

CARINA MARIN CALLEGARI

HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS DE  
RAFINOSE, PRESENTES EM PRODUTOS DE SOJA,  
POR  $\alpha$ -GALACTOSIDASES

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003

CARINA MARIN CALLEGARI

HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS DE  
RAFINOSE, PRESENTES EM PRODUTOS DE SOJA,  
POR  $\alpha$ -GALACTOSIDASES

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

APROVADA EM: 31 de julho de 2003.

---

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros

---

Prof<sup>a</sup>. Elza Fernandes de Araújo

---

Prof. Rogélio Lopes Brandão

---

Prof<sup>a</sup>. Valéria Monteze Guimarães  
(Conselheira)

---

Prof. Sebastião Tavares de Rezende  
(Orientador)

“A sabedoria é resplandecente, não murcha, mostra-se facilmente para aqueles que a amam. Ela se deixa encontrar por aqueles que a buscam.”

*SABEDORIA 6, 12.*

A Deus

Aos meus pais, Joeusa e Jadir,

Aos meus irmãos Patrícia e Bruno,

Ao meu noivo e amigo José Neto.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por proporcionar grandes maravilhas em minha vida, me guiar, abençoar e olhar sempre por mim e pelas pessoas que estão a minha volta. Obrigada Senhor!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido pela realização deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Sebastião Tavares de Rezende, pelo apoio, amizade, dedicação, paciência, presteza, conforto, pela confiança em mim depositada e pela orientação do meu trabalho.

Às professoras Valéria Monteze Guimarães, Maria Goreti de Almeida Oliveira e Neuza Maria Brunoro Costa, pelo apoio e orientação no decorrer do meu trabalho.

Ao professor Maurílio Alves Moreira, pelo apoio, atenção e solidariedade a mim dispensados.

Ao secretário Eduardo Pereira Monteiro, pela dedicação, atenção, boa vontade e por estar sempre sorrindo em todos os momentos nos quais precisei de sua ajuda.

Ao Aloísio Nunes Cordeiro, por estar sempre disponível na concessão dos materiais utilizados nos experimentos.

A todos os funcionários do BIOAGRO, e professores da Pós-graduação em Bioquímica Agrícola pela colaboração.

Ao Laboratório de Enzimologia do BIOAGRO, onde grande parte do meu trabalho foi realizado, obrigada pelo carinho com que fui recebida.

Ao Laboratório de Análises Bioquímicas do BIOAGRO, pela contribuição em algumas análises da minha tese.

Aos meus colegas dos Laboratórios de Enzimologia e Análises Bioquímicas, Gal, Luciana Xavier, Agenor, Luciana Resende, Marcelo, Isabela, Joana, Jander, Luciane, Lílian, Vilmar, Carlos.

Aos meus amigos Daniel, Lílian, Angélica, Simone e Mariana que muito contibuíram para a realização deste trabalho, obrigada pela amizade e pelo carinho dispensados a mim.

Aos meus grandes amigos Christiano, Isaura e Inês, pelas conversas e apoio nos momentos mais difíceis. Vocês são jóias preciosas.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, dedicação e apoio em todos os dias da minha vida. Eu amo vocês.

Aos meus irmãos Patrícia e Bruno, pela amizade e companheirismo.

Aos meus sogros Graça e Eduardo, pelo carinho com que sempre me trataram e por me confiarem um tesouro tão estimado.

Ao meu noivo, meu amor, meu amigo e cúmplice Netinho, por a cada dia das nossas vidas me apoiar, me tranquilizar, melhorar meu astral, me ensinar muitas coisas e por me amar.

## BIOGRAFIA

**Carina Marin Callegari**, filha de Jadir José Callegari e Joeusa Tereza Marin Callegari, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, em 14 de outubro de 1977.

Realizou seus estudos básicos em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo.

Em março de 1995, iniciou o curso de graduação em Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em dezembro de 1999.

Ingressou no Programa de Mestrado em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em agosto de 2001, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, em julho de 2003, com defesa de tese.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Absorbância
AE	Atividade Enzimática
BSA	Albumina sérica bovina
CM-Sepharose	Carboxi metil-Sepharose
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$\rho$ NPGal	$\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo
$\rho$ NPGlc	$\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo
$o$ NP $\beta$ Gal	$o$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
$\rho$ NP $\beta$ Gal	$\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
$\rho$ NP $\alpha$ M	$\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo
$\rho$ NP $\alpha$ A	$\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-arabinopiranosídeo
$\rho$ NP $\alpha$ X	$\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-xilopiranosídeo
PEG	Polietilenoglicol
p/p	Peso/peso
RO	Oligossacarídeos de rafinose
SDFA	Sistema de duas fases aquosas
SDS	Dodecil sulfato de sódio
U	Unidade de atividade enzimática
v/v	Volume/volume
$V_o$	Velocidade inicial

$V_{\max}$	Velocidade máxima
ppm	Partes por milhão
kD	Quilodaltons
DNS	Dinitrossalicilato
PER	Índice de eficiência protéica

## ÍNDICE

RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Objetivo geral .....	3
1.2. Objetivos específicos .....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Qualidade nutricional da proteína da soja .....	4
2.2. Biossíntese e papel fisiológico dos RO .....	6
2.3. $\alpha$ -Galactosidases .....	9
2.3.1. <i>a-Galactosidase de semente de soja</i> .....	11
2.3.2- <i>a-Galactosidase humana</i> .....	12
2.4. Mecanismo de ação das $\alpha$ -galactosidases .....	13
2.5. Utilização da soja na alimentação .....	18
2.6. Flatulência .....	21
2.7. Hidrólise enzimática de RO em extratos hidrossolúveis de soja .....	23
2.8. Utilização de enzimas em processos industriais .....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1. Reagentes utilizados .....	28
3.2. Material genético e enzimas utilizadas .....	29

3.3. Germinação das sementes .....	30
3.4. Preparação do extrato enzimático .....	30
3.5. Determinação da matéria seca em sementes de soja germinadas .....	30
3.6. Determinação da atividade de $\alpha$ -galactosidase .....	31
3.6.1. <i>Com o substrato sintético r-nitrofenil-<math>\alpha</math>-D-</i> <i>galactopiranosídeo(rNPGal)</i> .....	31
3.6.2. <i>Com açúcares não redutores como substratos</i> .....	31
3.6.3. <i>Com açúcares redutores como substratos</i> .....	32
3.6.4. <i>Com outros substratos sintéticos</i> .....	32
3.7. Avaliação quantitativa da hidrólise de RO no extrato desengordurado de soja e nos produtos melaço leve e pesado .....	33
3.8. Hidrólise de RO no extrato de soja desengordurado .....	33
3.9. Extração dos açúcares solúveis do extrato de soja desengordurado .....	34
3.10. Hidrólise de RO no melaço e extração dos açúcares solúveis .....	34
3.11. Determinação dos açúcares solúveis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	35
3.12. Purificação das $\alpha$ -galactosidasas .....	37
3.12.1. <i>Preparo da amostra enzimática</i> .....	38
3.12.2. <i>Crioprecipitação e precipitação ácida</i> .....	38
3.12.3. <i>Fracionamento do sobrenadante com sulfato de</i> <i>amônio</i> .....	38
3.12.4. <i>Cromatografia de filtração em gel</i> .....	39
3.12.5. <i>Cromatografia de troca iônica</i> .....	39
3.13. Caracterização da $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes de soja germinadas da variedade Monarca .....	39
3.13.1. <i>Efeito do pH</i> .....	39
3.13.2. <i>Efeito da temperatura</i> .....	40
3.13.3. <i>Ensaio de termoestabilidade</i> .....	40
3.13.4. <i>Meia-vida da <math>\alpha</math>-galactosidase</i> .....	40

3.13.5. <i>Determinação dos parâmetros cinéticos constante de Michaelis-Menten (<math>K_{M\ ap}</math>) e velocidade máxima (<math>V_{max\ ap}</math>) aparentes</i> .....	41
3.13.6. <i>Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da <math>\alpha</math>-galactosidase</i> .....	41
3.14. Determinação da concentração de proteína .....	42
3.15. Dosagem do açúcar redutor .....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4.1. Atividade de $\alpha$ -galactosidase de soja durante a germinação ...	44
4.2. Purificação da $\alpha$ -galactosidase de sementes de soja var. Monarca germinadas .....	45
4.3. Caracterização da $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja var. Monarca .....	49
4.3.1. <i>Efeito do pH</i> .....	49
4.3.2. <i>Temperatura ótima</i> .....	51
4.3.3. <i>Termoestabilidade</i> .....	52
4.3.4. <i>Meia-vida da <math>\alpha</math>-galactosidase</i> .....	53
4.3.5. <i>Constante de Michaelis-Menten (<math>K_{M\ ap}</math>) e velocidade máxima (<math>V_{max\ ap}</math>)</i> .....	56
4.3.6. <i>Determinação da atividade da <math>\alpha</math>-galactosidase semi-purificada utilizando outros substratos</i> .....	61
4.3.7. <i>Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da <math>\alpha</math>-galactosidase</i> .....	63
4.4. Análise quantitativa da hidrólise dos oligossacarídeos no extrato desengordurado de soja e no melaço de soja .....	65
4.5. Hidrólise dos oligossacarídeos do extrato desengordurado de soja e dos produtos melaço leve e pesado utilizando $\alpha$ -galactosidases de várias fontes .....	68
5. CONCLUSÕES .....	77
6. PERSPECTIVAS .....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79

## RESUMO

CALLEGARI, Carina Marin, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003. **Hidrólise de oligossacarídeos de rafinose, presentes em produtos de soja, por  $\alpha$ -galactosidases.** Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Conselheiras: Neuza Maria Brunoro Costa e Valéria Monteze Guimarães.

A ingestão de grãos de leguminosas, como a soja e derivados, resulta no aparecimento de sintomas desagradáveis, destacando-se a flatulência. Flatulência é resultante do metabolismo anaeróbico de  $\alpha$ -1,6-galactosídeos de rafinose (RO: oligossacarídeos de rafinose) presentes nos grãos das leguminosas em geral. A remoção desses açúcares poderia aumentar o consumo de alimentos derivados de soja. A hidrólise enzimática dos RO, catalisada por  $\alpha$ -galactosidases, parece ser o tratamento mais promissor para a redução do conteúdo de RO em produtos derivados de soja. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de  $\alpha$ -galactosidases de várias fontes para hidrolisar os RO presentes no extrato desengordurado de soja e nos produtos melaço leve e pesado. Foram testadas  $\alpha$ -galactosidase de sementes germinadas de soja e de *Tachigali multijuga*,  $\alpha$ -galactosidases de *Aspergillus terreus* e de *Penicillium griseoroseum*. O processo de purificação do extrato enzimático, obtido de sementes de soja var. Monarca, embebidas por 60 h, consistiu das etapas de crioprecipitação, precipitação ácida, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias de filtração em gel e de troca iônica,

resultando numa preparação contendo atividade de  $\alpha$ -galactosidase. A enzima foi purificada 19,74 vezes, com rendimento de 36,64%. Atividade máxima de  $\alpha$ -galactosidase foi detectada em pH 5,0 a 50 °C. Cerca de 90% da atividade enzimática original foi mantida, após pré-incubação por 4 h a 40 °C. Os valores de  $K_{M\ ap}$  para pNPGal, melibiose e rafinose foram de 0,47 mM, 1,46 mM e 3,43 mM, respectivamente. A enzima hidrolisou com maior intensidade o pNPGal, seguido por rafinose, estaquiase e melibiose. Galactose, SDS,  $CuSO_4$ , rafinose, estaquiase e melibiose atuaram como inibidores da atividade de  $\alpha$ -galactosidase. Os resultados dos tratamentos do extrato desengordurado de soja com a preparação enzimática contendo atividade de  $\alpha$ -galactosidase, mostraram redução de 100% de rafinose e 53% de estaquiase, após incubação por 8 h, a 40 °C. Quando o extrato desengordurado de soja foi tratado com a  $\alpha$ -galactosidase de *Tachigali multijuga*, a S1 de *A. terreus* e a de *P. griseoroseum*, constatou-se redução no teor de rafinose de 72%, 100% e 66%, e no teor de estaquiase de 49%, 100% e 100%, respectivamente, após incubação por 8 h, a 40 °C. A redução no teor de RO nos produtos melaço leve e pesado de soja, tratados com a preparação enzimática contendo atividade de  $\alpha$ -galactosidase, foi de 100% para rafinose e 58% para estaquiase, após incubação por 8 h, a 40 °C, para ambos os produtos. Conclui-se que as  $\alpha$ -galactosidasas testadas hidrolisaram substancialmente os carboidratos não-digeríveis, rafinose e estaquiase, do extrato desengordurado de soja e dos produtos melaço leve e pesado de soja, indicando uma possível utilização destas enzimas em processos industriais, visando a diminuição dos RO e o aumento do uso da soja como fonte protéica vegetal na alimentação humana e animal.

## ABSTRACT

CALLEGARI, Carina Marin, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2003. **Hydrolysis of raffinose oligosaccharides, present in soybean products, by  $\alpha$ -galactosidases.** Advisor: Sebastião Tavares de Rezende. Committee members: Neuza Maria Brunoro Costa and Valéria Monteze Guimarães.

The intake of legume seeds, like soybean and its derived products, results in unpleasant symptoms, including flatulence. It results from the anaerobic metabolism of  $\alpha$ -1,6-galactosides of raffinose (RO: Raffinose Oligosaccharides) that is generally present in legume seeds. The removal of these sugars would have a positive impact in soybean food consumption. The enzymatic hydrolysis of RO by  $\alpha$ -galactosidase, seems to be the most promising treatment, for the reduction of RO content in derived soybean products. The objective of this work was to verify the efficiency of  $\alpha$ -galactosidases from various sources in hydrolyze RO present in soybean extract and soybean molasses. The  $\alpha$ -galactosidases tested were purified from germinating seeds of soybean and seeds of *Tachigali multijuga*, of the *Aspergillus terreus* and of *Penicillium griseoroseum* cultures. The purification process of the enzymatic extract from germinating soybean seeds at 60 h was submitted to cryoprecipitation, acid precipitation, fractionation with ammonium sulphate, gel filtration and ion exchange chromatography, resulting in a preparation with activity for  $\alpha$ -galactosidase. The purification factor was 19.74

fold with enzymatic activity recovery of 36.64%. Maximum  $\alpha$ -galactosidase activity was detected in pH 5.0 and 50 °C. The enzyme maintained near 90% of its original activity after pre-incubation for 4 h at 40 °C. The  $K_{M\ ap}$  values for hydrolysis of pNPGal, melibiose and raffinose were of 0.47 mM, 1.46 mM and 3.43 mM, respectively. The highest enzyme activity was observed with pNPGal, followed by raffinose, stachyose and melibiose. Galactose, SDS, CuSO<sub>4</sub>, raffinose, stachyose and melibiose inhibited the enzyme activity. The results of the treatment of soybean extract with the enzymatic preparation of  $\alpha$ -galactosidase, after incubation for 8 h at 40 °C, showed a reduction of 100% and 53% in the raffinose and stachyose contents, respectively. When the soybean extract was treated with  $\alpha$ -galactosidases of *T. multijuga*, S1 of *A. terreus* and *P. griseoroseum*, a reduction of 72%, 100% and 66%, and of 49%, 100% and 100%, it was verified in the raffinose and stachyose contents, respectively, after incubation for 8 h, at 40 °C. The reduction in the level of RO in the soybean molasses, treated with the enzymatic preparation with  $\alpha$ -galactosidase activity, was from 100% for raffinose and 58% for stachyose, respectively, after incubation for 8 h, at 40 °C. In conclusion, it was observed that the  $\alpha$ -galactosidases tested in this study, were able to hydrolyze substantially the non digestible carbohydrates (raffinose oligosaccharides) present in soybean extract and soybean molasses, indicating a possible use of these enzymes in the industrial process, seeking the decrease of RO and the increase of the use of the soybean as a source of vegetable protein for human and animal feeding.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja, uma leguminosa cultivada no mundo inteiro, é uma excelente fonte de proteína para a dieta humana e animal. A produção mundial total de soja em 2001 foi cerca de 184,1 milhões de toneladas (THIPPESWAMY e MULIMANI, 2002; USDA, 2003).

O grão de soja apresenta alto teor de lipídeos, 15 a 25 %, e um conteúdo de proteínas de 30 a 45 %, com uma composição em aminoácidos adequada à alimentação humana, destacando-se o alto teor em lisina e de outros aminoácidos essenciais. Apresenta ainda de 20 a 35 % de carboidratos e cerca de 5 % de cinzas (MOREIRA, 1999). Devido ao seu alto valor nutricional, a cultura de soja apresenta-se muito difundida mundialmente e seu potencial energético-protéico tem sido comercialmente explorado por indústrias alimentícias, estimulando assim, sua produção em larga escala (BELLEVER E SNIZEK, 1999).

A soja possui uma fração protéica significativa que é principalmente utilizada na fabricação de ração para a alimentação animal. A forma pela qual a soja é mais utilizada na alimentação animal é como farelo resultante da extração do óleo, o qual também é largamente empregado pelas indústrias de ração. A fração óleo é também utilizada na indústria de alimentos para a produção de margarina, óleo de cozinha, agentes emulsificantes e vários outros produtos. A soja apresenta ainda diversas utilidades na indústria

química e farmacêutica (LIMA,1999). Apesar da diversidade de utilização da soja, aproximadamente 83 % da produção mundial é utilizada para a extração de óleo, destinado principalmente ao consumo humano, e o farelo resultante é destinado à fabricação de ração animal (LIMA, 1999).

Mais recentemente, a fração protéica tem sido utilizada também para alimentação humana na forma de farinha, isolados protéicos e concentrados protéicos contendo, respectivamente, 50%, 70% e 90-97% de proteínas (MOREIRA, 1999).

A soja (*Glycina max* (L.) Merrill) pertence à família das leguminosas e possui características semelhantes às dos alimentos de alto valor nutritivo, por conter em suas proteínas, quantidade suficiente de quase todos os aminoácidos essenciais (COSTA E MIYA, 1972). De acordo com GOMES (1978), esta leguminosa possui considerável teor de minerais, principalmente de cálcio, fósforo e de vitaminas do complexo B.

Apesar de seu alto valor nutricional, uma série de fatores anti-nutricionais, tais como inibidor de tripsina, ácido fítico e oligossacarídeos da família da rafinose (RO), está presente na soja (SANNI et al., 1997; MULTIMANI et al., 1996). Devido à presença de RO, principalmente rafinose [ $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1,6)- $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranosídeo] e estaquiase [ $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1,6)- $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1,6)- $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranosídeo], a soja ainda não foi utilizada em toda a sua potencialidade. Isso ocorre devido ao fato de humanos e outros animais monogástricos não possuírem a enzima  $\alpha$ -galactosidase (E.C. 3.2.1.22,  $\alpha$ -D-galactosídeo galactohidrolase), necessária para a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,6 presentes em RO (GUIMARÃES et al., 2001). A deficiência desta enzima na mucosa intestinal, faz com que os RO passem intactos em grande parte do intestino, sendo então fermentados a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> por microrganismos anaeróbios, causando flatulência (PRICE et al., 1988). Assim, a presença de RO na soja e em outras leguminosas assume papel restritivo ao seu uso como fonte protéica. Deste modo, a conversão enzimática dos RO presentes na soja em açúcares digeríveis, pode ser uma alternativa para melhorar a sua qualidade nutricional e aumentar o seu uso na alimentação de humanos e animais (GUIMARÃES et al., 2001).

Muitos alimentos têm sido produzidos a partir da soja, tais como farinha, leite e alguns produtos fermentados, porém, o problema da flatulência ainda persiste (SANNI et al., 1997). 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). Além disso, pesquisas em países ocidentais tem relatado efeitos hipocolesterolêmicos em pacientes que consomem proteína concentrada de soja ou isolados de soja como ingredientes de alimentos (TAKATSUKA et al., 2000).

### **1.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi realizar experimentos de hidrólise enzimática utilizando  $\alpha$ -galactosidases de várias fontes, de forma a promover a redução ou a eliminação dos RO no extrato desengordurado de soja e nos produtos melaço leve e pesado de soja.

### **1.2. Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Identificar o tempo de germinação das sementes de soja, capaz de promover maior atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase.
2. Produzir e purificar parcialmente a  $\alpha$ -galactosidase de sementes de soja em germinação.
3. Caracterizar bioquimicamente e cineticamente a  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada;
4. Analisar o extrato desengordurado de soja quanto aos teores de carboidratos, proteínas e lipídios;
5. Avaliar a capacidade hidrolítica da  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de soja, bem como da mesma enzima, obtida de outras fontes, sobre os oligossacarídeos de rafinose (RO) do extrato desengordurado de soja;
6. Determinar as condições ótimas de hidrólise, como tempo, temperatura de incubação e quantidade de enzima.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Qualidade nutricional da proteína de soja

A soja contribui na alimentação humana e animal com uma proteína de boa qualidade. A composição de aminoácidos essenciais, quando comparada com o padrão da Organização de Alimentação e Agricultura (FAO), conforme Quadro 1, indica que ela apresenta teores de aminoácidos devidamente balanceados (LIU, 1997).

**Quadro 1** – Padrões de Aminoácidos de Referência, Composição em Aminoácidos da Proteína de Soja (mg/g) e Escore Químico.

Aminoácidos	Padrão FAO/WHO 1985 pré-escolares 2-5 anos (mg/g prot.)	Soja (mg/g)*	Escore Químico
Isoleucina	28	51,58	1,84
Leucina	66	81,69	1,24
Lisina	58	68,37	1,18
Metionina + Cistina	25	35,70	1,43
Fenilalanina + Tirosina	63	97,84	1,55
Treonina	34	41,94	1,23
Triptofano	11	12,73	1,16
Valina	35	54,27	1,55

\*Fonte: LIU, 1997.

Como as proteínas da maioria das leguminosas, a proteína de soja apresenta baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados, como metionina, sendo este aminoácido encontrado em menor concentração, seguido por cisteína e triptofano. Entretanto, a proteína de soja contém suficiente teor de lisina, que é deficiente na maioria das proteínas provenientes de cereais. Dessa forma, a combinação dessa proteína com as proteínas de cereais proporciona níveis balanceados dos aminoácidos lisina e metionina (LIU, 1997).

ANTUNES e SGARBIERI (1980) relataram que o valor biológico da soja se deve, principalmente, às suas propriedades como alimento protéico, apresentando alto teor de proteínas de fácil digestão, e por ser uma fonte de óleo de boa qualidade. Além disso, com base no método da Digestibilidade Protéica Corrigido pelo Escore de Aminoácidos (PDCAAS), a proteína de soja na forma pura é equivalente em qualidade, a proteínas de origem animal (LIU, 1997). Entretanto, quando a proteína de farinhas de soja foi avaliada por meio de ensaios biológicos, observou-se que sua qualidade protéica foi inferior à da caseína para promover crescimento e manutenção de peso de ratos, bem como para promover síntese protéica (MONTEIRO, 2000). Vários fatores têm sido identificados que afetam a digestibilidade protéica e conseqüentemente a sua qualidade, incluindo a presença de componentes biologicamente ativos, tratamento térmico, e a própria estrutura química da proteína de soja. Esses fatores podem afetar a digestibilidade ou por impedir a hidrólise de um “pool” de proteínas em aminoácidos individuais ou por render aminoácidos hidrolisados não disponíveis ao organismo (LIU, 1997).

A maioria das leguminosas tem menos de 10% de lipídios em suas sementes. Em contraste, a soja tem aproximadamente 20%, vindo após o amendoim, que tem 48% em base de matéria seca. O ácido linoléico ( $\omega$ -6) contribui com aproximadamente 53% do conteúdo total de ácidos graxos do óleo de soja, enquanto o ácido graxo  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3) contribui com aproximadamente 8% (LIU, 1997). E este último é responsável pela baixa estabilidade oxidativa dos produtos de soja (MOREIRA, 1999).

Segundo HYMOWITZ (1972), os açúcares totais correspondem a 8% da matéria seca em sementes de soja. Desse total, 60% corresponde a sacarose, 4% a rafinose e 36% a estaquiose. O amido é encontrado em sementes verdes, mesmo assim em pequena quantidade.

## 2.2- Biossíntese e papel fisiológico dos RO

Os RO são o segundo tipo de carboidrato solúvel mais abundante presente 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). Acredita-se que o papel primário dos RO seja de carboidratos de reserva (CHATTERTON et al., 1990; DINNI et al., 1989). Além disso, os RO têm outras importantes funções nas plantas. Eles servem como metabólitos de transporte de esqueletos carbônicos em muitas leguminosas e existem evidências de seu papel na adaptação das plantas ao frio e em conferir tolerância à dessecação durante a maturação da semente. Acredita-se que os efeitos relacionados a estresses sejam resultantes da proteção das proteínas de membrana pelos RO (JONES et al., 1999). LAHUTA et al. (2000) demonstraram que a queda do vigor de sementes de *Lupinus luteus* L pode confirmar a relação direta entre a longevidade das sementes e o conteúdo de oligossacarídeos de rafinose nas mesmas. A sacarose e os RO estão sempre presentes em sementes dessecadas dormentes. Na ausência dos RO, a tolerância das sementes à dessecação é perdida, mesmo que a sacarose esteja presente. Acredita-se que a sacarose seja o principal agente da tolerância das sementes à dessecação (KOSTER e LEOPOLD, 1988), enquanto os RO impedem a cristalização da sacarose (LEOPOLD e VERTUCCI, 1986).

