por 10 min a temperatura ambiente. O conteúdo de açúcares redutores foi determinado de acordo com MILLER (1956).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição bioquímica das sementes de *Tachigali multijuga* e atividade de α -galactosidase durante a germinação

O conteúdo de proteínas, lipídeos, cinzas e carboidratos total foi determinado nas sementes maduras de *Tachigali multijuga* com o objetivo de determinar a composição centesimal. Os resultados demonstraram que as sementes maduras contêm 36,37 % de proteínas, 2,38 % de lipídeos, 3,53 % de cinzas e 57,72 % de carboidratos total.

Os galactooligossacarídeos (GO) também foram quantificados. Sacarose, rafinose e estaquiose estão presentes em sementes de *Tachigali multijuga* na concentração de $0,83 \pm 0,05$ %, $0,30 \pm 0,04$ % e $1,16 \pm 0,21$ %, respectivamente. Usualmente eles correspondem somente a uma menor fração dos carboidratos de sementes (ZIEGLER, 1995). Nas sementes de *Tachigali multijuga*, a quantidade de sacarose, rafinose e estaquiose correspondeu a 1,44 %, 0,52 % e 2,00 %, respectivamente, do total de carboidratos.

Já é bem conhecido, que os GO desaparecem rapidamente após embebição da semente e que eles são completamente hidrolisados antes dos carboidratos poliméricos (VIDAL-VALVERDE et al., 2002; EL-ADAWY et al., 2003), indicando que eles apresentam um papel especial no início da germinação. A α -galactosidase, enzima responsável pela quebra de GO e uma

das três enzimas requeridas para a hidrólise de galactomananas em sementes, tem, portanto, um importante papel durante a germinação. Em sementes de *Pisum sativum*, a inibição da α -galactosidase bloqueou a degradação de GO, levando a uma demora na germinação de alguns dias (BLÖCHL et al., 2007).

As sementes de *Tachigali multijuga* foram utilizadas como fonte da enzima α -galactosidase. Uma vez que esta enzima é importante para a germinação, as sementes de *Tachigali multijuga* foram colocadas para germinar conforme descrito no item 2.5, com o objetivo de induzir a atividade enzimática da α -galactosidase. Este passo foi importante para os procedimentos de purificação, os quais necessitam da enzima com alta atividade. Os resultados demonstraram que a atividade da enzima aumentou durante a germinação das sementes e alcançou máxima atividade após 108 h de embebição (Figura 2).

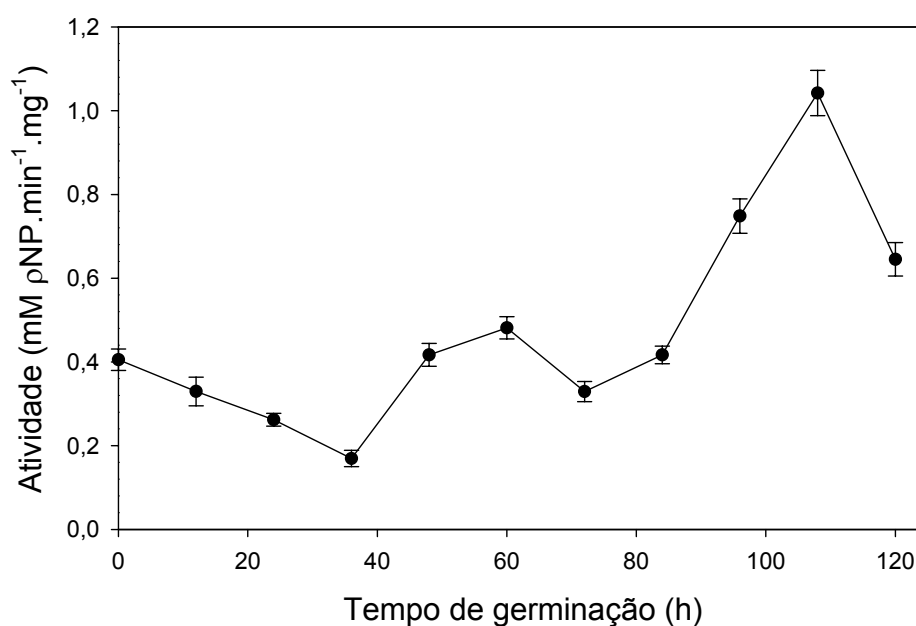


Figura 2 – Atividade específica da enzima α -galactosidase no extrato bruto de sementes de *Tachigali multijuga* durante a germinação.

3.2. Purificação da α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*

O extrato bruto foi obtido a partir de sementes de *Tachigali multijuga* germinadas por 108 h de acordo com o item 2.6.1, e foi submetido às etapas de

purificação. Um resumo das etapas de purificação está apresentado na Tabela 1. Durante as etapas de purificação a atividade da α -galactosidase foi determinada utilizando o substrato ρ NP α Gal, como descrito no item 2.7.1, e o teor protéico determinado pelo método de Bradford, conforme descrição no item 2.8.

Tabela 1 - Resumo das etapas de purificação da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

Etapas	Proteína (mg)	Atividade Total (mM.min ⁻¹)	Atividade Específica (mM.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	392,20	135,79	0,35	1,00	100,00
Precipitação ácida	278,78	123,00	0,44	1,27	90,58
Diálise	256,00	121,90	0,48	1,38	89,77
DEAE-Sephacel	20,49	87,48	4,27	12,33	64,42
Sephadex G-150	0,10	8,36	86,16	248,87	6,16

A enzima α -galactosidase foi purificada 248,87 vezes, com rendimento de aproximadamente 6%. WILLIAMS et al. (1978) trabalhando com α -galactosidase de sementes de *Trifolium repens* conseguiram um fator de purificação de 2.863, mas com um rendimento de 2,6 % para α -galactosidase IV. GUIMARÃES et al. (2001) trabalhando com α -galactosidase de sementes germinadas de soja var. Doko, obtiveram um rendimento final de 2,0 % e um fator de purificação de 2.404, para a enzima P2. VIANA et al. (2005) purificaram a α -galactosidase de sementes de soja var. CAC-1 12,7 vezes e obtiveram um rendimento de 25,6 %.

As etapas de precipitação ácida e diálise foram feitas como descrito nos itens 2.6.2 e 2.6.3. A amostra enzimática foi purificada 1,27 e 1,38 vezes, após a etapa de precipitação e diálise, respectivamente. A diálise foi importante para a retirada de sal presente na amostra e também para equilibrar a amostra com o mesmo tampão utilizado na cromatografia de troca iônica.

O material da diálise foi submetido à cromatografia de troca-iônica, em coluna de DEAE-Sephacel. O perfil da cromatografia de troca-iônica está representado na Figura 3.

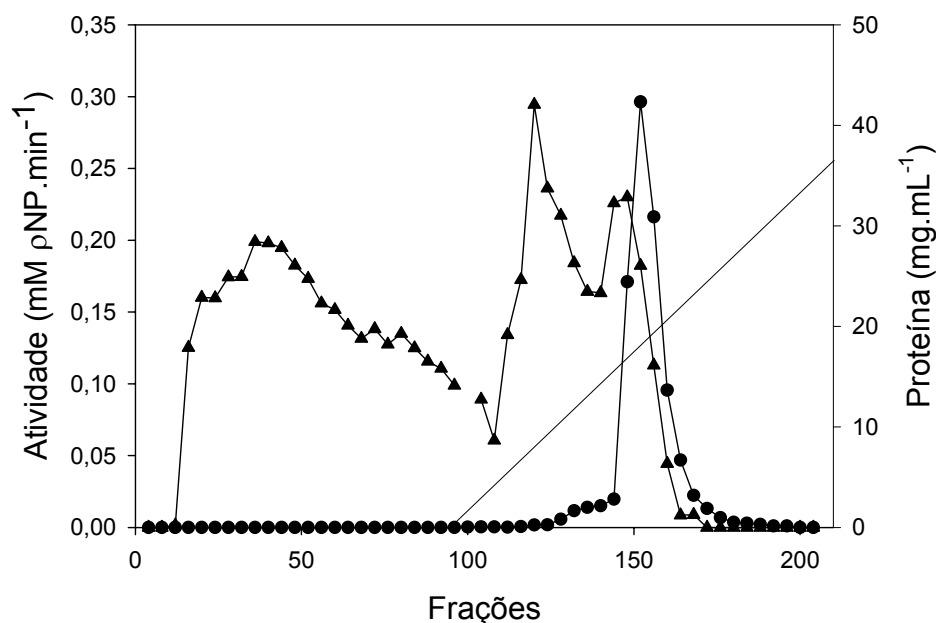


Figura 3 - Perfil cromatográfico de eluição da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* em coluna aniônica DEAE-Sephacel. Atividade de α -galactosidase (●); proteína (▲), gradiente de 0 -1,0 M de NaCl (—).

O perfil de eluição da cromatografia em coluna de troca-iônica revelou a presença de apenas um pico protéico com atividade de α -galactosidase, que foi eluído com aproximadamente 0,5 M de NaCl. As frações contendo a atividade enzimática foram reunidas e concentradas por ultrafiltração. Nesta etapa, a enzima foi purificada 12,33 vezes, com um rendimento de 64,42 % (Tabela 1).

VIANA et al. (2006) obtiveram um resultado semelhante purificando a α -galactosidase da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV1, utilizando a resina DEAE-Sepharose.

A amostra ultrafiltrada foi submetida à cromatografia de filtração em gel, utilizando uma coluna de Sephadex G-150. Um perfil demonstrativo desta eluição está representado na Figura 4.

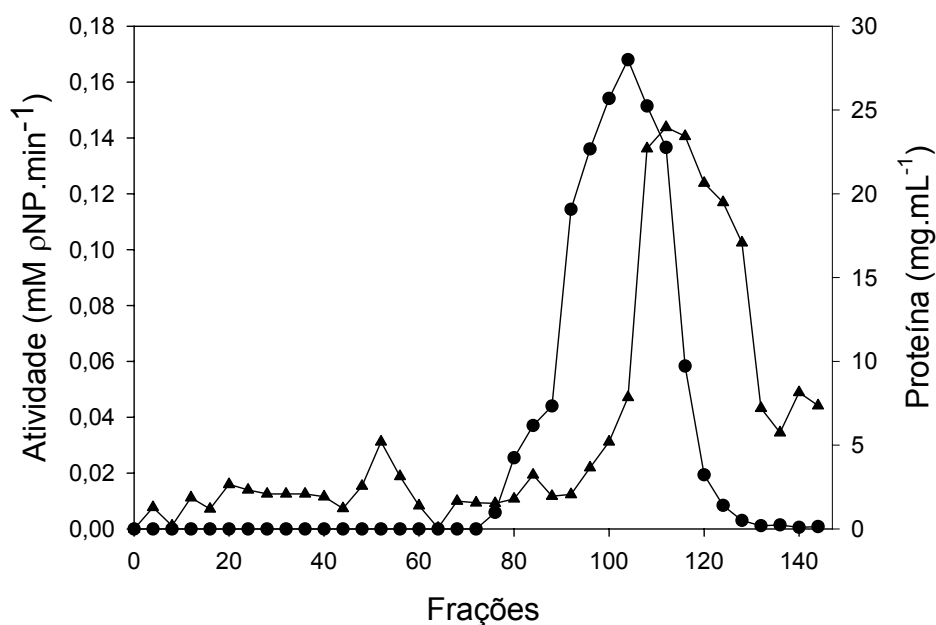


Figura 4 - Perfil cromatográfico de eluição da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* em coluna de Sephadex G-150. Atividade de α -galactosidase (●); proteína (▲).

Foi observado somente um pico com atividade de α -galactosidase e este foi dividido em duas frações. A primeira fração (F1) contendo os tubos de 90 a 103, apresentaram alta atividade enzimática e baixo teor de proteínas, e a segunda fração (F2) contendo os tubos 104 a 116, apresentaram atividade enzimática porém com teor protéico alto. Após esta etapa, a fração F1 foi purificada 248,87 vezes, com um rendimento de 6,16 % (Tabela 1). Esta fração foi utilizada na caracterização enzimática. KANG e LEE (2001), relataram um fator de purificação de 103,16, após a cromatografia em Sephacril S-200, para a α -galactosidase de *Vitis labruscana* cultivar Honey black.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para confirmação das etapas de purificação da α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*, as frações que apresentaram atividade enzimática, eluídas das colunas de DEAE-Sephacel e de Sephadex G-150 foram submetidas à eletroforese, em gel de poliacrilamida 12,5 %, sob condições desnaturantes. O perfil de migração das proteínas presentes nessas amostras está apresentado na Figura 5.

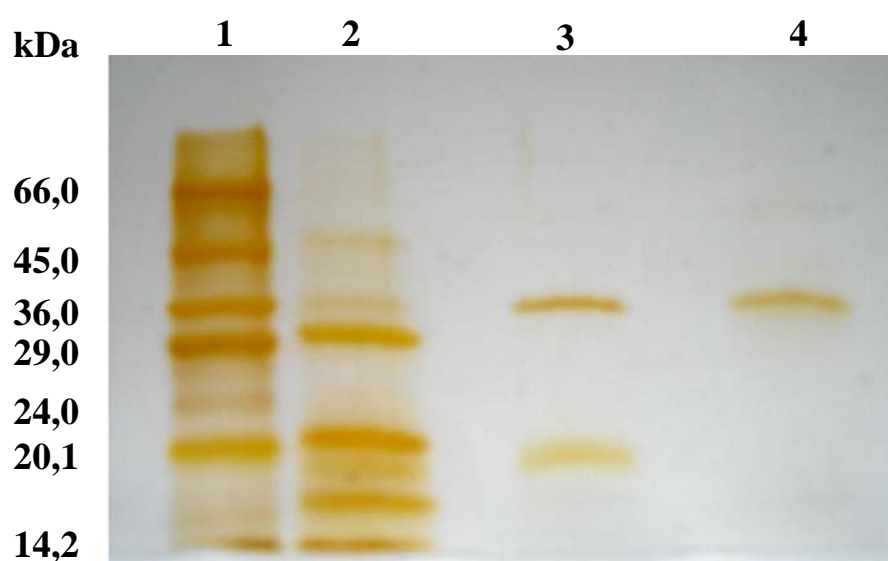


Figura 5 - Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12,5 %) corado com prata de amostras da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*. 1- marcadores de massa molecular; 2- extrato bruto; 3- fração enzimática proveniente da DEAE-Sephacel; 4- fração enzimática proveniente da Sephadex G-150.

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida indicou a presença de várias bandas protéicas no extrato bruto obtido a partir de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* (Figura 5 - canaleta 2). Duas bandas protéicas foram visualizadas na fração enzimática proveniente da cromatografia de troca-iônica (Figura 5 - canaleta 3) e a presença de apenas uma banda protéica foi observada na fração enzimática proveniente da cromatografia de filtração em gel (Figura 5 - canaleta 4).

3.3.1. Determinação da massa molecular

A massa molecular da enzima α -galactosidase purificada de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foi calculada a partir da regressão linear, correlacionando-se o logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão com a distância relativa percorrida no gel SDS-PAGE (Figura 5). Para a distância relativa percorrida de 0,370 pela enzima α -galactosidase foi calculado o valor da massa molecular de aproximadamente 38 kDa (Figura 6).

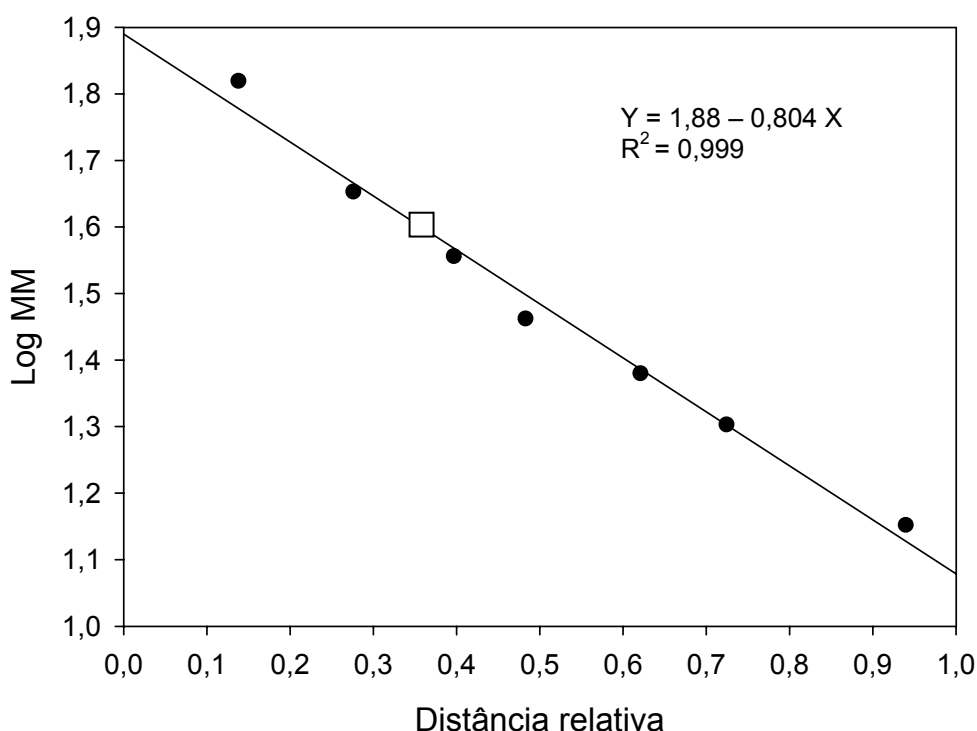


Figura 6 - Determinação da massa molecular da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*. Marcadores de massa molecular: Albumina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-P desidrogenase (36 kDa), Anidrase carbônica (36 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), Inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -Lactoalbumina (14,2 kDa). Distâncias relativas percorridas pelos marcadores (•) e pela α -galactosidase (□).

Valores próximos da massa molecular da α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foram encontrados para as α -galactosidases de sementes de *Trifolium repens*, 41 kDa (WILLIAMS et al., 1978), de cultura de células de *Oryza sativa* L. var. Nipponbare, 41 kDa (KIM et al., 2002) e de *Coffee beans*, 40 kDa (MARRACCINI et al., 2005). Entretanto, valores de massa

molecular menores foram encontrados em sementes de *Sesbania virgata*, 26 kDa (TONINI et al., 2006) e *Vigna unguiculata*, 33 kDa (OLIVEIRA-NETO et al., 1998)

Por outro lado, algumas α -galactosidases de microorganismos possuem valores de massa molecular maiores como a determinada em *Aspergillus fumigatus*, 54,7 kDa (de REZENDE et al., 2005), em *Thermomyces lanuginosus*, 57 kDa (PUCHART et al., 2000) e em *Debaryomyces hansenii* UFV1, 60 kDa (VIANA et al., 2006).

3.4. Caracterização cinética da α -galactosidase purificada de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*

3.4.1. Efeito do pH

A atividade da α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foi testada na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 7,0, na temperatura de 40 °C, utilizando o ρ NP α Gal como substrato (Figura 7). Máxima atividade foi encontrada na faixa de pH 5,0 - 5,5. Em pH 7,0 a atividade da α -galactosidase foi nula.

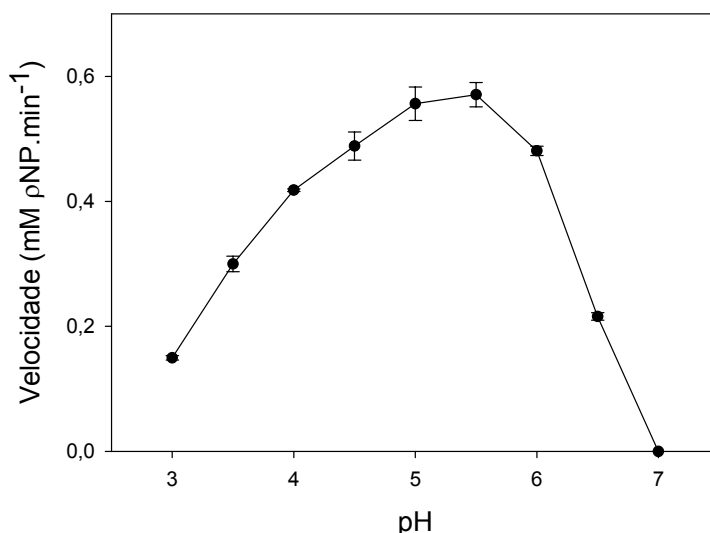


Figura 7 - Efeito do pH na atividade da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

GAO e SCHAFFER (1999) encontraram um resultado semelhante para a forma ácida da α -galactosidase de *Cucumis melo* L. cv C-8. A enzima apresentou atividade máxima na faixa de pH 5,0 - 5,5. OLIVEIRA et al. (2005) trabalhando com a α -galactosidase de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli encontraram um valor ótimo de atividade no pH 5,5. No trabalho realizado por CALLEGARI (2003), a α -galactosidase semipurificada de sementes de soja var. Monarca apresentou atividade máxima no pH 5,0.

