

SIMONE DE FÁTIMA VIANA

CARACTERIZAÇÃO DE α -GALACTOSIDASE DE SOJA PARA
HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

SIMONE DE FÁTIMA VIANA

CARACTERIZAÇÃO DE α -GALACTOSIDASE DE SOJA
PARA HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS DE RAFINOSE

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

APROVADA EM: 28 de fevereiro de 2002.

Prof. Maurílio Alves Moreira
(Conselheiro)

Prof. Neuza Maria Brunoro Costa
(Conselheira)

Prof. José Humberto de Queiróz

Prof. Valéria Monteze Guimarães

Prof. Sebastião Tavares de Rezende
(Orientador)

*“Conto ao senhor é o que eu sei e o
senhor não sabe; mas principalmente
quero contar é o que eu não sei se sei,
e que pode ser que o senhor saiba”*

(GRANDE SERTÃO: VEREDAS/GUIMARÃES ROSA)

A Deus

Aos meus pais, Leila e Francisco,

Aos meus irmãos Luciany e Lucas,

Ao meu noivo e amigo Aureliano.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este mestrado, ter me abençoado todos os dias de minha vida e por estar sempre do meu lado nos momentos difíceis e alegres, me ajudando. 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 para a realização deste trabalho.

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

Aos professores Maurílio Alves Moreira, Neuza Maria Brunoro Costa, Maria Goreti de Almeida Oliveira, Valéria Monteze Guimarães, pelo apoio ao meu trabalho.

Ao secretário Eduardo pelo carinho, dedicação e boa vontade indispensáveis em todos os momentos.

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

Ao laboratório de Enzimologia do BIOAGRO, onde o meu trabalho foi realizado, obrigada pelo carinho com que fui recebida.

Ao laboratório de Análises Físico-Químicas do BIOAGRO, pela contribuição em algumas análises da minha tese.

Aos meus amigos dos laboratórios de Enzimologia e Análises Físico-Químicas, Christiano, Gal, Giordani, Bárbara, Éster, Luciana, Cristina, Maria Regina, Éder, Samir, Taís, Lucimara.

Aos amigos Jander e Inês, pela amizade, pelos ensinamentos e colaboração no meu trabalho.

Aos meus amigos Daniel, Marcelo, Angélica, Carina, Onell que muito me ajudaram para a realização deste trabalho, obrigada pela amizade, pelo carinho e pela dedicação.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos Luciany e Lucas, meus avós, meus tios e tias, primos e primas pelo carinho e apoio depositados em mim.

Aos meus sogros e amigos João Darci e Elci, pelo carinho com que sempre me trataram e pela ajuda em todos os momentos difíceis.

Ao meu noivo Aureliano, pelo carinho, amizade, dedicação, ensinamentos e principalmente pelo seu amor.

Aos meus amigos de Viçosa, as minhas colegas de república e a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Simone de Fátima Viana, filha de Francisco Viana Sobrinho e Leila Vânia de Fátima, nasceu em Piumhi, Minas Gerais, em 1º de outubro de 1975.

Realizou seus estudos básicos em Piumhi, Minas Gerais.

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 UFV, em março de 2000, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae*, em fevereiro de 2002, com a 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
ρ NPGal	ρ -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo
ρ NPGlc	ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
o NP β Gal	o -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
ρ NP β Gal	ρ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo
ρ NP α M	ρ -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo
ρ NP α A	ρ -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo
ρ NP α X	ρ -nitrofenil- α -D-xilopiranosídeo
PEG	Poli(et)ilenoglicol
ρ/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
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Qualidade nutricional da proteína da soja	4
2.2. Biossíntese e papel fisiológico dos RO	6
2.3. A utilização da soja na alimentação.....	9
2.4. Flatulência.....	14
2.5. Hidrólise enzimática de RO em extratos hidrossolúveis de soja ..	15
2.6. Utilização de enzimas em processos industriais	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Reagentes utilizados	20
3.2. Material genético.....	21
3.3. Germinação das sementes.....	21
3.4. Determinação das atividades enzimáticas	21
3.5. Determinação da matéria seca em sementes de soja germinadas	21
3.6. Determinação da atividade de α -galactosidase.....	22

3.6.1. Com o substrato sintético ρ -nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (ρ -NPGal)	22
3.6.2. Com açúcares não redutores como substratos	22
3.6.3. Com açúcares redutores como substratos	23
3.6.4. Com outros substratos sintéticos	23
3.7. Hidrólise de RO no extrato de soja desengordurado.....	24
3.8. Extração dos açúcares solúveis do extrato de soja desengordurado.....	24
3.9. Determinação dos açúcares solúveis por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).....	25
3.10. Purificação das α -galactosidases	26
3.10.1. PROTOCOLO 1.....	26
3.10.1.1. Preparo da amostra enzimática.....	27
3.10.1.2. Sistema de duas fases aquosas (SDFA)	27
3.10.1.3. Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose.....	28
3.10.2. PROTOCOLO 2.....	29
3.10.2.1. Preparo da amostra enzimática.....	29
3.10.2.2. Crioprecipitação e precipitação ácida	30
3.10.2.3. Fracionamento do sobrenadante com sulfato de amônio	30
3.10.2.4. Cromatografia de filtração em gel	30
3.11. Caracterização da α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja germinadas da var. CAC-1	31
3.11.1. Efeito do pH	31
3.11.2. Efeito da temperatura	31
3.11.3. Ensaios de termoestabilidade	31
3.11.4. Meia-vida da α -galactosidase	31
3.11.5. Determinação dos parâmetros cinéticos Constante de Michaelis-Menten ($K_{M\ ap}$) e Velocidade máxima ($V_{max\ ap}$) aparentes	32
3.11.6. Efeito contra íons, agentes redutores e açúcares na atividade de α -galactosidase.....	33
3.12. Determinação do teor de proteína	33

3.13. Dosagem do açúcar redutor.....	34
3.14. Determinação do teor de proteína no extrato de soja desengordurado.....	34
3.15. Determinação do teor lipídico no extrato de soja desengordurado	35
3.16. Determinação de umidade no extrato de soja desengordurado.	35
3.17. Determinação do teor de carboidratos do extrato de soja desengordurado.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Atividade de α -galactosidase de soja da variedade CAC-1 durante a germinação.....	36
4.2. Purificação da α -galactosidase de sementes de soja var. CAC-1 germinadas pelo Protocolo 1.....	37
4.2.1. <i>Caracterização da α-galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinadas</i>	40
4.2.1.1. Efeito do pH.....	40
4.2.1.2. Determinação da temperatura ótima.....	41
4.2.1.3. Termoestabilidade.....	42
4.2.1.4. Meia-vida da α -galactosidase	43
4.2.1.5. Determinação da constante de Michaelis – Menten ($K_{M\ ap}$) e velocidade máxima de reação ($V_{max\ ap}$).....	45
4.2.1.6. Determinação da atividade de α -galactosidase contra substratos específicos	50
4.2.1.7. Efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase	51
4.2.1.8. Hidrólise dos oligossacarídeos no extrato de soja desengordurado	52
4.3. Purificação de α -galactosidase de sementes de soja var. CAC-1 pelo Protocolo 2	54
5. CONCLUSÕES.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

VIANA, Simone de Fátima, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Caracterização de α -galactosidase de soja para hidrólise de oligossacarídeos de rafinose.** Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Conselheiros: Maurílio Alves Moreira e Neuza Maria Brunoro Costa.

A ingestão de grãos de leguminosas, como a soja e derivados, resulta no aparecimento de sintomas desagradáveis, o que limita o seu consumo. Dentre os sintomas desagradáveis, destaca-se a flatulência, que é resultante do metabolismo anaeróbico de α -1,6-galactosídeos de rafinose (RO: oligossacarídeos de rafinose) presentes nos grãos das leguminosas em geral. A remoção desses açúcares das sementes ou do extrato hidrossolúvel poderia aumentar o consumo de alimentos derivados de soja. Vários processos para redução do conteúdo de RO em derivados de soja já foram descritos; entretanto, a hidrólise enzimática dos RO, catalisada por α -galactosidases, parece ser o mais promissor. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência da α -galactosidase de sementes de soja em germinação para hidrolisar os RO presentes no extrato de soja. Sementes de soja (*Glycine max*, vr. CAC-1) foram germinadas por 60 h, a 27 °C. O extrato enzimático foi obtido pela trituração das sementes em tampão citrato/fosfato de sódio, pH 5,0. A suspensão foi filtrada e centrifugada, e o extrato enzimático resultante, utilizado para a

purificação da α -galactosidase. Em uma primeira abordagem, o extrato enzimático foi fracionado em um sistema de duas fases aquosas (SDFA), formado por uma mistura de 16% (p/p) de PEG 1500, 16% (p/p) de fosfato de sódio pH 5,0 e 12% (p/p) de NaCl. A enzima presente na fase superior do SDFA foi dialisada e submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose, pH 4,0. As frações com atividade de α -galactosidase, eluídas com um gradiente de NaCl (0-0,8M), foram reunidas, concentradas por ultrafiltração, originando a α -galactosidase semi-purificada. A α -galactosidase foi purificada 12,4 vezes e o rendimento do processo de purificação foi de 13,5%. Atividade máxima de α -galactosidase foi detectada em pH 5,6 a 50 °C. A enzima manteve-se em torno de 100% da atividade original após pré-incubação por 3 h, a 35 e 40 °C, mas somente 50% da atividade original foi mantida após pré-incubação a 45 °C. K_M ap para pNPGal, melibiose e rafinose determinados pelo método do duplo-recíproco foram de 0,30 mM, 0,63 mM e 6,16 mM, respectivamente. A enzima hidrolisou com maior intensidade rafinose, seguido de pNPGal, estaquiose e melibiose. Galactose, rafinose, melibiose, $CuSO_4$, SDS e CAC-1 $\frac{1}{2}$ atuaram como inibidores da atividade da enzima parcialmente purificada. Resultados do tratamento do leite de soja com a enzima mostraram redução de 72,3% de estaquiose e 89,2% de rafinose após um período de incubação de 6h, a 40 °C. Com o objetivo de aumentar o rendimento do processo de purificação, visando futuras aplicações em ensaios biológicos, um segundo protocolo foi estabelecido. O extrato enzimático obtido, como já descrito, foi submetido à crioprecipitação, precipitação ácida, fracionamento com sulfato de amônio (20-50% de saturação) e cromatografia de filtração gélica em Sephadex G-100. A α -galactosidase foi semi purificada em quatro etapas, com índice de purificação de 21,33 vezes e recuperação de 44% da atividade enzimática.

Em conclusão, observamos que a adição de α -galactosidase ao extrato de soja hidrolisou uma fração significativa dos carboidratos não digeríveis, estaquiose e rafinose, podendo diminuir a flatulência causada por esses oligossacarídeos e assim aumentar o uso desta fonte protéica vegetal na alimentação humana e animal. Além disso, essa enzima apresenta características cinéticas

compatíveis com as exigências para sua utilização em processos industriais, visando a diminuição nos teores dos oligossacarídeos de rafinose.

ABSTRACT

VIANA, Simone de Fátima, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2002. **Characterization of soybean α -galactosidase for raffinose oligosaccharides hydrolysis.** Advisor: Sebastião Tavares de Rezende. Committee members: Maurílio Alves Moreira and Neuza Maria Brunoro Costa.

The ingestion of legume seeds, like soy and derived products, results in unpleasant symptoms, which limits its consumption. Among the unpleasant symptoms, flatulence is the major one, which results from the anaerobic metabolism of α -1,6-galactosides of raffinose (RO: Raffinose oligosaccharides) generally presents in legume seeds. Removal of those sugars from soy seeds or soybean derived products would have a positive impact in soy food consumption. Several processes for RO content reduction in soy products were described, however, enzymatic hydrolyze of RO by α -galactosidase seems to be the most promising. The objectives of this work were to test α -galactosidase efficiency from germinated soy seeds to hydrolyze RO present in soybean milk. Soy seeds (*Glycine max*, cv CAC-1) were allowed to germinate for 60 h, at 27 °C. The enzymatic extract was obtained by seed trituration in a citrate /sodium phosphate, pH 5.0. Then the suspension was filtered, centrifuged and the resulting enzymatic crude extract used for α -galactosidase purification. First,

the enzymatic extract was fractionated in a Aqueous Two-Phase System (ATPS) consisted of a 16 % (w/w) polyethyleneglycol (PEG 1500) solution, 16% (w/w) of sodium phosphate pH 5.0 and 12% (w/w) of NaCl. The enzyme present in the upper phase of the ATPS was dialyzed and loaded onto a CM-Sepharose Fast Flow ionic exchange column, pH 4.0. The fractions with activity of α -galactosidase, were eluted with a gradient of NaCl (0-0.8M), they were pooled together, concentrated by ultra filtration, producing α -galactosidase partially purified. α -Galactosidase was partially purified in two stages. Purification index was 12.4 times with enzymatic activity recovery of 13.5%. Maximum α -galactosidase activity was detected in pH range of 5-6 and 50 °C. The enzyme maintained near 100% of original activity after pre-incubation for 3h at 35 and 40 °C, but only 50% of original activity after pre-incubation at 45 °C. K_M app values for hydrolyze of pNPGal, melibiose and raffinose was of 0.30, 0.63 and 6.16 mM, respectively. The enzyme was able to hydrolyze better raffinose, followed by pNPGal, stachyose and melibiose. Galactose, raffinose, melibiose, $CuSO_4$, SDS and CAC-1₂ inhibited the enzyme activity. Soybean milk treated with α -galactosidase showed reduction of 72.3 and 89.2% in the stachyose and raffinose contents, respectively, after incubation for 6h at 40°C. In order to increasing the purification process efficiency, seeking future application in biological assays, a second protocol was established. Enzymatic extract was submitted to cryoprecipitation, acid precipitation and fractionation with ammonium sulphate (20-50% of saturation) and filtrated by gel chromatography. The extract was loaded onto Sephadex G-100 column. α -Galactosidase was partially purified in four stages. Purification index was 21.33 times with enzymatic activity recovery of 44%.