Os RO são sintetizados durante a formação das sementes e hidrolisados durante o processo de germinação (KANDLER e HOLF, 1980; SARAVITZ et al., 1987). A via metabólica de síntese dos RO pode ser representada (DEY, 1985) como se segue:

UDP-galactose + mio-inositol → galactinol + UDP

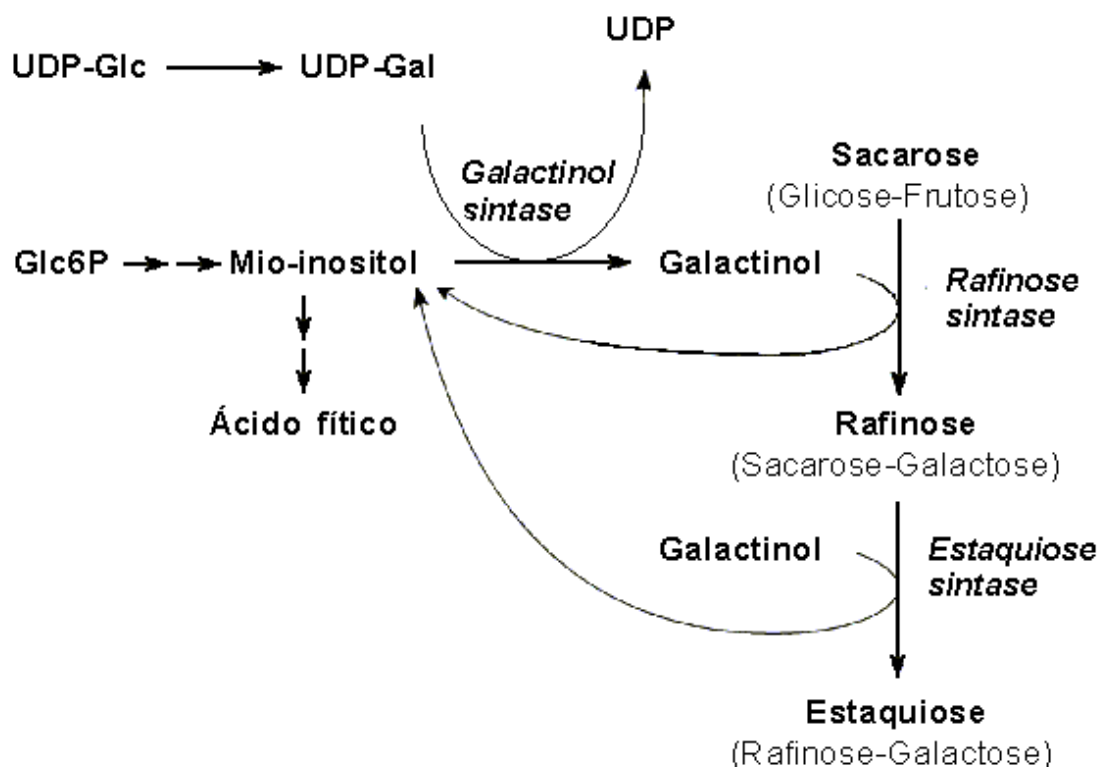
Galactinol + sacarose → rafinose + mio-inositol

Galactinol + rafinose → estaquiose + mio-inositol

Galactinol + estaquiose → verbascose + mio-inositol

Galactinol + verbascose → ajuçose + mio-inositol

Um esquema da via de síntese dos oligossacarídeos, bem como das enzimas envolvidas, está representado na Figura 1 (SUAREZ et al., 1999).



**Figura 1** – 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 (Retirado de GUIMARÃES, 2001).

A reação inicial é catalisada pela galactinol sintase (UDP-galactose: mio-inositol galactosil transferase, GS), que requer  $Mn^{+2}$  para sua atividade (LIU et al., 1995), produzindo galactinol a partir de UDP-galactose e mio-inositol. Em folhas e sementes, a atividade de GS correlaciona-se positivamente com os níveis de oligossacarídeos da série de rafinose. Esta enzima provavelmente regula os níveis de oligossacarídeos de reserva em partes específicas das plantas (CASTILHO et al., 1990; MITCHELL et al., 1992). Subseqüentemente à reação inicial, sintases específicas catalisam a síntese de cada membro da série, pela transferência do galactinol para a sacarose, a rafinose, a estaquiose

e a verbascose, produzindo os  $\alpha$ -1,6-galactosídeos tri, tetra, penta e hexassacarídeos de rafinose.

A GS é induzida e tem sua atividade 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. A manipulação ou bloqueio da produção de GS reduziria o fluxo de carbono na via, inibindo parcial ou completamente a síntese de RO. Sendo assim, a redução da atividade de GS poderia diminuir os problemas nutricionais associados com os RO, mas poderia resultar também em plantas e/ou sementes que se tornariam susceptíveis ao estresse ambiental. Uma estratégia mais adequada para redução dos níveis de RO seria a manipulação de etapas individuais da via ao invés da via como um todo. Isso requereria a compreensão do controle da expressão dos genes envolvidos em cada etapa específica da mesma (JONES et al., 1999). Apesar do interesse em se obter variedades de soja com níveis reduzidos de RO, variedades sem rafinose e estaquiose ainda não foram obtidas.

A rafinose acumula-se em altas concentrações nos órgãos de reserva, durante o desenvolvimento da planta. Com a perda de água, que ocorre nas sementes durante a maturação, há concomitante aumento na concentração de rafinose. Durante o processo de germinação, esta é degradada à galactose e sacarose. O grupo frutossil da rafinose pode ser clivado pela invertase originando melibiose (DEY, 1985).

Um dos mais abundantes tetrassacarídeos em plantas é a estaquiose (DEY, 1985). Em raízes e sementes, estaquiose pode ser armazenada ou transformada em outros  $\alpha$ -galactosil oligossacarídeos. Em sementes, estaquiose é metabolizada durante a germinação. Verbascose e ajuçose 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).

A hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,6 glicosídicas presentes nos oligossacarídeos de rafinose, nos polissacarídeos da parede das células e nas glicoproteínas de reserva é catalisada pela  $\alpha$ -galactosidase. Em células de cotilédones de soja, a  $\alpha$ -galactosidase ocorre nas cisternas do aparelho de

Golgi e pode ser depositada em corpos protéicos. Sementes maduras usualmente contêm algumas formas de  $\alpha$ -galactosidase que diferem na sua massa molecular e atividade (LAHUTA et al, 2000).

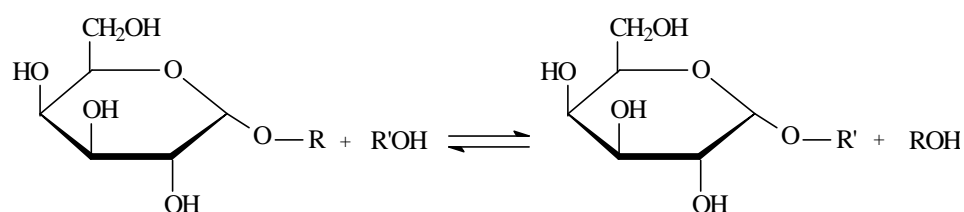
A ação da  $\alpha$ -galactosidase de sementes em desenvolvimento provoca aumento na relação manose/galactose nas sementes maduras, pela remoção de resíduos de galactose contidos na estrutura primária de galactomananas (EDWARDS et al., 1992).

A degradação dos oligossacarídeos requer a ação de  $\alpha$ -galactosidases e de invertases. Os níveis destas enzimas aumentam durante a germinação das sementes. Invertase (EC 3.2.1.26  $\beta$ -D-frutofuranosídeo frutohidrolase) hidrolisa sacarose em glicose e frutose e ocorre em muitas plantas e microrganismos (HIRAYAMA et al., 1989). A expressão e distribuição das invertases de plantas têm sido especialmente documentadas, porque desempenham importante papel no metabolismo de açúcar (ENDO et al., 1990).

### 2.3- $\alpha$ -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  $\alpha$ -galactosidase por Weidenhagen, que estudou a especificidade de ação da enzima usando açúcares com resíduos  $\alpha$ -D-galactosil não-redutor terminal (DEY e PRIDHAM, 1972).

A reação catalisada pela  $\alpha$ -galactosidase está apresentada na Figura 2.



**Figura 2** – Esquema da reação catalisada pela  $\alpha$ -galactosidase.

A molécula hidroxílica aceptor,  $\text{R}'\text{OH}$ , é comumente a água, embora  $\text{R}$  e  $\text{R}'$  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 (DEY e PRIDHAM, 1972; SPANGENBERG et al., 2000).

$\alpha$ -Galactosidases intracelular e extracelular ocorrem em microrganismos, plantas e animais. A enzima catalisa a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,6 de resíduos  $\alpha$ -D-galactosídeos em uma grande variedade de substratos, incluindo oligossacarídeos lineares e ramificados, polissacarídeos e substratos sintéticos como *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (ADEMARK et al, 2001).

As  $\alpha$ -galactosidases estão amplamente distribuídas entre várias espécies de plantas e geralmente são consideradas como participantes na degradação de reservas de RO e galactomanas 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 subsequentemente usados como fonte de carbono visando o fornecimento de energia para vários processos metabólicos ( REID e MEIER, 1973).

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

Formas multimoleculares da  $\alpha$ -galactosidase já foram descritas em muitas fontes vegetais (GUIMARÃES et al., 2001; SHIVANNA et al., 1990; ALANI et al., 1989) e também purificadas de microrganismos (ADEMARK et al., 2001).

### **2.3-1. $\alpha$ -Galactosidase de semente de soja**

A  $\alpha$ -galactosidase de semente de soja madura é uma proteína tetramérica com massa molecular de 160 kDa em pH 4,0. Em pH 7,0, a proteína dissocia-se em subunidades com massas moleculares de 38 e 40 kDa. Ambas as formas monomérica e tetramérica são enzimaticamente ativas, mas com propriedades cinéticas diferentes (DEL CAMPILLO E SHANNON, 1982).

A  $\alpha$ -galactosidase está presente já no início do desenvolvimento do grão de soja e acumula-se linearmente com o enchimento do grão. A enzima é armazenada nos corpos protéicos das células de cotilédones onde constitui apenas 0,05% do total de proteínas (HERMAN E SHANNON, 1985).

KUO et al (1997) demonstraram que a atividade de  $\alpha$ -galactosidases que hidrolisam rafinose e estaquiose aumenta durante o desenvolvimento da semente de soja, ao mesmo tempo em que ocorrem altas taxas de acúmulo de RO. É sugerido que os mecanismos que impedem a interação da enzima com o substrato talvez sejam decorrentes de compartimentalização, ou devido a algum inibidor endógeno. Entretanto, a função das  $\alpha$ -galactosidases no desenvolvimento da semente de soja e na degradação dos RO ainda é pouco estudada.

Estudos com  $\alpha$ -galactosidases de soja demonstraram que estas apresentam potencial para uso na conversão de sangue tipo B para O, pela hidrólise do resíduo  $\alpha$ -D-galactosil presente no epitopo das células do sangue do grupo B (DAVIS et al, 1996).

DAVIS et al (1996) obtiveram uma  $\alpha$ -galactosidase recombinante de soja que foi expressa em *Pichia pastoris*. A enzima recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade e a análise em SDS-PAGE mostrou uma única proteína de massa molecular 39,8 kDa sob condições redutoras e 38,0 kDa sob condições não-redutoras. Esta proteína continha a seqüência NGKVHTPPMG na região amino-terminal, correspondendo a seqüência de aminoácidos deduzida a partir do gene da  $\alpha$ -galactosidase de soja. Os resultados obtidos por DAVIS et al (1996) mostraram que a enzima recombinante foi um monômero, em contraste com a  $\alpha$ -galactosidase de soja nativa que é um

tetrâmero. A enzima foi ativa para a hidrólise do resíduo  $\alpha$ -1,3 galactosil terminal presente no epítipo das células sanguíneas do grupo B, fazendo a conversão dos eritrócitos do tipo B para O.

### **2.3-2. $\alpha$ -Galactosidase humana**

A  $\alpha$ -galactosidase humana é uma enzima lisossomal necessária no metabolismo de glicosfingolípídios (MARANVILLE e ZHU, 2000). Sua deficiência resulta na doença de Fabry, uma patologia hereditária do metabolismo, de transmissão recessiva ligada ao cromossoma X, caracterizada pelo acúmulo de glicosfingolípídios neutros com terminal  $\alpha$ -galactosil no plasma e tecidos. A doença foi atribuída a uma deficiência na ceramida trihexosidase, uma enzima lisossomal, mais precisamente caracterizada como uma  $\alpha$ -galactosidase – a  $\alpha$ -galactosidase A (GERMAIN, 2000).

A doença de Fabry foi primeiramente descrita em 1898 pelo inglês William Anderson e pelo alemão Johannes Fabry. Em 1947, foi mencionada a presença de vacúolos de reserva na média das artérias e nos glomérulos, sugerindo uma doença de sobrecarga generalizada. A natureza lipídica do material acumulado foi caracterizada pela presença de principalmente dois glicosfingolípídios, a globotriaosilceramida (GL3) e, em menor grau, a galabiosilceramida, que permitiram a caracterização da doença de Fabry entre outras esfingolipidoses (GERMAIN, 2000).

As manifestações clínicas nos machos hemizigotos acometidos (1 em 40.000) são principalmente devido a doença progressiva de pequenos vasos, incluindo angioqueratoma e disfunção progressiva. A falência renal e a vasculopatia cardíaca e cerebral levam ao falecimento precoce na maioridade. A demonstração da deficiência da  $\alpha$ -galactosidase A em leucócitos ou no plasma é o método definitivo para o diagnóstico de machos hemizigotos acometidos pela doença (GARMAN et al, 2002; GERMAIN, 2000). A maioria das fêmeas portadoras são clinicamente sintomáticas. Elas podem apresentar acroparestesia isolada, sintomas cardíacos, ou uma característica distrofia

corneal benigna. Devido a inativação ocasional do cromossoma X, a detecção enzimática de portadoras é freqüentemente inconclusiva (GERMAIN, 2000).

Atualmente, ainda não está estabelecido nenhum padrão de tratamento para a doença de Fabry, entretanto, a terapia de reposição enzimática usando uma proteína  $\alpha$ -galactosidase recombinante mostrou-se uma promessa terapêutica, visto que tentativas clínicas indicam eficácia em indivíduos que sofrem de doença de Fabry. A terapia de substituição usando o gene da  $\alpha$ -galactosidase tem obtido resultados encorajadores em experimentos com células em cultura (GARMAN et al, 2002).

#### **2.4- Mecanismo de ação das $\alpha$ -galactosidases**

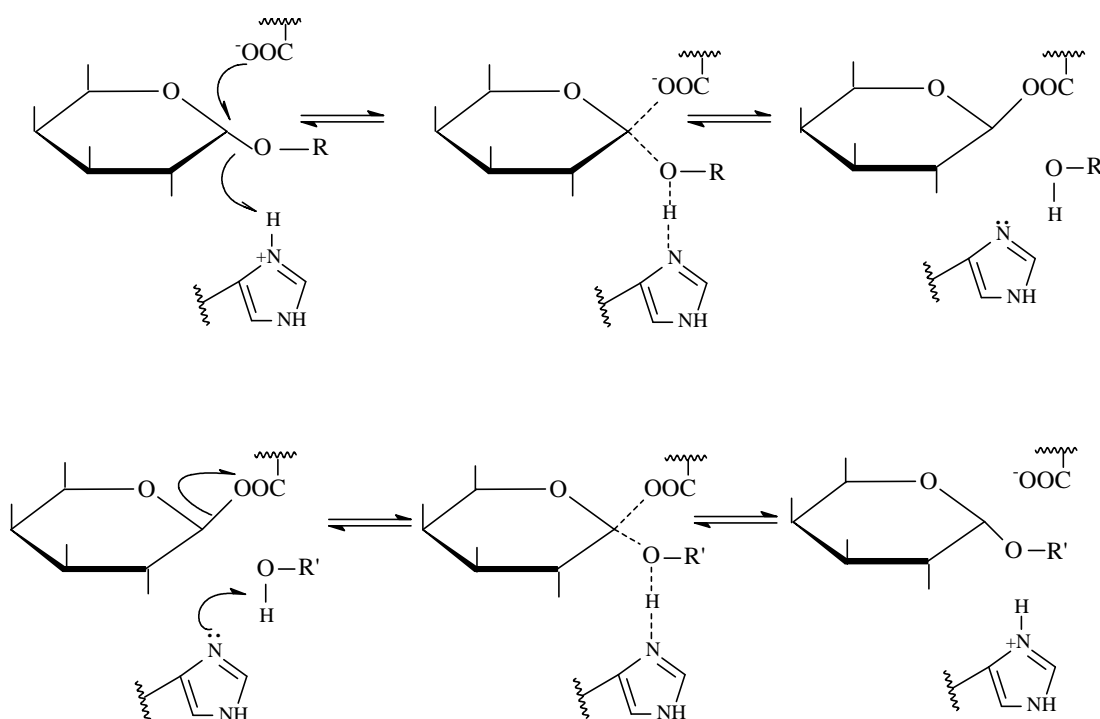
De acordo com DEY e PRIDHAM (1972) poucos fatos concretos relativos ao mecanismo de ação das  $\alpha$ -galactosidases estavam disponíveis até o início da década de 70, devido ao conhecimento insuficiente da química e cinética das enzimas da maioria das fontes. Até aquele momento, não havia estudos sobre fissão de ligação por  $\alpha$ -galactosidases embora, por analogia com outras glicosidases, sugeriu-se que provavelmente as ligações galactose-oxigênio dos substratos fossem clivadas. Estudos de ressonância magnética nuclear e polarimetria mostravam claramente com  $\alpha$ -galactosidases de *Cajanus indicus* e amêndoa doce que os resíduos galactosil liberados possuíam a mesma configuração anomérica do substrato.

Estudos de especificidade com  $\alpha$ -galactosidase de amêndoas doce e aril  $\alpha$ -D-galactosídeos mostraram que a natureza eletrônica do aglicom exercia notável influência sobre a taxa de hidrólise enzimática. Por meio desses estudos, observou-se também que o mecanismo de ação para a  $\alpha$ -galactosidase de amêndoas doce assemelhava-se às hidrólises alcalina e ácida de aril glicosídeos, o que, conseqüentemente, podia ser atribuído a presença de grupos básicos e ácidos no sítio ativo. Esses grupos foram identificados por Dey e Malhotra (citados por DEY E PRIDHAM, 1972) como carboxil (desprotonado) e imidazol (protonado), respectivamente. A fotooxidação em presença de azul de metileno e a inibição por íons  $Ag^+$

também davam suporte a essas conclusões. Resultados similares pareciam ocorrer com a  $\alpha$ -galactosidase I de *Vicia faba* (DEY e PRIDHAM, 1972).

Dey e Malhotra (citados por DEY e PRIDHAM, 1972) observaram com a enzima de amêndoas doce que a ligação do p-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactosídeo no sítio ativo da enzima proporcionava diminuição do pK do grupamento que sofria dissociação no lado ácido e aumentava o valor do pK do grupamento que sofria dissociação no lado alcalino da faixa ótima de pH da enzima. Esses resultados conduziam a hipótese de que mudanças induzidas pelo substrato na molécula da enzima, ampliavam sua faixa efetiva de pH, favorecendo a reação catalítica (DEY e PRIDHAM, 1972).

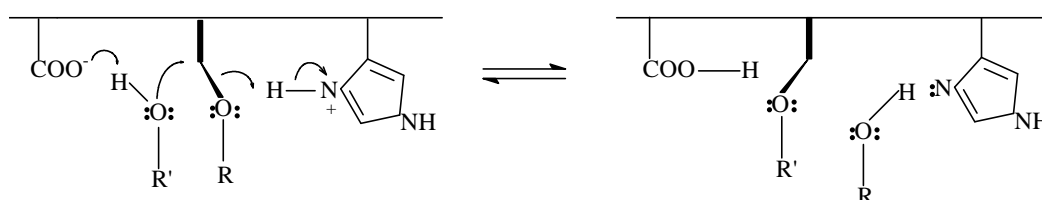
Baseando-se nesses resultados, Dey (citado por DEY e PRIDHAM, 1972) postulou um mecanismo de duas etapas para a ação da  $\alpha$ -galactosidase de amêndoas doce (Figura 3).



**Figura 3** – Mecanismo de ação de duas etapas postulado por Dey (citado por DEY e PRIDHAM, 1972) para a  $\alpha$ -galactosidase de amêndoas doce.

No mecanismo de ação de duas etapas, o aglicom é clivado pela ação combinada dos grupos carboxil e imidazol. Esta clivagem é seguida pela reação com uma molécula aceptora (R'OH), que pode ser a água ou um álcool alifático, resultando na hidrólise ou em produtos de transferência. Sugeriu-se que seria possível que somente o ataque eletrofílico do grupo imidazol seria suficiente para clivar a ligação glicosil-oxigênio, resultando na formação de um carbocátion no C-1 da galactose. No mecanismo de duas etapas completo, duas inversões de Walden provavelmente ocorrem, resultando na retenção da configuração anomérica no produto final. Entretanto, a formação do carbocátion intermediário não precisaria necessariamente conduzir a rancemização, a configuração poderia ser conservadamente estabilizada por uma ligação específica do composto intermediário na enzima (DEY e PRIDHAM, 1972).

Um mecanismo alternativo de uma etapa (Figura 4) foi também sugerido por Dey, 1969 (citado por DEY e PRIDHAM, 1972).



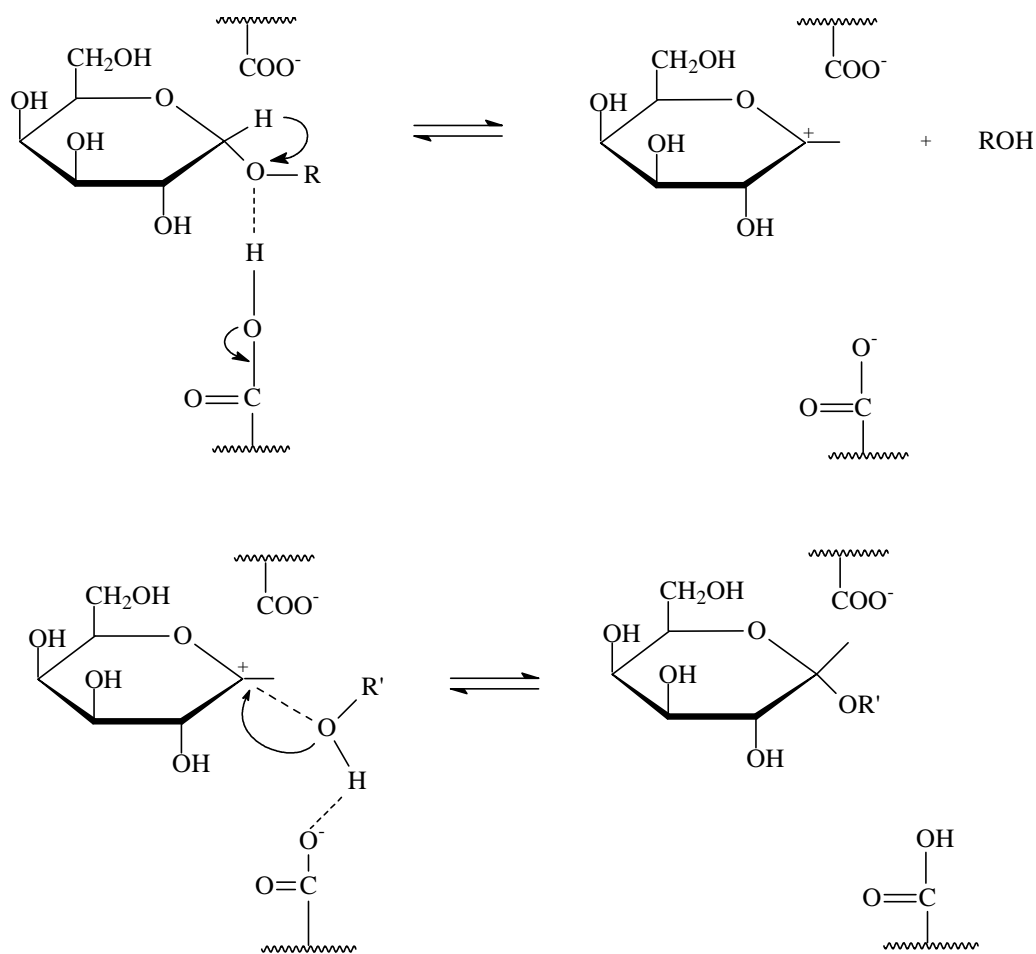
**Figura 4** – Mecanismo de ação de uma etapa sugerido por Dey (citado por DEY e PRIDHAM, 1972 ) para a  $\alpha$ -galactosidase de amêndoa doce.

No mecanismo de ação de uma etapa, um complexo ternário seria formado entre a enzima, o substrato e a molécula aceptora, com os grupos carboxil e imidazol apresentando papéis similares, como no mecanismo de duas etapas. O ataque no átomo de carbono anomérico da galactose levaria a formação de um produto com retenção da configuração (DEY e PRIDHAM, 1972).