Resultados similares foram encontrados para o fungo *Thermomyces lanuginosus* cepa CBS395.62/b, pH 5,0 - 5,5 (REZESSY-SZABÓ et al., 2006). Por outro lado, valores menores de pH ótimo foram encontrados para a α -galactosidase dos fungos *Aspergillus niger*, pH 4,5 (MANZANARES et al., 1998), *Aspergillus fumigatus*, pH 4,0 - 4,5 (de REZENDE et al., 2005) e *Thermomyces lanuginosus*, pH 4,5 - 5,0 (PUCHART et al., 2000).

3.4.2. Efeito do pH na estabilidade e atividade da α -galactosidase

O efeito do pH na estabilidade da α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foi testado incubando-se a enzima nos valores de pH entre 3,0 e 7,0 por 15 e 30 min a 40°C. Após o período de pré-incubação, a atividade da enzima foi determinada como descrito no item 2.7.1. A atividade relativa e a estabilidade da α -galactosidase em diferentes valores de pH estão mostrados na Figura 8.

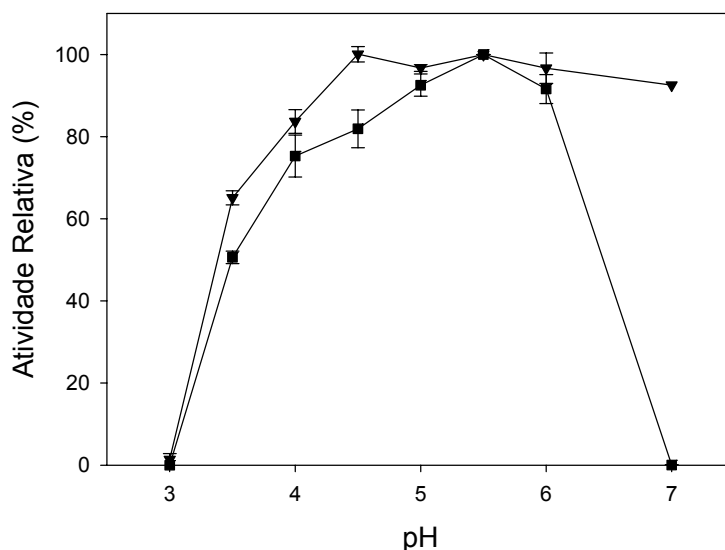


Figura 8 - Estabilidade ao pH da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* por 15 (▼) e por 30 min (■). A atividade foi determinada em pH 5,0 a 40 °C após pré-incubação da enzima nos valores de pH 3,0 – 7,0.

O valor de pH para atividade máxima da α -galactosidase foi entre 5,0 e 5,5. A enzima reteve 100 % de sua atividade quando pré-incubada em pH 4,5 - 7,0, por 15 min à 40 °C. Entretanto, quando pré-incubada nas mesmas condições por 30 min, teve atividade nula em pH 7,0. A α -galactosidase manteve considerável atividade quando pré-incubada no pH 4,0, por 15 e 30 min a 40 °C, mas perdeu total atividade no pH 3,0.

Segundo SEGEL (1979), os efeitos do pH na estabilidade de uma enzima devem ser levados em conta em qualquer estudo do efeito do pH na ligação do substrato e na catálise. A curva de pH não dá indicações da razão pela qual a velocidade declina acima e abaixo do pH ótimo e, o declínio poderia resultar da constituição de uma forma iônica não adequada do substrato ou da enzima (ou de ambos), ou da inativação da enzima, ou ainda da combinação destes efeitos. No entanto, a estabilidade de uma enzima ao pH também depende de outros fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de íons metálicos e contaminantes, concentração de substratos ou cofatores da enzima ou da própria concentração da enzima.

Nos valores de pH 4,0 - 6,0, a enzima α -galactosidase reteve mais de 70 % de sua atividade (Figura 8). Portanto, os resultados sugerem que, nestes

valores de pH não há mudança significativa na cadeia lateral de aminoácidos que são essenciais para a catálise.

Uma enzima pode permanecer estável ou então perder atividade, quando incubada por um período de tempo mais longo em pH diferente do ótimo. Neste trabalho foi observado que uma pré-incubação por 30 min em pH 7,0 promoveu irreversível perda de atividade na α -galactosidase, enquanto que sua atividade foi totalmente mantida após pré-incubação por um curto período de tempo de 15 min (Figura 8).

Outras α -galactosidases descritas na literatura foram estudadas quanto à estabilidade ao pH. A α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV1, quando incubada por 30 min a 60 °C em pH 4,0 - 7,6, manteve 82 % de sua atividade, mas perdeu 90 % de atividade após a incubação em pH 3,0 (VIANA et al., 2006). A α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) foi completamente estável em pH 6,0 - 9,0, e manteve 60 - 80 % de sua atividade quando incubada em pH 3,5 - 5,5 (GOTE et al., 2006).

3.4.3. Efeito da temperatura

A atividade da α -galactosidase purificada foi ensaiada na faixa de temperatura entre 30 e 65 °C em pH 5,0, utilizando o substrato sintético pNP α Gal (Figura 9). As maiores atividades foram detectadas entre as temperaturas de 40 e 55 °C, sendo que a temperatura de máxima atividade da enzima foi à 50 °C. Entretanto, na temperatura de 60 °C houve perda total de atividade enzimática.

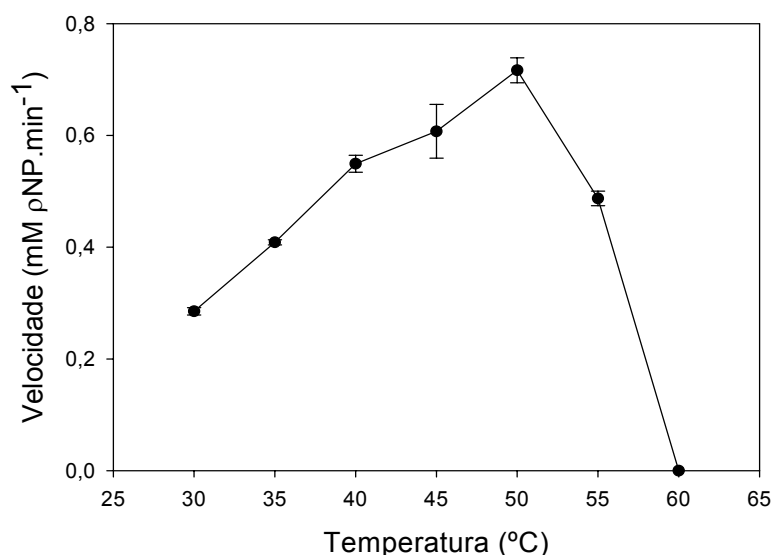


Figura 9 - Efeito da temperatura na atividade da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

O efeito da temperatura sobre a atividade da enzima α -galactosidase foi verificada por outros autores. Temperaturas ótimas iguais ao descrito neste trabalho, 50 °C, foram encontrados por CALLEGARI (2003) e VIANA et al (2005) para as α -galactosidas de sementes germinadas de soja var. Monarca e de sementes germinadas de soja var. CAC-1, respectivamente. No entanto, temperaturas ótimas de 45 °C, foram descritas para a α -galactosidase 3 de *Carica papaya* L. (SOH et al., 2006) e para a α -galactosidase de cultura de células de *Oryza sativa* L. var. Nipponbare (KIM et al., 2002).

3.4.4. Análise da termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 35, 40, 45 e 50 °C, por vários períodos de tempo como descrito no item 2.10.4. A α -galactosidase foi bastante termoestável. A enzima reteve cerca de 65 % de sua atividade original, quando incubada por 12 h e 200 h a 40 e 35 °C, respectivamente (Figura 10A). Na temperatura de 45 °C, a enzima manteve em torno de 70 % de sua atividade original por 30 min, e perdeu aproximadamente 60 % de sua atividade após 180 min. No entanto, a 50 °C, a enzima α -galactosidase perdeu 79% de sua atividade inicial após 30 min de incubação (Figura 10B). Embora a temperatura de atividade máxima da

α -galactosidase tenha sido 50 °C, nesta temperatura a enzima apresentou pouca estabilidade, portanto, a temperatura de trabalho escolhida foi 40 °C.

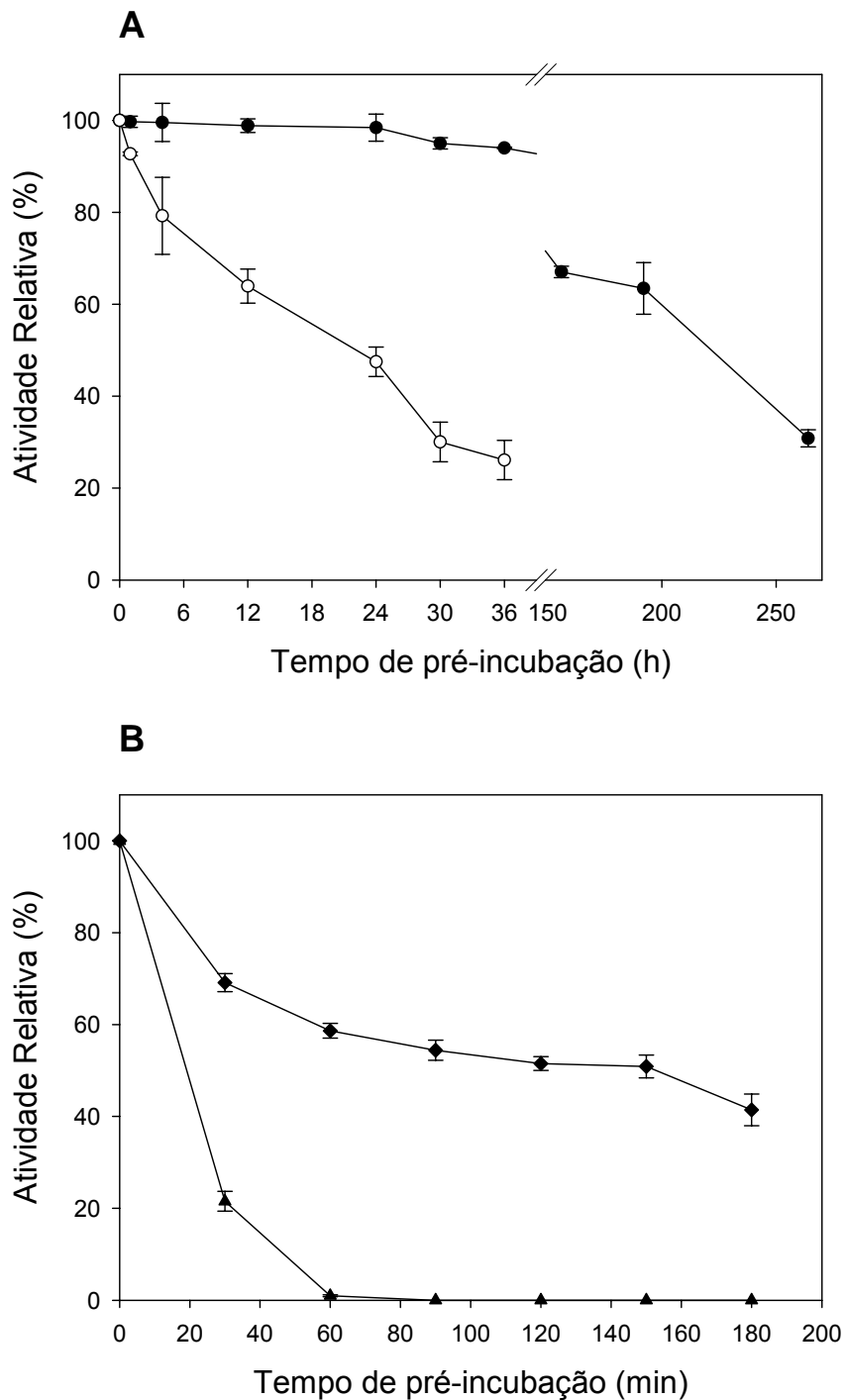


Figura 10 - Termoestabilidade da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas por diversos períodos de tempo a 35 (●), 40 (○), 45 (◆) e 50°C (▲) e ensaiadas a 40 °C.

A α -galactosidase de sementes germinadas de soja var. CAC-1 foi termoestável, e não perdeu atividade a 35 - 40 °C após 3 h. No entanto, a enzima perdeu 60 % de sua atividade quando pré-incubada a 45 °C após 3 h e 78 % a 50 °C depois de 30 min (VIANA et al., 2005). Em sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli, as α -galactosidases C1 e C2 mantiveram 70 % de sua atividade a 45 °C por 3 h, mas a 50 °C a α -galactosidase C1 perdeu completamente sua atividade com 30 min de pré-incubação e a α -galactosidase C2 manteve 40 % de sua atividade após 180 min (OLIVEIRA et al., 2005). Em *Carica papaya* L., a α -galactosidase 2 perdeu 50 % de atividade a 47 °C por 10 min (SOH et al., 2006).

Normalmente, α -galactosidases de plantas são menos termoestáveis que α -galactosidases de microorganismos. A α -galactosidase de *Aspergillus niger* não perdeu atividade quando pré-incubada por 8 h a 40 °C (MANZANARES et al., 1998). A α -galactosidase de *Talaromyces flavus* permaneceu totalmente estável quando pré-incubada por 22 h em temperaturas acima de 40 °C, e somente foi inativada após 5 h em temperaturas acima de 60 °C (SIMERSKÁ et al., 2007). A α -galactosidase de *Thermomycyces lanuginosus* cepa CBS395.62/b foi estável por 24 h a 55 °C em pH 6,4 - 8,3. A enzima apresentou rápido decréscimo de atividade em temperaturas superiores a 65 °C (REZESSY-SZABÓ et al., 2007).

3.4.5. Meia-vida da α -galactosidase

Os valores de meia-vida da α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foram calculados por regressão não-linear, por meio de uma curva de velocidade de reação versus o tempo de pré-incubação. Esses parâmetros foram calculados utilizando o programa Sigma Plot, versão 9.0 para Windows.

Os ensaios foram realizados nas temperaturas de 35, 40, 45 e 50 °C, usando o substrato pNP α Gal conforme descrito no item 2.10.5. Na temperatura de 35 °C, o tempo estimado de meia-vida da α -galactosidase foi 179 h (Figura 11). A 40 °C, a meia-vida foi 17 h e 40 min (Figura 12); a 45 °C, a meia-vida foi 117 min (Figura 13) e a 50 °C, a meia-vida foi 16 min (Figura 14).

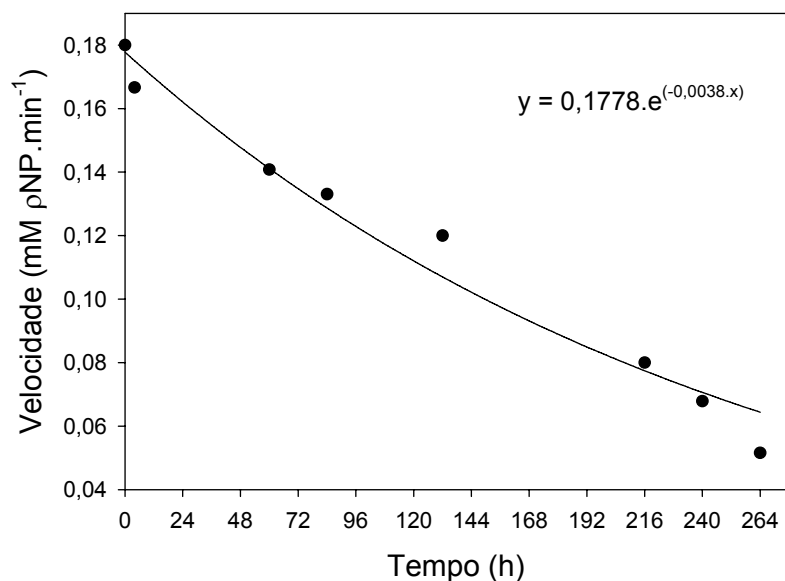


Figura 11 - Determinação da meia-vida a 35 °C, da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*. Cada ponto representa a média de três repetições. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10 %.

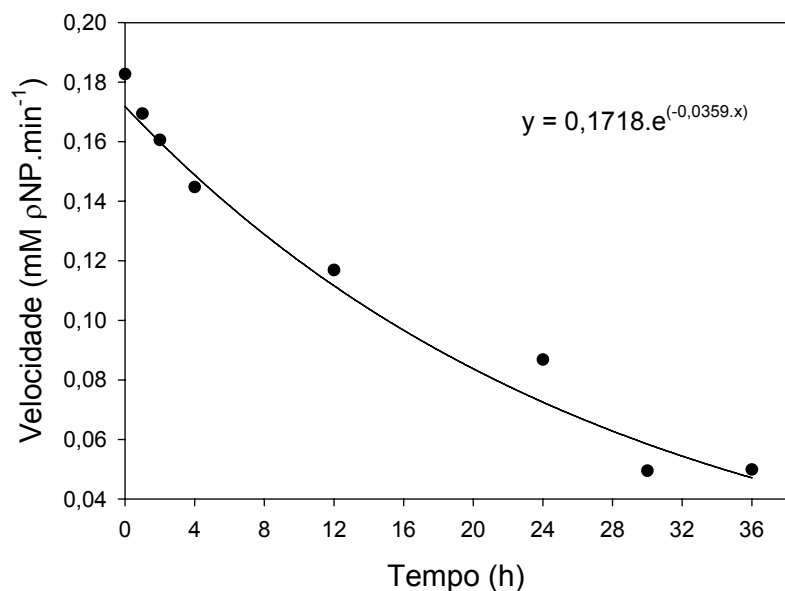


Figura 12 - Determinação da meia-vida a 40 °C, da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*. Cada ponto representa a média de três repetições. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10 %.

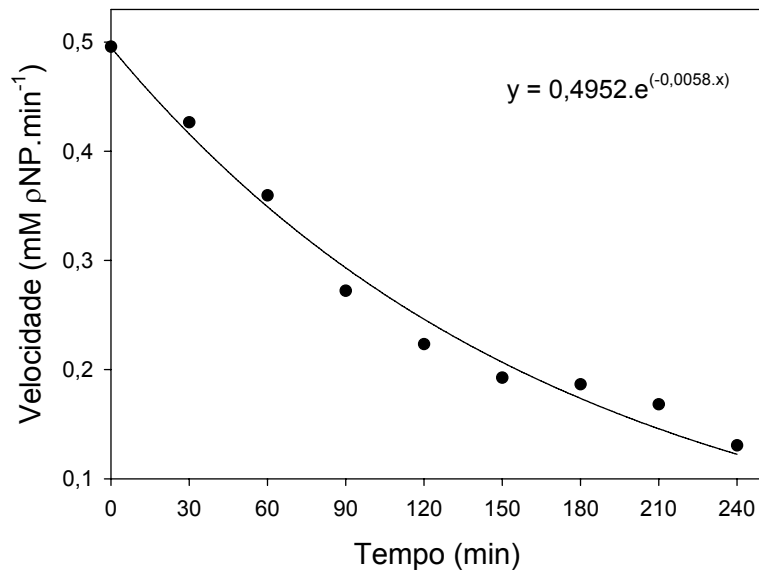


Figura 13 - Determinação da meia-vida a 45 °C, da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*. Cada ponto representa a média de três repetições. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10 %.

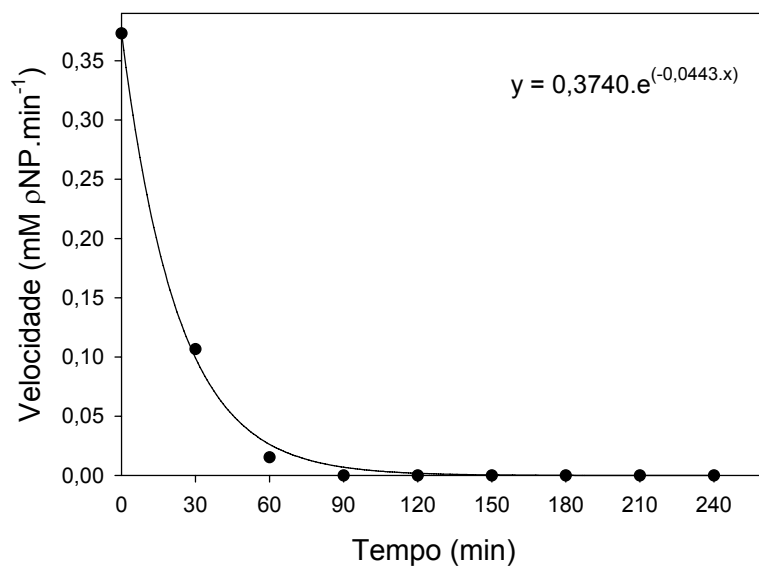


Figura 14 - Determinação da meia-vida a 50 °C, da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*. Cada ponto representa a média de três repetições. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10 %.

CALLEGARI (2003) determinou a meia-vida para a α -galactosidase semipurificada de sementes germinadas de soja var. Monarca de 14,4 h a 40 °C. GUIMARÃES et al. (2001) encontraram para as α -galactosidases P1 e P2 de sementes germinadas de soja var. Doko meia-vida de 16,0 e 11,2 min, respectivamente, a 50 °C. VIANA (2002) encontrou uma meia-vida de 337,30 e 30,26 min para a α -galactosidase semipurificada de sementes germinadas de soja var. CAC-1, nas temperaturas de 45 e 50 °C, respectivamente.