In conclusion, we observed that the addition of α -galactosidase to soybean extract hydrolyzed a significant fraction of the carbohydrates non digestible, raffinose oligosaccharides, that can reduce the flatulence caused by those oligosaccharides and also can increase the use of this protein vegetable source in the human and animal feeding. Besides, that enzyme presents compatible kinetic characteristics for use in industrial processes, with the objective to reduce raffinose oligosaccharides content.

1. INTRODUÇÃO

As leguminosas apresentam teores de proteínas que variam entre 20 e 40% do peso seco (DUFFUS e SLAUGHTER, 1980; GRUPTA, 1983). Tais vegetais são utilizados principalmente como fonte indireta de proteínas, pois os animais ruminantes e não ruminantes, que fazem parte da dieta humana, são alimentados com grãos e seus derivados. Durante seu desenvolvimento, nas sementes, ocorre acúmulo de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais e compostos não nutritivos, os quais determinam o seu valor nutricional. Dentre os fatores que limitam a utilização de leguminosas, destacam-se o baixo teor de aminoácidos sulfurados, proteínas pouco digeríveis, fenômeno “hard-to-cook”, palatabilidade e capacidade de produzir flatulência (de LUMEN, 1992).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma leguminosa com características semelhantes às dos alimentos protéicos de alto valor nutritivo, por conter, em suas proteínas, quantidade suficiente de quase todos os aminoácidos essenciais (COSTA e MIYA, 1972). Segundo BOOKWALTER (1975), a qualidade nutricional de sua proteína pode ainda ser melhorada pela suplementação com metionina, aminoácido limitante da soja, e, segundo GOMES (1978), esta leguminosa possui considerável teor de minerais, principalmente de cálcio e fósforo, e de vitaminas do complexo B.

A ingestão de soja e derivados resulta no aparecimento de sintomas desagradáveis, o que limita o seu consumo. Dentre os sintomas desagradáveis, destaca-se a flatulência (de LUMEN, 1992), que é resultante do metabolismo anaeróbico de α -1,6-galactosídeos de rafinose (RO: oligossacarídeos de rafinose) presentes nos grãos das leguminosas em geral (PRICE et al., 1988). A mucosa do intestino humano e de outros animais monogástricos, como aves e suínos, é desprovida das enzimas α -1,6-galactosidases (EC.3.2.1.22 α -D-galactosil galactohidrolase), que são necessárias à conversão dos RO em açúcares mais simples. Conseqüentemente, os RO não hidrolisados são conduzidos à parte posterior do intestino, onde são fermentados anaerobicamente a CO₂, H₂ e CH₄ pela microflora (PRICE et al., 1988). Desta forma, os RO presentes na soja e outras leguminosas assumem papel restritivo quanto ao consumo destes grãos como fonte protéica. Farinha de soja contém níveis substanciais de açúcares livres, particularmente sacarose, rafinose e estaquiose (BACH KNUDSEN e LI, 1991). A presença em altas concentrações desses açúcares na dieta alimentar pode resultar na retenção de fluidos e na aceleração do trânsito intestinal, afetando a utilização e absorção de nutrientes (WIGGINS, 1984).

O extrato protéico extraído do grão de soja, comumente conhecido como leite de soja, é um produto de alto valor nutritivo e de fácil elaboração. Tem alcançado grande destaque na alimentação de crianças e adultos, particularmente naqueles que apresentam intolerância ao leite de vaca, causada por deficiências genéticas na digestão da lactose, ou por reações alérgicas às suas proteínas (VEIGA, 1984).

Segundo COSTA e MORI (1978), a soja, pelas suas qualidades nutricionais, facilidade de adaptação a quase todas regiões do globo, alta produção e facilidade de cultivo, é considerada por muitos especialistas como um dos alimentos básicos para a população do futuro, por constituir uma boa fonte de proteína de baixo custo e de alto valor nutritivo para a alimentação humana e animal.

Nesse sentido, tendo em vista a alta qualidade protéica da soja, sua grande produção no Brasil e seu baixo custo, torna-se necessária a formulação

de alimentos a base de soja com baixos teores de oligossacarídeos de rafinose, proporcionando um aumento na oferta para a população.

Portanto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar a eliminação dos RO no extrato hidrossolúvel de soja, visando à diminuição significativa do fenômeno da flatulência, o que poderia contribuir para o aumento do consumo da soja.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- i) identificar o tempo de germinação das sementes de soja, o período capaz de promover maior atividade da enzima α -galactosidase;
- ii) produzir e purificar parcialmente a α -galactosidase de sementes de soja em germinação;
- iii) caracterizar bioquimicamente e cineticamente a α -galactosidase semi-purificada;
- iv) analisar o extrato de soja quanto aos teores de carboidratos, proteínas e lipídios;
- v) avaliar a capacidade hidrolítica da α -galactosidase semi-purificada sobre os oligossacarídeos de rafinose do extrato de soja; e
- vi) determinar as condições ótimas de hidrólise, como tempo, temperatura de incubação e quantidade de enzima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Qualidade nutricional da proteína da soja

As proteínas da soja, quando adicionadas a uma série de alimentos, conferem propriedades funcionais desejáveis, como emulsificação, absorção de gordura, retenção de umidade, espessamento e capacidade de formar espuma (WOLF, 1970).

A soja contribui na alimentação 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, com exceção dos aminoácidos sulfurados, ela apresenta teores de aminoácidos devidamente balanceados (DE, 1971).

Quadro 1 – Padrões de Aminoácidos de Referência, Composição em Aminoácidos de 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	45	1,60
Leucina	66	78	1,18
Lisina	58	64	1,10
Metionina + Cistina	25	26	1,04
Fenilalanina + Tirosina	63	81	1,28
Treonina	34	42	1,23
Triptofano	11	13	1,18
Valina	35	48	1,37

Fonte: GORDON, 1970.

Os aminoácidos limitantes na soja e em todas as leguminosas são metionina e cisteína. Por outro lado, a proteína da soja é rica em lisina, aminoácido limitante nos cereais, os quais geralmente são ricos em aminoácidos sulfurados, o que torna a soja uma fonte protéica ideal para complementar os cereais (LIU, 1997; BAU et al., 2000).

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 fonte de óleo de boa qualidade.

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

Segundo HYMOWITZ (1972), os açúcares livres correspondem a 8% do total de açúcares, sendo que destes existem 60% de sacarose, 4% de rafinose

e 36% de estaquiose. O amido é encontrado em sementes verdes, mesmo assim em pequena quantidade.

2.2. Biossíntese e papel fisiológico dos RO

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

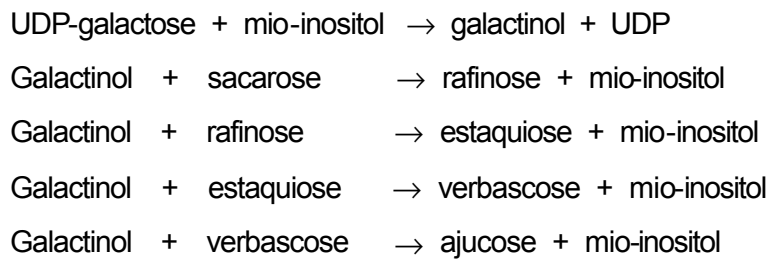
Acredita-se que o papel primário dos RO é servir como carboidratos de reserva (CHATTERTON et al., 1990; DINNI et al., 1989).

Os RO têm importantes funções nas plantas. Eles servem como metabólitos de transporte em muitas leguminosas e tem sido proposto um papel positivo na proteção ao frio. Também confere tolerância à dessecação durante a maturação da semente. Estas respostas a estresses são ocasionadas pelo resultado da ação dos RO como agentes protetores das proteínas de membrana (JONES et al., 1999).

Durante a germinação das sementes, os oligossacarídeos são a fonte primária de energia e substratos para a síntese de outros compostos (JIMÉNEZ et al., 1985).

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 previnem 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) com o se segue:



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

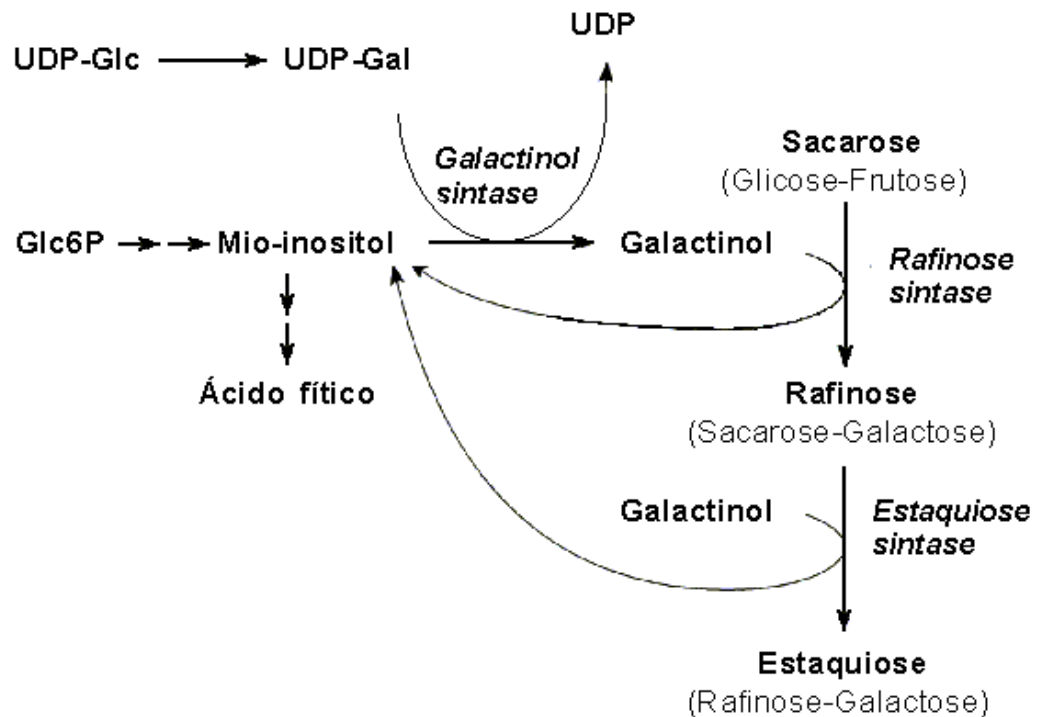


Figura 1 – Esquema da via metabólica de síntese dos oligossacarídeos de rafinose. UDP-Glc: uridina difosfato-glicose; UDP-Gal: uridina difosfato-galactose; UDP: uridina difosfato; Glc6P: glicose-6-fosfato (Retirado de GUIMARÃES, 2001).

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 α -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. De acordo com JONES et al., 1999, uma estratégia mais adequada seria a manipulação de cada etapa individual da via; entretanto, seria necessário o conhecimento do controle da expressão dos genes envolvidos em cada etapa específica dessa via. 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. Um dos mais abundantes tetrassacarídeos em plantas é a estaquiose (DEY, 1985). Em raízes e sementes, estaquiose pode ser armazenada ou transformada em outros α -galactosil oligossacarídeos. Em sementes, estaquiose é metabolizada durante a germinação. Verbascose e ajucose são os penta e hexassacarídeos, respectivamente. Estes oligossacarídeos coexistem com rafinose e estaquiose na maioria das leguminosas e estão presentes em órgãos de reserva (DEY, 1985).

A hidrólise das ligações α -1,6 glicosídicas presentes nos oligossacarídeos de rafinose, nos polissacarídeos da parede das células e nas glicoproteínas de reserva é catalisada pela α -galactosidase. Sementes maduras usualmente contêm algumas formas de α -galactosidase que diferem na sua massa molecular e atividade (LAHUTA, 2000).

A ação da α -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 α -galactosidases e de invertases. Os níveis destas enzimas aumentam durante a germinação das sementes. Invertase (EC 3.2.1.26 β -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. A utilização da soja na alimentação

A produção de soja no Brasil em 1999/2000 foi de aproximadamente 30,05 milhões de toneladas e o consumo, de 22,60 milhões de toneladas, ou seja, 75% da soja produzida no Brasil é consumida internamente. Nos Estados Unidos, da produção de 71,93 milhões de toneladas, 48,78 milhões de toneladas foram consumidas no país, o equivalente a 68%. Já na China, a produção foi de 14 milhões de toneladas e o consumo de 17,30 milhões de toneladas. Neste país, o consumo é maior do que a produção (USDA, 2001). O Brasil contribui com aproximadamente 19% da produção mundial de soja, os Estados Unidos com 45,3% e a China com 8,9%.

A soja é uma fonte de proteína de boa qualidade e baixo custo. Em nível populacional observa-se um escasso consumo de soja (grãos ou subprodutos), devido a fatores como sabor amargo, flatulência (LANDA, 1973) e baixa digestibilidade (JAFFÉ, 1968). Em investigações bioquímicas, tem-se constatado deficiência de aminoácidos sulfurados (BRESSANI et al., 1977;

RACKIS, 1974) e a presença de compostos antinutricionais, como inibidores de tripsina, hemaglutininas e oligossacarídeos. Essas pesquisas conduzem a busca de formas de eliminar os compostos mencionados e melhorar o valor nutricional da soja.

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).

Além das qualidades nutricionais, estudos recentes têm sugerido que a soja pode ter outros aspectos benéficos, incluindo propriedades antineoplásicas. Portanto, sem os fatores antinutricionais, inclusive os causadores da flatulência, a soja poderia ser 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).

O leite de soja é rico em proteínas de alta qualidade 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 são indigeríveis pelos mamíferos e podem causar flatulência em humanos. A hidrólise destes oligossacarídeos requer a ação da enzima α -galactosidase, que hidrolisa um α -galactosídeo e esta enzima não está presente no trato intestinal humano (GITZELMANN e AURICCHIO, 1965). 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).