Estudos de modificação química da  $\alpha$ -galactosidase de côco, realizados por Mathew e Balasubramaniam (citados por MATHEW E BALASUBRAMANIAM, 1987), indicaram a presença de dois grupos carboxil,

tirosina e triptofano e a ausência do grupo imidazol no ou próximo ao sítio ativo da  $\alpha$ -galactosidase (MATHEW e BALASUBRAMANIAM, 1987). Estudando o efeito do pH nos valores dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{max}$ , MATHEW e BALASUBRAMANIAM (1987) observaram que os grupos dissociáveis no sítio ativo da enzima apresentavam valores de  $pK_a$  de 3,8 e 6,5. Esses resultados sugeriam que a forma protonada com  $pK_a$  de 6,5 era requerida para a catálise, visto que a afinidade pelo substrato decrescia com o aumento do pH. Por outro lado, a forma ionizada do grupo com  $pK_a$  3,8 era importante na ligação do substrato com o sítio ativo da enzima, pois em valores de pH inferiores a 3,8, foi observada diminuição da  $pK_M$ , indicando menor afinidade da enzima pelo substrato. Os resultados suportavam a hipótese de presença dos mesmos grupos ionizando na enzima livre. Constatou-se também que o efeito do pH sobre a  $V_{max}$  permanecia constante na faixa de pH compreendida entre 2,5-6,5. A partir desses resultados, MATHEW e BALASUBRAMANIAM (1972) concluíram que dois grupos ionizáveis com  $pK_a$ s de 3,8 e 6,5 estariam envolvidos na ligação do substrato ao sítio ativo da enzima e um desses grupos, estaria envolvido diretamente na catálise. O grupo com  $pK_a$  de 3,8 seria um grupo carboxil ( $pK_a$  3,0-4,7), requerido como um grupo  $-COO^-$  para a catálise. O grupo com  $pK_a$  de 6,5 seria um grupo carboxil perturbado, como já havia sido verificado por Koshland e Neet para a molécula de lisozima.

Com base em experimentos de modificação química e nos resultados de estudos cinéticos, MATHEW e BALASUBRAMANIAM (1987) propuseram um novo mecanismo de ação para a  $\alpha$ -galactosidase (Figura 5).



**Figura 5** – Mecanismo de ação para  $\alpha$ -galactosidase de côco sugerido por MATHEW e BALASUBRAMANIAM, 1972.

No mecanismo de ação proposto para a  $\alpha$ -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)

## 2.5- Utilização da soja na alimentação

A produção de soja no Brasil em 2001 foi de aproximadamente 43,50 milhões de toneladas e o consumo de 26,40 milhões de toneladas, ou seja, cerca de 61% da soja produzida no Brasil é consumida internamente. Nos Estados Unidos, da produção de 78,70 milhões de toneladas, 50,90 milhões de toneladas foram consumidas no país, o equivalente a 65%. O Brasil contribui com aproximadamente 24% da produção mundial de soja, os Estados Unidos com 42% e a China com 8% (USDA, 2003).

A soja é uma fonte de proteína de boa qualidade e baixo custo (CRUZ, et al., 1981). Apesar de a proteína de soja possuir perfil aminoacídico balanceado, os produtos a base de soja não são bem aceitos devido ao seu sabor e digestibilidade (THIPPESWAMY e MULIMANI, 2002; MULIMANI et al., 1997). Vários fatores afetam a digestibilidade protéica, incluindo a presença de compostos biologicamente ativos como inibidores de tripsina, hemaglutininas e oligossacarídeos, bem como o tratamento térmico e a forma química da proteína de soja por si mesma (LIU, 1997).

O extrato hidrossolúvel de soja vem sendo utilizado na alimentação humana, particularmente como substituto ao leite de vaca. Tal uso é indicado para pessoas com intolerância ao leite de vaca e com algumas deficiências genéticas, como a ineficiência em metabolizar a lactose. Adicionalmente, devido à alta produção de soja nos países tropicais, sua utilização na alimentação de animais, como suínos na fase de aleitamento, representa uma alternativa econômica bastante atrativa (DUFFUS e SLAUGHTER, 1980).

O leite de soja é rico em proteínas de alto valor biológico e não contém colesterol e lactose, apenas pequenas quantidades de ácidos graxos saturados, podendo ser utilizado como suplemento para pessoas que são lactase deficientes. É um bom meio de crescimento para bifidobactérias devido ao fato de conter sacarose, rafinose e estaquiase, açúcares que são fermentados pela maior parte das espécies pertencentes a este gênero (DESJARDINS et al., 1990). Os dois últimos açúcares, quando ingeridos pelos mamíferos, podem causar flatulência. A hidrólise destes oligossacarídeos requer a ação da enzima  $\alpha$ -galactosidase, que hidrolisa resíduos contendo um  $\alpha$ -galactosídeo não-redutor terminal, porém esta enzima não está presente no

trato intestinal de animais e humanos (GITZELMANN e AURICCHIO, 1965; SHABALIN et al., 2002). Portanto, a ingestão de soja resulta em flatulência, náuseas, desconforto e diarreia. Tais sintomas estão associados com o alto teor de RO, aproximadamente 40% do peso seco total de açúcares presentes nos grãos de soja (HYMOWITZ et al., 1972). Mais especificamente, a rafinose e a estaquiose são os causadores primários de tais sintomas (WAGNER et al., 1976).

Além das qualidades nutricionais, estudos recentes têm sugerido que a soja pode ter outros aspectos benéficos, incluindo propriedades antineoplásicas. Segundo LIU (1997), a soja é uma fonte rica em fitoquímicos, muitos dos quais apresentam efeitos benéficos importantes à saúde humana e animal. Estes incluem compostos que são encontrados na soja em concentrações muito maiores do que em outros alimentos, como isoflavonóides e compostos que são importantes na prevenção de doenças crônicas presentes em muitos vegetais, como a vitamina E. Atualmente, a soja é indicada no tratamento de vários problemas de saúde da mulher no período peri e pós-menopausa, como ondas de calor, osteoporose, algumas doenças renais, fibrose cística, doenças inflamatórias, doenças imunes e hipertensão (BARNES et al., 1999). A ingestão de produtos de soja também têm sido relacionada com a prevenção de câncer de próstata em homens (BAU et al., 2000). Portanto, sem os fatores antinutricionais, inclusive os causadores da flatulência, a soja poderia ser ainda mais proveitosa para humanos e animais (SUAREZ et al., 1999). Guias dietéticos preconizam a diminuição da ingestão de colesterol e ácidos graxos saturados e aumento da ingestão de fibras, antioxidantes e fitoquímicos. Esses guias indicam a inclusão de grãos e produtos à base de soja para a saúde do coração (ANDERSON et al., 1999).

Segundo SUAREZ et al. (1999) a farinha de soja obtida de sementes com baixos teores de oligossacarídeos proporcionou menor produção de gás do que a obtida da soja convencional. O experimento partiu do pressuposto de que a ingestão de produtos de soja pode causar excessiva produção de gás intestinal. O objetivo do estudo foi comparar a produção de gás e os sintomas gasosos em voluntários saudáveis após a ingestão de 34 e 80 g de farinha de soja obtida da soja convencional ou soja com baixos teores de oligossacarídeos indigeríveis. Foram medidos o hidrogênio da respiração

(indicador da má absorção de carboidratos), a frequência de flatulência e os sintomas abdominais. A concentração de hidrogênio da respiração, por 8 h, foi significativamente maior depois da ingestão de 34 g de soja convencional ( $60,4 \pm 9,4$  ppm) do que depois da ingestão de soja com baixos teores de oligossacarídeos ( $34,3 \pm 8,1$  ppm). Diferenças significativas foram observadas com doses de 80 g ( $157,9 \pm 19,4$  ppm) de soja convencional em relação à soja com baixos teores de oligossacarídeos ( $50,8 \pm 6,8$  ppm). A frequência de flatulência ( $7,5 \pm 1,9$  vezes/12 horas) foi significativamente maior após a ingestão de 80 g de soja convencional, comparada à ingestão de arroz ( $3,2 \pm 0,8$  vezes/12 horas). Entretanto, a frequência de flatulência após a ingestão de soja com baixos teores de oligossacarídeos ( $3,9 \pm 0,7$  vezes/12 horas) foi comparável àquela observada após a ingestão de arroz, não tendo sido observado diferença significativa na severidade de outros sintomas abdominais.

Técnicas para reduzir os conteúdos de rafinose e estaquiose dos produtos de soja têm sido o assunto de extensivas investigações. Embebição e cocção das sementes (MULIMANI e DEVENDRA, 1998; MULIMANI et al., 1997), processos de fermentação (SCALABRINI et al., 1998) e extração dos RO com água (COON et al., 1990) foram estudados. A cocção não elimina estes oligossacarídeos estáveis ao calor; entretanto, a germinação por 1-4 dias resultou na diminuição dos teores de açúcares. A incubação com vários microrganismos ou enzimas derivadas de microrganismos gera produtos com um conteúdo de oligossacarídeos reduzido. Técnicas como extração dos RO com etanol a partir de farinha de soja também foram testadas (LESKE et al., 1993). COON et al., 1990 relataram que a remoção com metanol de galactooligossacarídeos da farinha de soja aumentou a digestibilidade de polissacarídeos que não o amido e melhorou o aproveitamento energético de uma dieta a base de farinha de soja por aves domésticas em 50% e 20% respectivamente.

Várias pesquisas sugerem que a conversão enzimática dos RO presentes no leite de soja e outros derivados parece ser a estratégia mais eficiente para reduzir os RO e aumentar seu valor nutricional (CRUZ e PARK, 1982; SANNI et al., 1997).

Um estudo foi realizado utilizando sementes de soja em quatro tempos de germinação (0, 1, 3 e 5 dias), com o objetivo de verificar as prováveis

mudanças bioquímicas e nutricionais nas mesmas. A análise dos resultados demonstrou que era preferível usar as sementes germinadas por três dias, por apresentarem maior digestibilidade aparente em relação às sementes sem germinar. Também notou-se que os teores dos açúcares rafinose e estaquiose nos grãos chegaram a zero após o terceiro dia de germinação; ademais os inibidores de tripsina também diminuíram a partir do terceiro dia. A cor das sementes germinadas era característica das sementes de soja, amarelo pálido. Entretanto, a cor das sementes após cinco dias de germinação era amarelo esverdeado, o que é um fator indesejável para o preparo posterior de produtos como o extrato hidrossolúvel de soja (JIMÉNEZ et al., 1985). Estudos relacionados ao efeito da germinação de sementes de soja na biodisponibilidade de nutrientes “in vivo” são, ainda, muito limitados (BAU et al., 2000).

Vários autores informaram a respeito do valor biológico e nutricional de sementes germinadas de soja. Eles observaram que a duração do processo de germinação exerceu grande influência sobre o consumo alimentar e características biológicas em ratos, bem como sobre o índice de eficiência protéica (PER) das dietas à base de grãos (BAU et al., 2000). Em animais avaliados num bioensaio, observou-se que a germinação das sementes por um dia induziu maior PER, ganho de peso corporal diário e ingestão diária de proteínas, quando comparados aos obtidos com dietas a base de sementes não-germinadas e com sementes germinadas por longos períodos. Esses resultados podem ser devido, em parte, à eliminação de galactosídeos e a um leve decréscimo na atividade de inibidores de tripsina (BAU et al., 2000). Soja germinada (germinação  $\geq 3$  dias) usada nos gêneros alimentícios deve ser aquecida em condições apropriadas antes do consumo para ser assegurado a higiene, qualidade nutricional e palatabilidade (BAU et al., 2000).

## **2.6- Flatulência**

O flato intestinal consiste principalmente de  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2$  e  $CH_4$ . O intestino normal produz de 7 a 10 L de gás/dia, com a maior parte reabsorvida no sangue. Somente 600 mL de gás são eliminados por dia, muitos dos quais insensivelmente, à proporção de 100 mL/h. Quando a quantidade de gás

eliminada normalmente é excedida, o paciente reclama de flatulência (MAHAN e ARLIN, 1995).

O volume excessivo de gases intestinais pode estar relacionado a um aumento da motilidade intestinal fazendo com que o volume gasoso passe pelo cólon muito rapidamente, afetando a atividade absorptiva dos enterócitos. Os gases também podem ser resultado de aerofagia, que é a deglutição de ar durante a ingestão de líquidos e sólidos. Entretanto, a maior parte desse gás é expelido pelo estômago, sendo que somente pequenas quantidades fazem seu caminho até o cólon. Altas concentrações de  $N_2$  e  $O_2$  no volume de gás intestinal, ambas substâncias presentes na atmosfera em grandes quantidades, resultam da aerofagia. Gases excessivos podem, algumas vezes ser produzidos pela fermentação bacteriana de resíduos dietéticos não digeríveis. O volume de gases intestinais quando alcança o reto, atinge altas concentrações de  $H_2$  e  $O_2$  indicando fermentação bacteriana excessiva e sugerem uma absorção menos eficiente de substratos fermentáveis, como a lactose. Se o problema se constitui em uma deficiência enzimática, os carboidratos que não são digeridos devem ser diminuídos ou mesmo eliminados da dieta. A tendência bastante conhecida dos feijões de produzirem gases tem sido atribuída à presença de carboidratos específicos, tais como rafinose e estaquiose (MAHAN e ARLIN, 1995).

As substâncias possivelmente produtoras de gases estão presentes em vegetais, como feijão roxo, feijão de lima, feijão branco, brócolis, couve de Bruxelas, repolho, couve-flor, milho, pepino, couve-rábano, alho-poró, lentilhas, cebolinha, ervilha, pimentão verde, rabanete, chucrute, cebola branca, soja e nabo; em frutas, como maçã, abacate, melão e melancia; entre outros, como doces e açúcar em excesso, refrigerantes e outras bebidas gasosas, café e bebidas alcoólicas (MAHAN e ARLIN, 1995).

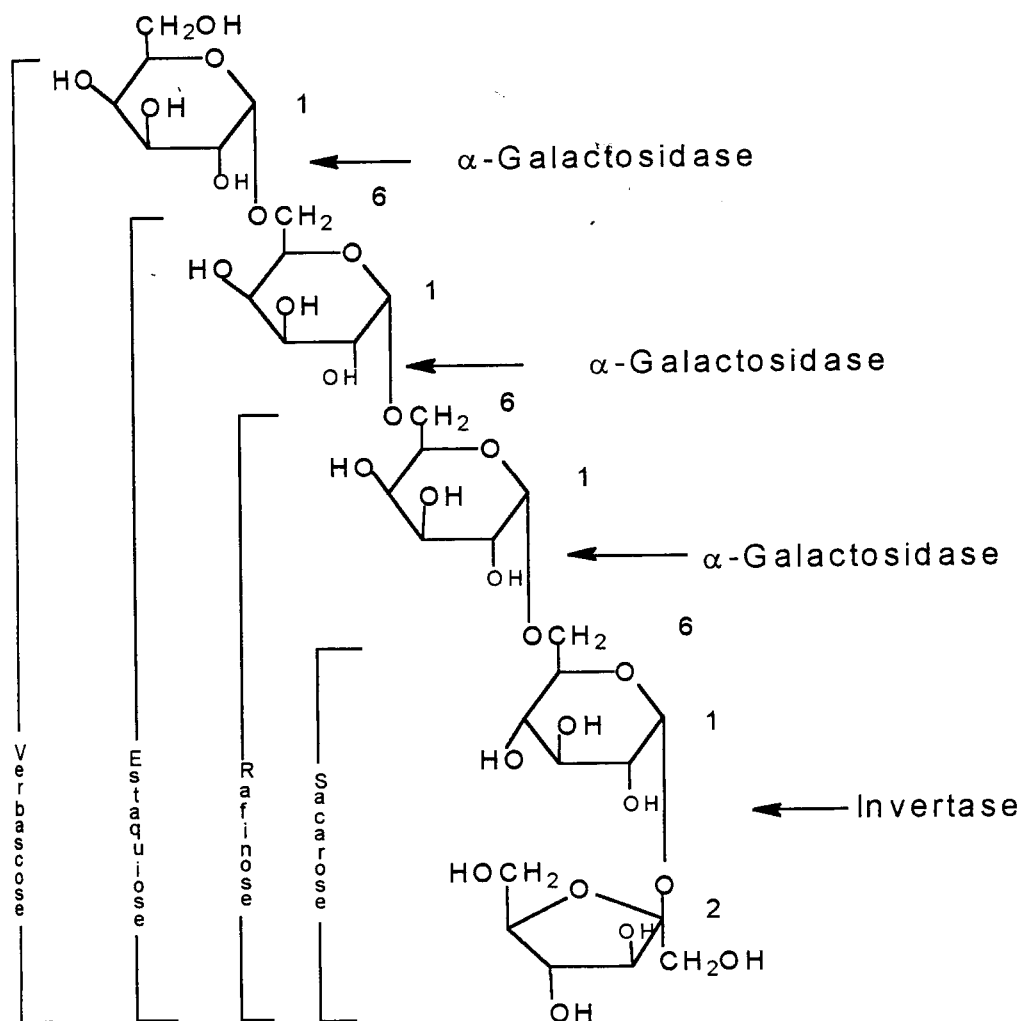
ONYENEKWE et al. (2000) demonstraram que as técnicas de cocção e embebição em água quente de grãos de *Vigna unguiculata* por 4 h causaram redução no volume do flato de 38,4% e 82,2%, respectivamente, o que foi atribuído a redução dos níveis de dois galactosídeos após a cocção ou embebição em água quente, respectivamente. A embebição em água quente é altamente defendida para a *V. unguiculata* usada na formulação de alimentos instantâneos e farinha, porque os cotilédones permanecem intactos,

razoavelmente cozidos, e o odor associado com a embebição em água fria é completamente eliminado.

## **2.7- Hidrólise enzimática de RO em extratos hidrossolúveis de soja**

A degradação enzimática completa dos oligossacarídeos de rafinose a monossacarídeos requer a ação conjunta de duas glicohidrolases:  $\alpha$ -galactosidases que degradam os oligossacarídeos de rafinose a galactose e sacarose e a  $\beta$ -frutoseidase que hidrolisa as ligações entre frutose e glicose nas estruturas sacarose, rafinose e estaquiose. O poder de causar flatulência da manotriose e melibiose, produtos obtidos pela ação da  $\beta$ -frutoseidase na estaquiose e rafinose, permanece inalterado uma vez que o resíduo  $\alpha$ -galactosil é mantido (REHMS e BARZ, 1995). Um esquema da via de degradação dos oligossacarídeos, bem como das enzimas envolvidas, está representado na Figura 6 (de REZENDE, 1998).

SCALABRINI et al. (1998) analisaram vinte e sete isolados de *Bifidobacterium* quanto à atividade de  $\alpha$ -galactosidase e produção de ácido láctico e acético, com o objetivo de determinar seu potencial para uso na produção de leite de soja fermentado. Os resultados indicaram que bifidobactérias são candidatas promissoras como cultura padrão para a fermentação do leite de soja. Elas foram capazes de reduzir os  $\alpha$ -galactooligossacarídeos que podem levar a flatulência e os aldeídos alquílicos responsáveis pelo indesejável sabor de feijão cru. Alguns isolados produziram também baixas quantidades de ácido acético, que produz gosto desagradável.



**Figura 6** – Oligossacarídeos de rafinose e sítios de clivagem para as enzimas hidrolíticas invertase e  $\alpha$ -galactosidase (Retirado de REZENDE, 1998).

Existem vários relatos sobre a utilização de  $\alpha$ -galactosidase de origem vegetal e microbiana na degradação dos oligossacarídeos presentes no leite de soja e em outras farinhas obtidas de leguminosas (SOMIARI e BALOGH, 1995; MULIMANI et al., 1997).

A produção de  $\alpha$ -galactosidase pelo fungo *Aspergillus fumigatus* foi estudada por de REZENDE (1998); entretanto, a enzima não foi capaz de hidrolisar os RO nas condições experimentais. Apesar das várias pesquisas visando o estabelecimento de processos para a remoção dos RO no extrato

hidrossolúvel de soja com a utilização de enzimas microbianas, estudos ainda são necessários para aumentar a segurança e a eficiência desses processos. KOTWAL et al. (1998) estudaram a produção de  $\alpha$ -galactosidase pelo fungo *Humicola sp.*; THANANUNKUL et al. (1976) avaliaram micélios de *Mortierella vinacea* imobilizados em gel de poliacrilamida como fonte de  $\alpha$ -galactosidase para remoção dos RO no leite de soja e CRUZ e PARK (1982) utilizaram preparações das enzimas  $\alpha$ -galactosidase e invertase produzidas por *Aspergillus oryzae*. Também foi avaliado por SANNI et al. (1997) o efeito de  $\alpha$ -galactosidases extracelulares produzidas por *Lactobacillus plantarum* na qualidade nutricional do leite de soja e derivados.

THIPPESWAMY e MULIMANI (2002) relataram a hidrólise dos oligossacarídeos da família da rafinose por  $\alpha$ -galactosidase livre e imobilizada em gel de poliacrilamida de *Gibberella fujikuroi* em leite de soja submetido a tratamento enzimático por 3, 6 e 12 horas. Eles observaram que após 3 horas de incubação foram hidrolizados 79 % e 66 % dos RO pela  $\alpha$ -galactosidase livre e imobilizada, respectivamente. Após 6 horas de incubação, 88 % dos RO foram hidrolizados pela enzima livre e 69 % pela enzima imobilizada. Após 12 horas de incubação, a hidrólise dos RO foi de 91% e 71 % pela  $\alpha$ -galactosidase livre e imobilizada, respectivamente. Geralmente a  $K_M$  do substrato para a enzima livre é menor comparada a da enzima imobilizada e, de acordo com os autores, poderia resultar em uma menor hidrólise de RO no leite de soja no sistema imobilizado. O leite de soja, preparado a partir de farinha desengordurada, contém 400 mg de rafinose e 680 mg de estaquiose por 100 mL, mas a hidrólise de estaquiose é maior do que a de rafinose no mesmo. THIPPESWAMY e MULIMANI (2002) sugeriram que a diferença na hidrólise pode ser devida ao acúmulo de rafinose, que é formada após a hidrólise de estaquiose.

Nos resultados de THIPPESWAMY e MULIMANI (2002) observa-se somente 10 % de redução de RO entre 3 e 12 horas de incubação, indicando que a incubação inicial de 3 horas foi melhor que a incubação prolongada com a enzima. A partir dos estudos de estabilidade térmica da  $\alpha$ -galactosidase livre e imobilizada, observou-se que as formas livre e imobilizada retiveram aproximadamente 90 % de sua atividade após 12 horas de incubação, contudo,

a enzima imobilizada ofereceu a vantagem de poder ser repetidamente utilizada por 4 vezes, quando comparada à enzima livre.

Estudos utilizando fontes vegetais para a obtenção de  $\alpha$ -galactosidases nos processos de hidrólise dos RO em leite de soja ainda são escassos. GUIMARÃES et al. (2001) purificaram  $\alpha$ -galactosidases (P1 e P2) de sementes germinadas de soja var. Doko e testaram sua habilidade em hidrolisar RO presentes no extrato hidrossolúvel de soja. Os autores constataram que, apesar da enzima P1 não ter sido capaz de hidrolisar os oligossacarídeos presentes no extrato hidrossolúvel, a enzima P2 reduziu consideravelmente a quantidade de rafinose (73,3%) e estaquiose (40,6%) após incubação por 8 h a 30 °C. MULIMANI e DEVENDRA (1998) usaram sementes de *Cassia sericea* como fonte de  $\alpha$ -galactosidase para hidrólise dos RO. Esses autores demonstraram que, após 3 h, os oligossacarídeos, rafinose, estaquiose e verbascose foram hidrolisados. A utilização de  $\alpha$ -galactosidase de *Cyamopsis tetragonoloba* para redução dos RO também foi avaliada por MULIMANI et al. (1997). Esses autores concluíram que o tratamento de farinha de soja com extrato bruto contendo  $\alpha$ -galactosidase foi eficiente na redução de rafinose e estaquiose. MULIMANI e DEVENDRA (1998) testaram três técnicas para redução dos RO: embebição e 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 RO. O mesmo foi observado por MULIMANI et al. (1997), os quais utilizaram  $\alpha$ -galactosidase de sementes de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*).

Entretanto, nenhum processo enzimático seguro, eficiente e economicamente satisfatório, utilizando enzimas nativas ou recombinantes, está disponível até o momento.

## **2.8- Utilização de enzimas em processos industriais**

As  $\alpha$ -galactosidases apresentam grande potencial para a utilização em várias aplicações industriais. Além do uso na hidrólise de rafinose e estaquiose 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

(KOBAYASHI e SUZUKI, 1972). Xarope de beterraba é largamente utilizado para a produção comercial de leveduras pela conveniência comercial (BURROWS, 1979). Embora o açúcar predominante no xarope de beterraba seja a sacarose, o teor de rafinose pode variar de 0,5 a 5,2% (NAGODAWITHANA e TRIVEDI, 1990). De acordo com THIPPESWAMY e MULIMANI (2002), estudos de imobilização de  $\alpha$ -galactosidase em nylon tem sido desenvolvidos com o objetivo de hidrolisar rafinose em melão de beterraba. Cepas de fermento geralmente utilizam a frutose liberada deste trissacarídeo, após hidrólise pela invertase ( $\beta$ -frutofuranosidase) mas, não o dissacarídeo residual, melibiose. Portanto, a hidrólise completa da rafinose requer a ação da invertase e  $\alpha$ -galactosidase. Algumas  $\alpha$ -galactosidases de eucariotos são capazes de remover resíduos de galactose da ligação  $\alpha$ -1,3 terminal de glicanas, o que apresenta um potencial uso médico em terapia de transfusão, na conversão de sangue do grupo B para sangue do grupo O (ZHU e GOLDSTEIN, 1994; PUCHART et al., 2000).