A meia-vida a 50 °C da α -galactosidase de *Debaryomyces. hansenii* foi de 821 min (VIANA et al., 2006). Estudos com a α -galactosidase do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* realizados por PUCHART et al. (2000) mostraram que a meia-vida a 65 °C da enzima foi de 180 min. Para a α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) a meia-vida da enzima a 70 °C foi de 30 min (GOTE et al., 2006).

3.4.6. Especificidade da α -galactosidase com outros substratos

A enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foi avaliada quanto à capacidade de hidrolisar substratos sintéticos e naturais e polissacarídeos.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que a enzima α -galactosidase hidrolisou mais eficientemente o substrato sintético ρ NP α Gal, seguido dos substratos naturais rafinose, melibiose e estaquiose. A enzima foi capaz de hidrolisar o ρ NP α Gal, mas não hidrolisou os outros substratos sintéticos que contêm ligações β ou que contêm resíduos de glicose, arabinose, xilose e manose. Isto significa que a enzima apresentou especificidade absoluta para resíduos de D-galactose ligados em posição α .

Tabela 2 - Atividade relativa da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* ensaiada contra alguns substratos. As atividades foram calculadas em relação a atividade com o substrato ρ NP α Gal, que foi considerada como 100%.

Substrato	Concentração (mM) ^a	Atividade relativa (%) \pm SD
ρ NP α Gal	0,5	100 \pm 0,08
Sacarose	10	0
Rafinose	5	60,96 \pm 0,06
Melibiose	12	17,55 \pm 0,05
Estaquiose	15	13,16 \pm 0,04
Goma de alfarroba	0,5	2,80 \pm 0,26
Goma guar	0,5	2,54 \pm 0,29
ONP β Gal ^b	0,5	0
ρ NP β Gal ^b	0,5	0
ONP β Glc ^b	0,5	0
ρ NP α Glc ^b	0,5	0
ρ NP α A ^b	0,5	0
ρ NP β X ^b	0,5	0
ρ NP α M ^b	0,5	0

^a Concentração final em mM exceto para os substratos goma de alfarroba e goma guar (%).

^b o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (oNP β Gal), ρ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ρ NP β Gal), o-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (oNP β Glc), ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ NP α Glc), ρ -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo (ρ NP α A), ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (ρ NP β X) e ρ -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo (ρ NP α M).

Resultados semelhantes para a atividade da enzima α -galactosidase contra substratos sintéticos foram obtidos por CHINEN et al. (1981) para a α -galactosidase de *Saccharum officinarum*, por KANG e LEE (2001) para a α -galactosidase de *Vitis labruscana* cultivar Honey black, e por OLIVEIRA et al. (2005), para as α -galactosidases C1 e C2 de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli.

Para os substratos naturais, as α -galactosidases C1 e C2 de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli apresentaram uma atividade relativa de 94 e

100 % para rafinose e 63 e 56 % para estaquiose, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2005). VIANA et al. (2005) obtiveram uma atividade relativa para rafinose e estaquiose de 113 % e 50,78 %, respectivamente, para α -galactosidase de sementes germinadas de soja var. CAC-1.

A α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* hidrolisou os polissacarídeos testados. Estudos realizados com a α -galactosidase de *Oryza sativa* L. var. Nipponbare (KIM et al., 2002) mostraram que a enzima hidrolisou 32 e 24 % de goma de alfarroba e goma guar, respectivamente. A α -galactosidase atuou em goma de alfarroba mais rapidamente do que em goma guar e, este mesmo efeito foi relatado para outras enzimas microbianas e de plantas (PUCHART et al., 2000).

3.4.7. Efeito de íons, açúcares e agentes redutores na atividade da α -galactosidase

O efeito de íons, açúcares e agentes redutores na atividade da α -galactosidase foi determinado pré-incubando soluções destes compostos com a preparação enzimática por 15 min, a 40 °C (Tabela 3), seguido da realização do ensaio normal de atividade, tendo ρ NP α Gal como substrato. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade da enzima pré-incubada sem efetor como 100 %.

A α -galactosidase foi completamente inibida por Hg^{2+} , Cu^{2+} e Ag^+ e foi parcialmente inibida por D-galactose e melibiose. Redução na atividade da α -galactosidase por Hg^{2+} e Ag^+ foi relatado por alguns autores (CHINEN et al., 1981; ITOH et al., 1986; KIM et al., 2002; SOH et al., 2006). A atividade das α -galactosidases C1 e C2 de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli foi totalmente inibida por Cu^{+2} (OLIVEIRA et al., 2005). Este tipo de inibição por íons usualmente sugere reação que envolve grupos carboxílicos, ou grupos amino (presentes em lisina e arginina) e imidazol da histidina no sítio ativo da enzima (DEY e PRIDAM, 1972).

Tabela 3 - Efeito de íons, açúcares simples e agentes redutores sobre a atividade da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

Efetor ^a	Atividade relativa (%) \pm SD
	α -galactosidase
---	100,0 \pm 0,31
HgCl ₂	0
NaCl	101,20 \pm 0,02
SDS	0
β -mercaptoetanol	99,48 \pm 0,02
CaCl ₂	93,94 \pm 0,03
KCl	94,00 \pm 0,03
CuSO ₄	1,43 \pm 0,08
Iodoacetamida	95,69 \pm 0,02
AgNO ₃	0
EDTA	113,83 \pm 0,01
Sacarose	97,34 \pm 0,01
D-Glicose	101,98 \pm 0,01
D-Galactose	69,89 \pm 0,01
Melibiose	75,56 \pm 0,1

^a A concentração final de SDS foi de 1 mM. A concentração final dos outros compostos no ensaio foi de 2 mM.

A α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* não foi inibida por β -mercaptoetanol, mas o SDS foi um inibidor potente. O detergente iônico SDS é um agente desnaturante totalmente eficiente para proteínas. Na sua presença muitas proteínas perdem suas funções pelo rompimento total ou parcial das estruturas terciária ou quaternária (BISCHOFF et al., 1998).

A atividade da α -galactosidase não foi inibida por EDTA e iodoacetamida, isto sugere que a enzima não é uma metaloenzima, e que grupos –SH (sulfidril) não fazem parte da catálise. Resultados semelhantes foram relatados para a α -galactosidase de sementes germinadas de soja var. CAC-1 (VIANA et al., 2005). A mesma enzima apresentou baixa ou nenhuma inibição por Na⁺, K⁺, EDTA,

iodoacetamida, β -mercaptoetanol e D-glicose, mas foi altamente inibida por SDS, Cu^{2+} e D-galactose.

As α -galactosidases de microorganismos também tiveram comportamento semelhante ao descrito neste trabalho. A α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV1 apresentou baixa ou nenhuma inibição por SDS, NaCl, K^{+1} , Ca^{+2} , sacarose e D-glicose. Cu^{2+} e Ag^{+} inibiram completamente a enzima e a D-galactose e a melibiose inibiram parcialmente (VIANA et al., 2006). A atividade da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* foi completamente inibida por Hg^{2+} , Cu^{2+} e Ag^{+} na concentração de 1 mM (GOTE et al., 2006) e a α -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* teve sua atividade totalmente reduzida por Hg^{2+} , Ag^{+} e SDS (FALKOSKI et al., 2006).

3.4.8. Constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{\max})

O efeito da concentração dos substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, melibiose, rafinose e estaquiose na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase foi determinado pela curva de Michaelis-Menten.

Os valores da constante cinética K_M e da velocidade máxima V_{\max} para cada substrato estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de K_M , V_{\max} e V_{\max}/K_M determinados pela curva de Michaelis-Menten com os substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, melibiose, rafinose e estaquiose para a enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

Substratos	K_M (mM)	V_{\max} *	V_{\max}/K_M (min^{-1})
$\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$	0,45	0,47	1,043
Melibiose	5,37	0,06	0,011
Rafinose	39,62	1,38	0,035
Estaquiose	48,80	0,18	0,004

* Para o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, V_{\max} está expressa em mM de $\rho\text{NP}/\text{min}$; para o substrato melibiose, V_{\max} está em mM de glicose/min e para os substratos rafinose e estaquiose, V_{\max} está em mM de açúcar redutor/min.

O valor de K_M calculado para o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ (Figura 15) foi menor em relação aos outros substratos, seguido pelo K_M para o substrato melibiose (Figura 16), rafinose (Figura 17) e estaquiose (Figura 18). O valor de K_M para o substrato estaquiose foi o maior encontrado.

SEGEL (1979), afirma que a constante cinética K_M indica a “adequacidade” relativa de diferentes substratos para uma determinada enzima. Ou seja, o substrato que apresenta um menor valor de K_M possui uma maior afinidade aparente para a enzima. Da mesma maneira, o valor da relação V_{max}/K_M , pode ser utilizado como um parâmetro de comparação para medir a eficiência catalítica de uma enzima para diferentes substratos, sendo que, maiores valores da relação V_{max}/K_M indicam uma maior eficiência catalítica.

Com base nessas informações pode-se concluir que o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ é usado preferencialmente pela enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* uma vez que apresentou menor valor de K_M , e que, a eficiência catalítica representada pela relação V_{max}/K_M foi maior para o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ seguido dos substratos rafinose, melibiose e estaquiose (Tabela 4).

SOH et al. (2006) determinaram para a α -galactosidase de *Carica papaya* L. um valor de K_M de 1,36 mM para o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$. De acordo com GUIMARÃES et al. (2001), os valores de K_M calculados para os substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, melibiose e rafinose foram 0,76 mM; 5,34 mM e 5,53 mM, respectivamente, para a α -galactosidase P2 de sementes germinadas de soja var. Doko. Estes resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho, exceto para o substrato rafinose.

As α -galactosidases C1 e C2 de *Platymiscium pubescens* Micheli têm, respectivamente, um $K_{M\text{ ap}}$ de 0,54 mM e 0,78 mM para o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, e um $K_{M\text{ ap}}$ de 4,64 mM e 5,09 mM para o substrato rafinose (OLIVEIRA et al., 2005). GAO e SCHAFER (1999) encontraram um valor de K_M para os substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, melibiose, rafinose e estaquiose de 0,3 mM; 0,7 mM; 4,2 mM e 10,5 mM, respectivamente, para a α -galactosidase ácida de *Cucumis melo* L. cv C-8. Valores maiores de K_M foram determinados para a α -galactosidase 1 de sementes de *Trifolium repens*, 1,1 mM para o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ e 67 mM para o substrato rafinose (WILLIAMS et al., 1978).

Para a α -galactosidase de *Trichoderma reesei*, o valor de K_M calculado foi de 0,05 mM; 3,0 mM e 11,0 mM para os substratos ρ NP α Gal, melibiose e rafinose, respectivamente (SHABALIN et al., 2002). De acordo com VARBANETS et al. (2001), os valores de K_M para a α -galactosidase de *Penicillium* sp. 23, estimados para os substratos ρ NP α Gal, melibiose, rafinose e estaquiose foram 1,0 mM; 4,0 mM; 5,7 mM e 3,5 mM, respectivamente. FALKOSKI et al. (2006) determinaram para os substratos ρ NP α Gal, melibiose e rafinose um valor de $K_{M\text{ app}}$ para a α -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* de 1,32 mM, 2,06 mM e 20,67 mM, respectivamente.

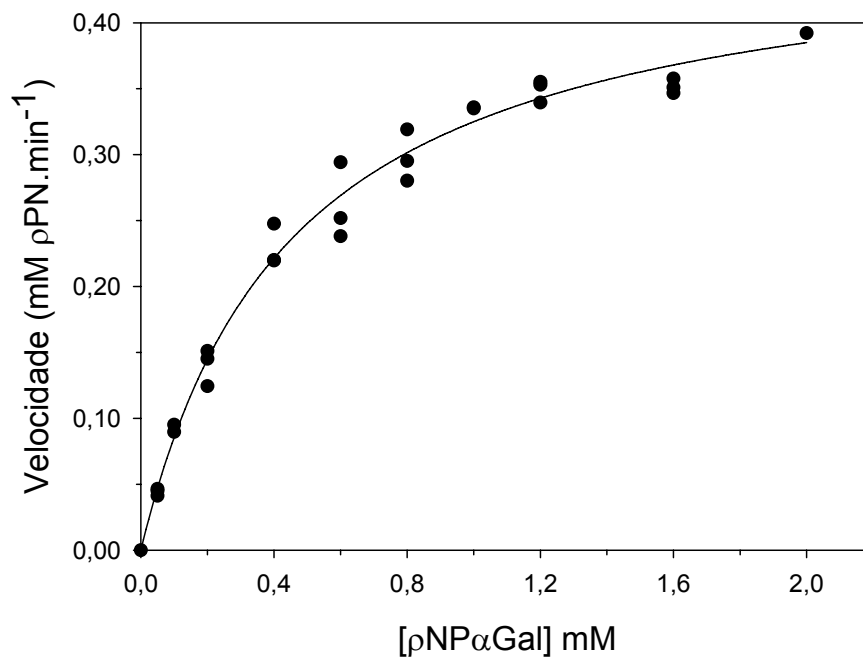


Figura 15 - Efeito da concentração do substrato ρ NP α Gal na velocidade da reação catalisada pela enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

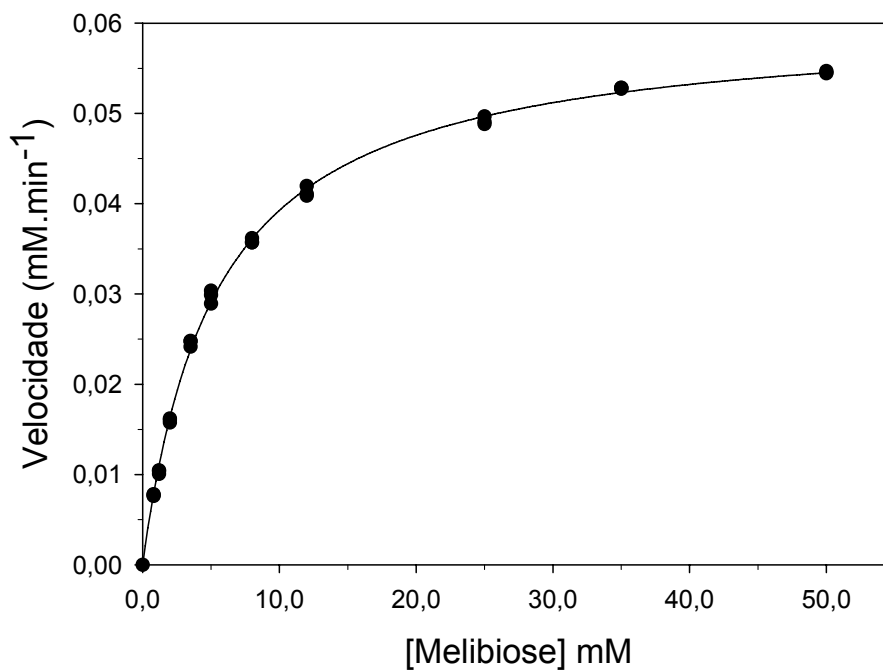


Figura 16 - Efeito da concentração do substrato melibiose na velocidade da reação catalisada pela enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

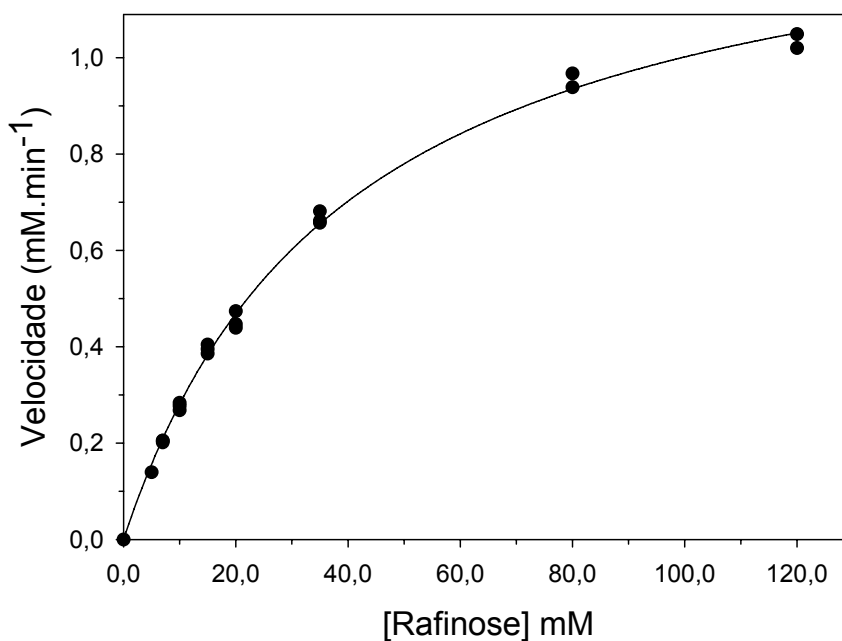


Figura 17 - Efeito da concentração do substrato rafinose na velocidade da reação catalisada pela enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

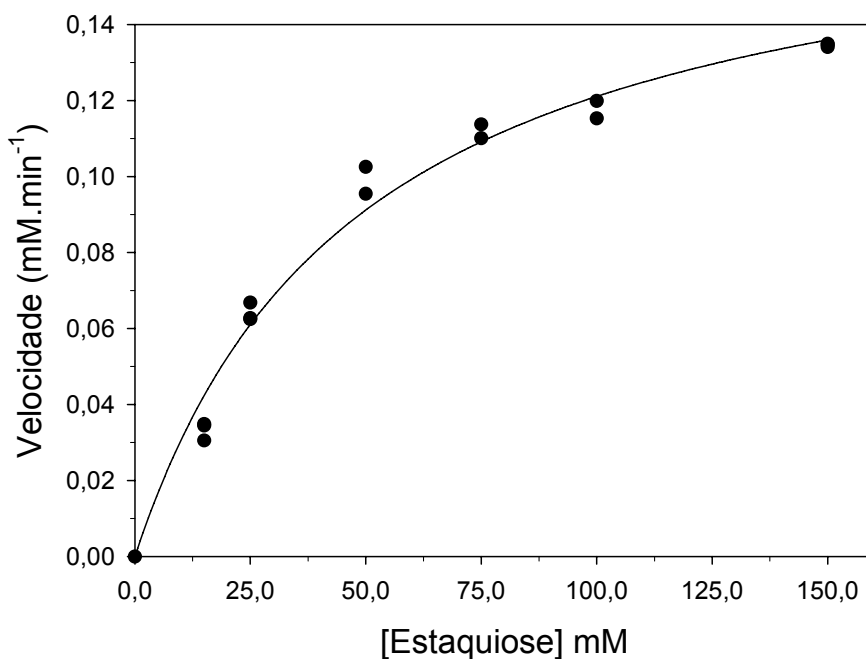


Figura 18 - Efeito da concentração do substrato estaquiiose na velocidade da reação catalisada pela enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

3.4.9. Constante de inibição (K_i) para o açúcar galactose

Para determinar a constante de inibição para a galactose, foi feito o gráfico dos duplos recíprocos para a velocidade da reação de hidrólise do substrato ρ NP α Gal pela α -galactosidase na ausência e presença de diferentes concentrações de galactose (Figura 19). Observa-se uma maior inclinação das retas com o aumento da concentração da galactose, o que representa uma menor velocidade da reação enzimática, ou seja, houve inibição.

Analisando a Figura 19, percebe-se uma tendência das retas a se encontrarem no eixo Y, indicando que a inibição é do tipo competitiva. Neste caso, a velocidade máxima tende a ser constante, mesmo na presença do inibidor, e o K_M se torna maior, pois é necessária uma maior concentração de substrato para que a velocidade seja igual à metade da velocidade máxima, já que inibidor e substrato competem pelo mesmo sítio na enzima.

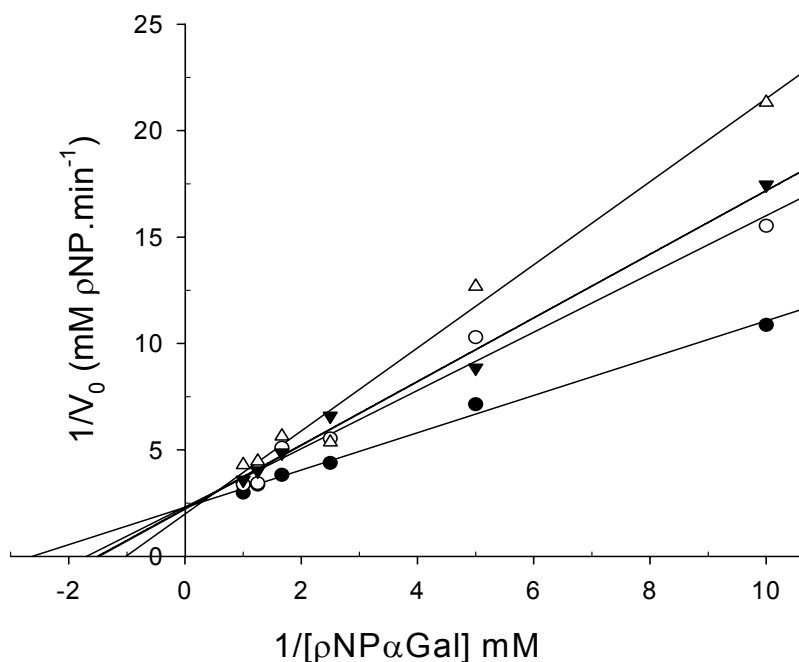


Figura 19 – Gráfico dos duplos recíprocos para a velocidade da reação em função da concentração de galactose para a enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* na ausência (●) e na presença de 1 mM (○), 2 mM (▼) e 3 mM (Δ) de galactose.