Os oligossacarídeos de soja têm sido relatados por produzirem gás no trato gastrintestinal de ratos, cães e homem (STEGGERDA, 1968). As bactérias anaeróbicas no cólon degradam os oligossacarídeos, produzindo gases como hidrogênio, dióxido de carbono e pequenas quantidades de metano (RACKIS, 1975).

Segundo SUAREZ et al. (1999) a farinha de soja 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 houve diferença significativa na severidade de outros sintomas abdominais.

Assim, a eliminação dos RO das sementes de soja ou de seus derivados poderá conduzir à redução dos sintomas indesejáveis causados pela ingestão dos mesmos e, conseqüentemente, poderá ampliar o consumo de tais produtos.

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 14 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. A ultrafiltração da fração aquosa da soja tem sido utilizada na remoção dos oligossacarídeos da soja (SUAREZ et al., 1999). Técnicas como extração dos RO com etanol a partir de farinha de soja também foram testadas (LESKE et al., 1993).

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 com quatro diferentes tempos de germinação (0, 1, 3 e 5) dias, com o objetivo de estudar as mudanças bioquímicas e nutricionais que aconteceram. 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 diminuiram 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 (JIMÉNEZ et al., 1985).

BAU et al. (2000) concluíram que a germinação de sementes de soja resultou em um aumento substancial dos componentes biologicamente ativos em sementes de soja. O valor nutricional das sementes e as características biológicas em ratos foram também afetados pelo processo de germinação. Sementes germinadas são ricas em alguns componentes biologicamente

ativos, como lectina, fitoesteróis, saponinas, componentes osteogênicos, etc. Então sementes germinadas podem ser benéficas ao serem incorporadas nas dietas, por também reduzirem o colesterol sérico e prevenirem a obesidade, doenças cardiovasculares, câncer de útero nas mulheres e de próstata nos homens. Entretanto, os efeitos terapêuticos a que são referidos necessitam ser confirmados por estudos mais detalhados. Dessa forma, sementes de soja germinadas podem ser usadas como uma excelente alternativa, em substituição às proteínas animais, para uma dieta nutricionalmente balanceada. A duração da germinação elevou grandemente o PER (índice de eficiência protéica) das sementes, o consumo alimentar e as características biológicas nos ratos. Soja germinada (germinação ≥ 3 dias) usada nos gêneros alimentícios deve ser aquecida em condições apropriadas antes do consumo para ser assegurado a higiene, qualidade nutricional e palatabilidade.

Algumas substâncias encontradas na soja estão sendo reconhecidas por sua poderosa capacidade em prevenir câncer e outras doenças em humanos. 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).

Acredita-se que a eliminação dos RO nas sementes de soja, ou em seus derivados, poderá ser alcançada por meio da manipulação genética de plantas, alterando a síntese de um ou mais componentes importantes da via metabólica que conduz à síntese dos RO, ou pela hidrólise enzimática dos RO presentes nos extratos hidrossolúveis dos grãos de soja e outros derivados protéicos (de REZENDE, 1998).

2.4. 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.

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 flatus de 38,4% e 82,2%, o que foi atribuído ao nível de dois galactosídeos antes da 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.

2.5. Hidrólise enzimática de RO em extratos hidrossolúveis de soja

A hidrólise enzimática de RO pode ser realizada por enzimas específicas para as ligações α -1,6 que une os resíduos de galactose aos oligossacarídeos sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose, também por enzimas específicas para a ligação β -1,2 que une frutose a glicose nos mesmos oligossacarídeos acima citados.

Um esquema da via de degradação dos oligossacarídeos, bem como das enzimas envolvidas, está representado na Figura 2 (de REZENDE, 1998).

A degradação enzimática completa dos oligossacarídeos de rafinose a monossacarídeos requer a ação conjunta de duas glicohidrolases: α -galactosidases que degradam os oligossacarídeos de rafinose a galactose e sacarose e a β -frutosidase 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 β -frutosidase na estaquiose e rafinose, permanece inalterado uma vez que o resíduo α -galactosil é mantido (REHMS e BARZ, 1995).

YOSHIDA et al. (1997) estudaram a capacidade de vinte e nove cepas de leveduras em usar galactose, melibiose e rafinose para produzir α -galactosidase. Entre estas, cinco produziram α -galactosidase intra e extracelular e dois, somente a enzima intracelularmente.

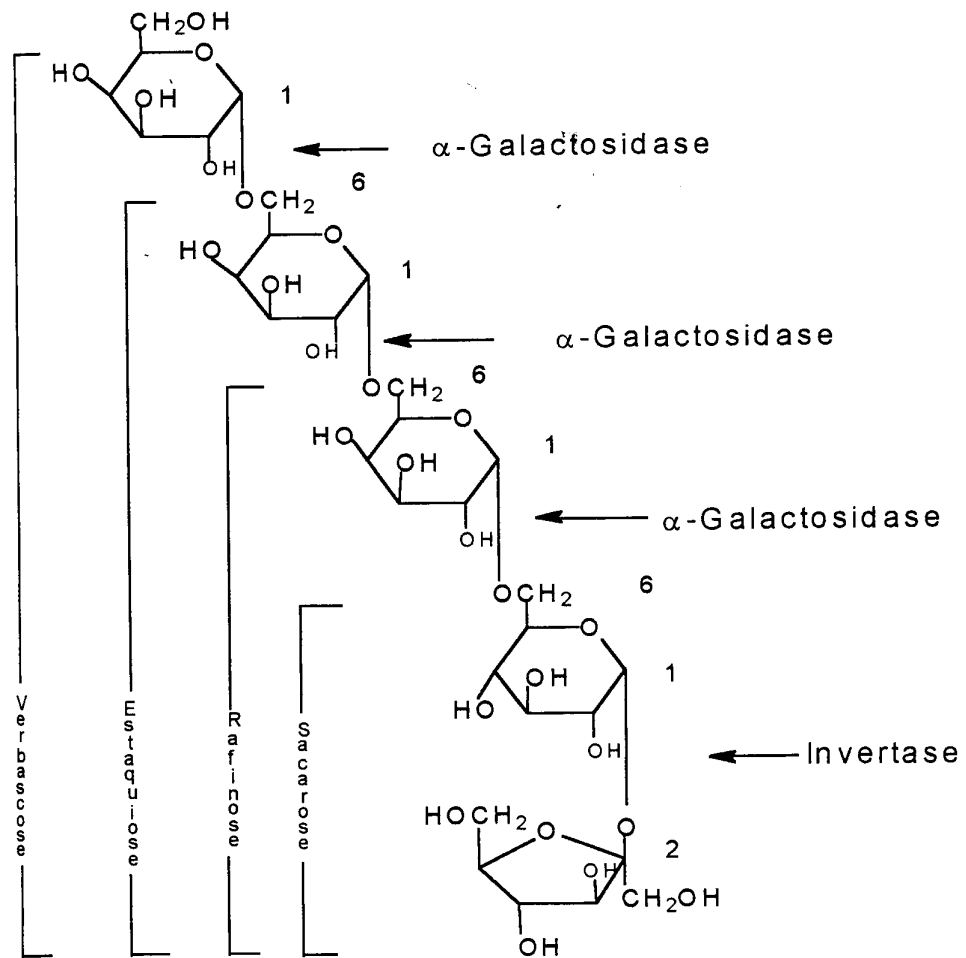


Figura 2 – Oligossacarídeos de rafinose e sítios de clivagem para as enzimas hidrolíticas invertase e α -galactosidase (Retirado de REZENDE, 1998).

SCALABRINI et al. (1998) analisaram vinte e sete isolados de *Bifidobacterium* quanto à atividade de α -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 bifidobacterias são candidatas promissoras como cultura padrão para a fermentação do leite de soja. Elas foram capazes de reduzir os α -galactooligosacarídeos que podem levar a flatulência e os aldeídos alquílicos

responsáveis pelo “beany flavour”. Alguns isolados produziram também baixas quantidades de ácido acético, que produz gosto desagradável.

Existem vários relatos sobre a utilização de α -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 α -galactosidase pelo fungo *Aspergillus fumigatus* foi estudada por 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. CRUZ e PARK (1982) estudaram a produção de α -galactosidases pelo fungo *Aspergillus oryzae* e sua aplicação na hidrólise dos RO em leite de soja. Com o mesmo objetivo, KOTWAL et al. (1998) estudaram a produção de α -galactosidase pelo fungo *Humicola sp.*; THANANUNKUL et al. (1976) avaliaram micélios de *Mortierella vinacea* imobilizados em gel de poliacrilamida como fonte de α -galactosidase para remoção dos RO no leite de soja e CRUZ e PARK (1982) utilizaram preparações das enzimas α -galactosidase e invertase produzidas por *Aspergillus oryzae*. Também foi avaliado por SANNI et al. (1997) o efeito de α -galactosidases extracelulares produzidas por *Lactobacillus plantarum* na qualidade nutricional do leite de soja e derivados.

Estudos utilizando fontes vegetais para a obtenção de α -galactosidases nos processos de hidrólise dos RO em leite de soja ainda são escassos. MULLIMANI e DEVENDRA (1998) usaram sementes de *Cassia sericea* como fonte de α -galactosidase para hidrólise dos RO. Esses autores demonstraram que, após 3 h, os oligossacarídeos, rafinose, estaquiose e verbascose foram hidrolisados. A utilização de α -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 α -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; fato observado por MULIMANI et al. (1997), os quais utilizaram α -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.

2.6. Utilização de enzimas em processos industriais

As α -galactosidases apresentam grande potencial 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). Cepas de fermento geralmente utilizam a frutose liberada deste trissacarídeo, após hidrólise pela invertase (β -frutofuranosidase) mas, não o dissacarídeo residual, melibiose. Portanto, a hidrólise completa da rafinose requer a ação da invertase e α -galactosidase. Algumas α -galactosidases de eucariotos são capazes de remover resíduos de galactose da ligação α -1,3 terminal de glucanas, 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 α -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 α -galactosidase. É importante que o modo de ação e a estabilidade das α -

galactosidases sejam conhecidos, pois as demandas industriais com estas propriedades reduzem os custos para resfriamento e reaquecimento. O uso potencial das α -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- β -1,4-mananases na polpa de papel Kraft.

3. MATERIAL 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- α -D-galactopiranosídeo, p -nitrofenol, rafinose, estaquiase, glicose, melibiose, galactose e metil α -D-manopiranosídeo foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

As resinas Sephadex G-100, 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.

O produto extrato de soja desengordurado foi fornecido pela Empresa Bunge Alimentos S/A, Esteio - RS - Brasil.

3.2. Material genético

Sementes de soja (*Glycine max* L. Merr. cv. CAC-1) 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).

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 e 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. Nos tempos (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96) horas, amostras de sementes foram retiradas da câmara de germinação e congeladas para posteriores análises.

3.4. Determinação das atividades enzimáticas

Para a extração da enzima α -galactosidase, quatro sementes de soja germinadas foram pesadas e homogeneizadas em gral de porcelana com 4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e centrifugadas a 14.000 rpm em centrífuga tipo Eppendorff modelo 5415C, por 20 min, a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios de atividade de α -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 um grama de amostras que foram colocadas em estufa a 75 °C, por 12 horas. Após esse tempo, as amostras foram novamente pesadas e a matéria seca, determinada por diferença.

3.6. Determinação da atividade de α -galactosidase

3.6.1. Com o substrato sintético *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (*p*-NPGal)

A atividade de α -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 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 μ L de solução 2 mM de *p*-NPGal, 0-100 μ L da preparação enzimática. A reação foi conduzida por 15 min em banho-maria a 37 °C e interrompida pela adição de 1 mL de solução 0,5 M de Na₂CO₃. Os valores de absorbância em 410 nm foram transformados em μ moles de *p*-nitrofenolato (*p*-NP), utilizando uma curva padrão construída com 0–0,20 μ moles de *p*-NP e solução estoque de concentração 2 μ mol/mL. Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de proteína necessária para produzir um μ mol de *p*-NP por minuto nas condições de ensaio.

3.6.2. Com açúcares não redutores como substratos

Ensaio para a atividade de α -galactosidase foram realizados contra açúcares não redutores rafinose e estaquiase com o uso do reagente dinitrossalicilato (DNS) (MILLER, 1956). O sistema de reação continha 100 μ L de enzima semi-purificada, 400 μ L de solução de açúcar 100 mM e 500 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. O ensaio foi conduzido por 20 min, a 40 °C. Após esse período, foi adicionado 1,0 mL do reagente de DNS. A amostra foi fervida por 5 min e acrescentados 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 μ moles de glicose, utilizando solução estoque de concentração 1 mg/mL. Uma unidade de

enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

3.6.3. Com açúcares redutores como substratos

Os ensaios da atividade de α -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 50 μL de enzima semi-purificada, 200 μL de solução de açúcar redutor 100 mM e 250 μL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A reação foi conduzida por 30 min, a 40 °C e a reação foi 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 formado foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm, por meio de uma curva padrão construída com 0-20 μmoles de glicose, utilizando solução estoque de concentração 1 mg/mL. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol 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- α -D-glicopiranosídeo ($p\text{NP}\alpha\text{Glc}$), p -nitrofenil- α -D-xilopiranosídeo ($p\text{NP}\alpha\text{X}$), p -nitrofenil- α -D-arabinopiranosídeo ($p\text{NP}\alpha\text{A}$), p -nitrofenil- α -D-manopiranosídeo ($p\text{NP}\alpha\text{M}$), p -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo ($p\text{NP}\beta\text{Gal}$) e o -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo ($o\text{NP}\beta\text{Gal}$) foi formado por 10 μL enzima semi-purificada, 250 μL de solução de substrato 2 mM e 740 μL 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

absorbância a 410 nm foram transformados em μ moles de *p*-nitrofenol (*p*NP) formado, utilizando a mesma curva padrão descrita no item 3.6 1.