Segundo PUCHART et al. (2000), outra aplicação industrial de  $\alpha$ -galactosidases é na usina açucareira. Pequenas quantidades de rafinose e/ou estaquiose afetam negativamente a cristalização da sacarose. Eles podem ser facilmente eliminados e convertidos a sacarose pelo tratamento com  $\alpha$ -galactosidase. É importante que o modo de ação e a estabilidade das  $\alpha$ -galactosidases sejam conhecidos, pois as demandas industriais com estas propriedades reduzem os custos para resfriamento e reaquecimento. O uso potencial das  $\alpha$ -galactosidases para o processamento dos produtos alimentícios de soja tem sido também demonstrado. Outra possível aplicação dessa enzima é na indústria de papel e de polpa, onde galactosidases podem aumentar a clarificação da polpa, efeito de endo- $\beta$ -1,4-mananases na polpa de papel Kraft.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

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

#### **3.1- Reagentes utilizados**

Iodoacetamida, p-nitrofenil- $\alpha$ D-galactopiranosídeo, p-nitrofenol, rafinose, estaquiase, glicose, melibiose, galactose foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

As resinas cromatográficas Sephadex G-100 e CM-Sepharose Fast Flow foram obtidas da Amersham Pharmacia Biotech.

Os açúcares sacarose e frutose foram obtidos da Merck S. A. Indústria Química.

Todos os demais reagentes utilizados apresentavam procedência e grau de pureza analíticos.

Os produtos extrato de soja desengordurado e melaço leve e pesado de soja, foram fornecidos pela Empresa Bunge Alimentos S/A, Esteio – RS – Brasil e Comércio e Indústrias Brasileiras COINBRA S/A, Orlandia – SP – Brasil, respectivamente.

O extrato desengordurado de soja 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).

O melaço de soja é o produto resultante da evaporação do álcool etílico, um solvente utilizado para a extração dos oligossacarídeos, quando da preparação de concentrados protéicos de soja. O processo de extração de RO arrasta um pouco de proteína junto com os açúcares (LIU, 1997). Comercialmente, os produtos melaço leve e pesado de soja são obtidos após a manutenção do melaço por cerca de 3 a 4 dias em repouso. Após esse período, há nítida separação no fundo do tanque de decantação dos sólidos em solução aquosa. A fração do fundo que apresenta-se esbranquiçada pela presença de proteínas é denominada melaço pesado. A fração superior, que é límpida, é denominada melaço leve.

### **3.2- Material genético e enzimas utilizadas**

Sementes de soja (*Glycine max* var. Monarca) foram fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Qualidade da Soja, em desenvolvimento no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

As enzimas  $\alpha$ -galactosidases de sementes germinadas de *Tachigali multijuga*, de *Aspergillus terreus* (S1 e S2) e de *Penicillium griseoroseum*, foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Bioquímicas/ BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa. A  $\alpha$ -galactosidase, contida no extrato enzimático bruto obtido a partir de sementes germinadas de *T. multijuga*, foi parcialmente purificada por partição em sistema de duas fases aquosas, seguido por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel conforme descrito por FIALHO et al., 2002. As  $\alpha$ -galactosidases de *A. terreus* foram purificadas a partir do sobrenadante da cultura por cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200 e cromatografia de interação hidrofóbica Fenil-Sepharose, segundo REIS et al., 2002. A  $\alpha$ -galactosidase de *P. griseoroseum* foi purificada a partir do sobrenadante da cultura por fracionamento com sulfato de amônio (40-100% de saturação), cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200, cromatografia de troca iônica CM-Sepharose e cromatografia

de interação hidrofóbica Fenil-Sepharose, conforme descrito por FALKOSKI et al., 2003.

### **3.3- Germinação das sementes**

As sementes foram selecionadas e colocadas para germinar de modo uniforme sobre duas folhas de papel Germitest previamente embebidas em água destilada, cobertas com uma terceira folha do papel também embebida em água e enroladas na forma de um rolo. Vários rolos foram confeccionados e colocados em câmara de germinação a 27 °C, com umidade e luminosidade controladas. Nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 horas, amostras de sementes foram retiradas da câmara de germinação e congeladas para posterior determinação da atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase.

### **3.4- Preparação do extrato enzimático**

Para a extração da enzima  $\alpha$ -galactosidase, quatro sementes de soja germinadas foram pesadas e homogeneizadas em gral de porcelana com 8 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e centrifugadas a 14.000 rpm em centrífuga tipo Eppendorf modelo 5415C, por 20 min, a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios de atividade de  $\alpha$ -galactosidase e para a determinação do teor de proteínas.

### **3.5- Determinação da matéria seca em sementes de soja germinadas**

O teor de umidade das sementes de soja germinadas foi determinado pesando-se cerca de três gramas de amostras colocadas em estufa a 60 °C, por 48 horas. Após esse tempo, as amostras foram novamente pesadas e a matéria seca, determinada por diferença.

### **3.6- Determinação da atividade de $\alpha$ -galactosidase**

#### **3.6-1. Com o substrato sintético *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (*p*NPGal)**

A atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi determinada pela medida da taxa de conversão do substrato sintético *p*NPGal.

Para este ensaio, a mistura de reação com um volume final de 1,0 mL foi composta de 650-750  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250  $\mu$ L de solução 2 mM de *p*NPGal, 0-100  $\mu$ L da preparação enzimática (0-0,03 mg de proteína). A reação foi conduzida por 15 a 30 min em banho-maria a 40 °C e interrompida pela adição de 1 mL de solução 0,5 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Os valores de absorbância em 410 nm foram transformados em  $\mu$ moles de *p*-nitrofenolato (*p*NP), utilizando uma curva padrão construída com 0–0,20  $\mu$ moles de *p*NP a partir de uma solução estoque de concentração 2  $\mu$ mol/mL. Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de proteína necessária para produzir um  $\mu$ mol de *p*NP por minuto nas condições de ensaio.

#### **3.6-2. Com açúcares não redutores como substratos**

Ensaio para a atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram realizados contra açúcares não redutores rafinose e estaquiose com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) (MILLER, 1956). O sistema de reação continha 50  $\mu$ L de enzima semi-purificada (0,13 mg de proteína), 50  $\mu$ L de solução de açúcar 900 mM e 950  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. O ensaio foi conduzido por 30 min, a 40 °C. Após esse período, foi adicionado 1,0 mL do reagente de DNS e as amostras foram colocadas em banho fervente por 5 min. As amostras foram retiradas do banho e acrescidas de 2,0 mL de água. A mistura da reação foi deixada em repouso por 10 min a temperatura ambiente. A quantidade de açúcar redutor formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, por meio de uma curva padrão construída com 0-20  $\mu$ moles de glicose, utilizando uma solução estoque de concentração

1 mg/mL. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

### **3.6-3. Com açúcares redutores como substratos**

Os ensaios da atividade de  $\alpha$ -galactosidase contra açúcares redutores melibiose, lactose, maltose foram realizados por meio da medida de formação de glicose, pelo método da glicose oxidase (STERNBERG et al., 1970), utilizando um kit comercial (Bioclim). O ensaio foi formado com 20  $\mu$ L de enzima semi-purificada (0,052 mg de proteína), 20  $\mu$ L de solução dos açúcares 100 mM e 460  $\mu$ L e 480  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A reação foi conduzida por 30 min, a 40 °C sendo interrompida pela imersão dos tubos em banho de água fervente, por 5 min, que, após, foram colocados em água corrente para esfriar. Em cada tubo foi adicionado 1 mL do reativo de glicose oxidase e incubados 15 min, a 37 °C. A quantidade de glicose formada foi estimada espectrofotometricamente a 510 nm, por meio de uma curva padrão construída com 0-0,3  $\mu$ moles de glicose, utilizando uma solução estoque de concentração 1 mg/mL. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

### **3.6-4. Com outros substratos sintéticos**

O sistema de ensaio para os substratos sintéticos  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo ( $pNP\alpha$ Glc),  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-xilopiranosídeo ( $pNP\alpha$ X),  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo ( $pNP\alpha$ M),  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $pNP\beta$ Gal),  $p$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $pNP\alpha$ Gal) e  $o$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $oNP\beta$ Gal) foi formado por 20  $\mu$ L enzima semi-purificada (0,005 mg de proteína), 250  $\mu$ L de solução de substrato 2 mM e 730  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. O ensaio foi conduzido por 15 min, a 40 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução 0,5 M de  $Na_2CO_3$ . Os valores de absorvância a 410 nm foram transformados em  $\mu$ moles

de p-nitrofenolato (pNP) formado, utilizando a mesma curva padrão descrita no item 3.6.1.

### **3.7- Avaliação quantitativa da hidrólise de RO no extrato desengordurado de soja e nos produtos melaço leve e pesado**

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 5 g do extrato reconstituído foram transferidas para Beckers de 80 mL. Foi adicionada, em cada Becker, 16 U da enzima semi-purificada para cada grama de pó contida nas amostras, sendo os mesmos incubados em banho maria a 40 °C. Em intervalos de tempos regulares, alíquotas (100 µL), em triplicata da amostra incubada foram retiradas e utilizadas para determinação da formação de açúcar redutor com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) como descrito no item 3.6.2.

Experimento semelhante foi conduzido com os produtos melaço leve e pesado. Os produtos foram diluídos em água na proporção de 1:5 (p/v) e homogeneizados. Porções de aproximadamente 11 g dos produtos diluídos foram transferidas para Beckers de 80 mL. Foi adicionada, em cada Becker, 16 U da enzima semi-purificada para cada grama de melaço leve e pesado contido nas amostras, sendo os mesmos incubados em banho maria a 40 °C. Em intervalos de tempos regulares, alíquotas (100 µL), em triplicata da amostra incubada foram retiradas e utilizadas para determinação da formação de açúcar redutor com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) como descrito no item 3.6.2.

A eficiência da hidrólise foi avaliada pelo aumento dos níveis de açúcar redutor presentes no extrato de soja desengordurado e nos produtos melaço leve e pesado, em função do tempo de incubação com a enzima.

### **3.8- Hidrólise de RO no extrato de soja desengordurado**

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 40 U da enzima semi-purificada para cada grama de pó do extrato desengordurado contido nas amostras. Os Erlenmeyers foram, então, incubados por 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 RO presentes no extrato de soja desengordurado, essas preparações foram liofilizadas e os RO extraídos de 30 mg do pó obtido. Os teores de RO 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 RO presentes no extrato de soja desengordurado, em função do tempo de incubação com a enzima.

### **3.9- Extração dos açúcares solúveis do extrato de soja desengordurado**

A extração dos açúcares solúveis do extrato de soja desengordurado tratado e não tratado enzimaticamente foi realizada de acordo com metodologia proposta por SARAVITZ et al. (1987), com modificações. Aproximadamente 30 mg do pó foram pesados em tubos tipo Eppendorf e utilizados para o processo de extração dos açúcares solúveis. Os açúcares foram extraídos da farinha, em três etapas sucessivas de tratamento com etanol 80%, a 100 °C, por 5 min. Após cada extração, a mistura foi centrifugada em centrífuga tipo Eppendorf 5415C por 10 min a 14.000 rpm. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 45 °C, e os açúcares ressuspensos em 1,2 mL de etanol 80%. A solução contendo os açúcares foi novamente submetida à centrifugação por 10 min, filtrada em filtro Millipore de 0,45 micra de diâmetro e o filtrado obtido foi armazenado em freezer a -20 °C para posterior análise por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### **3.10- Hidrólise de RO no melão e extração dos açúcares solúveis**

Os produtos, melão leve e pesado, foram diluídos em água na proporção de 1:5 (p/v), homogeneizados em agitador magnético por 10 min.

Porções de aproximadamente 5 g de melaço diluído foram transferidas para Erlenmeyers de 25 mL em triplicata. Foi adicionada, em cada Erlenmeyer, uma quantidade de enzima correspondente a 40 U da enzima semi-purificada para cada grama de melaço leve e pesado contido nas amostras. Os Erlenmeyers foram, então, incubados por 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 RO presentes no melaço, alíquotas do material submetido à hidrólise (1,5 mL), foram resfriadas, transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas em centrífuga tipo Eppendorf 5415C por 20 min a 14.000 rpm. Ao sobrenadante (100 µL) foram adicionados 800 µL de etanol e 100 µL de água deionizada, de forma a se obter uma solução 80% de etanol. Esta solução contendo os açúcares solúveis foi armazenada em freezer a -20 °C. Após 24 h, a solução contendo os açúcares foi novamente submetida a centrifugação nas mesmas condições já descritas, filtrada em filtro Millipore de 0,45 micra de diâmetro e o filtrado obtido foi armazenado em freezer a -20 °C para posterior análise por CLAE.

A eficiência da hidrólise foi avaliada pela redução dos níveis dos RO presentes no melaço (leve e pesado), em função do tempo de incubação com a enzima.

### **3.11- Determinação dos açúcares solúveis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

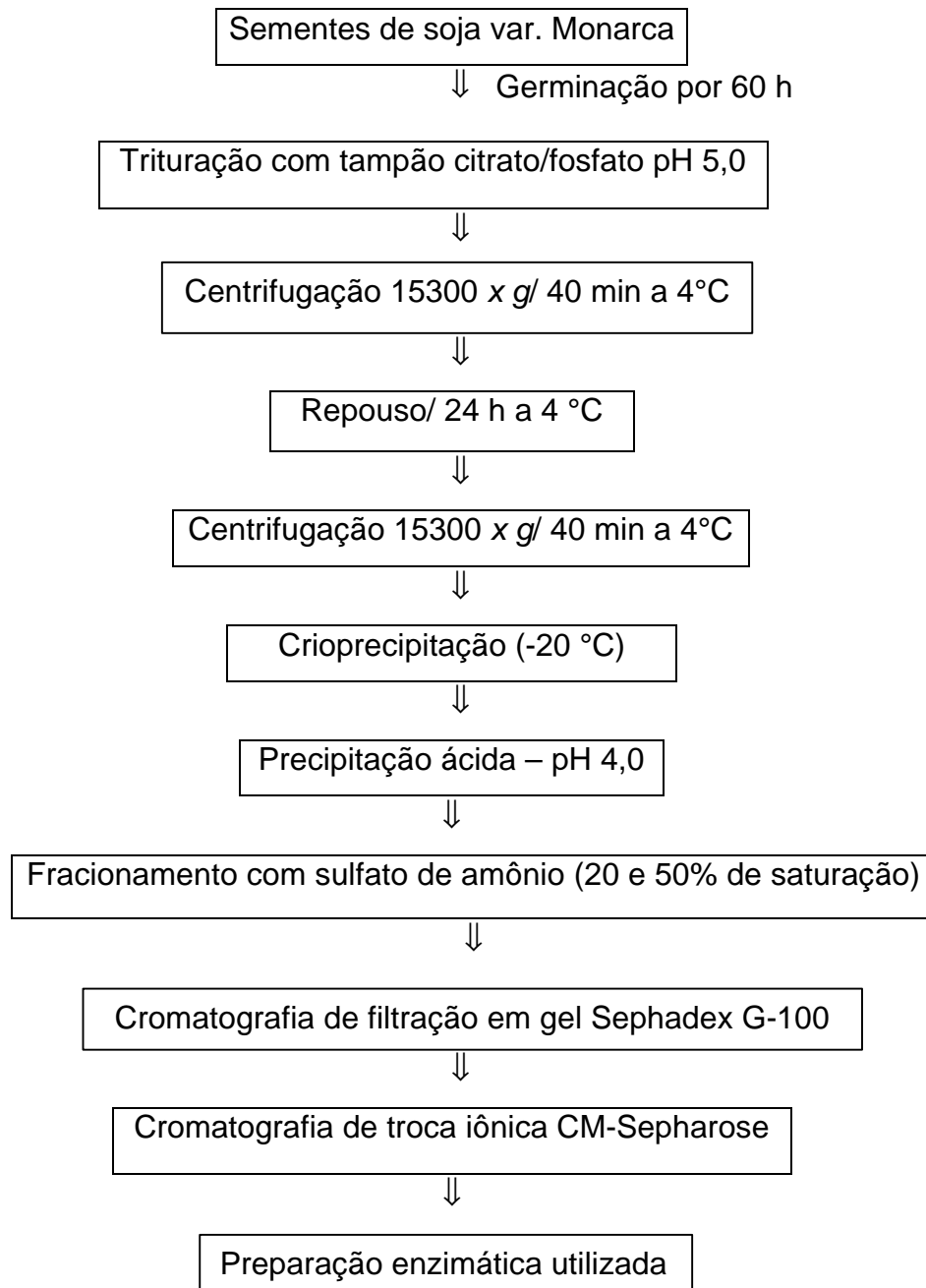
Os RO extraídos do extrato de soja desengordurado e do melaço de soja, tratados e não tratados enzimaticamente com a  $\alpha$ -galactosidase, foram analisados por CLAE em cromatógrafo Shimadizu série 10A, equipado com detector de índice de refração e coluna em aço inox (25 x 0,465 cm) contendo como fase estacionária o grupo aminopropil (-NH<sub>2</sub>). Como fase móvel, foi utilizada mistura de acetonitrila:água (80:20) em condições isocráticas. As análises foram realizadas a 40 °C, sob fluxo de 0,9 mL/min. Todo o processo foi controlado por microcomputador acoplado ao sistema.

Para determinação quantitativa dos açúcares solúveis presentes no extrato de soja desengordurado e no melaço, inicialmente foi feita a

padronização do método. A partir de uma solução estoque formada pela mistura dos açúcares frutose, sacarose, rafinose e estaquiose nas concentrações de 4, 4, 8, 8 % (p/v), respectivamente, foram feitas diluições para obtenção das soluções padrão. Cada solução padrão foi injetada no cromatógrafo líquido para obtenção das curvas, correlacionando área do pico com a concentração do açúcar na solução. As retas foram obtidas por regressão linear. Um volume de 20  $\mu$ L de cada amostra foi injetado no cromatógrafo e cada açúcar presente foi automaticamente identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenção e concentração dos açúcares nas soluções padrão. Todos os cálculos foram feitos por meio de um microcomputador acoplado ao sistema de CLAE, equipado com o programa de computador LC-10 versão 2.2. para Windows.

### 3.12- Purificação das $\alpha$ -Galactosidases

A  $\alpha$ -galactosidase de sementes germinadas de soja var. Monarca foi parcialmente purificada de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 7.



**Figura 7** – Esquema das etapas de purificação.

### **3.12-1. Preparo da amostra enzimática**

O preparo do extrato enzimático foi feito segundo GUIMARÃES (2001). Amostras de cerca de 250-300 g de sementes de soja, variedade Monarca, foram colocadas em germinador por 60 horas a 27 °C. Após esse período, foram retiradas e congeladas a -20 °C. Amostras de sementes germinadas (800-950 g) foram trituradas em liquidificador com 1700-2000 mL de tampão contendo 0,1M de ácido cítrico e 0,05 M de fosfato de sódio, pH 5,0. O extrato foi incubado sob agitação por 1 h, a 4 °C. A suspensão foi, então, filtrada e centrifugada a 15.300 g por 40 min a 4 °C.

### **3.12-2. Crioprecipitação e precipitação ácida**

O sobrenadante obtido de acordo com o item anterior foi submetido ao processo de crioprecipitação, que consistiu na manutenção do extrato por 24 h em temperatura de -20 °C. Após esse período, o extrato foi descongelado e centrifugado como descrito no item 3.12.1.

O sobrenadante foi, então, submetido a uma precipitação ácida com a adição de ácido cítrico até que o pH do meio fosse reduzido para 4,0. Após agitação por 30 min, o extrato foi novamente centrifugado sob as mesmas condições descritas acima.

### **3.12-3. Fracionamento do sobrenadante com sulfato de amônio**

O sobrenadante obtido após a precipitação ácida foi submetido a um fracionamento por duas precipitações sucessivas com sulfato de amônio. No extrato enzimático foi adicionado lentamente e sob agitação, a 4 °C, sulfato de amônio, correspondendo a 20% de saturação. A amostra foi centrifugada a 15.300 g por 40 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até uma saturação de 50%. A amostra foi centrifugada como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 25 mL de tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0. Após cada etapa de purificação, foram realizadas determinações do teor

de proteína, segundo LOWRY et al. (1951), e da atividade de  $\alpha$ -galactosidase, como descrito no item 3.6.1.

#### **3.12-4. Cromatografia de filtração em gel**

A amostra obtida no item 3.12.3 foi submetida a cromatografia de filtração em gel em uma coluna (95 x 2,5 cm) de Sephadex G-100 equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, a 4 °C com fluxo contínuo de 20 mL/h, e coletadas frações de 3,5 mL. As frações com atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram reunidas.

#### **3.12-5. Cromatografia de troca iônica**

A amostra proveniente do item 3.12.4 foi submetida à cromatografia de troca iônica, catiônica, em uma coluna (14 x 2,9 cm) de CM-Sepharose Fast Flow (Pharmacia), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. As proteínas foram eluídas com 100 mL desse tampão, seguido por um gradiente crescente formado por 200 mL de tampão acetato de sódio e 200 mL do mesmo tampão contendo 0,8 M de NaCl, a 4 °C, com fluxo de 40 mL/h. Frações de 3,5 mL foram coletadas. As frações eluídas apresentando atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram reunidas e concentradas por ultrafiltração, utilizando-se uma membrana de 30 kDa.

### **3.13- Caracterização da $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes de soja germinadas da variedade Monarca**

#### **3.13-1. Efeito do pH**

Para determinação do pH ótimo da atividade de  $\alpha$ -galactosidase, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.6.1, exceto que o ensaio foi realizado com valores de pH, utilizando tampão McIlvaine (McILVAINE, 1921).

### **3.13-2. Efeito da temperatura**

As condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.6.1, exceto no ensaio que foi conduzido em várias temperaturas compreendidas entre 3 °C a 65 °C. A solução tampão usada nesses ensaios foi de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0.

### **3.13-3. Ensaio de termoestabilidade**

A estabilidade térmica da enzima  $\alpha$ -galactosidase foi testada em várias temperaturas. Alíquotas da enzima semi-purificada, juntamente com a solução tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, foram pré-incubadas nas temperaturas 40, 45 e 50 °C, por 0, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480 e 600 min. Após cada tempo de pré-incubação, o substrato foi adicionado e o ensaio para atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi conduzido a 40 °C, como descrito no item 3.6.1.

### **3.13-4. Meia-vida da $\alpha$ -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 20  $\mu$ L de enzima semi-purificada (0,005 mg de proteína), 730  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Essa mistura foi pré-incubada nas temperaturas 40, 45 e 50 °C por 0, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 600 e 720 min. Após cada intervalo de tempo, aos tubos de ensaios foram acrescentados 250  $\mu$ L de solução 2 mM de pNPGal. Os tubos permaneceram incubados por mais 15 min, a 40 °C, e a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de solução 0,5 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A absorbância das amostras foram determinadas a 410 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em velocidade utilizando a curva padrão descrita no item 3.6.1.

### **3.13-5. Determinação dos parâmetros cinéticos constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ap) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ap) aparentes**

Para obtenção dos valores de  $K_M$  ap e  $V_{max}$  ap, os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando-se várias concentrações dos substratos. Para a determinação desses parâmetros para a  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada, foram utilizados os substrato pNPGal, rafinose e melibiose. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos como descrito no item 3.6, utilizando as concentrações 0,0105, 0,0125, 0,02075, 0,025, 0,0375, 0,05, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,375, 0,5, 0,625 e 0,75 mM de pNPGal. A atividade de  $\alpha$ -galactosidase contra o substrato rafinose nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,332, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,6, 2,4, 3,2, 4,0, 5,6, 7,2, 8,0, 10,0 e 12,0 mM foi medida pela formação de açúcar redutor com o uso do reagente dinitrossalicilato (MILLER, 1956), como descrito no item 3.6.2. Com o substrato melibiose, foram utilizadas as concentrações de 0,05, 0,083, 0,1, 0,15, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 15,0, 20,0, e 30,0 mM, sendo a atividade de  $\alpha$ -galactosidase determinada pela formação de glicose livre utilizando o método da glicose oxidase (STERNBERG et al., 1970), como descrito no item 3.6.3. Os valores de  $K_M$  ap e  $V_{max}$  ap foram calculados por meio da curva de velocidade, em função da concentração de substrato, curva de Michaelis-Menten e pelo duplo recíproco, gráfico de Lineweaver-Burk, utilizando o inverso da velocidade contra o inverso da concentração do substrato (LINEWEAVER e BURK, 1934). Os cálculos foram feitos em computador utilizando o programa Curve Expert, versão 1.3 para Windows (HYAMS, 1997).