Para determinar a constante de inibição (K_i) para a galactose, foi utilizado o gráfico de DIXON (1953). O gráfico foi construído com a inclinação dos duplos recíprocos *versus* concentração do inibidor (Figura 20). Através da extrapolação desse gráfico obteve-se o valor de K_i quando $Y = 0$. A inibição pela galactose é do tipo competitiva com um valor de K_i igual a 2,74 mM.

Um resultado próximo ao encontrado neste trabalho foi determinado por GAO e SHAFFER (1999) estudando a α -galactosidase alcalina II de *Cucumis melo* L. cv C-8. Estes autores encontraram inibição do tipo competitiva com um valor de K_i para a galactose de 1,34 mM. GUIMARÃES et al. (2001) também observaram inibição competitiva para a α -galactosidase P2 de sementes germinadas de soja var. Doko, porém o valor de K_i (0,65 mM) determinado foi menor em relação ao encontrado neste trabalho.

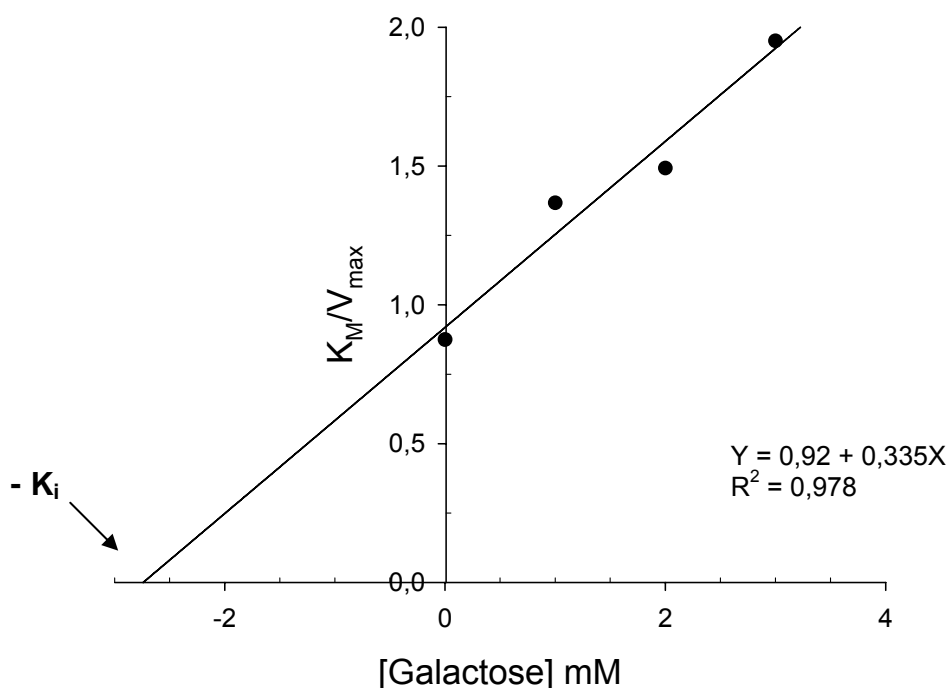


Figura 20 – Gráfico de Dixon correlacionando os dados obtidos a partir do gráfico dos duplos recíprocos (Figura 19): inclinação de $1/[S]$ versus [inibidor].

Inibição do tipo competitiva e com um valor de K_i para a galactose de 16,25 mM foi encontrado em *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) (GOTE et al., 2006). VIANA et al. (2006) encontraram uma inibição do tipo não-competitiva com um valor de k_i de 2,7 mM para a α -galactosidase de *Debaryomyces hansenii* UFV1.

3.4.10. Determinação da energia de ativação (E_a) utilizando a Equação de Arrhenius para os substratos ρ NP α Gal e rafinose

A energia de ativação (E_a) da reação catalisada pela α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foi determinada medindo a constante de velocidade da reação em diferentes temperaturas, e construindo um gráfico de $\log V_{max}$ versus $1/T$, onde T significa temperatura expressa em Kelvin. A inclinação da reta obtida é igual a $(-E_a/2,3R)$, onde R é a constante universal dos gases com valor de 8,314 J/mol.

Para determinar a E_a para o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$, concentrações do substrato entre 0,1 e 1 mM e temperaturas de 30, 35, 40, 45 e 50 °C foram utilizadas. As V_{max} foram determinadas utilizando os gráficos dos duplos recíprocos.

A Figura 21 está mostrando o gráfico de Arrhenius para a reação de hidrólise do substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ pela α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* em diversas temperaturas. A E_a calculada foi de 13,86 kcal/mol ou 58,0 kJ/mol.

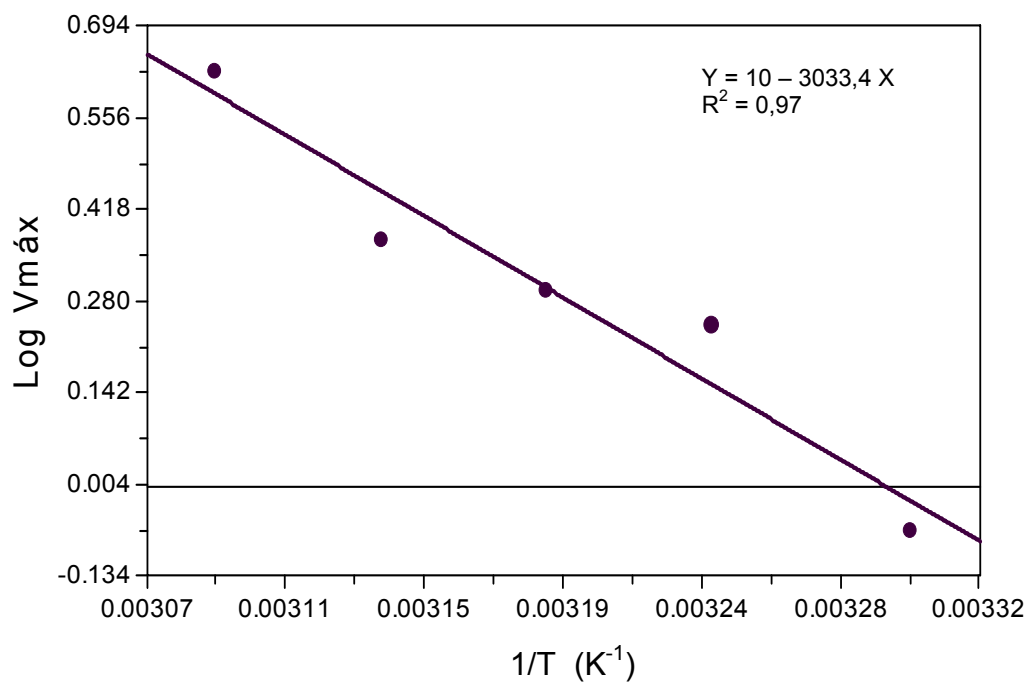


Figura 21 - Gráfico de Arrhenius para a hidrólise do substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ pela enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* nas temperaturas de 30 a 50 °C.

Para calcular a E_a para a hidrólise do substrato rafinose foi utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente. A Figura 22 mostra o gráfico de Arrhenius para essa reação nas temperaturas de 35 a 50 °C. As V_{max} foram determinadas utilizando os gráficos dos duplos recíprocos e concentrações do substrato rafinose entre 12 e 75 mM.

A E_a calculada para o substrato rafinose foi de 4,75 kcal/mol ou 19,88 kJ/mol. Este valor de E_a é bem menor que o valor calculado para o substrato $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$. O estado de transição é alcançado mais rapidamente quando

o valor de E_a é menor, neste caso, a velocidade da reação em direção à formação dos produtos é mais rápida. Os resultados mostram que apesar do valor da razão V_{max}/K_M (Tabela 4) ser maior para o substrato $\rho NP\alpha Gal$ comparado ao substrato rafinose, o valor de E_a determinado para a α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foi maior para o substrato $\rho NP\alpha Gal$ que para o substrato rafinose. Estes resultados indicam que após a formação do complexo ES, provavelmente a hidrólise de rafinose com formação de produto é mais rápida.

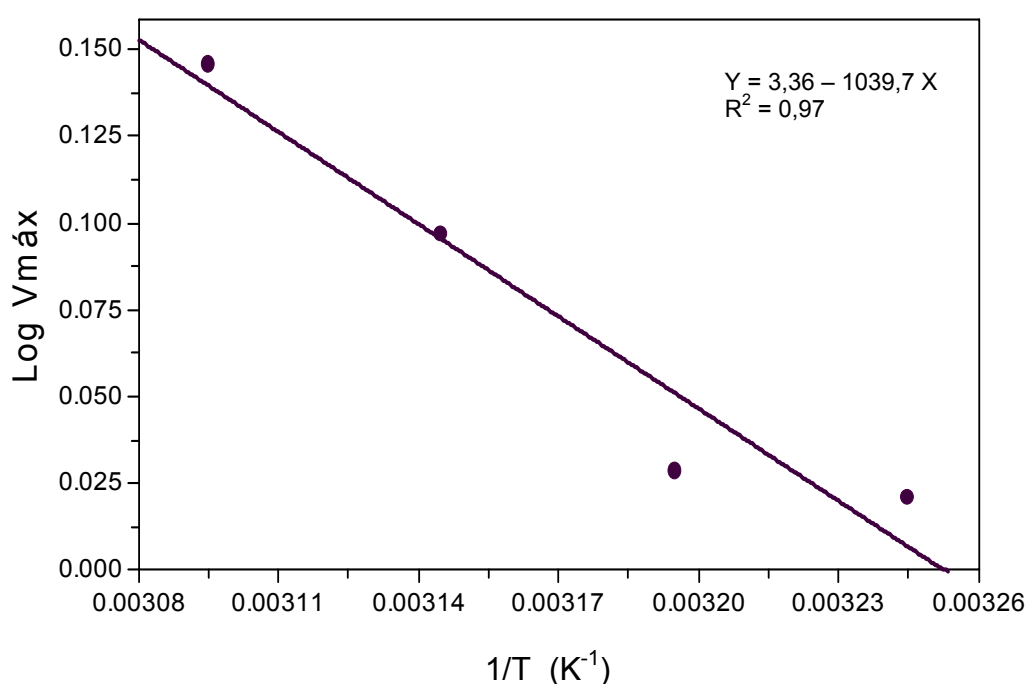


Figura 22 - Gráfico de Arrhenius para a hidrólise do substrato rafinose pela enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* nas temperaturas de 30 a 50 °C.

Algumas enzimas reportadas na literatura tiveram um valor de E_a similar para o substrato $\rho NP\alpha Gal$ como as α -galactosidases de *Mortierella vinacea*, E_a de 12,4 Kcal/mol (SUZUKI et al., 1970), de *Lactobacillus fermentum*, E_a de 12,0 Kcal/mol (GARRO et al., 1996) e de *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, E_a de 11,9 Kcal/mol (KING et al., 2002). A α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) possui valores de E_a para os

substratos $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ e rafinose de 14,30 Kcal/mol e 0,14 Kcal/mol, respectivamente (GOTE et al., 2006).

3.5. Hidrólise de galactooligossacarídeos presentes no leite de soja pela α -galactosidase

A habilidade da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* em hidrolisar os GO presentes na farinha desengordurada de soja foi demonstrada. Os resultados estão apresentados na Figura 23 e os valores das porcentagens de redução dos açúcares solúveis estão mostrados na Tabela 5.

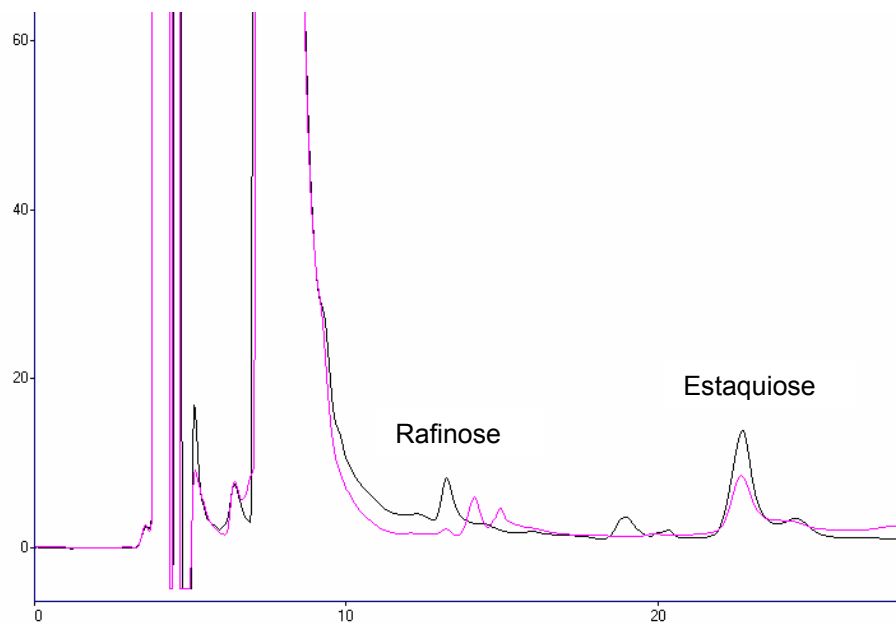


Figura 23 - Cromatograma comparativo da hidrólise do extrato desengordurado de soja pela enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*. Controle (—); tratamento por 8 h (—).

Tabela 5 - Porcentagem de hidrólise de GO na farinha desengordurada de soja pela enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.

Hidrólise de GO (%) \pm SD		
Tempo (h)	Rafinose	Estaquiose
0	0	0
4	69,90 \pm 0,30	51,61 \pm 1,4
6	69,25 \pm 0,4	48,52 \pm 1,12
8	71,84 \pm 0,08	49,34 \pm 2,67

Os teores de GO no tempo 0 h de hidrólise foram considerados como 100%. Os demais resultados foram calculados em relação ao tempo 0 h, a partir de cromatogramas obtidos das análises por CLAE.

Os resultados apresentados na Tabela 5 demonstram que a α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foi capaz de reduzir o conteúdo de rafinose e estaquiose na farinha desengordurada de soja em aproximadamente 70 e 50 %, respectivamente após 4 h de hidrólise à 40 °C. A porcentagem de redução dos açúcares mostrou-se semelhante para todos os tempos analisados, indicando que a hidrólise provavelmente ocorreu mais no início da incubação.

Está bem descrito na literatura que os GO, principalmente rafinose e estaquiose, presentes em soja podem causar distúrbios gastrointestinais em humanos desde que estes açúcares sejam metabolizados pela flora microbiana presente no intestino delgado com extensiva produção de gás (PUCHART et al., 2000). Os GO podem ser hidrolisados pela α -galactosidase, enzima capaz de clivar as ligações α -1,6 destes oligossacarídeos, liberando resíduos de galactose e sacarose (GUIMARÃES et al., 2001), minimizando os sintomas de flatulência. Portanto, para aliviar estes sintomas, muitas α -galactosidas de diferentes fontes foram estudadas por diversos autores com o objetivo de obter uma enzima eficiente que pudesse ser utilizada em processos industriais para hidrolisar os GO presentes em produtos de soja.

GUIMARÃES et al. (2001) conseguiram reduzir o conteúdo de rafinose e estaquiose em 73,3 e 40,6 %, respectivamente, após tratamento do leite de soja por 8 h, a 30 °C, com a α -galactosidase de sementes germinadas de soja var. Doko. VIANA et al. (2005) conseguiram uma redução de 72,3 % de estaquiose e 89,2 % de rafinose, após hidrólise da farinha desengordurada de soja com a α -galactosidase de sementes germinadas de soja var. CAC-1 por um período de 6 h a 40 °C.

FALKOSKI et al. (2006) estudaram três α -galactosidases de fontes diferentes e avaliaram a capacidade delas em hidrolisar os GO presentes no extrato desengordurado de soja. A enzima α -galactosidase de sementes germinadas de soja var. Monarca foi capaz de hidrolisar os açúcares rafinose e estaquiose 100 e 53 %, respectivamente, após 8 h de tratamento enzimático. Redução de 72,7 % de rafinose e 100 % de estaquiose foi obtido com a α -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* após 4 h de hidrólise. A α -galactosidase de *Aspergillus terreus* promoveu 100 % de hidrólise de rafinose e estaquiose, após 4 h de tratamento.

Com o mesmo objetivo de obter uma enzima que possa ser utilizada de forma eficiente na hidrólise dos GO, GOTE et al. (2004) testaram a capacidade da α -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146) em hidrolisar os GO em leite de soja. Estes autores conseguiram uma redução de 94 % de rafinose e 100 % de estaquiose após 2 h de incubação a 65 °C, sugerindo a potencial aplicação da enzima em leite de soja e produtos relacionados industrializados.

3.6. Hidrólise de galactomananas pela α -galactosidase

As galactomananas são polissacarídeos de parede celular, compostas de uma cadeia principal de resíduos de D-manose unidas por ligações β -1,4. A cadeia principal é ramificada em extensões variáveis pelas unidades de D-galactose através de ligações glicosídicas α -1,6, promovendo polímeros com diferentes razões de manose/galactose (BUCKERIDGE e DIETRICH, 1996; ISHRUD et al., 2001).

As galactomananas de plantas são polissacarídeos importantes para processos industriais. Os polissacarídeos goma de alfarroba e goma guar são utilizados para aumentar a viscosidade de comidas devido à suas propriedades gélicas. A goma de alfarroba pode formar gel quando usada sozinha ou em combinação com outros polissacarídeos como o ágar, carragena e goma xantana. A goma de alfarroba é capaz de formar gel melhor que a goma guar, porém, é muito mais cara. Uma remoção quantitativa de resíduos de D-galactose na goma guar pela α -galactosidase melhora a propriedade gélica deste polissacarídeo, tornando-o comparável à goma de alfarroba (McCLEARY e NEUKOM, 1982; BULPIN et al., 1990).

A α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* foi capaz de hidrolisar os polissacarídeos goma de alfarroba e goma guar (Figura 24). Máxima hidrólise foi conseguida em um período de tempo de 24 h a 40 °C. A goma guar foi hidrolisada na mesma proporção que a goma de alfarroba exceto no tempo de 12 h. O fato de a enzima α -galactosidase ter sido capaz de hidrolisar galactomananas, sugere sua aplicação industrial para promover propriedades gélicas em polissacarídeos.

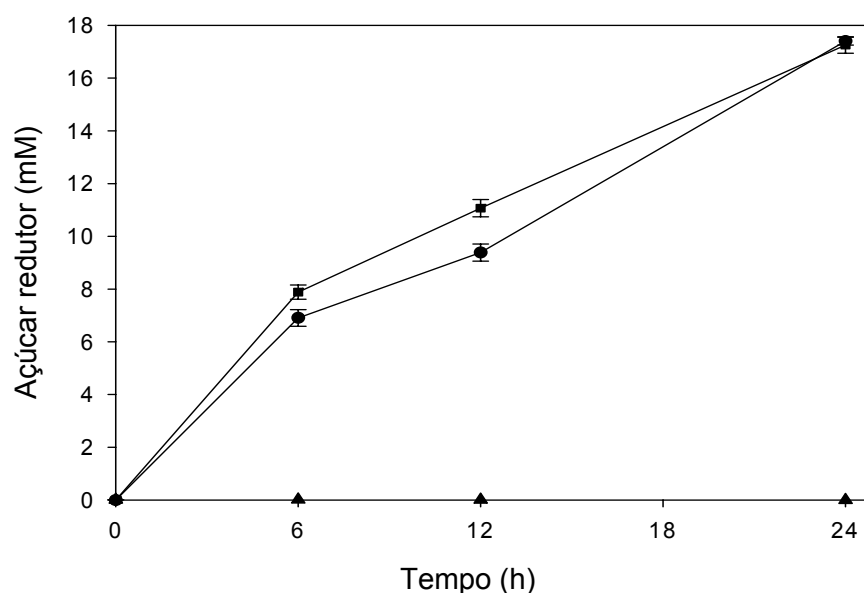


Figura 24 - Ação da enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* sobre galactomananas. (■) Goma guar, (●) Goma de alfarroba. Para todos os ensaios controle (▲), a enzima foi substituída por água destilada.

As α -galactosidases são classificadas em dois grupos baseado em suas especificidades ao substrato. Um grupo é específico para α -galactosídeos de baixa massa molecular como o ρ NP α Gal, melibiose e outros galactooligossacarídeos. O outro grupo de α -galactosidases atua sobre galactomananas e também hidrolisa substratos de baixa massa molecular (DEY et al., 1993). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga* pode estar agrupada na segunda categoria das α -galactosidases.