3.7. 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 aparelho Politron por 5 min. Porções de 1,2 g do extrato reconstituído foram transferidas para erlenmeyers de 10 mL. Cinco unidades (5 U) de enzima semi-purificada, segundo o protocolo 1, foram adicionadas a essa mistura, que foi incubada por (2, 4 e 6) h, a 40 °C sob agitação de 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.

Para a enzima obtida pelo protocolo 2, foram também conduzidos dois experimentos de hidrólise, seguindo os mesmos passos do experimento anterior, à exceção daqueles em que foram utilizados 5 e 10 U de enzima para cada experimento, em que a temperatura foi de 45 °C e os tempos de incubação de (1, 2, 3 e 4) h. Os ensaios também foram realizados com 1,2 g do extrato reconstituído e a mesma quantidade de enzima fervida.

3.8. 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 Eppendorff 5415C (14.000 rpm) por 5 min. O extrato alcoólico total obtido foi evaporado em estufa a 50 °C, e os açúcares ressuspendidos em 1,2 mL de água deionizada. Essa solução aquosa contendo os açúcares foi submetida à centrifugação por 5 min, filtrada em filtro Milipore de 0,45 micra de diâmetro e o filtrado obtido foi armazenado em freezer a -20 °C para posterior análise no HPLC (Cromatografia líquida de alto desempenho).

3.9. Determinação dos açúcares solúveis por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)

Os RO extraídos do extrato de soja desengordurado tratado e não tratado enzimaticamente com a α -galactosidase foram analisados por HPLC em cromatógrafo Shimadzu 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 (-NH₂). Como fase móvel, foi utilizada mistura de acetonitrila:água (75:25) em condições isocráticas. As análises foram realizadas a 30 °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, 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 (3, 3, 4, 4) % (p/v), respectivamente, foram feitas diluições de (10, 20, 30 e 40) vezes para obtenção das soluções padrão. Cada solução padrão foi injetada no HPLC para obtenção das curvas, correlacionando área do pico com a concentração do açúcar na mistura. As retas foram obtidas por regressão linear e os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99. Um volume de 20 μ L de cada amostra analisada 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 no microcomputador acoplado no HPLC, equipado com o programa de computador LC-10 versão 2.2. para Windows.

3.10. Purificação das α -galactosidases

3.10.1. PROTOCOLO 1

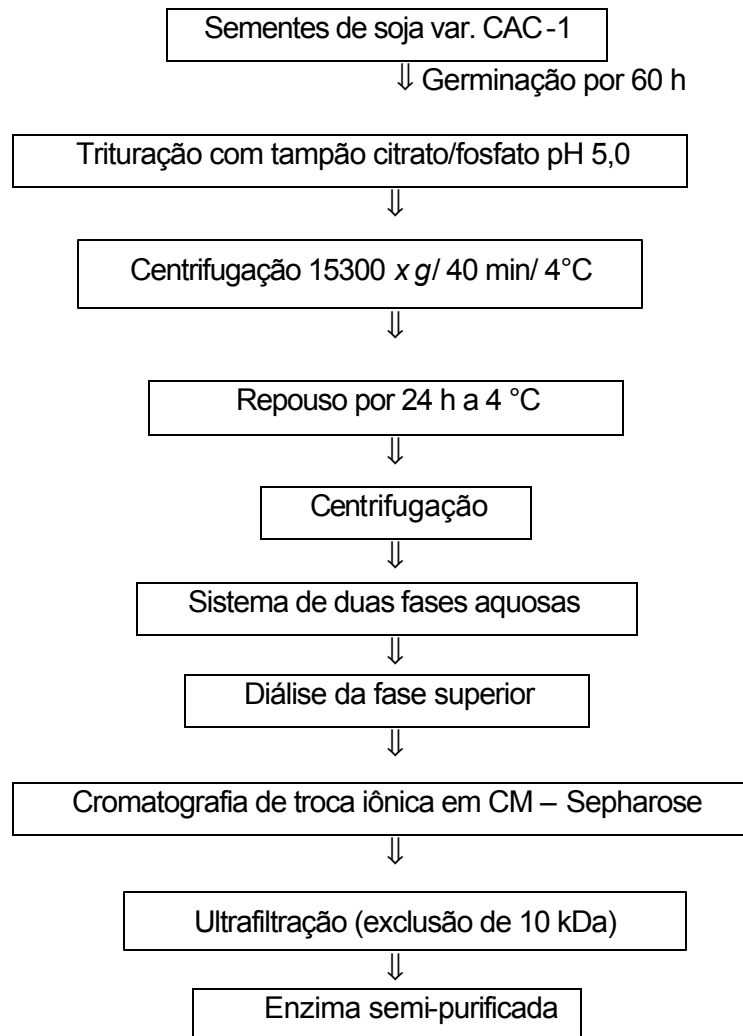


Figura 3 – Esquema das etapas de purificação.

3.10.1.1. *Preparo da amostra enzimática*

O preparo do extrato enzimático foi feito segundo GUIMARÃES (2001). Amostras de 120 g de sementes de soja, variedade CAC-1, foram colocadas em germinador a 27 °C, por 60 horas. Após esse período, foram retiradas e congeladas a -20 °C. As sementes germinadas (423 g) foram trituradas em liquidificador com 870 mL de tampão citrato 0,1 M, pH 5,0, contendo 0,05 M de fosfato de sódio. O extrato foi incubado sob agitação por 1 h, a 4 °C. A suspensão foi, então, filtrada e centrifugada a 15.300 x g, por 40 min, a 4 °C.

3.10.1.2. *Sistema de duas fases aquosas (SDFA)*

O extrato enzimático, obtido no item 3.10.1.1, foi submetido ao sistema de duas fases aquosas (SDFA) (HUSTEDT et al., 1985).

Primeiramente foram preparadas as soluções de PEG 1500 50% (p/p) e fosfato 40% (p/p). A solução de PEG foi preparada com 200 g de PEG e o volume foi completado para 400 g com água. Essa solução foi deixada sob agitação por cerca de 3 h. A solução de fosfato foi preparada utilizando 119,13 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 86,17 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ e o volume foi completado para 400 g com água. Essa solução permaneceu sob agitação por aproximadamente, 3 h.

O SDFA consistia de 224 g da solução de PEG, 280 g da solução fosfato, 84 g de cloreto de sódio (12%), 112 g de extrato enzimático, segundo GUIMARÃES (2001). Amostras de 50 g da mistura aquosa foram transferidas para tubos de centrifuga, onde eram misturadas no vórtex por 1 min e, então, centrifugadas por 5 min, a 4.100 x g, a 8 °C. Os volumes das fases superior e inferior foram determinados em tubos graduados, e coletados separadamente. Os coeficientes de partição da enzima α -galactosidase (K_{enz}) e das proteínas (K_{prot}) no SDFA foram calculados medindo a atividade de α -galactosidase, utilizando p-NPGal e o teor protéico em cada fase, utilizando o método de BRADFORD.

$$K_{enz} = \frac{\text{atividade } \alpha\text{-galactosidase fase superior}}{\text{atividade } \alpha\text{-galactosidase fase inferior}}$$

$$K_{prot} = \frac{\text{concentração proteína fase superior}}{\text{concentração proteína fase inferior}}$$

As fases superiores resultantes do SDFA contendo a α -galactosidase foram reunidas e dialisadas contra tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, por 5 h, a 4 °C.

3.10.1.3. *Cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose*

A amostra dialisada, proveniente do item 3.10.1.2, foi submetida à cromatografia de troca iônica, catiônica, em uma coluna (25,5 x 1,5 cm) de CM-Sepharose Fast Flow (Pharmacia), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0. As proteínas foram eluídas com 100 mL desse tampão, seguido por um gradiente crescente formado por 300 mL do tampão acetato de sódio e 300 mL desse mesmo tampão contendo 0,8 M de NaCl, a 4 °C, com fluxo de 42 mL/h. Frações de 4,2 mL foram coletadas. As frações eluídas contendo atividade de α -galactosidase foram reunidas e concentradas por ultrafiltração, utilizando-se uma membrana de 30 kDa, até o volume final de 40 mL.

3.10.2. PROTOCOLO 2

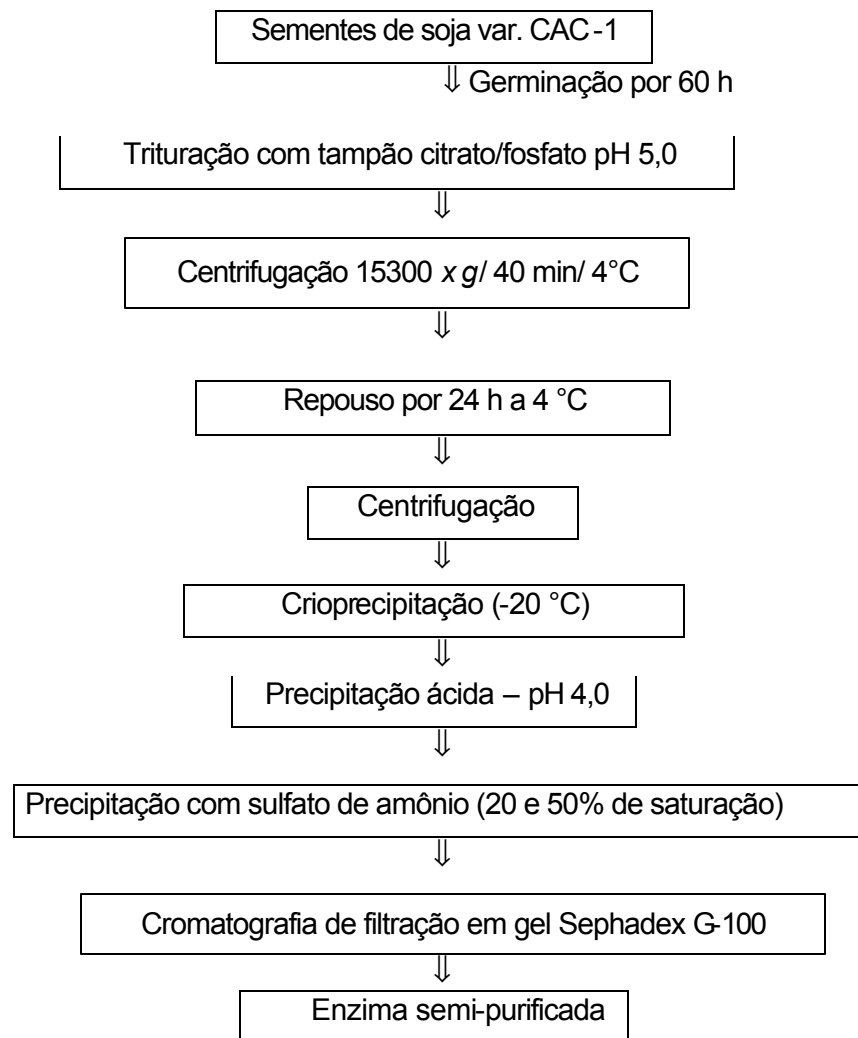


Figura 4 – Esquema das etapas de purificação.

3.10.2.1. Preparo da amostra enzimática

A preparação da amostra contendo atividade de α -galactosidase foi realizada como descrito anteriormente no item 3.10.1.1.

3.10.2.2. Crioprecipitação e precipitação ácida

O sobrenadante obtido de acordo com o item anterior foi submetido ao processo de crioprecipitação (mantido a 4 °C por 24 h) e centrifugado como descrito no item 3.10.1.1.

O sobrenadante foi, então, submetido a uma precipitação ácida com a adição de ácido cítrico até abaixar para pH 4,0. Após agitação por 30 min, o extrato foi novamente centrifugado.

3.10.2.3. 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 foram adicionados lentamente e sob agitação, a 4 °C, 31,8 g de sulfato de amônio, correspondendo a 20% de saturação. A amostra foi centrifugada por 35 min a 15.300 x g, a 4 °C. O precipitado foi descartado e no sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até atingir 50% de saturação. A amostra foi centrifugada como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 12 mL de tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0. Após cada etapa de purificação, foram feitas as determinações do teor de proteína, segundo LOWRY et al. (1951), e da atividade de α -galactosidase, como descrito no item 3.6.1.

3.10.2.4. Cromatografia de filtração em gel

A amostra obtida no item 3.10.2.3 foi submetida a cromatografia de filtração em gel em uma coluna (35 x 1,5 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 18 mL/h, e coletadas frações de 3,0 mL. As frações com atividade de α -galactosidase foram reunidas.

3.11. Caracterização da α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja germinadas da var. CAC -1

3.11.1. Efeito do pH

Para determinação do pH ótimo da atividade de α -galactosidase, a mistura de reação e as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.6.1, exceção do ensaio realizado com diferentes valores de pH, utilizando tampão Mcllvaine.

3.11.2. Efeito da temperatura

As condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 3.6.1, exceto no ensaio conduzido em várias temperaturas (30 °C a 70 °C). A solução tampão usada nesses ensaios foi de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0.

3.11.3. Ensaio de termoestabilidade

A estabilidade térmica da enzima α -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 (35, 40, 45 e 50) °C, por (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180) min. Após cada tempo de pré-incubação, o substrato foi adicionado e o ensaio para atividade de α -galactosidase foi conduzido a 40 °C, como descrito no item 3.6.1.

3.11.4. Meia-vida da α -galactosidase

O ensaio para determinar a meia-vida da enzima foi feito utilizando 10 μ L de enzima semi-purificada, 740 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Essa mistura foi pré-incubada nas temperaturas (40, 45 e 50) °C por tempos pré-determinados. A cada 30 min, aos tubos de ensaios foram

acrescentados 250 μ 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 Na₂CO₃. A absorbância das amostras foi determinada a 410 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em velocidade utilizando a curva padrão descrita no item 3.6.1.