### **3.13-6. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da $\alpha$ -galactosidase**

O efeito de íons, açúcares e agentes redutores na atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada foi testado utilizando o seguinte ensaio: 20  $\mu$ L de enzima semi-purificada (0,005 mg de proteína), 100  $\mu$ L de soluções 10 mM dos compostos lactose, maltose, melibiose, rafinose, manose, D-galactose, D-

glicose, estaquiose, sacarose,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ , EDTA, SDS, 2-mercaptoetanol, iodoacetamida e 630  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A mistura foi incubada por 10 min, a 40 °C, e, após esse período, foram acrescentados 250  $\mu\text{L}$  de solução 2mM de pNPGal e o ensaio para a atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi conduzido como descrito no item 3.6.1.

### **3.14- Determinação da concentração de proteína**

Nas preparações enzimáticas obtidas, os teores protéicos foram determinados de acordo com o método descrito por LOWRY et al. (1951), utilizando o reagente de Fenol Folin-Ciocalteu's. Foram preparadas as seguintes soluções: Reagente 1 (0,25 g de  $\text{CuSO}_4$ , 25 g de citrato de sódio, 0,5 g de tartarato de sódio e potássio em 50 mL de água), Reagente 2 (1,6 g de  $\text{NaOH}$  em 50 mL de água), Reagente 3 (5 g de SDS em 50 mL de água). Os Reagente A (partes iguais dos reagentes 1, 2, 3 e água) e Reagente B (1 mL de Fenol Folin-Ciocalteu's em 5 mL de água) foram preparados alguns minutos antes da sua utilização no ensaio. Em 10  $\mu\text{L}$  de amostra foram adicionados 990  $\mu\text{L}$  de água, 1 mL do reagente A, misturados e deixados em repouso por 10 min. Posteriormente, 0,5 mL do reagente B foi adicionado e agitado no vórtex e deixado em repouso por 30 min. A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 750 nm, utilizando uma curva padrão construída com 0-200  $\mu\text{g}$  de albumina sérica bovina.

### **3.15- Dosagem do açúcar redutor**

A dosagem do açúcar redutor foi realizada utilizando-se a amostra contendo o açúcar redutor. À amostra foi adicionado 1 mL do reagente de DNS. A mistura foi submetida à fervura por 5 min (MILLER, 1956). A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. A curva padrão foi construída utilizando 0 a 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de glicose 0,25 mg/mL. O reagente de DNS foi preparado da seguinte forma: em um Becker de 1000 mL, foram colocados 10 g de ácido dinitrossalissílico e 200 mL de água deionizada. A mistura foi submetida a agitação para promover a dissolução do ácido. Em seguida foi acrescentada à mistura, 300 mL de solução  $\text{NaOH}$  2N,

sendo mantida a agitação e submetida a aquecimento. A esta solução, foram adicionados, lentamente, 300 g de tartarato de sódio e potássio, sendo a mesma mantida sob agitação e aquecimento por 30 min após a adição deste sal. Após o preparo, o volume final da solução foi completado para 1000 mL.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Atividade de $\alpha$ -galactosidase de soja durante a germinação

De acordo com os dados apresentados no Quadro 2, observa-se que a maior atividade específica de  $\alpha$ -galactosidase de sementes de soja var. Monarca, foi obtida com 84 h após a embebição, seguida pelos tempos de 60 e 72 h, nos quais os valores de atividade específica foram os mesmos.

Pode-se observar que os valores foram bem próximos entre si nos tempos de 60, 72, 84 e 96 h após a embebição. Portanto, devido à praticidade e facilidade em manusear as sementes, visto que sementes embebidas por mais de 60 h apresentavam difícil trituração, sementes de soja var. Monarca embebidas por 60 h, foram utilizadas para produção do extrato para posterior purificação e caracterização da  $\alpha$ -galactosidase.

**Quadro 2** – Matéria seca, teor de proteína e atividade de  $\alpha$ -galactosidase de sementes de soja var. Monarca após vários tempos de embebição.

Tempo de embebição (h)	Matéria seca (mg)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg ptn)	Atividade/matéria seca (U/mg ms*)
0	583,80	1,66	0,11	0,066	0,001
12	537,60	1,72	0,10	0,058	0,001
24	532,70	1,76	0,10	0,057	0,001
36	531,60	1,48	0,11	0,074	0,002
48	573,90	1,52	0,15	0,097	0,002
60	568,30	1,11	0,15	0,135	0,002
72	572,40	1,11	0,15	0,135	0,002
84	640,20	1,12	0,17	0,152	0,002
96	591,30	1,21	0,16	0,132	0,002

\*ms = Matéria seca.

1U = quantidade de proteína necessária para produzir um  $\mu$ mol de pNP por minuto nas condições de ensaio.

Kasai, citado por BAU et al. (2000) detectou maior atividade de  $\alpha$ -galactosidase após 3 dias de germinação. GUIMARÃES (2001) descreveu maior atividade de  $\alpha$ -galactosidase em sementes de soja var. Doko entre 48 e 60 h de germinação. Os dados aqui obtidos, estão também de acordo com os resultados de VIANA (2002), que encontrou pico de atividade da enzima nas sementes de soja var. CAC-1 entre 60-84 h de germinação.

#### **4.2- Purificação da $\alpha$ -galactosidase de sementes de soja var. Monarca germinadas**

As etapas de purificação da  $\alpha$ -galactosidase de sementes de soja germinadas var. Monarca germinadas por 60 h, são apresentadas no Quadro 3.

**Quadro 3** – Resumo do processo de purificação da  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca.

Etapas de purificação	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação* (X)	Rendimento (%)
Extrato bruto	600	13300,80	366,00	0,027	1,00	100,00
Crioprecipitação	598	9036,71	312,59	0,034	1,25	85,41
Precipitação ácida	570	5018,22	295,34	0,059	2,14	80,69
Fracionamento com sulfato de amônio (20%)	550	2249,79	277,59	0,139	5,05	75,84
Fracionamento com sulfato de amônio (50%)	25	990,00	170,32	0,172	6,25	46,53
Sephadex G-100	299	516,94	155,59	0,301	10,94	42,51
CM-Sepharose	132	246,84	134,11	0,543	19,74	36,64

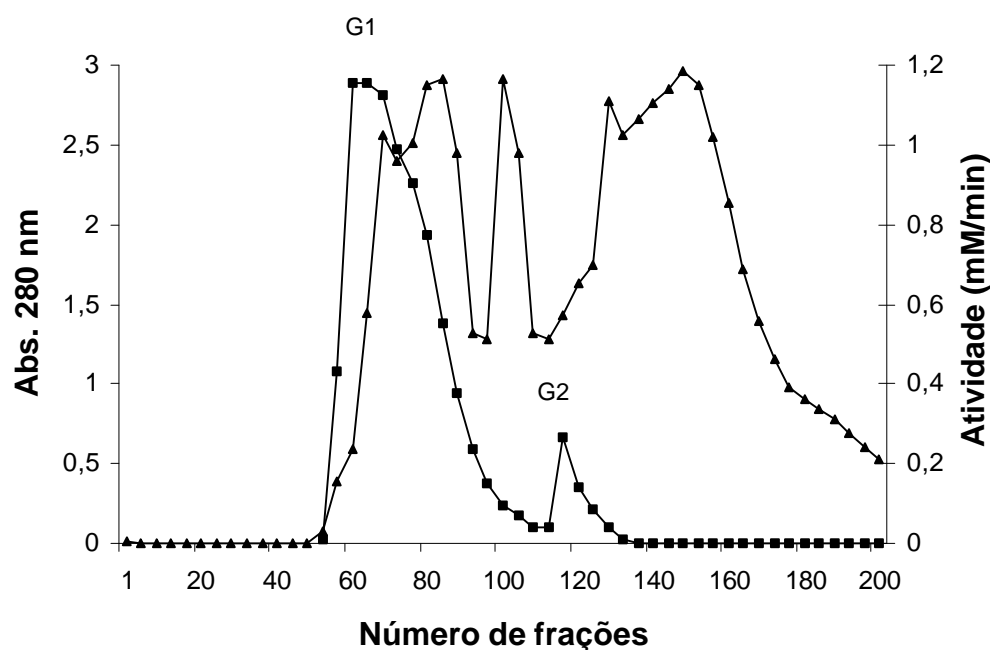
1U = quantidade de proteína necessária para produzir um  $\mu$ mol de p-NP por minuto nas condições de ensaio.

\* = atividade específica em relação ao extrato bruto.

A precipitação com ácido cítrico duplicou a atividade específica da enzima no extrato bruto com uma pequena redução na atividade enzimática total. O fracionamento com sulfato de amônio (20%-50%) promoveu um aumento da atividade específica em cerca de 6 vezes.

Processo semelhante foi utilizado por ALANI et al. (1989) na purificação de  $\alpha$ -galactosidase de *Vigna unguiculata*, que obtiveram um aumento de cerca de 3 vezes na atividade específica com a etapa de precipitação com ácido cítrico, porém, um menor aumento na atividade específica após a etapa de fracionamento com sulfato de amônio (25%-55%), 3,75 vezes. Resultados semelhantes também foram obtidos por VIANA (2002), que alcançou fatores de purificação de 1,83 e 7,66, respectivamente, com a precipitação com ácido cítrico e o fracionamento com sulfato de amônio (20%-50%).

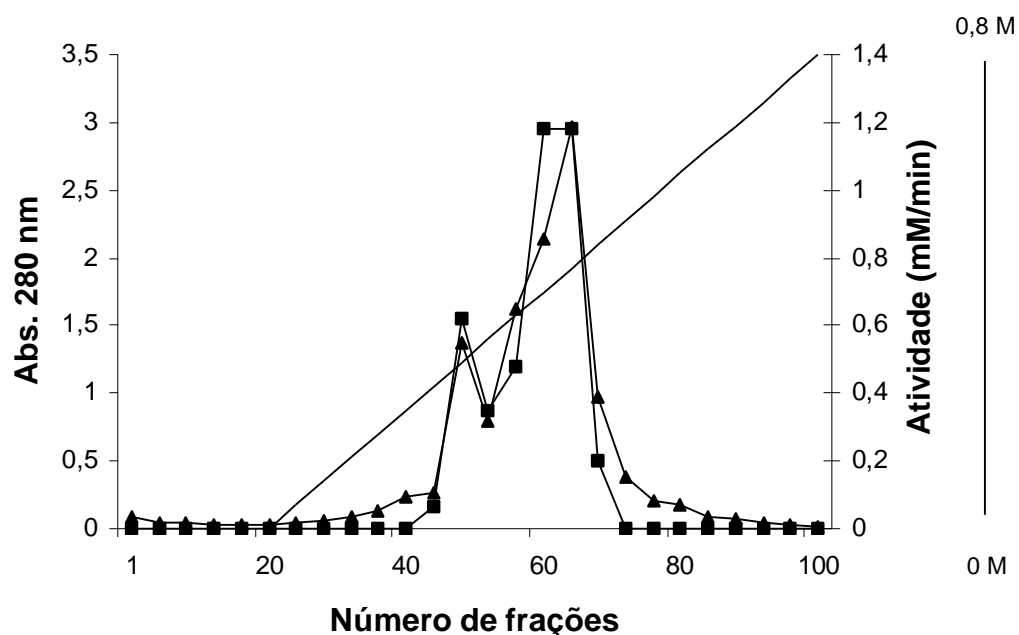
Após a precipitação com sulfato de amônio, o precipitado foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0, e submetido à cromatografia de filtração em gel, utilizando uma coluna de Sephadex G-100. O perfil cromatográfico desta amostra está apresentado na Figura 8.



**Figura 8** – Perfil da cromatografia de filtração em gel Sephadex G-100, da amostra de  $\alpha$ -galactosidase proveniente do fracionamento com sulfato de amônio (20%-50%). Atividade de  $\alpha$ -galactosidase (■); absorbância a 280 nm (▲).

O perfil de eluição da cromatografia de filtração em gel revelou a presença de dois picos protéicos com atividade de  $\alpha$ -galactosidase. As frações com atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram reunidas, concentradas, e denominadas G1 e G2. A fração G1 foi posteriormente submetida à cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna de CM-Sepharose (Figura 9).

Dois picos protéicos também com atividade de  $\alpha$ -galactosidase foram obtidos por ALANI et al. (1989), utilizando coluna de Sephadex G-100 na purificação de  $\alpha$ -galactosidase de *Vigna unguiculata*. O autor relatou que esta etapa da purificação aumentou consideravelmente a atividade específica da enzima no extrato enzimático. No presente trabalho, o fator de purificação passou de, aproximadamente, 6 vezes para 11 vezes.



**Figura 9** – Perfil da cromatografia de troca iônica CM-Sepharose, da amostra de  $\alpha$ -galactosidase fração G1 proveniente do eluato de Sephadex G-100. Atividade de  $\alpha$ -galactosidase (■); absorbância a 280 nm (▲); gradiente de cloreto de sódio de 0 a 0,8 M (—).

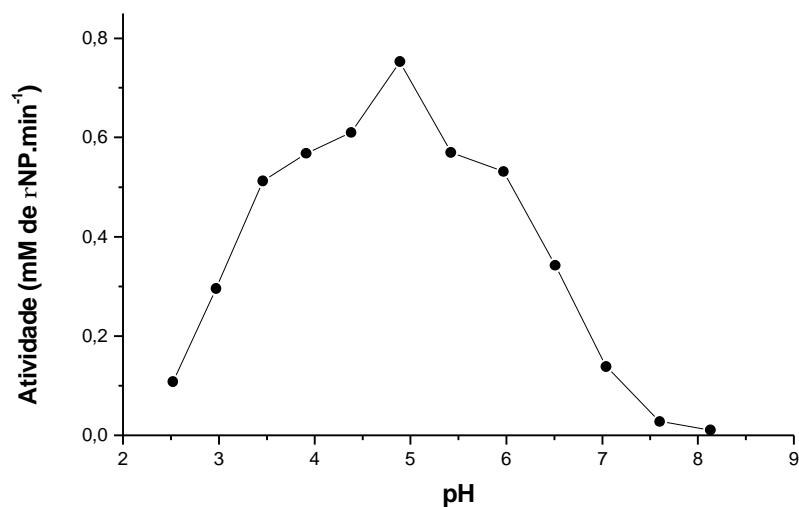
O perfil da eluição da cromatografia em coluna de troca iônica da fração G1 revelou a presença de dois picos protéicos com atividade enzimática de  $\alpha$ -galactosidase. Esses picos protéicos foram reunidos em uma única fração, concentrados por ultrafiltração e armazenados em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A cromatografia em coluna de troca iônica tem sido utilizada por vários autores em protocolos de purificação total ou parcial de  $\alpha$ -galactosidases de diversas fontes. O método permite a separação de frações protéicas e também promove aumento satisfatório na atividade específica da enzima contida nas amostras submetidas a este tipo de cromatografia (ALANI et al., 1989; GUIMARÃES et al, 2001; ADEMARK et al.; 2001).

### **4.3- Caracterização da $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca**

#### ***4.3.1- Efeito do pH***

A atividade de  $\alpha$ -galactosidase foi testada na faixa de pH compreendida entre 2,5 e 8,0, na temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando a preparação enzimática proveniente da cromatografia de troca iônica, como fonte da enzima  $\alpha$ -galactosidase e o pNPGal como substrato (Figura 10). As maiores atividades foram encontradas na faixa de pH de 3,5-6,0; com atividade máxima em pH 5,0.

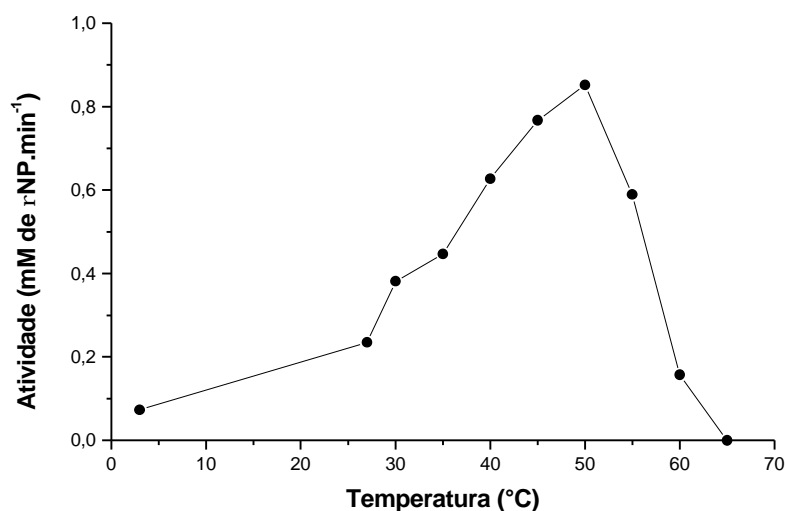


**Figura 10** – Efeito da variação do pH na atividade da enzima  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca.

KANG e LEE (2001), estudando a atividade de glicosidases da polpa de *Vitis venifera* L. Muscat da Alexandria, observaram que das várias glicosidases ensaiadas, a  $\alpha$ -galactosidase foi a mais ativa, seguida pela  $\alpha$ -manosidase, nos ensaios conduzidos em pH 5,0 ou 7,0. O mesmo resultado foi obtido quando outros cultivares de uva foram avaliados em pH 7,0. ADEMARK et al. (2001) demonstraram máxima atividade em pH 4,5 para quatro formas de  $\alpha$ -galactosidase purificadas a partir do fungo *Aspergillus niger* ATCC 46890 cultivado em meio contendo galactomanana de sementes de *Ceratonia siliqua* ou galactomanana de goma guar. PUCHART et al. (2000) observaram, em relação à  $\alpha$ -galactosidase purificada a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749, maior atividade enzimática na faixa de pH compreendida entre 4,5 e 5,0. Resultados semelhantes ao descrito neste trabalho foram encontrados por VIANA (2002) estudando  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja var. CAC-1.

### 4.3.2- Temperatura ótima

Quando a atividade da  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada foi ensaiada na faixa de temperatura entre 3 e 65 °C e pH 5,0, utilizando-se pNPGal como substrato, observaram-se maiores atividades na faixa de temperatura de 40 a 55 °C. A temperatura na qual foi observada maior atividade enzimática foi a de 50 °C (Figura 11).



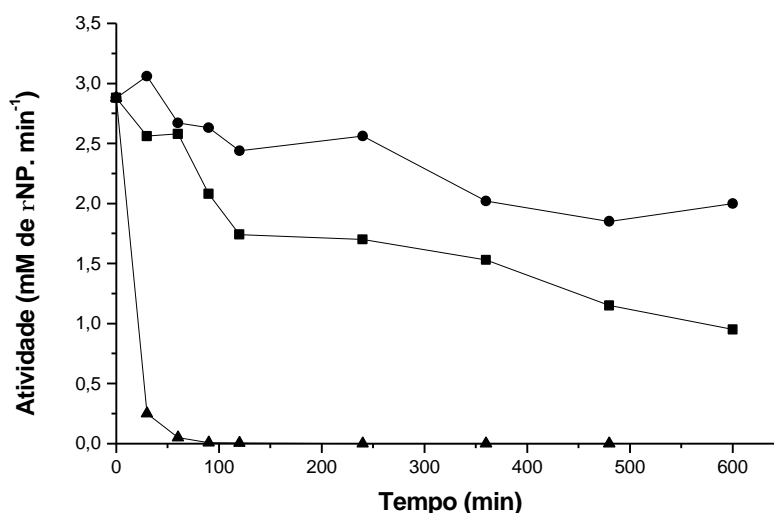
**Figura 11** – Efeito da temperatura na atividade da  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca.

ADEMARK et al. (2001) mostraram, para quatro formas de  $\alpha$ -galactosidase de *Aspergillus niger* ATCC 46890, atividade máxima a 60 °C e pH 4,5. PUCHART et al. (2000) observaram atividade máxima na faixa de temperatura compreendida entre 65 e 70 °C para  $\alpha$ -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749. GUIMARÃES et al. (2001) encontraram temperatura ótima na faixa de 45 a 50 °C para atividade de  $\alpha$ -galactosidase purificada a partir de sementes germinadas de soja var. Doko. VIANA (2002) encontrou resultados semelhantes aos citados aqui, trabalhando com  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja var. CAC-1.

### 4.3.3- Termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, amostras da enzima semi-purificada foram pré-incubadas nas temperaturas 40, 45 e 50 °C por tempos que variaram entre 0 e 10 h.

A  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada manteve cerca de 90% e 70% de sua atividade original, quando incubada a 40 °C por 4 e 10 h, respectivamente. Na temperatura de 45 °C a enzima manteve 60% de sua atividade inicial após 4 h de incubação e 33% após 10 h. A  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada perdeu 91% de sua atividade inicial após 30 min de incubação a 50 °C (Figura 12).



**Figura 12** – Efeito da temperatura e do tempo de pré-incubação na estabilidade da  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas por vários tempos nas temperaturas de 40 °C (●), 45 °C (■) e 50 °C (▲). Após a pré-incubação os ensaios com o substrato pNPGal foram realizados a 40 °C.

VIANA (2002), trabalhando com  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja var. CAC-1 observou que a enzima mantinha sua atividade inicial após incubação por 180 min a 35 °C e 40 °C. ADEMARK et al. (2001) observaram para quatro formas de  $\alpha$ -galactosidase purificadas de

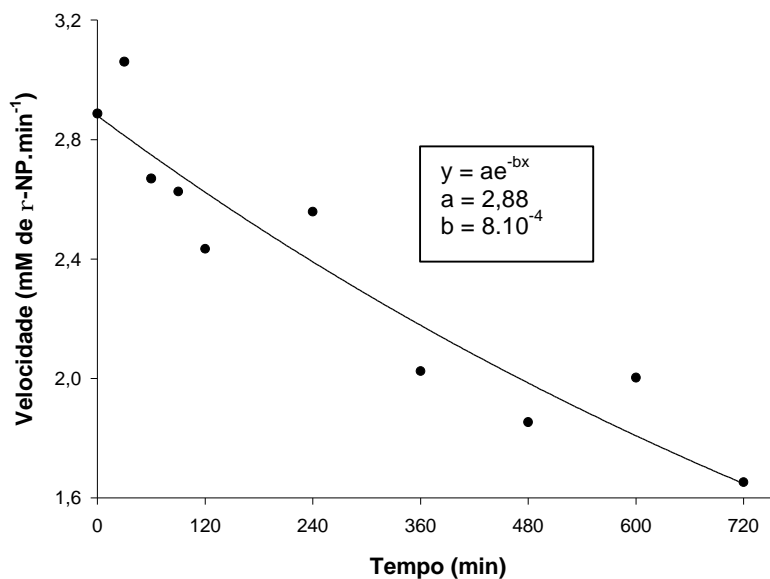
*Aspergillus niger* ATCC 46890, retenção de cerca de 95% da atividade original após 21 horas de incubação a 40 °C. PUCHART et al. (2000) relataram, em relação à  $\alpha$ -galactosidase do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* IMI 158740, completa estabilidade enzimática após 6 horas de incubação a 60 °C e pH 4,5.

Dependendo de sua origem,  $\alpha$ -galactosidases exibem diferentes padrões de termoestabilidade (DEY e PRIDHAM, 1972). De um modo geral, pode-se observar que as  $\alpha$ -galactosidases fúngicas são mais termoestáveis que as  $\alpha$ -galactosidases de plantas.

#### **4.3.4- Meia-vida da $\alpha$ -galactosidase**

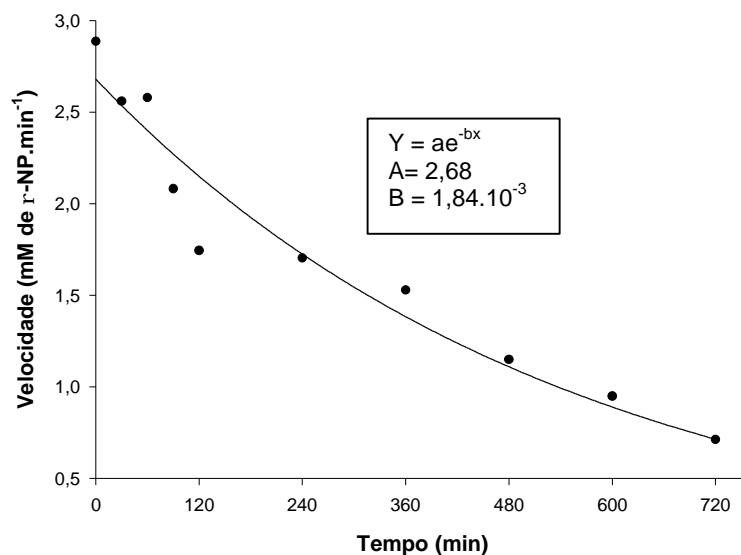
Os valores de meia-vida da  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada nas temperaturas de 40, 45 e 50 °C, foram calculados por regressão não-linear, por meio de uma curva de velocidade de reação versus o tempo de pré-incubação. Esses parâmetros foram calculados utilizando o programa Sigma Plot, versão 7.0 para Windows.

Os ensaios para determinação do tempo de meia vida nas diferentes temperaturas foram conduzidos por um tempo total de 12 h. Na temperatura de 40 °C, o tempo estimado de meia vida da enzima foi 14 h e 24 min (Figura 13). Na temperatura de 45 °C, a meia vida da enzima foi 5 h e 36 min (Figura 14) e a 50 °C, a meia vida foi 8 min e 36 s (Figura 15).