É encontrado na literatura que outras α -galactosidases são capazes de hidrolisar galactomananas. A α -galactosidase de *Helianthus annuus* L. hidrolisou goma de alfarroba e goma guar. Os limites de hidrólise alcançados foram de 50 % e 30 %, respectivamente. Estes resultados indicam que a enzima hidrolisa eficientemente ligações α -galactosídicas de galactomananas (KIM et al., 2003). ADEMARK et al (2001) trabalhando com múltiplas formas de α -galactosidases de *Aspergillus niger*, observaram 60 % de hidrólise da goma de alfarroba quando sozinha e 67 % quando combinada com β -manosidases, para as α -galactosidases II-IV. Por outro lado a α -galactosidase I não atacou os resíduos de D-galactose presentes na goma de alfarroba. Nenhuma atividade hidrolítica foi observada contra o polissacarídeo goma guar, para todas as enzimas estudadas. SIMERSKÁ et al. (2007) hidrolisaram goma de alfarroba e goma guar com a α -galactosidase de *Talaromyces flavus*. A enzima hidrolisou mais eficientemente a goma de alfarroba que goma guar, conseguindo máxima hidrólise após 24 h a 30 °C, para ambos os polissacarídeos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.441-448, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, p.1094, 1975.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. Determination of glucose with oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*, **Verlag Chemie, Weinheim**, p.1205-1215, 1974.

BISCHOFF, K. M.; SHI, L.; KENNELLY, P. J. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v.260, p.1-17, 1998.

BLÖCHL, A.; PETERBAUER, T.; RICHTER, A., Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1093-1096, 2007.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p. 93-99, 1987.

BORGES, E.E.L.; JUNIOR, J.I.R.; REZENDE, S.T.; PEREZ, S.C.J.G.A. Alterações fisiológicas em sementes de *Tachigali multijuga* (Benth.) (mamoneira) relacionadas aos métodos para a superação da dormência. **Revista Árvore**, v.28, p.317-325, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Determinação do teor de umidade. In: **Regras para análise de sementes**, S.1, p.80-83, 1976.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germination seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). **Plant Science**, v.117, p.33-43, 1996.

BULPIN, P.V.; GIDLEY, M.J.; JEFFCOAT, R.; UNDERWOOD, D.J. Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant α -galactosidase. **Carbohydrate Polymers**, v.12, p.155-168, 1990.

CALLEGARI, C. M. **Hidrólise enzimática de oligossacarídeos de rafinose em produtos de soja por α -galactosidases**. Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG, p.49. (Tese M.S), 2003.

CHINEN, I.; NAKAMURA, T.; FUKUDA, N. Purification and properties of α -galactosidase from immature stalks of *Saccharum officinarum* (sugar cane). **Journal of Biochemistry**, v.90, p.1453-1461, 1981.

DE REZENDE, S.T.; GUIMARÃES, V.M.; RODRIGUES, M.C.; FELIX, C.R. Purification and characterization of an α -galactosidase from *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.195-202, 2005.

DEY, P.M.; PATEL, S.; BROUWNLADER, M.D. Induction of α -galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) gum. **Biotechnology of Applied Biochemistry**, v.17, p.361–371, 1993.

DEY, P.M.; PRIDHAM, J.B. Biochemistry of α -galactosidases. **Advanced Enzymology**, v.36, p. 91-130, 1972.

DIXON, M. **Biochemistry Journal**, v.55, p.170-171, 1953.

EL-ADAWY, T.A.; RAHMA, E.H.; EL-BEDAWEY, A.A.; EL-BELTAGY, E.A. Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea, and lentil seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.58, p.1-13, 2003.

FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; CALLEGARI, C.M.; REIS, A.P.; BARROS, E.G.; REZENDE, S.T. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial α -galactosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.1018-10190, 2006.

GANTER, C.; BOCK, A.; BUCKEL, P.; MATTES, R. Production of thermostable recombinant α -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. **Journal of Biotechnology**, v.8, p.301-310, 1988.

GAO, Z.; SCHAFFER, A.A. A novel alkaline-alpha-galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. **Plant Physiology**, v.119, p.979-987, 1999.

GARRO, M.S.; VALDEZ, G.F.; OLIVER, G.; GIORI, G.S. Purification of α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Biotechnology**, v.45, p.103-109, 1996.

GOTE, M.; UMALKAR, H.; KHAN, I.; KHIRE, J. Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM 5146) and its application in the removal of flatulence causing factors from soymilk. **Process Biochemistry**, v.39, p.1723-1729, 2004.

GOTE, M.M.; KHAN, M. I.; GOKHALE, D.V.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M. Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). **Process Biochemistry**, v.41, p.1311-1317, 2006.

GUIMARÃES, V.M.; DE REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; FELIX, C.R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p.67-73, 2001.

ISHRUD, O.; ZAHID, M.; ZHOU, H.; PAN, Y. A water-soluble galactomannan from the seeds of *Phoenix dactylifera* L. **Carbohydrate Research**, v.335, p.297-301, 2001.

ITOH, T.; UDA, Y.; NAKAGAWA, H. Purification and characterization of α -galactosidase from watermelon. **Journal of Biochemistry**, v.99, p.243-250, 1986.

KANG, H.C.; LEE, S.H. Characteristics of an α -galactosidase associated with grape flesh. **Phytochemistry**, v.58, p.213-219, 2001.

KELLER, F.; PHARR, D.M. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharide. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A.A. Photoassimilate Distribution in Plants and Crops, **New York: Marcel Dekker**, p.157-184, 1996.

KIM, W.D.; KOBAYASHI, O.; KANEKO, S. SAKAKIBARA, Y.; PARK, G.G.; KUSAKABE, I.; TANAKA, H.; KOBAYASHI, H. α -Galactosidase from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare) cells. **Phytochemistry**, v.61, p.621-630, 2002.

KIM, W.D.; KANEKO, S.; PARK, G.G.; TANAKA, H.; KUSAKABE, I.; KOBAYASHI, H. Purification and characterization of α -galactosidase from sunflower seeds. **Biotechnology Letters**, v.25, p.353-358, 2003.

KING, M.R.; WHITE, B.A.; BLASCHEK, H.P.; CHASSY, B.M.; MACKIE, R.I.; CANN, I.K.O. Purification and characterization of a thermostable α -galactosidase from *Thermoanaerobacterum polysaccharolyticum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5676-5682, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-683, 1970.

MANZANARES, P.; GRAAFF, L.H.; VISSER, J. Characterization of galactosidase from *Aspergillus niger*. purification of a novel α -galactosidase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.383-390, 1998.

MARRACCINI, P.; ROGERS, W.J.; CAILLET, V.; DESHAYES, A.; GRANATO, D.; LAUSANNE, F.; LECHAT, S.; PRIDMORE, D.; PÉTIARD, V. Biochemical and molecular characterization of α -D-galactosidase from coffee beans. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.909-920, 2005.

McCLEARY, B.V.; NEUKOM, J. Effect on enzymic modification on the solution and interaction properties of galactomannan. **Progress in Food and Nutrition Science**, v.6, p.109-118, 1982.

McLLVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Biochemistry**, v.49, p.183-186, 1921.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1956.

OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, V.M.; BORGES, E.E.L.; FIALHO, L.S.; OLIVEIRA, M.G.A.A.; DE REZENDE, S.T. Purificação e caracterização de α -galactosidase de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli. **Revista Árvore**, v.29, n.4, p.535-543, 2005.

OLIVEIRA-NETO, O.B.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J. Partial purification and properties of cotyledonary α -galactosidase from three cultivars of *Vigna unguiculata*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, p.91-96, 1998.

PUCHART, V.; VRŠANSKÁ, M.; BHAT, M.K.; BIELY, P. Purification and characterization of α -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1524, p.27-37, 2000.

REID, J.S.G.; MEIER, H. Enzyme activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidases and β -mannosidase by the aleurone layer. **Planta**, v.112, p.301-308, 1973.

REZESSY-SZABÓ, J.; NGUYEN, Q.D.; HOSCHKE, A.; BRAET, C.; HAJÓS, G.; CLAEYSSSENS, M. A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395.62/b: Purification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, p.55-62, 2007.

SEGEL, I. H. **Bioquímica. Teoria e Problemas**. Cap. 4 – Enzimas, 1979.

SHABALIN, A.K.; KULMINSKAYA, A.A.; SAVEL'EV, A.N.; SHISHLYANNIKOV, S.M.; NEUSTROEV, K.N. Enzymatic properties of α -galactosidase from *Trichoderma reesei* in the hydrolysis of galactooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.231-239, 2002.

SIMERSKÁ, P.; MONTI, D.; ČECHOVÁ, I.; PELANTOVÁ, H.; MACKOVÁ, M.; BEZOUŠKA, K.; RIVA, S.; KŘEN, V. Induction and characterization of an unusual α -D-galactosidase from *Talaromyces flavus*. **Journal of Biotechnology**, v.128, p.61-71, 2007.

SOH, C-P.; ALI, Z.M.; LAZAN, H. Characterization of a α -galactosidase with potential relevance to ripening related texture changes. **Phytochemistry**, v.67, p.242-254, 2006.

SUZUKI, H.; LI, S.C.; LI, Y.T. α -Galactosidase from *Mortierella vinacea*. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.245, p.781-786, 1970.

TONINI, P.P.; LISBOA, C.G.S.; SILVA, C.O.; MAZZONI-VIVEIROS, S.C.; BUCKERIDGE, M.S. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. **Trees**, v.21, p.13-21, 2006.

VARBANETS, L.D.; MALANCHUK, V.M.; BUGLOVA, T.T.; KUHLMANN R.A. *Penicillium* sp.23 α -galactosidase: purification and substrate specificity. **Carbohydrate Polymers**, v.44, p.357-363, 2001.

VIANA, S.F. **Caracterização de α -galactosidase de soja para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose**. Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG, p.65. (Tese M.S), 2002.

VIANA, S.F.; GUIMARÃES, V.M.; JOSÉ, I.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; COSTA, N.M.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; DE REZENDE, S.T. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 93, p.665-670, 2005.

VIANA, P.A.; DE REZENDE, S.T.; MARQUES, V.M.; TREVIZANO, L.M.; PASSOS, F.M.L.; OLIVEIRA, M.G.A.; BEMQUERER, M.P.; OLIVEIRA, J.S.; GUIMARÃES, V.M. Extracellular α -galactosidase from *Debaryomyces hansenii* UFV-1 and its use in the hydrolysis of raffinose oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2385-2391, 2006.

VIDAL-VALVERDE, C.; FRIAS, J.; SIERRA, I.; BLAZQUEZ, I.; LAMBEIN, F.; KUO, Y.H. New functional legume foods by germination: effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. **European Foods Research and Technology**, v.215, p.472-477, 2002.

WILLIAMS, J.; VILLARROYA, H.; PETEK, F. α -Galactosidases II III and IV from seeds of *Trifolium repens*. **Biochemical Journal**, v.175, p.1069-1077, 1978.

ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase. **Gene**, v.140, p.227-231, 1994.

ZIEGLER, P. Carbohydrate degradation during germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Eds.). Seed development and germination. **New York: Macel Dekker**, p.447-474, 1995.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E CLONAGEM DE UM FRAGMENTO DO GENE DA ESTAQUIOSE SINTASE EM SEMENTES DE *Glycine max* L. MERRIL

RESUMO

Os galactooligossacarídeos (GO) são carboidratos presentes em leguminosas. Eles exercem funções importantes como tolerância à dessecação e fonte de energia para a germinação. Em soja, a estaquiose é biossintetizada pela enzima estaquiose sintase (STS). Este açúcar está presente em altos níveis na semente, e é responsável por distúrbios gastrointestinais em humanos. Portanto, existe interesse em estudar o gene *STS* de soja visando futuras manipulações genéticas para a redução do conteúdo de estaquiose em sementes. Os objetivos deste trabalho foram: quantificar o conteúdo de estaquiose durante o enchimento do grão de soja; determinar a atividade de STS; isolar um fragmento do gene *STS* e verificar o seu padrão de expressão. Todas as análises foram realizadas com amostras de 8 estádios de desenvolvimento, divididos de acordo com a massa fresca do grão (1º: 75, 2º: 150, 3º: 225, 4º: 300, 5º: 375, 6º: 450, 7º: 525 mg e 8º: soja madura). A quantificação de estaquiose foi feita por HPLC. Em sementes maduras de soja, o conteúdo de estaquiose foi 4,10 % e a atividade específica da enzima STS foi 2,15 nkat/mg, usando galactinol e rafinose como substratos. Um fragmento do gene *STS* foi isolado por PCR a partir de cDNA de semente e *primers* degenerados. A clonagem de um fragmento de 983 pb no vetor *pGEM-T Easy* foi confirmada por seqüenciamento. O alinhamento deste fragmento, usando a ferramenta BLAST, mostrou que a seqüência clonada se refere ao gene *STS*, até então não isolado em soja. Os resultados demonstraram que o gene *STS* é expresso em todos os estádios de desenvolvimento do grão, além de folhas, caule e raiz. Este trabalho abre perspectivas para pesquisas biotecnológicas visando o desenvolvimento de variedades de soja mais adequadas para o consumo humano.

Palavras chave: galactooligossacarídeos, estaquiose sintase, soja.

1. INTRODUÇÃO

Os galactooligossacarídeos (GO) estão presentes em altos níveis nas sementes dos grãos de leguminosas (JONES et al., 1999). Eles são carboidratos importantes de transporte no floema, servem como reserva para muitas plantas (SPRENGER e KELLER, 2000) e são os α -galactosídeos mais comuns que se acumulam durante o desenvolvimento e maturação das sementes (PETERBAUER e RICHTER, 1998). Dentre as múltiplas funções que exercem, destacam-se como fonte primária de energia durante a germinação das sementes (LAHUTA et al., 2000).

Os GO também apresentam um papel positivo na aclimatização ao frio, e, conferem tolerância a dessecação durante a maturação da semente (JONES et al., 1999), possivelmente, protegendo e estabilizando estruturas celulares (KARNER et al., 2004).

A via biossintética dos GO já está bem estabelecida, a síntese depende da ação seqüencial de uma série de α -galactosiltransferases. No primeiro passo, UDP-galactose mais mio-inositol formam galactinol mais UDP, pela atividade da enzima galactosil sintase (GS). No segundo passo, a enzima rafinose sintase (RFS) transfere um resíduo de galactose do galactinol para a sacarose, formando rafinose e mio-inositol. No terceiro passo, a enzima estaquiose sintase (STS) transfere outro resíduo de galactose do galactinol para a rafinose, formando os produtos estaquiose e mio-inositol (BACHMANN et al., 1994). Desta forma os GO

podem ser considerados extensões da sacarose, variando apenas no número de resíduos de galactose (SPRENGER e KELLER, 2000).

No entanto, a presença dos GO em sementes maduras de leguminosas, constitui um fator antinutricional para humanos. Em soja, rafinose e estaquiose são os oligossacarídeos mais abundantes (NEUS et al., 2005) e os principais causadores de flatulência. Portanto, existe interesse por variedades de soja com níveis reduzidos de GO.

Vários trabalhos foram realizados para reduzir o conteúdo de fitato em sementes de soja. O fitato é considerado fator antinutricional porque o trato intestinal dos animais que não são ruminantes não possui a enzima fitase, necessária para metabolizar o fitato, e, portanto o fósforo do fitato não é absorvido, sendo necessário suplementar a alimentação com fósforo inorgânico (MEIS et al., 2003). A via biossintética do fitato compartilha um intermediário comum à via biossintética dos GO, o mio-inositol. Uma mutação no gene da mio-inositol 1-fosfato sintase (*MIPS*) bloqueou a síntese de mio-inositol 1-fosfato, e conseqüentemente, reduziu o conteúdo de mio-inositol. O genótipo originado apresentou redução nos níveis de fitato e GO (HITZ et al., 2002).

Até o momento nenhum trabalho foi desenvolvido para diminuir o conteúdo dos GO em soja através da redução apenas de estaquiose. Em soja, a estaquiose está presente em níveis mais elevados que rafinose (GUIMARÃES et al., 2001; VIANA et al., 2005), e, é o principal causador de distúrbios gastrointestinais em humanos. Uma vez que estaquiose é sintetizada pela enzima estaquiose sintase, uma das maneiras de reduzir o conteúdo de estaquiose em sementes de soja é através do silenciamento do gene que codifica para a enzima STS, e assim alterar a via de síntese desse açúcar.

O gene que codifica a enzima STS ainda não foi seqüenciado, portanto, os objetivos deste trabalho foram isolar, clonar e sequenciar um fragmento do gene *STS*, para que futuramente técnicas de engenharia genética possam ser desenvolvidas para a obtenção de soja com baixa estaquiose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Sequenciamento e Análise de fragmentos de DNA, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Material genético

Todas as análises foram realizadas utilizando folhas e sementes de soja da variedade comercial CAC-1 cultivada em casa de vegetação sob aquecimento controlado e fotoperíodo de 14 h de luz.

As sementes foram coletadas em um período de aproximadamente três meses, separadas em oito estádios de desenvolvimento, que compreenderam praticamente todo o período de enchimento do grão, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C , para posterior análise. Esses estádios foram determinados com base no peso de matéria fresca da semente: 1^o – 0 a 75 mg; 2^o – 76 a 150 mg; 3^o – 151 a 225 mg; 4^o – 226 a 300 mg; 5^o – 301 a 375 mg; 6^o – 376 a 450 mg; 7^o – 451 a 525 mg e 8^o – representado por sementes maduras (LANNA, 2002).

As folhas foram coletadas das plantas que tinham sementes correspondentes ao primeiro estádio, e, logo após, foram coletadas de 15 em 15 dias até a planta apresentar sementes maduras.

2.2. Extração e determinação da atividade enzimática

A enzima estaquiose sintase foi extraída das sementes de soja de cada estágio de desenvolvimento do grão e sua atividade enzimática foi determinada de acordo com PETERBAUER et al. (2002) com modificações. Para a etapa de extração, amostras de 1,0 g de sementes foram maceradas com 4 mL de tampão de extração (Tampão HEPES-NaOH 0,05 M, pH 7,0; MgCl₂ 0,01 M; EGTA 0,025 M; DTT 0,01 M e polivinil polipirrolidone (PVPP) 1 %). As amostras foram centrifugadas a 13.000 x g durante 20 min a 4 °C em ultracentrífuga refrigerada (Beckman J2-MI). O sobrenadante foi passado por uma coluna de filtração em gel G-25 (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia) para dessalinização e utilizado para a determinação da atividade enzimática. Os ensaios de atividade consistiram de 100 µL do extrato enzimático, 25 µL de galactinol 60 mM (Sigma) e 25 µL de rafinose 120 mM (Sigma). A mistura de reação foi incubada a 35 °C por 4 h e em seguida foi submetida à fervura por 5 min para desnaturação das proteínas. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min em centrífuga tipo *Eppendorf* 5415C e o sobrenadante foi liofilizado por um período de 8 h. Em seguida as amostras foram ressuspensas em 110 µL de etanol 80 % e filtradas em filtro Millipore de 0,45 micra de diâmetro e armazenadas a – 20 °C, para análise posterior em CLAE. O tempo do ensaio enzimático no qual a enzima estaquiose sintase apresentou linearidade de formação de produto durante a reação foi determinado através de uma curva de tempo que correlacionou [P] (mg de estaquiose/mL de extrato enzimático) vs tempo (h).

A enzima galactan:galactan galactosiltransferase (GGT) foi extraída das folhas frescas de soja, conforme descrito acima, exceto que o tampão de extração utilizado foi McIlvaine pH 5,0 (McLLVAINE, 1921) e a atividade enzimática foi determinada de acordo com BACHMANN et al. (1994) com modificações. Os ensaios de atividade consistiram de 250 µL do extrato enzimático e 50 µL de rafinose 120 mM (Sigma). A mistura de reação foi incubada a 35 °C por 4 h e em seguida foi submetida à fervura por 5 min para desnaturação das proteínas. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 min em centrífuga tipo *Eppendorf* 5415C e o sobrenadante foi liofilizado por um período de 8 h. Em seguida as amostras foram ressuspensas em 110 µL de

etanol:água 80 % e filtradas em filtro Millipore de 0,45 micra de diâmetro e armazenadas a – 20 °C, para análise posterior em CLAE.

2.3. Determinação do teor de proteína nos extratos enzimáticos

Os teores de proteínas nas preparações enzimáticas serão determinados espectrofotometricamente a 595 nm, conforme descrito por BRADFORD (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

2.4. Quantificação dos galactooligossacarídeos (GO) nas sementes de soja

2.4.1 Extração dos GO

Para a extração dos GO nas sementes de soja durante o enchimento do grão, foi empregada a metodologia descrita por GUIMARÃES et al. (2001), com modificações. Aproximadamente 50 mg das amostras liofilizadas e pesadas em tubos tipo *ependorf* foram usadas para o processo de extração dos açúcares solúveis. A fração óleo, presente nas amostras foi retirada em 4 extrações com 1 mL de éter de petróleo a 42 °C, por 5 min. Os açúcares foram então extraídos em 3 etapas de tratamento com etanol 80 %, a 100 °C, por 5 min. Após cada extração feita com éter de petróleo ou álcool 80 %, a mistura foi submetida à centrifugação em centrífuga do tipo *Eppendorf* 5415C, 14.000 rpm, por 20 min. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C, os açúcares foram ressuspensos em 1 mL de etanol 80 % e congelados a – 20 °C. Após 24 h, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições já descritas, passadas em filtro Millipore de 0,45 micra de diâmetro e armazenadas a - 20 °C, para posterior análise por CLAE.