3.11.5. 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 diferentes concentrações dos substratos. Para a determinação desses parâmetros para a α -galactosidase semi-purificada pelo protocolo 1, foram utilizados os substrato p-NPGal, rafinose e melibiose. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos como descrito no item 3.6, utilizando as concentrações (0,025, 0,05, 0,10, 0,15, 0,25, 0,50, 1,0 e 1,5) mM de p-NPGal. A atividade de α -galactosidase contra o substrato rafinose (concentrações de (0,25, 0,5, 1,5, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0) mM) foi medida pela formação de açúcar redutor com o uso do reagente dinitrossalicilato (MILLER, 1956). Com o substrato melibiose (concentrações de (0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 5,0) mM), a atividade de α -galactosidase foi determinada pela formação de glicose livre utilizando o método da glicose oxidase (STERNBERG et al., 1970). 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 ou do método do duplo recíproco, gráfico de Lineweaver-Burk, utilizando o inverso da velocidade contra o inverso da concentração do substrato (LINEWEAVER e BURKE, 1934). Foi utilizado o programa Curve Expert, versão 1.3 para Windows (HYAMS, 1997).

3.11.6. Efeito contra íons, agentes redutores e açúcares na atividade de α -galactosidase

O efeito de íons, açúcares e agentes redutores na atividade da enzima α -galactosidase semi-purificada pelo protocolo 1 foi testado utilizando o seguinte ensaio: 10 μ L de enzima semi-purificada, 200 μ L de soluções 10 mM dos compostos $MgCl_2$, $CAC-1_2$, KCl, $CuSO_4$, NaCl, SDS, β -mercaptoetanol, D-galactose, D-glicose, sacarose, rafinose, melibiose, EDTA, Iodoacetamida e 540 μ L de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A mistura foi incubada por 15 min, a 40 °C, e, após esse período, foram acrescentados 250 μ L de solução 2 mM de pNPGal e o ensaio para a atividade de α -galactosidase foi conduzido como descrito no item 3.6.1.

3.12. Determinação do teor de proteína

Os teores de proteínas nos extratos enzimáticos foram quantificados conforme descrito por BRADFORD (1976). Um volume de 0–100 μ L das preparações foi misturado com 1 mL do reagente de Bradford e a absorbância das amostras, determinada a 595 nm, utilizando-se uma curva padrão construída com 0 a 20 μ g de albumina sérica bovina (BSA).

Para o preparo do reagente de Bradford, utilizaram-se 100 mg de Comassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol e 100 mL de ácido fosfórico 85%. A mistura foi deixada sob agitação e, após a solubilização, o volume foi completado para 1 L e a solução, filtrada em papel Whatman n°1. O método baseia-se no desenvolvimento da cor, em função da ligação da proteína com o pigmento Comassie Brilliant Blue G-250.

Para as preparações enzimáticas obtidas pelo protocolo 2, os teores protéicos foram determinados de acordo com o método descrito por LOWRY et al. (1951), utilizando o reagente de fenol Folin. Foram preparadas as seguintes soluções: Reagente 1 (0,25 g de $CuSO_4$, 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 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 Folin-Ciocalteu e 5 mL de água) foram preparados alguns minutos antes da sua utilização no ensaio. Em 10 μ L de amostra foram adicionados 990 μ 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 0-70 μ g de albumina sérica bovina.

3.13. Dosagem do açúcar redutor

A dosagem do açúcar redutor foi feita utilizando a amostra contendo o açúcar redutor e nela foi adicionado 1 mL do reagente de DNS e a mistura foi fervida por 5 min (MILLER, 1956). A absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. A curva padrão foi construída utilizando 0 a 20 μ L de solução de glicose 1 mg/mL. O reagente de DNS foi preparado adicionando-se lentamente a solução A (1 g de DNS dissolvido em 20 mL de NaOH 2N aquecidos) à solução B (30 g de tartarato de sódio e potássio dissolvidos em 100 mL de água destilada) e o volume final completado para 100 mL.

3.14. Determinação do teor de proteína no extrato de soja desengordurado

O teor de proteínas foi determinado, segundo o método de Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total descrito pela ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC (1975) com modificações. Na fase de digestão da amostra, quando o material se apresentou aparentemente digerido, foi adicionada solução de peróxido de hidrogênio 30%, levando-se a mistura ao aquecimento por 30 minutos. Na fase de destilação, a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico 4%. Para conversão de nitrogênio em proteína foi usado o fator 6,25.

3.15. Determinação do teor lipídico no extrato de soja desengordurado

Os lipídios foram determinados em aparelho extrator de Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente, segundo o procedimento descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), com refluxo por 24 horas.

3.16. Determinação de umidade no extrato de soja desengordurado

O teor de umidade foi determinado de acordo com Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1976). Assim, para o extrato de soja desengordurado foram pesadas amostras de, aproximadamente, um grama e colocadas em estufa a 105 °C, por 24 horas.

3.17. Determinação do teor de carboidratos do extrato de soja desengordurado

O teor de carboidratos foi determinado por diferença percentual, considerando os teores de proteínas, lipídios e cinzas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade de α -galactosidase de soja da variedade CAC-1 durante a germinação

Para determinar o tempo de maior atividade da enzima, sementes de soja var. CAC-1 foram colocadas para germinar, e nos extratos dos cotilédones dessas sementes foram determinados os teores de umidade e de proteínas, além da atividade de α -galactosidase (Quadro 2).

Analisando os dados apresentados no Quadro 2, nota-se que os maiores valores para a atividade específica foram observados nos tempos de 60 e 84 h de germinação.

Apesar da maior atividade específica ter sido expressa no tempo de 84 h, o tempo utilizado na germinação das sementes foi 60 h, devido à facilidade em manusear as sementes e por estas apresentarem maior atividade de α -galactosidase. Observou-se que as sementes germinadas por 84 h são de difícil trituração e o teor de proteínas foi bem menor, por isso apresentou atividade específica maior.

Com base nesse resultado, sementes de soja var. CAC-1, germinadas por 60 h, foram utilizadas para produção do extrato visando a realização de trabalhos de purificação e caracterização da α -galactosidase.

Quadro 2 – Matéria seca, teor de proteína e atividade de α -galactosidase de sementes de soja var. CAC-1 em germinação

Tempo germinação (h)	Matéria seca* (mg)	Proteína (%)	Atividade Total (U/mL)	Atividade específica (U/mg ptn)	Atividade/ Matéria seca (U/mg ms)
0	494,5	8,03	0,29	0,036	0,0023
12	558,4	10,07	0,23	0,023	0,0016
24	543,9	10,59	0,24	0,022	0,0017
36	741,5	15,40	0,38	0,024	0,0020
48	581,8	8,74	0,27	0,032	0,0018
60	504,9	7,83	0,30	0,038	0,0023
72	575,5	7,22	0,23	0,032	0,0016
84	395,2	5,58	0,24	0,044	0,0024
96	497,6	7,41	0,20	0,027	0,0016

*ms = Matéria seca

A atividade específica de α -galactosidase determinada no tempo de 60 h de germinação das sementes está em acordo com os resultados obtidos por GUIMARÃES (2001), que encontrou pico de atividade da enzima α -galactosidase nas sementes de soja var. Doko germinadas após 48–60 h. O aumento da atividade de α -galactosidase durante o processo germinativo também foi descrito por CRUZ e SILVA (1986), que trabalhando com sementes de soja da variedade Paraná, encontraram um pico de atividade no período de 60-72 h após a embebição das sementes.

4.2. Purificação da α -galactosidase de sementes de soja var. CAC-1 germinadas pelo Protocolo 1

O extrato enzimático obtido a partir de sementes de soja var. CAC-1 germinadas por um período de 60 h foi submetido ao fracionamento em um

sistema de duas fases aquosas (SDFA). O resultado dessa etapa de purificação está representado no Quadro 3.

Quadro 3 – Atividade de α -galactosidase de soja var. CAC-1 germinada e teor de proteínas em cada uma das fases do sistema de duas fases aquosas

Parâmetros	Sistema de duas fases aquosas (SDFA)	
	Fase superior (FS)	Fase inferior (FI)
Volume (mL)	208	210
Atividade (U/mL)	0,19	0,03
Proteína (mg/mL)	0,48	0,83
Atividade específica (U/mg)	0,38	0,03

O K_{prot} foi de 0,58, mostrando que a concentração de proteína foi maior na fase inferior e o K_{enz} foi 6,34, revelando que a atividade enzimática estava concentrada na fase superior.

Esta etapa purificou a enzima em torno de 3,28 vezes, com um rendimento de 34%. Processo semelhante foi utilizado por FALCO et al. (2000) para purificação da α -galactosidase de sementes de *Sesbania marginata*. Segundo esses autores essa etapa rendeu uma purificação de 5,7 vezes, com uma taxa de recuperação de 144 %. Também GUIMARÃES et al. (2001), purificando α -galactosidases de sementes de soja em germinação, utilizaram o fracionamento das proteínas no sistema de duas fases aquosas e obtiveram, nesse processo, purificação de 13 vezes, com rendimento de, aproximadamente, 70% da atividade enzimática. TANUJA et al. (2000) referem-se ao sistema de duas fases aquosas como uma alternativa para a recuperação e purificação de enzimas intra e extracelulares.

O material da fase superior do SDFA foi dialisado e submetido à cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna de CM-Sepharose. O perfil desta eluição está representado na Figura 5.

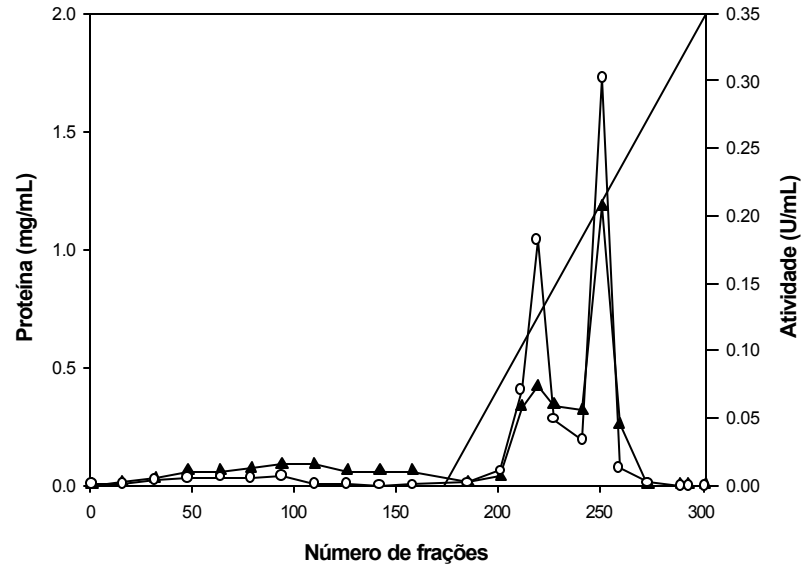


Figura 5 – Perfil da cromatografia da amostra de α -galactosidase proveniente da fase superior do SDFA, em coluna de troca iônica CM-Sepharose. Atividade de α -galactosidase (o); proteínas (); gradiente salino em concentração molar de cloreto de sódio variando de 0 a 0,8 M (—).

O perfil de eluição da cromatografia de troca iônica da α -galactosidase proveniente da fase superior do SDFA revelou a presença de dois picos protéicos com atividade de α -galactosidase. Esses picos protéicos foram reunidos, concentrados por ultrafiltração e armazenados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O resumo dos processos de purificação está mostrado no Quadro 4. A amostra foi purificada 12,4 vezes, com o rendimento final de aproximadamente 13,5 % da atividade enzimática.

Quadro 4 – Resumo dos processos de purificação da α -galactosidase de sementes de soja var. CAC-1 germinada

Etapas da purificação	Prot. total (mg)	Ativ. total (U)	Ativ. específica (U/mg prot.)	*Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	1388,12	103,32	0,07	1	100
SDFA	147,4	35,2	0,23	3,28	34,0
Amostra dialisada	108,3	34,2	0,31	4,42	33,1
CM-Sepharose	29,63	26,44	0,89	12,7	25,6
Ultrafiltração	16,0	14,0	0,87	12,4	13,5

1 U = μ mol de p-NP formado por minuto por mL de extrato enzimático.

* Fator de purificação = atividade específica em relação ao extrato bruto

4.2.1. Caracterização da α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinadas

4.2.1.1. Efeito do pH

A atividade de α -galactosidase semi-purificada foi testada na faixa de pH compreendida entre 2,5 e 8,0, na temperatura de 37 °C, utilizando o substrato sintético p-NPGal. Foram encontradas atividades consideráveis na faixa de pH de 3,5–6,0; entretanto, a atividade máxima foi detectada em pH 6,0. Atividades menores foram determinadas em pH (2,5 e 7,0). A atividade de α -galactosidase foi praticamente nula em valores de pH na faixa de pH 7,5–8,0 (Figura 6).

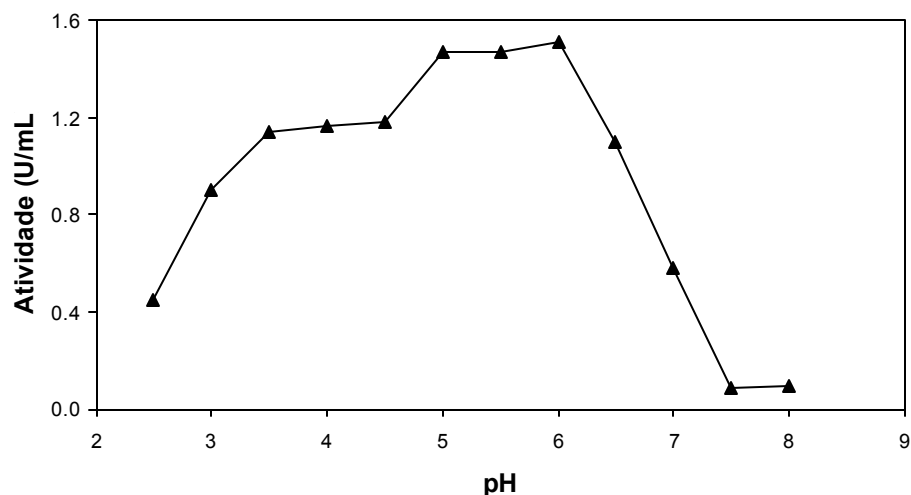


Figura 6 – Efeito da variação do pH na atividade da enzima α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada.