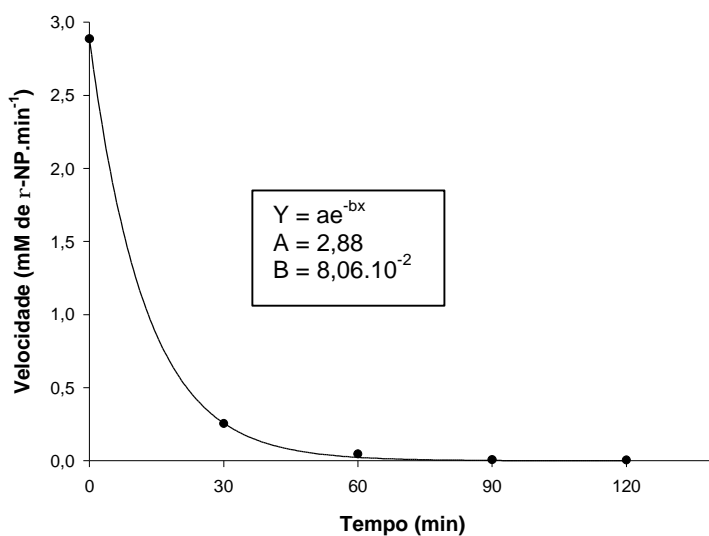


**Figura 13** – Determinação da meia vida a 40 °C, da  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca. Cada ponto representa a média de três repetições. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10 %.

DUFFAUD et al (1997) determinaram a meia vida da  $\alpha$ -galactosidase purificada a partir da eubactéria hipertermofílica *Thermotoga neapolitana* 5068, em 8 h e 30 min (85 °C), em 2 h e 19 min (90 °C) e em 3 min (100 °C). O tempo de meia vida determinado para a  $\alpha$ -galactosidase purificada a partir da bactéria termofílica *Bacillus stearothermophilus* NUB3621 foi inferior a 10 min a 80 °C, 3 h e 30 min a 75 °C e 19 horas a 70 °C. VIANA (2002) encontrou tempo de meia vida de 5 h e 37 min a 45 °C e 30 min e 15 s a 50 °C para  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja var. CAC-1.



**Figura 14** – Determinação da meia vida a 45 °C, da  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca. Cada ponto representa a média de três repetições. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10%.

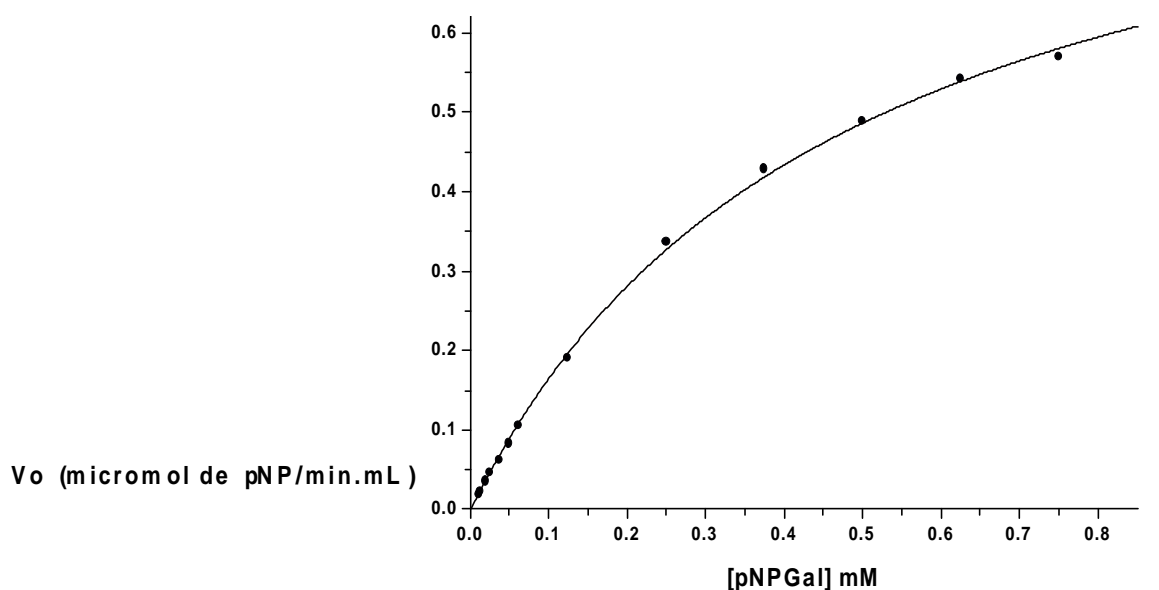


**Figura 15** – Determinação da meia vida a 50 °C, da  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca. Cada ponto representa a média de três repetições. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10%.

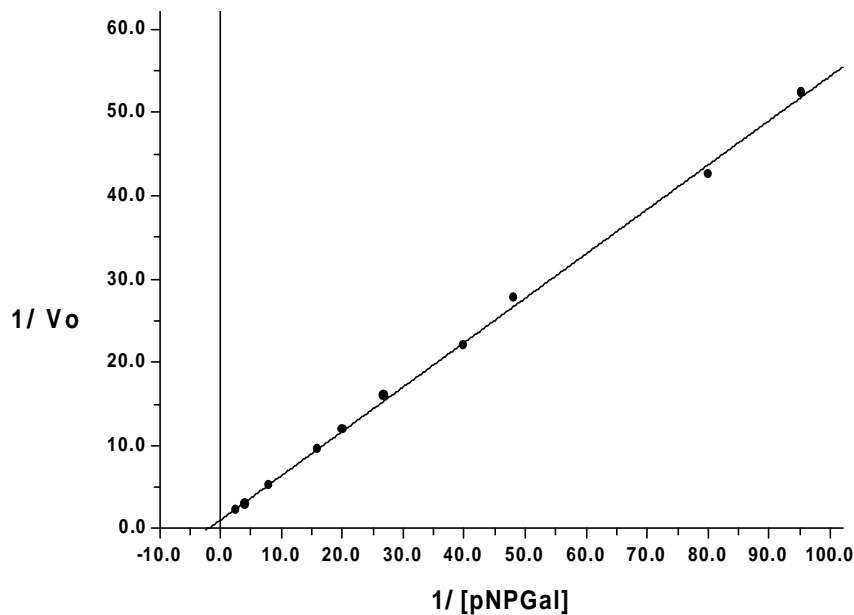
#### 4.3.5- Constante de Michaelis-Menten ( $K_{M\ ap}$ ) e velocidade máxima ( $V_{max\ ap}$ )

O efeito da concentração dos substratos pNPGal, melibiose e rafinose na velocidade de reação catalisada pela enzima  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes de soja germinadas var. Monarca foi determinado utilizando-se a curva de Michaelis-Menten e o duplo recíproco de Lineweaver-Burk.

Para o substrato pNPGal, os valores de  $K_{M\ ap}$  e  $V_{max\ ap}$  determinados por regressão não-linear pela curva de Michaelis-Menten foram de 0,47 mM e 0,94 mM de pNP.min<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 16). Quando determinado pelo duplo-recíproco, os valores obtidos foram de 0,47 mM e 0,89 mM de pNP.min<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 17).



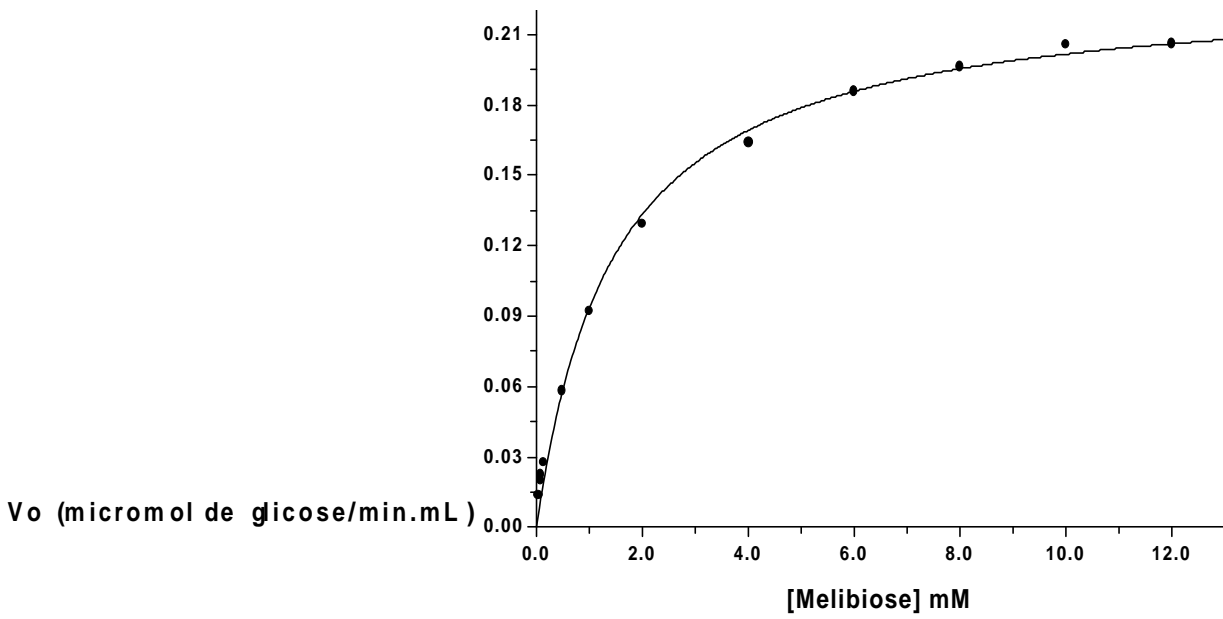
**Figura 16** – Efeito da concentração do substrato pNPGal, na velocidade da reação catalisada pela  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca.



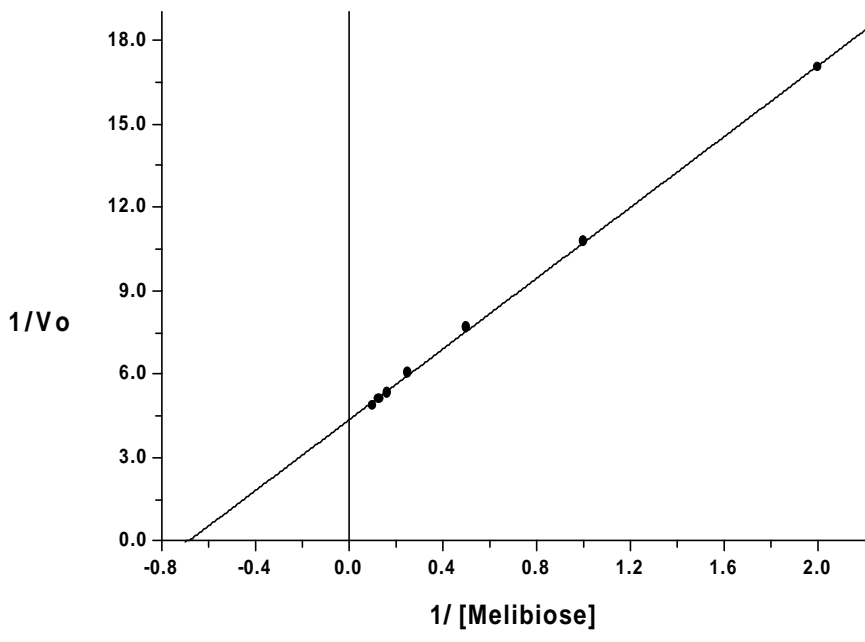
**Figura 17** – Determinação da  $K_{M\ ap}$  e  $V_{max\ ap}$  para a hidrólise do pNPGal pela  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca pelo método do duplo-recíproco. Os valores do inverso da velocidade e da concentração do substrato foram calculados a partir dos dados da Figura 16.

SHIVANNA, et al. (1990), DUFFAUD et al. (1997) e PUCHART et al. (2000), trabalhando, respectivamente, com  $\alpha$ -galactosidase- $C_2$  de sementes germinadas de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*),  $\alpha$ -galactosidase de *Thermotoga neapolitana* 5068 e  $\alpha$ -galactosidase purificada a partir de cultura do fungo *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749, encontraram valores de  $K_M$  para o substrato sintético pNPGal, similares ao encontrado neste estudo.

Para o substrato melibiose, os valores de  $K_{M\ ap}$  e  $V_{max\ ap}$  determinados por regressão não linear pela curva de Michaelis-Menten e pelo duplo recíproco de Lineweaver-Burk foram, respectivamente, 1,47 mM e 0,23 mM de glicose formada.min<sup>-1</sup> (Figura 18) e 1,46 mM e 0,23 mM de glicose formada.min<sup>-1</sup> (Figura 19).



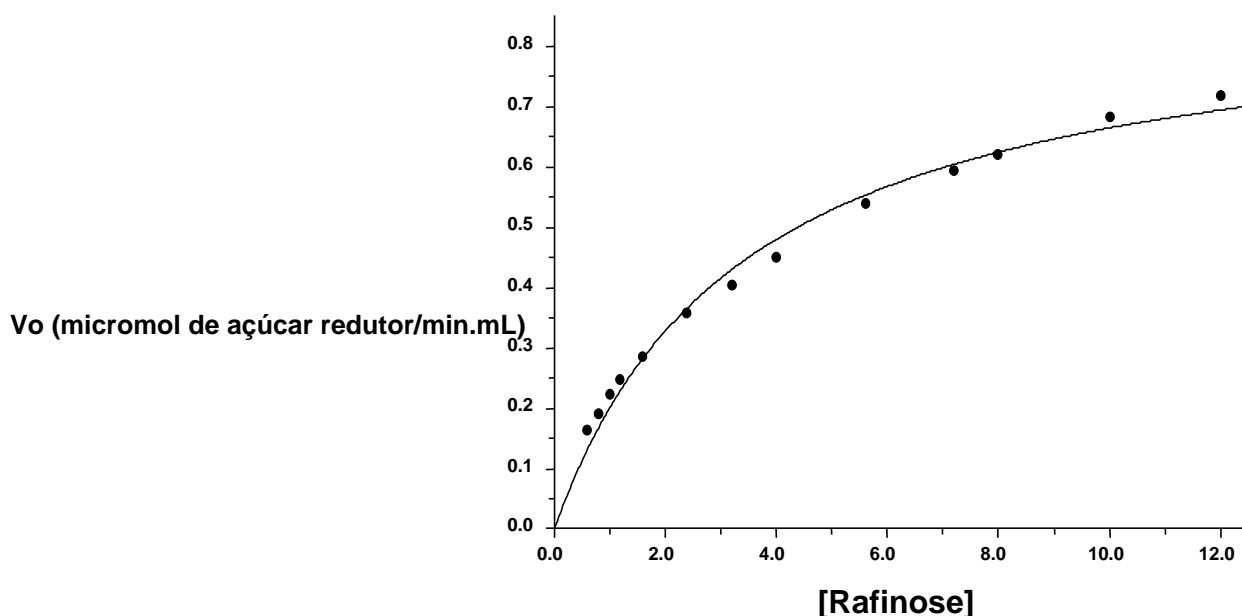
**Figura 18** – Efeito da concentração do substrato melibiose na velocidade da reação catalisada pela  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca.



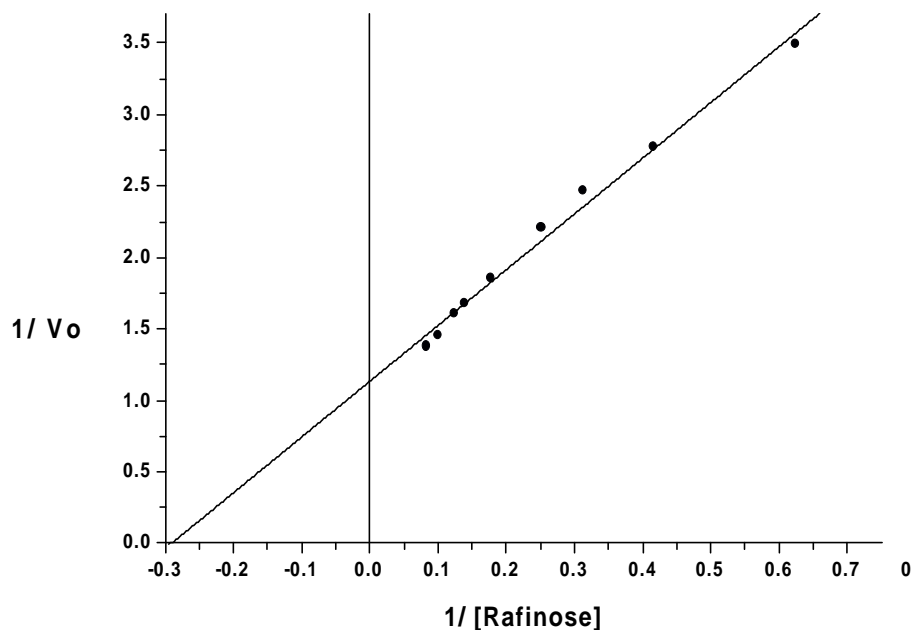
**Figura 19** – Determinação da  $K_{M\ ap}$  e  $V_{max\ ap}$  para a hidrólise da melibiose pela  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca pelo método do duplo recíproco. Os valores do inverso da velocidade e da concentração do substrato foram calculados a partir dos dados da Figura 18.

ADEMARK et al. (2001) encontraram valor de  $K_M$  igual a 1,0 mM de melibiose para a forma  $\alpha$ -gal I, purificada a partir de cultura de *Aspergillus niger* ATCC 46890, crescido em meio contendo galactomanana de *Ceratonia siliqua* ou galactomanana de goma guar. GUIMARÃES (2001) encontrou valor de  $K_M$  para o substrato melibiose de 5,34 mM, trabalhando com  $\alpha$ -galactosidase purificada a partir de sementes germinadas de soja var. Doko.

Para o substrato rafinose, os valores de  $K_{M\text{ ap}}$  e  $V_{\text{max ap}}$  determinados, respectivamente, por regressão não linear pela curva de Michaelis-Menten e pelo duplo recíproco de Lineweaver-Burk foram de 3,44 mM e 0,89 mM de açúcar redutor formado.min<sup>-1</sup> (Figura 20) e 3,43 mM e 0,88 mM de açúcar redutor formado.min<sup>-1</sup> (Figura 21).



**Figura 20** – Efeito da concentração do substrato rafinose na velocidade da reação catalisada pela  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca.



**Figura 21** – Determinação da  $K_M$  ap e  $V_{max}$  ap para a hidrólise da rafinose pela  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca pelo duplo-recíproco. Os valores do inverso da velocidade e da concentração do substrato foram calculados a partir dos dados da Figura 20.

SHIVANNA et al. (1990) encontraram, para  $\alpha$ -galactosidase- $C_2$  purificada a partir de sementes germinadas de guar, valor de  $K_M$  igual a 10,66 mM para o substrato rafinose. GUIMARÃES (2001) relatou, para  $\alpha$ -galactosidase purificada de sementes germinadas de soja var. Doko, valor de  $K_M$  para rafinose igual a 5,53 mM. É importante lembrar que neste trabalho, a  $\alpha$ -galactosidase foi parcialmente purificada de sementes germinadas de soja, o que pode explicar a diferença com relação aos valores de  $K_M$  encontrados por GUIMARÃES (2001), que trabalhou com  $\alpha$ -galactosidase pura de sementes germinadas de soja. FRIDJONSSON et al. (1999) relataram  $K_M$  igual a 16,4 mM para o substrato rafinose, estudando a cinética da  $\alpha$ -galactosidase de *Bacillus stearothermophilus* NUB3621.

#### **4.3.6- Determinação da atividade da $\alpha$ -galactosidase semi-purificada utilizando outros substratos**

A enzima  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes de soja germinadas var. Monarca foi ensaiada com substratos sintéticos alternativos, de acordo com os procedimentos descritos em Materiais e Métodos (Quadro 4).

**Quadro 4** – Atividade relativa da  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca ensaiada com vários substratos sintéticos

Substrato	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)
$\rho$ NP $\alpha$ Gal	0,5	100,00
$\rho$ NP $\beta$ Gal	0,5	4,53
$\sigma$ NP $\beta$ Gal	0,5	0
$\rho$ NP $\alpha$ Glc	0,5	0
$\rho$ NP $\alpha$ Xil	0,5	0
$\rho$ NP $\alpha$ Man	0,5	0

As atividades foram calculadas em relação a atividade com o substrato  $\rho$ NPGal, que foi considerada como 100%.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a enzima  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca demonstrou especificidade quase absoluta para a galactose em posição  $\alpha$ , e praticamente não hidrolisou ligação glicosídica contendo resíduo de galactose unido por ligação  $\beta$ -1,4. Também não apresentou qualquer atividade em relação a outros substratos sintéticos contendo resíduos de açúcar diferentes da galactose. Atividade enzimática muito baixa foi observada quando a enzima foi ensaiada com o substrato  $\rho$ NP $\beta$ Gal, 4,53%, mas nenhuma atividade foi constatada quando o substrato utilizado foi o  $\sigma$ NP $\beta$ Gal, dado que sugere uma relação entre a afinidade da enzima pelo substrato e a natureza do substituinte no anel fenil do galactosídeo aromático. Foi relatado que fatores que afetam a afinidade são provavelmente complexos e incluem a posição e o tamanho do substituinte aromático, seu

efeito eletrônico e o grau de hidratação (DEY e PRIDHAM, 1972). Resultados semelhantes foram obtidos por KANG e LEE (2001), trabalhando com  $\alpha$ -galactosidase presente em polpa de uva. Essa enzima hidrolisou com maior eficiência o substrato sintético  $\rho$ NPGal, que contém o resíduo de D-galactose unido por ligação  $\alpha$ -1,6, em relação a outros substratos testados, apresentando apenas 16% hidrólise do resíduo de D-galactose unido por ligação  $\beta$ -1,4 em relação ao controle. A rápida hidrólise do controle e a baixa hidrólise do resíduo unido por ligação  $\beta$ -1,4 indica que a galactosidase é  $\alpha$ -anômero específica.

A enzima  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada também foi ensaiada com alguns substratos naturais em concentrações equivalentes ao dobro do valor da  $K_{M\text{ ap}}$ . Os resultados são apresentados no Quadro 5.

**Quadro 5** – Atividade relativa da  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca ensaiada com alguns substratos naturais

Substrato	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)
$\rho$ NPGal	1	100,00
Rafinose	7	30,60
Maltose	4	18,12
Estaquiose	7	11,74
Melibiose	4	7,68
Lactose	4	2,30
Sacarose	4	0

Todas as atividades foram calculadas em relação a atividade com o substrato  $\rho$ NPGal, que foi considerada como 100%.

Pela observação do Quadro 5, constata-se que a enzima  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja var. Monarca mostrou-se capaz de hidrolisar os açúcares rafinose, estaquiase e melibiose, apresentando maior atividade relativa para rafinose, 30,60% em relação ao controle, quando comparada com os outros açúcares. SHIVANNA et al. (1990) relataram para as enzimas  $\alpha$ -galactosidase-A e C<sub>2</sub> de sementes germinadas de guar, que entre os substratos naturais testados, a rafinose foi melhor substrato quando comparado com melibiose para ambas enzimas. PUCHART et al. (2000) observaram que a  $\alpha$ -galactosidase obtida de cultura do fungo *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749, mostrou-se ativa quando ensaiada com

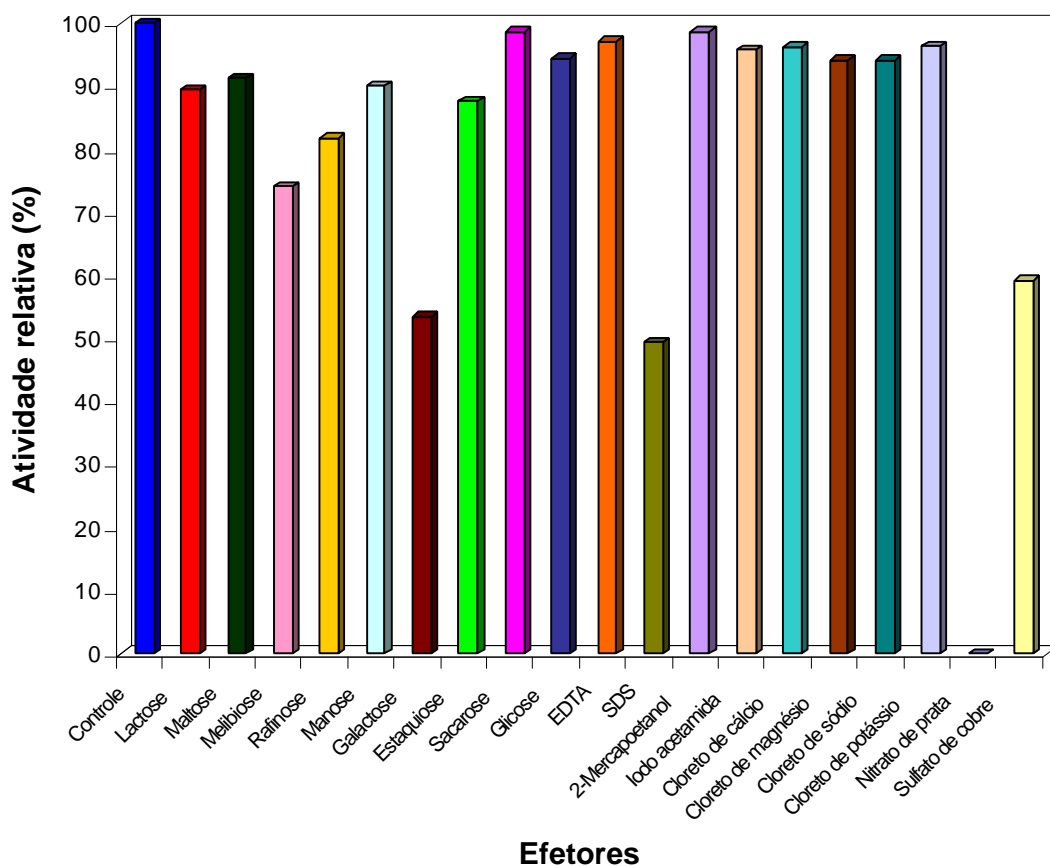
os oligossacarídeos melibiose, rafinose e estaquiose. Melibiose e rafinose foram mais rapidamente hidrolisadas que a estaquiose, que passa por uma dupla desgalactosilação. O passo limitante para a hidrólise completa, é a liberação do primeiro resíduo galactosil ligado na estaquiose. A rafinose resultante é desgalactosilada a sacarose mais rapidamente e, por essa razão é dificilmente observada entre os produtos (PUCHART et al., 2000).