2.4.2. Quantificação dos GO por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As atividades enzimáticas da estaquiase sintase e GGT, bem como os teores dos GO presentes nas sementes de soja durante o enchimento do grão

foram analisados por CLAE em cromatógrafo Shimadzu série 10A, equipado com detector de índice de refração, uma coluna em aço inox (25 X 0,465 cm) contendo a fase estacionária o grupo aminopropil (-NH₂). A mistura acetonitrila-água (80:20) em condições isocráticas foi a fase móvel. As análises foram realizadas a 35 °C sob o fluxo de 1 mL/min e todo o processo foi controlado por um computador acoplado ao sistema.

O método foi padronizado para a determinação quantitativa dos açúcares solúveis. A partir de uma solução estoque formada pela mistura dos açúcares sacarose, rafinose e estaquiose nas concentrações de 10, 1 e 10 (mg/mL), respectivamente, foram feitas diluições para obtenção das soluções padrão. Cada solução foi injetada no cromatógrafo líquido para obtenção das curvas, correlacionando a área do pico com a concentração do açúcar na solução. As retas foram obtidas por regressão linear. Um volume de 20 µL de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada açúcar presente foi identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenção e concentrações dos açúcares nas soluções padrão. Todos os cálculos foram feitos pelo computador acoplado ao sistema de CLAE, equipado com o programa LC-10 versão 2.2 para Windows.

2.5. Desenho de *primers* degenerados para o gene da estaquiose sintase de soja.

O gene da estaquiose sintase de soja ainda não foi seqüenciado, portanto *primers* degenerados foram desenhados para aumentar a probabilidade de conseguir isolar um fragmento correspondente ao gene da estaquiose sintase. Os *primers* degenerados foram desenhados de acordo com o trabalho de PETERBAUER et al. (1999) com base na seqüência da estaquiose sintase de *Vigna angularis* (acesso Y19024). As seqüências dos *primers* estão mostradas abaixo:

STS2 (F): 5' GA(AG) GA(AG) ATI GA(CT) GA(CT) (CT)TI TT(CT) GGI GG 3'

STS3 (R): 5' CCA ICC IGC ICC (CT)TG (AG)CA (AG)TT (AG)AA 3'

2.6. Extração de RNA Total

A extração de RNA total das sementes foi conduzida de acordo com SAMBROOK et al. (1989), com algumas adaptações ao protocolo original. Todas as etapas de extração do RNA total foram realizadas a 4 °C e em condições livres de RNAses.

Foram macerados cerca de 4 g de sementes na presença de nitrogênio líquido e a cada amostra foram adicionados 18 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5; EDTA 1mM e SDS 1%), 6 mL de fenol e 6 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados vigorosamente em agitador vórtex por 15 min e centrifugados a 4 °C por 10 min a 8.000 x g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e nele foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 2 M e 2 volumes de etanol 96 % e, em seguida, a mistura foi incubada por 1 h a -20°C. Foi realizada uma nova centrifugação a 8.000 x g por 15 min e o precipitado resultante foi lavado com etanol 70 % e ressuscitado em 2,5 mL de água DEPC (água deionizada tratada com dietil pirocarbonato). Após uma centrifugação de 5 min a 5.000 x g, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foram adicionados 2,5 mL de cloreto de lítio 4 M. O tubo foi incubado por cerca de 12 h a 4 °C para promover a precipitação do RNA. A amostra foi então centrifugada a 8.000 x g por 30 min e o precipitado foi ressuscitado em 1,8 mL de água DEPC e acrescido de 0,2 mL de acetato de sódio 2 M e 3,6 mL de etanol 96 %. Após precipitação por cerca de 4 h a -20 °C, a solução foi centrifugada a 8.000 x g por 10 min e, em seguida, o precipitado foi lavado 2 vezes em etanol 70 %, e depois de seco foi ressuscitado em 200 µL água DEPC.

As amostras de RNA total foram quantificadas a 260 nm e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2 % em tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do RNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema de fotodocumentação *Eagle Eye II* (Stratagene).

2.7. Síntese da primeira fita de cDNA

Para as reações de RT-PCR todas as amostras foram tratadas com *RQ1 RNase-free DNase* (Promega), conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas em tampão da DNase 1X (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0; MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 1 mM) por 45 min a 37 °C e extraídas com igual volume de fenol e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) seguido de uma centrifugação a 12.000 x g por 2 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e realizada uma outra extração com fenol e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa foi submetida à precipitação com acetato de sódio 3 M e etanol 96 % por 1 h a -20 °C e depois centrifugada a 12.000 x g por 15 min. O precipitado foi lavado com etanol 70 %, seco e ressuspendido em água DEPC. As amostras foram novamente quantificadas em espectrofotômetro.

A fita de cDNA inicial foi sintetizada usando o kit *SuperScript™ Preamplification System for First-Strand Synthesis System* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA total (5 µg) foram incubadas com 1 µL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ a 70 °C por 10 min e em seguida, incubadas no gelo. Foram adicionados tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 5 mM, os desoxirribonucleotídeos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (0,5 mM cada) e DTT 5 mM, e estas foram incubadas a 42 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionadas 200 U da enzima transcriptase reversa e as amostras foram incubadas a 42 °C por 50 min e a 70 °C por 15 min. Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA foi degradado pela adição de 2 U de RNase H sob incubação a 37 °C por 20 min. Para cada amostra foi feito um controle negativo que continha todos os reagentes menos a transcriptase reversa.

Para verificar a qualidade do cDNA e normalizar a quantidade de cDNA molde, reações de síntese da segunda fita e amplificação por PCR foram realizadas com um par de *primers* de actina de soja (F: 5' CCC CTC AAC CCA AAG GTC AAC AG 3' e R: 5' GGA ATC TCT CTG CCC CAA TTG TG 3').

2.8. Amplificação de um fragmento do gene da estaquiose sintase

As reações de PCR foram conduzidas, cada uma delas contendo a combinação dos *primers* degenerados STS2(F) e STS3(R), com o objetivo de amplificar o gene da estaquiose sintase. Cada reação de PCR de 25 μ L continha 5 μ L da reação de síntese da primeira fita, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, os quatro dNTPs (0,2 mM cada), 0,8 μ M de *primers* e 1 U de Taq DNA polimerase (Phoeneutria, pht).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador da GeneAmp[®] PCR System modelo 9700 (Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação foram os mesmos usados por PETERBAUER et al. (1999) constituídos por uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos constituídos por: uma etapa de desnaturação a 94 °C por 1 min, uma etapa de anelamento dos *primers* ao cDNA molde a 49 °C por 1,5 min e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 min, e um período adicional de extensão a 72 °C por 8 min.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE 1X contendo 0,2 μ g/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado com o auxílio do equipamento Eagle EyeTM II (Stratagene). Após a confirmação da amplificação, o fragmento de interesse foi excisado do gel de agarose com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) e utilizado para clonagem.

2.9. Clonagem de um fragmento do gene da estaquiose sintase

O fragmento de DNA de interesse isolado foi clonado em vetor *pGEM-T Easy*. Para tal, a reação foi feita utilizando o *pGEM[®]-T Easy Vector System I* (Promega), e conduzida conforme procedimento descrito pelo fabricante. A reação continha 5,0 μ L do tampão 2X *Rapid Ligation Buffer* (Tris HCl 60 mM, pH 7,8; MgCl₂ 20 mM; DTT 20 mM; ATP 1 mM e PEG 10 %), 1,0 μ L do vetor *pGEM-T Easy* (DNA plasmidial preparado pela digestão com ECO RV e adição de timidinas na extremidade 3' - 50 ng), 3,0 μ L do produto de PCR purificado a partir do gel de agarose (aproximadamente 50 ng), 1,0 μ L de T₄ DNA Ligase

(Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; KCl 50 mM; DTT 1 mM; EDTA 0,1 mM e glicerol 50 %), totalizando um volume final de 10,0 μ L. Como controle positivo, foram utilizadas as mesmas quantidades dos reagentes descritos para a reação de ligação, tendo como alteração a substituição do produto de PCR por 2,0 μ L do *Control Insert DNA* (fragmento de 542 pares de base com resíduos terminais de desoxiadenosina) e 1,0 μ L de água deionizada autoclavada. Após o preparo, as misturas de reações foram incubadas a 4 °C, por um período de 12 h.

2.10. Transformação de *Escherichia coli* DH5 α

As células de *E. coli* DH5 α ultracompetentes foram transformadas por choque térmico segundo SAMBROOK et al. (1989). Foram adicionados a 200 μ L de células ultracompetentes 5 μ L da reação de ligação em um microtubo e este foi incubado por 30 min no gelo. O choque térmico foi realizado a 42 °C por 45 segundos, as células foram mantidas no gelo por 2 min e, em seguida, foram adicionados 800 μ L de meio SOC (extrato de levedura 0,5 %; triptona 2 %; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM e glicerol 10 %). A cultura foi incubada a 37 °C por 1 h a 150 rpm, as células foram concentradas por centrifugação a 1500 x *g* por 5 min e ressuspensas em 200 μ L de SOC. Uma alíquota de 100 μ L foi plaqueada em meio LB sólido contendo ampicilina 50 μ g/ μ L, X-Gal 1 mg e IPTG 10 mM. As placas foram incubadas por cerca de 16 h a 37 °C.

2.11. Identificação das colônias transformadas

Após incubação das placas contendo as células de *E. coli* DH5 α transformadas, foram selecionadas 10 colônias brancas por placa, e foi feita uma réplica de cada. As colônias foram analisadas por reações de PCR com o conjunto de *primers* degenerados. As colônias que mostraram a amplificação do produto esperado foram inoculadas em 5,0 mL de meio LB líquido (20 g/L) e 2,5 μ L de ampicilina 50 μ g/ml e incubadas a 37 °C durante 16 h sob agitação de 180 rpm. Após o crescimento, as bactérias foram aliquoteadas em glicerol 20 %, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. O DNA plasmidial foi extraído com

o kit *Wizard®Plus SV Minipreps* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração do DNA plasmidial foi verificada em gel de agarose 0,8 % e a clonagem foi confirmada utilizando-se amostras de DNA plasmidial em reações de PCR realizadas como descrito anteriormente e por sequenciamento.

2.12. Seqüenciamento do fragmento de DNA

O seqüenciamento do clone foi realizado em seqüenciador automático ABI PRISM 377 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) utilizando-se o kit ABI PRISM *BigDye® III v 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento foram conduzidas de acordo com a técnica de seqüenciamento por terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER et al. (1977). As reações de amplificação linear foram realizadas usando o termociclador (Applied Biosystems), *GeneAmp® PCR System 9.700*, programado para um período inicial de desnaturação a 96 °C, por 2 min, seguido por 25 ciclos de 96 °C, por 30 segundos; 55 °C, por 20 segundos; e 60 °C, por 4 min. Foram utilizados os *primers* universais: M13F e M13R. Os produtos de extensão, produzidos na reação de seqüenciamento, foram purificados pela adição de 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M (pH 4,8), 2 volumes de etanol 95 % e incubação à temperatura ambiente por 15 min. Os fragmentos foram coletados por centrifugação (10.000 x *g* por 20 min) e o precipitado foi lavado com etanol 70 %, seco à temperatura ambiente e, em seguida, ressuspenso em tampão de corrida (17 % de azul de bromofenol:83 % de formamida). Finalmente, os fragmentos foram desnaturados a 94 °C por 5 min e separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 4,5 %.

As seqüências obtidas foram analisadas pelo Programa *Seqman* do pacote DNASTAR (DNASTAR Inc.), comparadas e alinhadas com seqüências disponíveis no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*) com o auxílio da ferramenta BLAST (*blast analysis*) e posteriormente alinhadas no programa *Clustal W*.

2.13. Desenho de *primers* específicos para o gene da estaquiose sintase

Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados a partir da seqüência obtida do fragmento isolado com os *primers* degenerados. Os *primers* foram desenhados com auxílio do *Primer3 Input Program* (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi).

O conjunto de *primers* amplifica um fragmento de 284 pb, e foi utilizado para determinar do perfil de expressão do gene da estaquiose sintase nas sementes de soja durante o enchimento do grão e em tecido-específico. Parâmetros que atestam a viabilidade de uso destes oligonucleotídeos foram determinados com o auxílio do programa *QuickPrimer* do pacote DNASTAR (DNASTAR INC.). As seqüências dos *primers* estão mostradas abaixo:

Primer 3 (F): 5' AAC CAA GCA AAT TCC CAT G 3'

Primer 4 (R): 5' GGA ACA CAA GCA TCT TAA TG 3'

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição dos galactooligosacarídeos

Em muitas espécies de plantas, os GO são encontrados em cotilédones e cascas de sementes. Durante a maturação da semente, ocorre acúmulo destes oligossacarídeos, e, estes açúcares apresentam um importante papel na aquisição da tolerância à dessecação, e conseqüentemente, preservam as sementes durante o armazenamento em longo prazo (HORBOWICZ e OBENDORF, 1994; OBENDORF, 1997).

Neste trabalho, a sacarose e os GO (rafinose e estaquiose) foram quantificados nas sementes de soja durante o enchimento do grão, para verificar o perfil de acúmulo destes açúcares. Os resultados estão apresentados na Figura 1.

A sacarose foi o açúcar mais abundante e estava presente em todos os estádios de desenvolvimento da semente. Houve um ligeiro acúmulo de sacarose, atingindo uma concentração máxima de 10,21 % no 5^o estágio, seguido de uma redução até o 8^o estágio, correspondente a soja madura. A rafinose estava presente nas sementes em concentrações muito baixas, atingindo máxima concentração na soja madura de 0,53 %. A estaquiose foi encontrada apenas na soja madura, com uma concentração de 4,1 %.

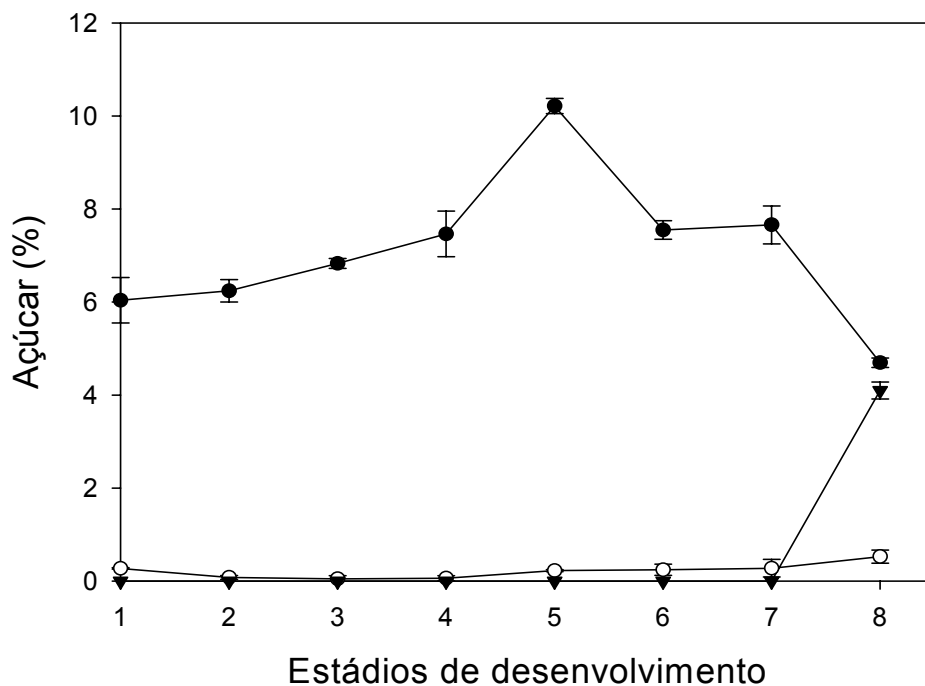


Figura 1 - Composição de açúcares durante o desenvolvimento das sementes de soja. (●) sacarose; (○) rafinose e (▼) estaquiose.

O decréscimo observado na concentração de sacarose na soja madura pode ser devido ao fato de que este açúcar é substrato para a síntese de rafinose. Por outro lado, a rafinose não estava presente em altos níveis, e, portanto deve ter sido utilizada para a síntese de estaquiose.

O fato de ter sido encontrado rafinose e estaquiose na soja madura indica que estes açúcares foram sintetizados durante o estágio de maturação das sementes. Acúmulo de rafinose e especialmente estaquiose nos últimos estágios de desenvolvimento da semente também foi observado por OOMS et al. (1993) em *Arabidopsis thaliana*.

OBENDORF et al. (1998) encontraram resultados semelhantes em sementes de *Glycine max* var. Chippewa 64. Durante o desenvolvimento da semente, a maturação foi alcançada em 46 DAF (dias após o florescimento). A sacarose aumentou constantemente no cotilédone atingido concentração máxima em 62 DAF. A rafinose apresentou um pequeno aumento em 44 DAF e se

manteve constante. A estaquiose acumulou rapidamente entre 44 e 54 DAF. Os autores observaram que houve um decréscimo na concentração de mio-inositol com simultâneo aumento de galactinol entre 44 e 46 DAF, coincidindo com o início de acúmulo de estaquiose.

Em sementes de *Phaseolus vulgaris* cv. Vernel o acúmulo de rafinose e estaquiose apresentaram um perfil parecido com o trabalho de BAILLY et al. (2001). A maturação da semente foi alcançada em 45 DAF. A concentração de sacarose foi alta, e manteve quase constante no eixo embrionário durante todo o período de desenvolvimento da semente. A rafinose foi o açúcar menos abundante, atingindo concentração máxima em 46 DAF. A estaquiose começou a ser sintetizada em 40 DAF e apresentou máxima concentração após 46 DAF em níveis 2,5 vezes maiores que a rafinose.

Estes resultados também são coerentes com os estudos de DJEMEL et al. (2005) em *Medicago truncatula* Gaertn. Estes autores observaram alta concentração de estaquiose durante a maturação da semente. A maturação das sementes foi alcançada após 25 DAF. A sacarose alcançou concentração máxima em 3 DAF e depois decresceu constantemente, enquanto que a rafinose não foi acumulada. A estaquiose foi sintetizada 28 DAF e atingiu máxima concentração em 35 DAF.

3.2. Atividade da estaquiose sintase

A atividade da enzima estaquiose sintase (STS) foi determinada em todos os estádios de desenvolvimento das sementes de soja. As condições do ensaio foram determinadas com base no trabalho de PETERBAUER et al. (2002) para a enzima de *Pisum sativum*, com modificações, como descrito no item 2.2. Ensaio pré-eliminarem nas temperaturas variando de 30 - 37 °C definiram a temperatura de 35 °C para a enzima STS de soja.

Após a definição das condições do ensaio, a primeira coisa que foi feita antes de determinar a atividade da STS de soja foi determinar o tempo do ensaio. É importante estabelecer os limites de linearidade, ou seja, estabelecer a concentração máxima de produto que pode ser acumulado antes que as respostas de [P] vs tempo e velocidade de síntese vs [E] deixem de ser lineares. Os resultados estão apresentados na Figura 2.

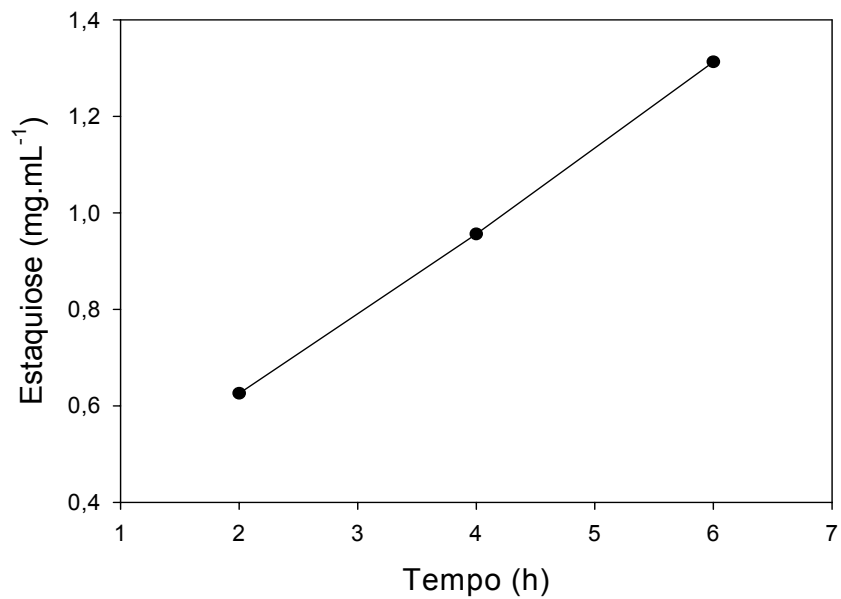


Figura 2 - Determinação da taxa de formação de estaquiose pela enzima estaquiose sintase de soja em diferentes tempos de reação.