CRUZ et al. (1981) encontraram o pH ótimo de 7,0 para a α -galactosidase de *Cladosporium cladosporioides*. MANSOUR e KHALIL (1998) demonstraram que o pH ótimo para a α -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi de 4,5 e para α -galactosidase de *Cl. Cladosporides* e *Aspergillus niger*, de 5,0. A α -galactosidase isolada do fungo *Aspergillus fumigatus* hidrolisou rafinose e melibiose no pH de 4,5 e 5,5, respectivamente (de REZENDE, 1998). DEY (1981) purificou α -galactosidase de sementes de *Castanea sativa* e obteve dois picos de atividade enzimática, sendo que a primeira fração apresentou pH ótimo de 4,5 e a segunda fração, pH ótimo de 6,0. GUIMARÃES et al. (2001) determinaram que o pH ótimo estava na faixa de 5,0–5,5 para α -galactosidase de soja.

4.2.1.2. Determinação da temperatura ótima

Quando a atividade de α -galactosidase semi-purificada foi ensaiada na faixa de temperatura de (30 a 70) °C, observou-se maiores atividades na faixa de temperatura compreendida entre (40 a 55) °C; entretanto, a temperatura ótima para a atividade enzimática utilizando o substrato p-NPGal foi de 50 °C (Figura 7).

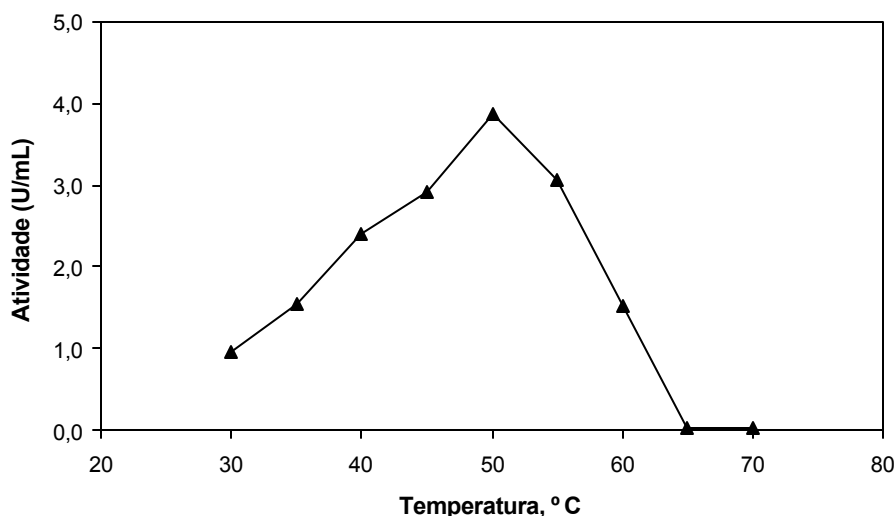


Figura 7 – Efeito da temperatura na atividade da α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada.

Segundo de REZENDE e FELIX (1997), a temperatura ótima para hidrólise de rafinose e melibiose para a α -galactosidase de *Aspergillus fumigatus* foi de (55 e 60) °C, respectivamente. MANSOUR e KHALIL (1998) mostraram que a temperatura ótima para a atividade da α -galactosidase isolada de *Cladosporium cladosporides*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* foram de (40, 50 e 50) °C, respectivamente. GUIMARÃES et al. (2001) encontraram uma faixa de temperatura ótima de (45 a 50) °C para a atividade de α -galactosidase de soja. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os trabalhos citados.

4.2.1.3. Termoestabilidade

Para os ensaios de termoestabilidade, amostras da enzima semi-purificada foram pré-incubadas à temperatura de (35, 40, 45 e 50) °C por tempos que variaram entre (0 e 180) min.

A α -galactosidase semi-purificada manteve sua atividade original quando incubada a (35 e 40) °C, por um período de 180 min. Na temperatura de 45 °C, a enzima perdeu 60% de sua atividade original após 120 min de pré-incubação, mas permaneceu com essa atividade residual até o final do período de 180 min

de pré-incubação. Já na temperatura de 50 °C, a enzima perdeu 78% de sua atividade original após 30 min de pré-incubação (Fig. 8).

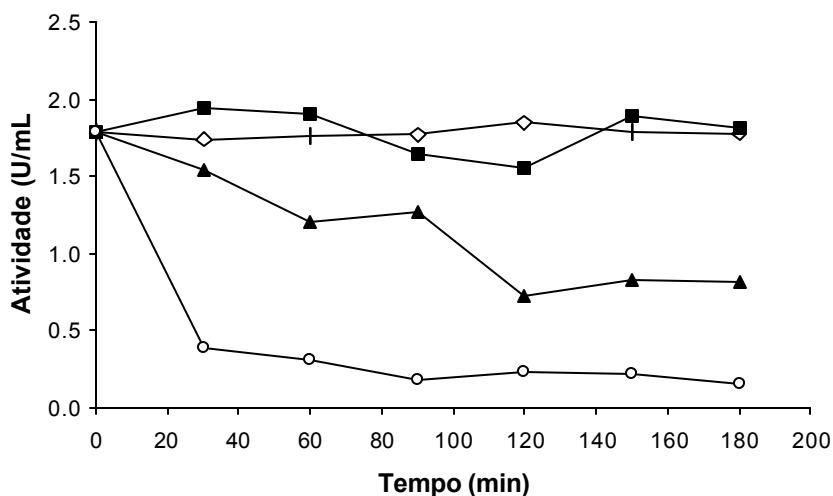


Figura 8 – Efeito da temperatura e do tempo de pré-incubação na estabilidade α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas por vários tempos nas temperaturas de 35 °C (□), 40 °C (◇), 45 °C (▲) e 50 °C (○). Após a pré-incubação os ensaios com o substrato p -NPGal foram realizados a 37 °C.

SOMIARI e BALOGH (1995) mostraram que a α -galactosidase isolada do *Aspergillus niger* foi estável na temperatura de pré-incubação de (35-50) °C por 1 h. Segundo DEY e PRIDHAM (1972), α -galactosidases exibem diferentes padrões de termoestabilidade, dependendo da sua origem. GUIMARÃES et al. (2001) mostraram que a α -galactosidase de soja foi estável a 40 °C.

4.2.1.4. Meia-vida da α -galactosidase

Os valores de meia-vida da α -galactosidase semi-purificada nas temperaturas de (40, 45 e 50) °C foram calculados por meio de uma curva obtida por regressão não-linear da variação da velocidade em função do tempo

de pré-incubação. Esses parâmetros foram calculados utilizando o programa Curve Expert, versão 1.3 para windows.

Na temperatura de 45 °C, a meia-vida da enzima foi de 337,30 min (Figura 9) e a 50 °C, a meia-vida foi de 30,26 min (Figura 10). Já em 40 °C, o ensaio foi realizado até 780 min e não foi possível alcançar a metade da atividade da enzima, não sendo possível obter a meia-vida da enzima.

DUFFAUD et al. (1997) purificaram α -galactosidase de *Thermotoga neapolitana* 5068 e determinaram que a sua meia-vida a 85 °C que foi de 8,5 h e a 90 °C que foi de 130 min e a 100 °C, 3 min. PUCHART et al. (2000) trabalhando com α -galactosidase de *Thermomyces lanuginosus* encontrou meia-vida de 3 h, a 65 °C. GUIMARÃES (2001) realizou ensaios a 30 °C com duas formas da enzima α -galactosidase de soja e obteve uma meia-vida de 253,95 min para a fração P1 e 1199,4 min para a fração P2.

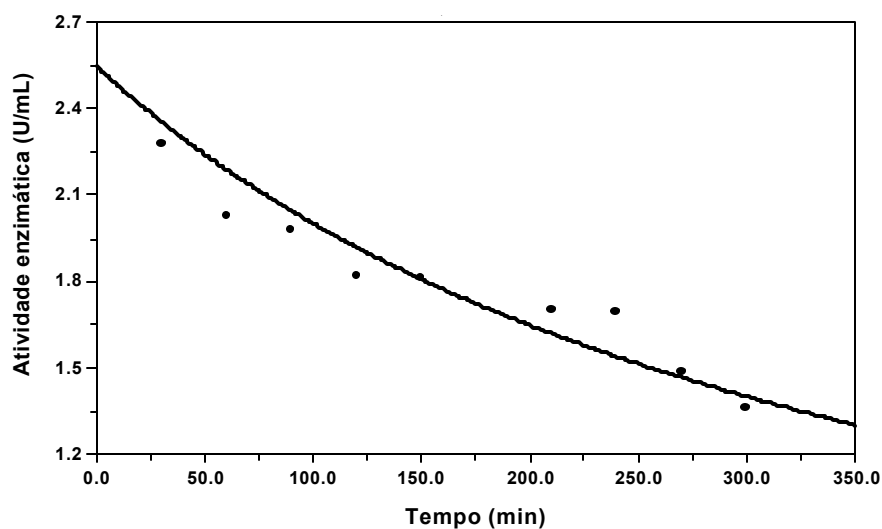


Figura 9 – Efeito do tempo de pré-incubação na temperatura de 45 °C, na atividade α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada. Cada ponto representa a média de três repetições. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10%.

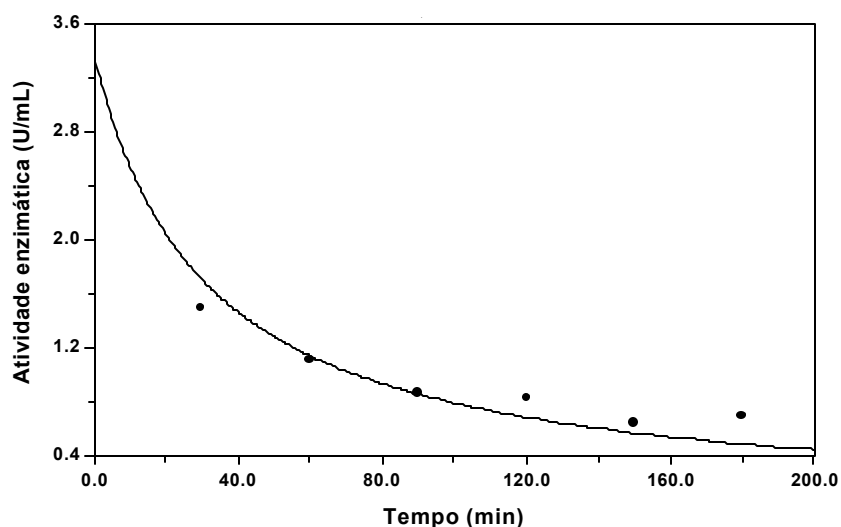


Figura 10 – Efeito do tempo de pré-incubação na temperatura de 50 °C, na atividade α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada. Cada ponto representa a média de três repetições. Os valores de desvio padrão foram sempre inferiores a 10%.

4.2.1.5. Determinação da constante de Michaelis – Menten (K_M $_{ap}$) e velocidade máxima de reação (V_{max} $_{ap}$)

O efeito da concentração dos substratos p -NPGal, rafinose e melibiose na velocidade da reação catalisada pela enzima α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinadas foi determinado utilizando o método do duplo-recíproco, Lineweaver-Burk, e a curva de Michaelis-Menten.

Para o substrato p -NPGal, os valores de K_M $_{ap}$ e V_{max} $_{ap}$ determinados por regressão não-linear pela curva de Michaelis-Menten foram de 0,30 mM e 2,88 μ mol de p -NP. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 11).

O valor de K_M $_{ap}$ obtido foi equivalente ao encontrado por GUIMARÃES (2001) para hidrólise do p -NPGal pela α -galactosidase purificada de sementes de soja var. Doko em germinação.

Quando determinado pelo método do duplo-recíproco, conforme mostrado na Figura 12, o K_M $_{ap}$ foi de 0,33 mM e a V_{max} $_{ap}$ foi de 2,91 μ mol de p -NP. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

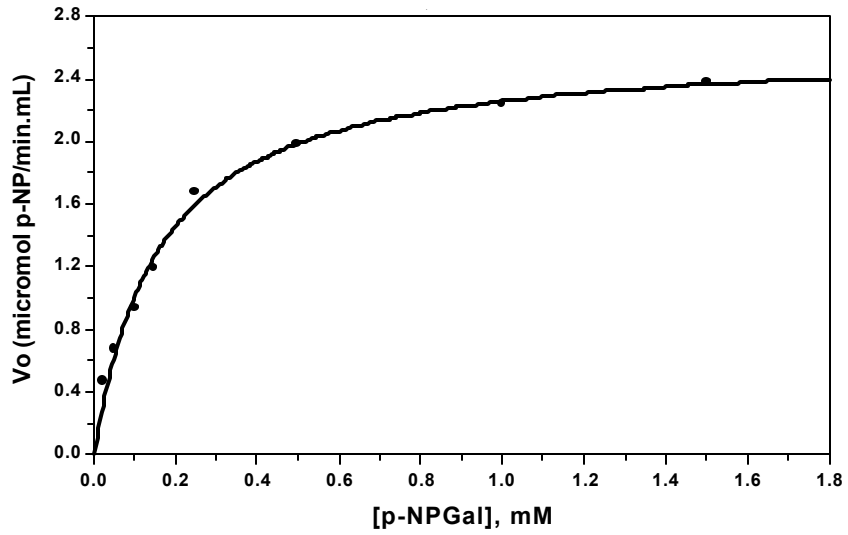


Figura 11 – Efeito da concentração do substrato, ρ -NPGal, na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada.