O fato de a enzima semi-purificada hidrolisar lactose e maltose, sugere que na preparação enzimática existiam outras proteínas com atividade enzimática, visto que, de acordo com os dados apresentados no Quadro 4, a enzima mostrou-se específica para resíduos de galactose unidos por ligação  $\alpha$ -1,6.

A rápida hidrólise do substrato sintético pNPGal em relação à hidrólise dos oligossacarídeos foi também observada para a  $\alpha$ -galactosidase de polpa de uva (KANG e LEE, 2001).

#### ***4.3.7- Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da $\alpha$ -galactosidase***

O efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da  $\alpha$ -galactosidase foi determinado pré-incubando soluções destes compostos com a preparação enzimática por 10 min, a 40 °C (Figura 20), seguido da realização do ensaio normal de atividade, tendo pNPGal como substrato. A concentração final dos compostos no ensaio foi de 1mM.



**Figura 22** – Efeito de açúcares, agentes redutores e íons na atividade da  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca

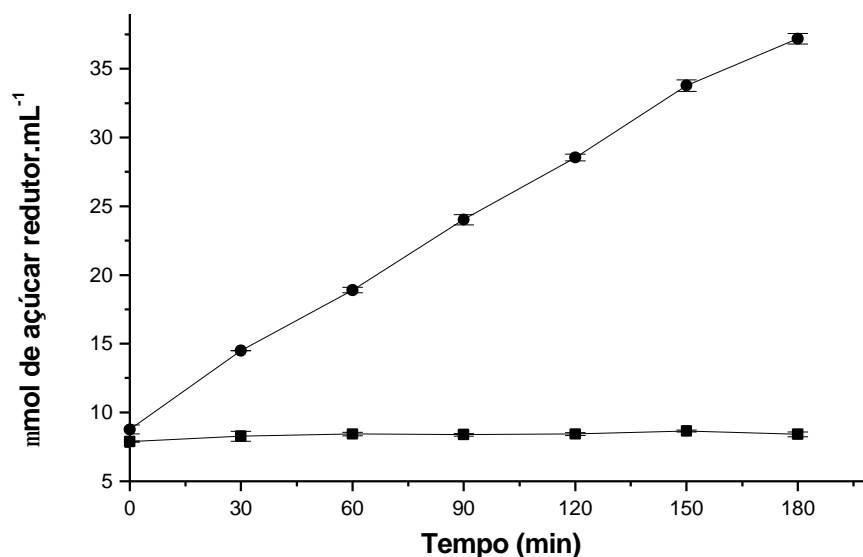
Foi detectada baixa ou nenhuma inibição da atividade da enzima por lactose, maltose, manose, sacarose, glicose, EDTA, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, 2-mercaptoetanol e iodoacetamida. A atividade enzimática foi levemente inibida por melibiose, rafinose e estaquiase. Forte inibição enzimática foi observada em presença de galactose, SDS e sulfato de cobre. O nitrato de prata inibiu completamente a atividade da enzima.

O fato de a enzima não apresentar inibição por EDTA e iodoacetamida indica, respectivamente, que não há dependência de íons metálicos para a atividade catalítica, bem como não há grupo  $-SH$  (sulfidrílica) livre essencial à catálise na molécula da enzima.

KANG e LEE (2001) não observaram aumento ou decréscimo significativo na atividade da  $\alpha$ -galactosidase de polpa de uva, quando ensaiada na presença de 1 mM de cloreto de magnésio, cloreto de cobre, cloreto de cálcio ou EDTA. ADEMARK et al. (2001) relataram, para 3 formas de  $\alpha$ -galactosidase purificadas a partir de cultura do fungo *Aspergillus niger* ATCC 46890 ( $\alpha$ -gal II-IV), que a galactose foi um potente inibidor nos ensaios com pNPGal, e manose e glicose apresentaram pouco ou nenhum efeito. GUIMARÃES et al. (2001) demonstraram que a galactose é inibidor competitivo da  $\alpha$ -galactosidase. VIANA (2002) informou forte inibição da atividade da  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja var. CAC-1, quando ensaiada em meio contendo SDS, sulfato de cobre ou galactose.

#### **4.4- Análise quantitativa da hidrólise dos oligossacarídeos no extrato desengordurado de soja e no melão de soja**

Uma amostra de 6,0 g do extrato desengordurado de soja foi reconstituída com água na proporção de 1:10 (p/v). Amostras de 5 g do extrato reconstituído foram incubadas com  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja var. Monarca, conforme descrito no item 3.7. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo regulares para avaliação quantitativa da hidrólise por meio da determinação de açúcar redutor liberado no meio (Figura 23).



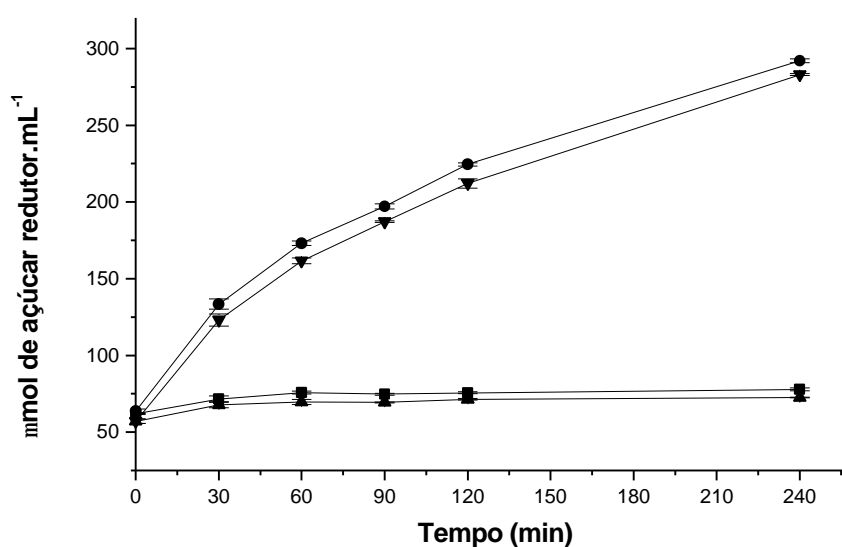
**Figura 23** – Determinação quantitativa da hidrólise do extrato desengordurado de soja pela enzima  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca. Controle – enzima fervida (■), ensaio com 16 U de enzima por grama de pó de extrato (●). Cada ponto representa a média e o desvio padrão de 3 repetições.

Os produtos melaço leve e pesado de soja foram avaliados em relação ao seu teor de isoflavonas e açúcares. Constatou-se, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que os produtos melaço leve e pesado de soja apresentam, respectivamente 3,89 mg/g e 5,45 mg/g de isoflavonas. O Quadro 7 mostra algumas informações sobre os teores de açúcares.

**Quadro 6** – Teores de açúcares nos produtos melaço leve e pesado de soja

Açúcares	Melaço leve (mg/g)	Melaço pesado (mg/g)
Frutose	13,02	13,00
Glicose	2,17	2,36
Sacarose	127,49	119,81
Rafinose	21,59	19,99
Estaquiose	61,97	56,20

Experimentos semelhantes ao conduzido com o extrato desengordurado de soja, foram conduzidos com os produtos melação leve e pesado. Amostras de 8,0 g dos dois produtos foram diluídas com água deionizada na proporção de 1:5 (p/v). Cerca de 11 g dos produtos diluídos foram incubadas com  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja var. Monarca, conforme descrito no item 3.7. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo regulares para avaliação quantitativa da hidrólise por meio da determinação de açúcar redutor liberado no meio (Figura 22).



**Figura 24** – Determinação quantitativa da hidrólise de melação leve (ML) e pesado (MP) pela enzima  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca. Controle ML – enzima fervida (■); ensaio com 16 U de enzima por grama de ML (●); controle MP – enzima fervida (▲); ensaio com 16 U de enzima por grama de MP (▼). Cada ponto representa a média e o desvio padrão de 3 repetições.

Pelo perfil dos gráficos das Figuras 23 e 24, pode-se concluir que houve um aumento linear na liberação de açúcar redutor no meio com o decorrer do tempo de incubação do extrato desengordurado de soja e dos produtos melação leve e pesado com a enzima  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca.

Apesar de não permitir a quantificação da porcentagem de redução dos RO nos substratos utilizados, este experimento indica que a enzima apresenta potencial de uso para a hidrólise desses oligossacarídeos, pois como no extrato enzimático não foi detectada atividade de invertase e os produtos utilizados nos experimentos contém principalmente os açúcares sacarose, rafinose e estaquiose, os aumentos significativos de açúcar redutor no meio são decorrentes da atividade hidrolítica da  $\alpha$ -galactosidase. No ensaio com o extrato desengordurado de soja, a concentração de açúcar redutor passou de 7,88  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor/mL para 37,19  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor/mL no final do ensaio, aumento de quase 5 vezes a concentração inicial. Utilizando o produto melação leve, observou-se aumento na concentração de 61,82  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor/mL para 292,06  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor/mL, já para o produto melação pesado, a concentração passou de 57,08  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor/mL para 282,87  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor/mL.

#### **4.5- Hidrólise dos oligossacarídeos do extrato desengordurado de soja e dos produtos melação leve e pesado utilizando $\alpha$ -galactosidases de várias fontes**

Além da  $\alpha$ -galactosidase de soja, foram utilizadas no ensaio de hidrólise a  $\alpha$ -galactosidase de sementes germinadas de mamoneira – *Tachigali multijuga* – (FIALHO et al.,2002),  $\alpha$ -galactosidases (S1 e S2) de *Aspergillus terreus* (REIS et al., 2002) e  $\alpha$ -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* Pg/644 (FALKOSKI et al.,2003), cedidas pelo Laboratório de Análises Bioquímicas do BIOAGRO/UFV, visando comparar a eficiência das mesmas em hidrolisar os RO presentes no extrato desengordurado de soja. Os parâmetros cinéticos determinados para as enzimas de *T. multijuga*, *A. terreus* e *P. griseoroseum* estão apresentados no Quadro 7

**Quadro 7** – Parâmetros cinéticos das reações catalisadas pelas  $\alpha$ -galactosidases de *T. multijuga*, *A. terreus* e *P. griseoroseum*

Fonte da $\alpha$ -galactosidase	$K_{M\ ap}$ (mM)	$V_{max\ ap}$ ( $\mu\text{mol } \rho\text{-NP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
<i>T. multijuga</i> *	1,57	1,18
<i>A. terreus</i> S1**	1,89	0,90
<i>P. griseoroseum</i> ***	1,14	0,02

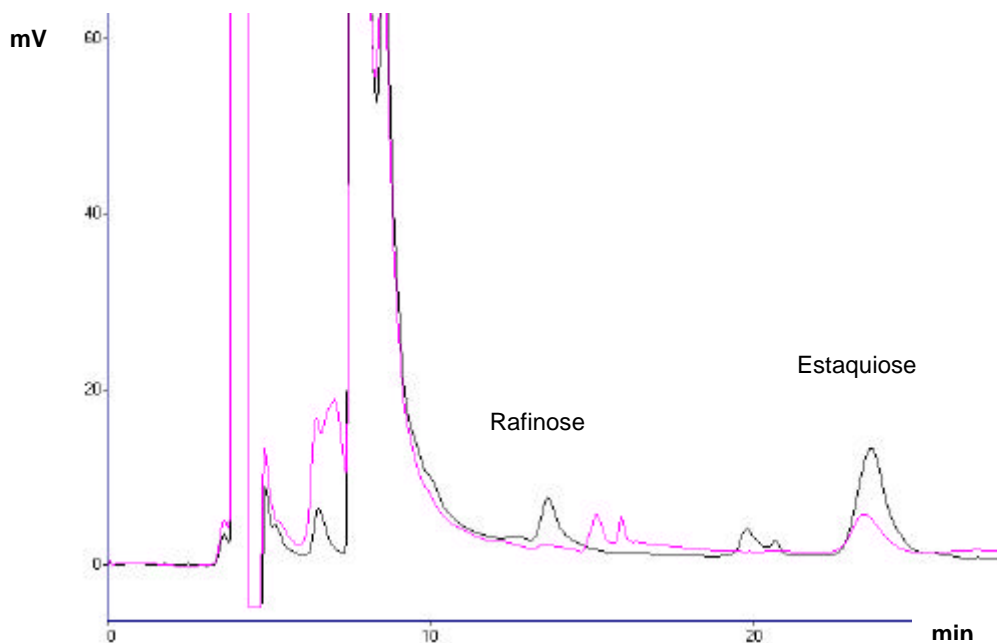
\* FIALHO et al.,2002

\*\* REIS et al., 2002

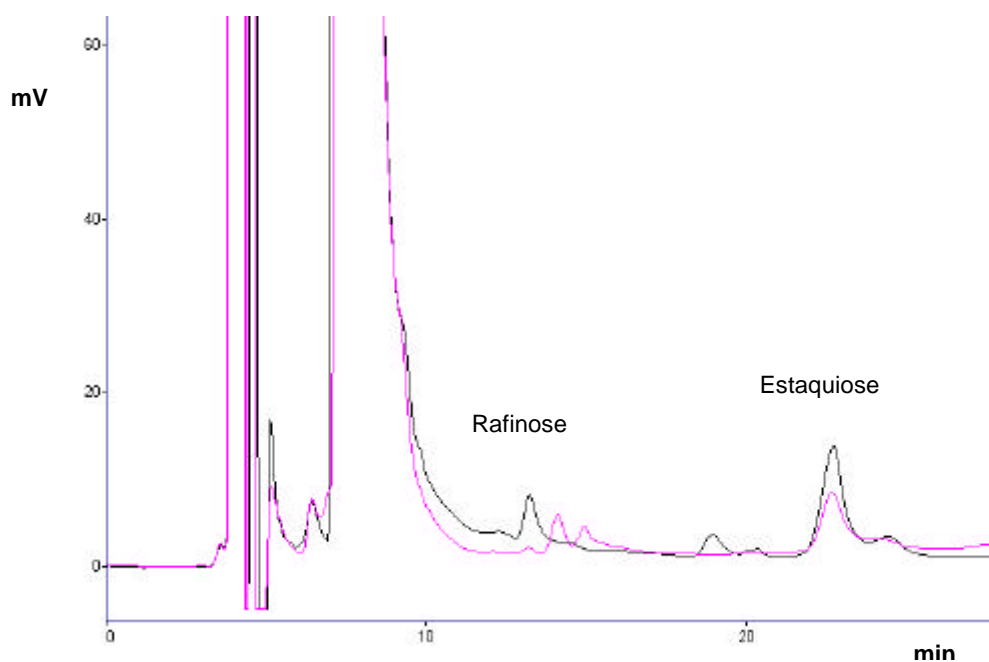
\*\*\* FALKOSKI et al.,2003

O extrato desengordurado de soja foi reconstituído com água deionizada na proporção de 1:10 (p/v). Amostras de 2,0 g do extrato desengordurado reconstituído foram incubadas com  $\alpha$ -galactosidase de sementes germinadas de soja var. Monarca,  $\alpha$ -galactosidase de sementes germinadas de mamoneira – *Tachigali multijuga* – (FIALHO et al., 2002),  $\alpha$ -galactosidases (S1 e S2) de *Aspergillus terreus* (REIS et al., 2002) e  $\alpha$ -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* Pg/644 (FALKOSKI et al., 2003), conforme descrito no item 3.8. Após esses tempos, as amostras foram congeladas, liofilizadas e os açúcares solúveis foram extraídos e analisados por CLAE. Como controle, o extrato desengordurado de soja foi incubado com enzimas fervidas nas mesmas condições.

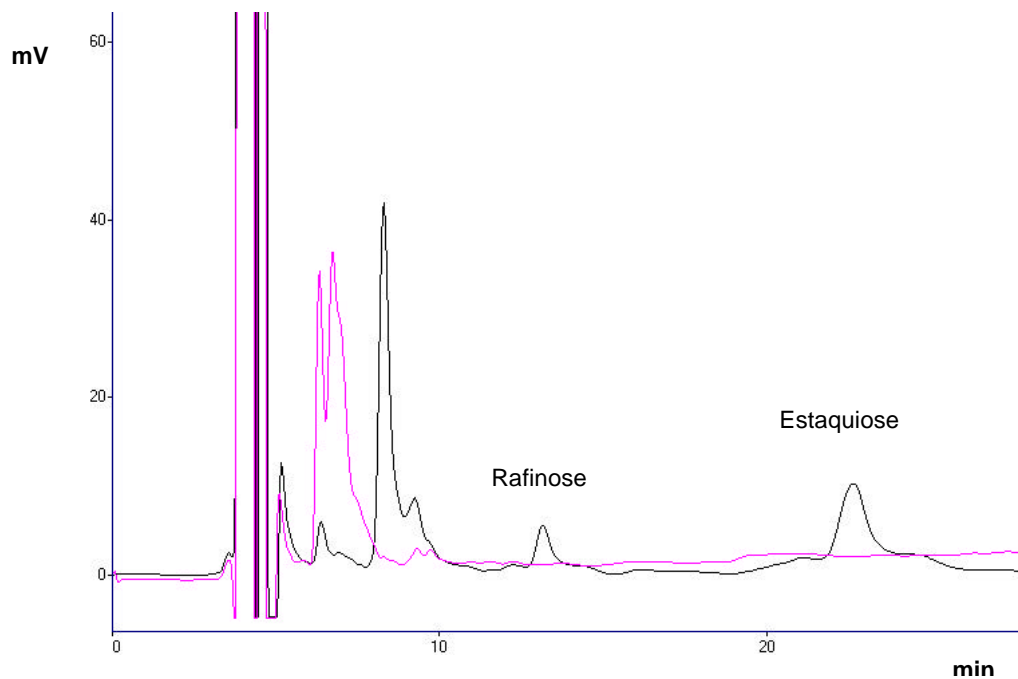
Cromatogramas representativos da hidrólise do extrato desengordurado de soja com as  $\alpha$ -galactosidases de sementes germinadas de soja var. Monarca, sementes germinadas de mamoneira, extraídas de *Aspergillus terreus* e de *Penicillium griseoroseum*, são apresentados, respectivamente, nas Figuras 25, 26, 27 e 28.



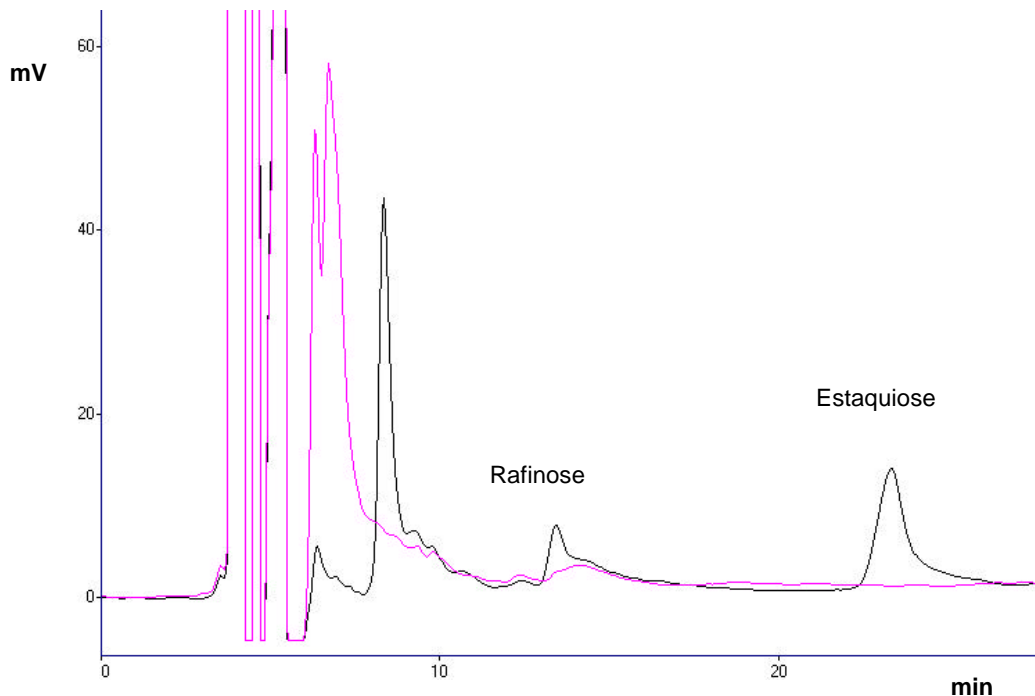
**Figura - 25** – Cromatograma comparativo da hidrólise do extrato desengordurado de soja pela enzima  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca. Controle (—); tratamento por 8 h (—).



**Figura 26** - Cromatograma comparativo da hidrólise do extrato desengordurado de soja pela enzima  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de mamoneira. Controle (—); tratamento por 8 h (—).



**Figura 27** – Cromatograma comparativo da hidrólise do extrato desengordurado de soja pela  $\alpha$ -galactosidase S1 de *Aspergillus terreus*. Controle (—); tratamento por 6 h (—).



**Figura 28** – Cromatograma comparativo da hidrólise do extrato desengordurado de soja pela  $\alpha$ -galactosidase de *Penicillium griseoroseum*. Controle (—); tratamento por 6 h (—).

**Quadro 8** – Porcentagem de hidrólise dos oligossacarídeos contidos no extrato desengordurado de soja pela  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca, sementes germinadas de mamoneira (*Tachigali multijuga*), de *Aspergillus terreus* e de *Penicillium griseoroseum*

Origem das enzimas	Tratamento enzimático (h)			
	0	4	6	8
	Rafinose (% de redução)			
Soja	0	71,45	78,13	100,00
Mamoneira	0	69,90	69,25	71,84
<i>A. terreus</i> S1	0	100,00	100,00	100,00
S2	0	-	-	-
<i>P. griseoroseum</i>	0	72,68	73,67	65,68
	Estaquiase (% de redução)			
Soja	0	34,73	51,84	53,11
Mamoneira	0	51,61	48,52	49,34
<i>A. terreus</i> S1	0	100,00	100,00	100,00
S2	0	100,00	100,00	100,00
<i>P. griseoroseum</i>	0	100,00	100,00	100,00

- = não determinado

Os teores de rafinose e estaquiase no tempo zero de hidrólise foram considerados como 100%. Os demais resultados foram calculados em relação ao tempo zero. Os resultados foram calculados a partir de cromatogramas obtidos das análises por CLAE. Os ensaios foram realizados em triplicata e representam as médias dos valores obtidos. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10 %.

De acordo com os dados apresentados no Quadro 8, verifica-se que, após 8 h de incubação do extrato desengordurado de soja com a  $\alpha$ -galactosidase de soja e de mamoneira houve, respectivamente, redução de 100% e 72% no teor de rafinose contido nas amostras. Em relação a estaquiase, observou-se redução de 53% e 49%, respectivamente.

No tratamento do extrato desengordurado de soja com a enzima extraída de sementes de mamoneira, a porcentagem de redução dos açúcares mostrou-se semelhante para todos os tempos analisados, indicando que, provavelmente a hidrólise ocorre mais no início da incubação.