Foi observada uma relação linear entre a formação de produto, estaquiose, e o tempo de ensaio enzimático a 35 °C. O tempo escolhido para o ensaio foi de 4 h.

A atividade da enzima STS de soja determinada em todos os estádios de desenvolvimento da semente está apresentada na Figura 3.

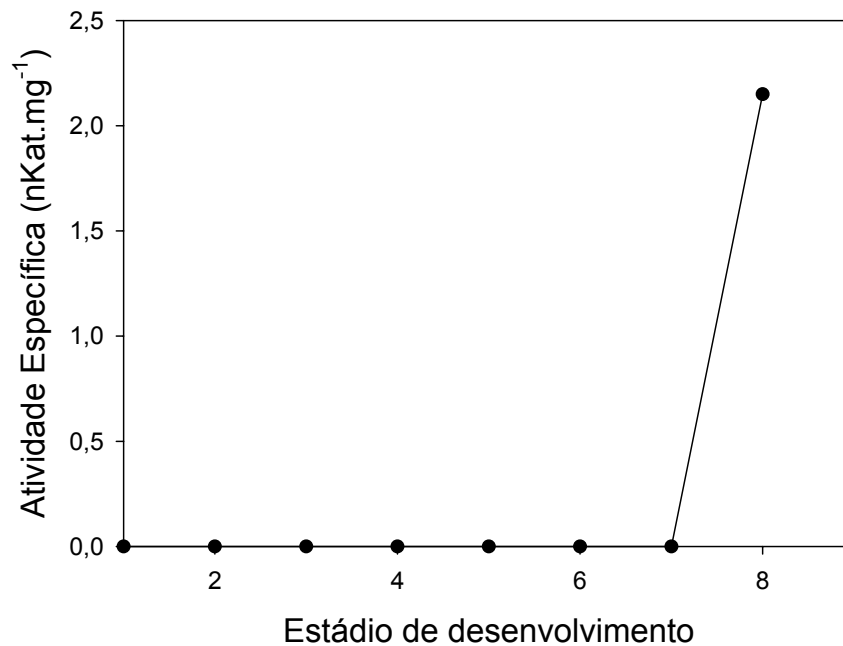


Figura 3 - Determinação da atividade específica da enzima estaquiase sintase de soja durante o desenvolvimento das sementes. Foram utilizados galactinol e rafinose como substratos para a enzima estaquiase sintase. O resultado está expresso em nkat por mg de proteína. Todos os valores foram determinados de três repetições.

A atividade específica no extrato solúvel das sementes de soja foi 2,15 nkat/mg ($7,9 \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}/\text{mg}$), e foi detectada apenas na soja madura. Estes resultados estão coerentes com a quantificação de açúcares (Figura 1), pois a estaquiase foi encontrada somente na soja madura.

Em *Vigna angularis* a atividade específica da enzima STS foi muito menor, 0,046 nkat/mg, no extrato bruto solúvel das sementes. A enzima além de sintetizar estaquiase a partir de galactinol e rafinose, foi capaz de sintetizar galactosilnonitol (atividade de galactosilnonitol sintase, GOS) a partir de galactinol e D-ononitol, como também foi capaz de transferir o grupo galactosil do galactosilnonitol para a rafinose formando estaquiase. Estes resultados demonstraram que a enzima atuou sobre múltiplos substratos, e ocupa um papel central em reações de transferência de galactose (PETERBAUER e RICHTER, 1998).

A enzima STS de sementes de *Lens culinaris* apresentou atividade específica de 0,029 nkatal/mg, quando galactinol e rafinose foram utilizados como substratos. Esta enzima participa tanto da via de síntese dos GO como de

galactosil ciclitols. A enzima catalisou a reação de transferência do grupo galactosil do galactinol para o D-pinitol formando os produtos galactopinitol A e mio-inositol. O galactopinitol A foi galactolisado pela mesma enzima para formar ciceritol. A enzima STS não somente foi capaz de utilizar o galactopinitol A como acceptor de galactose, mas como doador para formar estaquiose a partir de rafinose (HOCH et al., 1999).

PETERBAUER et al. (2002) encontraram atividade específica de 0,013 nkat/mg no extrato bruto solúvel das sementes de *Pisum sativum* para a enzima STS. A enzima é multifuncional e operou pelo mecanismo pingue-pongue. No primeiro passo da reação, o grupo galactosil do galactinol foi transferido para a enzima formando um complexo intermediário enzima-galactose. No segundo passo, a enzima transferiu a galactose para a rafinose (atividade de STS). Todas as reações são reversíveis e aconteceram em um único sítio ativo.

Estudos posteriores realizados por PETERBAUER et al. (2003) confirmaram que a enzima também foi capaz de sintetizar verbascose a partir de galactinol e estaquiose (atividade de verbascose sintase). A enzima catalisou a transferência do grupo galactosil de uma molécula de estaquiose para a outra, formando verbascose e rafinose como produto. Foi observado que a reação de síntese de verbascose entre duas moléculas de estaquiose é independente de galactinol, e foi realizada pela enzima STS e não pela enzima galactan:galactan galactosil transferase (GGT).

Neste trabalho a determinação da atividade da enzima STS de soja foi feita apenas na presença dos substratos galactinol e rafinose, não sendo possível afirmar se esta enzima também é multifuncional, e quais seriam seus substratos e produtos.

Um ensaio enzimático contendo apenas o substrato rafinose e extrato de folhas como fonte da enzima foi realizado com o objetivo de verificar a presença da enzima GGT. A enzima GGT foi descrita por vários autores (BACHMANN et al., 1994; BACHMANN e KELLER, 1995; BRAUN e KELLER, 2000; INAN HAAB e KELLER, 2002). Ela é capaz de sintetizar estaquiose a partir de duas moléculas de rafinose, numa reação independente de galactinol. Esta enzima foi encontrada até o momento apenas em vacúolos de folhas. Os resultados demonstraram que nenhuma atividade desta enzima foi detectada nas folhas de soja em nossas

condições de trabalho, portanto, pode ser afirmado que a síntese de estaquiase é devido somente à enzima STS.

3.3. Isolamento de um fragmento do gene que codifica a enzima STS de soja

Um fragmento do gene que codifica para a enzima STS de soja foi isolado usando *primers* degenerados desenhados como descrito no item 2.5. O RNA extraído de todos os estádios de desenvolvimento da semente apresentou boa qualidade como apresentado na Figura 4. A normalização da quantidade de cDNA molde nas reações de PCR foram realizadas por meio da amplificação por PCR do gene de actina de soja.

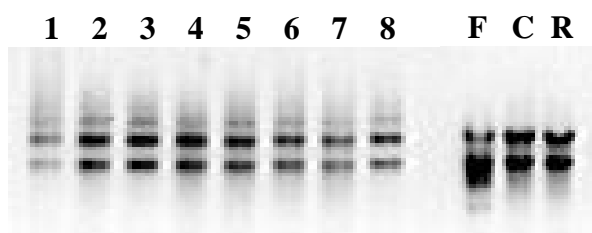


Figura 4 - RNA total tratado com *RQ1 RNase-free DNase* (Promega). Os números de 1 a 8 correspondem aos oito estádios de desenvolvimento da semente; F- folha; C- caule e R- raiz.

Uma boa amplificação do fragmento foi conseguida na faixa de temperatura de anelamento dos *primers* entre 45 – 50 °C usando cDNA do 3^o estágio de desenvolvimento da semente como apresentado na Figura 5.

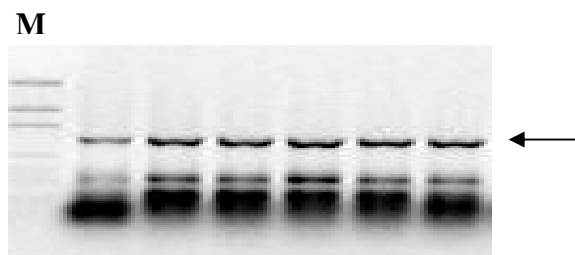


Figura 5 - Amplificação do fragmento do gene *STS* de soja usando *primers* degenerados em combinação com cDNA de sementes. A temperatura de anelamento dos *primers* variou da esquerda para a direita de 45 a 50 °C. A seta indica o tamanho do fragmento amplificado (983 pb). M - Marcador de pares de base comercial (*pGEM*[®] *DNA Markers* - Promega).

Várias reações de PCR foram realizadas para isolar o fragmento desejado para posterior clonagem e sequenciamento. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e foi observada a presença de 2 bandas (Figura 6). A amplificação de mais de uma banda foi devido ao fato de ter sido usado *primers* degenerados. A banda de tamanho esperado tinha aproximadamente 983 pb.

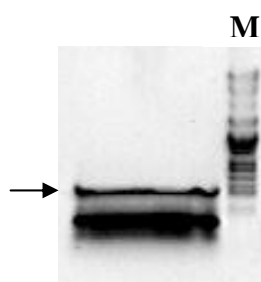


Figura 6 - Fragmento do gene *STS* de soja amplificado usando *primers* degenerados em combinação com cDNA de sementes para clonagem em vetor *pGEM-T Easy*. A seta indica o fragmento de interesse (983 pb). M - DNA do fago λ clivado com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Hind*III, utilizado como marcador de massa molecular.

Um fragmento foi clonado no vetor *pGEM-T Easy* e inserido em células de *Escherichia coli* DH5 α ultracompetentes. Cinco colônias das dez analisadas apresentaram o fragmento clonado (Figura 7A). O clone positivo correspondente ao DNA plasmidial amplificado na canaleta 4 foi denominado de clone (2/3) (Figura 7B) e seqüenciado como descrito no item 2.12.

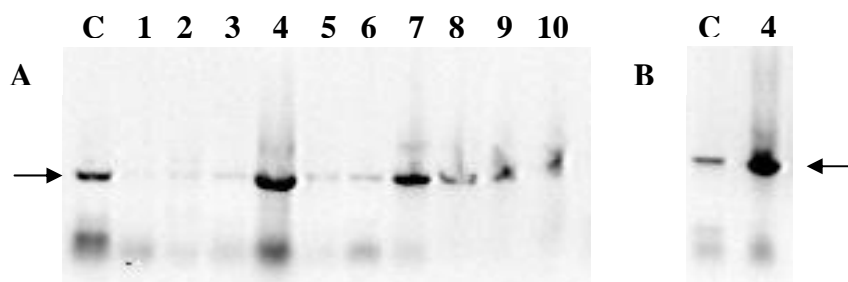


Figura 7 - Ensaio para a confirmação da clonagem do fragmento do gene *STS* de soja no vetor *pGEM-T Easy*. A) Reação de PCR realizada com DNA plasmidial de 10 colônias transformadas, B) confirmação da extração do DNA plasmidial. O número 4 representa o clone (2/3). A seta corresponde a amplificação de um fragmento de 983 pb. C refere-se ao fragmento amplificado a partir de cDNA de sementes e *primers* degenerados, utilizado como marcador de tamanho.

3.4. Sequenciamento do fragmento do gene *STS* de soja

O resultado do sequenciamento confirmou que o fragmento isolado se refere ao gene *STS* de soja, até então nunca isolado e sequenciado nesta leguminosa. O fragmento obtido possui 983 pb. A Figura 8 está apresentado o resultado do sequenciamento.

```

1  GAGGAGATGG ATGATTTGTT TGGGGGGAGG GAAAGGAGAA CAAAGAATTA TGTGGAGGGT
61 GTTGTGCAA AGCAAATGAG TGTGGTGGGA TTAAGGCTTT CATAAGGGAC TTGAGGACTG
121 AATTCAAAGG TTTGGATGAT GTCTATGTGT GGCATGCCCT TTGTGGCTCG TGGGGTGGTG
181 TGAGGCCAGG AGCCACACAC TTGAATTCCA AAATAACACC TTGCAAATC TCCCCTGGCC
241 TTGATGGGAC CATGCAAGAT CTTGCTGTGG TTAAAATAGT GGAAGGTTCC ATAGGACTTG
301 TTCATCCTGA ACAAGCTAAT GACTTGTACG ATTCCATGCA CTCTTATCTT GCCCAATCTG
361 GTGTTACCGG AGTCAAAAT TACGCTTTTC ATAGTCTTGA ATATGTGTGC GAGGAATATG
421 GAGGCAGAGT CGAGCTTGCA AAGGCTTATT ACGATGGGTT GACAAACTCT ATTGTCAAGA
481 ATTTTAATGG AAGTGGAAATC ATCGCTAGCA TGCAGCAGTG CAACGACTTT TTCTTCCTTG
541 GAACCAAGCA AATTCCCATG GGAAGATTTG GGGATGACTT TTGGTTCCAA GACCCCAATG
601 GGGACCCAAT GGGAGTGTTT TGGTTACAGG GGTGCACATG ATTCACTGTG CCTACAACAG
661 TTTGTGGATG GGGCAGATGA TTCAGCCCGA TTGGGACATG TTCCAATCGG ATCATGTGTG
721 TGGCCAAATT TCATGCGAGT TCGAGGGCTA TTTGTGGCGG TCCTGTCTAT GTAAGTGACA
781 GTGTGGGCTC TCATGACTTT GATCTCATT AGATGCTTGT GTTCCCTGAT GGTACCGTGC
841 CCAAATGCAT ACATTCTGCA CTTCCAACAA GAGATTGCCT TTTCAAGAAC CCTCTCTTTG
901 ACCAAAAAAC CGTTCTCAA AATTGGAACT TCAACAAGTA TGGAGGAGTT ATTGGTGCTT
961 TCAATTGCCA GGGCGCCGC TGG

```

Figura 8 - Resultado do sequenciamento do fragmento do gene *STS* de soja. As regiões em negrito e sublinhadas se referem as sequências dos *primers* degenerados. As regiões marcadas em cinza se referem as sequências dos *primers* internos específicos.

O fragmento isolado e sequenciado foi traduzido para obter a sequência deduzida de aminoácidos. A sequência de aminoácidos deduzida foi comparada com outras sequências da enzima *STS* de outras espécies depositadas em banco de dados público (*GenBank*) (Figura 9). A sequência de aminoácidos da enzima rafinose sintase de soja também foi utilizada para comparação (Figura 10) pois esta enzima participa junto com a enzima *STS* na mesma via de biossíntese dos GO e está envolvida na reação de transferência de resíduos de galactose do galactinol para a sacarose.

fGmSTS -----
VaSTS1 MAPPNDPVN-----ATLGLPESEKVFSDLSDGKLTVKGVVLLSHVPENVTFFSSFS
PsSTS1 MAPPLN--S-----TTSNLIKTESIFDLSEKFKVKGFPLFHDVPEVNSFRSFS
AmSTS MAPPYDPIPIPIPMSAILNFLSSTVKDNSFELLDGTLVKNVPIILTDIPSNVFSFS
SsSTS MAPPND-----PISSIFSPILSVKKNDAFELVGGKLSVKNVPLLSEIPSNVTFKFS

fGmSTS -----
VaSTS1 CVPR--DAPSSILQRVTAASHKGGFLGFSHVSPSDRLINSLGFRGRNFLSIFRKTWWS
PsSTS1 CKPSESNAAPPSSLQKVLAYSHKGGFFGFSHETPSDRMLNNSIGSFNGKDFLSIFRKTWWS
AmSTS VQSS--EAPVPLFQRAQSLSSSGGFLGFSQNEPSSRLMNSLGKFTDRDFVSI
SsSTS CQSS--GAPAPLYNRAQSLSNCGGFLGFSQKESADSVTNSLGKFTNREFVSI

fGmSTS -----
VaSTS1 TQWVGNSGSDLQMETQWILIEVPETESYVVIPIPIIEKSFRSALHPGSDDHVKICAESGST
PsSTS1 TQWIGKSGSDLQMETQWILIEVPETKSYVVIPIPIIEKCFRSALFPGFNDHVKIIAESGST
AmSTS TQWVGTTGSDIQMETQWIMLDVPEIKSYAVVPIIVEGKFRSALFPKGDGHILIGAESGST
SsSTS TQWVGTSGSDIQMETQWIMLNLPEIKSYAVVPIIVEGKFRSALFPKGDGHVLIISAESGST

fGmSTS -----
VaSTS1 QVRASSFGAIAYVHVAETPYNLMREAYSALRVHLDSFRLLLEKTVPRIVDKFGWCTWDAF
PsSTS1 KVKESTFNSIAYVHFSENPYDLMKEAYS AIRVHLNSFRLLLEKTI
AmSTS KVKTSNFDIAIAYVHSENPYTLMRDAYTAVRVHLNTFKLIEEKSAPPLVNKFGWWTWDAF
SsSTS CVKTTSFTSIAYVHVSNDNPYTLMKDGYTAVRVHLDTFKLIEEKSAPPLVNKFGWCTWDAF

fGmSTS -----
VaSTS1 YLTVNPGVGHGLKDFSEGGVAPRFVVIDDGWQSVNFDEDPNEDAKNLVLGGEQMTARL
PsSTS1 YLTVNPIGIFHGLDDFSGKGGVEPRFVIIDDGWQSI
AmSTS YLTVEPAGIYHGVQEFADGGLTPRFLIIDDGWQSI
SsSTS YLTVEPAGIYHGVQEFADGGLTPRFLIIDDGWQSI

fGmSTS -----GDGFVWEG-----
VaSTS1 HRFEEDKFRKYQKGLLGPNAPSFNPETIKELISKGIEAEHLG-KQAAAI
PsSTS1 HRFDECYKFRKYESGLLGPNSPPYDPNNFTDLILKGI
AmSTS HRLDECEKFRKYKGGSMGPNRPPFDPKPKLLISKAIEIEVAEKARDKAAQSGVTDLAR
SsSTS HRFDECEKFRKYKGGSMGPKVPYFDPKPKLLISKAIEIEGVEKARDKAIQSGITDLSQ

fGmSTS -----KENKELCGG-----CC---CKANECCGIIKAFIRDLRTEFKGLDDVY
VaSTS1 IELMIVKVREEIDDLFGGKGESNESGGCC---CKAAECCGMKDFTTDLRTEFKGLDDVY
PsSTS1 IESKIKKVKEIDDLFGG---EQFSSGEKS---EMKSEYG-LKAFTKDLRTKFKGLDDVY
AmSTS YEAEIEKLTKELDQMFGGG---EETSSGKSCSSCSCKSDNFGMKAFTKDLRTNFKGLDDIY
SsSTS YEIKLKLKLEDEMFGGGNDEKGSCKGSDCSCKSQNSGMKAFTNDLRTNFKGLDDIY

fGmSTS VWHALCGSWGVRPGATHLNSKITPCKLSPGLDGTMDLAVVKIVEGSI
VaSTS1 VWHALCGGWGGVRPGTHLDSKIIPCKLSPGLVGTMDLAVDKIVEGSI
PsSTS1 VWHALCGAWGGVRPETHLDTKIVPCKLSPGLDGTMEDLAVVEISKASLGLVHPSQANEL
AmSTS VWHALAGAWGGVRPGATHLNAKIVPTNLSPLDGTMTDLAVVKIIEGSTGLVDPDQAEF
SsSTS VWHALAGAWGGVPGATHLNAKIEPCKLSPGLDGTMTDLAVVKILEGSI

fGmSTS YDSMHSYLAQSGVTGVKIDVHFSLEYVCEEYGGRVELAKAYYDGLTNSI
VaSTS1 YDSMHSYLAQTGVTGVKIDVIHFSLEYVCEEYGGRVEIAKAYYDGLTNSI
PsSTS1 YDSMHSYLAESGITGVKVDVIHFSLEYVCEYGGRVDLAKVYVEGLTKSI
AmSTS YDSMHSYLSVGITGVKVDVIHTLEYISEDYGGRVELAKAYYKGLSKSLAKNFNGTGLIS
SsSTS YDSMHSYLSKVGITGVKVDVIHTLEYVSENYGGRVELGKAYYKGLSKSLKKNFNGSGLIS

fGmSTS SMQQCNDFFLGTKQIPMGRFGDDFWFQDPNGDPMGVFWLQCGCTFTVPTTVCGWG--RFS
VaSTS1 SMQQCNDFFLGTKQIPFGRVGGDDFWFQDPNGDPMGVFWLQGVHMIHCSYNSLWMGQIIQ
PsSTS1 SMQHCNDFFLGTKQISMGRVGGDDFWFQDPNGDPMGSFWLQGVHMIHCSYNSLWMGQMIQ
AmSTS SMQQCNDFFLGTEQISMGRVGGDDFWFQDPNGDPMGVYWLQGVHMIHCAYNSMWMGQIIQ
SsSTS SMQQCNDFFLGTEQISMGRVGGDDFWFQDPNGDPMGVFWLQGVHMIHCAYNSMWMGQIIH

fGmSTS PIGTCSNRIMCVAKFHASSRAICGGPVYVSDSVGSHDFDLIKMLVFPDGTVPKCIH
VaSTS1 PDWDMFQSDHECAKFHAGSRAICGGPVYVSDSVGSHDFDLIKMLVFPDGTVPKCIYFPLP
PsSTS1 PDWDMFQSDHVCACFHAGSRAICGGPIYVSDNVGSHDFDLIKMLVFPDGTVPKCIYFPLP