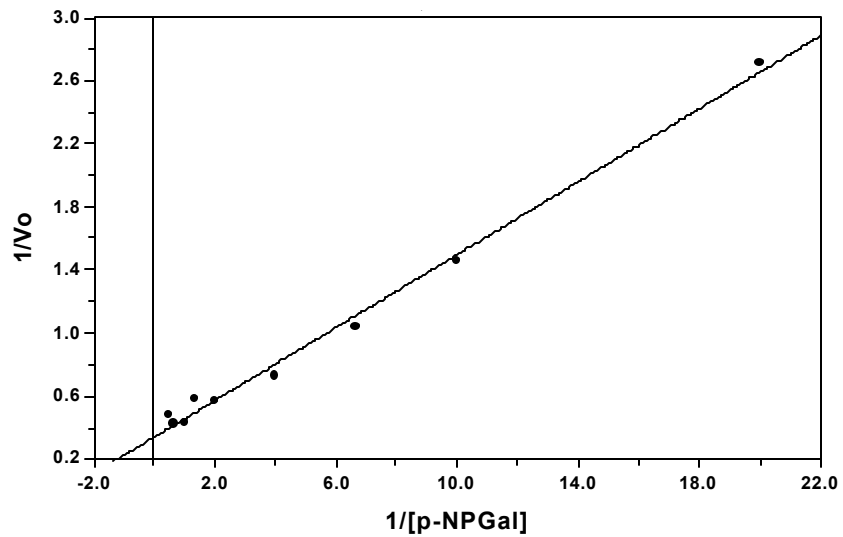


Figura 12 – Determinação do $K_{M\ ap}$ e $V_{max\ ap}$ para hidrólise do ρ -NPGal pela α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada, pelo método do duplo-recíproco.

Para o substrato rafinose, os valores de $K_{M\text{ ap}}$ e $V_{\text{max ap}}$ determinados por regressão não-linear pela curva de Michaelis-Menten foram de 6,16 mM e 3,28 μmol de açúcar redutor formado. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 13).

O $K_{M\text{ ap}}$ e $V_{\text{max ap}}$ calculados pelo método do duplo-recíproco foram de 6,01 mM e 3,32 μmol de açúcar redutor formado. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 14). Este valor está de acordo com GUIMARÃES (2001) que, trabalhando com α -galactosidase purificada de soja var. Doko em germinação, encontrou valor de K_M para rafinose de 5,53 mM.

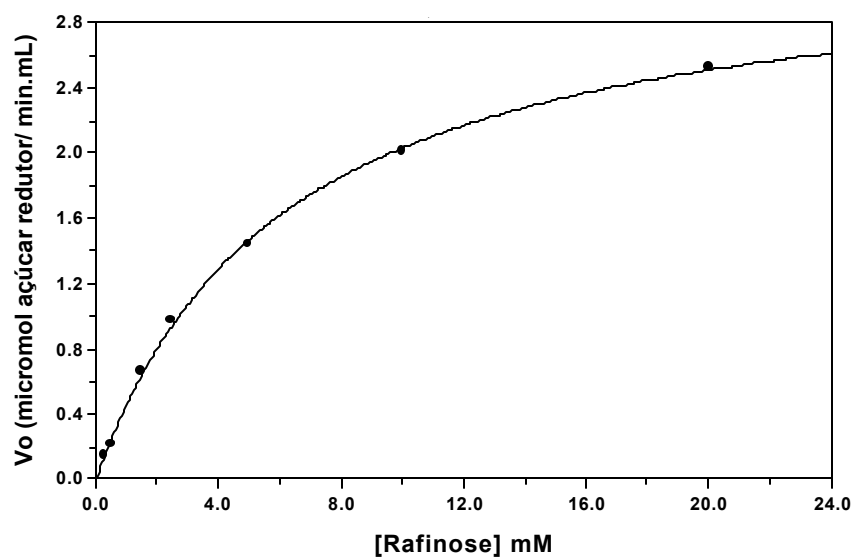


Figura 13 – Efeito da concentração do substrato, rafinose, na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada.

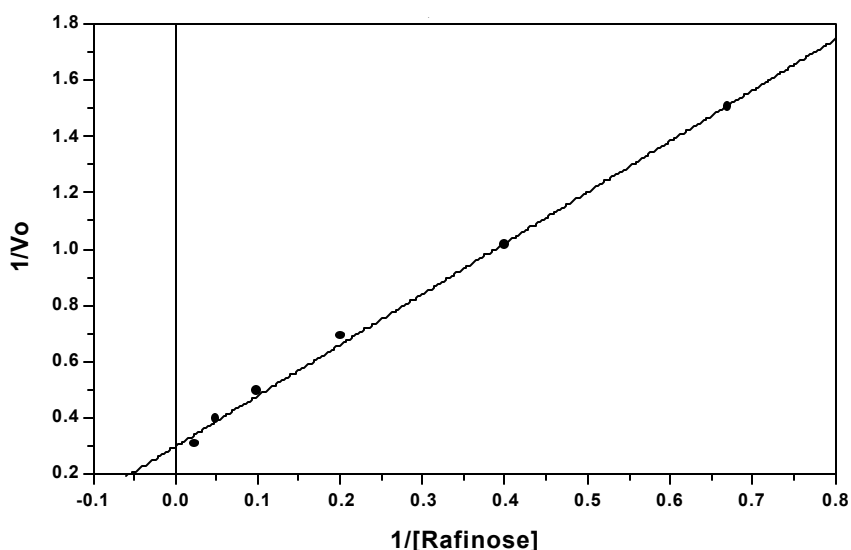


Figura 14 – Determinação do K_M ap e V_{max} ap para hidrólise da rafinose pela α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada, pelo método do duplo recíproco.

Para o substrato melibiose, os valores de K_M ap e V_{max} ap determinados por regressão não-linear pela curva de Michaelis-Menten foram 0,63 mM e 0,20 μmol de glicose formada. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 15)

Utilizando o método do duplo-recíproco, os valores de K_M ap e V_{max} ap foram de 0,42 mM e 0,17 μmol de glicose formada. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 16). Valor de K_M da α -galactosidase para o substrato melibiose de 5,34 mM foi encontrado por GUIMARÃES (2001).

É importante ressaltar que neste trabalho a α -galactosidase foi apenas parcialmente purificada de sementes de soja em germinação, o que pode explicar a diferença entre os valores de K_M obtidos e aqueles valores encontrados por GUIMARÃES (2001), que trabalhou com α -galactosidasas purificadas de sementes de soja.

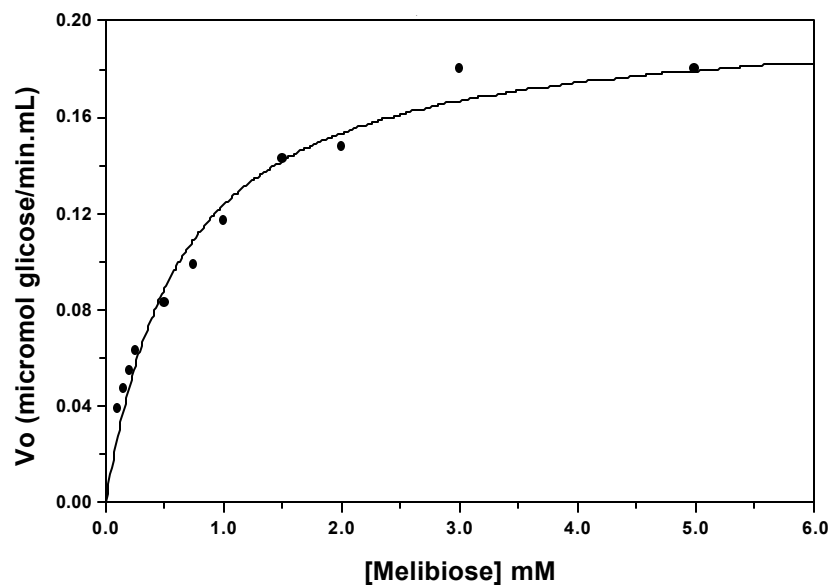


Figura 15 – Efeito da concentração do substrato, melibiose, na velocidade da reação catalisada pela α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada.

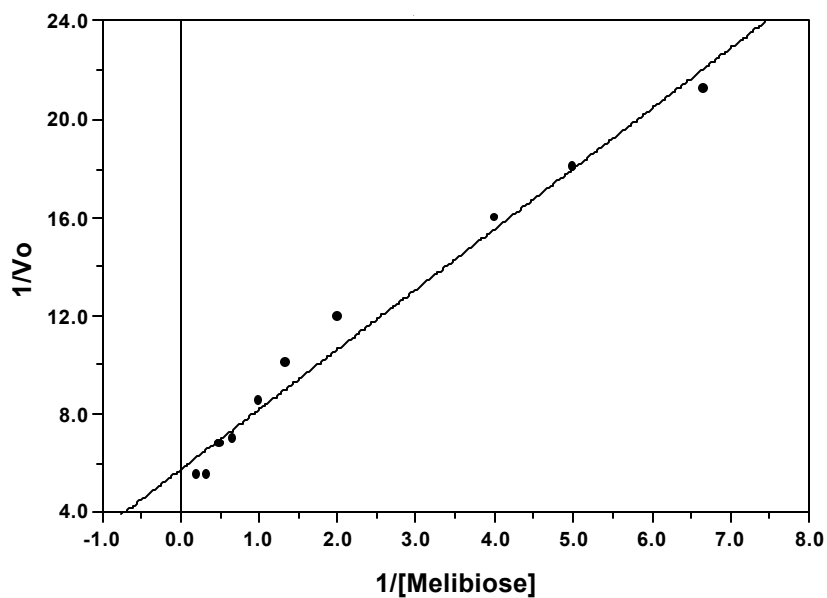


Figura 16 – Determinação do K_M ap e V_{max} ap para hidrólise da melibiose pela α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinada, pelo método do duplo recíproco. Os valores do inverso da velocidade e da concentração do substrato foram calculados a partir dos dados da Figura 15.

4.2.1.6. Determinação da atividade de α -galactosidase contra substratos específicos

A enzima α -galactosidase de soja var. CAC-1 semi-purificada foi ensaiada com outros substratos, de acordo com os procedimentos descritos em Material e Métodos.

Quadro 5 – Atividade relativa da α -galactosidase de soja variedade CAC-1 semi-purificada contra vários substratos

Substrato	Concentração (mM)	Atividade relativa (%)
ρ NP- α -Gal	0,5	100
ρ NP- β -Gal	0,5	0
σ NP- β -Gal	0,5	0
ρ NP- α -Glc	0,5	0
ρ NP- α -Xil	0,5	0
ρ NP- α -Ara	0,5	0
ρ NP- α -Man	0,5	0
Rafinose	40	143,02
Estaquiose	40	50,76
Melibiose	40	7,9
Sacarose	40	7,78
Maltose	40	5,53
Lactose	40	4,63

Todas as atividades relativas foram calculadas em relação a atividade contra o substrato ρ -NPGal, que foi considerada como 100 %.

De acordo com os dados obtidos, conclui-se que a enzima α -galactosidase semi-purificada de soja var. CAC-1 hidrolisou o ρ -NPGal, mas não os outros substratos sintéticos contendo resíduos de açúcar diferentes de galactose ou vários outros açúcares, inclusive a galactose em posição β . A enzima apresentou atividade relativa de 143,02% para rafinose e 50,76% para

estaquiose, indicando que essa enzima apresenta alta capacidade de hidrólise sobre os oligossacarídeos. O fato de hidrolisar lactose, maltose e sacarose sugere que a enzima semi-purificada não apresenta uma especificidade absoluta ou que na preparação enzimática existiam outras proteínas com atividade enzimática.

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

O efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da α -galactosidase foi determinado pré-incubando soluções destes compostos com a enzima semi-purificada por 15 min, a 40 °C (Figura 17), seguido da realização do ensaio normal para atividade de α -galactosidase.

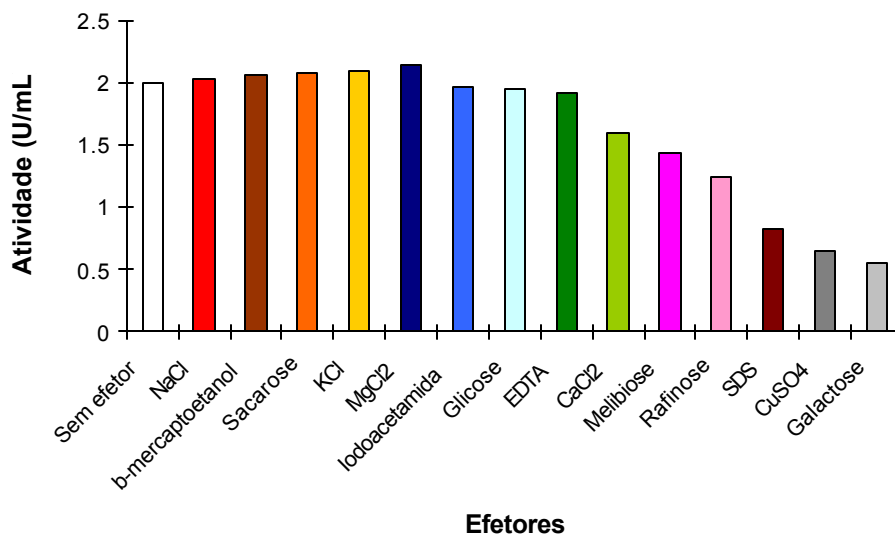


Figura 17 – Efeito de íons, agentes redutores, açúcares na atividade da α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja var. CAC-1 germinadas.

A atividade da enzima apresentou muito baixa ou nenhuma inibição por cloreto de sódio, β -mercaptoetanol, sacarose, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, iodoacetamida, glicose e EDTA. A atividade da enzima foi levemente inibida por cloreto de cálcio, melibiose e rafinose e sofreu forte inibição por SDS, sulfato de cobre e galactose.