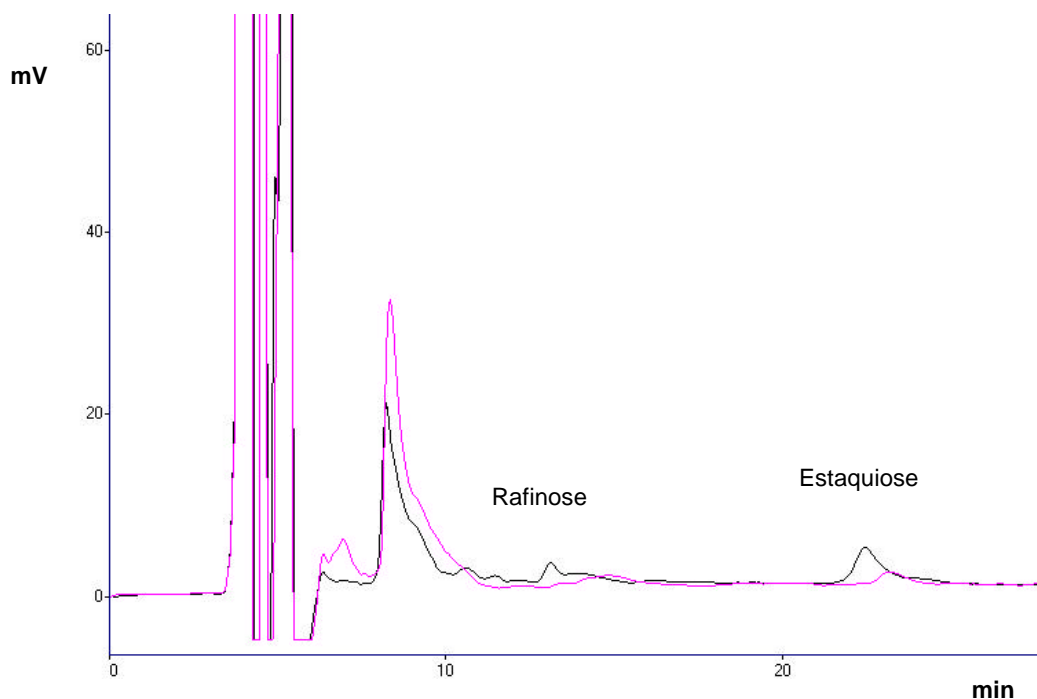
No tratamento do extrato desengordurado de soja com a enzima S1 de *Aspergillus terreus* foi observada redução de 100% nos teores de ambos oligossacarídeos, rafinose e estaquiase, já com 4 horas de incubação. Com a enzima S2, apesar de se ter alcançado completa redução do teor de

estaquiouse, não foi possível determinar a porcentagem de redução de rafinose, visto que após o tratamento, foi observada a presença de um subproduto da hidrólise enzimática, que apresentou tempo de retenção semelhante à rafinose, impedindo a correta quantificação da porcentagem de redução desse oligossacarídeo.

A  $\alpha$ -galactosidase de *Penicillium griseoroseum* proporcionou considerável redução no teor de rafinose, sendo os resultados observados muito semelhantes para todos os tempos de tratamento. De forma similar às enzimas de *A. terreus*, a  $\alpha$ -galactosidase de *P. griseoroseum* promoveu completa hidrólise do teor de estaquiouse presente nas amostras.

Semelhantemente ao experimento realizado com o extrato desengordurado de soja, os produtos melaço leve e pesado foram também submetidos ao tratamento enzimático com objetivo de reduzir o conteúdo de RO nos mesmos. Os produtos foram diluídos com água deionizada na proporção de 1:5 (p/v). Amostras de 5,0 g dos produtos diluídos foram incubadas com  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca, conforme descrito no item 3.10. As soluções de açúcares obtidas após os processos descritos no item 3.10, foram analisadas por CLAE. Como controle, os produtos melaço leve e pesado foram incubados com a enzima fervida nas mesmas condições.

Um cromatograma representativo da hidrólise do produto melaço pesado pela  $\alpha$ -galactosidases de sementes germinadas de soja var. Monarca, está apresentado na Figura 29. Os resultados da hidrólise estão apresentados no Quadro 9.



**Figura 29** – Cromatograma comparativo da hidrólise do produto melaço pesado pela enzima  $\alpha$ -galactosidase presente na preparação enzimática obtida a partir de sementes germinadas de soja var. Monarca. Controle (—); tratamento por 6 h (—).

**Quadro 9** – Porcentagem de hidrólise dos oligossacarídeos pela  $\alpha$ -galactosidase contida na preparação enzimática obtida a partir de sementes de soja germinadas var. Monarca, presentes nos produtos melaço leve (ML) e pesado (MP) de soja.

Tempos de hidrólise (h)	Rafinose (% de redução)		Estaquiose (% de redução)	
	ML	MP	ML	MP
0	-	-	-	-
4	100,00	100,00	49,35	49,07
6	100,00	100,00	57,82	50,01
8	100,00	100,00	58,07	57,60

Os teores de rafinose e estaquiose no tempo zero de hidrólise foram considerados como 100%. Os demais resultados foram calculados em relação ao tempo zero. Os resultados foram calculados a partir de cromatogramas. Os ensaios foram realizados em triplicata e representam as médias dos valores obtidos. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10 %.

CRUZ et al. (1981) obtiveram hidrólise completa dos oligossacarídeos, rafinose e estaquiose, presentes em amostras de leite de soja, quando

submetidas à hidrólise com extrato bruto contendo  $\alpha$ -galactosidase produzida por *Cladosporium cladosporioides*. MANSOUR e KHALIL (1998) observaram que os extratos brutos de  $\alpha$ -galactosidase de *C. cladosporides*, *A. orizyae* e *A. niger*, foram efetivos na redução do conteúdo de rafinose e estaquiose de farinhas de grão-de-bico. A redução no conteúdo desses oligossacarídeos foi quase 100% para todos os tratamentos enzimáticos, sendo significativamente maior quanto maior o tempo de incubação com os extratos enzimáticos. MULIMANI e DEVENDRA (1998), estudando o efeito da imersão, cocção e tratamento com extrato bruto de  $\alpha$ -galactosidase de vagem de *Cassia sericea*, constataram que o tratamento com o extrato enzimático bruto foi claramente mais efetivo que a imersão e a cocção na redução dos níveis de verbascose, estaquiose e rafinose na farinha de grão vermelho. O tratamento enzimático por 3 h removeu completamente os galactooligossacarídeos presentes nas amostras de farinha de grão vermelho. MULIMANI et al. (1997) observaram redução de 90,4% a 91,9% no conteúdo de estaquiose, após tratamento de farinha de soja com extrato bruto de  $\alpha$ -galactosidase obtido de sementes de guar. Diferente dos resultados obtidos nesse estudo com as enzimas de fontes vegetais, MULIMANI et al. (1997) observaram que o nível de sacarose nas amostras tratadas com a enzima foi menor, quando comparado com o controle. A hidrólise dos RO pode ser realizada pela  $\alpha$ -galactosidase ou pela invertase. Enquanto a  $\alpha$ -galactosidase hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,6 dos açúcares da família da rafinose, liberando galactose e sacarose, a invertase hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,2 produzindo, por exemplo, maninotriose, melibiose e frutose (GUIMARÃES et al., 2001). Dessa forma, os resultados de MULIMANI et al. (1977) indicam a presença de invertase no extrato bruto de sementes de guar, o que impede a afirmação da eficiência da hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,6 dos oligossacarídeos de rafinose pela  $\alpha$ -galactosidase obtida por esses autores.

SANNI et al. (1997) trataram sementes de soja com as enzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -galactosidases de *Lactobacillus plantarum*, obtendo redução de 95,6% de estaquiose e 98,9% de rafinose, no extrato hidrossolúvel de soja. O tratamento enzimático proporcionou também redução no teor de ácido fítico e inibidor de tripsina. Os resultados da avaliação sensorial mostraram que o extrato

hidrossolúvel de soja preparado com as sementes tratadas enzimaticamente foi melhor em relação ao sabor, textura, aparência e palatabilidade, quando comparado com o extrato preparado a partir de sementes não tratadas.

GDALA et al. (1997) avaliaram o efeito da suplementação com  $\alpha$ -galactosidase na digestibilidade ileal da dieta de porcos enriquecida com farinha de sementes de *Lupinus luteus* (var. Amulet) ou *Lupinus angustifolius* (var. Saturn) e observaram que a suplementação enzimática aumentou significativamente a digestibilidade dos  $\alpha$ -galactosídeos. A digestibilidade da rafinose passou de 40,7% e 52,2% para as variedades Amulet e Saturn, respectivamente, para 95% quando a enzima foi acrescentada na dieta. Efeito similar foi observado para estaquiiose, que apresentou aumento da digestibilidade de 60,1% para 82,7% quando a var. estudada foi Amulet e de 71,9% para 92,4% quando a var. estudada foi Saturn.

THIPPESWAMY e MULIMANI (2002) comparando a degradação enzimática de RO presentes no leite de soja pela  $\alpha$ -galactosidase imobilizada e livre de *Gibberella fujikuroi*, constataram que apesar da enzima livre ter mostrado maior eficiência catalítica que a enzima imobilizada – após 12 h de incubação, a hidrólise dos açúcares da família da rafinose foi 91% e 71% para a enzima livre e imobilizada, respectivamente – a imobilização permite a utilização da enzima por várias vezes, ao passo que a enzima livre é sempre perdida após a realização dos ensaios.

## 5. CONCLUSÕES

- Sementes de soja germinadas por 60 h apresentaram alta atividade específica de  $\alpha$ -galactosidase.
- A  $\alpha$ -galactosidase semi-purificada de sementes germinadas de soja apresentou atividade máxima em pH 5,0 e temperatura de 50 °C.
- A enzima manteve cerca de 90% e 70% de sua atividade original, quando incubada por 240 min e 600 min a 40 °C, respectivamente. Mas perdeu 40% da atividade original após 240 min de incubação a 45 °C.
- A meia vida da enzima foi de 14 h e 24 min a 40 °C.
- O extrato desengordurado de soja e os produtos melão leve e pesado de soja, quando submetidos aos tratamentos enzimáticos com  $\alpha$ -galactosidasas de fontes vegetais e microbianas, apresentaram considerável redução nos teores de rafinose e estaquiose.
- As enzimas de origem microbiana foram mais eficientes em hidrolisar os oligossacarídeos de rafinose presentes no extrato desengordurado de soja, em comparação com as de origem vegetal.
- A enzima S1 de *Aspergillus terreus* hidrolisou completamente os oligossacarídeos de rafinose presentes no extrato desengordurado de soja.
- As informações contidas nesse trabalho podem ser utilizadas na fabricação de produtos derivados de soja e provavelmente de outras leguminosas, com baixos níveis de oligossacarídeos, de forma a proporcionar aumento e versatilidade do uso da soja como alimento e suplemento protéico.

## 6. PERSPECTIVAS

- Seqüenciamento do gene da  $\alpha$ -galactosidase mais eficiente;
- Clonagem do gene e expressão em vetor adequado;
- Imobilização da enzima;
- Confecção de biorreator;
- Utilização em escala industrial.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMARK, P.; LARSSON, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Multiple  $\alpha$ -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.441-448, 2001.
- ALANI, S.R.; SMITH, D.M.; MARKAKIS, P.  $\alpha$ -Galactosidases of *Vigna unguiculata*. **Phytochemistry**, v.28, p.2047-2051, 1989.
- ANDERSON, J.W.; SMITH, B.M.; WASHNOCK, C.S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **American Journal Clinical Nutrition**, v.70, p.464AS-74S, 1999.
- ANTUNES, P.L.; SGARBIERI, V.C. Processamento e valor nutricional da soja, *Glycine max* (L.) Merrill. **AGROS**, v.15, p.65-84, 1980.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington, 1975. 1094p.
- BARNES, S.; KIM, H.; XU, J. Soy in the prevention and treatment of chronic diseases. In: **Anais CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**, Londrina, PR. EMBRAPA-SPI. 1999, p.295-308.
- BAU, H.M.; VILLAUME, CH, MÉJEAN, L. Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats. **Nahrung**, v.44, p.2-6, 2000.
- BELLAVER, C.; SNIZEK, J.P.N. Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding. **Anais CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**, Londrina, PR. EMBRAPA-SPI. 1999, p.183-199.

- BOOKWALTER, G.N. Fortification of dry soybean-based foods with DL-methionine. **Journal Food Science**, v.40, p.266-79, 1975.
- 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.80-3, 1976.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L.G.; MOLINA, M.R. Estudios sobre digestibilidad de la proteína de varias especies de leguminosas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.27, n.2, p.215-231, 1977.
- BURROWS, S. Baker's yeast. In: ROSE, A.H. **Economic Microbiology**. London: Academic Press, 1979. p.31-64.
- CASTILHO, E.M.; de LUMEN, B.O.; REYES, P.S.; de LUMEN, 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 Physiological Biochemistry**, v.28, p.167-172, 1990.
- COON, C.N.; LESKE, K.L.; AKAVANICHAN, O.; CHENG, T.K. Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters. **Poultry Science**, v.69, p.787-793, 1990.
- 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.
- CRUZ, R.; PARK, Y.K. Production of fungal  $\alpha$ -galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. **Journal Food Science**, v. 47, 1973-1975, 1982.
- de REZENDE, S.T. Teores de oligossacarídeos de rafinose em soja, purificação e caracterização de invertases e  $\alpha$ -galactosidases de microrganismos. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 1998. 157p. Tese (D.S.) - Universidade de Brasília.
- de REZENDE, S.T.; FELIX, C.R. Raffinose-hydrolyzing activity of *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Letters**, v.19, p. 217-220, 1997.
- DE, S.S. Technology of production of edible flours and protein products from soybean. **Agricultural Services Bulletin**, v.11, p.1-158, 1971.
- DESJARDINS, M.L.; ROY, D.; GOULET, J. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. **Journal Dairy Science**, v.73, p.299-307, 1990.

- DEY, P.M. 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  $\alpha$ -galactosidases. **Advances Enzymology**, v.36, p.91-130, 1972.
- DINNI, A.; SIMONE, F.; RAIMUNDO, R.; SENATORE, F. Oligosaccharides in five different *Vicia faba* cultivars. **Biochemistry System Ecology**, v.17, p.559-561, 1989.
- DUFFUS, C.M.; SLAUGHTER, J.C. Seeds and their uses. **N.Y: John Wiley**, p.1-34, 1980.
- ENDO, M.; NAKAGAWA, H.; OGURA, N.; SATO, T. Size and levels of mRNA for acid invertase in ripe tomato fruit. **Plant Cell Physiology**, v.31, p.655-659, 1990.
- FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, M.V.; OLIVEIRA, M.G.A.; NEVES, M.A.S.; de REZENDE, S.T. Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from transformant *Penicillium griseoroseum* Pg/644. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2003, Caxambú, MG, **Anais. SBBq**, 2003. p.138.
- FIALHO, L.S.; GUIMARÃES, V.M.; BORGES, E.E.L.; JOSÉ, I.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; de REZENDE, S.T. Partial purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Tachigali multijuga* seeds. In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2002, Caxambú, MG, **Anais. SBBq**, 2003. p.124.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Protein quality evaluation**, Rome: 1991. 66 p. (FAO Food and Nutrition. Paper, 51).
- FRIDJONSSON, O.; WATZALAWICH, H.; GEHWEILER, A.; MATTES, R. Thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB3621: cloning, sequencing and characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v.176, p.147-153, 1999.
- GARMAN, S.C.; HANNICK, L.; ZHU, A.; GARBOCZI, D.N. The 1.9 Å structure of  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase: molecular basis of glycosidase deficiency diseases. **Structure**, v.10, p.425-434, 2002.
- GDALA, J.; JANSMAN, A.J.M.; BURACZEWSKA, L.; HUISMAN, J.; van LEEUWEN, P. The influence of  $\alpha$ -galactosidase supplementation on the ileal digestibility of lupin seed carbohydrates and dietary protein in young pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.67, p.115-125, 1997.

- GERMAIN, D.P. La maladie de Fabry. Aspects cliniques et génétiques. Perspectives thérapeutiques. **Rev Méd Interne**, v.21, p.1086-1103, 2000.
- GITZELMANN, R.; AURICCHIO, S. The handling of soy  $\alpha$ -galactosidase by a normal and galactosemic child. **Pediatrics**, v.36, p.231-232, 1965.
- GOMES, P. **A soja**. São Paulo: Nobel, 1978. 152p.
- GUIMARÃES, V.M. Purificação e caracterização de  $\alpha$ -galactosidasas de sementes de soja em germinação e seu uso para hidrólise de oligossacarídeos. Brasília: DF, 2001. 161 p. **Tese (D.S.)** – Universidade de Brasília.
- GUIMARÃES, V.M.; de REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; FELIX, C.R. Characterization of  $\alpha$ -galactosidasas from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. **Phytochemistry**, v. 58, p. 67-73, 2001.
- HIRAYAMA, M.; SUMI, N.; HIDAKA, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural Biology Chemistry**, v.53, p.667-673, 1989.
- HYAMS, D. Curve Expert 1.3: A comprehensive curve fitting system for Windows. Copyright (c). 1997.
- HYMOWITZ, T.; COLLINS, F.I.; PANCZER, J.; WALKER, W.M. Relationship between the content of oil protein, and sugar in soybean seed. **Agronomy Journal**, v.64, p.613-616, 1972.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3 ed. São Paulo, 1985. v.1. 533p.
- JAFFÉ, W.G. Factores tóxicos em leguminosas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.18, p.203-218, 1968.
- JIMÉNEZ, M.J.M.; ELÍAS, L.G.; BRESSANI, R.; NAVARRETE, D.A.; GÓMEZ-BRENES, R.; MOLINA, M.R. Estudios bioquímicos Y nutricionales de la semilla germinada de soya. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.35, n.3, p. 480-490 1985.
- 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**. v.3. Carbohydrates, Press J. ed. Academic Press, N.Y. Arg. Kagawa Univ. 15:117-131. 1980.

- KANG, H.-C.; LEE, S.-H. Characteristics of an  $\alpha$ -galactosidase associated with grape flesh. **Phytochemistry**, v.58, p.231-219, 2001.
- KOBAYASHI, H.; SUZUKI H. Studies on the decomposition of raffinose by  $\alpha$ -galactosidase of mold. II. Formation of mold pellet and its enzyme activity. **Journal of Fermentation Technology**, v.50, p.625-632, 1972.
- KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugar and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v.88, p.829-832, 1988.
- KOTWAL, S.M.; GOTE, M.M.; SAINKAR, S.R.; KHAN, M.I.; KHIRE, J.M. Production of  $\alpha$ -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp. In solid-state fermentation and its application in soyamilk hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.33, p.337-343, 1998.
- KUO, T.M.; LOWEEL, C.A.; SMITH, P.T. Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. **Plant Science**, v.125, p.1-11, 1997.
- 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.
- LANDA, J.A. Características y componentes alimentarios. **Jornada Integral de Soya**, p.29-31, 1973.
- LEOPOLD, A.C.; VERTUCCI, C. W. Physical attributes of desiccated seeds. In: LEOPOLD, A.C. **Membranes, metabolism, and dry organisms**. Comstock Press, Ithaca, N.Y., p.22-24, 1986.
- LESKE, K.L.; JEVNE, C.J.; COON, C.N. Effect of oligosaccharide additions on nitrogen-corrected true metabolizable energy of soy protein concentrate. **Poultry Science**, v.72, p.664-668, 1993.
- LINEWEAVER, H.; BURKE, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal American Chemistry Society**, v.56, p.658-666, 1934.
- LIU, K. Soybeans – Chemistry, technology and utilization. **New York: Chapman e Hall**, 1997. 532p.
- LIU, J.J.; ODEGARD, W.; de LUMEN, B.O. Galactinol synthase from kidney bean cotyledon and zucchini leaf. Purification and N-terminal sequences. **Plant Physiology**, v.109, p.505-511, 1995.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v.193, p.267-275, 1951.

- de LUMEN, B.O. Molecular strategies to improve protein quality and reduced flatulence in legumes: A review. **Food Structure**, v.11, p.33-46, 1992.
- MAHAN, L. K.; ARLIN, M.T. **Krause - Alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 1995. 957p.
- MANSOUR, E.H.; KHALIL, A.H. Reduction of raffinose oligosaccharides in chickpea (*Cicer arietinum*) flour by crude extracellular fungal  $\alpha$ -galactosidase. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.78, p.175-181, 1998.
- MARANVILLE, E.; ZHU, A. Assessment of amino-acid substitutions at tryptophan 16 in  $\alpha$ -galactosidase. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.1495-1501, 2000.
- MATHEW, C.D.; BALASUBRAMANIAM, K. Mechanism of action of  $\alpha$ -galactosidase. **Phytochemistry**, v.26, p.1299-1300, 1987.
- McILVAINE, 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.
- MONTEIRO, M.R.P. Avaliação da digestibilidade e da qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenases. Viçosa. MG, 2000. 69 p. **Tese (D.S.)** – Universidade Federal de Viçosa.
- MOREIRA, A.M. Programa de melhoramento genético da qualidade de óleo e proteína da soja desenvolvido na UFV. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 1999, Londrina, PR, **Anais**. EMBRAPA – SPI, 1999. p.99-104.
- 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  $\alpha$ -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of red gram flour. **Food Chemistry**, v.61, p.475-479, 1998.
- NAGODAWITHANA, T.W.; TRIVEDI, N.B. Yeast selection for baking. In: PANCHAL, C. **Yeast Strain Selection**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 139-184.
- ONYENEKWE, P.C.; NJOKU, G.C.; AMEH, D.A. Effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) processing methods on flatus causing oligosaccharides. **Nutrition Research**, v.20, p.349-358, 2000.

- 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.; VRSANSKA, M.; BHAT, M.K.; BIELY, P. Purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from a thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1524, p.27-37, 2000.
- RACKIS, J.J. Biological and physiological factors in soybeans. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.51, p.161-174, 1974.
- RACKIS, J.J. Oligosaccharides of food legumes: alpha-galactosidase activity and the flatus problem. In: JEANS, A.; HODGE, J. Physiological Effects of Food Carbohydrates. **American Chemistry Society**. 1975.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C.Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76. A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123 (11), p.1939-1955, November, 1993.
- REHMS, H.; BARZ, W. Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempe-producing *Rhizopus fungi*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.44, p.47-52, 1995.
- REIS, A.P.; GUIMARÃES, V.M.; de QUEIROZ, J.H.; BARROS, E.G.; OLIVEIRA, M.G.A.; de REZENDE, S.T. Production, purification and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus terreus*. In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2003, Caxambú, MG, **Anais**. SBBq, 2003. p.128.
- SAHABALIN, D.A.; KULMINSKAYA, A.A.; SAVEL'EV, A.N.; SHISHKYANNIKOV, S.M.; NEUSTROEV, K.N. Enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei* in the hydrolysis of galactooligosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.231-239, 2002.
- 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. Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. **Plant Physiology**, v.83, p.185-189, 1987.
- SCALABRINI, P.; ROSSI, M.; SPETTOLI, P.; MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.213-219, 1998.
- SHIVANNA, B.D.; RAMAKRISHNA, M.; RAMADOSS, C.S. Purification and properties of the anionic form of  $\alpha$ -galactosidase from germinating guar (*Cyamopsis tetragonolobus*). **Plant Science**, v.72, p.173-180, 1990.

- SLOMINSKI, B.A. Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial preparations of  $\alpha$ -galactosidase and  $\beta$ -fructofuranosidase: potential for use as dietary additives. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 65, p. 323-330, 1994.
- 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  $\alpha$ -galactosidases in transglycosylation reactions. **Carbohydrate Research**, v.329, p.65-73, 2000.
- STEGGERDA, F.R. Gastrointestinal gas following food consumption. **Ann. N.Y. Academic Science**, v.50, p.57-66, 1968.
- STERNBERG, D.; VIJAYKUMAR, P.; REESE, E.T.  $\beta$ -glucosidase: microbiology of production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Canadian Journal Microbiology**, v.23, p.139-147, 1970.
- 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, n.1, p.135-139, 1999.
- TAKATSUKA, N.; NAGATA, C.; KURISU, Y.; INABA, S. DAWAKAMI, N.; SHIMIZU, H. Hypocholesterolemic effect of soymilk supplementation with usual diet in premenopausal normolipidemic japanese women. **Preventive Medicine**, v.31, p 308-314, 2000.
- THANANUNKUL, D.; TANAKA, M; CHIEHESTER, C.O.; LI, T. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of  $\alpha$ -galactosidase within polycrylamide gel. **Journal of Food Science.**, v. 41, p. 173-175, 1976.
- THANANUNKUL, D.; TANANKA, M.; CHICHESTER, C.O.; LEE, T.C. Degradation of raffinose and stachyose in soybean milk by  $\alpha$ -galactosidase within polyacrylamide gel. **Journal of Food Science**, v.41, p.173-175, 1976.
- THIPPESWAMY, S.; MULIMANI, V.H. Enzymic degradation of raffinose family oligosaccharides in soymilk by immobilized  $\alpha$ -galactosidase from *Gibberella fujiduroi*. **Process Biochemistry**, 2000.
- USDA (<http://www.soystats.com/2002>), 2003.
- VIANA, S.F. Caracterização de  $\alpha$ -galactosidase de soja para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose. Viçosa: MG, 2002. 65 p. **Tese (M.S.)** – Universidade Federal de Viçosa.

WAGNER, J.R.; BECKER, R.; GUMBMAN, M.R.; OLSON, A.C. Hydrogen production in the rat following ingestion of raffinose, stachyose and oligosaccharide-free bean residue. **Journal of Nutrition**, v.106, p.466-470, 1976.

WOLF, W.J. Soybean proteins, their functional, chemical, and physical properties. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.18, p.969-75, 1970.

YOSHIDA, S.; TAN, C.H.; SHIMOKAWA, T.; TURAKAINEN, H.; KUSAKABE, I. Substrate Specificities of  $\alpha$ -Galactosidases from Yeasts. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.61, p.359-361, 1997.

ZHU, A.; GOLDSTEIN, J. Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean  $\alpha$ -galactosidase. **Gene (Amst.)**, v.140, p.227-231, 1994.