AmSTS	PDWDMFQSDHPPGGYFHAGSRAICGGPVYVSDSLGGHNFDDLKLVFNDGTIPKCIHFALP
SsSTS	PDWDMFQSDHCSAKFHAGSRAICGGPVYVSDSLGGHNFDDLKLVFNDGTIPKCIHFALP
fGmSTS	TRDCLFKNPLFDQKTVLKIWNFNKYGGVIGAFNCQGAGW-----
VaSTS1	TRDCLFRNPLFDQKTVLKIWNFNKYGGVIGAFNCQGAGWDPKGKKFKGFPECYKAISCTV
PsSTS1	TRDCLFKNPLFDHTTVLKIWNFNKYGGVIGAFNCQGAGWDPIMQKFRGFPECYKPIPGTV
AmSTS	TRDCLFKNPLFDSKTIILKIWNFNKYGGVIGAFNCQGAGWDPKEQRIKGYSQCYKPLSGSV
SsSTS	TRDCLFKNPLFDSKTIILKIWNFNKYGGVVIGAFNCQGAGWDPKEQRIKGYSECYKPLSGSV
fGmSTS	-----
VaSTS1	HVTEVEWDQKKEAEHMGKAEYVYVYLNQAEVLHLMTPVSEPLQLTIQPSTFELYNFVVPVE
PsSTS1	HVTEVEWDQKEETSHLGKAEYVYVYLNQAEELSLMTLKSEPIQFTIQPSTFELYSFVPT
AmSTS	HVSGIEFDQKKEASEMGEAEYAVYVYLNQAEELSLATRSDPIKITIQSSTFEIFSFPVPIK
SsSTS	HVSDIEWDQKVEATKMGAEAEYAVYVYLNQAEELSLATRSDPIKITIQSSTFEIFSFPVPIK
fGmSTS	-----
VaSTS1	KLGSNNIKFAPIGLTNMFNSGGTIQLELEYIEKDVKVKVKGGRFLAYSTQSPKKFQLNGS
PsSTS1	KLCGG-IKFAPIGLTNMFNSGGTVIDLEYVGNKAKIKVKGGSFLAYSSPCKKFLNGC
AmSTS	KLGEK-VKFAPIGLTNLFNAGGTIQGLVYNEGIKIEVKGDGKFLAYSSVVPKAYVNGA
SsSTS	KLGGQ-VKFAPIGLTNLFNNSGGTIQGVVYDEGVAKIEVKGDGKFLAYSSVVPKRSYLNGE
fGmSTS	-----
VaSTS1	DAAFQWLPDGKLTNLNLAWIEENDGVSDLAIFF
PsSTS1	EVDFEWLGDKLVCNVPWIEEACGVSDMEIFF
AmSTS	EKVFAWSGNGKLELDITWYEECGGISNVTFFVY
SsSTS	EVEYKWSGNGKVEVDVPWYEECGGISNITFFV

Figura 9 - Comparação da sequência de aminoácidos do fragmento da enzima STS de soja (fGmSTS) com outras seqüências da estaquiase sintase depositadas no *GenBank*. VaSTS1, estaquiase sintase de *Vigna angularis* (acesso no. Y19024); PsSTS1, estaquiase sintase de *Pisum sativum* (acesso no. AJ311087); AmSTS, estaquiase sintase de *Alonsoa meridonalis* (acesso no. AJ487030); SsSTS, estaquiase sintase de *Stachys sieboldii* (acesso no. AJ344091) e GmRFS, rafinose sintase de *Glycine max* (acesso no. E24424). As regiões marcadas em cinza se referem a resíduos de aminoácidos totalmente conservados, e, em azul se referem a resíduos de aminoácidos do mesmo grupo. O alinhamento foi feito com o programa *CLUSTAL W*.

```

fGmSTS -----
GmRFS  MAPSISKTVELNSFGLVNGNLPLSITLEGSNFLANGHPFLTEVPENIIVTPSPIDAKSSK

fGmSTS -----
GmRFS  NNEDDDVVGCFVGFHADEPRSRHVASLGKLRGKIFMSIFRFKVVWTTTHWVGSNGHELEHE

fGmSTS -----GDGF-----
GmRFS  TQMMLLDKNDQLGRPFVLILPILQASFRASLQPLDDYVDVCMESGSTRVCGSSFGSCLY

fGmSTS -----VWG-
GmRFS  VHVGHDPYQLLREATKVVRMHLGTFKLLLEKTAPVIIDKFGWCTWDAFYLVKVPSPGVWEG

fGmSTS -----EG-----KENKELCG
GmRFS  VKGLVEGGCPPGMVLIDDGWQAICHDEDPITDQEGMKRTSAGEQMPCLVKLEENYKFRQ

fGmSTS GCCCKANECGGIKAFIRDLRTEFKGLDDVYVWHALCGSWGGVVRPGAT-HLNSKIITPKLS
GmRFS  YCSGKDSEKG-MGAFVRDLKEQFRSVEQVYVWHALCGYWGGVVRPKVPGMPQAKVVTPKLS

fGmSTS PGLDGTMQDLAVVKIVEGSI GLVHPEQANDLYDSMHSYLAQSGVTGVKIDVFSLEYVCE
GmRFS  NGLKLTMKDLAVDKIVSNGVGLVPPHLAHLLEYGLHSRLESAGIDGVKVDVIHLLLEMLSE

fGmSTS EYGGRVELAKAYYDGLTNSIVKNFNGSGIIASMQQCNDFFFLGTQIIPMGRFGDDFWFQD
GmRFS  EYGGRVELAKAYYKALTASVKKHFKGNVVIASMEHCNDFFLLGTEAIALGRVGDDFWCTD

fGmSTS PNGDPMGVFWLQGCTFTVPTTVCGWGR--FSPIGTCSNRIMCVAKFHASSRAICGGPVVYV
GmRFS  PSGDPNGTYWLQGCHMVHCAYNLSLWMGNFIQPDWDMFQSTHPCAETFHAPLGP SLVDQFTL

fGmSTS SDSVGSDFDLIKMLVFPDGTVPKCIHSALPTRDCLFKNPLFDQKTVLKIWNFNKYGGVI
GmRFS  VIVLESTTSSCSRASLCLMGRFCVVNTMHSPPHETVCLKTPCMMGRQCSKFGISTNIQVVF

fGmSTS GAFNCQGAGW--
GmRFS  VYLIAKEVGGVP

```

Figura 10 - Comparação da sequência deduzida de aminoácidos do fragmento da enzima STS de soja (fGmSTS) com a seqüência da GmRFS, rafinose sintase de *Glycine max* (acesso no. E24424). As regiões marcadas em cinza se referem a resíduos de aminoácidos totalmente conservados, e, em azul se referem a resíduos de aminoácidos do mesmo grupo. O alinhamento foi feito com o programa *CLUSTAL W*.

A comparação da seqüência de aminoácidos do fragmento isolado da enzima STS de soja revelou alta identidade com as enzimas STS de *Vigna angularis* (79 %), *Pisum sativum* (75 %), *Alonsoa meridionalis* (73 %) e *Stachys sieboldii* (73 %) (Figura 9), no entanto apresentou pouca homologia (36 %) com a enzima rafinose sintase de *Glycine max* (Figura 10).

Devido à baixa homologia entre as seqüências de aminoácidos (36 %) entre as enzimas STS e rafinose sintase de soja, é esperado que, apesar de

terem funções semelhantes, e, participarem da mesma via de biossíntese de açúcares, elas são enzimas codificadas por genes diferentes.

A informação fornecida neste trabalho é de grande importância, pois se as enzimas STS e rafinose sintase são moléculas diferentes, técnicas de engenharia genética poderão ser utilizadas para o manuseio das atividades de ambas as enzimas. Neste sentido, trabalhos futuros poderão ser realizados para manipular o gene *STS* de soja com o objetivo de reduzir o conteúdo de estaquiose em sementes sem afetar a atividade da rafinose sintase.

3.5. Análise do padrão de expressão do gene *STS*

Uma vez isolado e seqüenciado um fragmento do gene *STS* de soja a partir de *primers* degenerados, *primers* específicos foram desenhados como descrito no item 2.13. Ensaio de RT-PCR foram realizados para a análise da expressão do gene *STS* em sementes de soja correspondentes a todo o período de enchimento do grão e em tecidos como folhas, caule e raiz (Figura 11). O tamanho do cDNA amplificado correspondeu ao tamanho esperado para o produto amplificado pelos *primers* específicos (284 pb).

Embora a utilização da técnica de RT-PCR como método para análise quantitativa da expressão gênica seja discutível (BUSTIN, 2000), este método foi escolhido devido à facilidade da sua execução. Como controle interno foi utilizado o gene de actina de soja que apresenta expressão constitutiva.

A análise por RT-PCR mostrou que o gene *STS* é expresso em todos os estádios de desenvolvimento da semente com um padrão de expressão decrescente dos estádios iniciais até o 6^o estágio. Houve um aumento de expressão dos transcritos do gene *STS* no 7^o estágio e uma pequena diminuição no nível dos transcritos em sementes maduras.

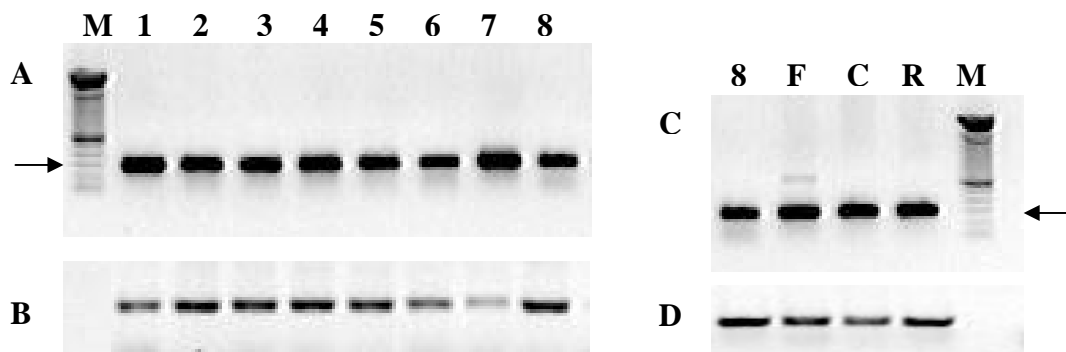


Figura 11 - Ensaio de RT-PCR para o gene da enzima estaquiose sintase em soja. A) Amostras de cDNA amplificadas para o gene *STS* durante o desenvolvimento das sementes de soja, e C) em tecido específico. B; D) o controle interno com actina. Os números de 1 a 8 correspondem aos oito estádios de desenvolvimento da semente; F- folha; C- caule e R- raiz. A seta indica o tamanho do fragmento amplificado (284 pb). (M) Marcador de massa molecular comercial (100 bp DNA Ladder-Promega).

Os resultados demonstram que o gene *STS* é transcrito durante todo o desenvolvimento das sementes de soja, porém a enzima STS está ativa somente nas sementes maduras. Esta afirmação tem como base a determinação da atividade enzimática (Figura 3) e a quantificação de estaquiose (Figura 1), que foram encontradas somente na soja madura.

O aumento nos transcritos do gene *STS* no 7^o estágio provavelmente está relacionado com a síntese de estaquiose que ocorreu nas sementes durante a maturação. Provavelmente houve uma preparação para entrar no estágio de maturação, momento em que a necessidade de transcritos para a biossíntese da enzima STS foi maior. Conseqüentemente, houve a síntese de estaquiose, aumentando o conteúdo dos GO, que são carboidratos envolvidos na aquisição da tolerância a dessecação e reserva para a germinação das sementes. Nenhum trabalho sobre a expressão do gene *STS* em sementes foi encontrado na literatura para comparação com nossos resultados.

A Figura 11C está apresentando a presença de transcritos do gene *STS* em órgãos como folhas, caule e raiz. Provavelmente em algum momento durante o crescimento e desenvolvimento da planta, ou durante o desenvolvimento das

sementes, a enzima STS está presente na sua forma ativa para sintetizar estaquiose nesses órgãos. Segundo CANNY (1973) a sacarose é o principal açúcar de transporte no floema. Estudos utilizando o exudato do floema de algumas espécies de plantas revelou que os açúcares derivados da sacarose (rafinose, estaquiose e verbascose) também são translocados. A presença de transcritos do gene *STS* em órgãos, principalmente em folhas, possivelmente está relacionado com a translocação de açúcares. Se estaquiose for sintetizada, provavelmente deverá ocorrer a translocação deste açúcar para um ponto da planta onde a necessidade de energia é maior, ou translocação para órgãos de reserva, como as sementes.

Estudos prévios sobre translocação foram realizados por TURGEON (1996). O galactinol, um doador de grupos galactosil para a biossíntese de rafinose e estaquiose, não é translocado de forma muito eficiente em folhas de *Cucumis blumei*. Foi sugerido pelo autor que apesar do galactinol ter características de um açúcar de transporte ideal, ou seja, é um açúcar não-redutor com a mesma massa molecular da sacarose, e está em quantidades significantes em algumas espécies de plantas, este dissacarídeo provavelmente está predominantemente presente no citosol.

AYRE et al. (2003) estudando o mecanismo de transporte de solutos no floema em folhas de *Cucumis blumei*, demonstraram que o galactinol não é acumulado no floema, enquanto que sacarose, rafinose e estaquiose são pouco acumulados no floema porque estes açúcares são transportados de forma eficiente para fora das folhas.

Para afirmar se a presença de transcritos do gene *STS* em folhas, caule e raiz implica em biossíntese de estaquiose nesses órgãos, e, se houver biossíntese e translocação deste açúcar de um órgão para o outro, como ela ocorre em soja, ou, em que taxa esta translocação acontece na planta, um estudo mais detalhado sobre o assunto é necessário.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYRE, B.G.; KELLER, F.; TURGEON, R. Symplastic continuity between companion cells and the translocation stream: Long-distance transport is controlled by retention and retrieval mechanisms in the phloem. **Plant Physiology**, v.131, p.1518-1528, 2003.

BACHMANN, M.; MATILE, P.; KELLER, F. Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga reptans* L. Cold acclimation, translocation, and sink to source transition: Discovery of chain elongation enzyme. **Plant Physiology**, v.105, p.1335-1345, 1994.

BACHMANN, M.; KELLER, F. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. **Plant Physiology**, v.109, p.991-998, 1995.

BAILLY, C.; AUDIGIER, C.; LADONNE, F.; WAGNER, M.H.; COSTE, F.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.701-708, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAUN, R.; KELLER, F. Vacuolar chain elongation of raffinose oligosaccharides in *Ajuga reptans*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.27, p.743-746, 2000.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, p.169-193, 2000.

CANNY, M.J. **Phloem translocation**. Cambridge. University Press. p.30-31, 1973.

DJEMEL, N.; GUEDON, D.; LECHEVALIER, A.; SALON, C.; MIQUEL, M.; PROSPERI, J.M.; ROCHAT, C.; BOUTIN, J.P. Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.557-566, 2005.

GUIMARÃES, V.M.; DE REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; FELIX, C.R. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v.58, p.67-73, 2001.

HITZ, W.D.; CARLSON, T.J.; KERR, P.S.; SEBASTIAN, S.A. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. **Plant Physiology**, v.128, p.650-660, 2002.

HOCH, G.; PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Purification and characterization of stachyose synthase from Lentil (*Lens culinaris*) seeds: galactopinitol and stachyose synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.366, p.75-81, 1999.

HORBOWICZ, M.; OBENDORF, R.L. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey. **Seed Science and Research**, v.4, p. 385-405, 1994.

INAN HAAB, C.; KELLER F. Purification and characterization of the raffinose oligosaccharide chain elongation enzyme, galactan:galactan galactosyltransferase (GGT), from *Ajuga reptans* leaves. **Physiologia Plantarum**, v.114, p.361-371, 2002.

JONES, D.A.; DUPONT, M.S.; AMBROSE, M.J.; FRIAS, J.; HEDLEY, L.C. The discovery of compositional variation for the raffinose family of oligosaccharides in pea seeds. **Seed Science Research**, v.9, p.305-310, 1999.

KARNER, U.; PETERBAUER, T.; RABOY, V.; JONES, D.A.; HEDLEY, C.L.; RICHTER, A. *myo*-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1981-1987, 2004.

LAHUTA, L.B.; GORECKI, R.J.; MICHALCZYK, D.; PIOTROWICZ-CIESLAK, A.I. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v.3, p.1-10, 2000.

LANNA, A. C. **Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p.84. (Tese D.S), 2002.

McLLVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Biochemistry**, v.49, p.183-186, 1921.

MEIS, S.J.; FEHR, W.R.; SCHNEBLY, S.R. Seed source effect on field emergence of soybean lines with reduced phytate and raffinose saccharides. **Crop Science**, v.43, p.1336-1339, 2003.

NEUS, J.D.; FEHR, W.F.; SCHNEBLY, S.R. Agronomic and seed characteristics of soybean with reduced raffinose and stachyose. **Crop Science**, v.45, p.589-592, 2005.

OBENDORF, R.L. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. **Seed Science Research**, v.7, p.63-74, 1997.

OBENDORF, R.L., HORBOWICZ, M., DICKERMAN, A.M., BRENAC, P. AND SMITH, M. Soluble oligosaccharides and galactosyl cyclitols in maturing soybean seeds in Planta and in vitro. **Crop Science**, v.38, p.78-84, 1998.

OOMS, J.J.J.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.M.; BARTELS, D.; KOORNNEEF, M.; KARSSSEN, C.M. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*: a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants. **Plant Physiology**, v.102, p.1185-1191, 1993.

PETERBAUER, T.; KARNER, U.; MUCHA, J.; MACH, L.; JONES, D.A.; HEDLEY, C.L.; RICHTER, A. Enzymatic control of the accumulation of verbascose in pea seeds. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p.1385-1391, 2003.

PETERBAUER, T.; MUCHA, J.; MACH, L.; RICHTER, A. (2002). Chain elongation of raffinose in pea seeds: Isolation, characterization, and molecular cloning of a multifunctional enzyme catalyzing the synthesis of stachyose and verbascose. **The Journal of Biological Chemistry**, v.227, p.194-200, 2002.

PETERBAUER, T.; MUCHA, J.; MAYER, U.; POPP, M.; GLÖSSL, J.; RICHTER, A. Stachyose synthesis in seeds of adzuki bean (*Vigna angularis*): molecular cloning and functional expression of stachyose synthase. **The Plant Journal**, v.20, p.509-518, 1999.

PETERBAUER, T.; RICHTER, A. Galactosylononitol and stachyose synthesis in seeds of adzuki bean. Purification and characterization of stachyose synthase. **Plant Physiology**, v.117, p.165-172, 1998.

SAMBROOK, T.; FRITSSCH, E. F. & MANIATIS, T. Extraction, purification and analysis of mRNA from eukaryotic cells. In: *Molecular cloning, a Laboratory Manual*, 2nd ed. **USA: Cold Spring Harbor Laboratory**, p.187-210, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA Sequence with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SPRENGER, N.; KELLER, F. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the roles of two distinct galactinol synthases. **The plant Journal**, v.21, p.249-258, 2000.

TURGEON, R. Phloem loading and plasmodesmata. **Trends in Plant Science**, v.1, p.418-423, 1996.

VIANA, S.F; GUIMARÃES, V.M.; JOSÉ, I.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; COSTA, N.M.B.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A.; DE REZENDE, S.T. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 93, p.665-670, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Foi isolada e purificada uma enzima α -galactosidase de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*.
- ✓ A enzima α -galactosidase apresentou boa estabilidade ao pH, mas não possui estabilidade térmica em temperaturas elevadas.
- ✓ A α -galactosidase não hidrolisou totalmente os açúcares rafinose e estaquiose na farinha desengordurada de soja. Uma melhor hidrólise poderá ser conseguida com o uso de uma maior quantidade de enzima. Desta forma, a enzima α -galactosidase poderá ser utilizada futuramente em processos industriais.
- ✓ A α -galactosidase hidrolisou goma guar e goma de alfarroba. Isto sugere sua aplicação industrial para melhorar a propriedade gélica de galactomananas.
- ✓ Em soja, estaquiose é acumulada durante a maturação das sementes. A atividade da enzima estaquiose sintase (STS) de soja está presente apenas em sementes maduras.

- ✓ Foi isolado, clonado e seqüenciado um fragmento do gene *STS* de soja. A análise da seqüência pelo *BLAST* revelou que o fragmento clonado se refere ao gene *STS*, até então nunca isolado e seqüenciado em soja.

- ✓ A seqüência de aminoácidos deduzida do fragmento isolado apresentou alta homologia com outras seqüências da enzima *STS* depositadas no *GenBank*, mas apresentou pouca homologia com a seqüência da enzima rafinose sintase. Isto indica que estas enzimas são codificadas por genes diferentes apesar de participarem da mesma via metabólica, e, catalisarem reações de transferência de grupos galatosil presentes no galactinol.

- ✓ O gene *STS* é expresso em todos os estádios de desenvolvimento da semente de soja, além de folhas, caule e raiz. Isto indica que a expressão do gene *STS* não é órgão específico.

- ✓ O isolamento de um fragmento do gene *STS* de soja acrescenta tanto conhecimentos científicos, como permite que técnicas de engenharia genética possam ser desenvolvidas para o silenciamento desse gene em soja.