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

Muitas formas de α -galactosidase purificadas de microrganismos e plantas são inibidas por galactose. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com GUIMARÃES et al. (2001), os quais demonstraram que a galactose é um inibidor competitivo para a α -galactosidase.

4.2.1.8. Hidrólise dos oligossacarídeos no extrato de soja desengordurado

O extrato de soja desengordurado foi analisado quanto aos seus teores de carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas.

Quadro 6 – Avaliação nutricional do extrato de soja desengordurado

Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Cinzas (%)
32,3	59,5	0,04	8,2

De acordo com o teor de proteína obtido, pode-se afirmar que o produto analisado se enquadra na categoria de farinha de soja, uma vez que esta apresenta teores de proteínas em torno de 50% (MOREIRA, 1999).

Amostras do extrato de soja desengordurado reconstituído com água na proporção de 1:10 (p/v) foram incubados com 6 U de α -galactosidase semi-purificada de soja var. CAC-1, sob agitação, por 0 a 6 h, a 40 °C. Após esses tempos, as amostras foram congeladas, liofilizadas e os açúcares solúveis

extraídos e analisados por HPLC. Como controle, o extrato de soja desengordurado foi incubado com enzima semi-purificada fervida, nas mesmas condições.

Quadro 7 – Porcentagem de hidrólise dos oligossacarídeos pela α -galactosidase semi-purificada das sementes de soja var. CAC-1 germinada, presentes no extrato de soja desengordurado.

Tempos de hidrólise (h)	Teor de rafinose (%)	Redução (%)	Teor de estaquiose (%)	Redução (%)
0	1,29	-	5,0	-
2	0,22	82,3	2,2	55,9
4	0,21	83,5	1,72	65,5
6	0,13	89,2	1,38	72,3

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 (não mostrados). Os ensaios foram realizados em triplicata e representam as médias dos valores obtidos.

De acordo com os dados do Quadro 7, verifica-se que, após 6 h de incubação do extrato de soja desengordurado com a α -galactosidase, houve redução de 89,2% do teor de rafinose e 72,3% do teor de estaquiose. Entretanto, a maior percentagem de redução dos níveis de rafinose e estaquiose ocorreu após 2 horas de hidrólise. Os resultados obtidos demonstram que ocorreu hidrólise de rafinose e estaquiose. Estava presente na preparação enzimática somente atividade de α -galactosidase, que hidrolisou as ligações α -1,6 presentes na rafinose e estaquiose.

MULIMANI et al. (1997) utilizando α -galactosidase de sementes de guar conseguiram obter uma hidrólise dos oligossacarídeos da farinha de soja de 90,4% da rafinose e 91,9% da estaquiose. Entretanto, os autores utilizaram 12,8 U de enzima não purificada/g de farinha. SANNI et al. (1997) estudaram o

efeito da adição de α -galactosidase de *Lactobacillus plantarum* em produtos derivados de sementes de soja. A enzima foi adicionada ao leite de soja e promoveu redução no teor de oligossacarídeos de 71,9% de rafinose, 77,9% de estaquiose e 86,1% de sacarose. O leite preparado com as sementes embebidas teve um teor de redução de 18,6% de estaquiose, 15,9% de rafinose e 6,7% de sacarose. CRUZ e PARK (1982) realizaram um experimento de hidrólise do leite de soja utilizando α -galactosidase não purificada produzida por *Aspergillus oryzae*. A rafinose foi hidrolisada completamente, enquanto a estaquiose foi substancialmente hidrolisada e a sacarose desapareceu completamente. GUIMARÃES et al. (2001) conseguiram reduzir os teores de rafinose e estaquiose em (67 e 53)%, respectivamente, após tratamento do leite de soja por 12 h, a 30 °C, com a α -galactosidase (1,2 U de enzima por mL de leite de soja não desengordurado) parcialmente purificada de sementes de soja em germinação.

A maior eficiência do processo de hidrólise obtida neste experimento, comparada aos observados por GUIMARÃES et al. (2001), deve-se provavelmente à maior temperatura e quantidade de enzima empregada. Esses resultados indicam que a enzima α -galactosidase de soja em germinação apresenta grande eficiência para hidrolisar os RO presentes no leite de soja. Entretanto, é necessário aprimorar ainda mais as condições para o processamento do leite de soja, visando o desenvolvimento de um biorreator que possa servir de modelo para futura aplicação industrial.

4.3. Purificação de α -galactosidase de sementes de soja var. CAC-1 pelo Protocolo 2

Um segundo protocolo de purificação de α -galactosidase foi estabelecido com o objetivo de aumentar o rendimento do processo.

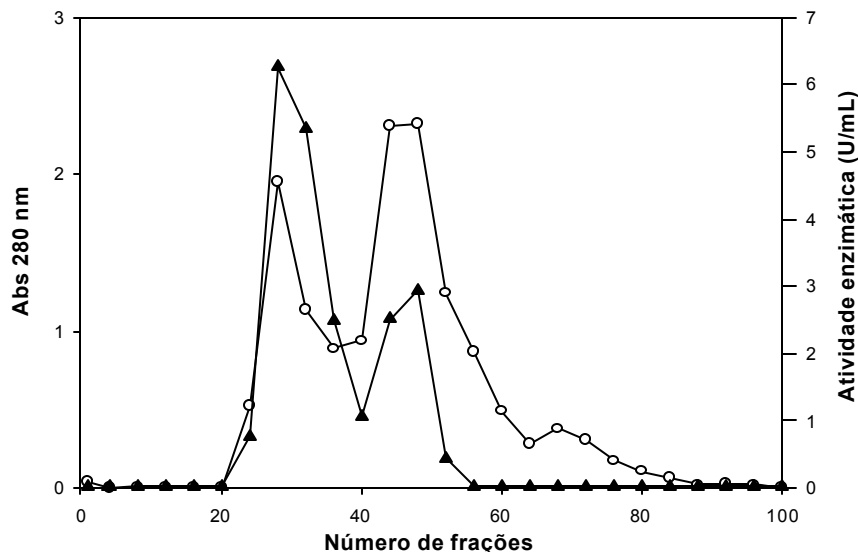


Figura 18 – Perfil da cromatografia da amostra de α -galactosidase de soja var. CAC-1 germinada, proveniente do fracionamento com sulfato de amônio, em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. Atividade de α -galactosidase (▲); proteínas (○).

O perfil de eluição da amostra enzimática em coluna de Sephadex G-100 apresentou dois picos protéicos com alta atividade de α -galactosidase.

Tanto na cromatografia de troca iônica, utilizada no protocolo 1 de purificação, quanto na cromatografia de filtração em gel, utilizada no protocolo 2, pode ser claramente observada a eluição de duas frações protéicas contendo atividade de α -galactosidase, sugerindo fortemente a presença de, pelo menos, duas formas da enzima. Resultados similares foram obtidos por GUIMARÃES et al. (2001) que, trabalhando com purificação de α -galactosidase de sementes de soja em germinação, encontraram duas formas da enzima. Também DEY et al. (1982) utilizaram uma coluna de Sephadex G-100 para separar duas formas de α -galactosidasas de sementes de *Vicia faba*. SOMIARI e BALOGH (1995), purificando α -galactosidase do *Aspergillus niger*, encontraram três picos de atividade após cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-100.

O resumo dos processos de purificação está mostrado no Quadro 8. A amostra foi purificada 21,33 vezes, com o rendimento final de 44,0 % da atividade enzimática.

Quadro 8 – Resumo dos processos de purificação da α -galactosidase de sementes de soja germinando var. CAC-1, pelo protocolo 2

Étapas de Purificação	Prot. total (mg)	Ativ. total (U)	Ativ. específica (U/mg)	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	4672,50	135,0	0,030	1,00	100,00
Precipitação ácida	2220,00	122,5	0,055	1,83	90,70
Fracionamento com sulfato de amônio (20-50%)	176,50	40,45	0,230	7,66	30,00
Sephadex G-100	91,84	59,36	0,640	21,33	44,00

1 U = μ mol de pNP formado por minuto por mL de extrato enzimático.

Os resultados apresentados no quadro acima demonstram que tanto o rendimento quanto o grau de purificação foram significativamente superiores, quando comparados aos obtidos na purificação pelo protocolo 1.

5. CONCLUSÕES

- Sementes de soja germinadas por 60 h apresentaram alta atividade de α -galactosidase.
- A α -galactosidase semi-purificada de sementes de soja apresentou atividade máxima na faixa de pH de 5–6 e temperatura de 50 °C.
- A enzima manteve em torno de 100% da atividade original após pré-incubação por 3 h a (35 e 40) °C, mas somente 50% da atividade original foi mantida após pré-incubação a 45 °C.
- A meia-vida da enzima foi de 337,30 min a 45 °C.
- O extrato de soja desengordurado, quando submetido ao tratamento enzimático pela enzima α -galactosidase de soja da variedade CAC-1 germinada, sofreu hidrólise de (89,2 e 72)% nos teores de rafinose e estaquiase, respectivamente.
- A adição de α -galactosidase ao extrato de soja hidrolisou uma fração significativa dos carboidratos não digeríveis, estaquiase e rafinose, podendo diminuir a flatulência causada por esses oligossacarídeos e, assim, aumentar o uso desta fonte protéica vegetal na alimentação humana e animal. Além disso, essa enzima apresenta características cinéticas compatíveis com as exigências para sua utilização em processos industriais, visando a diminuição nos teores dos oligossacarídeos de rafinose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.) Merril. **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.

BACH KNUDSEN, K.E.; LI, B.W. Determination of oligosaccharides in protein-rich feed-stuffs by gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.39, p.689-694, 1991.

BARNES, S.; KIM, H.; XU, J. Soy in the prevention and treatment of chronic diseases. In: **Anais CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA**, 1999, 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.

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. Sucrolyl oligosaccharides 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.

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

CRUZ, R.; BATISTELA, J.C.; WOSIACKI, G. Microbial α -galactosidase for soymilk processing. **Journal Food Science**. v.46, p.1196-1200, 1981.

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

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

de REZENDE, S.T. **Teores de oligossacarídeos de rafinose em soja, purificação e caracterização de invertases e α -galactosidas 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. α -galactosidase from sweet chestnut seeds. **Phytochemistry**, v.20, p.1493-1496, 1981.

DEY, P.M. In: DEY, P.M.; DIXON, R.A. **Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants**. New York: Academic Press, 1985, p.53-129.

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

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

DEY, P.M.; HUSTLER, M.J.; PRIDHAM, J.B.; SUMAR, N. Factors affecting the extraction and the relative proportions of multiple forms of plant α -galactosidases. **Phytochemistry**, v.21, p.1557-1562, 1982.

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

DUFFAUD, G.D.; McCUTCHEN, C.M.; LEDUC, P.; PARKER, K.N.; KELLY, R.M. Purification and characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermogota neaplitan* 5068. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.167-177, 1997.

DUFFUS, C.M.; SLAUGHTER, J.C. **Seeds and their uses**. N.Y: John Wiley, 1980, p.1-34.

EDWARDS, M.; SCOTT, C.; GIDLEY, M.J.; REID, J.S.G. **Planta**, v.87, p.67-74, 1992.

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.

FALCO, A.L.P.; DURRANT, L.R.; FRANCO, T.T. Purification of α -galactosidase from seeds of *Sesbania marginata*. **Brasilian Journal of Chemical Engineering**, v.17, p.819-825, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Protein quality evaluation**, Rome: 1991. 66 p. (FAO Food and Nutrition. Paper, 51).

GITZELMANN, R.; AURICCHIO, S. The handling of soy α -galactosidase by a normal and galactosemic child. **Pediatrics**, v.36, p.231-232, 1965.

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

GRUPTA, Y.P. Nutritive value of food legume. In: ARORA, S.K. **Chemistry and Biochemistry of legumes**. India: Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi, 1983. p.187-327.

GUIMARÃES, V.M. **Purificação e caracterização de α -galactosidases 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 α -galactosidases 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 fruactooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Agricultural Biology Chemistry**, v.53, p.667-673, 1989.

HUSTED, H., KRONER, K.K.KULA, M.R. Applications of phase partitioning in biotechnology. In: WALTER, H., BROOKS, D.E., FISHER, K., **Partitioning in in Aqueous Two-Phase Systems**, 1985.

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.

KOBAYASHI, H.; SUZUKI H. Studies on the decomposition of raffinose by α -galactosidase of mold. II. Formation of mold pellet and its enzyme activity. **Journal Ferm. 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 α -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola* sp. In solid-state fermentation and its application in soyamilk hydrolysis. **Process Biochemistry**, v.33, p.337-343, 1998.

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 Soc**, 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 Biology 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 α -galactosidase. **Journal Science Food Agricultural**, v.78, p.175-181, 1998.

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

MITCHELL, D.E.; GADUS, V.; MADORE, M.A. **Plant Physiology**, v.99, p.959-965, 1992.

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 α -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 α -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 Soc**, 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 Soc**. 1975.

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.

SANNI, A.I.; ONILUDE, A.A.; OGUNDOYE, O.R. Effect of bacterial galactosidase treatment on the nutritional status of soybean seeds and its milk derivate. **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.

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.

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. β -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.

TANUJA, S.; SRINIVAS, N.D.; GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction coupled with ultrafiltration for purification of amyloglucosidase. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.63-68, 2000.

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

USDA (<http://www.usda.gov/>), 2001.

VEIGA, G.V. **Efeito de complexantes e enzimas proteolíticas sobre o teor protéico do leite de soja (Glicine Max (L.) merrill) extraído da variedade UFV-1.** Lavras, MG: ESAL, 1984. 86p. Tese (M.S.) – Escola Estadual de Lavras, 1984.

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 Nutrition**, v.106, p.466-470, 1976.

WIGGINS, H.S. Nutritional value of sugars and related compounds undigested in the small gut. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.43, p.69-75, 1984.

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 α -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 α -galactosidase. **Gene (Amst.)**, v.140, p.227-231, 1994.